



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL  
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA**

**KYLVA ROCHA DE CASTRO E SILVA**

**QUIRÓPTEROS COMO HOSPEDEIROS DO FUNGO  
*Coccidioides posadasii*: DESCRIÇÃO DO PRIMEIRO  
REGISTRO DE ISOLAMENTO**

**FORTALEZA/CEARÁ**

**2011**

**Universidade Federal do Ceará  
Faculdade de Medicina  
Departamento de Patologia e Medicina Legal  
Programa de Pós-graduação em Microbiologia Médica**

Kylvia Rocha de Castro e Silva

**Quirópteros como hospedeiros do fungo *Coccidioides posadasii*: descrição do primeiro registro de isolamento**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica.

Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rossana de Aguiar Cordeiro.

Co – orientador: Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim.

**FORTALEZA/CEARÁ**

**2011**

S579q Silva, Kylvia Rocha de Castro e.

Quirópteros como hospedeiros do fungo *Coccidioides posadasii* / Kylvia Rocha de Castro e Silva – Fortaleza, 2011.

126 f : Il. Color.

Dissertação (submetida a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica) – Universidade Federal do Ceará - UFC, 2011.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro

1. *Coccidioides posadasii*. 2. Quirópteros. 3. Ecoepidemiologia. Título.

CDD 579.772

Kylvia Rocha de Castro e Silva

**QUIRÓPTEROS COMO HOSPEDEIROS DO FUNGO *Coccidioides posadasii*:  
DESCRIÇÃO DO PRIMEIRO REGISTRO DE ISOLAMENTO**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica. Área de concentração: Microbiologia Humana e Animal.

Data da Defesa: 19 de dezembro de 2011.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rejane Pereira Neves  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

---

Dr. Benedito Neilson Rolim  
Secretaria da Saúde do Estado do Ceará – SESA  
Núcleo de Endemias Transmissíveis por Vetores – NUEND

---

Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha  
Faculdade de Veterinária  
Universidade Estadual do Ceará – UECE

---

Dr<sup>a</sup>. Rossana de Aguiar Cordeiro (Orientadora)  
Departamento de Patologia e Medicina Legal  
Universidade Federal do Ceará – UFC

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Jesus Cristo, nosso Senhor,  
por estar sempre presente em minha vida.  
À Santo Expedito por interceder por mim.  
À Nossa Senhora por me guardar e me proteger.  
À minha família, em especial, avó, mãe, irmãos, marido e filho,  
fonte de todo amor que existe em mim.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por todos os momentos de minha vida, pela presença necessária e por iluminar meu caminho com pessoas maravilhosas, como um verdadeiro Pai.

Ao meu filho, Danilo Rocha de Castro e Silva, que mesmo sem citar uma única palavra sobre pós-graduação, foi meu maior incentivo, pelo sorriso sincero que me dá coragem, pelo carinho, abraço e sentimento forte.

Ao meu esposo, Davi Jones de Sousa e Silva, pelo seu incentivo constante, por reconhecer seu importante papel como coluna de sustentação em minha vida, pelo seu imenso amor e por me fazer feliz.

À minha mãe, Terezinha Aurení Rocha de Castro, por sempre acreditar em mim, por abdicar de seu tempo e gostos por nós e por seu amor incondicional.

À minha avó, Maria José da Silveira, por ser minha segunda mãe, pelo carinho e amor sempre expressos em palavras e gestos.

Aos meus irmãos, Kilber Rocha de Castro e Kácio Rocha de Castro, por me compreender em momentos de aflição e pelo apoio manifestado.

Às minhas eternas amigas, Kerly Shamyra da Silva Alves, Aline de Oliveira Vítor, Cliciane Lopes Bentes, Marcia Helena Rodrigues Rocha, Gláucia Maria Cavalcante Maia, Amelba Cynthia Mesquita Mota, Débora Sousa de Macêdo e Francisca Elisa de Sousa e Silva, pelo apoio emocional e prático.

À minha orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rossana de Aguiar Cordeiro, para quem as palavras são poucas pelo enorme carinho que tenho, pelo exemplo de pessoa e profissional, por ter acreditado em mim, por sempre realizar com excelência seu papel de formadora, por suas palavras, sempre utilizadas em momento oportuno.

Ao Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim, por sempre transmitir ensinamentos, de sua maneira, mesmo sem perceber e pelo incentivo direto ou indireto.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, pelos esclarecimentos de minhas dúvidas, pela disponibilidade e pelo sorriso sem igual.

Ao Prof. Marcos Fábio Gadelha Rocha, pela paciência e compreensão, pelo “Bom dia!” e pela ajuda na adequação e correção do artigo.

Aos membros da banca de qualificação, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Camila Gomes Virgínio Coelho e Dr<sup>ª</sup>. Maria Auxiliadora Bezerra Fechine, pela disponibilidade, considerações e sugestões durante a avaliação deste trabalho.

Aos membros da banca de defesa, Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha, Prof. Dr. Benedito Neilson Rolim e Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rejane Pereira Neves, por terem aceitado participar deste momento, pelo zelo na avaliação deste trabalho, sugestões e críticas construtivas.

Ao Prof. Francisco Airton Castro da Rocha, por ceder materiais necessários para procedimentos laboratoriais.

Ao Prof. Roberto Wagner Bezerra de Araújo por permitir a análise histológica.

A Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lília Maria Carneiro Câmara e ao Prof. José Ajax Nogueira Queiroz pelos esclarecimentos sobre o teste sorológico de imunodifusão e interpretação dos resultados.

A todos os educadores que participaram de minha formação no curso de Mestrado em Microbiologia Médica – UFC, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, Prof. Dr. André Jalles Monteiro, Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha, Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Fernanda Edna Araújo Moura, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Silvia Helena Barem Rabenhorst, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rossana de Aguiar Cordeiro, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Aparecida Tieme Nagao Dias, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cibelle Barreto Mano de Carvalho, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lília Maria Carneiro Câmara e Prof<sup>ª</sup>. Dra<sup>ª</sup> Tereza de Jesus Pinheiro Gomes Bandeira, pela possibilidade de aprendizado.

À equipe da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, em especial, Francisco Bergson Pinheiro Moura, Raffael de Oliveira Júnior e Naylê Francelino Holanda Duarte, pela possibilidade e apoio na captura dos morcegos estudados no trabalho.

Aos que fazem o Campus Avançado do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia em Jaguaribe – Ceará pelo apoio e incentivo a conclusão do curso de Mestrado.

A todos os colegas do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), Charles Ielpo Mourão, Renato Evando Moreira Filho, Carlos Eduardo Cordeiro Teixeira, George Cândido Nogueira, Paula Bittencourt Vago, Sabrina Tainah da Cruz Silva, Lucas Pereira de Alencar, Ramila de Brito Macedo, Ângela Donato Maia Malaquias, Rita Amanda Chaves de Lima, Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia, Maria Auxiliadora Bezerra Fechine, Juliana Fernandes Pereira, Érica Pacheco Caetano, Kharla Kharolyne Nobre Rabelo Patoilo, Pedro Henrique Rodrigues, Manoel Paiva de Araújo Neto, João Jaime Giffoni Leite, Lívia Gurgel do Amaral Valente e Joyce Fonteles Ribeiro, porque afinal, somos um grupo, e sempre, mesmo que de forma mínima, há ajuda mútua, porém meu agradecimento em especial a Francisca Jakelyne de Farias Marques, pelo companheirismo e amizade.

Aos estudantes de iniciação científica do CEMM, em especial a Rebecca de Aguiar Cordeiro, pela intensa colaboração no desenvolvimento deste trabalho, por compartilhar inúmeros momentos de trabalho e alegrias, e Heuziwanne Tavares Leite Andrade, Danielle Fernanda de Oliveira Miranda, pelo apoio em paralelo.

Aos ex-alunos do CEMM, Camila Gomes Virgínio Coelho e Lauro Perdigão Vieira Neto, pelos “plantões tira-dúvidas” e gentileza.

À turma de pós-graduação de 2010.1, Débora Menezes da Costa, Hermínio Benítez Rabelo Mendes, Paula Brito e Cabral, Thially Braga Gonçalves, e em especial, Mariana Oliveira Arruda, pela amizade e auxílio recíprocos durante todo o curso.

À Carolinda Vilma Soares de Oliveira, secretária e “psicopedagoga” do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, pela atenção, disponibilidade e amizade.



A todos os funcionários da Universidade Federal do Ceará, em especial a Michele Pereira Queiroz, Cláudio Barros Chaves, José Airton Correia da Rocha, Daniel Teixeira Lima, Eliane Nascimento Nunes, Nayana Soares Gomes, Monalisa Cunha e Terezinha de Jesus Santos Rodrigues que não medem esforços para ajudar.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP, pelo apoio financeiro.

“Quebraremos as barreiras que nós mesmos erguemos,  
quando sinceramente apreciarmos os demais e a nós mesmos”.

Lucas Kastrup

## RESUMO

A ordem Chiroptera mostra-se como reservatório para vários agentes infecciosos, incluindo protozoários, bactérias, vírus e fungos. A fim de investigar a eco-epidemiologia de *Histoplasma capsulatum* no Nordeste do Brasil, foram capturados 83 morcegos em áreas urbanas e rurais no estado do Ceará, em coletas diurnas e noturnas, durante o período de agosto de 2010 a março de 2011. Após eutanásia, fragmentos de baço, fígado e pulmão foram removidos, macerados e alíquotas de 100µL foram semeadas em placas contendo ágar BHI modificado, as quais foram incubadas por até seis semanas nas temperaturas de 28°C e 35°C. Alíquotas remanescentes de cada material macerado foram estocadas a -20°C. Embora o fungo não tenha sido isolado em nenhuma amostra, após 21 dias de incubação à 35°C foi observado o crescimento de uma colônia fúngica sugestiva de *Coccidioides* spp. em amostra de pulmão da espécie *Carollia perspicillata*. Fragmentos de pulmão do morcego retirados do estoque a -20°C e analisados ao microscópio óptico revelaram estruturas esféricas semelhantes a forma parasitária do fungo. A colônia foi investigada por meio do teste de reversão *in vivo* em modelo murino, com observação dos animais inoculados por até quatro semanas. A identificação molecular das culturas foi realizada por reação de PCR específica para *C. posadasii*, empregando os oligonucleotídeos *Coi9-R* e *Coi9-F*. Por fim, amostras de macerados dos pulmões, baço e fígado foram investigadas quanto à presença de anticorpos ou antígenos específicos para *C. posadasii*, bem como quanto à presença de anticorpos anti-*Histoplasma*, por meio da técnica de imunodifusão. Esférulas características de *Coccidioides* spp. foram visualizadas em amostras de pulmão dos camundongos infectados experimentalmente. Análise molecular das culturas isoladas de pulmão de *C. perspicillata*, bem como dos órgãos dos camundongos, mostraram banda de aproximadamente 630 pb, característica de *C. posadasii*. Por meio de reação de imunodifusão, foram detectados dois animais reagentes para antígenos de *Coccidioides*. Os animais pertenciam às espécies *Glossophaga soricina* e *Desmodus rotundus* e um animal da espécie *G. soricina* anticorpo-positivo para *Coccidioides*. Não foi observada presença de anticorpos anti-*Histoplasma* em nenhuma das amostras. O presente estudo mostra o primeiro isolamento de *C. posadasii* em quirópteros. Adicionalmente, de forma inédita, detectou-se de antígenos e anticorpos específicos para *C. posadasii* nestes animais. Faz-se necessário o estudo dos quirópteros na ecoepidemiologia do patógeno.

**Palavras-chave:** *Coccidioides posadasii*, quiróptero, ecoepidemiologia.

## ABSTRACT

The order Chiroptera is shown as a reservoir for various infectious agents, including protozoan, bacteria, virus and fungi. To investigate the eco-epidemiological aspects of *Histoplasma capsulatum* in Northeast Brazil, 83 bats were captured in urban and rural areas in Ceará, collected in day and night, during the period August 2010 to March 2011. After euthanasia, fragments of spleen, liver and lung were removed, macerated and 100 µL aliquots were plated on agar containing modified BHI, which were incubated for up to six weeks at temperatures of 28 °C and 35 °C. Aliquots of each remaining macerated material stored at -20 °C. Although the fungus was not isolated in any samples, after 21 days at 35 °C was observed the growth of a fungal colony suggestive of *Coccidioides* spp. in lung samples of the species *Carollia perspicillata*. Fragments of the bat lung removed from storage at -20 °C and analyzed by optical microscopy revealed spherical structures similar to the shape of the parasitic fungus. The colonies were investigated by means of the reversion *in vivo* in a murine model, with observation of the animals inoculated up to four weeks. The molecular identification of cultures was performed by PCR specific for *C. posadasii*, using the oligonucleotides *Coi9-R* and *Coi9-F*. Finally, samples of macerated lung, spleen and liver were investigated for the presence of antibodies or antigens specific for *C. posadasii*, as well as the presence of anti-*Histoplasma*, by immunodiffusion. Spherules of *Coccidioides* spp. features were visualized in lung samples of mice experimentally infected. Molecular analysis of cultures isolated from lungs of *C. perspicillata*, as well as organs of mice, showed approximately 630 pb band, characteristic of *C. posadasii*. By immunodiffusion reaction, two animals were detected reagents for *Coccidioides* antigens. The animals belonged to the species *Glossophaga soricina* and *Desmodus rotundus* and an animal of the species *G. soricina* antibody-positive for *Coccidioides*. There was no presence of anti-*Histoplasma* in any sample. The present study shows the first isolation of *C. posadasii* in bats. Additionally, in an unprecedented manner, we detected antigens and antibodies specific to *C. posadasii* in these animals. It is necessary to the study of bats in ecoepidemiology the pathogen.

Keywords: *Coccidioides posadasii*, bats, eco-epidemiology.

## ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>22</b>
1.1	Fungos.....	22
1.2	Aspectos Históricos da Coccidioidomicose.....	23
1.3	Características de Gênero <i>Coccidioides</i> .....	27
1.4	Ecoepidemiologia das Espécies do Gênero <i>Coccidioides</i> .....	30
1.5	Virulência e Patogenia.....	31
1.6	Forma Clínicas e Fatores de Risco.....	34
1.7	Diagnóstico Laboratorial.....	36
1.8	Tratamento e Profilaxia.....	38
1.9	Coccidioidomicose e animais.....	40
1.10	Aspectos Gerais dos Quirópteros.....	40
1.11	Importância Ecológica dos Morcegos.....	44
1.12	Quirópteros e Doenças Emergentes e Re-emergentes.....	45
	1.12.1 Infecções Fúngicas e Morcegos.....	48
1.13	Características das Espécies de Quirópteros Capturadas neste Estudo.....	51
	1.13.1 <i>Molossus molossus</i> .....	51
	1.13.2 <i>Glossophaga soricina</i> .....	51
	1.13.3 <i>Sturnira lilium</i> .....	53
	1.13.4 <i>Carollia perspicillata</i> .....	54
	1.13.5 <i>Trachops cirrhosus</i> .....	55
	1.13.6 <i>Desmodus rotundus</i> .....	56
	1.13.7 <i>Anoura geoffroyi</i> .....	57
<b>2</b>	<b>PERGUNTAS DE PARTIDA.....</b>	<b>59</b>

<b>3</b>	<b>HIPÓTESES CIENTÍFICAS</b> .....	59
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	60
4.1	Objetivo Geral.....	60
4.2	Objetivos Específicos.....	60
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	61
5.1	Local de Estudo.....	61
5.2	Aspectos Éticos.....	63
5.3	Quirópteros.....	63
5.4	Teste de Reversão <i>in vivo</i> .....	65
5.5	Análise Molecular.....	66
	5.5.1 Extração de DNA de Culturas Positivas.....	66
	5.5.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	67
5.6	Análise Imunológica.....	68
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	70
6.1	Aspectos Relacionados aos Quirópteros.....	70
6.2	Isolamento Fúngico.....	73
6.3	Microscopia Direta.....	74
6.4	Teste de Reversão <i>in vivo</i> .....	74
6.5	Análise Molecular.....	76
6.6	Análise Imunológica.....	76
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	77
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	83
<b>9</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	84
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	85
	<b>ANEXOS</b> .....	100

Anexo I – Parecer do Comitê de Ética para o Uso de Animais.....	100
Anexo II – Soluções e técnica de coloração da Prata-Metenamina.....	103
Anexo III – Fonte das figuras.....	106
Anexo IV – Publicações.....	108

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Pesquisadores que contribuíram para as primeiras descobertas sobre a Coccidioidomicose: Alejandro Posadas (A), Emmet Rixford (B), William Ophüls (C) e Hebert Moffitt (D)..... 24
- Figura 2 A natureza geofílica de *Coccidioides* spp. foi descoberta por Robert Stewart (A) e Karl Meyer (B). Grandes avanços no entendimento dos aspectos epidemiológicos da coccidioidomicose foram realizados por Charles Smith (C)..... 26
- Figura 3 Aspecto evolutivo das mudanças genéticas determinantes para a patogenicidade em *Coccidioides* spp. e suas relações com outras espécies fúngicas. (A) Redução da família de genes envolvidos no metabolismo de material vegetal; (B) Expansões das famílias de genes relacionados às proteases e queratinases, proporcionando uma associação não patogênica com mamíferos; (C) Aquisição e adaptação de genes envolvidos no metabolismo, membrana biológica e produção de micotoxinas, tornando-o capaz de sobreviver no hospedeiro e causar doença; (D) Genes relacionados ao metabolismo primário e secundário, bem como secreção de proteínas, são compartilhados entre *Coccidioides immitis* e *Coccidioides posadasii* e têm sido sujeitos à seleção positiva desde a divergência entre as duas espécies..... 27
- Figura 4 Macromorfologia de *Coccidioides* spp. em Ágar Batata Dextrose, mostrando colônias brancas com textura algodonosa (A). Aspecto micromorfológico de *Coccidioides* spp. revelando hifas hialinas jovens (B) e hifas maduras contendo artroconídios (seta) espaçados por células disjuntoras (C). Montagem tipo lâmina-lamínula com lactofenol azul algodão..... 29
- Figura 5 Aspecto micromorfológico da forma parasitária de *Coccidioides* spp. em tecido pulmonar de camundongos, visualizado em exame direto com KOH 10 % (A), histopatológico corado por PAS (B) e Grocott-Gomori, com observação de endosporos liberados de esférula rompida..... 29
- Figura 6 Ciclo biológico de *Coccidioides* spp. demonstrando as conexões entre



	as fases filamentosa e parasitária. O hospedeiro adquire a infecção pela inalação de artoconídios infectantes dispersos no ar, que no interior do pulmão modifica-se originando uma esférula com endosporos em seu interior. Ao romper-se a esférula libera endosporos que podem reiniciar um ciclo parasitário ou iniciar um ciclo ambiental ao entrar em contato com condições ambientais propícias, convertendo-se para a fase filamentosa. Ao se desenvolverem, as hifas formam artoconídios que tem a capacidade de se desprender do micélio.....	33
Figura 7	Representação esquemática da classificação taxonômica dos quirópteros.....	41
Figura 8	Abrigos naturais e artificiais utilizados pelos quirópteros durante o período diurno: caverna (A); teto de construção (B); folhagens (C); tronco de árvores (D); gruta (E) e caixas d'água (F).....	42
Figura 9	Esquema do processo evolutivo dos hábitos alimentares dos morcegos.....	43
Figura 10	Interações entre os hospedeiros humanos, domésticos e silvestres (A); Modelo ecológico caracterizando o surgimento de doenças emergentes (B).....	46
Figura 11	Distribuição geográfica de doenças e/ou patógenos emergentes e re-emergentes.....	47
Figura 12	Espécimes de <i>Molossus molossus</i> (Família Molossidade) capturados em forro de casa urbana (A) e no interior de casa de temperatura (B).....	51
Figura 13	Morcego nectarívoro da espécie <i>Glossophaga soricina</i> (Família Phyllostomidae, Sub-família Glossophaginae): A) Envergadura do animal; B) Perfil do rosto do animal mostrando a língua característica deste tipo alimentar; C) Morcego de perfil e D) Morcego no abrigo.....	52
Figura 14	Morcego da espécie <i>Sturnira lilium</i> , representante da família Phyllostomidae e Sub-família Stenodermatinae. A) Seta representando listras frontais que caracterizam esta sub-família e B) Perfil do morcego.....	53
Figura 15	Morcego da espécie <i>Carollia perspicillata</i> , representante da família Phyllostomidae e Sub-família Carollinae. A) Envergadura do morcego; B) Morcego de perfil; C) Seta indicando lábio inferior em	

	“V” com uma verruga central rodeada por lobos, característicos da espécie e D) Perfil do rosto do animal.....	55
Figura 16	Morcego da espécie <i>Trachops cirrhosus</i> , representante da família Phyllostomidae e Sub-família Stenodermatinae. A) Seta indicando protuberâncias em forma de verrugas nos lábios e B) Perfil do morcego.....	56
Figura 17	Morcego hematófago da espécie <i>Desmodus rotundus</i> (Família Phyllostomidae, Sub-família Desmodontinae) observados no interior de residência (A) e preso ao tronco de uma árvore (B).....	57
Figura 18	Morcego nectarívoro da espécie <i>Anoura geoffroyi</i> , representante da família Phyllostomidae e Sub- família Glossophaginae.....	58
Figura 19	Mapa representando as cidades do estado do Ceará onde foram realizadas capturas de quirópteros.....	61
Figura 20	Sítios de captura de morcegos. Caminho para coleta noturna em caverna localizada no município de Quixadá (A, B, C); prédio abandonado contendo em seu interior um poço, popularmente denominado de cacimba, indicado por seta branca (D); forro de casa (E).....	62
Figura 21	Isolamento dos órgãos para análise micológica, molecular e sorológica. Nas condições de campo, onde foi utilizado o ponto de apoio para os agentes de endemias (A); Nas condições de laboratório, utilizando fluxo laminar (B, C). Órgãos utilizados para o processamento, fígado, baço e pulmões (D).....	64
Figura 22	Aspectos morfológicos da colônia de <i>Coccidioides posadasii</i> isolada a partir de macerado de pulmão de quiróptero. Macromorfologia da colônia em placa contendo meio BHI modificado (A); micromorfologia da colônia visualizada com adição de lactofenol azul algodão (B); macromorfologia observada em tubo contendo meio ágar batata dextrose (C).....	73
Figura 23	Observação de esférulas da forma parasitária de <i>Coccidioides</i> spp., em macerado de pulmão de quiróptero da espécie <i>Carollia perspicillata</i> : Esférula rompida (A) e Esférula contendo endosporos em seu interior (B).....	74

Figura 24 Visualização de esférulas de *Coccidioides posadasii* em órgãos de camundongos infectados experimentalmente. Preparação tipo lâmina-lamínula com KOH 10% mostrando esférulas em processo de maturação, mostrando grande vacúolo central (A-C); esférula madura liberando endóporos (D). Esférulas maduras repletas de endosporos em preparados histológicos corados por Grocott-Gomori (E, F), Fontana Masson (G, H) e PAS (I, J)..... 75

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Isolamentos de <i>Histoplasma capsulatum</i> em quirópteros.....	49
----------	--	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Descrição dos locais de captura dos morcegos.....	70
Tabela 2	Municípios do estado do Ceará onde foram realizadas as coletas dos quirópteros, indicando espécie, família, sub-família da qual fazem parte estes animais, além da dieta, gênero e número de indivíduos capturados.....	72

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> – Infusão de Cérebro e Coração
CEMM	Centro Especializado em Micologia Médica
CEUA	Comitê de Ética para o Uso de Animais
CF	<i>Complement Fixation</i> – Fixação do Complemento
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EPI	Equipamento de Proteção Individual
FM	Fontana – Masson
HE	Hematoxilina-eosina
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> – Vírus da Imunodeficiência Humana
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos naturais Renováveis
IPECE	Instituto de Pesquisa e Estratégia Econômica do Ceará
KOH	Hidróxido de Potássio
NUVET	Núcleo de Vetores
PAS	Ácido periódico de Schiff
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em cadeia da polimerase
SESA	Secretaria de Saúde
SNC	Sistema Nervoso Central
TBE	Tampão Tris Borato EDTA
TP	<i>Tube precipitin</i> – Precipitação em Tubo

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 FUNGOS

Os fungos são seres eucariontes e heterotróficos, considerados ubíquos e cosmopolita, por estarem presentes em uma diversidade de ambientes e, adaptarem-se à diversas circunstâncias impostas pelo meio (SIDRIM; ROCHA; CORDEIRO, 2004; ALMEIDA, 2008). Desempenham importantes papéis na natureza, sendo responsáveis pela reciclagem da matéria, através da decomposição. Adicionalmente, são utilizados na alimentação, indústria, biotecnologia, agricultura, tendo ainda importância como seres causadores de doenças no homem, plantas e animais (ANDERSON; CAIRNEY, 2004).

As infecções fúngicas são consideradas importantes problemas de saúde pública (CHAKRABARTI; 2005) e, nas últimas três décadas, tem sido observado um aumento na frequência das micoses sistêmicas devido a crescente sobrevivência dos pacientes imunossuprimidos, como aqueles com aids, além da melhoria dos métodos diagnósticos e dos procedimentos cirúrgicos (ESPINEL-INGROFF, 1996; UNIS; OLIVEIRA; SEVERO, 2004). As micoses sistêmicas – aquelas que comprometem um ou mais órgãos profundos (ODDS et al., 2002) – podem ser didaticamente classificadas em duas amplas categorias: micoses oportunistas e endêmicas (PFALLER; DIEKEMA, 2010). Embora o número de patógenos oportunistas seja crescente, os principais agentes correspondem a espécies dos gêneros *Candida* e *Aspergillus*, além de *Cryptococcus neoformans* e *Pneumocystis jirovecii*. As micoses endêmicas, por sua vez, são causadas principalmente por fungos termo-dimórficos, sendo *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides* spp., *Paracoccidioides brasiliensis* e *Blastomyces dermatitidis* os principais agentes (PFALLER; DIEKEMA, 2010).

No Nordeste brasileiro, a coccidioidomicose é considerada uma micose endêmica, uma vez que a região apresenta características geoclimáticas compatíveis com a proliferação do fungo no solo: clima semi-árido com altas temperaturas, baixos níveis pluviométricos, longos períodos de seca, ventos frequentes e solo alcalino (SILVA et al., 1997), tal como observado no interior do Ceará, Nordeste do Brasil.

## 1.2 ASPECTOS HISTÓRICOS DA COCCIDIOIDOMICOSE

Estudos retrospectivos sugerem a existência de infecção por *Coccidioides* spp. desde a pré-história da América do Norte. Galgiani (1993) relata que estudiosos observaram ao microscópio esférulas características da forma parasitária do fungo a partir de lesões em esqueleto de ameríndio com idade aproximada de 1.000 anos. Adicionalmente, estudos conduzidos por Morrow (2006) evidenciaram a presença de esférulas em fóssil de um bisão de aproximadamente 8.500 anos, encontrado em Nebraska, Estados Unidos, região que não corresponde a área endêmica de coccidioidomicose. Tal achado cria duas hipóteses, a primeira sugere que a zona endêmica para a micose no Holoceno fosse mais ampla; e a segunda, que o bisão tenha migrado da zona endêmica para uma não endêmica (MORROW, 2006). Contudo, o primeiro caso de coccidioidomicose foi relatado em 1892, na Argentina, quando o residente de medicina Alejandro Posadas (Figura 1A) e seu professor Robert Wernicke descreveram microrganismos semelhantes a protozoários da ordem Coccidia em um paciente que apresentava lesões cutâneas crônicas (GALGIANI, 1993; FISHER et al., 2002; HIRSHMANN, 2007). Posadas inoculou material de seu paciente em vários mamíferos, dentre eles: cão, gato e macaco, promovendo infecções experimentais nestes animais (HIRSHMANN, 2007).

Em 1984, Emmet Rixford (Figura 1B) e Thorne apresentaram os aspectos clínicos dos dois primeiros casos que ocorreram nos Estados Unidos em imigrantes recém-chegados a região do Vale de São Joaquim, na Califórnia (AMPEL, 2009). Em 1986, Rixford e T. Caspar Gilchrist verificaram um parasita semelhante àquele observado por Posadas, descreveram-no como um protozoário da ordem Coccidia, Classe Sporozoa, nomeando-o de *Coccidioides immitis*, fazendo menção a sua morfologia (“Coccidia”) e sua característica clínica (“not mild” que significa em português, não leve) (HIRSHMANN, 2007).

A natureza fúngica do parasita só foi reconhecida em 1900 por William Ophüls (Figura 1C) e Herbert C. Moffitt (Figura 1D), quando ocorreu o terceiro caso nos Estados Unidos em um imigrante português. Os pesquisadores cultivaram amostra de pus proveniente de abscessos do paciente e observaram crescimento fúngico que a princípio acreditaram ser resultado de contaminação. Então, produziram infecção em cobaias, isolando o microrganismo em vários tecidos destes animais (RYFKOGEL, 1908; HIRSHMANN, 2007; DEUS FILHO, 2009). Desta forma, foi revelado que o agente causador da doença não se tratava de um protozoário e sim de um fungo que apresentava duas formas: micelial em cultura e esférula em tecidos (HIRSHMANN, 2007; NEGRONI, 2008).





