



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO - PROPESP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS – PPGCF

Desenvolvimento de reação de qPCR para detecção de *H. capsulatum* em amostras de solo de grutas e cavernas do Município de Presidente Figueiredo

BIANCA KELLY NEVES IZIDRO DA SILVA

MANAUS

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO - PROPESP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS – PPGCF

BIANCA KELLY NEVES IZIDRO DA SILVA

Desenvolvimento de reação de qPCR para detecção de *H. capsulatum* em amostras de solo de grutas e cavernas do Município de Presidente Figueiredo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Vicente de Souza Braga

Co-orientador: Prof. Dr. Maurício Morishi Ogusku

MANAUS

2021

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586d Silva, Bianca Kelly Neves Izidro da
Desenvolvimento de reação de qPCR para detecção de *H. capsulatum* em amostras de solo de grutas e cavernas do Município de Presidente Figueiredo / Bianca Kelly Neves Izidro da Silva . 2021
81 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: João Vicente Braga de Souza
Coorientador: Maurício Morishi Ogusku
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Desenvolvimento. 2. Grutas. 3. Cavernas. 4. qPCR. 5. *Histoplasma capsulatum*. I. Souza, João Vicente Braga de. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

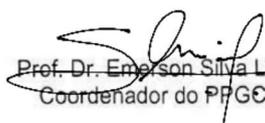
**"Desenvolvimento de reação de qPCR para detecção de *H. capsulatum*
em amostras de solo de grutas e cavernas do município de Presidente
Figueiredo"**

DISCENTE: BIANCA KELLY NEVES IZIDRO DA SILVA

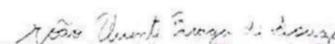
PARECER:

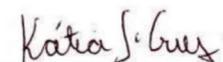
Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus, AM, 30/03/2021.


Prof. Dr. Emerson Silva Lima
Coordenador do PPGCF

**A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes
professores:**


Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza
Orientador e Presidente da Banca (UFAM)


Profa. Dra. Katia Santana Cruz
Membro (FMT-HVD)


Profa. Dra. Ani Beatriz Jackisch Matsuura
Membro (FIOCRUZ)

Dedico ao meu esposo Karlisson Richard por todo apoio e às minhas filhas por toda compreensão.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, pelos caminhos que disponibiliza e auxílio na caminhada.

Ao meu esposo, pelo amor, apoio e paz concedidos.

Á minha filha Sarah, por ser minha primeira ouvinte a cada apresentação.

Á minha mãe pela dedicação as minhas filhas, na minha ausência

Ao Professor Doutor João Vicente Braga de Souza, pelo acolhimento, paciência e conhecimentos.

Ao Professor Dr. Maurício Mourishi Ogusko, pelo apoio e pelos ensinamentos.

À Professora Doutora Ana Cortez, pelo apoio, incentivo e disposição em somar.

Ao Programa de Pesquisa para o SUS (PPSUS) e aos participantes, Dra. Kátia Cruz, Dra. Ani Beatriz, Silviane, Marla e Márcia pela parceria.

Aos integrantes dos Laboratório de Micologia e Micobacteriologia do INPA pelos ensinamentos e apoio.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas e seus professores.

Aos funcionários do INPA, por todo auxílio nos experimentos. Às colegas do Mestrado, Karin e Rosa e em especial à Izabela Mesquita pela amizade e disposição sempre presente em ajudar.

Á minha colega de bancada Janice Nina do Laboratório Distrital Sul, por sempre me incentivar e ajudar sempre que foi preciso. E à minha colega Gecinez Montoia pelo incentivo e constante gentileza.

RESUMO

Histoplasma capsulatum é um fungo encontrado no ambiente que causa uma micose profunda, que se apresenta de forma assintomática à disseminada. Na forma disseminada acomete principalmente pacientes com AIDS. Na América do Sul, essa enfermidade é uma das três principais que levam o paciente com AIDS a óbito. Apesar destes fatos poucos estudos avaliaram sua distribuição ambiental. Este estudo teve como objetivo o desenvolvimento de reação de qPCR para detecção de *H. capsulatum* em amostras de solo de grutas e cavernas do Município de Presidente Figueiredo. Inicialmente, foi feito um estudo *in silico* com software Geneious para desenvolver um *primer* da região ITS do DNA_r de *H. capsulatum*, em seguida o conjunto de *primers* e sonda foi validado com a execução da curva padrão com DNA de cultura do fungo alvo, cálculo do erro experimental, teste para verificar reações cruzadas com outros patógenos e teste de sensibilidade e especificidade. Por fim, com estes *primers* e sonda foi feita a verificação da presença do *H. capsulatum* em 30 amostras de solo de 2 cavernas e 1 gruta do município de Presidente Figueiredo que tiveram seu DNA extraído por duas metodologias distintas. Como resultados, foi desenvolvido um conjunto de *primers* e sonda para detecção de *H. capsulatum* para uso em PCR em tempo real (qPCR) tendo como alvo a região ITS do DNA_r. O desenho desenvolvido demonstrou *in silico* ser tão ou mais adequado que outras propostas que tinham como alvo esta mesma região. O conjunto demonstrou resultados satisfatórios quanto limite de detecção, 10 fg/μL de amostra (20 fg/reação), curva padrão adequada (r^2 0,97), baixo erro experimental, ausência de reação cruzada com outros organismos patogênicos sensibilidade e especificidade adequados. Os experimentos aplicando o novo conjunto de *primers* e sonda em 30 amostras de solo de grutas/cavernas do Município de Presidente Figueiredo demonstraram a presença de DNA de *H. capsulatum* em uma amostra. A proposta de qPCR é uma nova opção de detecção/diagnóstico que poderá ajudar no entendimento da distribuição ambiental do patógeno bem como no diagnóstico clínico em amostras biológicas. A detecção de *H. capsulatum* em amostra de solo de caverna do município de Presidente Figueiredo reforça a necessidade de cuidados recomendados para o turismo na região.

Palavras-chave: Desenvolvimento, grutas, cavernas, qPCR, *Histoplasma capsulatum*

ABSTRACT

Histoplasma capsulatum is a fungi found in the environment that causes a deep mycosis, which presents itself in the asymptomatic form until disseminated. In its disseminated form, it mainly affects AIDS patients. In South America, this disease is one of the three main causes of death for AIDS patients. Despite these facts, few studies have evaluated its environmental distribution. This study aimed to develop a qPCR reaction to detect *H. capsulatum* in soil samples from caves in the county of Presidente Figueiredo. Initially, an *in silico* study was performed with the Geneious software to develop a primer targeting the ITS region of the DNAr of the *H. capsulatum*, then the primer and probe set was validated with the execution of the standard curve with target fungal culture DNA, experimental error, tested to check cross reactions with other pathogens and sensitivity and specificity test. Finally, with this primer and probe, the presence of *H. capsulatum* was verified in 30 soil samples from 3 caves of Presidente Figueiredo that had their DNA extracted by two different methodologies. As a result, a set of primers and probe was developed to detect *H. capsulatum* for use in real-time PCR (qPCR) targeting the ITS region of DNAr. The design demonstrated *in silico* to be equal or more appropriate than other proposals that targeted this same region. The set demonstrated satisfactory results in terms of detection limit, 10 fg/ μ L of sample (20 fg/reaction), adequate standard curve (r^2 0.97), low experimental error, absence of cross reaction with other pathogenic organisms, adequate sensitivity and specificity. The experiments applying the new primer and probe set in 30 soil samples from caves in the Presidente Figueiredo demonstrated the presence of DNA from *H. capsulatum* in one sample. The qPCR proposal is a new detection and diagnosis option that can help in understanding the environmental distribution of the pathogen as well as in the clinical diagnosis in biological samples. The detection of *H. capsulatum* in a sample of cave soil in the municipality of Presidente Figueiredo reinforces the need for recommended care for tourism in the region.

Keyword: Development, caves, qPCR, *Histoplasma capsulatum*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma dos procedimentos experimentais que foram realizados no presente estudo.....	30
Figura 2. Alinhamento de 99 sequências da região ITS1 do DNA ribossomal de <i>H. capsulatum</i>	33
Figura 3. Alinhamento de 99 sequências da região ITS1 do DNA ribossomal de <i>H. capsulatum</i> (continuação).	34
Figura 4. Conjuntos de <i>primers</i> e sonda para a região conservada de ITS do DNA ribossomal de <i>H. capsulatum</i> gerados pelo software Geneious.....	36
Figura 5. Alinhamento de 99 sequências da região ITS1 do DNA ribossomal de <i>H. capsulatum</i>	49
Figura 6. Alinhamento de 99 sequências da região ITS1 do DNA ribossomal de <i>H. capsulatum</i> (continuação).	50
Figura 7. Conjuntos de <i>primers</i> e sonda para a região conservada de ITS do DNA ribossomal de <i>H. capsulatum</i> gerados pelo software Geneious.....	52
Figura 8. Curvas de amplificação com amostras em quadruplicata de diluições em série de 10 vezes correspondendo a 11 ng (A), 1,1 ng (B), 0,11 ng (C), 0,011 ng (D) e 0,0011 (E) e 0,00011 ng (110 fg) de DNA de <i>H. capsulatum</i> / μL ; com dois controles negativos (G e H).....	53
Figura 9. Curva padrão para <i>H. capsulatum</i> , com R^2 : 0,97; Slope: -3,521; Eficiência: 92,31%, representando a regressão linear para ciclo limiar (cyclethreshold-Ct) versus quantidade de DNA (ng) por cada 2 μL usados em cada de reação.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estudos de detecção clínica de <i>H. capsulatum</i> por biologia molecular.....	26
Tabela 2. Estudos de detecção ambiental de <i>H. capsulatum</i> por biologia molecular.....	28
Tabela 3. Conjuntos de <i>primers</i> e sonda para detecção de <i>Histoplasma capsulatum</i> gerados pelo software Geneious.	35
Tabela 4. <i>Primers</i> e sonda do gene da beta-actina eleito para controle interno da reação.	37
Tabela 5. Relação da presença de DNA com o resultado do teste	39
Tabela 6. <i>Primers</i> e sonda do gene da beta-actina eleito para controle interno da reação.	46
Tabela 7. Conjuntos de <i>primers</i> e sonda para detecção de <i>Histoplasma capsulatum</i> gerados pelo software Geneious	51
Tabela 8. Resultados do ensaio cálculo do erro experimental.....	55
Tabela 9. Resultados da avaliação de reações cruzadas com fungos que podem estar presentes em amostras clínicas e no meio ambientes interferindo na especificidade da reação.	55
Tabela 10. Resultados da relação da presença do DNA com o resultado do teste	56
Tabela 11. Localização por gruta/caverna e por GPS das amostras coletadas em Presidente Figueiredo e os resultados da qPCR	57
Tabela 12. Estudos realizados com qPCR com alvo na região ITS do <i>H. capsulatum</i>	58
Tabela 13. Estudos de detecção ambiental de <i>H. capsulatum</i> por biologia molecular	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μM – Micromolar

μL – Microlitro

AIDS – Acquired Immunodeficiency Syndrome (Síndrome da imunodeficiência adquirida)

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)

CFP – Coleção de Fungos Patogênicos

CNS – Conselho Nacional de Saúde

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP's – Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

EDTA – Ácido etileno diamino tetracético

EIA – Enzima imuno ensaio

EUA – Estados Unidos da América

HE – Hematoxilina-Eosina

fg – Fentograma

g – Grama

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

INPA – Instituto de Pesquisa da Amazônia

LBA – Lavado broncoalveolar

LCR – Líquido cefaloraquidiano

ml – Mililitro

mM – Milimolar

MGB – *Minor Groove Binder*

NaCl – Cloreto de sódio

NFQ – *Non-Fluorescent Quencher*

ng – Nanograma

PAHO – Pan American Health Organization

pb – Pares de bases

PCR – Reação em cadeia de polimerase

pg – Picograma

HDP – Histoplasmose disseminada progressiva

HPA – Histoplasmose pulmonar aguda

pH – Potencial Hidrogeniônico

qPCR – PCR em tempo real

TBE – Tris-ácido bórico-EDTA

Tris – Tris-(hidroximetil)-aminometano

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	<i>Histoplasma capsulatum</i>	16
2.2	Epidemiologia	17
2.3	Patologia	20
2.4	Tratamento	21
2.5	Metodologias aplicadas à detecção do <i>H. capsulaum</i>	22
2.5.1	Detecção clínica do <i>H. capsulatum</i>	22
2.5.1.1	Histopatologia	22
2.5.1.2	Cultura.....	23
2.5.1.3	Inoculação em cobaias	23
2.5.1.4	Antígeno.....	23
2.5.1.5	Testes sorológicos	24
2.5.1.6	PCR e qPCR.....	24
2.5.2	Detecção ambiental do <i>H. capsulatum</i>	26
2.5.2.1	Cultura e inóculo em cobaias	26
2.5.2.2	PCR e qPCR.....	27
3	OBJETIVOS	29
3.1	Geral	29
3.2	Específicos	29
4	MATERIAI E MÉTODOS	30
4.1	Universo do estudo	30
4.1.1	Cepas padrão	30
4.1.2	Amostras de solo	31
4.2	Procedimentos	32
5	RESULTADOS	42
6	CONCLUSÃO DA DISSERTAÇÃO	66
7	REFERÊNCIAS DA DISSERTAÇÃO	67
8	APÊNDICE	73

1 INTRODUÇÃO

A histoplasmose é causada pelo *Histoplasma capsulatum*, fungo dimórfico que se apresenta na forma filamentosa no ambiente e como levedura no organismo hospedeiro (LINDER & KAUFFMAN, 2019). Segundo Haldar et al., (2017), a histoplasmose é uma doença granulomatosa e suas manifestações clínicas podem ser classificadas de acordo com o local (pulmonar, extrapulmonar ou disseminado), duração da infecção (aguda e crônica) e padrão de infecção (primária e reativação).