**Figura 1.** Pesquisadores que contribuíram para as primeiras descobertas sobre a coccidioidomicose: Alejandro Posadas (A), Emmet Rixford (B), William Ophüls (C) e Herbert Moffitt (D). Fonte: Internet (Endereço eletrônico completo em anexo)

Em 1929, o estudante de medicina Harold Chope, em experimentos no laboratório de Ernest Dickson, contaminou-se acidentalmente com o fungo, desenvolvendo um quadro de pneumonia com eritema nodoso, semelhante ao quadro clínico conhecido por “Febre do Vale”, o qual acometia trabalhadores do Vale de São Joaquim (NEGRONI, 2008). A associação entre esta doença ocorreu quando o médico Ernest Dickson reencontrou Myrnic Gifford, sua ex-aluna, e tomou ciência de que, a cada 15 pacientes com “Febre do Vale”, três apresentavam eritema nodoso, verificando que esta doença e a coccidioidomicose se tratavam da mesma enfermidade (SMITH et al., 1946; HIRSCHMANN, 2007; AMPEL, 2009).

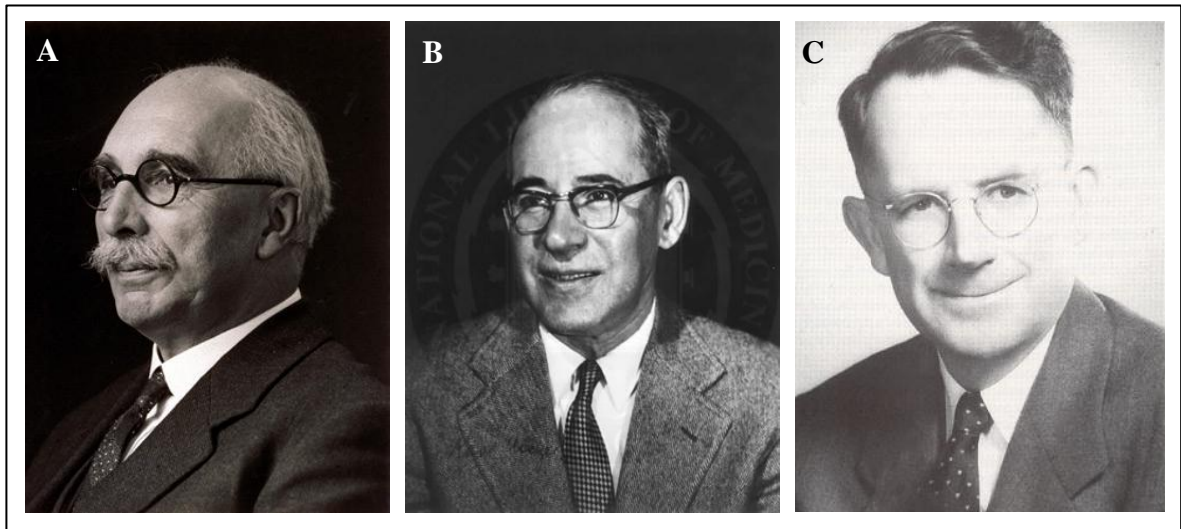
Em adição ao reconhecimento da forma benigna da doença, um marco histórico no entendimento da doença foi realizado por Robert A. Stewart (Figura 2A) e Karl F. Meyer

(Figura 2B) em 1932, os quais estabeleceram a característica geoflora de *Coccidioides immitis*, após realizarem o isolamento do fungo em amostras do solo de uma fazenda em Kern County, Califórnia, onde teriam morrido quatro filipinos decorrentes da “Febre do Vale” (HIRSCHMANN, 2007; NEGRONI, 2008). Os autores prepararam suspensões de solo em solução de NaCl a 30-50% e, após breve centrifugação, o sobrenadante obtido foi inoculado em placas contendo meio seletivo, e injetado por via subcutânea em cobaias (WANKE et al., 1999).

A fim de padronizar a nomenclatura dos relatos médicos vigentes, Dickson, em 1937, sugeriu que todas as doenças causadas por *C. immitis*, independentemente do quadro clínico, seriam chamadas de coccidioidomicose. Concomitantemente, o reconhecimento do eritema nodoso como forma benigna e auto-limitada da coccidioidomicose, suscitou alguns questionamentos quanto a alta positividade de testes cutâneos em indivíduos do Vale de São Joaquim, o porquê de nem sempre ser observado o eritema nodoso? Seria possível imunizar os recém-chegados a determinada área endêmica, uma vez que era observado suscetibilidade nestes e imunidade nos moradores da área? (SMITH et al., 1946).

Grandes avanços no entendimento dos aspectos epidemiológicos, clínicos e patológicos da coccidioidomicose foram realizados por Smith et al. (1946) (Figura 2C), que realizaram uma série de estudos imunológicos em militares recém-ingressos em uma base militar na região do Vale de São Joaquim. Na pesquisa, os soldados foram testados quanto a reatividade cutânea ao antígeno coccidioidina; os que apresentavam resultados negativos eram novamente testados em diferentes intervalos de tempo. Os resultados mostraram que infecções assintomáticas ocorriam em 60% dos casos e que a taxa de mortalidade nos casos de doença disseminada variava de 30 a 60%. Deste modo, foi possível concluir que o eritema nodoso seria apenas uma das formas benignas da doença, podendo inclusive ocorrer sem nenhuma sintomatologia associada (SMITH et al., 1946).

Na década de 1950, foi observado o primeiro caso de coccidioidomicose cutânea em um embalsamador. A infecção fúngica ocorreu após o profissional cortar a pele no caixão e entrar em contato com sangue e material purulento de vísceras que continha *C. immitis*. Estudos sobre a avaliação clínica e os aspectos sobre a aquisição da doença neste caso permitiram que pesquisadores afirmassem que a forma cutânea da doença seria rara (ESPINEL-INGROFF, 1996).



**Figura 2.** A natureza geoflora de *Coccidioides* spp. foi descoberta por Robert Stewart (A) e Karl Meyer (B). Grandes avanços no entendimento dos aspectos epidemiológicos da coccidioidomicose foram realizados por Charles Smith (C). Fonte: Internet (Endereço eletrônico completo em anexo)

No Brasil, o primeiro caso da doença ocorreu em 1978, em um paciente oriundo do município de Parapiranga, na Bahia e residente há seis anos no estado de São Paulo. O paciente apresentou problemas respiratórios e, a despeito da negatividade dos exames realizados, teve o seu caso clínico diagnosticado como tuberculose. O segundo caso foi observado no Distrito Federal em 1979, acometendo um paciente natural da cidade de Floriano, no Piauí, que apresentou em sua radiografia múltiplos nódulos bilaterais. Em ambos os casos, o diagnóstico da doença foi baseado na visualização de esférulas do fungo em cortes histológicos de tecidos pulmonares (GOMES et al., 1978; VIANNA; PASSOS; SANT'ANA, 1979; MORAES et al., 1998; VERAS et al., 2003).

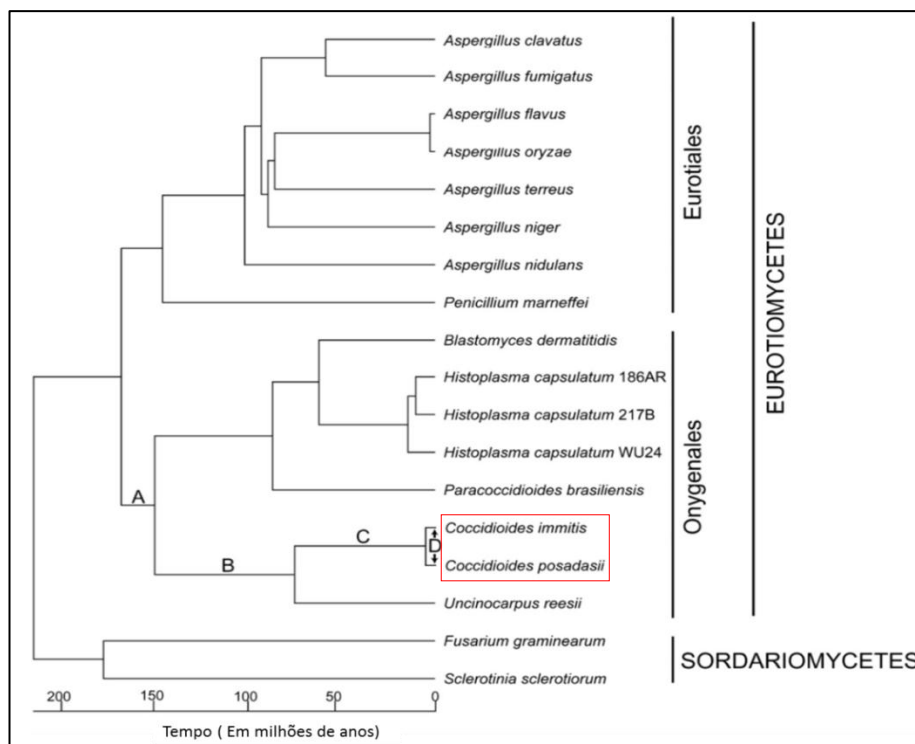
Após 15 anos, Wanke descreveu o primeiro surto epidêmico de coccidioidomicose pulmonar no Brasil, na cidade de Oeiras, Piauí (WANKE, 1994). Em 1997, foi descrito o segundo surto ocorreu no estado do Ceará, município de Aiuaba e acometeu quatro homens após uma caçada a tatus (SILVA et al., 1997; SIDRIM et al., 1997). Apenas em 1998, após descrição destes surtos, o Brasil foi incluído no mapa de distribuição geográfica da coccidioidomicose (PAPPAGIANIS, 1998).

No estado do Ceará, o primeiro caso da doença foi descrito em 1995, em um paciente natural de Jaguaribara (KUHL et al., 1995), cidade que foi inudada após a construção do açude Castanhão e que apresentava-se como uma região semi-árida, seca, com vegetação rica em cactos, nas margens do rio Jaguaribe (DIÓGENES et al., 1995), ou seja, condições ambientais semelhantes às observadas em áreas endêmicas para coccidioidomicose. Fato que levou Diógenes et al. (1995) a realizarem inquérito epidemiológico com esferulina na

localidade de Poço Comprido (Jaguaribara, Ceará). O estudo apresentou índice de reatividade ao antígeno de aproximadamente 12%, sugerindo a existência de coccidioidomicose-infecção no Ceará. Recentemente, Cordeiro et al. (2010) afirmaram que já foram diagnosticados 19 casos da doença no estado do Ceará, excluindo-se o caso descrito por Kuhl et al. (1995).

### 1.3 CARACTERÍSTICAS DO GÊNERO *COCCIDIOIDES*

Segundo Fisher et al. (2002), as espécies do gênero *Coccidioides* pertencem ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Eurotiomycetes, Ordem Onygenales, Família Onygenaceae. O gênero *Coccidioides* apresenta diversidade genômica (DICAUDO, 2006), sendo representado por duas espécies, *Coccidioides immitis* e *C. posadasii* (FISHER et al., 2002). Estudos genéticos ressaltam a proximidade filogenética entre *Coccidioides* e espécies patogênicas e sapróbias (SHARPTON et al., 2009), conforme demonstrado na figura 3.

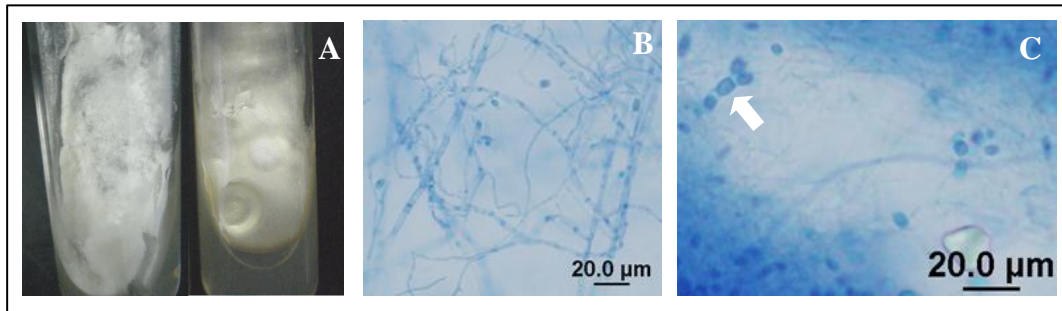


**Figura 3.** Aspecto evolutivo que determinaram a patogenicidade em *Coccidioides* spp. e suas relações com outras espécies fúngicas. (A) Deleção de genes envolvidos no metabolismo de material vegetal; (B) Expansões das famílias de genes relacionados às proteases e queratinases, proporcionando associação não patogênica com mamíferos; (C) Aquisição e adaptação de genes envolvidos no metabolismo, membrana biológica e produção de micotoxinas, tornando-o capaz de causar doença; (D) Genes do metabolismo e secreção de proteínas, são compartilhados entre *C. immitis* e *C. posadasii* e têm sido sujeitos à seleção positiva desde a divergência entre as duas espécies. Fonte: SHARPTON et al. (2009).

Os patógenos *C. immitis* e *C. posadasii* apresentam as mesmas características morfológicas e clínicas, embora apresentem diferenças geográficas e moleculares (FISHER et al., 2002; MURTHY; BLAIR, 2009; AJITHDOSS et al., 2011). As espécies *C. immitis* e *C. posadasii* anteriormente reconhecidas como cepas “Californiana” e “Não-Californiana”, respectivamente, foram assim denominadas devido sua distribuição geográfica: *C. immitis* está limitado ao Vale de São Joaquim, na Califórnia, enquanto *C. posadasii* pode ser encontrado em várias regiões do sudoeste dos Estados Unidos e nas Américas Central e do Sul (FISHER et al., 2002; DICAUDO, 2006). As diferenças genéticas entre as duas espécies foram observadas por meio da análise de polimorfismos de microssatélites (FISHER et al., 2002) e por reação de PCR (UMEYAMA et al., 2006).

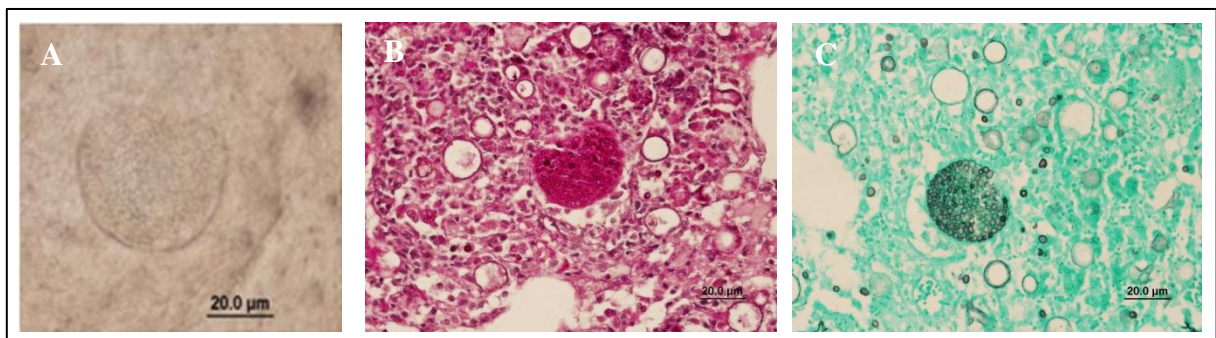
Embora *Coccidioides* spp. sejam considerados fungos termo-dimórficos, outros fatores químicos e físicos, a despeito da temperatura, parecem ser determinantes para a transição morfológica micélio-levedura. Diversos estudos mostram que esférulas e endosporos do fungo não são facilmente cultivados *in vitro*. No entanto, relativo sucesso é obtido em meios sintéticos suplementados com o dispersante N-Tamol (LONES; PEACOCK, 1959; PETKUS et al., 1985) e incubação a 40 °C em atmosfera contendo 20% de CO<sub>2</sub> (SUN; HUPPERT; VUKOVICH, 1976). Dados experimentais mostram que os aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano são importantes para a conversão micélio-levedura e maturação das esférulas *in vitro* (BROOKS; NORTHEY, 1962).

Na fase filamentosa, a macromorfologia é caracterizada pelo crescimento de um micélio vegetativo com colônias brancas de aspecto algodinoso (Figura 4A), que podem mudar de cor para castanho ou marrom com a maturação. Análise micromorfológica revela hifas hialinas, septadas e ramificadas, de 2 a 4 µm de diâmetro (Figura 4B) (KOLIVRAS et al., 2001; WANKE; LAZÉRA; EULÁLIO, 2005). A partir do quinto dia de cultivo, é possível verificar na micromorfologia uma grande quantidade de artroconídios sendo formados, de maneira que haja alternância destas estruturas com células degeneradas, denominadas disjuntores (Figura 4C) (KOLIVRAS et al., 2001). Os artroconídios - estruturas de forma retangular ou abaulada, semelhantes a um pequeno barril - são a forma infectante do fungo (AVILÉS-SALAS; QUINTERO-CUADRA; CORNEJO-JUÁREZ, 2007).



**Figura 4.** Macromorfologia de *Coccidioides* spp. em Ágar Batata Dextrose, mostrando colônias brancas com textura algodosa (A). Aspecto micromorfológico de *Coccidioides* spp. revelando hifas hialinas jovens (B) e hifas maduras contendo artroconídios (seta) espaçados por células disjuntoras (C). Montagens tipo lâmina-lamínula com lactofenol azul algodão. FONTE: CEMM, 2011

A estrutura parasitária de *Coccidioides* spp. em amostras clínicas – historicamente, a primeira forma descrita do fungo – é visualizada como uma esférula endosporulante em preparações do tipo lâmina-lamínula com hidróxido de potássio (KOH) a 10% ou em cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina (HE), com ácido periódico de Schiff (PAS) ou com impregnação de Gomori-Grocott (Figura 5). A esférula se mostra arredondada, com parede espessa, variando de 60 a 100 µm de diâmetro, não apresentando brotamento. Quando madura, contém em seu interior centenas de endosporos uninucleados, com 2-5 µm de diâmetro (WANKE; LAZÉRA; EULÁLIO, 2005; SAUBOLLE; MCKELLAR; SUSSLAND, 2007; DEUS FILHO, 2009).



**Figura 5.** Aspecto micromorfológico da forma parasitária de *Coccidioides* spp. em tecido pulmonar de camundongos, visualizado em exame direto com KOH 10% (A), histopatológico corado por PAS (B) e Grocott-Gomori (C), com observação de endosporos liberados de esférula rompida. Fonte: CEMM, 2011.

## 1.4 ECOEPIDEMIOLOGIA DAS ESPÉCIES DO GÊNERO *COCCIDIOIDES*

Os fungos do gênero *Coccidioides* vivem saprofiticamente em solos salinos e alcalinos de regiões semi-áridas e áridas do hemisfério ocidental do globo, entre as latitudes 40°N e 40°S (GREENE; KOENIG; FISHER, 2000; SABOULLE; MCKELLAR, SUSSLAND, 2007; CORDEIRO et al. 2010). Essas regiões apresentam precipitações escassas num limitado período de tempo, com inverno ameno e verão quente (GREENE; KOENIG; FISHER, 2000; LANIADO-LABORIN, 2007), e temperaturas próximas a 30°C. Dados mostram que *Coccidioides* spp. podem ser isolados entre 10 e 30 cm abaixo da superfície do solo (LANIADO-LABORIN, 2007).

Estudos relacionados ao isolamento de *Coccidioides* spp. do solo descrevem que o crescimento do fungo é dependente do aumento da umidade, seguido de um período seco em que as hifas sofrem dessecação, formam artroconídios infectantes que são liberados no ambiente pela ação do vento e de outros aspectos climáticos, bem como antropogênicos, tornando essas estruturas possíveis de serem inaladas (COMRIE, 2005; KOLIVRAS et al., 2001). O crescimento do fungo no solo é influenciado pelas estações do ano e clima (GREENE; KOENIG; FISHER, 2000), assim como, sua presença esporádica neste hábitat esteja relacionada a menor capacidade de competição por nutrientes, em comparação com outras espécies geofílicas (LACY; SWATEK, 1974). Ademais, os artroconídios infectantes podem tornar-se inviáveis devido à temperatura excessiva, luz ultravioleta e baixa umidade (FISHER et al., 2007). Nos meses mais quentes do ano, o fungo tem sua população no solo diminuída, devido a temperatura elevada que causa a morte celular; enquanto no período chuvoso ocorre o repovoamento do solo com abundância de crescimento fúngico (WANKE; LAZÉRA; EULÁLIO, 2005).

O fungo é encontrado em regiões onde ocorrem certas espécies vegetais, tais como algaroba, jojoba e chaparral, sendo esta última a associação mais conhecida (LANIADO-LABORIN, 2007). A algaroba (*Prosopis juliflora*) é uma planta xerófila adaptada a condições críticas de precipitação pluviométrica e de nutrientes no solo (OLIVEIRA et al., 1999). A jojoba (*Simmondsia chinensis*) é uma planta arbustiva xerófita de importância na indústria cosmética, com origem no deserto de Sonora, Sudoeste dos Estados Unidos e Noroeste do México, capaz de crescer em solos pobres e arenosos. Por sua vez, o chaparral (*Larrea tridentata*) é uma planta arbustiva comum nas regiões áridas do Norte do México e Sudoeste dos Estados Unidos (ARTEAGA; ANDRADE-CETTO; CÁRDENAS, 2005).

Casos da doença já foram descritos nos Estados Unidos, México, Guatemala, Honduras, Venezuela, Colômbia, Bolívia, Argentina, Paraguai e Brasil (WANKE; LAZÉRA; EULÁLIO, 2005; LANIADO-LABORIN, 2007; SABOULLE; MCKELLAR, SUSSLAND, 2007; TALAMANTES; BEHSETA; ZENDER, 2007). Estudos revelam que a incidência de coccidioidomicose nos Estados Unidos está aumentando (SABOULLE; MCKELLAR, SUSSLAND, 2007; LANIADO-LABORIN, 2007; CUMMINGS et al., 2010), com uma estimativa de 150.000 novos casos ao ano no sudoeste dos Estados Unidos (SHARPTON et al., 2009). Um aspecto que deve ser destacado para justificar parte deste acréscimo é a migração frequente de indivíduos para áreas endêmicas (LANIADO-LABORIN, 2007).

No Brasil, até o momento, todos os casos desta micose são provenientes da região Nordeste, ocorrendo nos estados do Piauí, Maranhão, Ceará e Bahia (DEUS FILHO, 2009; CORDEIRO et al., 2010), embora este último tenha apenas um caso registrado. Nessa região, estudos evidenciaram que a atividade de caça a tatus é um fator de risco associado à doença (SIDRIM et al., 1997; WANKE et al., 1999, CORDEIRO et al., 2009); a atividade, geralmente realizada por homens e cães, promove grande revolvimento de terra, contribuindo para dispersão dos propágulos fúngicos no ambiente. No Ceará, foram diagnosticados casos da micose em indivíduos procedentes dos municípios de Aiuaba, Independência, Boa Viagem, Solonópoles, Catunda, Santa Quitéria, Arneiroz, Ibiapina, Sobral, Jaguaribe e Parambu (CORDEIRO et al., 2010).

## 1.5 VIRULÊNCIA E PATOGENIA

Os agentes do gênero *Coccidioides* são reconhecidamente os mais virulentos patógenos fúngicos capazes de causar doenças no homem e nos animais (DIXON, 2001). Estes microrganismos são agentes biológicos de Classe de Risco 3, caracterizada por apresentar um elevado risco de contaminação individual, porém risco limitado para a comunidade (BRASIL, 2004). Os fungos deste gênero são os únicos incluídos na lista de microrganismos com potencial para armas biológicas (DIXON, 2001).

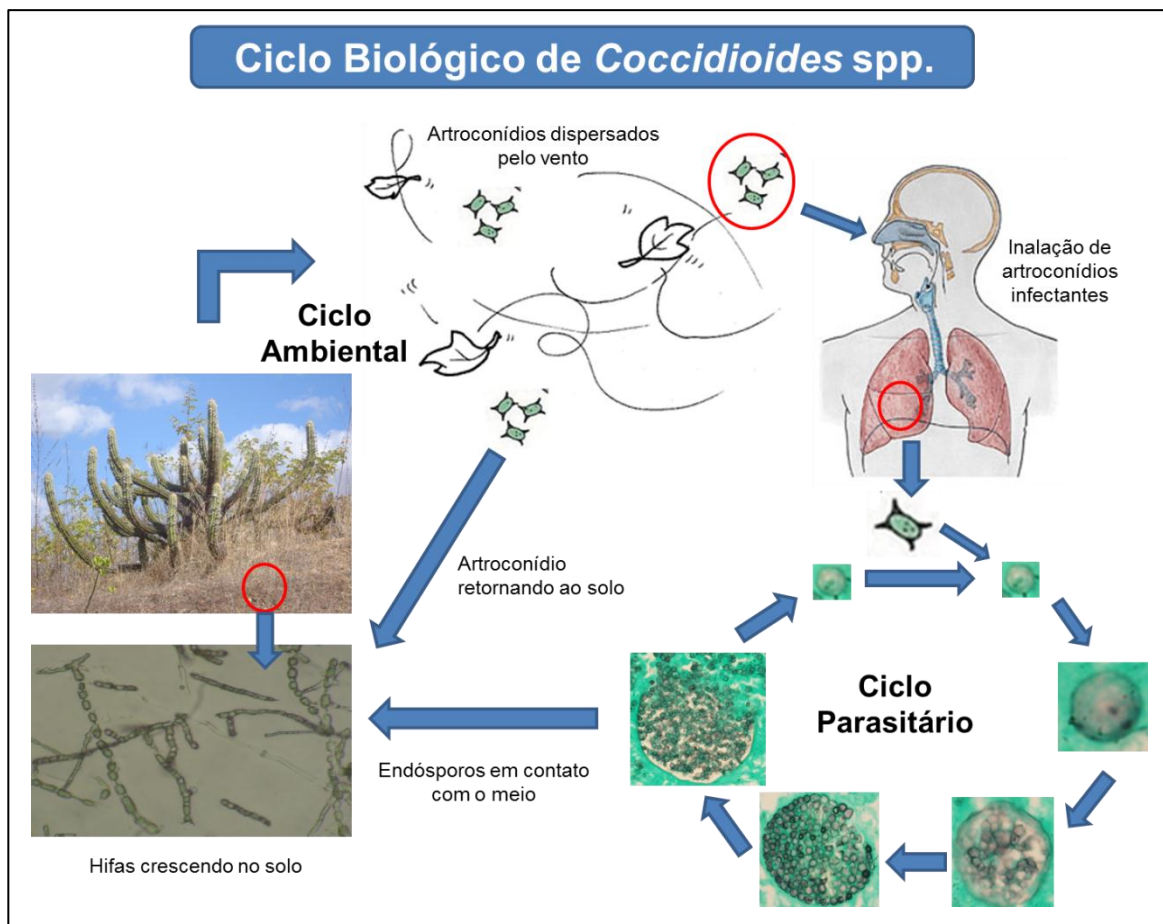
Além do homem, a infecção por *Coccidioides* spp. tem sido reportada em diversas espécies de mamíferos silvestres, tais como tatu (EULÁLIO et al., 2000) e roedores do deserto (LANIADO-LABORIN, 2007), bem como animais domésticos, como gatos (DICAUDO, 2006) e cães (AJITHDOSS et al., 2011). A doença também tem sido reportada em primatas não-humanos, tais como lêmures (BURTON et al., 1986), babuínos



(ROSENBERG; GLEISER; CAREY, 1984), chimpanzés, gorilas e macacos (SHUBITZ, 2007). Um único caso em réptil foi relatado por Timm, Sonn e Hultgren (1988).

A doença é adquirida pela inalação de artroconídios infectantes que apresentam fragmentos da parede celular de células disjuntoras em suas porções terminais, facilitando assim sua veiculação aérea (GALGIANI et al., 2005; RESTREPO, 2006). Após a inalação dos artroconídios ocorre intensa migração de neutrófilos para o foco infeccioso e, embora as células fúngicas sejam sensíveis ao estresse oxidativo e aos peptídeos catiônicos liberados pelos neutrófilos, apenas 20% dos artroconídios são eliminados (BORCHERS; GERSHWIN, 2010; COX, MAGEE, 1998; 2004). A taxa de fagocitose mediada por macrófagos e neutrófilos é dependente da cepa fúngica, sugerindo que fatores do microrganismo e do hospedeiro influenciam no encadeamento da doença. Estudos *in vitro* mostram que os neutrófilos polimorfonucleares podem promover a maturação de artroconídios em esférulas (COX; MAGEE, 2004).

Alterações celulares ocorridas nos artroconídios culminam com o surgimento de esférulas que, durante o processo de amadurecimento, sofrem invaginações e múltiplas divisões celulares, originando endosporos. No processo de amadurecimento, as esférulas tornam-se progressivamente maiores e, deste modo, resistentes a fagocitose, embora, neutrófilos polimorfonucleares ainda possam atuar nelas, digerindo parte da parede celular. Decorridas em média 72 horas, a esférula madura se rompe, liberando centenas de endosporos para o exterior. Cada endósporo liberado é capaz de formar uma nova esférula, renovando assim, o ciclo parasitário no interior do hospedeiro (COX; MAGEE, 1998; BORCHERS; GERSHWIN, 2010). Os endosporos presentes nas carcaças de animais podem retornar ao solo e, em face de condições ambientais favoráveis, sofrem conversão para a fase filamentosa (COX; MAGEE, 1998; AVILÉS-SALAS; QUINTERO-CUADRA; CORNEJO-JUÁREZ, 2007) (Figura 6). A patogenicidade está intimamente relacionada com a permanência das esférulas fúngicas que conseguem escapar aos mecanismos imunes do hospedeiro, gerando uma resposta inflamatória persistente, levando a formação de granulomas (GALGIANI, 1993).



**Figura 6.** Ciclo biológico de *Coccidioides* spp. demonstrando as conexões entre as fases filamentosas e parasitárias. O hospedeiro adquire a infecção pela inalação de artroconídios dispersos no ar, que no interior do pulmão modifica-se originando uma esférula com endósporos em seu interior. Ao romper-se a esférula libera endósporos que podem reiniciar um ciclo parasitário ou iniciar um ciclo ambiental ao entrar em contato com condições ambientais propícias, convertendo-se para a fase filamentosas. Ao se desenvolverem, as hifas formam artroconídios que tem a capacidade de se desprender do micélio. Fonte: SILVA, 2011.

A expressão de fatores de virulência por *Coccidioides* spp. é responsável pelo mérito do fungo em estabelecer doença no hospedeiro, ou seja, sua capacidade em driblar a resposta imune e/ou causar danos no hospedeiro. *Coccidioides* spp. apresentam mecanismos que os permitem sobreviver no ambiente hostil de parasitismo (HUNG; XUE; COLE, 2007). A literatura mostra a existência de camadas membranosas que contêm proteínas imunorreativas situadas em locais extratécnicos da superfície exterior das esférulas capazes de reagir com o hospedeiro e induzir a uma resposta do tipo Th2 (RAPPEYE; GOLDMAN, 2006; HUNG; XUE; COLE, 2007). Esta glicoproteína de superfície celular codificada pelo gene SOWgp funciona como uma adesina e contribui para a virulência das espécies de *Coccidioides* (HUNG et al., 2002).

Além de glicoproteínas, a atividade de certas enzimas também pode ser considerada como fator de virulência. A secreção de urease pelas esférulas contribui para lesão tecidual no hospedeiro. A atividade da urease resulta na produção de amônia cuja presença resulta em um microambiente alcalino que permite ao fungo sobreviver no hospedeiro (MIRBOD-DONOVAN et al., 2006). A produção de melanina, ou compostos precursores a ela, é considerada um importante fator de virulência em diversos patógenos, sendo evidenciada nos artroconídios, esférulas e endosporos de *C. posadasii*. Tal fator pode ser uma razão para a dificuldade no tratamento da coccidioidomicose, principalmente em pacientes com imunossupressão (NOSANCHUK et al., 2007).

## 1.6 FORMAS CLÍNICAS E FATORES DE RISCO

A coccidioidomicose pode ocorrer nas formas assintomática, pulmonar aguda, pulmonar crônica, disseminada ou cutânea primária (COX; MAGEE, 2004). A infecção apresenta-se de forma assintomática em aproximadamente 60% dos casos, sendo evidente apenas pelo teste cutâneo positivo; em 40% dos casos as manifestações clínicas são observadas (COX; MAGEE, 2004; CRUM; POTTER; PAPPAGIANIS, 2004; AVILÉS-SALAS; QUINTERO-CUADRA; CORNEJO-JUÁREZ, 2007).

Na forma pulmonar aguda, os principais sintomas observados são febre, tosse não produtiva, dispnéia e dor torácica (GALGIANI et al., 2005; DICAUDO, 2006; TOGASHI et al., 2009). Os sintomas podem surgir de sete a 20 dias após a exposição ao fungo e a infecção costuma ser autolimitada e resolver espontaneamente (COX; MAGEE, 2004; AVILÉS-SALAS; QUINTERO-CUADRA; CORNEJO-JUÁREZ, 2007). Em áreas endêmicas, a coccidioidomicose pulmonar primária é muitas vezes subdiagnosticada, sendo facilmente confundida com pneumonia bacteriana, o que leva a um tratamento errôneo com antibacterianos e/ou possíveis complicações (AMPEL, 2009).

Em torno de 5% dos casos de infecção pulmonar primária persistem e desenvolvem-se em doença pulmonar crônica ou progressiva, caracterizada por lesões nodulares ou cavitárias, e disseminação miliar (COX; MAGEE, 2004; DEUS FILHO, 2009). Os sintomas mais comuns desta forma infecciosa são: perda de peso, febre, hemoptise, dor ao tossir e dor pleurítica (COX; MAGEE, 2004). A coccidioidomicose pulmonar crônica é muitas vezes confundida com a tuberculose, principalmente em regiões endêmicas para as duas enfermidades, assim, é importante o diagnóstico diferencial entre elas (DEUS FILHO, 2009; CADENA et al., 2009; SILVA-HERNÁNDEZ et al., 2010; DEUS FILHO et al., 2010).

Nos primeiros dados epidemiológicos acerca das proporções das formas infecciosas do fungo, realizados por Charles Smith durante a Segunda Guerra Mundial, observou-se que a forma disseminada da doença ocorria em 1% dos pacientes com coccidioomicose primária. No entanto, estudos posteriores revelaram que este número pode chegar a 5%. A disseminação extra-pulmonar pode se manifestar com lesões cutâneas, osteomielite, meningite ou abscessos no baço, fígado e rins (COX; MAGEE, 2004).

A coccidioomicose ocorre de maneira indistinta, independente do gênero, idade e etnia do indivíduo, porém alguns fatores são responsáveis por um aumento do risco de aquisição e/ou disseminação da doença. A exposição à poeira, ocasionalmente ou de forma ocupacional (LANIADO-LABORIN, 2007; CRUM-CIANFLONE, 2007; CUMMINGS et al., 2010) é um fator de risco para aquisição da doença. Desta forma, profissões como militares, arqueólogos e trabalhadores da construção civil são consideradas de risco (LANIADO-LABORIN, 2007; CRUM-CIANFLONE, 2007; CUMMINGS et al., 2010). Os militares norte-americanos, por exemplo, estão particularmente em risco para esta infecção devido ao fato de seus treinamentos serem geralmente realizados em áreas desertas do oeste americano (CRUM; POTTER; PAPPAGIANIS, 2004).

Quanto ao gênero, é consenso que os homens são mais frequentemente infectados (LANIADO-LABORIN, 2007; VUGIA; WHELLER; CUMMINGS, 2009), provavelmente em virtude da exposição ocupacional, embora alguns estudos indiquem a existência de fatores genéticos e/ou hormonais relacionados a maior probabilidade de desenvolvimento de doença disseminada (LANIADO-LABORIN, 2007). Em relação a idade dos pacientes, sabe-se que a doença ocorre em todos os grupos etários, embora nos extremos de idade exista um maior risco de complicação da doença (LANIADO-LABORIN, 2007; HOF, 2010). Acredita-se que nos idosos isto ocorre como resultado da imunossenescência (HOF, 2010). Dados revelam que a incidência da doença é maior em adultos jovens (VUGIA; WHELLER; CUMMINGS, 2009), embora Hof (2010) tenha afirmado que em áreas endêmicas, a coccidioomicose é a infecção fúngica sistêmica mais comum em idosos. Adicionalmente, estudos demonstram que os filipinos e afro-descendentes apresentam um risco de 10 a 175 vezes maior de disseminação, provavelmente relacionado a maior frequência do tipo sanguíneo B entre esses indivíduos (LANIADO-LABORIN, 2007).

A gravidez também é considerada como um fator de risco para disseminação da doença (AVILÉS-SALAS; QUINTERO-CUADRA; CORNEJO-JUÁREZ, 2007), pois acredita-se que a intensidade das variações hormonais neste período estimulam o crescimento do fungo, e que a baixa imunidade observada em mulheres neste estado não seja capaz de limitar a infecção (CRUM et al., 2004). Dados clínicos demonstram que a disseminação

ocorre em maior frequência no último trimestre de gravidez e que mulheres afro-descendentes grávidas possuem maior risco a disseminação que mulheres brancas no mesmo estado (LANIADO-LABORIN, 2007).

Além destes aspectos, pacientes que realizam diálise, pacientes infectados com o vírus HIV e transplantados também apresentam um fator de risco para a disseminação da enfermidade (LANIADO-LABORIN, 2007; AVILÉS-SALAS; QUINTERO-CUADRA; CORNEJO-JUÁREZ, 2007). Nos Estados Unidos, a coccidioidomicose é uma infecção oportunista que acomete pacientes com aids (LANIADO-LABORIN, 2007; AVILÉS-SALAS; QUINTERO-CUADRA; CORNEJO-JUÁREZ, 2007) e, de modo geral, tornou-se menos comum com o advento da terapia anti-retroviral, sendo, atualmente, mais frequentemente diagnosticada em pacientes que desconhecem sua condição de portador do vírus HIV e apresentam baixa contagem de linfócitos T CD4 (LANIADO-LABORIN, 2007).

Em animais, a coccidioidomicose também cursa de forma assintomática ou oligossintomática. A doença é rara em bovinos, ovinos ou suínos, embora seja possível evidenciar lesões pulmonares nestes animais após o abate. Geralmente, a infecção por *Coccidioides* spp. em animais apresenta um período de incubação de uma a quatro semanas após a exposição, ocorrendo inicialmente nos pulmões. Disseminação pode envolver qualquer órgão, a depender da espécie animal acometida (CFSPH, 2010).

## 1.7 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico clínico da coccidioidomicose é difícil devido à frequente apresentação de sinais e sintomas variados e sem característica definida (AMPEL, 2010a; DEUS FILHO et al., 2010). O diagnóstico confirmatório da coccidioidomicose depende da observação da forma parasitária do fungo e/ou isolamento do microrganismo em amostras clínicas (SUTTON, 2007; MURTHY; BLAIR, 2009).

A coleta, o transporte e o processamento das amostras são características importantes no isolamento do fungo a partir de espécimes clínicos, uma vez que interferem na qualidade do material e viabilidade fúngica. As amostras mais comumente investigadas durante a suspeita de coccidioidomicose são escarro, lavado-broncoalveolar, aspirado endotraqueal e biópsias pulmonares (SUTTON, 2007). A microscopia direta das amostras clínicas em preparações lâmina-lamínula com KOH mostra esférulas com tamanho entre 60 a 100  $\mu\text{m}$  de diâmetro contendo endosporos em seu interior (SABOULLE; MCKELLAR; SUSSLAND, 2007). Este método é considerado rápido e presuntivo, quando são observadas

esférulas total ou parcialmente íntegras, além de permitir um risco menor do que a manipulação de uma cultura do fungo. No entanto, quando o tamanho das esférulas é menor do que 20 µm de diâmetro e não são visualizados endosporos em seu interior, o diagnóstico preliminar torna-se problemático, podendo estes achados serem confundidos com outros patógenos ou mesmo artefatos (SUTTON, 2007). Além disto, a observação de endosporos na ausência de esférulas pode ser confundido com leveduras dos gêneros *Candida* ou *Cryptococcus*, bem como a forma parasitária de *Histoplasma capsulatum* (SABOULLE, 2007).

Para o isolamento em cultura, pode ser utilizada uma variedade de meios, pois *Coccidioides* spp. não apresentam exigências nutricionais *in vitro*: ágar *Brain Heart Infusion* (BHI), ágar Sabouraud Dextrose, ágar Batata Dextrose, ágar Sabouraud Dextrose com cicloheximida, ágar Sabouraud Dextrose com cicloheximida e cloranfenicol (MURTHY; BLAIR, 2009; SABOULLE, 2007; SUTTON, 2007). As colônias se desenvolvem dentro de três a cinco dias, apresentando textura algodoadosa e cor branca, com reverso variando entre branco e marrom. A visualização microscópica da colônia é realizada em montagens com lactofenol azul algodão, onde são observadas hifas finas, hialinas e septadas, contendo artroconídios intercalados por células disjuntoras (SUTTON, 2007).

Testes para detecção de anticorpos específicos para a doença (IgM anti-*coccidioides* e IgG anti-*coccidioides*) têm sido utilizados para diagnóstico, acompanhamento ou prognóstico da coccidioidomicose (MURTHY; BLAIR, 2009). Entre a primeira e terceira semanas após o início da infecção é possível detectar IgM, enquanto a detecção de IgG ocorre entre a segunda e 28ª semana, na dependência do teste de detecção utilizado (MURTHY; BLAIR, 2009). Os anticorpos IgM e IgG são direcionados a dois grupos de antígenos distintos: TP (*tube precipitin*) e CF (*complement fixation*), respectivamente, sendo CF importante no prognóstico da doença (GALGANI, 1993). No diagnóstico imunológico, os principais testes utilizados são: imunodifusão em gel, fixação do complemento, e Imunoensaio Enzimático (ELISA). No início da infecção, o teste de ELISA é mais sensível, enquanto fixação do complemento e imunodifusão têm sua sensibilidade aumentada durante um período tardio de infecção (MURTHY; BLAIR, 2009). É importante destacar que um teste sorológico negativo não exclui a existência de infecção por *Coccidioides* spp. (GALGANI, 1993), principalmente se a infecção encontra-se na fase inicial (DICAUDO, 2006).

Espécimes clínicos como amostras de pele, pulmão, ossos, articulações e cérebro podem ser utilizados para realização de testes histopatológicos com fins de diagnóstico. O histopatológico é dito positivo quando são observadas esférulas em diferentes estágios de

maturação, geralmente coradas por *periodic acid-Schiff* (PAS), hematoxilina-eosina (HE), ou Grocott-Gomori (SABOULLE, 2007).

Testes de amplificação de ácidos nucleicos têm sido realizados para a detecção e diagnóstico de *Coccidioides* spp. em espécimes clínicos (CORDEIRO et al., 2006; BINNICKER et al., 2007; VUCICEVIC; CAREY; BLAIR, 2010), embora não existam testes comercialmente disponíveis (AMPEL, 2010a). O diagnóstico molecular permite a detecção do fungo em amostras clínicas suspeitas de infecção que possam apresentar-se contaminadas e/ou em culturas mistas, permitindo a detecção do patógeno antes da soroconversão. Alguns autores apontam que uma das principais vantagens do diagnóstico molecular na coccidioidomicose é a redução dos riscos associados ao manuseio e cultivo do fungo, o qual exige laboratório de biossegurança de nível 3 (BIALEK et al., 2004; AMPEL, 2010a).

## 1.8 TRATAMENTO E PROFILAXIA

No tratamento da coccidioidomicose deve-se considerar a gravidade da infecção pulmonar, existência de disseminação e os fatores de risco do paciente (DICAUDO, 2006), além da diversidade de formas clínicas que a doença pode apresentar (DEUS FILHO, 2009).

Quando é verificada infecção pulmonar primária ou aguda, a terapia não encontra consenso na literatura, pois não existem evidências de que o tratamento reduza a infecção ou impeça complicações (DICAUDO, 2006), embora, alguns pesquisadores sugiram tratamento para todos os pacientes sintomáticos com o intuito de aliviar os sintomas, bem como seu tempo de duração (DEUS FILHO, 2009). Ampel (2010b) descreve um estudo que avalia quando instituir tratamento para pacientes com coccidioidomicose pulmonar primária. No estudo foi observado que a decisão de tratar foi avaliada totalmente por critérios clínicos. Os pacientes não tratados não apresentaram complicações, no entanto foi realizado um acompanhamento prolongado. Os pacientes que foram tratados também não apresentaram complicações da doença, porém cerca de 10% dos pacientes que iniciaram e pararam o tratamento foi observado disseminação da doença. O resultado sugere que a decisão de se tratar a doença pulmonar primária não deve ser baseada na tentativa de apressar a cura ou evitar possíveis complicações.

O tratamento é considerado obrigatório para pacientes de risco e/ou com manifestações graves. No Brasil, ao ser observado pneumonia extensa e difusa, recomenda-se administração de anfotericina B até remissão clínica e radiológica, sendo posteriormente tratada com um dos azólicos por até dois anos (DEUS FILHO, 2009).

Nos casos de pacientes com coccidioidomicose pulmonar crônica em que ocorra detecção de nódulos causados por *Coccidioides* spp. sem apresentação de sintomas, o tratamento deve ser dispensado, no entanto, deve ser realizados exames de acompanhamento de forma rotineira e ao ser observado aumento no tamanho da cavidade, o paciente deve ser tratado com antifúngicos. Nos casos de lesões bem localizadas ou observação de hemoptise pode ser realizada ressecção cirúrgica (DEUS FILHO, 2009).

No caso de disseminação da micose, o tratamento é dependente do acometimento ou não do sistema nervoso central (SNC). O itraconazol, administrado sob a dose de 400-600 mg/dia, tem demonstrado menor incidência de recorrência e mostrado melhores resultados que o fluconazol quando administrados em pacientes com forma disseminada sem envolvimento do sistema nervoso central (DICAUDO, 2006; DEUS FILHO, 2009). Quando é observado comprometimento neurológico usualmente utiliza-se fluconazol numa dose mínima de 400 mg/dia. Entretanto, nos casos onde os azólicos são contra-indicados, como na gravidez, por serem considerados teratogênicos, a droga de escolha é a anfotericina B intratecal (DICAUDO, 2006).

O voriconazol é um novo triazólico relacionado estruturalmente com o fluconazol (AMPEL, 2009). Em idosos, o uso de voriconazol pode ter implicações clínicas, pois a atividade das enzimas envolvidas no seu metabolismo diminui com a idade e, deste modo, são observados nestes pacientes uma série de efeitos adversos neurológicos devido aos altos níveis séricos de voriconazol (HOF, 2010).

Como medidas profiláticas, em áreas endêmicas, pode-se observar a administração de azólicos em pacientes imunossuprimidos, como transplantados e pacientes com aids, com risco potencial em desenvolver coccidioidomicose (DICAUDO, 2006). Além disto, nas últimas duas décadas diversos grupos têm se dedicado ao estudo e formulação de uma vacina a partir de antígenos da fase parasitária do fungo (SABOULLE; MCKELLAR; SUSSLAND, 2007; AMPEL, 2009). Outras medidas profiláticas observadas são ações educativas e ambientais que visam diminuir a produção de aerossóis infectantes geradas pelo vento ou por atividades humanas, tais como a pulverização de óleo ou água em locais de construções, e plantio de mudas em pistas de pouso e estradas, bem como a utilização de máscaras durante atividades que geram poeira em áreas endêmicas para o fungo (MURTHY; BLAIR, 2009).



## 1.9 COCCIDIOIDOMICOSE E ANIMAIS

Os mamíferos são considerados organismos efetores do ciclo de vida de *Coccidioides* spp., participando diretamente na dispersão, manutenção e irradiação do fungo na natureza (EMMONS; ASHBURN, 1942; FISHER et al., 2001; MORROW et al., 2006). O papel dos mamíferos na distribuição e epidemiologia da coccidioidomicose nos Estados Unidos foi inicialmente estudado por Emmons e Ashburn (1942) em pequenos roedores silvestres. Ao observar lesões crônicas que sugeriam a existência de infecção natural, os autores consideraram que esses animais poderiam ser considerados sentinelas para o monitoramento da doença em uma dada área (EMMONS; ASHBURN, 1942). Adicionalmente, sabe-se que as estruturas parasitárias do fungo presentes em carcaças de diversas espécies animais podem crescer sob a forma filamentosa e persistir no solo por um longo período (LACY; SWATEK, 1974). Acredita-se também que os mamíferos tiveram papel determinante na introdução do fungo em áreas indenes ao realizarem grandes migrações e travessias no continente Americano (MORROW et al., 2006).

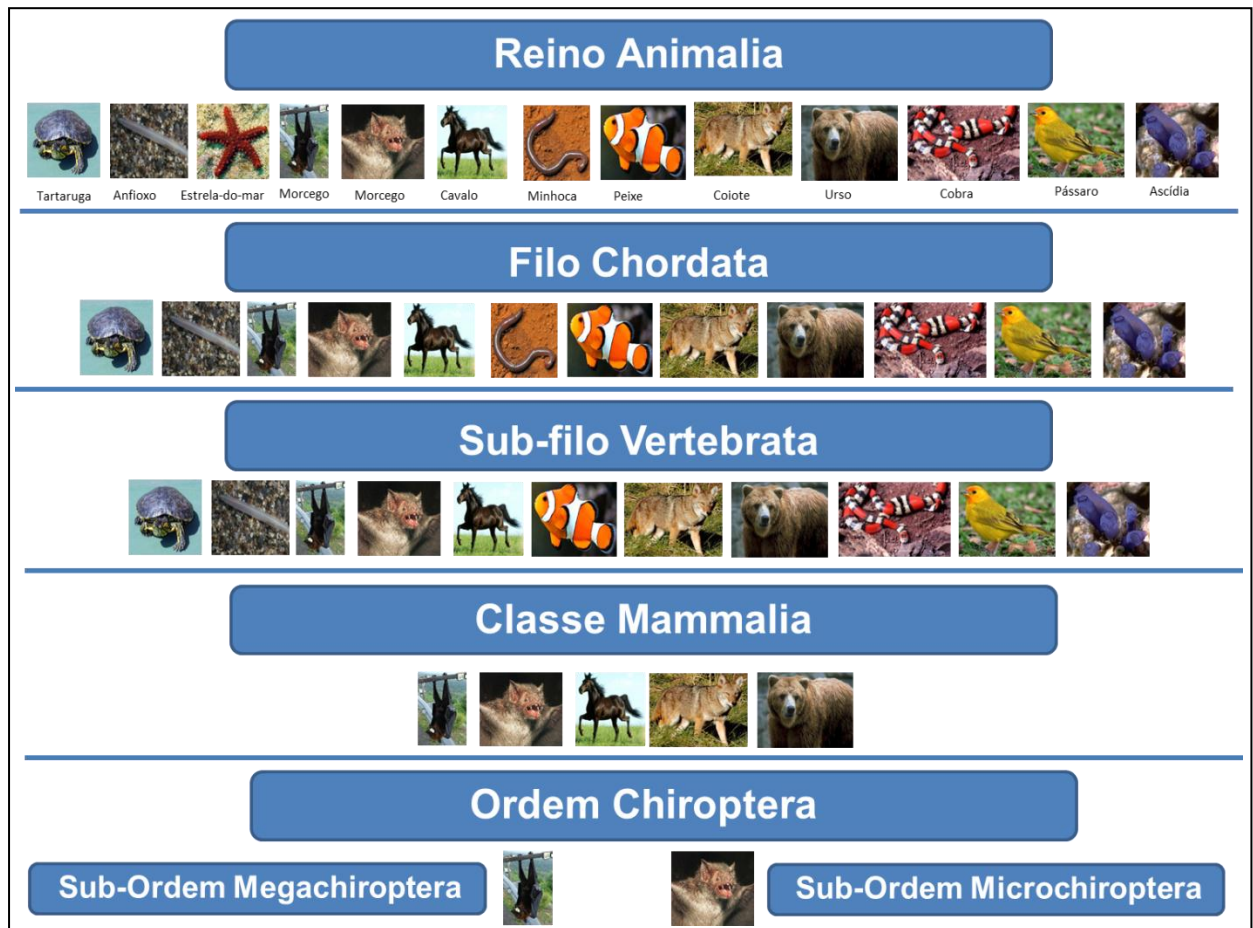
No Brasil, diversos autores comprovam a associação epidemiológica entre a coccidioidomicose e caçada de tatus (SIDRIM et al., 1997; WANKE et al., 1999, CORDEIRO et al., 2009). Estudo realizado por Eulálio et al. (2000) em 26 tatus capturados em Oeiras no Piauí, demonstrou a existência de infecção natural em três animais. Levando os autores a sugerir o papel desses animais como sentinelas para a identificação de áreas contendo de risco de coccidioidomicose em nosso meio. O fungo também já foi isolado em amostras de solo de tocas de tatus no Nordeste do Brasil (WANKE et al., 1999; CORDEIRO et al., 2006).

Embora a coccidioidomicose já tenha sido descrita em uma variedade de espécies de mamíferos silvestres e domésticos, até o presente momento não havia nenhuma relação direta entre *Coccidioides* spp. e quirópteros, apesar destes animais serem sabidamente envolvidos no ciclo biológico de uma grande variedade de patógenos humanos.

## 1.10 ASPECTOS GERAIS DOS QUIRÓPTEROS

Os morcegos são animais de grande importância na homeostasia dos ecossistemas, sendo inclusive reconhecidos como bioindicadores de degradação ambiental (ALVES; FISHER, 2007; REIS et al., 2007). Estes animais são classificados taxonomicamente na classe Mammalia e ordem Chiroptera (Figura 7), sendo os únicos

representantes desta classe adaptados ao vôo (ALVES; FISHER, 2007). Dentro desta classe, estes animais são considerados o segundo maior grupo em número e diversidade de espécies, ficando atrás apenas da ordem Rodentia (ARNONI; PASSOS, 2003), representando um quinto da população de mamíferos da Terra (OMATSU et al., 2007).



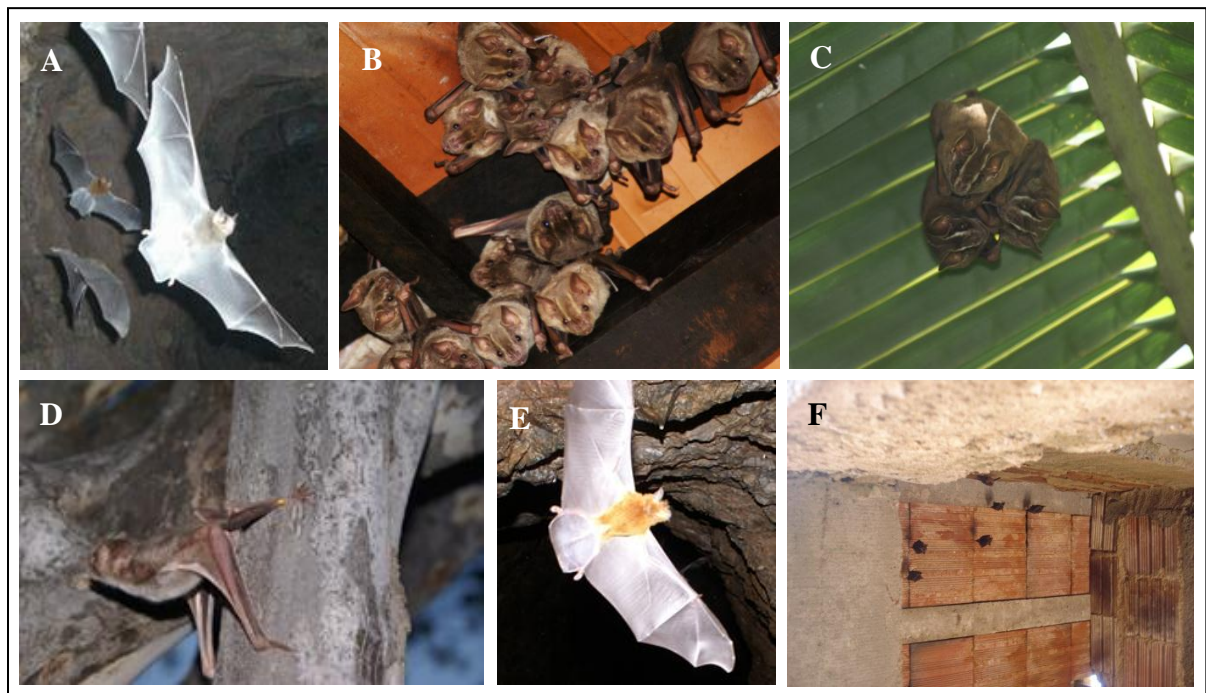
**Figura 7.** Representação esquemática da classificação taxonômica dos quirópteros.

Adaptado de HICKMAN; ROBERTS; LARSON, 2004.

A ordem Chiroptera, derivada do grego *cheir* (mão) e *pteron* (asa) (REIS et al., 2007), é representada por 18 famílias, 202 gêneros e 1120 espécies. No Brasil, são reconhecidas nove famílias, 64 gêneros e 167 espécies (PERACCHI et al., 2006); no estado do Ceará, entretanto, apenas 42 espécies foram descritas (FABIÁN, 2008). Essa ordem é representada por duas sub-ordens: Megachiroptera e Microchiroptera; os Megachiroptera – conhecidos como “raposas gigantes” – não são encontrados no Brasil, restringindo-se ao Velho Mundo, enquanto os Microchiroptera possuem distribuição mundial, com exceção de

regiões polares e ilhas muito afastadas dos continentes (HUTSON; MICKLEBURGH; RACEY, 2001; REIS et al., 2007).

Esses animais caracterizam-se por apresentarem hábito de vida noturno, com colorações de pelagens que variam pouco entre o preto e o pardo; raras espécies apresentam cor ruiva, amarelada ou branca (REIS et al., 2007). Durante o dia, permanecem em abrigos naturais ou artificiais (MENDES et al., 2007; HUTSON; MICKLEBURGH; RACEY, 2001; ARNONE, 2008), preferindo ocos de árvores, folhagens, cupinzeiros, fendas em rochas, buracos no solo e cavernas, bem como construções humanas, tais como forros de casa, porões, sótãos e pontes (BREDT; UIEDA; MAGALHÃES, 1999; ARNONE, 2008) (Figura 8). A seleção do abrigo pode ser influenciada pela avaliação do risco de predação, disponibilidade de alimento, estrutura social, luminosidade, temperatura e umidade (MENDES et al., 2007).