A histoplasmose é amplamente distribuída pelo mundo sendo endêmica em parte dos Estados Unidos da América (EUA), na América Central e América do Sul. Casos também são reportados na África, Oceania e Europa (BAHR et al., 2015; BROWN et al., 2018). No entanto, o aumento da importância epidemiológica dessa doença aconteceu devido a pandemia do HIV (NACHER et al., 2013; WHEAT, 2016). No Brasil, Giacomazzi et al., (2016) observaram incidência de 2,19 hospitalizações por histoplasmose a cada 1000 hospitalizações. Silva et al., (2017) observaram prevalência de histoplasmose disseminada de 4,4% e letalidade de 71,3% em pacientes com AIDS.

A infecção por *H. capsulatum* inicia-se com a inalação de microconídios e outros propágulos infecciosos distribuídos no ambiente (BEERS, 2011). Portanto, a pesquisa desse agente em amostras ambientais é importante (TAYLOR, STOIANOFF, FERREIRA, 2013; ROCHA-SILVA et al., 2014). No entanto, apesar de surtos e casos isolados fornecerem dados sobre a distribuição da doença (OLIVEIRA, 2014; BENEDICT & MODY, 2016; CORREIA et al., 2016), poucos estudos pesquisaram a presença desse agente no ambiente. Entre os estudos com amostras ambientais deve-se destacar aqueles que fizeram uso de cobaias, como os realizados por Emmons (1949) e Zeidberg et al., (1952) nos Estados Unidos da América. Mais recentemente, destacam-se os estudos conduzidos por metodologias moleculares devido a velocidade, sensibilidade e a não necessidade do uso de cobaias como os estudos realizados por Kikushi et al., (2008) no Japão, Moquet et al., (2012) na Guiana Francesa e Norkaew et al., (2013) na Tailândia. No Amazonas há relatos de turistas que desenvolveram histoplasmose em cavernas próximas à Manaus (SUZAKI et al., 1995) e detecção de mamíferos infectados com o fungo na região de Balbina (NAIFF et al., 1996). Menescal et al., (2019) observou 89 casos de histoplasmose em 7 anos de pesquisa com pacientes com HIV/AIDS, com óbito em 55% dos casos. Souza et al., (2008) verificaram a histoplasmose como causa de óbito em 13% dos pacientes com AIDS necropsiados. Apesar da gravidade dessa doença, não existem estudos de detecção de *H. capsulatum* em amostras ambientais no estado do Amazonas. Nesse estado,

existem cavernas e grutas com fluxo turístico e a detecção/quantificação do fungo pode fornecer dados para ações de prevenção da doença nestes locais turísticos.

No presente estudo foi realizado o desenvolvimento de um novo par de *primers* e sonda para detecção *H. capsulatum* para uso em PCR e PCR em tempo real (qPCR), tendo como alvo a região ITS do DNA_r do *H. capsulatum*. O desenho se mostrou adequado em teste *in silico* para detecção do DNA fungo obtido de culturas. Sua validação com a realização da curva padrão, observação do erro experimental, testes pra verificar se havia reação cruzada com os principais fungos clínicos e ambientais, testes para avaliar sua sensibilidade e especificidade apresentou resultados satisfatórios e o limite de detecção encontrado se mostrou compatível com Babady et al., (2011), Buitrago et al., (2013) e Lopez et al., (2017). Foi realizada qPCR aplicando o novo conjunto de *primers* e sonda em 30 amostras de solo de uma gruta e duas cavernas do Município de Presidente Figueiredo muito frequentadas por banhistas locais e turistas, que demonstrou a presença de DNA de *H. capsulatum* em somente uma amostra.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A histoplasmose é uma doença pulmonar e hematogênica causada pelo *Histoplasma capsulatum* (BEER, 2011). A infecção resulta da inalação de esporos aerossolizados e pode ser assintomática ou sintomática. Esta última, em geral, envolve doença pulmonar primária, entretanto, doença disseminada extrapulmonar e grave pode ocorrer, especialmente em pessoas imunodeprimidas (ARMSTRONG et al., 2018). Assim como a doença crônica pode ocorrer após a infecção primária assintomática (BEERS, 2011).

2.1 *Histoplasma capsulatum*

O *H. capsulatum* taxonomicamente pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota, classe Eurotiomycetes, ordem Onygenales, família Ajellomycetaceae, gênero *Histoplasma* (KIRK, 2019). O *H. capsulatum* é um fungo dimórfico, filamentoso no ambiente e se transforma em levedura em tecidos a 37° C. A fase micelial demonstra hifas septadas de 1-2,5 µm, microconídios de 2-6 µm, macroconídios de 8-14 µm surgindo de ramos laterais e terminais. Os macroconídios tem projeções em forma de dedos, são chamados conídios tuberculados e permitem a identificação de um fungo filamentoso como *H. capsulatum*. Os microconídios são infecciosos pois têm um tamanho que pode ser facilmente inalado. A forma de levedura é ovalada com diâmetro de 2-4µm que pode ser visto dentro de macrófagos ou livre em tecidos; Células-filhas de brotamento único com uma base estreita são típicas. Formas de leveduras atípicas, aumentadas e bizarras, juntamente com estruturas de hifas, foram observadas em infecções endovasculares (LINDER & KAUFFMAN, 2019).

Análises do solo mostraram que o

H. capsulatum não cresce em níveis de pH inferiores a 5 ou superiores a 10, em temperaturas superiores a 40°C (COLOMBO et al., 2011). O fungo habita solos ricos em fósforo e nitrogênio (GOMÉS et al., 2018), sendo encontrado no solo contendo fezes de aves e morcegos, que servem como um bom meio de crescimento. As aves não albergam o fungo devido à alta temperatura corporal, mas os morcegos podem ser portadores crônicos, excretando formas viáveis em suas fezes (SIMÃO & BORGES, 2009).

Surtos ocorridos de 1938 a 2013 demonstraram estar associados a locais como cavernas, galinheiros, construções, demolições, perturbações do solo ou de matéria vegetal e a presença de excrementos de morcegos ou aves (galinhas, melros, estorninhos, gralhas e outros) (BENEDICT & MODY, 2016).

H. capsulatum tem grande capacidade de sobrevivência no ambiente. Uma vez presente no solo, permanece por anos após a retirada das aves (DISMUKES et al., 2003). De forma similar, possui capacidade de sobreviver no hospedeiro. Possui afinidade pelo sistema retículo endotelial onde se torna patógeno intracelular de macrófagos (LACAZ et al., 2002).

De acordo com Garfoot & Rappleye, (2016), o *H. capsulatum* é capaz de causar doença em imunocompetentes, diferente dos fungos oportunistas, pois não é controlado pelas células fagocíticas. Infectam macrófagos e proliferam utilizando vários mecanismos. A levedura escapa de proteínas surfactantes antimicrobianas do pulmão induzindo internalização, evitam imunostimulação, neutralizam oxigênio reativo e captam metais como ferro e zinco para suprir limitações nutricionais.

Apesar de sua capacidade de sobrevivência, é de difícil isolamento do meio ambiente por cultivo, o que vem sendo comprovado desde o primeiro isolamento por Emmons (1949) até estudos posteriores, nestes o fungo tem sido isolado através do inóculo em ratos, o que depende tempo e a vida de cobaias (LOTTENBERG et al., 1979).

2.2 Epidemiologia

Casos de histoplasmoses foram relatados em muitas áreas do mundo. A distribuição da histoplasmose se estende a vários países da América Central e do Sul e do Caribe, Estados Unidos bem como da África Meridional e Subsaariana, da Índia, da China e do Sudeste Asiático. Casos também são vistos em toda a Europa e regiões não endêmicas (SCULLY&BRADDLEY, 2018).

A extensão geográfica da histoplasmose, pode ser mais abrangente que a descrita atualmente como endêmica por diversos fatores: viagens ou a migração de áreas endêmicas pode levar à aquisição de doenças com a possibilidade de reativação anos depois; com o número crescente de pessoas que recebem imunossupressores, cresce na população o risco de histoplasmose (ASSI et al., 2013; AZAR et al., 2017); a pandemia do HIV, resultou em mais casos de histoplasmose (NACHER et al., 2013; WHEAT., 2016); 120.000 novas infecções por HIV foram observados na América Latina e Caribe em 2016 (Pan American Health Organization & Joint United Nations Programme on HIV/AIDS, 2017); vários relatos de histoplasmose fora de áreas de alta prevalência, em pessoas que nunca viajaram, sugerem que bolsas de endemidade anteriormente não reconhecidas podem existir (AZAR et al., 2017) e a doença pode ser subdiagnosticada fora dos Estados Unidos, onde a detecção de antígeno é amplamente indisponível (DIAZ et al., 2018), a detecção na África por Mandengue, Ngandjio,

Atangana (2015), de *H. capsulatum* em 13% dos pacientes com HIV e sintomas como febre tosse com duração acima de duas semanas, manifestações de pele e células CD4 <200/ μ L investigados reforçam essa hipótese.

Na África, o *H. capsulatum* ocorre em áreas da África do Sul, a África Oriental e a África Ocidental em microfocos, incluindo cavernas. Casos de histoplasmose relatados na Itália, França, Alemanha, Espanha e outros países europeus são observados em pessoas que viajaram ou emigraram de áreas endêmicas da África. No entanto, casos autóctones são descritos, principalmente da Itália. O HIV contribuiu para aumentar o reconhecimento de histoplasmose na região Ásia-Pacífico assim como casos de histoplasmose originários da Índia parecem ser cada vez mais reconhecidos e diferenciados da tuberculose em pessoas infectadas pelo HIV. A maioria dos casos de histoplasmose na Austrália foi relatada em New South Wales e Queensland, mas casos ocasionais ocorrem em outros territórios. A histoplasmose compete com a peniciliose como uma infecção disseminada oportunista em pessoas infectadas pelo HIV na Tailândia. E na China, número crescente de casos foi relatado (LINDER & KAUFFMAN, 2019).

Na América do Norte é a infecção fúngica endêmica mais comum (AZAR & HAGE, 2017). Estudo realizado nos EUA mostrou que os ambientes preferidos do *Histoplasma* sp. se expandiram no país, para a bacia do alto rio Missouri, essa progressão provavelmente reflete mudanças no clima e no uso da terra com o aumento do cultivo e urbanização (MAIGA et al., 2018). Casos de histoplasmose tem ocorrido fora da area considerada endemica no vale dos rios Ohio e Mississipi. Dados de vigilância de 2011 a 2014 de 12 estados verificou a ocorrência de 3409 casos da doença; entre os casos com disponibilidade de dados sobre a imunidade e hospitalização e obito do paciente, 30% eram imunocomprometidos, 57% foram hospitalizados e 7% foram a obito (ARMSTRONG et al., 2018).