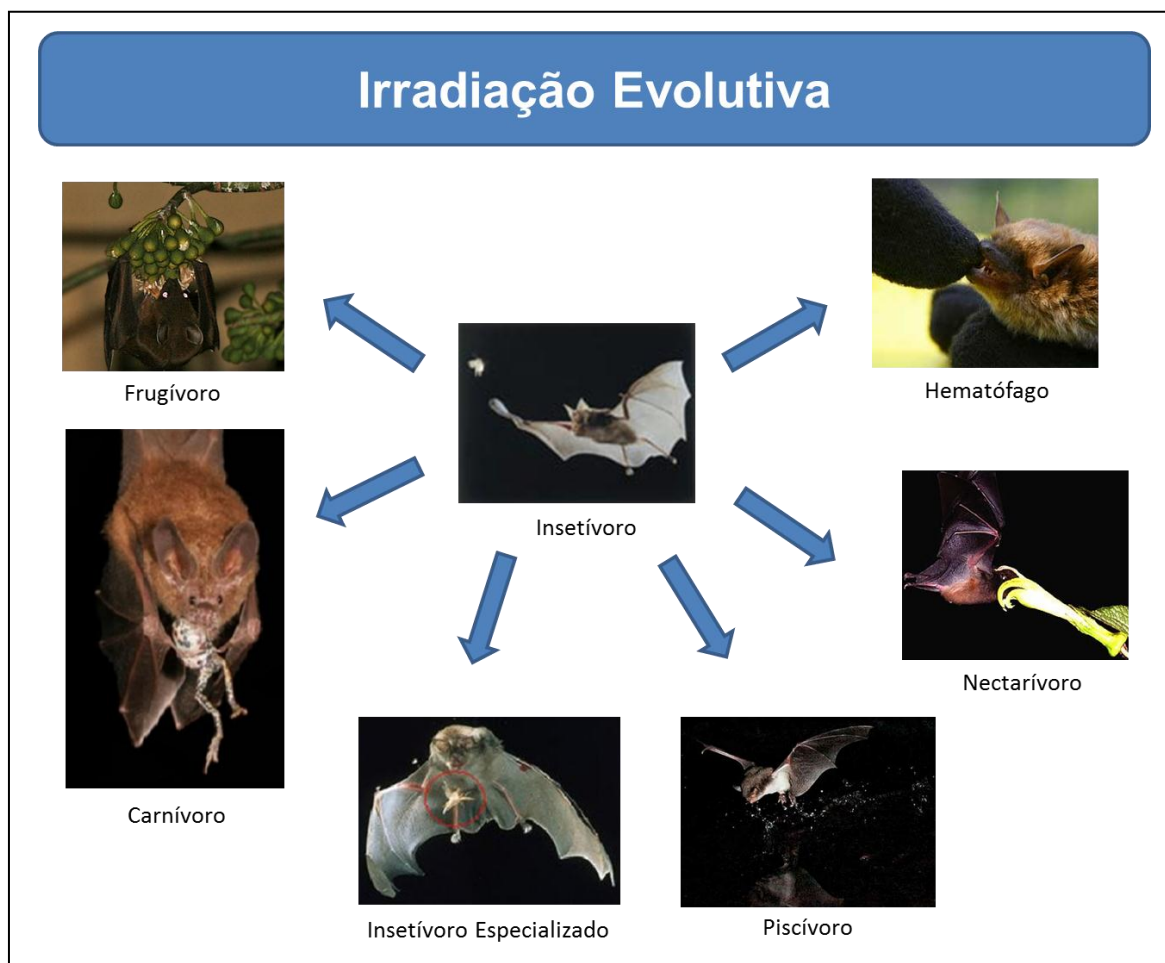
**Figura 8.** Abrigos naturais e artificiais utilizados pelos quirópteros: caverna (A); teto de construção (B); folhagens (C); tronco de árvores (D); gruta (E) e abaixo de caixa d'água (F).

Fonte: MOURA, 2010 (A-E); SILVA, 2010 (F).

A palavra “morcego” tem origem no latim, a partir dos termos *muris*, que significa rato e *coecus*, cego (PERACCHI et al., 2006), sendo este um termo inadequado porque, embora apresentem poucos cones na retina, esses animais não são completamente cegos (REIS et al., 2007). Os morcegos utilizam a ecolocalização para se orientar e, deste

modo, apresentam olhos pequenos, orelhas grandes e estruturas faciais importantes no direcionamento de ultra-sons que saem pelas narinas (REIS et al., 2007).

Quanto aos hábitos alimentares, apresentam uma grande diversidade de dietas, podendo ser insetívoros, carnívoros, piscívoros, nectarívoros, frugívoros, hematófagos ou onívoros. Tal diversidade não ocorre em nenhum outro grupo de mamíferos e, com exceção de sapatitismo, todos os grupos tróficos podem ser encontrados entre os morcegos (REIS et al., 2007). A evolução da diversidade de hábitos alimentares se deu a partir de um único hábito alimentar, o insetívoro (MILDENSTEIN; JONG, 2011), como pode ser observado na figura 9.



**Figura 9.** Esquema do processo evolutivo dos hábitos alimentares dos morcegos.

Fonte: adaptado de MILDENSTEIN; JONG, 2011.

## 1.11 IMPORTÂNCIA ECOLÓGICA DOS MORCEGOS

Devido à grande variação de formas, hábitos alimentares e adaptações morfológicas, os morcegos podem ocupar diversos nichos (BRUSCO; TOZATO, 2009) e, deste modo, influenciar a dinâmica dos ecossistemas naturais, agindo como dispersores de sementes, polinizadores e reguladores de populações de animais (BRUSCO; TOZATO, 2009).

A dispersão de sementes por meio das fezes dos morcegos frugívoros é fundamental para o sucesso reprodutivo das plantas consumidas, a manutenção das florestas e a regeneração de áreas degradadas (MIKICH; BIANCONE, 2005; REIS et al., 2007; BRUSCO; TOZATO, 2009; ALVES JR, 2009). Essas espécies podem dispersar sementes por enormes distâncias, tanto por epizocoria como por endozocoria. A epizocoria ocorre quando os frutos ou sementes são capazes de se prender ao animal que tem a função de transportá-los, enquanto na endozocoria o transporte se dá após o consumo dos frutos que se apresentam atrativos para o animal (BRUSCO; TOZATO, 2009; ALVES JR, 2009).

As espécies hematófagas se alimentam de sangue de outros mamíferos e de aves, e, deste modo, possuem dentes incisivos capazes de fazer cortes mínimos, bem como saliva contendo anticoagulante, o que permite a fluidez do sangue durante a alimentação (REIS et al., 2007). Sua importância ecológica provém do fato de que estas espécies vivem em cavernas e seu guano é considerado fonte de quase toda matéria orgânica ingressa neste ecossistema, o que sustentaria a cadeia alimentar carvenícola (BREDT; UIEDA; MAGALHÃES, 1999; ARNONI; PASSOS, 2003).

Os insetívoros alimentam-se durante o voo, sendo deste modo que adquirem maior volume de alimentação (REIS et al., 2007). Estes animais são importantes controladores de populações de insetos, podendo ser úteis na lavoura, eliminando insetos daninhos e na saúde pública, ao eliminar mosquitos transmissores de doenças, como *Aedes aegypti* (REIS et al., 2007).

Contudo, os morcegos também têm sido apontados como reservatórios de diversos agentes infecciosos, tais como vírus, bactérias, fungos, protozoários, inclusive patógenos emergentes (SILVA; PICCININI; FACCINI, 1997; SHI, 2010; WIBBELT et al., 2010). Uma vez que podem transmitir os microrganismos de forma mecânica ou biológica (SILVA; PICCININI; FACCINI, 1997), os morcegos são considerados animais de grande importância para a saúde humana (CHATURVEDI et al., 2010). Um exemplo emblemático da associação entre morcegos e microrganismos patogênicos é ilustrado pela transmissão da raiva por morcegos hematófagos e não-hematófagos. Estudo conduzido em São Paulo no

período de 2007 a 2009 demonstrou que, dos morcegos positivos para o vírus da raiva, 56,85% eram insetívoros e apenas 2% hematófagos (SCHEFFER; BARROS; ACHKAR, 2010).

Adicionalmente, os morcegos também são empregados em pesquisas em diversas áreas, como: fisiologia, epidemiologia, zoologia e farmacologia. Estudos envolvendo o desenvolvimento de vacinas, estudos sobre o efeito da inalação de fumaça e o tempo de eliminação de drogas pelo organismo, têm sido realizados com esses animais (REIS et al., 2007). Os morcegos também são considerados alimentos para alguns povos da África e tribos indígenas do Brasil, além de terem o guano utilizado como fertilizantes (REIS et al., 2007).

## **1.12 QUIRÓPTEROS E DOENÇAS EMERGENTES E RE-EMERGENTES**

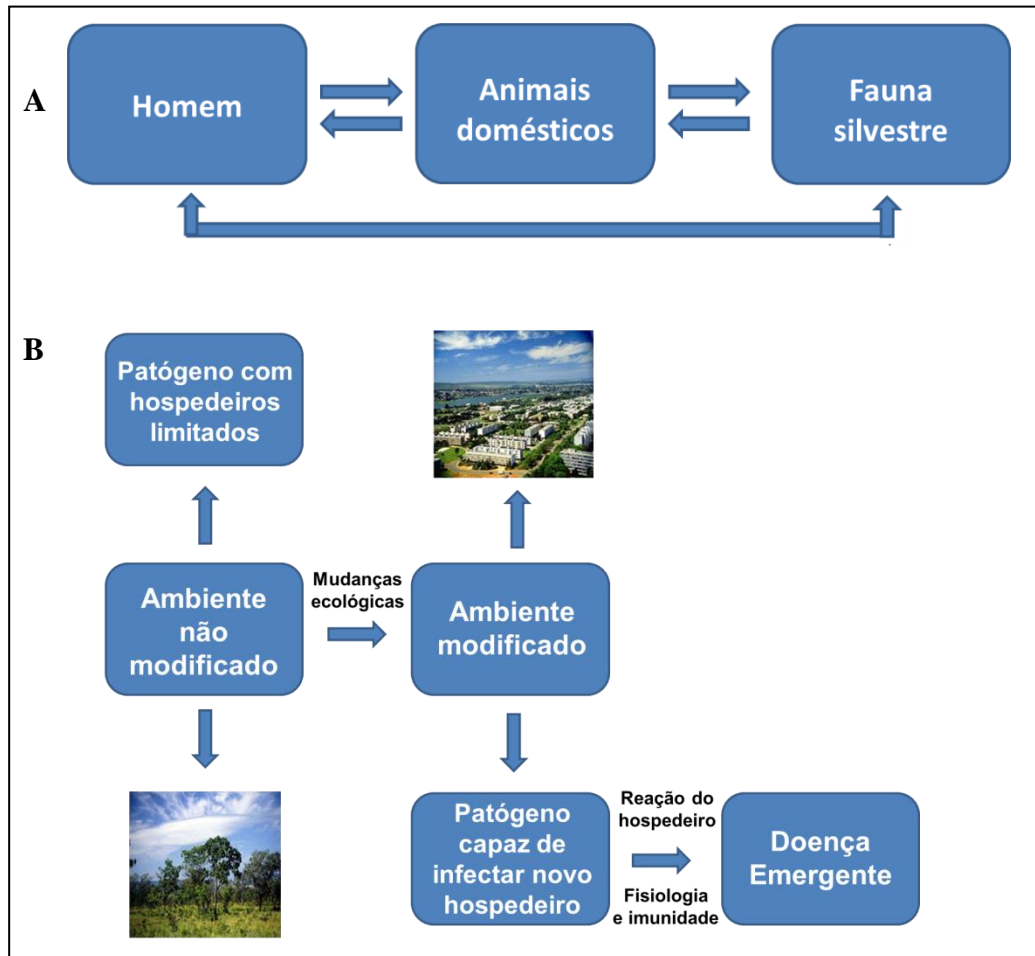
O conceito de doenças emergentes envolve: (1) enfermidades cuja incidência e/ou distribuição geográfica sofreu aumento/expansão nos últimos vinte anos; (2) enfermidades recém descobertas; (3) doenças que podem atingir novas populações ou (4) doenças causadas por agentes que evoluíram recentemente. Por sua vez, as doenças re-emergentes são definidas como enfermidades que apresentam aumento na ocorrência, em comparação com dados anteriores, em determinado âmbito geográfico (DASZAK; CUNNINGHAM; HYATT, 2000; WOOLHOUSE, 2002; CONFALONIEIRI, 2010).

Os estudos relacionados com o aumento da incidência de doenças infecciosas emergentes e re-emergentes no mundo demonstram que as zoonoses são os principais aspectos para tal aumento, uma vez que, os animais são a origem de infecção em cerca de 75% dos casos de doenças causadas por patógenos emergentes e re-emergentes. Os eventos de emergência das doenças infecciosas ocorrem tanto em ambientes construídos ou transformados pelo homem, bem como em ambientes naturais (CONFALONIEIRI, 2010).

Existem vários modelos ecológicos que buscam descrever o processo de emergência de doenças infecciosas. Um dos primeiros a serem observados foi o descrito por Daszak, Cunningham e Hyatt (2000), o qual enfatiza a continuidade do processo e estabelece as interações entre diversos hospedeiros, quais sejam o homem, os animais domésticos e a fauna silvestre (Figura 10A).

Outros modelos têm sido considerados, como o proposto por Perkins, Cattadori e Hudson (2005), no qual é afirmado que a primeira etapa de um processo de emergência de doenças infecciosas se dá por mudanças ecológicas, levando a uma transferência do patógeno

entre espécies. Tais eventos devem considerar a reação do novo hospedeiro com o agente infeccioso, como por exemplo, sua imunidade e fisiologia (Figura 10B).

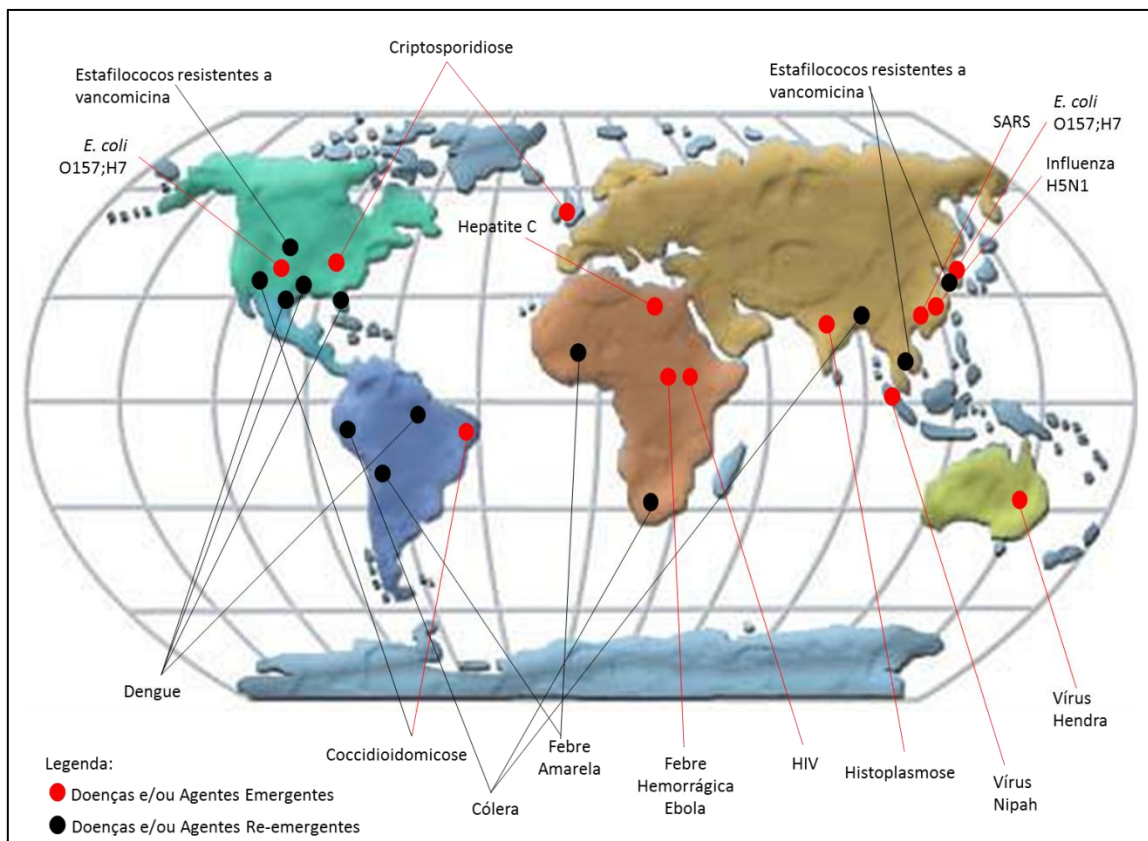


**Figura 10.** Interações entre os hospedeiros humanos, domésticos e silvestres (A). Modelo ecológico caracterizando o surgimento de doenças emergentes (B).

Fonte: Adaptações de CONFALONIEIRI, 2010 (A) e PERKINS; CATTADORI; HUDSON, 2005 (B).

A emergência de zoonoses depende da migração do patógeno de uma espécie doadora (hospedeira) para outra receptora. Para tal fim, são necessárias algumas características: (1) o patógeno deve possuir capacidade fisiológica para ocupação de novos nichos; (2) elevada prevalência da infecção na população de origem e, (3) contato insistente entre as espécies doadoras e receptoras (CONFALONIEIRI, 2010). Desta forma, é fundamental identificar as possíveis rotas de migração dos agentes infecciosos a partir de seu reservatório na natureza para novos hospedeiros, a fim de estabelecer uma possível ameaça por novos patógenos a determinados hospedeiros, incluindo o homem (DOBSON, 2005).

As doenças emergentes e re-emergentes são um problema de nível mundial, ocorrendo tanto países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento (COHEN, 1998). Compreendem doenças causadas principalmente por bactérias e vírus, embora, nos últimos anos, protozoários e fungos tenham figurado como importantes agentes. A figura 11 ilustra a diversidade de doenças emergente e re-emergentes distribuídas no mundo.



**Figura 11.** Distribuição geográfica de doenças e/ou patógenos emergentes e re-emergentes.

Fonte: Adaptado de PAPPAGIANIS, 1998 e MORENS; FOLKERS; FAUCI, 2010.

Os mamíferos têm papel crucial na emergência de doenças infecciosas, uma vez que são os principais reservatórios de zoonoses. Anteriormente acreditava-se que, devido a grande proximidade filogenética com os seres humanos, os primatas seriam as principais fontes de emergência de doenças; no entanto, estudos revelaram que os ungulados figuram como os animais mais importantes nesse processo, provavelmente pelo intenso contato com os humanos. A relação de espécies efetoras aponta os carnívoros e roedores em seqüência de importância; primatas, mamíferos marinhos e morcegos aparecem como reservatórios menos importantes de patógenos emergentes (PERKINS; CATTADORI; HUDSON, 2005).



No entanto, os morcegos se destacam como reservatórios importantes de vírus emergentes pois, devido sua imunidade, são capazes de abrigar uma maior quantidade de patógenos quando comparamos aos outros mamíferos (PERKINS; CATTADORI; HUDSON, 2005). Um estudo de infecção experimental pelo vírus Ebola em morcegos demonstrou que estes animais são capazes de suportar a circulação e a replicação de altos títulos virais sem manifestar sinais clínicos (OMATSU et al., 2007).

É provável que patógenos que têm os morcegos como reservatórios, utilizem-se da adaptação ao voo que esses animais apresentam como rota de dispersão e possibilidade de aquisição de novos nichos (DOBSON, 2005; CONFALONIEIRI, 2010). Morcegos frugívoros podem dispersar agentes infecciosos presentes em sua saliva durante o voo ao lançar os frutos parcialmente digeridos no solo. Comportamento semelhante ocorre em espécies insetívoras que eliminam as partes mais pesadas do corpo dos insetos que comem (DOBSON, 2005).

Os morcegos desempenham um importante papel na manutenção de vírus zoonóticos, atuando como vetores ou reservatórios naturais, tendo sido detectado e/ou isolado mais de 99 tipos de vírus nestes animais, incluindo espécies das famílias: Rhabdoviridae, Orthomyxoviridae, Paramyxoviridae, Coronaviridae, Togaviridae, Flaviviridae, Bunyaviridae, Reoviridae, Arenaviridae, Herpesviridae, Picornaviridae, Hepesviridae e Adenoviridae, (OMATSU et al., 2007; SHI, 2010; LI et al., 2010; OSBORNE et al., 2011). Muitos vírus que reconhecidamente causam doenças no homem e em outros animais são detectados em morcegos embora este animal se apresente aparentemente saudável (SHI, 2010). A raiva – enfermidade de alta mortalidade causada por um vírus de RNA pertencente ao gênero *Lyssavirus* – continua sendo a mais importante doença infecciosa transmitida por morcegos (BADILLO; MANTILLA; PRADILLA, 2009). A raiva humana causada por um sorotipo do gênero *Lyssavirus* proveniente de morcegos tem sido bastante relatada nas Américas do Norte e do Sul, Europa, Austrália e África (SHI, 2010).

### **1.12.1 Infecções Fúngicas e Morcegos**

Nos últimos anos, tem sido comum a descrição de novas espécies fúngicas por meio de técnicas moleculares, a relação crescente de cepas resistentes a antifúngicos, bem como o aumento do número de infecções causadas por fungos provenientes do ambiente, nunca antes diagnosticados como patógenos aos humanos e animais (NUCCI; MARR, 2005).

Os morcegos podem participar do ciclo biológico de diversas espécies fúngicas emergentes e re-emergentes, e podem também ser vitimados por esses patógenos.

Recentemente, tem sido discutido com grande preocupação pelas autoridades, a “Síndrome do Nariz Branco” (*White-Nose Syndrome*), cujo agente etiológico é o fungo *Geomyces destructans*. O microrganismo é capaz de crescer sobre focinho, orelhas e/ou asas membranosas de animais afetados, sendo responsável por invadir e destruir células da pele e membranas destes animais, causando uma doença devastadora que tem causado mortalidade em massa em morcegos na América do Norte (BLEHERT et al., 2009; PUECHMAILLE et al., 2011).

A presença de morcegos em um dado ambiente é considerada fator importante para o aumento do risco de aquisição de infecções, inclusive fúngicas, como histoplasmose (GALVÃO DIAS et al., 2010). A literatura relata isolamentos de *Cryptococcus neoformans* a partir de guano de quirópteros (REZENDE; DUARTE; FILIÚ, 2003) e *Paracoccidioides brasiliensis* no trato gastrointestinal nestes animais (GROSE; TAMSITT, 1965). Dados da literatura mostram que os quirópteros são os animais silvestres mais importantes na manutenção do ciclo biológico do fungo *Histoplasma capsulatum* na natureza (GALVÃO DIAS et al., 2010). A primeira associação entre morcegos e *H. capsulatum* foi realizado por Emmons (1958) e, desde então, outros estudos têm confirmado a participação de várias espécies de quirópteros na ecoepidemiologia do patógeno fúngico (Quadro 01).

Quadro 01: Isolamentos de *Histoplasma capsulatum* em quirópteros.

<b>Espécie de Morcego</b>	<b>Espécime clínico</b>	<b>Local</b>	<b>Referências</b>
<i>Artibeus hirsutus</i>	Pulmões e intestino	México	Taylor et al., 1999
<i>A. jamaicensis parvipes</i>	Pulmões, fígado e baço	Cuba	Fernández Andreu, 2004
<i>Brachyphylla nana nana</i>	Pulmões e fígado	Cuba	Fernández Andreu, 2004
<i>Carollia perspicillata</i>	Baço e fígado	República do Panamá, Panamá	Sharcklete; Diercks; Gale, 1961
<i>C. perspicillata</i>	Pulmões, fígado e baço	República do Panamá, Panamá	Klite; Diercks, 1965
<i>Chilonycteris rubiginosa fusca</i>	Baço e fígado	República do Panamá, Panamá	Sharcklete; Diercks; Gale, 1961
<i>C. rubiginosa</i>	Pulmões, fígado, baço, rim e fezes	República do Panamá, Panamá	Klite; Diercks, 1965
<i>Eumops bonariensis</i>	Fígado e baço	Buenos Aires,	Canteros et al.,

		Argentina	2005
<i>E. glaucinus</i>	Não determinado	São Paulo, Brasil	Galvão Dias et al., 2010
<i>Glossophaga soricina</i>	Baço	República do Panamá, Panamá	Klite; Diercks, 1965
<i>G. soricina</i>	Fígado	Girardot, Colômbia	Marinkelle; Grose, 1965
<i>Leptonycetris nivalis</i>	Pulmões, fígado e intestino	México	Taylor et al., 1999
<i>Macrotus waterhousei minor</i>	Pulmões e baço	Cuba	Fernández Andreu, 2004
<i>Micronycteris megalotis</i>	Pulmões, fígado, baço, rim e fezes	República do Panamá, Panamá	Klite; Diercks, 1965
<i>Myotis austroriparius</i>	Pulmões, fígado e baço	Flórida, Estados Unidos	Disalvo et al., 1970
<i>M. californicus</i>	Não determinado	México	Taylor et al., 1999
<i>Molossus major</i>	Pulmões e baço	República do Panamá, Panamá	Klite; Diercks, 1965
<i>M. molossus</i>	Não determinado	São Paulo, Brasil	Galvão Dias et al., 2010
<i>M. rufus</i>	Não determinado	São Paulo, Brasil	Galvão Dias et al., 2010
<i>Mormoops stramineus</i>	Intestino	México	Taylor et al., 1999
<i>Natalus stramineus</i>	Pulmões e intestino	México	Taylor et al., 1999
<i>Nyctinomops macrotis</i>	Não determinado	São Paulo, Brasil	Galvão Dias et al., 2010
<i>Phyllostomus hastatus</i>	Pulmões e baço	República do Panamá, Panamá	Klite; Diercks, 1965
<i>Pteronotus parnellus</i>	Não determinado	México	Taylor et al., 1999
<i>Tadarida brasiliensis muscula</i>	Fígado e baço	Cuba	Fernández Andreu, 2004
<i>T. brasiliensis</i>	Não determinado	São Paulo, Brasil	Galvão Dias et al., 2010

## 1.13 CARACTERÍSTICAS DAS ESPÉCIES DE QUIRÓPTEROS CAPTURADAS NESTE ESTUDO

### 1.13.1 *Molossus molossus*

A espécie *M. molossus* (Figura 12) é encontrada nas Américas, com registro nos Estados Unidos, México, Peru, Argentina, Paraguai, Uruguai, Brasil, Guianas, na Venezuela e Trinidad e Tobago (PERACCHI et al., 2006), sendo amplamente distribuída nos estados brasileiros (FABIAN; GREGORIN, 2007). Os morcegos do gênero *Molossus* alimentam-se exclusivamente de insetos aéreos e vivem em colônias que com até centenas de indivíduos, abrigando-se em ocos de árvores, fendas em rochas e construções humanas. A espécie *M. molossus* pode ser encontrada em abrigos em áreas rurais, como ocos de árvores, além de abrigos urbanos, sendo comumente encontrados em forros de residências (PERACCHI et al., 2006). Um fator importante de ser ressaltado é a aparente ausência de migração desta espécie (FABIAN; GREGORIN, 2007).

Relatos da literatura mostram que os fungos *H. capsulatum* (GALVÃO DIAS et al., 2010) e *Wangiella dermatitidis* (REIS, 1982), já foram isolados de *M. molossus*.

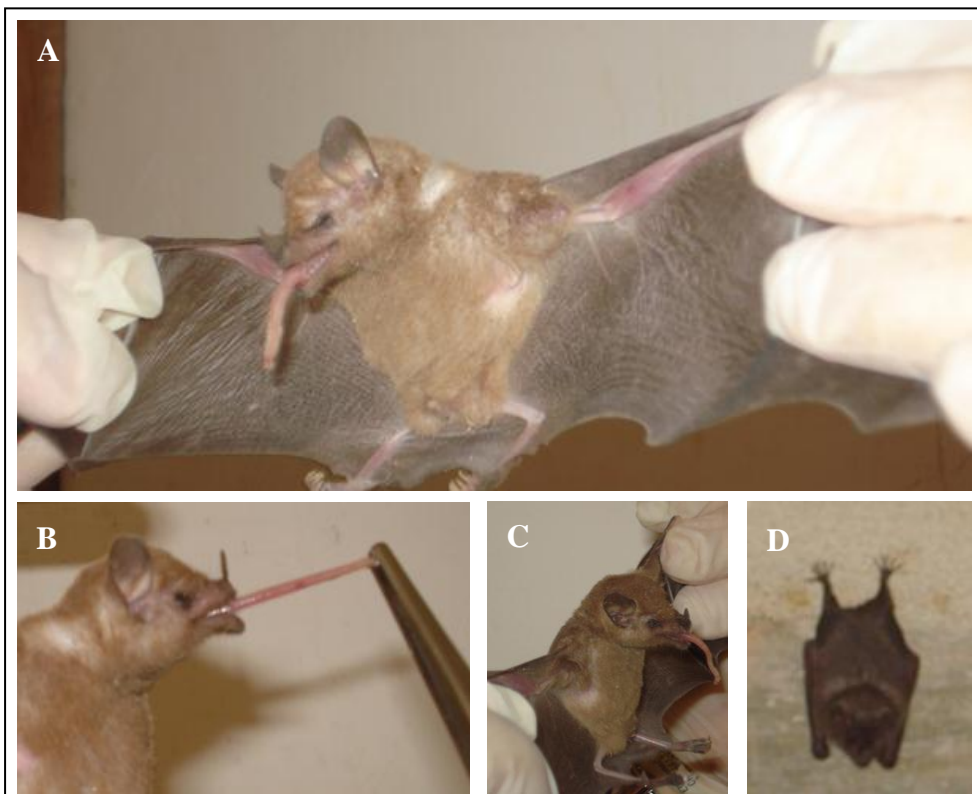


**Figura 12.** Espécimes de *Molossus molossus* (Família Molossidae) capturados em forro de casa urbano (A) e no interior de casa de temporada (B). Fonte: SILVA, 2010.

### 1.13.2 *Glossophaga soricina*

Esta espécie pode ser encontrada na América Latina e Caribe, com registros no México, Guianas, Brasil, Argentina, Paraguai, Bolívia, Peru, Venezuela, Antilhas, Jamaica e ilhas Bahamas (PERACCHI et al., 2006). São animais que se alimentam de néctar de uma grande variedade de plantas, ocorrendo em todos os biomas brasileiros (NOGUEIRA; DIAS; PERACCHI, 2007). Acredita-se que esta capacidade de ocupação de diversos ambientes se deve ao fato de a espécie *G. soricina* (Figura 13) ser bastante versátil no uso de abrigos, podendo ser encontrada em cavernas, ocos de árvores, fendas de rochas, túneis, minas, casas abandonadas, interior de cisternas, ductos de ventilação, poço de elevador, pontes, telhas e forros (NOGUEIRA; DIAS; PERACCHI, 2007). São espécies que vivem em pequenas colônias de 12 a 16 indivíduos de ambos os sexos, podendo estar associadas a outras espécies (PERACCHI et al., 2006).

São observados registros de isolamentos fúngicos nesta espécie. Mok, Luizão e Silva (1982) relataram a presença de *Torulopsis colliculosa*, *Candida guilliermondii*, *Trichosporon pullulans* em baço de animais capturados na Bacia Amazônica; enquanto em 1965, tanto Klite e Diercks, como Marinkelle e Grose descreveram o isolamento de *H. capsulatum* em amostras de fígado e baço de animais desta espécie, respectivamente.



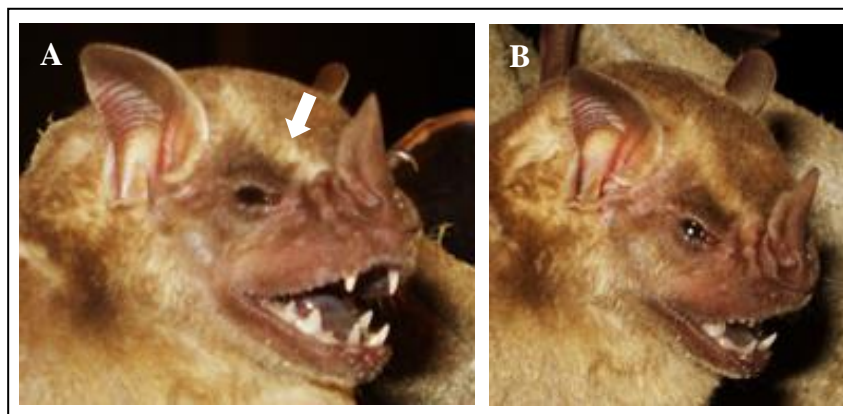
**Figura 13.** Morcego nectarívoro da espécie *Glossophaga soricina* (Família Phyllostomidae, Sub-família Glossophagine), após morte por inalação de éter: A) Envergadura do animal; B) Perfil do do rosto do animal mostrando a língua característica deste tipo alimentar; C) Morcego de perfil e D) Morcego no abrigo.

Fonte: SILVA, 2010.

### 1.13.3 *Sturnira lilium*

As espécies do gênero *Sturnira*, dentre elas, *S. lilium* (Figura 14), são endêmicas na região tropical no Novo Mundo, podendo ser encontradas tanto em regiões de florestas como em regiões semi-áridas (GANNON; WILLING; JONES JR, 1989; PERACCHI et al., 2006). A espécie *S. lilium* ocorre no México, Bolívia, Brasil, Paraguai, Uruguai, Argentina, Trinidad e Tobago (PERACCHI et al., 2006). No Brasil é encontrada em todo o território (ZORTÉA, 2007). São predominantemente frugívoros alimentando-se principalmente de plantas do gênero *Solanum* (PERACCHI et al., 2006; ZORTÉA, 2007), podendo também se alimentar de insetos e néctar (GANNON; WILLING; JONES JR, 1989), e, desta forma, são capazes de atuar como agentes polinizadores (ZORTÉA, 2007). Estudos demonstram que esta espécie adapta-se bem em regiões onde existem alterações ambientais, sendo encontradas em abundância em áreas de desmatamento. Os abrigos mais comuns para esta espécie são: grutas, edificações humanas, folhagem e ocos de árvores (ZORTÉA, 2007).

A literatura relata isolamentos de fungos a partir desta espécie, dentre eles *Wangiella dermatitidis* (REIS, 1982), *Candida parapsilosis* e *Candida curvata* (MOK; LUIZÃO; SILVA, 1982) foram isolados a partir do pulmão destes animais, enquanto *Kluyveromyces* sp. e *Candida* sp., recuperados de amostras do baço (MOK; LUIZÃO; SILVA, 1982).



**Figura 14.** Morcego da espécie *Sturnira lilium*, representante da família Phyllostomidae e Sub-família Stenodermatinae. A) Seta representando listra frontais que caracterizam esta sub-família e B) Perfil do morcego.  
Fonte: SILVA, 2010.

#### 1.13.4 *Carollia perspicillata*

A espécie *C. perspicillata* (Figura 15) distribui-se desde o norte da Argentina ao Sul do México (CRETEKOS et al., 2005), com registros na Bolívia, Paraguai, Peru, Guianas e Brasil, onde distribui-se amplamente, não apresentando registro apenas nos estados do Rio Grande do Norte, Sergipe e Tocantins (PERACCHI et al., 2006). Possui hábito alimentar frugívoro, sendo amplamente associado a plantas da família Piperaceae, especialmente do gênero *Piper*, que são encontradas em áreas abertas, tais como: clareiras, bordas de mata e capoeiras (MIKICH, 2002; PERACCHI et al., 2006; FILHO; LIMA; FOGAÇA, 2007). No entanto, estudos revelaram que a escolha do tipo de fruto para consumo independe do hábito da planta, do seu ambiente de ocorrência e da abundância na área, sendo dependente da cor que o fruto apresenta, sua disposição na planta, bem como, a disponibilidade ao longo do ano (MIKICH, 2002). Além disto, alimenta-se de insetos e néctar (PERACCHI et al., 2006; FILHO; LIMA; FOGAÇA, 2007).

Os indivíduos desta espécie podem associar-se em colônias como um harém de um único macho vivendo com inúmeras fêmeas, ou em colônias divididas por sexo (PERACCHI et al., 2006). Estas organizações sociais podem conter de 10 a 100 indivíduos e são observadas em construções abandonadas, cavernas, bueiros, galerias pluviais, fendas de rochas, ocos de árvores e em cavernas (CLOUTIER; THOMAS, 1992; PERACCHI et al., 2006; FILHO; LIMA; FOGAÇA, 2007).



**Figura 15.** Morcego da espécie *Carollia perspicillata*, representante da família Phyllostomidae e Sub-família Carollinae. A) Envergadura do morcego; B) Morcego de perfil; C) Seta indicando lábio inferior em “V” com um verruga central rodeada por lobos, característicos da espécie e D) Perfil do rosto do animal. Fonte: MOURA, 2011 (C); SILVA, 2011 (A, B e D).

Cloutier e Thomas (1992) relatam uma diversidade de isolados microbianos nesta espécie, sendo evidenciada a presença de protozoários do gênero *Trypanossoma*, além de bactérias intestinais e ainda vírus, como o da raiva. Estes pesquisadores afirmam que também já foram descritos fungos nesta espécie, dentre os quais podemos apontar, *Histoplasma capsulatum*, *Candida* sp., *Scopulariopsis* sp. e *Cryptococcus* sp.. Apesar da diversidade de parasitas encontrados nesta espécie, o isolamento fúngico é raro, conforme observado por Klite e Diercks (1965) que isolou o fungo *H. capsulatum* em apenas sete de 141 animais capturados desta espécie.

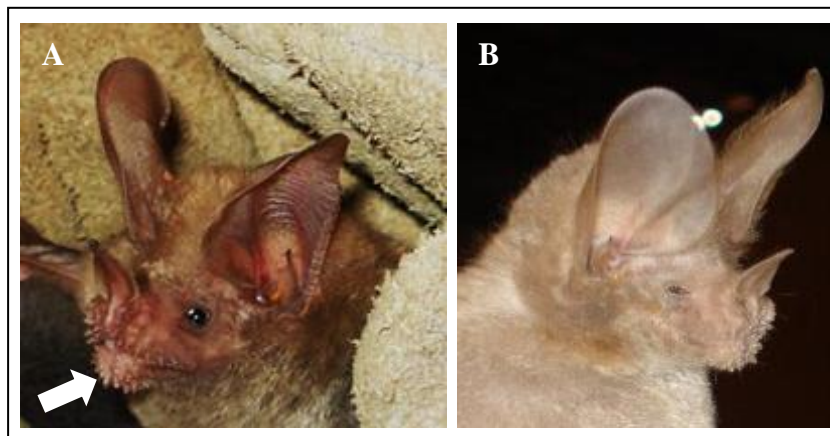
### 1.13.5 *Trachops cirrhosus*

Esse morcego é encontrado do México às Guianas, Trinidad e Tobago, Bolívia, Equador e Brasil (PERACCHI et al., 2006). No Brasil, a espécie já foi registrada em 17



estados, não tendo registro apenas na Região Sul do país (NOGUEIRA; PERACCHI; MORATELLI, 2007). A espécie *T. cirrhosus* (Figura 16) habita áreas de floresta, principalmente nas proximidades de rios, brejos e lagoas, utilizando como refúgio árvores ocas, cavernas, bueiros, túneis e construções; são coloniais, formando grupos de até 50 morcegos. Esta espécie é considerada onívora, e oportunista (PERACCHI et al., 2006).

É reconhecido pela predação de pequenos anfíbios, lagartos, aves e mamíferos, tais como ratos, marsupiais e morcegos, adaptando-se de forma rápida a vocalização d suas presas, através de aprendizado social. Além disso, alimenta-se de insetos e frutos (NOGUEIRA; PERACCHI; MORATELLI, 2007).



**Figura 16.** Morcego da espécie *Trachops cirrhosus*, representante da família Phyllostomidae e Sub-família Stenodermatinae. A) Seta indicando protuberâncias em forma de verrugas nos lábios e B) Perfil do morcegos. Fonte: MOURA, 2010 (A); SILVA, 2010 (B).

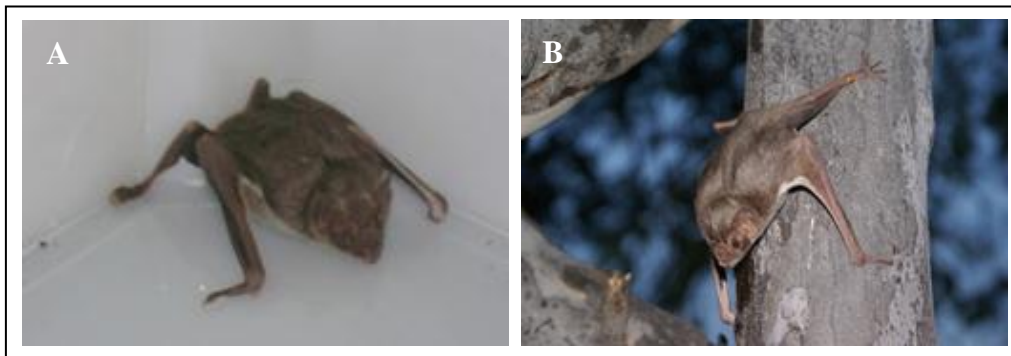
### 1.13.6 *Desmodus rotundus*

*Desmodus rotundus* (Figura 17) ocorre no México, Venezuela, Trinidad e Tobago, Bolívia, Chile, Brasil, Paraguai, Uruguai e Argentina (PERACCHI et al., 2006). É uma espécie relacionada com prejuízos na pecuária devido o seu papel na transmissão da raiva (AGUIAR, 2007). A espécie é encontrada desde áreas florestadas até regiões secas e utiliza como abrigos ocos de árvores, cavernas, bueiros, minas abandonadas e construções civis (BREDET; UIEDA; MAGALHÃES, 1999; AGUIAR, 2007).

São animais que vivem em colônias com baixo número de indivíduos, exceção se dá quando seu controle não é feito regularmente. Alimentam-se de sangue de mamíferos, preferindo aqueles com grande porte (AGUIAR, 2007), inclusive o homem (BREDET;

UIEDA; MAGALHÃES, 1999). Para tanto, apresentam características específicas, tais como a presença de enzimas anticoagulantes em sua saliva e dois canais em cada lado da língua que lhes permitem sugar o sangue (PERACCHI et al., 2006). Cada morcego ingere de 15 a 25 ml de sangue por noite e um animal parasitado poderá ser visitado à noite por mais de um morcego (PERACCHI et al., 2006).

Esse animal é de extrema importância no ciclo silvestre da raiva humana, sendo responsável por ataques a rebanhos bovinos em áreas rurais. Além do vírus da raiva, estudos mostram o crescimento em hemocultura de *Trypanosoma* spp. (BARROS et al., 2008) e, adicionalmente, também foi verificado o isolamento de fungos dos gêneros *Candida* sp. e *Kluyveromyces* sp. de amostras de fígado desses animais desta espécie (MOK; LUIZÃO; SILVA, 1982).



**Figura 17.** Espécimes de *Desmodus rotundus* (Família Phyllostomidae, Sub-família Desmodontinae) observados no interior de residência (A) e preso ao tronco de uma árvore (B). Fonte: MOURA, 2010.

### 1.13.7 *Anoura geoffroyi*

O gênero do qual pertence essa espécie é encontrado na Colômbia, Venezuela, Guianas, Brasil, Equador, Peru, Bolívia, Argentina, Costa Rica, Panamá, México e Antilhas (PERACCHI et al., 2006). No Brasil, os registros de ocorrência de *A. geoffroyi* (Figura 18) denotam sua ausência apenas na região Norte (NOGUEIRA; DIAS; PERACCHI, 2007). Esta espécie é observada em todos os biomas brasileiros (NOGUEIRA; DIAS; PERACCHI, 2007), sendo encontrada em áreas de florestas úmidas (PERACCHI et al., 2006), seus abrigos mais comuns são cavernas, fendas de rochas, bueiros, ocos de árvores e túneis, formando colônias de até 100 morcegos (NOGUEIRA; DIAS; PERACCHI, 2007). São animais que se alimentam predominantemente de néctar, muito embora possam ser encontrados consumindo

frutos, pólen e insetos (PERACCHI et al., 2006; NOGUEIRA; DIAS; PERACCHI, 2007). Não foram encontrados registros na literatura sobre isolados fúngicos nesta espécie.



**Figura 18.** Morcego nectarívoro da espécie *Anoura geoffroyi*, representante da família Phyllostomidae e Sub- família Glossophaginae. Fonte: MOURA, 2010.

## **2 PERGUNTAS DE PARTIDA**

1. Quirópteros podem ser considerados fontes naturais importantes para o isolamento de fungos patogênicos?

## **3 HIPÓTESES CIENTÍFICAS**

1. Os quirópteros apresentam-se como potenciais sentinelas para doenças causadas por fungos dimórficos.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 OBJETIVO GERAL**

Descrever o primeiro isolamento do fungo dimórfico *Coccidioides posadasii* em quiróptero.

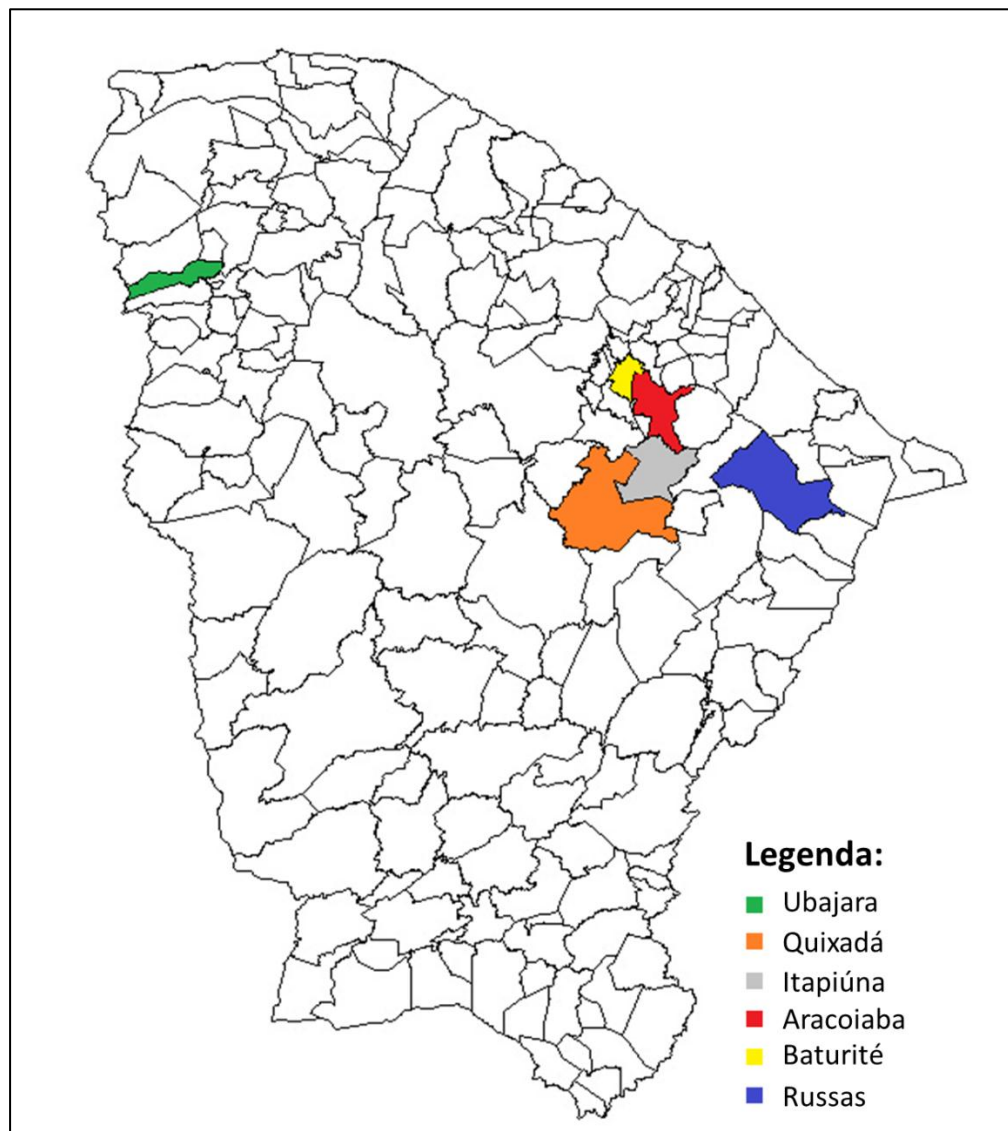
### **4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Descrever a presença de *Coccidioides posadasii* em quirópteros, por meio de cultivo *in vitro*, técnicas moleculares e sorológicas;
2. Caracterizar os locais onde foram capturados os morcegos que apresentaram-se como hospedeiros de *Coccidioides posadasii*;
3. Discutir a importância dos morcegos no ciclo biológico e na dispersão de *Coccidioides posadasii*.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 LOCAL DE ESTUDO

No período de fevereiro de 2010 a setembro de 2011, foram realizadas coletas em seis municípios do estado do Ceará: Aracoiaba, Baturité, Itapiúna, Russas, Quixadá e Ubajara, respeitando-se o cronograma estabelecido pelo programa de controle da raiva pertencente à Secretaria de Saúde do Estado do Ceará (SESA). Os municípios foram escolhidos com o intuito de se isolar *Histoplasma capsulatum* a partir de quirópteros, uma vez que a literatura consagrada a relação entre eles. A figura 19 mostra a localização dos municípios onde foram capturados os animais no mapa de divisão política do estado do Ceará.



**Figura 19.** Mapa representando as cidades do estado do Ceará onde foram realizadas capturas de quirópteros.

Os municípios incluídos na pesquisa localizam-se em regiões semi-áridas e sub-úmidas do estado, sendo caracterizados por clima tropical quente semi-árido, subúmido e úmido, segundo dados disponíveis pelo Instituto de Pesquisa e Estratégia Econômica do Ceará (IPECE). O estudo foi conduzido em áreas urbanas e rurais dos municípios supracitados durante períodos diurno e noturno, em locais de possível presença de morcegos, tais como construções e casas abandonadas, forros de residências e escolas, além de cavernas em formações rochosas (Figura 20).



**Figura 20.** Sítios de captura de morcegos. Caminho para coleta noturna em caverna localizada no município de Quixadá (A, B, C); prédio abandonado contendo em seu interior poço, popularmente denominado de cacimba, indicado por seta branca (D); forro de casa (E).

Fonte: MOURA, 2010 (A-C) e SILVA, 2010 (D, E).

O processamento das amostras coletadas foi realizado no Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) da Universidade Federal do Ceará, sob normas de biossegurança nível 3.

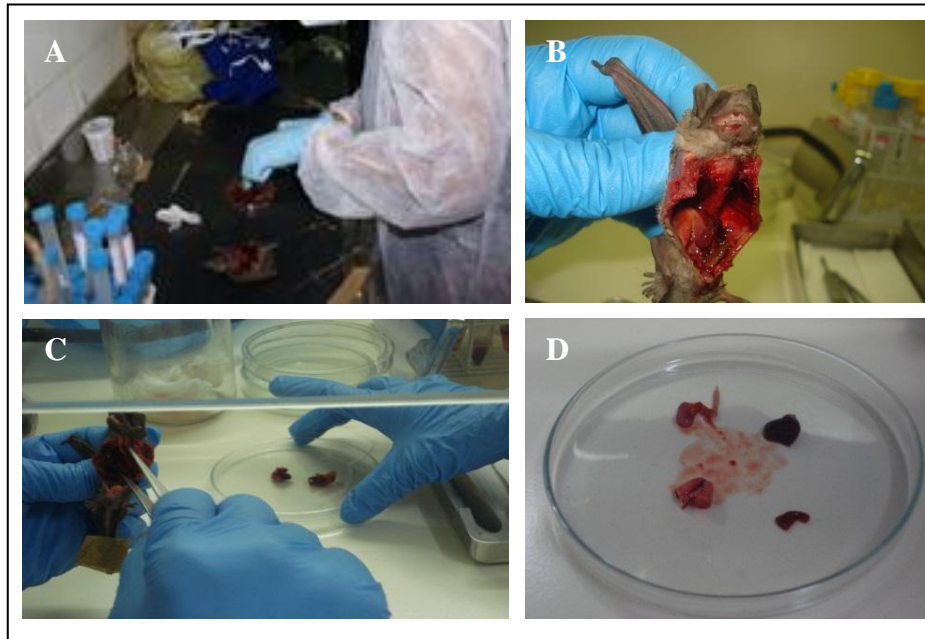
## 5.2 ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho está enquadrado dentro de um projeto amplo que tem por objetivo inicial foi o de caracterizar fenotípicamente e molecularmente os isolados de *Histoplasma capsulatum* a partir de amostras de materiais oriundos de animais, humanos e do ambiente, visando discutir a origem das amostras como fator de diversidade. Para sua realização, este estudo foi submetido ao Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Ceará, recebendo aprovação para o trabalho com os animais de acordo com o protocolo de número 07381395-8, que se encontra em anexo. Neste estudo foram empregados os morcegos capturados pelo Núcleo de Controle de Vetores (NUVET) da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará (SESA), para vigilância epidemiológica da raiva, conforme previamente autorizado pelo IBAMA.

## 5.3 QUIRÓPTEROS

Os morcegos foram capturados com o auxílio de médicos veterinários e técnicos do NUVET, utilizando redes de nylon com malha de 36 mm, em coletas diurnas e noturnas. Após a captura, os animais foram levados vivos ao laboratório do Núcleo de Vetores da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará (NUVET/SESA) cuja identificação foi realizada por médico veterinário, em seguida, os animais foram eutanasiados por inalação de éter. Sob condições assépticas, coletou-se fígado, baço e pulmões de cada animal (Figura 21), os quais foram transferidos para tubos tipo Falcon® de 15 mL contendo solução salina estéril acrescida de cloranfenicol 200 mg/L, com devida identificação. Os tubos contendo os órgãos foram armazenados em freezer a -20°C até processamento (KLITE; DIERCKS, 1965).





**Figura 21.** Retirada dos órgãos para análise micológica, molecular e sorológica. Nas condições de campo, onde foi utilizado o ponto de apoio para os agentes de endemias (A); Nas condições de laboratório, utilizando fluxo laminar (B, C). Órgãos utilizados para o processamento, fígado, baço e pulmões (D). Fonte: SILVA, 2011.

Os procedimentos para detecção de fungos patogênicos nas amostras de órgãos de quirópteros foram realizados com a utilização de equipamentos de proteção individual (EPI), no interior de cabine de segurança biológica classe II B2. As carcaças dos animais capturados, bem como os utensílios utilizados para o procedimento, foram descontaminados em autoclave a 121°C por 30 minutos.

Para o processamento laboratorial, os órgãos foram retirados do freezer e, com o auxílio de uma pinça sem dentes, foram depositados em placa de Petri para o descongelamento. Foram realizadas cortes manuais de cada órgão para pesquisa de estruturas fúngicas em montagens do tipo lâmina-lamínula com agente clarificante KOH a 10%. Ainda com o auxílio de pinça, para cada órgão analisado, foi realizado um “imprint” em lâmina para posterior coloração da Prata-Metenamina (CAMARGO, 2004), conforme mostrada em anexo.

O processamento e cultivo do material biológico foram realizados segundo procedimento descrito por Taylor et al. (1999). Para tanto, cada órgão foi transferido para um gral de porcelana, contendo 1 mL de solução salina com cloranfenicol (200 mg/L). O material foi macerado com o auxílio de um pistilo e o homogenato obtido foi transferido para tubo tipo Falcon® 15 mL e centrifugado a 3000 r. p. m. por 20 minutos. Alíquotas de 100µL obtidas do

sobrenadante obtido foram semeadas em placas de Petri contendo meio de cultura ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) suplementado com 1% glicose, 0,1% L-cisteína, 0,05% cicloheximida, e 0,005% cloranfenicol. Os experimentos foram realizados em duplicata, e as placas foram incubadas às temperaturas de 28°C e 35°C, com observações semanais. O sobrenadante remanescente foi mantido em freezer a -20°C para realização de imunodifusão e extração de DNA.

As placas foram incubadas por até seis semanas nas condições supracitadas. Colônias de patógenos fúngicos dimórficos foram semeadas em ágar Batata Dextrose para análise macromorfológica das características de relevo, textura e pigmentação do verso e reverso da colônia, bem como análises micromorfológicas em preparações tipo lâmina-lamínula com lactofenol azul-algodão, seguida de observações em microscópio óptico comum no aumento de 400X (SIDRIM; BRILHANTE; ROCHA, 2004).

#### **5.4 TESTE DE REVERSÃO *in vivo***

A identificação das colônias suspeitas foi realizada também por teste de reversão *in vivo*, conforme descrito por Cordeiro et al. (2006). Neste protocolo, a confirmação da identidade fúngica foi baseada na observação microscópica de estruturas parasitárias patognomônicas formadas durante infecção experimental em modelo murino.

Para tanto, foi adicionado 5mL de solução salina 0,9% a cada cultura fúngica mantida em ágar Batata Dextrose durante 15 dias. Em seguida, foram realizadas raspagens da superfície das colônias a fim de obter-se o inóculo fúngico. Dois camundongos *Swiss* receberam 1mL da suspensão preparada por via intraperitoneal e foram mantidos em biotério com temperatura e umidade controladas e fotoperíodo de 12 horas por quatro semanas, recebendo água e ração *ad libitum*.

Transcorrido esse período, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical e imediatamente foram retirados fígado, baço e pulmões. Fragmentos de cada órgão foram semeados em tubos contendo Agar Mycosel® e incubados a temperatura de 28°C por 30 dias, para análises macro e micromorfológica.