Na América Latina, as taxas de histoplasmose aumentaram com taxas crescentes de infecção pelo HIV. Estudos com histoplasmina demonstraram taxas altas de sensibilidade no sul do México, América Central e partes da América do Sul. Dados sugerem que mais de um terço das pessoas na América Central e do Sul foram expostas ao *Histoplasma* sp., com taxas mais altas na América Central e no norte da América do Sul (Venezuela, Guiana Francesa, Guiana, Suriname) (LINDER & KAUFFMAN, 2019). Numerosos casos foram relatados no Brasil, na Guiana Francesa, na Argentina, na Colômbia, na Venezuela, na Guatemala, e no Panamá. A histoplasmose disseminada progressiva (PDH) é a doença mais comum na AIDS na Guiana Francesa. Na Colômbia, mais de 70% dos pacientes com histoplasmose incluída em uma pesquisa realizada de 1992 a 2008 tinha vírus da imunodeficiência humana (HIV)/AIDS

(HAGE et al., 2015). Embora a histoplasmose seja provavelmente a micose sistêmica endêmica mais prevalente na América Latina, seu real ônus continua a ser determinado devido à escassez de estudos epidemiológicos prospectivos. Adenis et al., (2018) supõe que as taxas de mortalidade e incidência associadas à histoplasmose foram equivalentes, se não superiores, à tuberculose em pacientes com AIDS (PASQUALOTO & QUEIROZ-TELES, 2018).

No Brasil, a observação da distribuição dos casos é feita pelo levantamento realizado por estudos isolados, dado que a doença não é de notificação obrigatória no país (BRASIL, 2016); A positividade da histoplasmina, que reconhece infecções passadas, pode ser de até aproximadamente 90% em algumas áreas (HAGE et al., 2015). Surtos já foram observados nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Mato Grosso e Minas Gerais. Em artigo que resume a situação da histoplasmose no mundo, Bahr (2015) fornece dados de diversos estudos realizados no Brasil que confirma a alta endemicidade no país, especialmente nos estados do norte (Amazonas, Roraima, Pará, Amapá), nordeste (Ceará, Rio Grande do Norte, Bahia) e do sudeste (Minas Gerais, São Paulo). Giacomazzi et al., (2016) ao pesquisar a carga de doenças fúngicas graves em um ano no Brasil, com base em dados oficiais encontrou a incidência 2,19 hospitalizações por histoplasmose a cada 1000.

O Amazonas é apontado como área endêmica. São encontrados pesquisas do século passado, como o levantamento sorológico feito por Mok (1979) e o artigo de Fava & Fava Neto (1998) que descreve vários estudos, entre eles, três realizados no Amazonas no período de 1978-1986 que descrevem positividade a histoplasmina variando entre 12,8 -50,1%.

Em hospital localizado em Manaus, que atende a capital e as cidades de todo o Amazonas, Souza et al. (2008) verificaram as causas de óbito de 129 pacientes com AIDS necropsiados de 1996 a 2003 e encontram a histoplasmose em 17 pacientes (13%), destes 13 não foram diagnosticadas (76%) na avaliação clínica *antemortem*. No mesmo hospital, foram observados, no período de 2011 a 2018, 89 novos casos de histoplasmose, todos pacientes com HIV, do total 55% foram à óbito (MENESCAL et al., 2019).

Suzaki et al., (1995) relataram a ocorrência de histoplasmose aguda em viajantes japoneses que foram expostos a guano de morcego em uma caverna perto de Manaus; o grupo de 8 viajantes japoneses entraram em uma caverna por um total de 2 horas em março de 1993. Todos os visitantes eram saudáveis e sem histórico de radiografias torácicas anormais. De 10 a 20 dias após a exposição, 7 (87,5%) dos 8 indivíduos desenvolveram sintomas incluindo febre, mal-estar, perda de apetite, mialgia, artralgia, dor torácica e tosse seca. Cinco (62,5%) apresentavam sombras infiltrativas nodulares com ou sem linfadenopatia hilar no tórax. Oito

(100%) dos indivíduos apresentaram evidência sorológica de histoplasmose. A caverna envolvida nunca foi documentada como sendo endêmica para histoplasmose.

Naiff et al., (1996) isolaram de *Histoplasma capsulatum* de vinte e oito dos 479 animais examinados. Os animais pertenciam a oito espécies de mamíferos florestais dos estados do Amazonas, Pará e Rondônia na Amazônia brasileira; os isolados primários foram obtidos inoculando intradermicamente e intraperitonealmente o tecido triturado do fígado e baço em hamsters. O diagnóstico micológico em hamsters apresentando lesões foi confirmado pela histopatologia e cultura em ágar dextrose-Sabouraud.

2.3 Patologia

Vários fatores determinam a severidade da infecção pelo *H. capsulatum*, incluindo o tamanho do inóculo de microconídios inalado, a idade do indivíduo e o estado do sistema imune. A infecção é geralmente assintomática em indivíduos saudáveis, com teste de histoplasmina positivo porque os macrófagos pulmonares fagocitam os microconídios e transportam para destruição nos linfonodos (DIAZ, 2018). A infecção se resolve com o desenvolvimento de imunidade mediada por células. Como consequência da produção de linfócitos T que reconhecem o organismo, o fator de necrose tumoral e interferon gama são induzidos, ativando macrófagos para inibir o crescimento do organismo e fornecer proteção contra reinfecção. Embora os organismos persistam nos granulomas para a vida toda na maioria dos indivíduos saudáveis, normalmente não são viáveis, conseqüentemente, a infecção é latente, como visto em tuberculose (WHEAT et al., 2016).

Menos de 1% dos indivíduos expostos desenvolvem sintomas, destes 60% apresentam sintomas respiratórios como dor no peito, tosse e falta de ar, outras manifestações clínicas em imunocompetentes assemelham-se a influenza e podem incluir febre, calafrios, dor abdominal, náusea e vômito, especialmente em crianças; e mal estar, fadiga, perda de peso e dor de cabeça severa, mialgias e artralgias em adultos (DIAZ, 2018).

Entre os indivíduos que não tem a infecção assintomática, a clínica encontrada varia entre a histoplasmose pulmonar aguda, histoplasmose pulmonar crônica e histoplasmose disseminada, havendo ainda complicações incomuns como mediastinite granulomatosa, insuficiência adrenal, meningite e infecção endovascular. A histoplasmose pulmonar aguda geralmente se apresenta em crianças ou adultos jovens na primeira exposição. Radiografias de tórax mostram tipicamente doença do espaço aéreo focal; A linfadenopatia hilar e/ou mediastinal está frequentemente presente. Enquanto a histoplasmose pulmonar cavitária

crônica ocorre principalmente em idosos com doença pulmonar preexistente e se desenvolve à medida que a inflamação ocorre adjacente às infecções preexistentes e, posteriormente, ocorre necrose central, levando à formação de grandes lesões cavitárias que imitam tuberculose. Na mediastinite granulomatosa, múltiplos linfonodos mediastinais se ampliam para formar uma massa que frequentemente sofre necrose por caseação. A histoplasmose disseminada é incomum, exceto em crianças muito jovens e pessoas imunossuprimidas, especialmente aquelas com infecção por HIV com células CD4 <150/μL. Pacientes imunossuprimidos podem ter uma infecção avassaladora manifestada por choque, desconforto respiratório, insuficiência hepática e renal, obnubilção e coagulopatia. O exame físico demonstra hepatoesplenomegalia e linfadenopatia difusa em cerca de metade dos pacientes. Ulcerações orofaríngeas dolorosas são notadas em alguns pacientes. Histoplasmose disseminada pode envolver qualquer órgão (LINDER & KAUFFMAN, 2019).

2.4 Tratamento

Histoplasmose é resolvida sem tratamento na maioria dos indivíduos saudáveis. A doença pulmonar aguda usualmente é tratada. Em casos mais amenos o uso de itraconazol por 12 semanas é suficiente; em casos moderados a severos é preferível o uso de anfotericina B na formulação lipídica por 1-2 semanas seguida por itraconazol num total de 12 semanas. A histoplasmose pulmonar crônica sempre deve ser tratada; pode ser usado itraconazol por 12-24 semanas com monitorização por 1 ano após término da terapia (WHEAT et al., 2016).

Hage et al., (2015) determinam o tratamento de histoplasmose pulmonar crônica com itraconazol por 12 meses; Wheat et al., (2016) sugere até 24 meses com seguimento radiológico. Para a doença disseminada, de moderadamente severa a severa, a recomendação é Anfotericina lipossomal ou Anfotericina B complexo lipídico ou Anfotericina B desoxilato por 1–2 semanas, seguida por itraconazol 2 meses (HAGE et al., 2015).

Para pacientes com HIV, em um ensaio clínico, a anfotericina B lipossômica intravenosa (IV) foi mais eficaz que o desoxilato padrão de anfotericina B IV, reduziu mortalidade e toxicidade; portanto, pacientes com histoplasmose moderadamente severa à grave disseminada devem ser tratados com anfotericina B lipossômica IV por pelo menos 2 semanas ou até melhora clínica. Formulação lipídica da anfotericina B pode ser usada na mesma dosagem devido custo ou intolerância a anfotericina B lipossômica. Terapia com o itraconazol oral, por no mínimo 12 meses. Devido às possíveis interações entre itraconazol e antirretrovirais, é aconselhável obter níveis séricos de itraconazol. Em pacientes com histoplasmose disseminada

menos grave, o itraconazol oral é a terapia inicial apropriada. Em pacientes com meningite confirmada, a anfotericina B lipossomal deve ser administrada como terapia inicial por 4 a 6 semanas; seguido por terapia de manutenção com itraconazol por pelo menos 1 ano e até a resolução dos achados anormais do LCR. Postaconazol e voriconazol orais foram relatados como efetivos para histoplasmose em um pequeno número de pacientes com AIDS ou outras condições imunossupressoras. O fluconazol é menos efetivo que o itraconazol para a histoplasmose, mas demonstrou ser moderadamente eficaz na dose de 800 mg ao dia e pode também ser uma alternativa razoável nessa dose para intolerantes ao itraconazol. (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, THE HIV MEDICINE ASSOCIATION OF THE INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA, THE NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2017).

2.5 Metodologias aplicadas à detecção do *H. capsulaum*

2.5.1 Detecção clínica do *H. capsulatum*

O diagnóstico da histoplasmose baseia-se em uma abordagem multifacetada que inclui evidências clínicas, radiográficas e laboratoriais. Os padrões de ouro para diagnóstico laboratorial incluem demonstração de levedura no exame patológico do tecido e isolamento do fungo na cultura de espécimes clínicos; entretanto, a detecção de antígeno forneceu um método rápido, não invasivo e altamente sensível para o diagnóstico e é um marcador útil de resposta ao tratamento. Métodos moleculares com melhor sensibilidade em amostras clínicas estão sendo desenvolvidos (AZAR & HAGE, 2017).

2.5.1.1 Histopatologia

Na patologia, a característica é a presença de granulomas, caseosos ou não caseosos, indicativos da tentativa do sistema imunológico de conter a infecção. Juntamente com outros distúrbios granulomatosos, como sarcoidose, linfoma e infecções micobacterianas, a histoplasmose deve sempre ser considerada quando a inflamação granulomatosa é detectada. Após coloração com hematoxilina-eosina (HE) podem-se observar formas ovóides de levedura (2-4µm) de base estreita nos tecidos ou englobadas por macrófagos. A citologia ou a histopatologia, ao contrário da cultura, podem levar ao diagnóstico rápido, mas são prejudicadas por sensibilidades sub-ótimas. Além disso, procedimentos como a broncoscopia flexível e a

biópsia pulmonar transbrônquica necessários para obter amostras de tecido para culturas e análises patológicas são invasivos e podem não ser viáveis em pacientes criticamente enfermos ou com coagulopatias (HAGE et al., 2015).

2.5.1.2 Cultura

As culturas são mais úteis em pacientes com histoplasmose pulmonar disseminada ou crônica, positiva em 50 a 85% dos casos. Na doença disseminada, o maior rendimento de cultura é da medula óssea ou sangue, positivo em mais de 75% dos casos. Organismos podem ser isolados de espécimes de escarro ou broncoscopia de 75% dos pacientes com histoplasmose pulmonar crônica. São necessárias quatro semanas para isolar o organismo em cultura. A forma filamentosa de *H. capsulatum* cresce como um micélio branco ou lustroso e semelhante a camurça ou algodão (WHEAT et al., 2016). No exame microscópico dependendo da maturidade dos micélios, primeiro aparecem hifas septadas, seguidas de microconídios lisos (ou menos comuns, espinhosos) e originados de conidióforos curtos e hialinos são observados macroconídios tuberculados, com projeções semelhantes a dedos, altamente sugestivos de *H. capsulatum*; mas outros fungos, incluindo *Sepedonium* spp. também podem produzir tais estruturas, portanto é necessário um teste mais específico para diagnóstico definitivo. Ao serem incubadas a 37°C, as colônias apresentam leveduras pequenas redondas de brotamento estreito (AZAR & HAGE, 2017; LINDER & KAUFFMAN, 2019).