Adicionalmente, foram realizadas análises histopatológicas dos órgãos dos animais nos quais se realizou a infecção experimental. Para tanto, procedeu-se a desidratação dos órgãos conforme descrito a seguir. Inicialmente, os fragmentos foram mergulhados em etanol a concentrações crescentes de 80%, 90%, 95% e 100%; cada processo durou 30 minutos, sendo o processo de cada concentração repetido por três vezes. Em seguida, os

órgãos foram diafanizados em solução de álcool/xilol e xilol (3X), durante 30 minutos. A infiltração se deu mergulhando por três vezes os fragmentos na parafina em estufa a 60°C por um período de 30 minutos e, em seguida, as peças foram incluídas em parafina. Os cortes histológicos com espessura de 4 µm foram realizados com micrótomo rotativo utilizando uma navalha de aço. Com a finalidade de aderir as secções histológicas em lâmina de vidro, utilizou-se albumina e placa aquecedora; em seguida, se deu a desparafinização com xilol (3X) e álcool/xilol, com hidratação por banhos de 10 minutos de etanol em concentrações decrescentes de 100% (3X), 95%, 90% e 80%, seguido por água destilada (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina e eosina (HE), ácido periódico de Schiff (PAS), Fontana Masson (FM) e Grocott-Gomori. Posteriormente, as lâminas foram desidratadas conforme descrito acima. A selagem das preparações ocorreu com uso de lamínulas e resina Entellan®. As estruturas parasitárias foram observadas em microscópio óptico em objetivas de 40x e 100x.

## **5.5 ANÁLISE MOLECULAR**

### **5.5.1 Extração de DNA das culturas obtidas**

Adicionalmente, foi realizada a identificação molecular das culturas fúngicas por meio da técnica de PCR. Para a realização da extração de DNA, as culturas foram repicadas em frasco contendo caldo BHI e incubadas por 10 dias a 28°C. Passado este período, as culturas foram inativadas por vapor fluente a 100°C, utilizando autoclave. Com a intenção de verificar a viabilidade da amostra, após a inativação térmica fragmentos do micélio foram repicados em ágar Batata Dextrose e incubados por sete dias a 28°C. O material remanescente foi estocado em freezer a -20°C e, após confirmação da inocuidade das amostras, procedeu-se a extração de DNA.

Culturas inativadas mantidas a -20°C foram descongeladas e centrifugadas a 3.500 r. p. m. por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet celular obtido resuspendido em água destilada estéril para lavagem. Esta lavagem foi realizada duas vezes e, em seguida, descartando-se a água e transferindo o material fúngico para recipientes de vidro e congeladas em freezer a -80°C. O material congelado foi submetido a completa liofilização em aparelho LS3000 (Terroni, Brasil).

Amostras fúngicas liofilizadas sofreram lise em sistema Precellys®, seguindo informações do fabricante. Para tanto, foi adicionado até 0,2 g de massa fúngica liofilizada a

microtubo de polipropileno contendo esferas de cerâmica de 2,8 mm de diâmetro. Em seguida, adicionou-se 1 mL de tampão CTAB (Fórmula em anexo) contendo 1% de  $\beta$ -mercaptoetanol previamente aquecido a 65 °C. Os tubos foram submetidos a três ciclos de agitação a 6500 r. p. m. por 30 segundos, com intervalos de até 2 minutos entre cada ciclo. Após esse período, as amostras permaneceram em banho-maria a 65 °C por 3 horas, sendo adicionado um volume igual ao obtido de clorofórmio-álcool-isoamílico (proporção: 24:1). O homogenato seguiu para centrifugação (9650 g por 20 min a 4 °C), e o sobrenadante foi transferido para microtubo estéril, ao qual se adicionou álcool isopropílico na proporção de 0,54 do volume do material. O preparado permaneceu no freezer a -20 °C por 1 h e em seguida foi centrifugado (9650 g por 20 min a 4 °C). Após esta etapa, o sobrenadante foi descartado e, ao precipitado adicionou-se 1,5 mL de álcool etílico 70%, seguindo para centrifugação (9650 g por 20 min a 4 °C). O sobrenadante foi descartado e o DNA obtido foi ressuspenso em tampão de eluição AE (acetato de sódio 50 mM e EDTA 50 mM pH 5,2) do Mini Kit Dneasy Plant® (Qiagen, Alemanha).

As amostras de DNA foram quantificadas por meio de espectrofotometria a 260 nm. O cálculo da concentração de DNA de cada amostra foi realizado mediante a seguinte fórmula (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989):

$$C \text{ [ng/}\mu\text{l]} = A_{260} \times \text{diluição} \times \epsilon,$$

onde

A<sub>260</sub>: absorvância a 260 nm;

diluição: fator de diluição da amostra; e

$\epsilon$ : coeficiente de extinção, equivalente a 50 para moléculas de DNA fita dupla

### 5.5.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A reação de PCR foi realizada utilizando os seguintes reagentes: primers Coi9-1F (5'-TACGGTGTAATCCCGATACA-3') e Coi9-1R (5'-GGTCTGAATGATCTGACGCA-3') na concentração de 50 pMol/ $\mu$ L cada, dNTP's 1mM, Tampão 5X Green Go taq® (Promega, EUA), MgCl<sub>2</sub> 25 mM (Promega, EUA), Go Taq DNA Polimerase (Promega, EUA) e H<sub>2</sub>O (UMEYAMA et al., 2006).

A reação de amplificação foi realizada em volume total de 25  $\mu\text{L}$ , conforme observado abaixo.

<u>Reação:</u>	<u>Volumes:</u>
dNTP's (1mM).....	5 $\mu\text{L}$
Primer 1 (Coi9 – 1F).....	2,5 $\mu\text{L}$
Primer 2 (Coi9 – 1R).....	2,5 $\mu\text{L}$
Tampão 5X.....	5 $\mu\text{L}$
MgCl <sub>2</sub> .....	5 $\mu\text{L}$
Taq Hot.....	0,05 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O.....	2,95 $\mu\text{L}$
Total	23 $\mu\text{L}$ (mix) + 2 $\mu\text{L}$ de DNA fúngico

A amplificação ocorreu em um ciclo a 94 °C por três minutos, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 30 s, a 60 °C por 30 s, e em 72 °C por 45 s, tendo uma fase de extensão final a 72°C por três minutos.

Para visualização dos amplicons obtidos a partir da reação de PCR foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1% utilizando TBE (Tampão Tris Borato EDTA) 1X (Fórmula em anexo). Alíquotas de 6  $\mu\text{L}$  de cada amplicon foram submetidas a eletroforese em aparelho EPS 601 (Amersham Bioscience, Índia) a 80 volts por aproximadamente 1 hora. O marcador de peso molecular utilizado foi o padrão DNA 100 pb (New England Biolabs, EUA). Ao final da corrida, o gel foi mergulhado em solução de brometo de etídio 10 mg/mL por 20 minutos e visualizado em transiluminador.

Os dados obtidos pela extração e quantificação de DNA, bem como pela reação de PCR, foram avaliados de forma qualitativa.

## 5.6 ANÁLISE IMUNOLÓGICA

A presença de anticorpos específicos para patógenos fúngicos dimórficos nas amostras foi monitorada por meio de imunodifusão radial dupla, em que antígeno e anticorpo da reação se difundem passivamente de forma radial, formando linhas de precipitação em seu ponto de equilíbrio. Para a confecção da lâmina foi pipetado 3 ml de agarose 1% em salina.

Após esfriar, com um molde perfurador, foram feitos orifícios de 3 mm de diâmetro e retirado o ágar (CAMARGO, 2004).

As amostras foram investigadas quanto a presença de anticorpos específicos para *Coccidioides* spp. e *H. capsulatum*. Para cada um dos testes foi pipetado no orifício central 20 µl do antígeno específico. Para *H. capsulatum* foi utilizado o Kit ID Antígeno H & M (Immy Immunodiagnostics, Inc., USA), enquanto para *C. posadasii* foi utilizado antígeno produzido conforme CORDEIRO (2006). Nos orifícios superior e inferior foram adicionados 20 µl de soro controle. Para *H. capsulatum* foi utilizado soro controle H & M (Immy Immunodiagnostics, Inc., USA), enquanto para *C. posadasii* foi utilizado soro controle obtidos de pacientes com coccidioidomicose pulmonar estocados no CEMM. Nos outros orifícios laterais, foram pipetados 20 µl de amostras testes. Foi realizado o controle negativo com salina.

As lâminas foram incubadas por 48h em câmara úmida à 28°C. Transcorrido este tempo, foi realizada a leitura dos resultados. Para coloração das lâminas, estas foram deixadas em solução de NaCl a 0,9% durante 24 horas, realizando-se de três a quatro trocas da solução, neste período. Em seguida, as lâminas foram envolvidas em papel de filtro e secadas à 37°C em estufa por uma noite. No dia subsequente, foram lavadas com água para retirar fragmentos do papel de filtro sobre o gel e, posteriormente, realizou-se a coloração com *Coomassie Brilliant Blue* (em anexo) durante cinco minutos. Em seguida, as lâminas foram descoradas utilizando solução descorante, para obter melhor visualização das linhas de precipitação.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 ASPECTOS RELACIONADOS AOS QUIRÓPTEROS

Na pesquisa foram capturados 83 animais, sendo 45 fêmeas e 38 machos, em seis municípios do estado do Ceará: Aracoiaba, Baturité, Itapiúna, Quixadá, Russas e Ubajara. Detalhes sobre o período de coleta, georreferenciamento e local da captura podem ser verificados na Tabela 1.

Tabela 1: Descrição dos locais e seus respectivos períodos de captura dos morcegos.

<b>Período</b>	<b>Município / Localidade</b>	<b>Luminosidade</b>	<b>Umidade</b>	<b>Característica</b>
16/08/2010 a 20/08/2010	Quixadá / Fazenda Aroiera	Baixa	Baixa	Forro da casa
23/08/2010 a 27/08/2010	Itapiúna	Intermediária	Baixa	Construção / Prédio abandonado
23/08/2010 a 27/08/2010	Baturité	Baixa	Baixa	Forro de escola
23/08/2010 a 27/08/2010	Aracoiaba	Alta / Baixa	Alta / Alta	Pólo de lazer / Prédio abandonado
13/09/2010 a 17/09/2010	Ubajara / Furna do Araticum	Baixa	Alta	Caverna
13/10/2010 a 15/10/2010	Baturité	Intermediária	Alta	Construção
16/12/2010 a 17/12/2010	Aracoiaba	Baixa	Alta	Prédio Abandonado
21/03/2011 a 25/03/2011	Russas	Baixa / Baixa	Baixa / Alta	Forro de casa / Caverna

Os animais capturados correspondiam a sete diferentes espécies, classificadas nas Famílias Molossidae e Phyllostomidae. Os animais da Família Phyllostomidae foram classificados em seis subfamílias: Stenodermatinae, Phyllostominae, Glossophaginae, Carollinae, Desmondontinae e Lonchophillinae. Quanto à dieta alimentar, os animais eram na maioria frugívoros (n=27) ou nectarívoros (n=27), no entanto também ocorreram insetívoros (n=16), hematófagos (n=12) e onívoro (n=1). Características relacionadas ao local de captura, classificação taxonômica, dieta, gênero e quantidade de animais estão mostradas na Tabela 2.



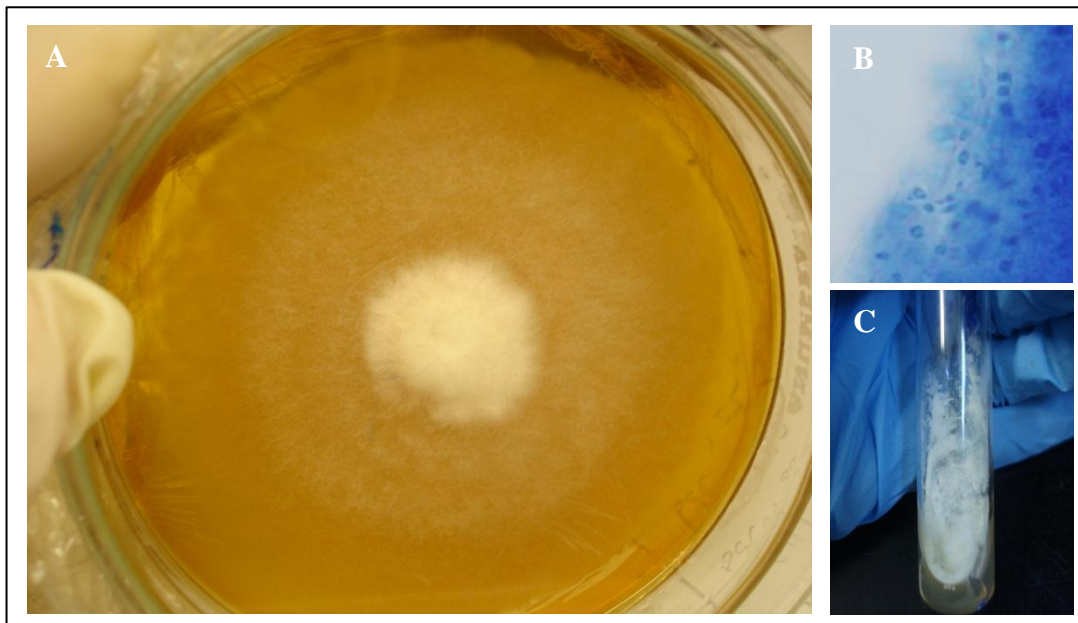
Tabela 2: Municípios do estado do Ceará onde foram realizadas as coletas dos quirópteros, indicando espécie, família e subfamília da qual fazem parte estes animais, além da dieta, gênero e número de indivíduos capturados.

<b>Município / Localidade</b>	<b>Espécies capturadas</b>	<b>Família /Subfamília</b>	<b>Dieta</b>	<b>Gênero</b>	<b>Total</b>
Quixadá	<i>Molossus molossus</i>	Molossidae	Insetívoro	1 m	01
Itapiúna	<i>Sturnira lilium</i>	Phyllostomidae / Stenodermatinae	Frugívoro	6 f - 3 m	09
Itapiúna	<i>Trachops cirrosus</i>	Phyllostomidae / Phyllostominae	Onívoro	1 f	01
Baturité	<i>Glossophaga soricina</i>	Phyllostomidae / Glossophaginae	Nectarívoro	2 f - 3 m	05
Aracoiaba	<i>Sturnira lilium</i>	Phyllostomidae / Stenodermatinae	Frugívoro	2 m	02
Aracoiaba	<i>Carollia perspicillata</i>	Phyllostomidae / Carollinae	Frugívoro	13 f- 3 m	16
Aracoiaba	<i>Glossophaga soricina</i>	Phyllostomidae / Glossophaginae	Nectarívoro	8 f - 4 m	12
Aracoiaba	<i>Anoura geoffroyi</i>	Phyllostomidae / Lonchophillinae	Nectarívoro	2 f - 2 m	04
Ubajara	<i>Desmodus rotundus</i>	Phyllostomidae / Desmodontinae	Hematófago	2 f - 5 m	07
Russas	<i>Molossus molossus</i>	Molossidae	Insetívoro	11 f - 4 m	15
Russas	<i>Desmodus rotundus</i>	Phyllostomidae / Desmodontinae	Hematófago	5 m	05
Russas	<i>Glossophaga soricina</i>	Phyllostomidae / Glossophaginae	Nectarívoro	6 m	06
<b>Total</b>					<b>83</b>

**Legenda:** m: macho; f: fêmea

## 6.2 ISOLAMENTO FÚNGICO

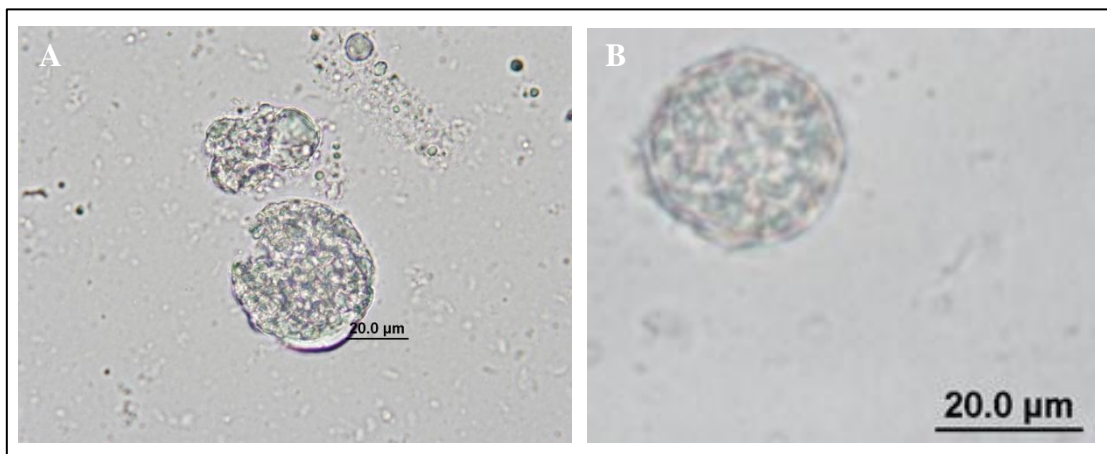
A despeito da busca inicial por *Histoplasma capsulatum*, não foi registrado nenhum isolamento do fungo nos animais capturados. No entanto, em semeadura em placa de macerado de pulmão de quiróptero fêmea da espécie *Carollia perspicillata* incubado a 35°C foi observada colônia com textura algodonosa, formando micélio aéreo e branco com reverso creme e relevo apiculado, sugestiva de *Coccidioides* spp.. Foi realizada a microscopia da colônia em montagem do tipo lâmina-lamínula com lactofenol azul algodão, revelando hifas hialinas e septadas com artroconídeos e células disjuntoras (DE HOOG et al., 2000). A colônia foi repicada em ágar batata para realização de testes confirmatórios (Figura 22), onde foi possível verificar um micélio aéreo, branco com reverso creme tornando-se acastanhada com o passar do tempo (DE HOOG et al., 2000). O fungo isolado encontra-se depositado na micoteca do CEMM/UFC, tendo como registro: CEMM 05-5-059.



**Figura 22.** Aspectos morfológicos da colônia de *Coccidioides posadasii* isolada a partir de macerado de pulmão de quiróptero. Macromorfologia da colônia em placa contendo meio ágar BHI modificado (A); micromorfologia da colônia visualizada com adição de lactofenol azul algodão (B); macromorfologia observada em tubo contendo meio ágar batata dextrose (C). Fonte: CEMM, 2011.

### 6.3 MICROSCOPIA DIRETA

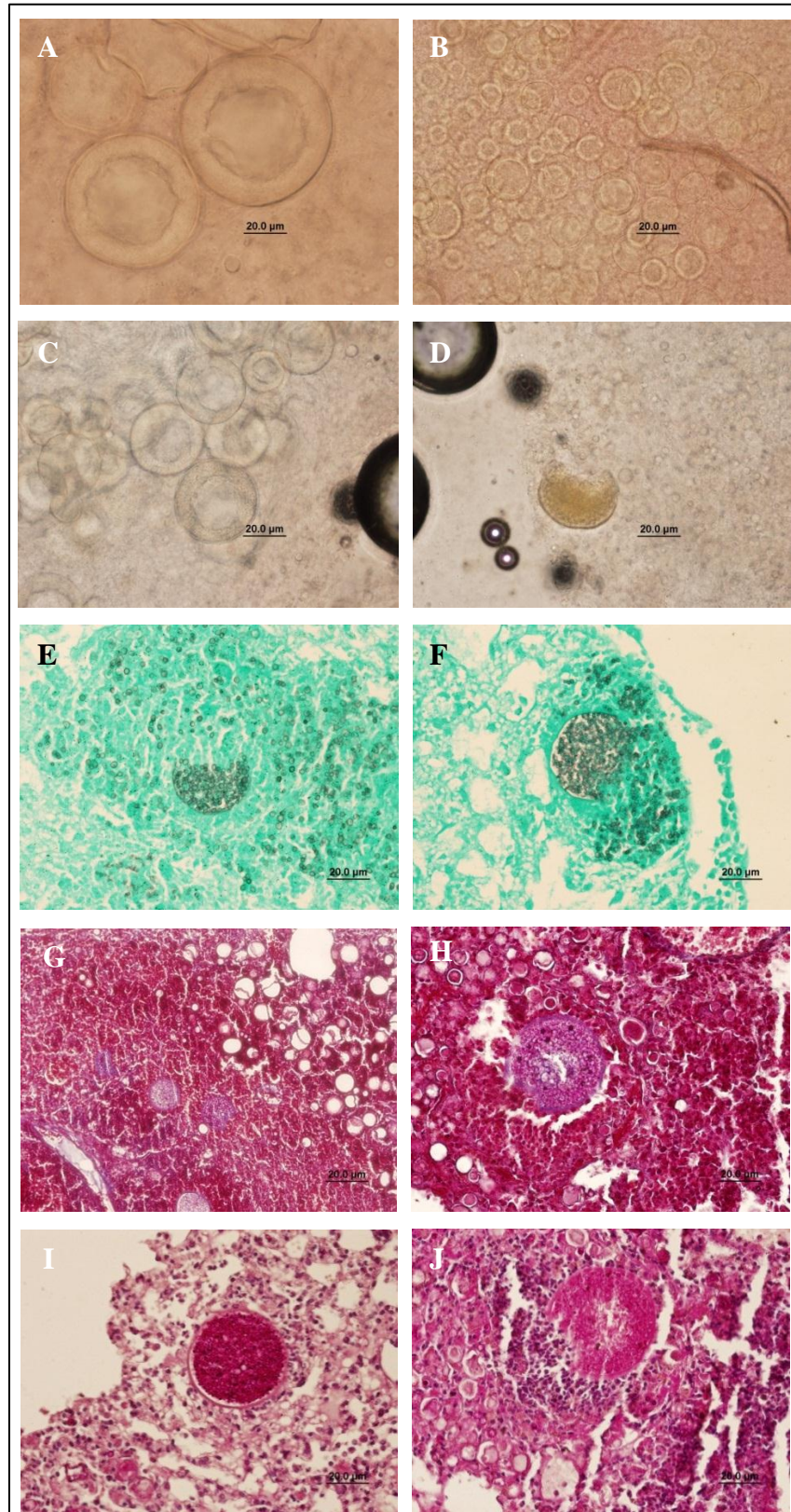
Com o intuito de visualizar formas parasitárias do fungo, foram retiradas alíquotas remanescentes do macerado de pulmão da espécie *C. perspicillata* estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$  e realizadas preparações tipo lâmina-lamínula com KOH 10% para observação em microscópio óptico. O exame direto realizado revelou esférulas características da forma parasitária do fungo, conforme evidenciado na figura 23. Foi possível verificar a presença de esférula maduras contendo endosporos em seu interior, além de esférulas rompidas, caracterizando a ocorrência do ciclo biológico de *Coccidioides* spp.



**Figura 23.** Observação de esférulas da forma parasitária de *Coccidioides* spp., em macerado de pulmão de quiróptero da espécie *Carollia perspicillata*: Esférula rompida (A) e Esférula contendo endosporos em seu interior (B). Fonte: CEMM, 2011.

### 6.4 TESTE DE REVERSÃO *in vivo*

O teste de reversão *in vivo* foi realizado em dois camundongos, que após 30 dias de inoculação da suspensão fúngica, foram eutanasiados e tiveram fragmentos do baço, fígado e pulmões semeados em tubos contendo ágar Mycosel®. Após uma semana de cultivo foi observado o crescimento de *Coccidioides* spp. em todos os tubos. Além disto, fragmentos dos órgãos destes animais foram utilizados para a realização de exames direto com adição de KOH e histopatológico corados com HE, FM, PAS, Grocott-Gomori (CORDEIRO et al., 2006), no Departamento de Patologia e Medicina Legal da UFC. Em todos os testes foi possível verificar a presença de esférulas maduras e imaturas, bem como a observação de endosporos sendo liberados (Figura 24).



**Figura 24.** Visualização de esférulas de *Coccidioides posadasii* em órgãos de camundongos infectados experimentalmente. Preparação tipo lâmina-lamínula com KOH 10% mostrando esférulas em processo de maturação, mostrando grande vacúolo central (A-C); esférula madura liberando endosporos (D). Esférulas maduras repletas de endosporos em preparados histológicos corados por Grocott-Gomori (E, F), Fontana Masson (G, H) e PAS (I, J). FONTE: CEMM, 2011.

## 6.5 ANÁLISE MOLECULAR

A reação de PCR, avaliada nas diluições de 1:50, 1:20 e 1:10 permitiu a amplificação de uma sequência de aproximadamente 634 pares de bases na amostra controle e na amostra positiva, o que permitiu a confirmação molecular do isolado como pertencente a espécie *Coccidioides posadasii*, conforme descrito por Umeyama et al., 2006.

## 6.6 ANÁLISE SOROLÓGICA

Conforme descrito anteriormente, os macerados de órgãos de quirópteros foram avaliados quanto à presença de antígenos e/ou anticorpos de *Coccidioides* spp. e *H. capsulatum*. Não foi encontrada positividade para *H. capsulatum* em nenhuma das amostras pesquisadas. Contudo pôde ser observada uma reação positiva para anticorpos contra *Coccidioides* spp. em macerado de pulmão da espécie de quiróptero *Glossophaga soricina*, bem como duas amostras positivas para antígenos de *Coccidioides* spp., obtidas de macerado de fígado da espécie *G. soricina* e de macerado do mesmo órgão de *Desmodus rotundus*.

## 7 DISCUSSÃO

A ordem Chiroptera é reconhecidamente importante do ponto de vista ecológico, uma vez que os animais nela classificados apresentam variações morfológicas, alimentares e adaptativas, que os tornam capazes de explorar diversos habitats, contribuindo para a reciclagem de nutrientes, controle de animais e manutenção da flora (BRUSCO; TOZATO, 2009). A capacidade apresentada por esses animais de explorar uma diversidade de habitats lhes permite interagir com uma ampla variedade de seres vivos, muitos dos quais podem ser hospedeiros intermediários de patógenos humanos e animais. Desta forma, nas últimas duas décadas, o interesse no estudo de morcegos visando à vigilância de doenças infecciosas aumentou (WIBBELT et al., 2010).

Dados da literatura mostram que os quirópteros têm sido associados a emergência de várias doenças infecciosas, principalmente viroses, tais como àquela causada por Hendra vírus e Nipah vírus, espécies do gênero *henipavirus*, novo gênero da família *Paramixoviridae* (SHI, 2010). De acordo com Jong et al. (2011), a descoberta dos quirópteros como hospedeiros naturais de agentes causadores de doenças infecciosas emergentes e seu posterior estudo como fonte desses agentes deveu-se a descoberta da presença de anticorpos para o vírus Hendra em morcegos na Austrália, um vírus altamente virulento com alta letalidade em seres humanos (CFSPH, 2009).

Os morcegos apresentam diversas características que os tornam importantes reservatórios de agentes de doenças infecciosas: existência de grande diversidade de espécies, longevidade, capacidade de dispersão e estrutura social, apresentando colônias de até 200.000 indivíduos (CALISHER et al., 2006; WONG et al., 2007; JONG et al., 2011). Em 2008, Calisher e colaboradores relataram que algumas espécies de morcegos podem viver por até 30 anos e que a ocorrência de alta densidade populacional em colônias oferece ampla oportunidade de transmissão de agentes infecciosos entre morcegos.

Em comparação com outros mamíferos, esses animais – que surgiram durante o período Eoceno (52 a 50 milhões de anos atrás) – apresentam poucas mudanças evolutivas (CALISHER et al., 2006), o que reforça a idéia de co-evolução de patógenos emergentes nesses animais. Desta forma, alguns fatores evolutivos, tais como a presença de receptores celulares e rotas bioquímicas conservadas que permitem a replicação de determinadas espécies virais nos quirópteros, parecem estar associados a emergência de doenças infecciosas (JONG et al., 2011).

Embora a importância dos quirópteros no ciclo epidemiológico de várias infecções virais seja amplamente conhecida, a associação desses animais com patógenos fúngicos é limitada a poucas espécies. Estudos prévios mostraram o isolamento de algumas espécies fúngicas potencialmente patogênicas entre esses animais, tais como: *Candida* spp., *Trichosporon pullulans* (MOK; LUIZÃO; SILVA, 1982) e *Wangiella dermatitidis* (REIS et al., 1982). Porém, o papel dos quirópteros na transmissão destas espécies permanece desconhecido.

A associação mais conhecida entre morcegos e fungos patogênicos é representada pelo fungo dimórfico *Histoplasma capsulatum*, tendo sido registrados isolamentos do fungo em abrigos localizados no meio urbano (GALVÃO DIAS, 2009) e rural (TAYLOR et al., 1999). Na pesquisa realizada por Galvão Dias (2009) em áreas urbanas, foi observado um percentual de positividade para *H. capsulatum* bem maior em áreas de grande proximidade com os humanos, tais como forros de residências (37,9%), em comparação com ambientes naturais, como árvores, por exemplo, os quais mostraram índice de positividade de 3,6%. Deve ser ressaltado que um único morcego infectado pode ser responsável por uma ampla contaminação de quirópteros ou mesmo de outros mamíferos, uma vez que fungos viáveis, capazes de se desenvolver em solo apropriado, podem ser liberados em suas fezes (MCMURRAY; GREER, 1979).