2.5.1.3 Inoculação em cobaias

O fungo também pode ser isolado de animais inoculados com os mesmos materiais que serviram para o cultivo. O material de exsudato pode ser liquefeito, misturando-se em partes iguais com solução fisiológica em tubo de ensaio com pérolas de vidro. O tecido deve ser triturado antes da adição da solução fisiológica. Tratando-se de material infectado, adicionar 10.000 unidades de penicilina e 1 mg de estreptomicina para cada mL de material. Inocula-se, intraperitonealmente, 2 a 4 camundongos, que serão sacrificados depois de 4 semanas. São semeados fragmentos de fígado ou baço (OLIVEIRA, 2014).

2.5.1.4 Antígeno

O antígeno galactomanano pode ser detectado nos fluidos corporais, oferecendo método para diagnóstico rápido. O maior rendimento para detecção ocorre em pacientes com histoplasmose disseminada progressiva (PDH) ou Histoplasmose pulmonar aguda (HPA), 80% a 95% dos casos. Menos frequente é a detecção na histoplasmose pulmonar subaguda ou crônica. O maior rendimento para a detecção de antígeno é obtido testando tanto a urina quanto o soro. O antígeno pode ser encontrado no lavado broncoalveolar (LBA) em 90% dos pacientes com histoplasmose pulmonar crônica ou histoplasmose pulmonar difusa, complicando a histoplasmose disseminada progressiva (HDP). As reações cruzadas ocorrem mais frequentemente em pacientes com blastomicose, peniciliose e paracoccidioidomicose (WHEAT et al., 2016; LINDER & KAUFFMAN, 2019).

2.5.1.5 Testes sorológicos

Enzimaímuensaio (EIA) parece ser mais sensível que fixação de complemento e imunodifusão (LINDER & KAUFFMAN, 2019). Testes sorológicos, como fixação de complemento e imunodifusão, confirmam retrospectivamente diagnóstico de histoplasmose aguda feito por Enzimaímuensaio (EIA), pois leva 6 ou mais semanas para o desenvolvimento de antígenos de *H. capsulatum*. Esses testes detectam anticorpos contra o fungo em convalescência. Os testes sorológicos serão positivos em 90% dos pacientes com doença pulmonar e em 85% dos pacientes com doença disseminada. Os testes sorológicos podem ser imprecisos em pacientes com AIDS, nestes casos, devem ser confirmados por cultura ou exame histopatológico (DIAZ, 2018).

2.5.1.6 PCR e qPCR

Dentre um universo de metodologias de detecção de microrganismos, em diagnóstico clínico, as técnicas moleculares estão se expandindo devido a sua característica de tornar pequenas quantidades do alvo detectáveis. A PCR atualmente é usada em diversos campos como diagnóstico de doenças genéticas (CAMUNAS-SOLER et al., 2018) e infecciosas (PATEL et al., 2013), monitoramento de cura de leucemia (JOVANOVIC et al., 2013), acompanhamento no tratamento da AIDS com medicamentos retrovirais (ALIDJINOU, BOCKET, HOBBER, 2014) e pode ser usada no diagnóstico da histoplasmose (MUÑOZ et al., 2010).

Na reação em cadeia da polimerase (PCR) podem ser utilizadas amostras de DNA de diversas origens biológicas como sangue, lavado bronco alveolar, líquido, biopsias, medula óssea, linfonodos (MAUBON, SIMON, AZNAR, 2007; SIMON et al., 2010) sendo de fundamental importância o cuidado com a extração do DNA para que a PCR seja bem sucedida. Para a obtenção do DNA podem ser utilizados Kits comerciais como os usados por Sampaio et al., (2012) e Babady et al., (2011) ou por técnicas utilizando diversas soluções padronizadas com o objetivo de provocar a lise das células para a liberação do DNA e posterior separação deste dos demais constituintes da amostra (NORKAEW et al., 2013).

Com o DNA extraído a PCR é realizada com a reunião dos reagentes necessários para amplificação: amostra, dNTPs, *primers*, cloreto de magnésio, tampão, Taq polimerase e submissão à ciclos de temperatura em um termociclador, onde ocorre a desnaturação em altas temperaturas, expondo as fitas simples ao *primer* que deve se anelar ao DNA da amostra para que a Taq polimerase inicie a síntese da nova cópia do DNA alvo. Dessa forma após vários ciclos haverá quantidade de DNA suficiente para detecção através de eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo ou Sybr green (MULLIS et al., 1986; BIALEK et al., 2002).

A qPCR, Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real, mesmo existindo a mais de 20 anos e sendo preferida em aplicações de pesquisa, ainda não conquistou ampla aceitação na prática rotineira, mas é a mais sensível e específica técnica para a detecção de ácidos nucleicos. (FOROOTAN et al., 2017). E possibilita o desenvolvimento de qPCR multiplex, onde, usando diferentes fluoróforos um único ensaio pode determinar a presença ou ausência de múltiplos patógenos (GAGO et al., 2014).

A necessidade de novas técnicas, como as moleculares, na detecção do *H. capsulatum* se torna mais importante devido à baixa sensibilidade do cultivo do fungo (FALCI et al; 2017) e ao fato do cultivo de amostras clínicas ter seus resultados em média de aproximadamente 27 dias e suas possíveis consequências: aumento dos custos hospitalares e tratamento inadequado (MAUBON, SIMON, AZNAR, 2007). Assim encontramos diversas tentativas de desenvolvimento de metodologias moleculares para diagnóstico, assim como o emprego de técnicas com bom desempenho prévio sendo usadas detecção em amostras clínicas diferentes, com a vantagem de não mostrar reatividade cruzada com outros fungos que causam micose sistêmica (BABADY et al., 2011). Além de apresentarem menor tempo quando empregadas na detecção do fungo em amostras clínicas (MAUBON, SIMON, AZNAR, 2007).

Na tabela 1 são apresentados estudos de detecção de *H. capsulatum* em amostras clínicas através da biologia molecular.

Autores/Local	Amostras	Método/Primer	Especificidade/ Sensibilidade/LOD
Bialek et al., 2002/Alemanha	Biopsia	Nested PCR/Hc100	100%/Não informado/1-5 células
Maubon, Simon, Aznar, 2007.	Amostras clínicas	Nested PCR/Hc100	100%/100%/Não informado
Simon et al., 2010/Guiana Francesa	Amostras clínicas	RTPCR/HCITS	95,4%/96%/10fg/ μ l
Babady et al; 2012/EUA	Amostras clínicas	RTPCR/Não informado	100%/73-94%/100 copias/ μ l
Koempzell et al., 2012/EUA	Tecido em formol e parafina	RTPCR/Hc100	100%/88,9%/6pg/ μ l
Sampaio et al., 2012/Brasil	Sangue com adição de <i>H. capsulatum</i>	PCR/HC100	Não informado/Não informado/10pg
Dantas et al., 2013/Brasil	Soro e sangue	Nested PCR/Hc100	100%/95-97%/Não informado
Gago et al., 2014/Espanha	Amostras clínicas	Multiplex RTPCR/Não informado	100%/90,7- 100%/2fg/20 μ l
Muraosa et al., 2016/Brasil	Soro com DNA adicionado	RTPCR/NAALADNASE Nested RT-PCR	100%/33%/50 copias 100%/77%/ 5 copias
Lopez et al., 2017/Colômbia	Tecido fresco e em formol/parafina de animal inoculado.	RTPCR/Hc100	100%/100%/1fg/ μ l
Carreto-Binaghi et al., 2019 Brasil	Lavado bronco alveolar	Nested PCR/Hc100	Não informado/Não informado/Não informado

TABELA 1. ESTUDOS DE DETECÇÃO CLÍNICA DE *H. CAPSULATUM* POR BIOLOGIA MOLECULAR

2.5.2 Detecção ambiental do *H. capsulatum*

2.5.2.1 Cultura e inóculo em cobaias

O *H. capsulatum* foi isolado pela primeira vez em 1948 por Emmons, após tentativas sem êxito de isolar o fungo diretamente do solo em cultura, passando o solo seco no ágar Sabouraud ou simplesmente incubando o solo úmido, pois todas as culturas foram cobertas por

outros microrganismos; o solo foi inoculado em cobaias e posteriormente foi realizada cultura de seus órgãos (EMMONS, 1949; EMMOS, 1961).

Norkaew et al., (2013) realizaram na Tailândia a cultura de solo contaminado com excrementos de morcegos e aves de 17 amostras positivas por PCR para *H. capsulatum*; mas nenhuma colônia filamentosa apresentou a morfologia do fungo. Sete amostras PCR positivas também foram inoculadas em cobaias e a cultura dos órgãos também falhou em isolar o fungo. Taylor, Stoianoff, Ferreira (2013) utilizaram cultura de solo em estudo micológico em caverna de Minas Gerais, e não obtiveram sucesso no isolamento do *H. capsulatum*.

2.5.2.2 PCR e qPCR

Devido às dificuldades do isolamento por cultura e inoculo em cobaias, Reid & Shafer (1999) investigaram a detecção do fungo utilizando PCR de 2 estágios (Nested PCR) em amostras de solo com adição de esporos do fungo. E demonstraram a capacidade de detectar pequenos números de esporos de *H. capsulatum* em amostras de solo.

Na Guiana Francesa, Moquet et al., (2012), utilizaram a qPCR para detecção em 31 amostras de solo, encontrando positividade em 12,9% (4) das amostras. E na Tailândia, Norkaew et al., (2013) detectaram o fungo em 6,41% das amostras de solo de cavernas, parques e templos testados (265) utilizando Nested PCR e *primers* anteriormente descritos por Bialek et al., (2002): Hc I e Hc II na primeira PCR e Hc III e Hc IV na segunda PCR.

No Brasil, Amorim-Conselheiro et al (2019), utilizando qPCR com alvo a região ITS 1 do DNA ribossomal do *H. capsulatum*, detectou *H. capsulatum* em 9 amostras de 59 pontos coletados na cidade de São Paulo em dormitórios onde havia poleiro de morcegos.

Na Colômbia, Gómez et al., (2018), demonstraram a presença de *H. capsulatum* em fertilizantes orgânicos utilizando Nested PCR. Em um total de 239 amostras coletadas: 201 (84,1%) corresponderam a fertilizantes orgânicos, 30 (12,5%) a excretas de aves e 8 (3,4%) a solos de cavernas. A PCR teve um limite de detecção de 0,1 pg/ μ l e uma especificidade de 100%. Um total de 25 (10,5%) amostras foram positivas e validadas por sequenciamento.

No Japão, Kikushi et al., (2008) realizaram uma pesquisa utilizando diferentes técnicas moleculares PCR, Nested PCR e qPCR em 3 diferentes laboratórios para detecção de *H. capsulatum* em 187 amostras de fezes de morcego coletadas em 67 cavernas; nenhum laboratório detectou o fungo.

Na tabela 2 é apresentada a detecção ambiental de *H. capsulatum* através da biologia molecular.

Autores/Local	Amostras	Método	Positividade
Reid & Schafer, 1999/ EUA	Solo com adição de esporos	Nested PCR	-
Kikushi et al., 2008/Japão	Solo de cavernas	Nested PCR/qPCR	0%
Moquet et al., 2012/Guiana Francesa	Solo	qPCR	12,90%
Norkaew et al., 2013/Tailândia	Solo de cavernas	Nested PCR	7,95%
	Solo com fezes de pombo	Nested PCR	4,76%
	Solo com fezes de galinha	Nested PCR	10,99%
Gómez et al., 2018/ Colômbia	Fertilizantes	Nested PCR	10,50%
Amorim- Conselheiro et al., 2019/Brasil	Fezes de morcego	qPCR	15,25%

TABELA 2. ESTUDOS DE DETECÇÃO AMBIENTAL DE *H. CAPSULATUM* POR BIOLOGIA MOLECULAR

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar o desenvolvimento de reação de qPCR (Real-time Polymerase Chain Reaction) para detecção de *H. capsulatum* em amostras de solo de grutas e cavernas do Município de Presidente Figueiredo.

3.2 Específicos

- Investigar desenvolvimento de conjunto de *primers* e sonda para detecção de *H. capsulatum* por qPCR
- Estudar a padronização e validação da reação de qPCR desenvolvida no presente estudo com amostras de DNA obtidas de cultura.
- Investigar a detecção de *H. capsulatum* em amostras de solo com a reação de qPCR desenvolvida

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Universo do estudo

O fluxo das atividades da presente dissertação é apresentado na Figura 1.

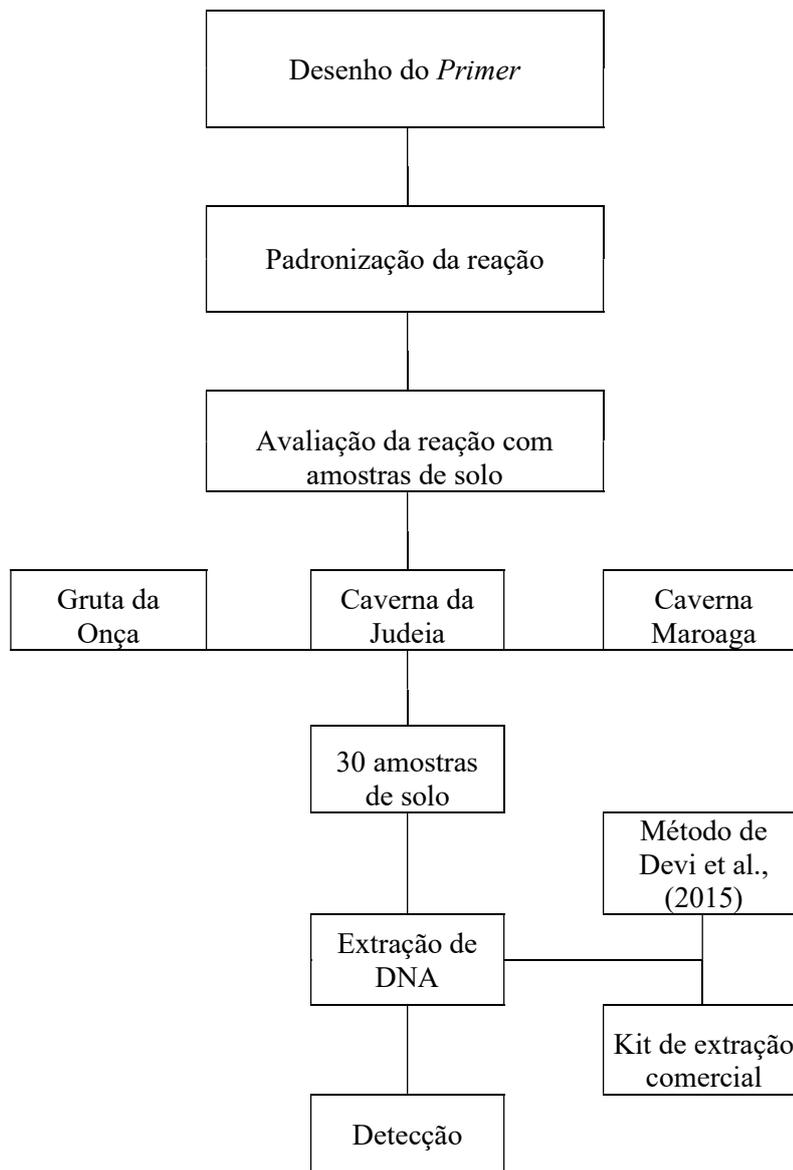


FIGURA 1. FLUXOGRAMA DOS PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS QUE FORAM REALIZADOS NO PRESENTE ESTUDO.

4.1.1 Cepas padrão

No presente estudo foi utilizado, como padrão na execução da curva padrão e controle positivo em todas as reações de qPCR, o DNA de dois isolados de *Histoplasma capsulatum*

(FMT3417 e FMT3342) oriundos da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas e depositados na Coleção de Microrganismos de Interesse Médico do INPA. Esses isolados tiveram seu DNA extraídos pela metodologia Blood Tissue e Invitrogen por Ivanete de Lima Sampaio em seu trabalho de dissertação intitulado “Seleção e otimização de protocolos para detecção de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* por reação em cadeia da polimerase” A utilização dessas amostras de DNA isolado está em conformidade com os preceitos do comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos (CNS 196/96), atualmente regulados pela Resolução CNS 466/2012. Sendo que este projeto foi aprovado no comitê de ética em pesquisa (CEP) da FMTAM (SAMPAIO, 2010).

Foram utilizados também, na avaliação da reação cruzada com outros microorganismos, DNA extraído pela metodologia de fenol clorofórmio das cepas dos fungos *Candida albicans* (LM 6222), *Cryptococcus neoformans* (LM 5428), *C. gattii* (LM 5424), *Aspergillus niger* (LM 01), *Fusarium oxysporum* (LM563) e também das Micobacterias *Mycobacterium abcessus*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium tuberculosis* da coleção de Microrganismos de Interesse Médico do INPA.

4.1.2 Amostras de solo

Foram solicitadas autorizações para coleta da Secretaria do Meio Ambiente de Presidente Figueiredo para as cavernas Maroaga e Judeia (Autorização número 011/2020) e para o proprietário da gruta da Onça (Memorando 02/2019/INPA).

As coletas foram realizadas nas cavernas Maroaga, Judeia e gruta da Onça localizadas no município de Presidente Figueiredo, de acordo com as coordenadas de GPS listadas na Tabela 11; dia 19 de fevereiro de 2020, utilizando luvas de procedimento, óculos de proteção, máscara N95, capa de proteção e botas plásticas.

A partir de um ponto espacial selecionado por conveniência foram coletadas 30 amostras da camada superficial do solo, no máximo 5 centímetros de profundidade, seguindo a linha natural das cavernas de acordo com a presença de poleiros de morcegos. Foram coletados diferentes tipos de solo (areia, terra preta) e sedimento (fezes de morcegos, material vegetal em decomposição, pedrisco). As amostras, com volume de 10 a 50 ml, dependendo da disponibilidade de volume no ambiente, pois as duas cavernas são alagadas e a gruta não dispõe em todo ponto de coleta de grande quantidade de solo, foram coletadas em frascos estéreis (tubos de Falcon) de 50 mL e mantidas em refrigeração -20° C até o processamento que foi realizado no Laboratório de Micologia do INPA.

4.2 PROCEDIMENTOS

4.2.1 Desenho de *primers* e sonda.

4.2.1.1 Análise *in silico* para definição da região gênica alvo de *H. capsulatum*

A região gênica alvo, ITS1 do DNA ribossomal de *H. capsulatum*, foi escolhida de acordo com os estudos de Buitrago et al., (2013) e Amorim-Conselheiro et al., (2019).

Foi realizada uma análise *in silico* do conjunto de *primers*/sonda utilizado por Buitrago et al., (2013), a fim de se verificar: a) a complementariedade dos mesmos sobre a região ITS1 do DNA ribossomal de *H. capsulatum*, na sequência consenso, a partir de diversas sequências gênicas de *H. capsulatum*, b) o tamanho do fragmento a ser amplificado por qPCR. Para isso, foi formado um painel de 99 sequências da região ITS1 do DNA ribossomal de *H. capsulatum*, obtidas do GenBank.

As 99 sequências ITS1 de *H. capsulatum* foram analisadas em software Geneious (versão 8.1.8). As sequências dos *primers* (HcITS-54F e HcITS-204R) e sonda (HcITS-155), utilizadas no estudo de Buitrago et al., (2013), foram inseridas para teste *in silico* na sequência consenso após o alinhamento (Figura 2 e 3).

Pelo alinhamento foi possível verificar a existência de variações nucleotídicas em sequências de *H. capsulatum*, inclusive em locais de hibridização do *primer* reverse HcITS-204R e da sonda HcITS-155. Também foi possível constatar que o tamanho do produto da PCR com os *primers* HcITS-54F e HcITS-204R seria de 154 pares de bases (pb).

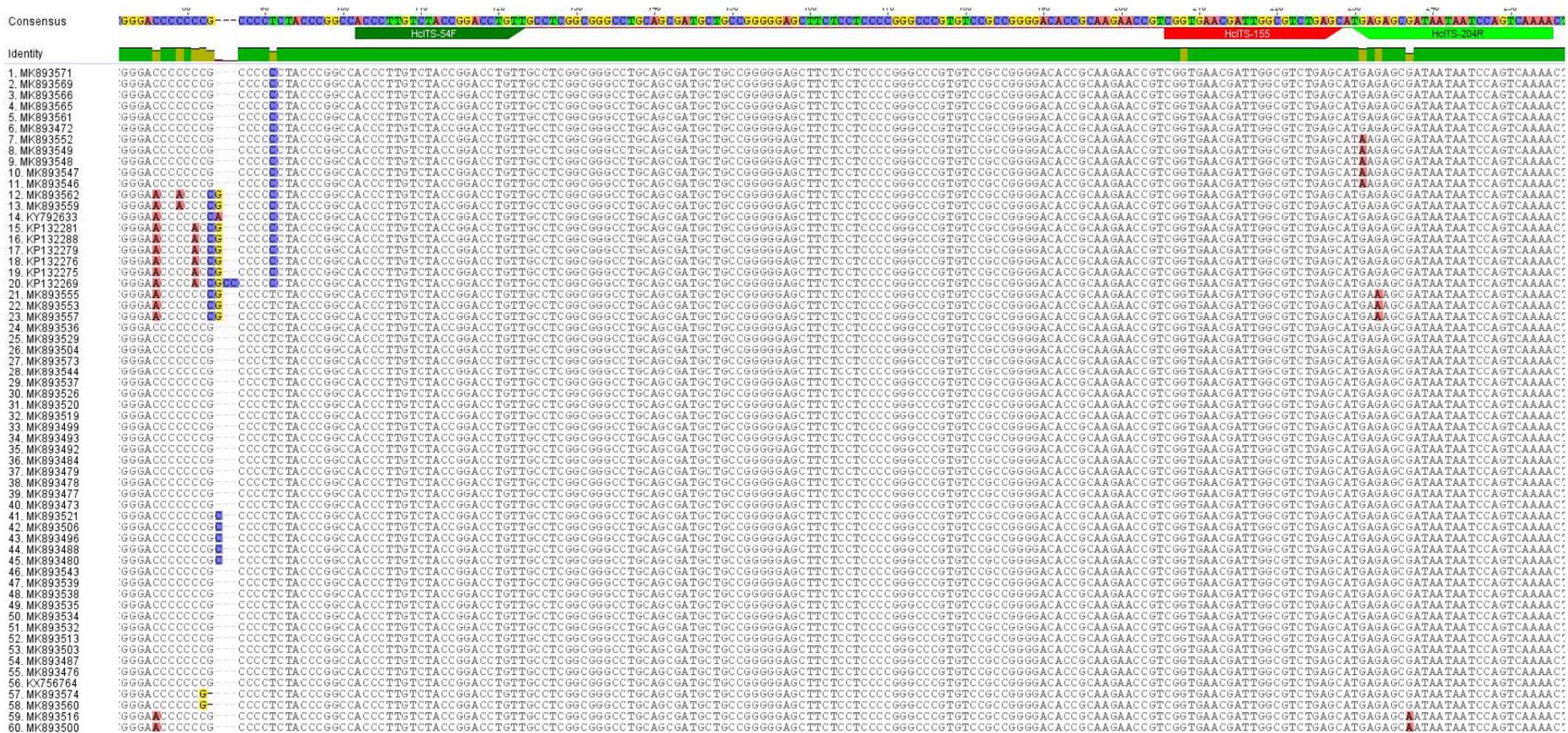


FIGURA 2. ALINHAMENTO DE 99 SEQUÊNCIAS DA REGIÃO ITS1 DO DNA RIBOSSOMAL DE *H. CAPSULATUM*

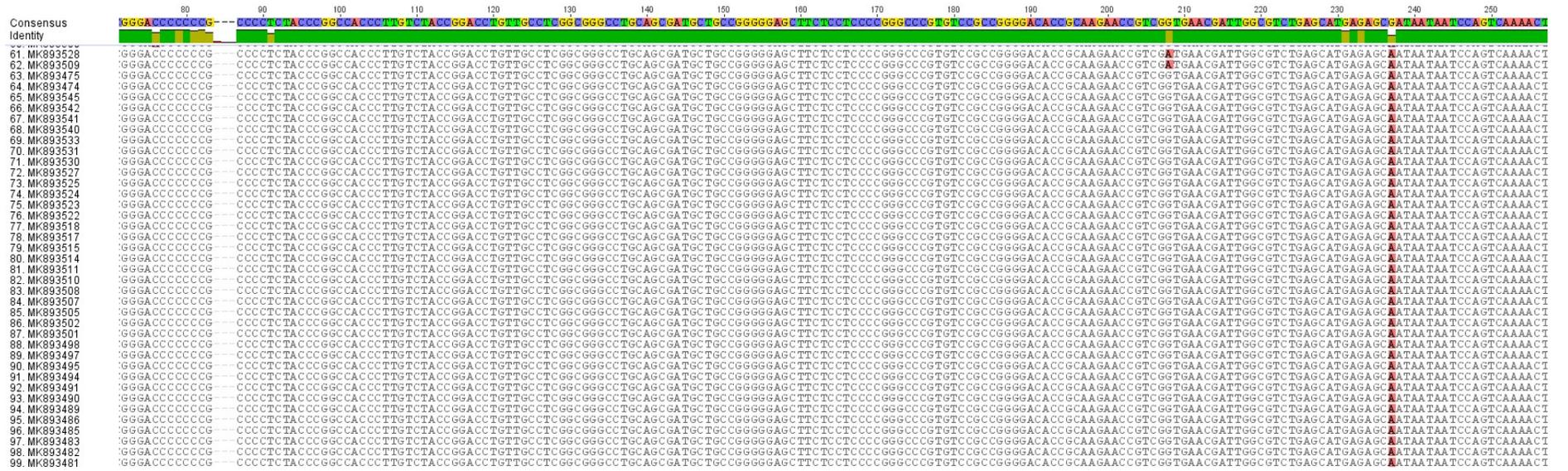


FIGURA 3. ALINHAMENTO DE 99 SEQUÊNCIAS DA REGIÃO ITS1 DO DNA RIBOSSOMAL DE *H. CAPSULATUM* (CONTINUAÇÃO).