Dada a importância dos quirópteros na manutenção e/ou dispersão de *H. capsulatum* na natureza, e o aumento do número de casos de histoplasmose nos últimos cinco anos em nosso meio (FECHINE, 2011). Assim como observado em trabalhos anteriores realizados no CEMM (COELHO, 2010), não foi possível isolar o fungo *H. capsulatum* na presente pesquisa. É possível que o pequeno número de animais capturados tenha colaborado para o insucesso no isolamento fúngico. A literatura mostra que geralmente o isolamento de *H. capsulatum* é associado há uma grande amostragem de morcegos capturados, como foi verificado nos trabalhos de Galvão Dias (2009) onde foram capturados 2427 animais, de Fernández Andreu (2004) com amostragem de 230 indivíduos e Taylor e colaboradores (1999) com coleta de 208 morcegos. Contudo, a alta amostragem não é o único fator determinante para a recuperação de *H. capsulatum* em quirópteros. Kikuchi et al. (2008) não obtiveram êxito no isolamento do fungo ao analisar 187 amostras de guano de morcegos em 67 cavernas no Japão. Desta forma, os autores sugeriram que os morcegos não seriam os principais agentes do ciclo epidemiológico da histoplasmose naquele país. Embora, em nosso meio, a histoplasmose seja considerada uma doença eminentemente urbana, com grande maioria dos casos provenientes da região metropolitana de Fortaleza (FECHINE, 2011). No presente estudo, só foi possível realizar a captura de morcegos em sítios rurais. Deste modo, é

necessária a intensificação das buscas em áreas urbanas, principalmente em sítios peridomiciliares.

Embora não tenha sido detectado *H. capsulatum* nos morcegos capturados, o estudo mostrou, pela primeira vez, o isolamento do fungo *C. posadasii*, além de evidências imunológicas de infecção por este fungo em quirópteros. Neste trabalho, a positividade frente a qualquer um dos métodos analisados, seja micológico, molecular ou sorológico, foi detectada em animais provenientes de apenas dois sítios de coleta, um localizado no município de Aracoiaba e o outro em Ubajara.

Em relação ao clima verificado na cidade de Aracoiaba temos o Tropical Quente Semi-Árido, além dos climas compartilhados com a cidade de Ubajara, climas Tropical Quente Sub-Úmido e Tropical Quente Semi-Árido Brando. O município de Ubajara ainda apresenta clima Tropical Quente Úmido (IPECE, 2011). O índice pluviométrico observado em 2010 na cidade de Aracoiaba foi de 596,7 mm/ano, enquanto Ubajara apresentou quadra chuvosa de 941,4 mm/ano (FUNCEME, 2011). Estas regiões apresentam características geoclimáticas compatíveis com o isolamento de *H. capsulatum*, tendo divergências ecológicas dos registros de *C. posadasii*. É importante ressaltar que, até o momento, não há registros de casos de coccidiodomicose nestas duas cidades.

O animal positivo ao isolamento micológico foi capturado em uma casa abandonada, localizada em área urbana do município de Aracoiaba, próxima a saída para zona rural, sendo observada o Maciço de Baturité como uma barreira física a passagem dos ventos. É um local rodeado por casas residenciais, sendo então, um ambiente com intensa movimentação humana. Nas redondezas, foram observadas poucas vegetações, exceção se dá a presença de um pólo de lazer arborizado cerca de 30 m do local de coleta.

Estudos têm mostrado o isolamento de *Coccidioides* spp. em diversas espécies animais e os mamíferos são largamente mais afetados. Algumas espécies são tão suscetíveis ao fungo que são sugeridas como sentinelas para o monitoramento da presença do patógeno no ambiente, tais como pequenos roedores nos Estados Unidos (EMMONS, 1943). No Brasil, o mamífero mais frequentemente associado a infecção por *C. posadasii* é o tatu, com destaque para o tatu de nove bandas, *Dasyurus novemcinctus* (WANKE et al. 1999). A grande relação desses animais com o fungo levou Eulálio et al. (2000) a sugerirem que os tatus fossem considerados animais sentinela da coccidiodomicose em nosso meio. De fato, no Nordeste do Brasil, a quase totalidade de casos de coccidiodomicose registrados até o momento envolve a exposição à poeira contaminada durante atividade recreativa de caça de tatus (CORDEIRO et al., 2010).



No município de Aracoiaba, no mesmo sítio de captura do morcego positivo ao exame micológico, um animal da espécie *Glossophaga soricina* apresentou anticorpos específicos para *Coccidioides* spp. no teste imunológico, enquanto em outro animal da mesma espécie foi detectada a presença de antígenos de *Coccidioides* spp. Em Ubajara, observou-se antígenos fúngicos de *Coccidioides* spp. em quiróptero da espécie *Desmodus rotundus*, proveniente da Furna do Araticum.

Em testes sorológicos, a baixa sensibilidade e a possibilidade de reações cruzadas com histoplasmose são as principais causas de falsos resultados. Em seres humanos, a detecção de anticorpos IgG contra *Coccidioides* spp. está relacionada a progressão do processo infeccioso, sendo verificado que a detecção de títulos crescentes de anticorpos relaciona-se com um prognóstico desfavorável, ao passo que títulos em declínio são associados a um quadro clínico em resolução (STEVENS, 1995). Não são observados níveis detectáveis de anticorpos na infecção assintomática, forma clínica comum em até 60% dos indivíduos infectados, no entanto, é possível obter positividade ao teste intradérmico ao antígeno coccidioidina ou esferulina (AMPEL, 2009).

Sabe-se que, em animais, a interpretação dos resultados de testes imunológicos na coccidioidomicose pode ser diferente daqueles em humanos. Em cães, o teste sorológico positivo não deve ser utilizado para diagnóstico, uma vez que existem animais doentes onde não é possível a detecção clínica, além da possibilidade de sobreposição de títulos de anticorpos em manifestações clínicas diferentes. Em cavalos, raramente são detectados anticorpos séricos em animais saudáveis (HIGGINS et al., 2005). No presente estudo, embora não seja possível afirmar que os morcegos que mostraram presença de anticorpos ou antígenos no teste imunológico estavam doentes, provavelmente esta reatividade imunológica representa um indício de contato dos animais com o fungo *C. posadasii* na natureza. É possível afirmar que os dados obtidos não correspondem à reação cruzada com *H. capsulatum*, uma vez que nenhum dos morcegos capturados mostrou reatividade na imunodifusão para este fungo.

É importante ressaltar que, durante as coletas realizadas na casa abandonada em Aracoiaba, foram capturadas quatro espécies de quirópteros: *Carollia perspicillata*, *Glossophaga soricina*, *Sturnira lilium* e *Anoura geoffroyi*. No entanto, positividade ao teste de imunodifusão foi observada apenas em *C. perspicillata* e *G. soricina*, desta forma deve ser avaliado um provável perfil diferenciado de suscetibilidade entre as espécies de quirópteros, conforme sugerido por Krutzsch e Watson (1978).

Embora este seja o primeiro registro do isolamento de uma espécie fúngica do gênero *Coccidioides* em vísceras de quirópteros, outros trabalhos já haviam sugerido associação desses animais com o fungo *C. immitis*. Em 1965, Kajihiro realizou uma pesquisa

com o objetivo de isolar dermatófitos em amostras de guano de morcegos coletadas em cavernas do Novo México. Além de quatro espécies de dermatófitos, o autor descreveu a presença de outras espécies fúngicas no material investigado, tais como: *Candida* sp., *Histoplasma capsulatum* e *C. immitis* (KAJIHIRO, 1965). Contudo, o trabalho não ressalta os métodos de isolamento empregado para *C. immitis*, bem como, não descreve a realização de testes de reversão *in vivo*, limitando a identificação fúngica apenas a caracteres morfológicos da fase saprofítica do fungo.

Em 1978, Krutzsch e Watson também descreveram o isolamento do fungo de amostras de guano de morcegos que foram coletadas em minas abandonadas. Os autores também realizaram infecção experimental de *C. immitis* em morcegos, afirmando que a suscetibilidade ao fungo varia de acordo com a espécie envolvida (KRUTZSCH; WATSON, 1978). Desta forma, os isolamentos de *Coccidioides* spp. a partir do guano de quirópteros faz referência apenas a sua fase saprofítica. No presente estudo, a visualização de esférulas, estruturas características da fase parasitária do fungo, em macerado de órgão de quiróptero confirma a infecção natural de quirópteros por *C. posadasii*.

Hoff e Bigler (1981) afirmam que a migração e os hábitos alimentares dos quirópteros seriam capazes de aumentar a distribuição geográfica de agentes fúngicos causadores de doenças no homem e em outros animais. De forma contrária, Wong et al. (2007) afirmam que a dieta alimentar destes animais não deve ter íntima relação com o tipo de patógeno por eles carreados, uma vez que o mesmo patógeno pode ser observado em mais de uma espécie de quiróptero. Alterações ambientais também podem ter papel importante na emergência de doenças infecciosas, uma vez que o desmatamento é capaz de modificar os padrões comportamentais desses animais, permitindo a expansão de seu nicho ecológico (JOIN et al., 2011). Desta forma, a ocupação de abrigos artificiais pelos morcegos permite que estes animais se aproximem de áreas habitadas pelo homem, estreitando a relação entre estas espécies, facilitando o papel dos quirópteros como veículo de doenças emergentes para os seres humanos.

No estado do Ceará, casos de coccidioidomicose foram registrados em 11 municípios: Aiuaba, Independência, Boa Viagem, Solonópoles, Catunda, Santa Quitéria, Arneiroz, Ibiapina, Sobral, Jaguaribe e Parambu (CORDEIRO et al., 2010). Essas cidades estão geograficamente distantes dos sítios onde foram detectadas positividade animal neste estudo: a distância entre Ubajara e Sobral é de aproximadamente 72 Km; entre Aracoiaba e Boa Viagem verifica-se uma distância de 174 Km. Desta forma, podemos afirmar que, embora seja possível, é pouco provável que os animais tenham migrado das zonas endêmicas de coccidioidomicose. Dados da literatura mostram que, devido ao porte pequeno e corpo

frágil, a espécie *C. perspicillata* não possui hábitos de migração de longas distâncias (CLOUTIER; THOMAS, 1992). O mesmo não ocorre com a espécie *D. rotundus*, uma vez que esta espécie é capaz de percorrer distâncias diárias de até 12 Km do abrigo em busca de alimento, retornando ao abrigo após alimentar-se (GREENHALL; JOERMANN; SCHMIDT, 1983).

A presença de *C. posadasii*, bem como a evidência da infecção fúngica em quirópteros capturados em áreas sem casos da doença, sugere a existência de uma ampla área de ocorrência do microorganismo em nosso meio. No Brasil, as regiões de ocorrência do fungo são determinadas pela detecção dos casos de coccidioidomicose em humanos, mas, segundo Cordeiro et al. (2010), o número de casos reportados pode ser subestimado.

É provável que outros animais silvestres, como o gambá-de-orelha-branca, por exemplo, sejam intermediários do processo infeccioso em quirópteros. Nesta perspectiva, a contaminação de uma área indene por *C. posadasii* poderia iniciar após a introdução de partículas fúngicas viáveis no solo, seja através de fezes do animal ou de suas carcaças. O gambá-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*) é um mamífero com hábito crepuscular e noturno que é capaz de conviver com o homem e adaptar-se a novos ambientes, sendo considerados animais com potencial de disseminar doenças entre diferentes populações (MULLER et al., 2005).

Estudos adicionais devem ser conduzidos a fim de elucidar o papel dos quirópteros no ciclo biológico do fungo *C. posadasii* e o impacto dessa associação na epidemiologia da coccidioidomicose.

## 8 CONCLUSÕES

1. Foi possível detectar infecção por *Coccidioides posadasii* em um morcego-fêmea da espécie *Carollia perspicillata*, capturado em casa abandonada na cidade de Aracoíaba;
2. Pela primeira vez verificou-se o registro de isolamento de *Coccidioides posadasii* em morcegos;
3. Morcegos das espécies *Glossophaga soricina* e *Desmodus rotundus* apresentaram resposta imune positiva para *Coccidioides posadasii*.

## 9 PERSPECTIVAS

A descoberta de um quiróptero naturalmente infectado por *Coccidioides posadasii* sugere que esses animais podem ser reservatórios para o microrganismo, abrindo perspectivas para novos estudos. Com o intuito de realizar desdobramento deste achado, faz-se necessário caracterizar os aspectos genéticos e de virulência dos isolados de *C. posadasii* oriundos de morcegos, além de investigar a ocorrência do fungo em outras espécies de quirópteros, bem como em um número maior de animais provenientes de locais onde a coccidioidomicose seja considerada endêmica ou com características ambientais semelhantes. É importante ainda investigar a origem da infecção desses animais, por meio do isolamento do fungo de amostras de solo de outras regiões do estado do Ceará.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, L. M. S. Subfamília Desmondontinae. In: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. **Morcegos do Brasil**. Londrina: Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina, p. 39 – 43, 2007.

AJITHDOSS, D. K.; TRAINOR, K. E.; SNYDER, K. D.; BRIDGES, C. H.; LANGEHR, I. M.; KIUPEL, M.; PORTER, B. F. Coccidioidomycosis presenting as a heart base mass in two dogs. **Journal of Comparative Pathology**, v. 145, n. 1-3, p. 1 - 6, 2011.

ALMEIDA, S. R. Biologia dos Fungos. In: ALMEIDA, S. R. **Micologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1 – 3, 2008.

ALVES JR, J. Frugivoria em morcegos (Mammalian, Chiroptera) e efeitos na germinação de sementes ingeridas. **Anuário da Produção de Iniciação Científica Discente**, v. 12, n. 14, p. 33 – 48, 2009.

ALVES, L. A.; FISHER, E. A. **Composição e abundância das espécies de morcegos (Mammalia: Chiroptera) no Parque Estadual da Ilha do Cardoso**, Cananéia, SP. Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, 23 a 28 de Setembro de 2007, Caxambu – MG. p. 1 – 2;

AMPEL, N. M. Coccidioidomycosis: A review of recent advances. **Clinics in Chest Medicine**, v. 30, p. 241 – 251, 2009.

AMPEL, N. M. The diagnosis of coccidioidomycosis. **Medicine Reports**, v. 2, n. 2, p. 1 – 4, 2010a.

AMPEL, N. M. New perspectives on coccidioidomycosis. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 7, p. 181 – 185, 2010b.

ANDERSON, I. C.; CAIRNEY, J. W. G. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 8, p. 769 – 779, 2004.

ARNONE, I. S. **Estudo da comunidade de morcegos na área de cárstica do Alto Ribeira – SP; Uma comparação com 1980**. 2008. 21f. Dissertação (Mestrado em Ciências, área de Zoologia). Universidade de São Paulo, 2008.

ARNONI, I. V.; PASSOS, F. C. Levantamento da fauna de morcegos (Chiroptera, Mammalia) do Parque Natural Municipal das Grutas de Botuverá, Botuverá, SC. **Anais do XXVII Congresso Brasileiro de Espeleologia**, 04 a 14 de julho de 2003, Januária, MG. p. 108 – 114.

ARTEAGA, S.; ANDRADE-CETTO, A.; CÁRDENAS, R. Larrea tridentata (*Creosote bush*), an abundant plant of Mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 231 – 239, 2005.

AVILÉS-SALAS, A.; QUINTERO-CUADRA, Y.; CORNEJO-JUÁREZ, P. Coccidioidomycosis extrapulmonar. Presentación de un caso y revisión de la literatura. **Revista Chilena de Infectología**, v. 24, n. 5, p. 398 – 341, 2007.

BADILLO, R.; MANTILLA, J. C.; PRADILLA, G. Human rabies encephalitis by a vampire bat bite in an urban area of Colombia. **Biomedica**, v. 29, n. 2, p. 191 – 203, 2009.

BARROS, J. H. S.; ROMIJN, P. C.; PINTO, A. G. S.; MADEIRA, M. F. Relato de infecção natural de morcegos por flagelados tripanosomatídeos em diferentes municípios do Estado do Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 6, p. 683 – 685, 2008.

BIALEK, R.; KERN, J.; HERMANN, T.; TIJERINA, R.; CECEÑAS, L.; REISCHL, U.; GONZÁLEZ, G. M. PCR Assays for identification of *Coccidioides posadasii* based on the nucleotide sequence of the antigen 2/proline-rich antigen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 778 – 783, 2004.

BINNICKER, M. J.; BUCKWALTER, S. P.; EUSBERNER, J. J.; STEWART, R. A.; MCCULLOUGH, A. E.; WOHLFIEL, S. L.; WENGENACK, N. L. Detection of *Coccidioides* species in clinical specimens by real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, 45, 173, 2007.

BLEHERT, D. S.; HICKS, A. C.; BEHR, M.; METEYER, C. U.; BERLOWSKI-ZIER, B. M.; BUCKLES, E. L.; COLEMAN, J. T. H.; DARLING, S. R.; GARGAS, A.; NIVER, R.; OKONIEWSKI, J. C.; RUDD, R. J.; STONE, W. B. Bat White-Nose Syndrome: An Emerging Fungal Pathogen? **Science**, v. 323, p. 227, 2009.

BORCHERS, A. T.; GERSHWIN, M. E. The immune response in Coccidioidomycosis. **Autoimmunity Reviews**, v. 10, p. 94 – 102, 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Diretrizes Gerais para o Trabalho em Contecção de Material Biológico**. Brasília, 2004. 60p.

BREDT, A.; UIEDA, W.; MAGALHÃES, E. D. Morcegos cavernícolas da região do Distrito Federal, Centro-Oeste do Brasil (Mammalia, Chiroptera). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 16, n. 3, p. 731 – 770, 1999.

BROOKS, L. D.; NORTHEY, W. T. Studies on *Coccidioides immitis* II. Physiological studies on in vitro spherulation. **Journal of Bacteriology**, v. 85, p. 12 – 15, 1962.

BRUSCO, A. R.; TOZATO, H. C. Frugivoria na dieta de *Artibeus Lituratus* Olfers, 1818 (Chiroptera, Phyllostomidae) no Parque do Ingá, Maringá/PR. **Revista Fapciência**, v. 3, n. 2, p. 19 – 29, 2009.

BURTON, M.; MORTON, R. J.; RAMSAY, E.; STAIR, E. L. Coccidioidomycosis in a ring-tailed lemur. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 189, n. 9, p. 1209 – 1211, 1986.

CADENA, J.; LEVINE, D. J.; ANGEL, L. F.; MAXWELL, P. R.; BRADY, R.; SANCHEZ, J. F.; MICHALEK, J. E.; LEVINE, S. M.; RESTREPO, M. I. Antifungal prophylaxis with voriconazole or itraconazole in lung transplant recipients: hepatotoxicity and effectiveness. **American Journal of Transplantation**, v. 9, p. 2085 – 2091, 2009.

CALISHER, C. H.; CHILDS, J. E.; FIELD, H. E.; HOLMES, K. V.; SCHOUNTZ, T. Bats: Important reservoir hosts of emerging viruses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 531 – 545, 2006.

CARLISHER, C. H.; HOLMES, K. V.; DOMINGUEZ, S. R.; SCHOUNTZ, T.; CRYAN, P. Bats prove to be rich reservoirs for emerging viruses. **Microbe**, v. 3, n. 11, p. 521 – 528, 2008.

CAMARGO, Z. P. **Técnicas imunológicas em micologia**. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 349-357, 2004.

CANTEROS, C. E.; LACHINI, R. H.; VACCARO, O.; MADARIAGA, J.; GALARZA, R.; SNAIDERMAN, L.; MARTÍNEZ, M.; PALADINO, M.; CICUTTIN, G.; VARELA, E.; ALCOBA, E.; ZUIANI, F.; SAHAZA, J. H.; TAYLOR, M. L.; DAVEL, G. First isolation of *Histoplasma capsulatum* from the urban bat *Eumops bonariensis*. **Revista Argentina de Microbiología**, v.37, n. 1, p. 46 – 56, 2005.

CFSPH. **Hendra Virus Infection** [Internet]. Iowa, Estados Unidos: Center for Food Security and Public Health; Setembro, 2009 [01 de dezembro de 2011]. Disponível em: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/hendra.pdf>.

CFSPH. **Coccidioidomycosis** [Intenet]. Iowa, Estados Unidos: Center for Food Security and Public Health; Junho, 2010 [27 de fevereiro de 2011]. Disponível em: [http://www.ivis.org/advances/Disease\\_Factsheets/coccidioidomycosis.pdf](http://www.ivis.org/advances/Disease_Factsheets/coccidioidomycosis.pdf).

CHAKRABARTI, A.; SHIVAPRAKASH, M. R. Microbiology of systemic fungal. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 51, n. 5, p. 16 – 20, 2005.

CHATURVEDI, V.; SPRINGER, D. J.; BEHR, M. J.; RAMANI, R.; LI, X.; PECK, M. K.; REN, P.; BOPP, D. J.; WOOD, B.; SAMSONOFF, W. A.; BUTCHKOSKI, C. M.; HICKS, A. C.; STONE, W. B.; RUDD, R. J.; CHATURVEDI, S. Morphological and molecular characterizations of psychrophilic fungus *Geomyces destructans* from New York bats with White Nose Syndrome (WNS). **Plos One**, v. 5, n. 5, p. 1 – 12, 2010.

CLOUTIER, D.; THOMAS, D. W. *Carollia perspicillata*. **Mammalian Species**, v.417, p. 1 – 9, 1992.

COELHO, C. V. G. **Inquérito sorológico, busca ambiental e análise clínico-laboratorial de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* em animais no estado do Ceará**. 2010. 147f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Universidade Estadual do Ceará, 2010.

COHEN, M. L. Resurgent and emergent disease in a changing world. **British Medical Bulletin**, v. 54, n. 3, 523 – 532, 1998.

COMRIE, A. C. Climate Factors Influencing Coccidioidomycosis Seasonality and Outbreaks. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 6, p. 688 – 692, 2005.

CONFALONIEIRI, U. E. C. Emergência de doenças infecciosas humanas: processos ecológicos e abordagens preditivas. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 3, p. 591 – 602, 2010.



CORDEIRO, R. A. **Estratégias para o conhecimento da coccidioidomicose – uma doença emergente no Nordeste do Brasil**. 2006. 125f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas). Universidade Federal do Ceará, 2006.

CORDEIRO, R. A.; BRILHANTE, R. S.; ROCHA, M. F.; FECHINE, M. A.; CAMARA, L. M.; CAMARGO, Z. P.; SIDRIM, J. J. C. Phenotypic characterization and ecological features of *Coccidioides* spp. from Northeast Brazil. **Medical Micology**, v.44, n. 7, p. 631 – 639, 2006.

CORDEIRO, R. A.; FECHINE, M. A. B.; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G.; COSTA, A. K. F.; NAGAO-DIAS, A. T.; CAMARGO, Z. P.; SIDRIM, J. J. C. Serologic detection of Coccidioidomycosis antibodies in Northeast Brazil. **Mycopathologia**, v. 167, p. 187 – 190, 2009.

CORDEIRO, R. A.; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G.; BANDEIRA, S. P.; FECHINE, M. A. B.; CAMARGO, Z. P.; SIDRIM, J. J. C. Twelve years of Coccidioidomycosis in Ceará State, Northeast Brazil: epidemiologic and diagnostic aspects. **Diagnostic Clinical and Infectious Diseases**, v. 66, p. 65 – 72, 2010.

COX, R. A; MAGEE, D. M. Protective immunity in coccidioidomycosis. **73rd Forum in Immunology**, p. 417 – 428, 1998.

COX, R. A; MAGEE, D. M. Coccidioidomycosis: Host response and vaccine development. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 4, p. 804 – 839, 2004.

CRETEKOS, C. J.; WEATHERBEE, S. D.; CHEN, C. H.; BADWAIK, N. K.; NISWANDER, L.; BEHRINGER, R. R.; RASWEILER, J. J. Embryonic staging system for the short-tailed fruit bat, *Carollia perspicillata*, a model organism for the mammalian order Chiroptera, based upon timed pregnancies in captive-bred animals. **Developmental Dynamics**, v. 233, n. 3, p. 721 – 738, 2005.

CRUM, N. F.; LEDERMAN, E. R.; STAFFORD, C. M.; PARRISH, J. S.; WALLACE, M. R. Coccidioidomycosis: a descriptive survey of a reemerging disease. Clinical characteristics and current controversies. **Medicine**, v. 83, n. 3, p. 149 – 175, 2004.

CRUM, N. F.; POTTER, M.; PAPPAGIANIS, D. Seroincidence of Coccidioidomycosis during Military Desert Training Exercises. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4552 – 4555, 2004.

CRUM-CIANFLONE, N. F. Coccidioidomycosis in the U.S. military: A review. **Annals of the New York Academy of Sciences**, p. 112 – 121, 2007.

CUMMINGS, K. C.; MCDOWELL, A.; WHELLER, C.; MCNARY, J.; DAS, R.; VUGIA, D. J.; MOHLE-BOETANI, J. C. Point-source outbreak of coccidioidomycosis in construction Workers. **Epidemiology and Infectious**, v. 138, p. 507 – 511, 2010.

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D. Emerging infectious disease of wildlife threats to biodiversity and human health. **Science**, v. 287, n. 5452, p. 443 – 449, 2000.

DE HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUERAS, M. J. **Atlas of Clinical Fungi**. Editora American Society Microbiology, 2ª ed, 1160p, 2000.

DEUS FILHO, A. Coccidioidomycosis. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 9, p. 920 – 930, 2009.

DEUS FILHO, A.; MENESES, A. O.; LIRA, A. L. A.; DEUS, A. C. B.; SOARES, A. S. Manifestações cutâneo-mucosas da coccidioidomicose: estudo de trinta casos procedentes dos estados do Piauí e Maranhão. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 1, p. 45 – 51, 2010.

DICAUDO, D. J. Coccidioidomycosis: A review and update. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 55, n. 6, p. 929 – 942, 2006.

DIÓGENES, M. J. N.; JAMACURU, W. F.; SILVA, M. A. B.; CARVALHO, F. F. Inquérito epidemiológico com esferulina em Jaguaribara – CE, Brasil, 1993. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 70, n. 6, p. 525 – 529, 1995.

DICKSON, E. C. "Valley Fever" of the San Joaquin Valley and fungus *Coccidioides*. **California and Western Medicine**, v. 47, n. 3, p. 151 – 155, 1937.

DISALVO, A. F.; BIGLER, W. J.; AJELLO, L.; JOHNSON, J. E.; PALMER, J. Bat and soil studies for sources of histoplasmosis in Florida. **Public Health Reports**, v. 85, n. 12, p. 1063 – 1069, 1970.

DIXON, D. M. *Coccidioides immitis* as a Select Agent of bioterrorism. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 602 – 605, 2001.

DOBSON, A. P. What Links Bats to Emerging Infectious Diseases? **Science**, v. 310, p. 628 – 629, 2005.

EMMONS, C. W.; ASHBURN, L. L. The isolation of *Haplosporangium parvum* n. sp. and *Coccidioides immitis* from wild rodents. Their relationship to coccidioidomycosis. **Public Health Reports**, v. 57, n. 46, p. 1715 – 1727, 1942.

EMMONS, C. W. A reservoir of coccidioidomycosis in wild rodents. **Journal of Bacteriology**, v. 45, p. 306, 1943.

EMMONS, C. W. Association of bats with histoplasmosis. **Public Health Reports**, v. 73, n. 7, p. 590 – 595, 1958.

ESPINEL-INGROFF, A. History of Medical Mycology in the United States. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 2, p. 235 – 272, 1996.

EULÁLIO, K. D.; MACEDO, R. L.; CAVALCANTI, M. A. S.; MARTINS, L. M. S.; LAZÉRA, M. S.; WANKE, B. *Coccidioides immitis* isolated from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in the state of Piauí, Northeast Brazil. **Mycopathologia**, v. 149, p. 57 – 61, 2000.

FABIÁN, M. E. Quirópteros do bioma caatinga, no Ceará, Brasil, depositados no Museu de Ciências Naturais da Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul. **Chiroptera Neotropical**, v. 14, n. 1, p. 354 – 359, 2008.

FABIAN, M. E.; GREGORIN, R. Família Molossidae. In: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. **Morcegos do Brasil**. Londrina: Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina, p. 149 – 165, 2007.

FECHINE, M. A. B. **Histoplasmose em indivíduos HIV positivos no estado do Ceará: estudo clínico-epidemiológico e teste de sensibilidade antimicrobiana de cepas de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum***. 2011. 143f. Tese (Doutorado em Ciências médicas). Universidade Federal do Ceará, 2011.

FERNÁNDEZ ANDREU, C. M. **Histoplasmosis en Cuba: Contruición a su diagnóstico, prevención y control**. 2004. 174f. Tese (Doctorado em Ciencias de la Salud). La Habana, 2008.

FILHO, H. O.; LIMA, I. P.; FOGAÇA, F. N. O. Subfamília Caroliinae. In: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. **Morcegos do Brasil**. Londrina: Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina, p. 99 – 105, 2007.