4.2.1.2 Desenho de novo conjunto *primers* e sonda de hidrólise para *H. capsulatum*

Diante das variações nucleotídicas observadas na região ITS de diversos isolados de *H. capsulatum*, optou-se por desenhar novos *primers* e sonda de hidrólise para a detecção de *H. capsulatum* por qPCR.

Quatro novos conjuntos de *primers* e sonda de hidrólise foram gerados pelo software Geneious, a fim de se obter um tamanho de produto de PCR entre 80-130 pb e para se hibridizarem à região mais conservada da sequência ITS de *H. capsulatum* (Figura 4).

As sequências dos novos *primers*, temperatura de *melting* (TM), porcentagem de guanina (G) e citosina (C), e tamanhos dos *amplicons*, estão descritos na Tabela 3, onde; MGB: *Minor Groove Binder*; NFQ: *Non-Fluorescent Quencher*.

Identificação	Sequência 5'® 3'	Tm	% GC	<i>Amplicon</i> (pares de base)
HcITS-106F	<u>TTGTCTACCGGACCTGTTGC</u>	60,0	55,0	100 pb
HcITS-205R	ACGGTTCTTGCGGTGTCC	60,0	61,1	
HcITS-106F	<u>TTGTCTACCGGACCTGTTGC</u>	60,0	55,0	101 pb
HcITS-206R	GACGGTTCTTGCGGTGTCC	61,3	63,2	
HcITS-106F	<u>TTGTCTACCGGACCTGTTGC</u>	60,0	55,0	102 pb
HcITS-207R	CGACGGTTCTTGCGGTGTC	61,7	63,2	
HcITS-106F	<u>TTGTCTACCGGACCTGTTGC</u>	60,0	55,0	102 pb
HcITS-207R'	CGACGGTTCTTGCGGTGT	60,7	61,1	
HcITS-127P	6FAM-TCGGCGGGCCTGCAGCGA-MGB-NFQ	69,7	77,8	-

TABELA 3. CONJUNTOS DE PRIMERS E SONDA PARA DETECÇÃO DE *HISTOPLASMA CAPSULATUM* GERADOS PELO SOFTWARE GENEIOUS.

A região sublinhada do *primer* HcITS-106F compartilha a sequência do *primer* HcITS-54F, utilizada no estudo de Buitrago et al., (2013).

Para o presente estudo, o conjunto de *primers*/sonda HcITS-106F/HcITS-205R/HcITS-127P foi escolhido para síntese.

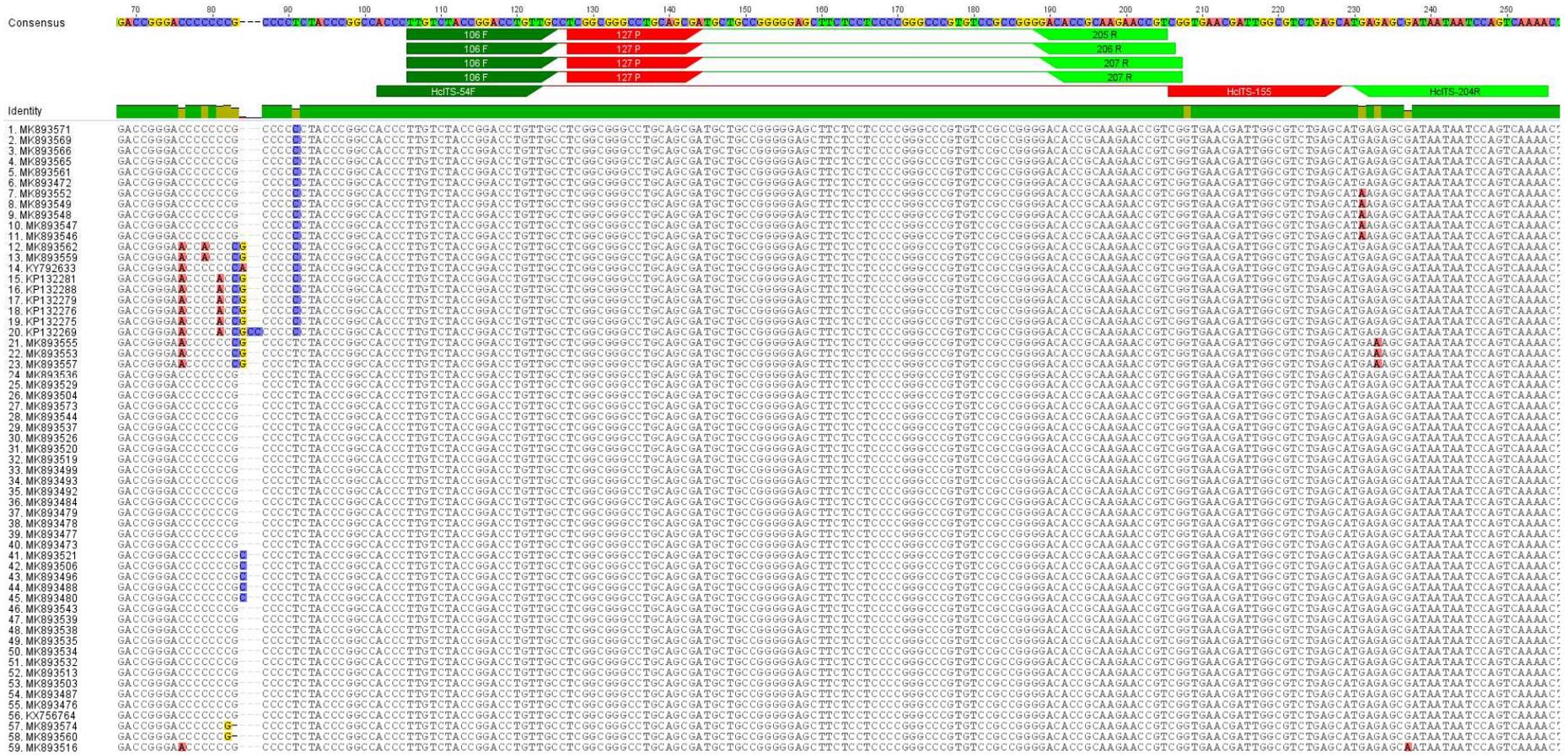


FIGURA 4. CONJUNTOS DE PRIMERS E SONDA PARA A REGIÃO CONSERVADA DE ITS DO DNA RIBOSSOMAL GERADOS PELO SOFTWARE GENIEUS.

4.2.1.3 Primers e sonda para o gene da beta-actina

Com o objetivo de monitorar a extração de ácidos nucleicos até a análise final dos dados, o gene da beta-actina foi eleito como controle interno da reação (CI). O fragmento amplificado deste gene, juntamente ou não, com as sequências alvo ITS de *H. capsulatum*, valida as reações para o fungo. A ausência do *amplicon* de beta-actina indica a presença de inibidores da qPCR ou falhas nos procedimentos durante o processo pré-analítico e analítico. Assim, com base na sequência nucleotídica do gene da beta-actina, foram desenhados um par de *primers* e uma sonda marcada com o fluoróforo VIC, específicos para esse gene (Tabela 4).

Identificação	Sequência 5'® 3'	Tm	% GC	<i>Amplicon</i> (pares de base)
B-act 862F	GCACTCTTCCAGCCTTCCTT	60,0	55,0	111 pb
B-act 972R	GTTGGCGTACAGGTCTTTGC	59,8	55,0	
B-act 884P	VIC-TGGGCATGGAGTCCTGTGGCA-MGB-NFQ	66,2	61,9	-

TABELA 4. PRIMERS E SONDA DO GENE DA BETA-ACTINA ELEITO PARA CONTROLE INTERNO DA REAÇÃO.

4.2.2 qPCR

A qPCR foi realizada de acordo com a metodologia apresentada no artigo de Amorim-Conselho et al., (2019) com modificações, seguindo as instruções do fabricante, e visando a região ITS1 do DNA ribossomal de *H. capsulatum*. A sequência alvo foi amplificada em uma reação final de 12µl contendo 1X Maxima Probe Master Mix qPCR (2X) (Thermo Fisher Scientific, EUA), 0,2 µM de cada *primer*, 0,2 µM de sonda e 2µL de DNA extraído da amostra.

A qPCR foi realizada usando um termociclador QuantStudio 3 do Laboratório de Micobacteriologia do INPA, gerando *amplicons* de 100 pares de base de comprimentos da sequência do DNA ribossômico do *Histoplasma capsulatum*. Controles positivo (DNA do *H. capsulatum*) e negativo (água MiliQ) foram incluídos em cada ensaio qPCR. O DNA humano foi usado como controle exógeno. Sendo gene β-actina o controle interno.

4.2.3 Padronização da reação de qPCR desenvolvida

4.2.3.1 Curva padrão

Foi realizada diluição do DNA *H. capsulatum* (Cepa FTM 1437) a partir da concentração de 11ng/µL para 1,1ng, 0,11 ng, 0,011 ng, 0,0011 ng, 0,00011 ng (110 fg) em

água MiliQ; para a construção de uma curva padrão e os pontos de cruzamento (ciclo limiar ou cycle threshold -ct) foram obtidos para calcular o número de cópias para cada qPCR a ser realizada. A reação de qPCR foi realizada como descrito no item 4.2.2; utilizando 2 µL do DNA diluído e a beta-actina como controle interno. A eficiência da reação e cálculo do R² foram calculados pelo software QuantStudio™ Design & Analysis Software 1.3.1.

O limite de detecção foi determinado pela menor concentração de DNA que cruzou o ciclo limiar.

4.2.3.2 Determinação do erro experimental

O erro experimental foi calculado a partir de três diluições seriadas do controle positivo, DNA de *H. capsulatum* (Cepa FMT 1347) de 1,1 ng para 0,11 ng e 0,011 ng/µL em tubos eppendorf com água MiliQ. Uma corrida de qPCR foi realizada com 4 réplicas experimentais de cada uma das 3 concentrações como descrito no item 4.2.2., utilizando o controle interno beta-actina, no mesmo dia, utilizando o mesmo lote de reagentes e preparadas por um único operador. Em seguida foram calculadas medias e desvio padrão, que foi calculado com a equação $s = \sqrt{\frac{1}{n} \sum (Y_i - y_v)^2}$, sendo n= número de amostras, Y_i = media dos resultados das amostras e y_v = resultado da amostra.