FISHER, M. C.; KOENIG, G. L.; WHITE, T. J.; SAN-BLAS, G.; NEGRONI, R.; ALVAREZ, I. G.; WANKE, B.; TAYLOR, J. W. Biogeographic range expansion into South America by *Coccidioides immitis* mirrors New World patterns of human migration. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 8, p. 4558 – 4562, 2001.

FISHER, M. C.; KOENING, G. L.; WHITE, T. J.; TAYLOR, J. W. Molecular and phenotypic description of *Coccidioides posadasii* sp. nov., previously recognized as the non-California population of *Coccidioides immitis*. **Mycologia**, v. 94, n. 1, p. 73 – 84, 2002.

FISHER, F. S.; BULTMAN, M. W.; JOHNSON, S. M.; PAPPAGIANIS, D.; ZABORSKY, E. *Coccidioides* niches and habitat parameters in the Southwestern United States. **Annals of the New York Academy of Sciences**, p. 47 – 72, 2007.

FUNCEME. **Boletins da Quadra Chuvosa**. Governo do estado do Ceará. Secretaria da Ciência, Tecnologia e Educação Superior. 2011. Disponível em: <http://www.funcceme.br/index.php/areas/clima/boletins-quadra-chuvosa>.

GALGIANI, J. N. Coccidioidomycosis. **The Western Journal of Medicine**, v. 159, n. 2, p. 153 – 171, 1993.

GALGIANI, J. N.; AMPEL, N. M.; BLAIR, J. E.; CATANZARO, A.; JOHNSON, R. H.; STEVENS, D. A.; WILLIAMS, P. L. Coccidioidomycosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, p. 1217 – 1223, 2005.

GALVÃO DIAS, M. A. **Aspectos epidemiológicos de *Histoplasma capsulatum* em morcegos em áreas urbanas do estado de São Paulo**. 2009. 89f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade de São Paulo, 2009.

GALVÃO DIAS, M. A.; ZANCOÉ-OLIVEIRA, R. M.; GIUDICE, M. C.; MONTENEGRO NETTO, H.; JORDÃO, L. R.; GRIGORIO, I. M.; ROSA, A. R.; AMORIM, J.; NOSANCHUK, J. D.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from bats in the urban area of São Paulo State, Brazil. **Epidemiology and Infectious**, p. 1 – 3, 2010.

- GANNON, M. R.; WILLING, M. R.; JONES JR, J. K. *Sturnira lilium*. **Mammalian Species**, n. 333, p. 1 – 5, 1989.
- GOMES, O. M.; SERRANO, R. R.; PRADEL, H. O.; MORAES, N. L.; VARELLA, A. L.; FIORELLI, A. I. Coccidioidomicose pulmonar. Primeiro caso nacional. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 24, p. 167 – 168, 1978.
- GREENE, D. R.; KOENIG, G.; FISHER, M. C. Soil isolation and molecular identification of *Coccidioides immitis*. **Mycologia**, v. 92, n. 3, p. 406 – 410, 2000.
- GREENHALL, A. M.; JOERMANN, G.; SCHMIDT, U. *Desmodus rotundus*. **Mammalian Species**, n. 202, p. 1 – 6, 1983.
- GROSE, E.; TAMSITT, J. R. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia, S.A. **Sabouraudia**, v. 4, p. 124 – 125, 1965.
- HICKMAN, C. P. JR.; ROBERTS, L. S.; LARSON, A. **Princípios Integrados de Zoologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 11ª edição, 846 p, 2004.
- HIGGINS, J. C.; LEITH, G. S.; VOSS, E. D. PAPPAGIANIS, D. Seroprevalence of antibodies against *Coccidioides immitis* in healthy horses. **Journal of The American Veterinary Medical Association**, v. 226, n. 11, p. 1888 – 1892, 2005.
- HIRSHMANN, J. V. The early history of Coccidioidomycosis: 1892–1945. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, p. 1202 – 1207, 2007.
- HOF, H. Mycoses in the elderly. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 29, p. 5 – 13, 2010.
- HOFF, G. L.; BIGLER, W. J. The role of bats in the propagation and spread of histoplasmosis: a review. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 17, n. 2, p. 191 – 196, 1981.
- HUNG, C.; YU, J.; SESHAN, K. R.; REICHARD, U.; COLE, G. T. A parasitic phase-specific adhesin of *Coccidioides immitis* contributes to the virulence of this respiratory fungal pathogen. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 7, p. 3443 – 3456, 2002.
- HUNG, C.; XUE, J.; COLE, G. T. Virulence mechanisms of *Coccidioides*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, p. 225 – 235, 2007.
- HUTSON, A. M.; MICKLEBURGH, S. P.; RACEY, P. A. **Microchiropteran Bats: global status survey and conservation action plan**. The World Conservation Union. 259p. 2001.
- IPECE. Governo do estado do Ceará. Secretaria do Planejamento e Gestão. **Perfil Básico Municipal**. 2011. Disponível em: [http://www.ipece.ce.gov.br/publicacoes/perfil\\_basico/perfil-basico-municipal-2011](http://www.ipece.ce.gov.br/publicacoes/perfil_basico/perfil-basico-municipal-2011).
- JONG, C.; FIELD, H. E.; NEWMAN, S. H.; EPSTEIN, J. H. Emerging infectious diseases. In: NEWMAN, S. H.; FIELD, H. E.; DE JONG, C. E.; EPSTEIN, J. H. **Investigating the role of bats in emerging zoonoses: Balancing ecology, conservation and public health interests**. Rome: Food and Agriculture Organisation of the United Nations, 12ª edição, p. 15 - 28, 2011.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 10ª edição, 488p, 2004.

KAJIHIRO, E. S. Occurrence of Dermatophytes in fresh bat guano. **Applied Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 720 – 724, 1965.

KIKUCHI, K.; SUGITA, T.; MAKIMURA, K.; URATA, K.; SOMEYA, T.; SASAKI, T.; KAMEI, K.; NIIMI, M.; HIRAMATSU, K.; UEHARA, Y. Is *Histoplasma capsulatum* a native inhabitant of Japan? **Microbiology Immunology**, v. 52, p. 455 – 459, 2008.

KLITE, P. D.; DIERCKS, F. H. *Histoplasma capsulatum* in fecal contents and organs of bats in the Canal Zone. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 14, . 3, 433 – 439, 1965.

KOLIVRAS, K. N.; JOHNSON, P. S.; COMRIE, A. C.; YOOL, S. R. Environmental variability and coccidioidomycosis (valley fever). **Aerobiologia**, v. 17, n. 1. p. 31 – 42, 2001.

KRUTZSCH, P. H.; WATSON, R. H. Isolation of *Coccidioides immitis* from bat guano and preliminary findings on laboratory infectivity of bats with *Coccidioides immitis*. **Life Sciences**, v. 22, n. 8, p. 679 – 683, 1978.

KUHL, I. A.; KUHL, G.; LONDERO, A.; DIÓGENES, M. J. N.; FERREIRA, M. F. Coccidioidomicose laríngea por *Coccidioides immitis*: relato de um caso. **Jornal Brasileiro de Otorrinolaringologia**, v. 62, p. 48 – 51, 1995.

LACY, G. H.; SWATEK, F. E. Soil ecology of *Coccidioides immitis* at Amerindian middens in California. **Applied Microbiology**, v. 27, n. 2, p. 379 – 388, 1974.

LANIADO-LABORIN, R. Expanding understanding of epidemiology of Coccidioidomycosis in the Western Hemisphere. **Annals of the New York Academy of Sciences**, p. 19 – 34, 2007.

LI, Y.; GE, X.; ZHANG, H.; ZHOU, P.; ZHU, Y.; ZHANG, Y.; YUAN, J.; WANG, L.; SHI, Z. Host range, prevalence, and genetic diversity of adenoviruses in bats. **Journal of Virology**, v. 84, n. 8, p. 3889–3897, 2010.

LONES, G. W.; PEACOCK, C. L. Role of carbon dioxide in the dimorphism of *Coccidioides immitis*. **Journal of Bacteriology**, v. 79, n. 2, p. 308 – 309, 1959.

MARINKELLE, C. J.; GROSE, E. *Histoplasma Capsulatum* from the Liver of a Bat in Colombia. **Science**, v.147, n. 3661, p. 1039 – 1040, 1965.

MCMURRAY, D. N.; GREER, D. L. Immune responses in bats following intranasal infection with *Histoplasma capsulatum*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 28, n. 6, p. 1036 – 1039, 1979.

MENDES, P.; VIEIRA, T. B.; PIMENTA, V. T.; OPREA, M.; DITCHFIELD, A. D. Estrutura da comunidade de quirópteros em áreas submetidas a diferentes métodos de regeneração no Mosteiro Zen Morro da Vargem, Ibirajuba, Espírito Santo. **Anais do VIII**

**Congresso de Ecologia do Brasil**, 23 a 28 de Setembro de 2007, Caxambu – MG. p. 1 – 2, 2007.

MIKICH, S. B. A dieta dos morcegos frugívoros (Mammalia, Chiroptera, Phyllostomidae) de um pequeno remanescente de Floresta Estacional Semidecidual do Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 19, n. 1, p. 239 – 249, 2002.

MIKICH, S. B.; BIANCONE, G. V. Potencializando o Papel dos Morcegos Frugívoros na Recuperação de Áreas Degradadas. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 51, p. 155 – 164, 2005.

MILDENSTEIN, T.; JONG, C. Natural history, ecological and socio-economic value of bats. In: NEWMAN, S. H.; FIELD, H. E.; DE JONG, C. E.; EPSTEIN, J. H. **Investigating the role of bats in emerging zoonoses: Balancing ecology, conservation and public health interests**. Rome: Food and Agriculture Organisation of the United Nations, 12ª edição, p. 15 - 28, 2011.

MIRBOD-DONOVAN, F.; SCHALLER, R.; HUNG, C.; XUE, J.; REICHARD, U.; COLE, G. T. Urease produced by *Coccidioides posadasii* contributes to the virulence of this respiratory pathogen. **Infecton and Immunity**, v. 74, n. 1, p. 504 – 515, 2006.

MOK, W. Y.; LUIZÃO, R. C. C.; SILVA, M. S. B. Isolation of fungi from bats of the Amazon basin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 570-575, 1982.

MORAES, M. A. P.; MARTINS, R. L. M.; LEAL, I. I. R.; ROCHA, I. S.; JUNIOR, P. M. Coccidioidomycose: novo caso brasileiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 6, p. 559 – 562, 1998.

MORENS, D. M.; FOLKERS, G. K.; FAUCI, A. S. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. **Nature**, v. 430, p. 242 – 249, 2010.

MORROW, W. Holocene coccidioidomycosis: Valley Fever in early Holocene bison (*Bison antiquus*). **Mycologia**, v. 98, n. 5, p. 669 – 677, 2006.

MULLER, G.; BRUM, J. G. W.; LANGONE, P. Q.; MICHELS, G. H.; SINKOC, A. L.; RUAS, J. L.; BERNE, M. E. A. *Didelphis albiventris* Lund, 1841, parasitado por *Ixodes loricatus* Neumann, 1899, e *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) (acari: ixodidae) no Rio Grande do Sul. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n.3, p. 319 - 324, 2005.

MURTHY, M. H.; BLAIR, J. E. Coccidioidomycosis. **Current Fungal Infection Reports**, v. 3, p. 7 – 14, 2009.

NEGRONI, R. Evolución de los conocimientos sobre aspectos clínico-epidemiológicos de la Coccidioidomycosis en las Américas. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 40, p. 246 – 256, 2008.

NOGUEIRA, M. R.; DIAS, D.; PERACCHI, A. L. Subfamília Glossophaginae. In: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. **Morcegos do Brasil**. Londrina: Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina, p. 45 – 59, 2007.

NOGUEIRA, M. R.; PERACCHI, A. L.; MORATELLI, R. Subfamília Phyllostominae. In: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. **Morcegos do Brasil**. Londrina: Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina, p. 61 – 97, 2007.

NOSANCHUK, J. D.; YU, J.; HUNG, C.; CASADEVALL, A.; COLE, G. T. *Coccidioides posadasii* produces melanin in vitro and during infection. **Fungal Genetics and Microbiology**, v. 44, p. 517 – 520, 2007.

NUCCI, M.; MARR, K. A. Emerging fungal diseases. **Emerging Infectious**, v. 41, p. 521 – 526, 2005.

ODDS, F. C.; ARAI, T.; DISALVO, A. F.; EVANS, E. G. V.; HAY, R. J.; RANDHAWA, H. S.; RINALDI, M. G.; WALSH, T. J. Nomenclature of fungal diseases: a report and recommendations from a Sub-Committee of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM). **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v.30, p. 1 – 10, 2002.

OLIVEIRA, M. R.; RODRIGUES, J. M. E.; CHIAVONE-FILHO, O.; MEDEIROS, J. T. N. Estudo das condições de cultivo da algaroba e jurema preta e determinação do poder calorífico. **Revista de Ciência e Tecnologia**, v. 14, p. 93 – 104, 1999.

OMATSU, T.; WATANABE, S.; AKASHI, H.; YOSHIKAWA, Y. Biological characters of bats in relation to natural reservoir of emerging viruses. **Comparative Immunology Microbiology & Infectious Diseases**, v. 30, p. 357 – 374, 2007.

OSBORNE, C.; CRYAN, P. M.; O'SHEA, T. J.; OKO, L. M.; NDALUKA, C.; CALISHER, C. H.; BERGLUND, A. D.; KLAVETTER, M. L.; BOWEN, R. A.; HOLMES, K. V.; DOMINGUEZ, S. R. Alphacoronaviruses in new world bats: Prevalence, persistence, phylogeny, and potential for interaction with humans. **Plos One**, v. 6, n. 5, p. 1 – 11, 2011.

PAPPAGIANIS, D. *Coccidioides immitis*. In: TOPLEY, W. W.; WILSON, G. S.; COLLIER, L. H.; BALOWS, A.; SUSSMAN, M. editors. **Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections**. London: Arnold; p. 357 – 371, 1998.

PERACCHI, A. L.; LIMA, I. P.; REIS, N. R.; NOGUEIRA, M. R.; FILHO, H. O. Ordem Chiroptera. In: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. **Mamíferos do Brasil**. Londrina: Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina p. 153 – 230, 2006.

PERKINS, S. E.; CATTADORI, I.; HUDSON, P. J. The role of mammals in emerging zoonoses. **Mammal Study**, v. 30, p. 67 – 71, 2005.

PETKUS, A. F.; BAUM, L. L.; ELLIS, R. B.; STERN, M.; DANLEY, D. L. Pure spherules of *Coccidioides immitis* in continuous culture. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 22, n. 2, p. 165 – 167, 1985.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive mycoses in North America. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 1 – 53, 2010.

PUECHMAILLE, S. J.; WIBBELT, G.; KORN, V.; FULLER, H.; FORGET, F.; MÜHLDOERFER, K.; KURTH, A.; BOGDANOWICZ, W.; BOREL, C.; BOSCH, T.; CHEREZY, T.; DREBET, M.; GÖRFÖL, T.; HAARSMA, A.; HERHAUS, F.; HALLART, G.; HAMMER, M.; JUNGSMANN, C.; BRIS, Y. L.; LUTSAR, L.; MASING, M.; MULKENS, B.; PASSIOR, K.; STARRACH, M.; WOJTASZEWSKI, A.; ZÖPHEL, U.;

TEELING, E. C. Pan-European distribution of White-Nose Syndrome fungus (*Geomyces destructans*) not associated with mass mortality. **Plos One**, v. 6, n. 4, p. 1 – 11, 2011.

RAPPLEYE, C. A.; GOLDMAN, W. E. Defining virulence genes in the dimorphic fungi. **Annual Review of Microbiology**, v. 60, p. 281 – 303, 2006.

REIS, N. R. Morcegos da região de Manaus e suas relações com fungos patogênicos. **Semina**, v. 12, n. 3, p. 255 – 262, 1982.

REIS, N. R.; SHIBATTA, O. A.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. Sobre os morcegos brasileiros. In: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. **Morcegos do Brasil**. Londrina: Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina, p. 61 – 97, 2007.

RESTREPO, A. M. *Coccidioides immitis* rixford et Gilchrist 1895, y *Paracoccidioides brasiliensis* (Splendore 1912) Almeida 1930: Dos hongos patógenos restringidos al continente americano. **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**, v. 30, n. 116, p. 367 – 386, 2006.

REZENDE, C. C.; DUARTE, D. C.; FILIÚ, W. F. O. Pesquisa de *Cryptococcus neoformans* e *Histoplasma capsulatum* na gruta Lago Azul, Bonito – MS. In: Congresso Brasileiro de Espeleologia, n. 27º, 2003. Januária, Minas Gerais. **Anais do XXVII Congresso Brasileiro de Espeleologia**: Sociedade Brasileira de Espeleologia, 2003. p. 140 – 144.

ROSENBERG, D. P.; GLEISER, C. A.; CAREY, K. D. Spinal coccidioidomycosis in a baboon. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 185, n. 11, p. 1379 – 1381, 1984.

RYFKOGEL, H. L. A. Fungus *Coccidioides*. **California State Journal of Medicine**. v. 6, n. 6, p. 200 – 202, 1908.

SABOULLE, M. A. Laboratory aspects in the diagnosis of coccidioidomycosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, p. 301 – 314, 2007.

SAUBOLLE, M. A.; MCKELLAR, P. P.; SUSSLAND, D. Epidemiologic, clinical, and diagnostic aspects of Coccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 26 – 30, 2007.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, p.E.5-E.7.

SCHEFFER, K. C.; BARROS, R. F.; ACHKAR, S. M. Classificação, quanto à família, dos espécimes de morcegos submetidos ao diagnóstico da raiva no Instituto Pasteur, no período de 2007 a 2009. **Chiroptera Neotropical**, v. 16, n. 1, p. 102 – 104, 2010.

SHARCKLETE, M. H.; DIERCKS, F. H.; GALE, N. B. *Histoplasma capsulatum* recovered from bat tissues. **Science**. v. 135, n. 3509, p. 1135, 1961.

SHARPTON, T. J.; STAJICH, J. E.; ROUNSLEY, S. D.; GARDNER, M. J.; WORTMAN, J. R.; JORDAR, V. S.; MAITI, R.; KODIRA, C. D.; NEAFSEY, D. E.; ZENG, Q.; HUNG, C.; MCMAHAN, C.; MUSZEWSKA, A.; GRYNBERG, M.; MANDELL, M. A.; KELLNER, E. M.; BARKER, B. M.; GALGANI, J. N.; ORBACH, M. J.; KIRKLAND, T. N., COLE, G.



T.; HENN, M. R.; BIRREN, B. W.; TAYLOR, J. W. Comparative genomic analyses of the human fungal pathogens *Coccidioides* and their relatives. **Genome Research**, v. 19, p. 1722 – 1731, 2009.

SHI, Z. Bat and virus. **Protein Cell**, v.1, n.2, p. 109 – 114, 2010.

SHUBITZ, L. F. Comparative aspects of coccidioidomycosis in animals and humans. **Annals of the New York Academy of Sciences**, p. 395 – 403, 2007.

SIDRIM, J. J. C.; SILVA, L. C. I.; NUNES, J. M. A.; ROCHA, M. F. G.; PAIXÃO, G. C. Le Nord-Est Brésilien, région d'endémie de coccidioidomycose? A propos d'une micro-épidémie. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 7, p. 37 – 39, 1997.

SIDRIM, J. J. C.; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G. Aspectos gerais de fungos filamentosos e dimórficos na apresentação filamentosa. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 83 – 88, 2004.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G.; CORDEIRO, R. A. Biologia dos fungos. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 41 – 49, 2004.

SILVA, L. C.; NUNES, L. M.; SIDRIM, J. J.; RIOS-GONÇALVES, A. J. Coccidioidomicose pulmonar aguda: primeiro surto epidêmico descrito no Ceará - segundo no Brasil. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 72, n. 5, p. 49 – 66, 1997.

SILVA, D. A.; PICCININI, R. S.; FACCINI, J. L. H. Os morcegos hematófagos como parasitas. **Revista Brasileira de Patologia Veterinária**, v. 6, n. 1, p. 93 – 95, 1997.

SILVA-HERNÁNDEZ, A. G.; BARBACHANO-RODRÍGUEZ, E.; ALANÍS-MIRANDA, P. A.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, R. M.; PORTALES-CASTANEDO, A. Tuberculosis and coccidioidomycosis in two patients without immune acquired deficiency. **Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social**, v. 48, n. 4, p. 447 – 452, 2010.

SMITH, C. E.; BEARD, R. R.; WHITING, E. G.; ROSENBERGER, H. G. Varieties of coccidioid infection in relation to the epidemiology and control of the diseases. **American Journal of Public Health**, v. 36, p. 1394 – 1402, 1946.

STEVENS, D. A. Coccidioidomycosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 332, n. 16, p. 1077 – 1082, 1995.

SUN, S. H.; HUPPERT, M.; VUKOVICH, K. R. Rapid in vitro conversion and identification of *Coccidioides immitis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 3, n. 2, p. 186 – 190, 1976.

SUTTON, D. A. Diagnosis of Coccidioidomycosis by culture: Safety considerations, traditional methods, and susceptibility testing. **Annals of the New York Academy of Sciences**. p. 315 – 325, 2007.

TALAMANTES, J.; BEHSETA, S.; ZENDER, C. S. Fluctuations in climate and incidence of Coccidioidomycosis in Kern County, California: A review. **Annals of the New York Academy of Sciences**. p. 73 – 82, 2007.

TAYLOR, M. L.; CHÁVEZ-TAPIA, C. B.; VARGAS-YÃNEZ, R.; RODRÍGUEZ-ARELLANES, G.; PEÑA-SANDOVAL, G. R.; TORIELLO, C.; PÉREZ, A.; REYES-MONTES, M. R. Environmental conditions favoring bat infection with *Histoplasma capsulatum* in mexican shelters. **The American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 61, n. 6, p. 914 – 919, 1999.

TIMM, K. I.; SONN, R. J.; HULTGREN, B. D. Coccidioidomycosis in a Snoran Gopher snake, *Pituophis melanoleucus affinis*. **Medical Micology**, v. 26, n. 2, p. 101 – 104, 1988.

TOGASHI, R. H.; AGUIAR, F. M. B.; FERREIRA, D. B.; MOURA, C. M.; SALES, M. T. M.; RIOS, N. X. Pulmonary and extrapulmonary coccidioidomycosis: three cases in an endemic area in the state of Ceará, Brazil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 3, p. 275 – 279, 2009.

UMEYAMA, T.; SANO, A.; KAMEI, K.; NIIMI, M.; NISHIMURA, K.; UEHARA, Y. Novel approach to designing primers for identification and distinction of the human pathogenic fungi *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii* by PCR amplification. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1859 – 1862, 2006.

UNIS, G.; OLIVEIRA, F. M.; SEVERO, L. C. Histoplasmose disseminada no Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 6, p. 463 – 468, 2004.

VERAS, K. N.; FIGUEIRÊDO, B. C. S.; MARTINS, L. M. S.; VASCONCELOS, J. T. P.; WANKE, B. Coccidioidomicose: causa rara de síndrome do desconforto respiratório agudo. **Journal of Pneumology**, v. 29, n. 1, p. 45 – 48, 2003.

VIANNA, H.; PASSOS, H. V.; SANT'ANA, A. V. Coccidioidomicose. Relato do primeiro caso em nativo ocorrido no Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.21, p. 51 – 55, 1979.

VUCICEVIC, D.; CAREY, E. J.; BLAIR, J. E. Coccidioidomycosis in liver transplant in an endemic area. **American Journal of Transplantation**, v.11, p. 111 – 119, 2010.

VUGIA, D. J.; WHELLER, C.; CUMMINGS, K. C. Increase in Coccidioidomycosis – California, 2000 – 2007. **Weekly**, v. 58, n. 5, p. 105 – 109, 2009.

WANKE, B. Coccidioidomicose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 27 (Supl IV), p. 375 – 378, 1994.

WANKE, B.; LAZERA, M. S.; MONTEIRO, P. C. F.; LIMA, F. C.; LEAL, M. J. S.; FERREIRA FILHO, P. L.; KAUFFMAN, L.; PINNER, R. W.; AJELLO, L. Investigation of an outbreak of endemic coccidioidomycosis in Brazil's Northeastern State of Piauí with a review of the occurrence and distribution of *Coccidioides immitis* in three other Brazilian states. **Mycopathologia**, v. 148, p. 57 – 67, 1999.

WANKE, B.; LAZÉRA, M. S.; EULÁLIO, K. D. Coccidioidomicose. In: COURA, J. R. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1237 – 1245, 2005.

WIBBELT, G.; MOORE, M. S.; SCHOUNTZ, T.; VOIGT, C. C. Emerging diseases in Chiroptera: why bats? **Biology Letters**, v. 6, p. 438 – 440, 2010.

WONG, S.; LAU, S.; WOO, P.; YUEN, K. Bats as a continuing source of emerging infections in humans. **Reviews in Medical Virology**, v. 17, p. 67 – 91, 2007.

WOOLHOUSE, M. E. Population biology of emerging and re-emerging pathogens. **Trends in Microbiology**, v. 10 (Supl 10), p. 3 – 7, 2002.

ZORTÉA, M. Subfamília Stenodermatinae. In: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. **Morcegos do Brasil**. Londrina: Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina, p. 107 – 128, 2007.

## **ANEXO I**

**(Parecer do Comitê de Ética para o Uso de Animais)**





## **ANEXO II**

**(Soluções e Técnica de Coloração da Prata-Metenamina)**

**Tampão Tris-Borato-EDTA (TBE - 5X)**

Trizma base	54 g
Ácido bórico	27,5 g
Na <sub>2</sub> EDTA 0,5 M pH 8,0	20 mL
Água deionizada	q.s.p. 1000 mL
pH 8,0	

**Tampão CTAB**

CTAB	2 g
Tris 1M	10 mL
EDTA 0,5 M	2 mL
NaCl	0,85 g
β-Mercaptoetanol	0,2 mL
Água deionizada	q.s.p. 100 mL

**Coloração Coomassie Brilliant Blue para imunodifusão**Solução descorante

Ácido acético glacial	20 mL
Álcool etílico	40 mL
Água deionizada	q.s.p. 100 mL

Solução Coomassie Blue R

Coomassie Blue R	0,15 g
Solução descorante	q.s.p. 100 mL



### **Técnica de Coloração de Prata-metenamina (Grocott-Gomori)**

- 1) Identificação da lâmina e preparo do esfregaço.
- 2) Fixação da lâmina com álcool comum.
- 3) Imergir em ácido crômico, por 10 minutos, para promover a oxidação das estruturas celulares. Desprezar a solução após o uso.
- 4) Lavar a lâmina com água destilada.
- 5) Cobrir a lâmina com metabissulfito de sódio a 1%, para retirar o excesso de ácido crômico, e, em seguida, lavar com água corrente.
- 6) Imergir a lâmina na solução de nitrato de prata-metenamina, aquecendo-a até atingir a temperatura de 90 °C; periodicamente, remover a lâmina-controle e observá-la ao microscópio.
- 7) Lavar a lâmina com água destilada.
- 8) Imergir a lâmina em solução de cloreto de ouro por 1 minuto.
- 9) Cobrir a lâmina com hipossulfito de sódio por 1 minuto, para melhorar a fixação da prata pelos fungos.
- 10) Imergir na solução contracorante de verde-luz por 3 minutos.
- 11) Lavar as lâminas em diferentes concentrações de etanol: 70%, 95% e álcool absoluto.
- 12) Passar a lâmina rapidamente no xilol.
- 13) Montar as lâminas com bálsamo do Canadá e observar ao microscópio óptico.

## **ANEXO III**

**(Fonte das Figuras)**

**Figura 3:** Pesquisadores que contribuíram para as primeiras descobertas sobre a Coccidioidomicose.

a) Alejandro Posadas;

Fonte: [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a9/Alejandro\\_Posadas.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a9/Alejandro_Posadas.jpg);

Acesso em 16 de abril de 2011.

b) Emmet Rixford;

Fonte: [http://farm5.static.flickr.com/4114/4855227532\\_09c66dc631.jpg](http://farm5.static.flickr.com/4114/4855227532_09c66dc631.jpg);

Acesso em 16 de abril de 2011.

c) William Ophüls;

Fonte: <http://elane.stanford.edu/images/public-web/wilson/portraits/p15-m.jpg>

Acesso em 16 de abril de 2011.

d) Herbert Moffitt.

Fonte: <http://history.library.ucsf.edu/moffitt.html>

Acesso em 16 de abril de 2011.

**Figura 4:** A natureza geofílica *Coccidioides* spp. foi descoberta por Robert Stewart (A) e Karl Meyer (B). Grandes avanços no entendimento dos aspectos epidemiológicos da coccidioidomicose foram realizados por Charles Smith (C).

Charles Smith

Fonte: <http://history.amedd.army.mil/booksdocs/historiesofcomsn/section1.html>

Acesso em 16 de abril de 2011.

Robert Stewart

Fonte: <http://www.hps.cam.ac.uk/whipple/aboutthemuseum/robertwhipple/>

Acesso em 16 de abril de 2011.

Karl Meyer

Fonte: <http://www.jbc.org/content/277/39/e27>

Acesso em 16 de abril de 2011.

**ANEXO IV**  
**(Publicações)**