4.2.3.3 Avaliação de reações cruzadas com amostras de DNA de cultura de cepas padrão

Para estudar a possibilidade de reações cruzadas *in vitro* com outros microorganismos foram realizados conforme padronizado, reações de qPCR foram realizadas contemplando DNA na concentração de 20 ng dos fungos *Candida albicans* (LM 6222), *Cryptococcus neoformans* (LM 5428), *Cryptococcus gatti* (LM 5424), *Aspergillus niger* (LM 01), um mix de Dna dos fungos citados, *Fusarium oxysporum* (LM 563), DNA das micobacterias *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium tuberculosis* e DNA de *H. capsulatum*. As amostras de fungos também foram testadas em PCR com primer para ITS (Pan fungal) para conferir a presença de DNA amplificável.

4.2.3.4 Definição de sensibilidade e especificidade frente a amostras sabidamente contaminadas com DNA de cultura de *H. capsulatum*

Para definir a sensibilidade e especificidade da metodologia, 2 amostras de DNA de *H. capsulatum* (cepas FMT 3417 e 3342) foram diluídas em água MiliQ em diferentes concentrações de 20 ng, 2 ng e 0,2 ng/ μ L, cada amostra foi diluída em triplicata em cada uma das 3 concentrações somando 9 diluições de cada cepa e 18 diluições no total. Estas diluições mais outras 18 amostras negativas (água MiliQ) foram submetidas a análise pela qPCR desenvolvida de acordo com o item 4.2.2, utilizando a beta-actina como controle interno. Sendo que o operador que executou a qPCR desconhecia quais amostras eram positivas ou negativas. As amostras e suas concentrações estão listadas na tabela 9.

Foram feitos os cálculos de sensibilidade (S) e especificidade (E) abaixo com os dados da tabela 5.

$$S = \text{Verdadeiro Positivo VP} / (\text{Verdadeiro Positivo -VP} + \text{Falso negativo- FN}) \times 100$$

$$E = \text{Verdadeiro negativo/Verdadeiro Negativo} + \text{Falso positivo}) \times 100$$

Teste	Presença de DNA	
	Positivo	Negativo
Positivo	VP	FP
Negativo	FN	VN

TABELA 5. RELAÇÃO DA PRESENÇA DE DNA COM O RESULTADO DO TESTE

4.2.4 Reação com as amostras de solo de cavernas e grutas de Presidente Figueiredo

No estudo da reação de qPCR desenvolvida frente a amostras de solo, 30 amostras de solo oriundos de grutas de Presidente Figueiredo analisadas. As amostras foram coletadas de diferentes cavernas (Onça, Maroaga e Judeia) e foram extraídas com duas metodologias distintas de extração de DNA de solo, uma comercial (Purelink-Invitrogen) e a metodologia descrita por Devi et al. 2015, as duas específicas para extração de DNA de solo e com o objetivo de conter os inibidores da PCR comuns nas amostras de solo.

4.2.4.1 Extração com metodologia desenvolvida por Devi et al., (2015) com modificações

Com uso de luvas e máscara facial, foi moído vidro de laboratório esterilizado e quebrado com pilão e almofariz até tornar-se um pó fino. 0,5 g do pó dE vidro foi transferido para microtubo de 2ml com 0,5 g de amostra de solo. Foi adicionado 0,5 mL de tampão de

extração de DNA [100 mM Tris, 100 mM EDTA, 1,5 M NaCl (pH 8)] e 5 mg de carvão ativado em pó à mistura de vidro e solo e o tubo foi submetido ao vortex por 5 minutos. O tubo foi incubado a 65° C por 10 min em banho seco e, em seguida, centrifugado a 12.000 g por 5 min. Foram transferidos 250 µl do sobrenadante para um novo tubo de microcentrifuga de 2 ml. Foram adicionados ao sobrenadante 50 µL de acetato de sódio [3M (pH 5,2)] e 200 µL de PEG [30% (MW-8000)] previamente autoclavados a 121°C por 15 minutos e resfriados à temperatura ambiente. A mistura foi colocada para precipitar a -20°C durante 20 minutos. E descongelada lentamente e depois centrifugada a 12.000 g, 5 min. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento suspenso com 200 µl de tampão TE autoclavado (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8). Foi adicionado 200 µL da mistura clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e centrifugada a 12.000 g durante 5 min. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo e adicionados 200 µl de isopropanol gelado. Foi permitido precipitar durante 5 min e foi centrifugada a 12.000 g durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 100 µl etanol a 70% e centrifugado a 12.000 g durante 2 min. O sobrenadante foi descartado e sedimento foi seco ao ar e dissolvido em 50 µL de tampão TE (pH 8).

4.2.4.2 Extração com Kit comercial Purelink (Invitrogen)

O procedimento foi executado de acordo com as instruções do fabricante Invitrogen (2015) à temperatura ambiente (20–25 ° C).

Preparo do lisado: Foram adicionados 600 µl de S1 (Lysis Buffer) ao tubo de esferas. Em seguida foram adicionadas 0,2 ± 0,05 g de solo, os tubos foram bem tampados e depois submetidos ao vortex. Em seguida foram adicionados 100 µL de S2 (Lysis Enhancer), o tubo foi bem tampado e agitado rapidamente no vórtex e incubado a 65 ° C por 10 minutos. E em seguida homogeneizado horizontalmente por 10 minutos na velocidade máxima no misturador vortex e posteriormente foi centrifugado a 14.000 × g por 5 minutos. Em seguida até 400 µL do sobrenadante foram transferidos para um tubo de microcentrifuga limpo com cuidado para evitar a transferência da camada de detritos que se forma sobre o pelet de esferas. Foram adicionados 250 µl de S3 (Cleanup Buffer) e o tubo foi agitado no vortex imediatamente para garantir uma dispersão uniforme do S3 e precipitação uniforme dos inibidores. Em seguida foi incubado no gelo por 10 minutos e centrifugado a 14.000 × g por 1 minuto e cerca de 500 µL do sobrenadante foi transferido para um tubo de microcentrifuga limpo, evitando o sedimento.

Ligação do DNA à coluna: Foram adicionados 900 µl de S4 (Binding Buffer) e o tubo foi agitado no vórtex brevemente. Em seguida foram adicionados 700 µL da mistura da amostra

em um conjunto de tubo de coluna de centrifugação e centrifugados a $14.000 \times g$ por 1 minuto; o fluxo foi descartado e restante da amostra foi adicionado ao de tubo de coluna de centrifugação e centrifugados a $14.000 \times g$ por 1 minuto; a coluna foi inspecionada para certificar se toda a mistura da amostra tinha passado para o tubo de coleta, se a amostra permanecia na coluna, nova centrifugação $14.000 \times g$ por 1 minuto foi feita.

Lavagem e eluição do DNA: coluna de centrifugação foi adicionada em um tubo de coleta limpo, e foram adicionados 500 μ l de S5 (Wash Buffer) e o conjunto da coluna de centrifugação foram centrifugados a $14.000 \times g$ por 1 minuto, em seguida, o fluxo foi descartado e conjunto do tubo da coluna de rotação foi centrifugado o a $14.000 \times g$ por 30 segundos; uma segunda centrifugação foi realizada para otimizar a remoção do S5 (Wash Buffer). Em seguida a coluna de centrifugação foi adicionada à um tubo limpo, e foram adicionados adicione 100 μ L de S6 (Elution Buffer) e incubado em temperatura ambiente por 1 minuto e o conjunto do tubo da coluna de rotação foi centrifugado a $14.000 \times g$ por 1 minuto e depois coluna foi descartada e o DNA purificado ficou no tubo, pronto para uso e foi armazenado a -20°C .

4.2.4.3 Reação de qPCR com as amostras de solo

Para avaliação da concentração e qualidade das amostras DNA de solo obtidas das duas metodologias de extração distintas foi utilizada a espectrofotometria. A concentração do DNA foi verificada através de leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm, assumiu-se que uma unidade de absorbância correspondeu a 50 $\mu\text{g/ml}$ de DNA. Para determinação do grau de pureza do DNA, foram realizadas também leituras em comprimento de onda 280 nm, e calculada a razão entre as absorbâncias 260/280.

Foi realizada qPCR como descrito no item 4.2.2, usando a beta-actina como controle interno.

5 RESULTADOS

Os resultados do presente trabalho estão na forma de artigo, que será submetida à revista *Iberoamericana de Micologia*.

Desenvolvimento de reação de qPCR para detecção de *Histoplasma capsulatum*

BIANCA KELLY NEVES IZIDRO DA SILVA¹, SILVIANE BEZERRA³, ANA C. A. CORTEZ², MAURÍCIO MORISHI OGUSKU², JOÃO V. B. SOUZA,²

¹PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM.
AV. GENERAL RODRIGO OCTAVIO JORDÃO, 1200, 69067-005, AMAZONAS, BRASIL.

²DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA MÉDICA, INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA. AV.
ANDRÉ ARAÚJO, 2936, 69080-971, AMAZONAS, BRASIL.

³COLEÇÃO DE MICRORGANISMO DE INTERESSE MÉDICO, INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA. AV. ANDRÉ ARAÚJO, 2936, 69080-971, AMAZONAS, BRASIL.

E-MAIL: JOÃO V. B. D. SOUZA; JOAO.SOUZA@INPA.GOV.BR

Resumo

Histoplasma capsulatum é um fungo encontrado no ambiente que causa uma micose profunda, que se apresenta de forma assintomática à disseminada. Na forma disseminada acomete principalmente pacientes com AIDS. Na América do Sul, essa enfermidade é uma das três principais que levam o paciente com AIDS a óbito. Apesar destes fatos poucos estudos avaliaram sua distribuição ambiental. Este estudo tem como objetivo o desenvolvimento de reação de qPCR para detecção de *H. capsulatum* em amostras de solo de grutas e cavernas do Município de Presidente Figueiredo. Como resultados, foi desenvolvido um novo par de primers e sonda para detecção de *H. capsulatum* para uso em PCR e PCR em tempo real (qPCR) tendo como alvo a região ITS do DNAr. O desenho desenvolvido demonstrou *in silico* ser tão ou mais adequado que outras propostas de primers e sonda. O novo conjunto de primers e sonda foram adequados para a detecção do DNA de *H. capsulatum* obtido de culturas. O conjunto demonstrou resultados satisfatórios quanto ao limite de detecção (10 fg/μL), curva padrão adequada (r^2 0,97), baixo erro experimental, ausência de reação cruzada com outros organismos patogênicos e sensibilidade e especificidade adequados. Os experimentos aplicando o novo

conjunto de *primers* e sonda em 30 amostras de solo de grutas/cavernas do Município de Presidente Figueiredo demonstraram a presença de DNA de *H. capsulatum* em somente uma amostra. O novo conjunto propicia outra opção mais abrangente quanto as cepas catalogadas. Enquanto demonstração do fungo nas amostras de solo reafirma a necessidade de manter os cuidados recomendados em cavernas e grutas onde há morcegos.

Palavras chaves: qPCR, *H. capsulatum*, desenvolvimento.

1. Introdução

A histoplasmose é causada pelo *Histoplasma capsulatum*, fungo dimórfico que se apresenta na forma filamentosa no ambiente e como levedura no organismo hospedeiro (LINDER & KAUFFMAN, 2019). Segundo Haldar et al., (2017), a histoplasmose é uma doença granulomatosa e suas manifestações clínicas podem ser classificadas de acordo com o local (pulmonar, extrapulmonar ou disseminado), duração da infecção (aguda e crônica) e padrão de infecção (primária e reativação).

A histoplasmose é amplamente distribuída pelo mundo sendo endêmica em parte dos Estados Unidos da América (EUA), na América Central e América do Sul. Casos também são reportados na África, Oceania e Europa (BAHR et al., 2015; BROWN et al., 2018). No entanto, o aumento da importância epidemiológica dessa doença aconteceu devido a pandemia do HIV (NACHER et al., 2013; WHEAT, 2016). No Brasil, Giacomazzi et al., (2016) observaram incidência de 2,19 hospitalizações por histoplasmose a cada 1000 hospitalizações. Silva et al., (2017) observaram prevalência de histoplasmose disseminada de 4,4% e letalidade de 71,3% em pacientes com AIDS.

A infecção por *H. capsulatum* inicia-se com a inalação de microconídios e outros propágulos infecciosos distribuídos no ambiente (BEERS, 2011). Portanto, a pesquisa desse agente em amostras ambientais é importante (TAYLOR, STOIANOFF, FERREIRA, 2013; ROCHA-SILVA et al., 2014). No entanto, apesar de surtos e casos isolados fornecerem dados sobre a distribuição da doença (OLIVEIRA, 2014; BENEDICT & MODY, 2016; CORREIA et al., 2016), poucos estudos pesquisaram a presença desse agente no ambiente. Entre os estudos com amostras ambientais deve-se destacar aqueles que fizeram uso de cobaias, como os realizados por Emmons (1949) e Zeidberg et al., (1952) nos Estados Unidos da América. Mais recentemente, destacam-se os estudos conduzidos por metodologias moleculares devido a velocidade, sensibilidade e a não necessidade do uso de cobaias como os estudos realizados por

Kikushi et al., (2008) no Japão, Moquet et al., (2012) na Guiana Francesa e Norkaew et al., (2013) na Tailândia.

No Amazonas há relatos de turistas infectados em cavernas próximas à Manaus (SUZAKI et al., 1995) e detecção de mamíferos infectados com o fungo na região de Balbina (NAIFF et al., 1996). Menescal et al., (2019) observou 89 casos de histoplasmose em 7 anos de pesquisa com pacientes com HIV/AIDS, com óbito em 55% dos casos. Souza et al., (2008) verificaram a histoplasmose como causa de óbito em 13% dos pacientes com AIDS necropsiados.

O presente estudo desenvolveu *primers* e sondas visando a região ITS1 do DNA ribossomal de *H. capsulatum* com o objetivo de aumentar a abrangência de variações genéticas de *H. capsulatum*, utilizou métodos de validação da metodologia que verificaram em teste *in silico* ser tão adequado que outras propostas de *primers* e sonda; foram adequados para a detecção do DNA de *H. capsulatum* obtido de culturas, demonstrou resultados satisfatórios quanto limite de detecção, curva padrão adequada, baixo erro analítico e ausência de reação cruzada com outros organismos patogênicos. E em experimentos com 30 amostras de solo de grutas/cavernas do Município de Presidente Figueiredo demonstraram a presença de DNA de *H. capsulatum* em somente uma amostra. Assim esta metodologia pode ser validada após mais estudos e pode ser utilizada na detecção ambiental do fungo assim como no diagnóstico clínico.

2 Material e métodos

2.1 Cepas padrão

No presente estudo foi utilizado, como padrão na execução da curva padrão e controle positivo em todas as reações de qPCR, o DNA de dois isolados de *Histoplasma capsulatum* (FMT3417 e FMT3342) oriundos da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas e depositados na Coleção de Microrganismos de Interesse Médico do INPA. Esses isolados tiveram seu DNA extraídos pela metodologia Blood Tissue e Invitrogen por Ivanete de Lima Sampaio em seu trabalho de dissertação intitulado “Seleção e otimização de protocolos para detecção de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* por reação em cadeia da polimerase”. A utilização dessas amostras de DNA isolado está em conformidade com os preceitos do comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos (CNS 196/96). Sendo que este projeto foi aprovado no comitê de ética em pesquisa (CEP) da FMTAM (SAMPAIO, 2010).

Foram utilizados também, na avaliação da reação cruzada com outros microorganismos, DNA extraído pela metodologia de fenol clorofórmio das cepas dos fungos *Candida albicans*

(LM 6222), *Cryptococcus neoformans* (LM 5428), *C. gattii* (LM 5424), *Aspergillus niger* (LM 01), *Fusarium oxysporum* (LM563) e também das Micobacterias *Mycobacterium abcessus*, *Mycobacterium chelonae* *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium tuberculosis* da coleção de Microorganismos de Interesse Médico do INPA.

2.2 Amostras de solo

As coletas foram realizadas nas cavernas Maroaga, Judeia e gruta da Onça localizadas no município de Presidente Figueiredo, de acordo com as coordenadas de GPS listadas na tabela 5; dia 19 de fevereiro de 2020, utilizando luvas de procedimento, óculos de proteção, máscara N95, capa de proteção e botas plásticas.

A partir de um ponto espacial selecionado por conveniência foram coletadas amostras da camada superficial do solo, no máximo 5 centímetros, seguindo a linha natural das cavernas de acordo com a presença de poleiros de morcegos. Foram coletados diferentes tipos de solo (areia, terra preta) e sedimento (fezes de morcegos, material vegetal em decomposição, pedrisco). As amostras foram coletadas em frascos estéreis (tubos tipo Falcon) de 50 mL e mantidas em refrigeração -20° C até o processamento que foi realizado no Laboratório de Micologia do INPA.

2.3 Desenho dos *primers* e sonda

2.3.1 Análise *in silico* para definição da região gênica alvo de *H. capsulatum*

A região gênica alvo, ITS1 do DNA ribossomal de *H. capsulatum*, foi escolhida de acordo com os estudos de Buitrago et al., (2013) e Amorim-Conselheiro et al., (2019).

Foi realizada uma análise *in silico* do conjunto de *primers*/sonda utilizado por Buitrago et al., (2013), a fim de se verificar: a) a complementariedade dos mesmos sobre a região ITS1 do DNA ribossomal de *H. capsulatum*, na sequência consenso, a partir de diversas sequências gênicas de *H. capsulatum*, b) o tamanho do fragmento a ser amplificado por qPCR. Para isso, foi formado um painel de 99 sequências da região ITS1 do DNA ribossomal de *H. capsulatum*, obtidas do GenBank.

As 99 sequências ITS1 de *H. capsulatum* foram alinhadas em software Geneious (versão 8.1.8). As sequências dos *primers* (HcITS-54F e HcITS-204R) e sonda (HcITS-155), utilizadas

no estudo de Buitrago et al., (2013), foram inseridas para teste *in silico* na sequência consenso após o alinhamento (Figura 5 e 6).

2.3.3 Primers e sonda para o gene da beta-actina

Com o objetivo de monitorar a extração de ácidos nucleicos até a análise final dos dados, o gene da beta-actina foi eleito como controle interno da reação (CI). O fragmento amplificado deste gene, juntamente ou não, com as sequências alvo ITS de *H. capsulatum*, valida as reações para o fungo. A ausência do *amplicon* de beta-actina indica a presença de inibidores da qPCR ou falhas nos procedimentos durante o processo pré-analítico e analítico. Assim, com base na sequência nucleotídica do gene da beta-actina, foram desenhados um par de *primers* e uma sonda marcada com o fluoróforo VIC, específicos para esse gene (Tabela 5).

Identificação	Sequência 5' - 3'	Tm	% GC	<i>Amplicon</i> (pares de base)
B-act 862F	GCACTCTTCCAGCCTTCCTT	60,0	55,0	111 pb
B-act 972R	GTTGGCGTACAGGTCTTTGC	59,8	55,0	
B-act 884P	VIC-TGGGCATGGAGTCCTGTGGCA-MGB-NFQ	66,2	61,9	-

TABELA 6. PRIMERS E SONDA DO GENE DA BETA-ACTINA ELEITO PARA CONTROLE INTERNO DA REAÇÃO.

2.4 Padronização da reação de qPCR desenvolvida

A qPCR foi realizada de acordo com a metodologia apresentada no artigo de Amorim-Conselho et al., (2019) com modificações, seguindo as instruções do fabricante, e visando a região ITS1 do DNA ribossomal de *H. capsulatum*. A sequência alvo foi amplificada em uma reação final de 12µl contendo 1X Maxima Probe Master Mix qPCR (2X) (Thermo Fisher Scientific, EUA), 0,2 µM de cada *primer*, 0,2 µM de sonda e 2µL de DNA extraído da amostra.

A qPCR foi realizada usando um termociclador QuantStudio 3 do Laboratório de Micobacteriologia do INPA, gerando *amplicons* de 100 pares de base de comprimentos da sequência do DNA ribossômico do *Histoplasma capsulatum*. Controles positivo (DNA do *H. capsulatum*) e negativo (água MiliQ) foram incluídos em cada ensaio qPCR. O DNA humano foi usado como controle exógeno. Sendo gene β -actina o alvo externo.

2.4.1 Curva padrão

Foi realizada diluição do DNA *H. capsulatum* (Cepa FTM 1437) a partir da concentração de 11ng/μL para 1,1ng, 0,11 ng, 0,011 ng, 0,0011 ng, 0,00011 ng (110 fg) em água MiliQ; para a construção de uma curva padrão (Figura 9) e os pontos de cruzamento (ciclo limiar ou cycle threshold -ct) foram obtidos para calcular o número de cópias para cada qPCR a ser realizada. A reação de qPCR foi realizada como descrito no item 2.4; utilizando 2 μL do DNA diluído e a beta-actina como controle interno. A eficiência da reação e cálculo do R² foram calculados pelo software QuantStudio™ Design & Analysis Software 1.3.1.

O limite de detecção foi determinado pela menor concentração de DNA que cruzou o ciclo limiar.

2.4.2 Cálculo do erro experimental

O erro experimental foi calculado a partir de três diluições seriadas do controle positivo, DNA de *H. capsulatum* (Cepa FMT 1347) de 1,1 ng para 0,11 ng e 0,011 ng/μL em tubos eppendorf com água MiliQ. Uma corrida de qPCR foi realizada com 4 réplicas de cada uma das 3 concentrações como descrito no item 2.4, utilizando o controle interno beta-actina, no mesmo dia, utilizando o mesmo lote de reagentes e preparadas por um único operador. Em seguida foram calculadas medias e desvio padrão, que foi calculado com a equação $s = \sqrt{\frac{1}{n} \sum (Y_i - y_v)^2}$, sendo n= número de amostras, Y_i = media dos resultados das amostras e y_v = resultado da amostra.

2.4.3 Avaliação de reações cruzadas com amostras de DNA de cultura de cepas padrão

Para estudar a possibilidade de reações cruzadas *in vitro* com outros microorganismos foram realizados conforme padronizado, reações de qPCR foram realizadas contemplando DNA dos fungos *Candida albicans* (LM 6222), *Cryptococcus neoformans* (LM 5428), *Cryptococcus gatti* (LM 5424), *Aspergillus niger* (LM 01), um mix de Dna dos fungos citados, *Fusarium oxysourum* (LM 563), DNA das micobactérias *Mycobacterium abcessus*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium tuberculosis* e DNA de *H. capsulatum*. As amostras de fungos também foram testadas em PCR com *primer* para ITS (Pan fungal) para conferir a presença de DNA amplificável.

2.4.4 Definição de sensibilidade e especificidade frente a amostras sabidamente contaminadas com DNA de cultura de *H. capsulatum*

Para definir a sensibilidade e especificidade da metodologia, 2 amostras de DNA de *H. capsulatum* (cepas FMT 3417 e 3342) foram diluídos em água MiliQ em diferentes concentrações de 20 ng, 2 ng e 0,2 ng/ μ L, cada amostra foi diluída em triplicata em cada uma das 3 concentrações somando 9 diluições de cada cepa e 18 diluições no total. Estas diluições mais outras 18 amostras negativas (água MiliQ) foram submetidas a análise pela qPCR desenvolvida de acordo com o item 2.4, utilizando a beta-actina como controle interno. Sendo que o operador que executou a qPCR desconhecia quais amostras eram positivas ou negativas.

Foram feitos os cálculos de sensibilidade e especificidade abaixo:

$$\text{Sensibilidade} = \text{Verdadeiro Positivo} / (\text{Verdadeiro Positivo} + \text{Falso negativo}) \times 100$$

$$\text{Especificidade} = \text{Verdadeiro negativo} / (\text{Verdadeiro Negativo} + \text{Falso positivo}) \times 100$$

2.5 Análise de amostras de solo de cavernas e grutas de Presidente Figueiredo

A reação de qPCR desenvolvida foi avaliada frente a amostras de solo, 30 amostras de solo oriundos de grutas de Presidente Figueiredo analisadas. As amostras foram coletadas de diferentes cavernas e gruta (Onça, Maroaga e Judeia) e seu DNA foi extraído com duas metodologias distintas, uma comercial (Purelink-Invitrogen) e a metodologia descrita por Devi et al. (2015), as duas específicas para extração de DNA de solo.

3. Resultados

3.1 Desenho dos *primers* e sondas

As 99 sequências ITS1 de *H. capsulatum* foram alinhadas em software Geneious (versão 8.1.8). As sequências dos *primers* (HcITS-54F e HcITS-204R) e sonda (HcITS-155), utilizadas no estudo de Buitrago et al., (2013), foram inseridas para teste *in silico* na sequência consenso após o alinhamento (Figura 5 e 6).

Pelo alinhamento foi possível verificar a existência de variações nucleotídicas em sequências de *H. capsulatum*, inclusive em locais de hibridização do *primer* reverse HcITS-204R e da sonda HcITS-155. Também foi possível constatar que o tamanho do produto da PCR com os *primers* HcITS-54F e HcITS-204R seria de 154 pares de bases (pb).

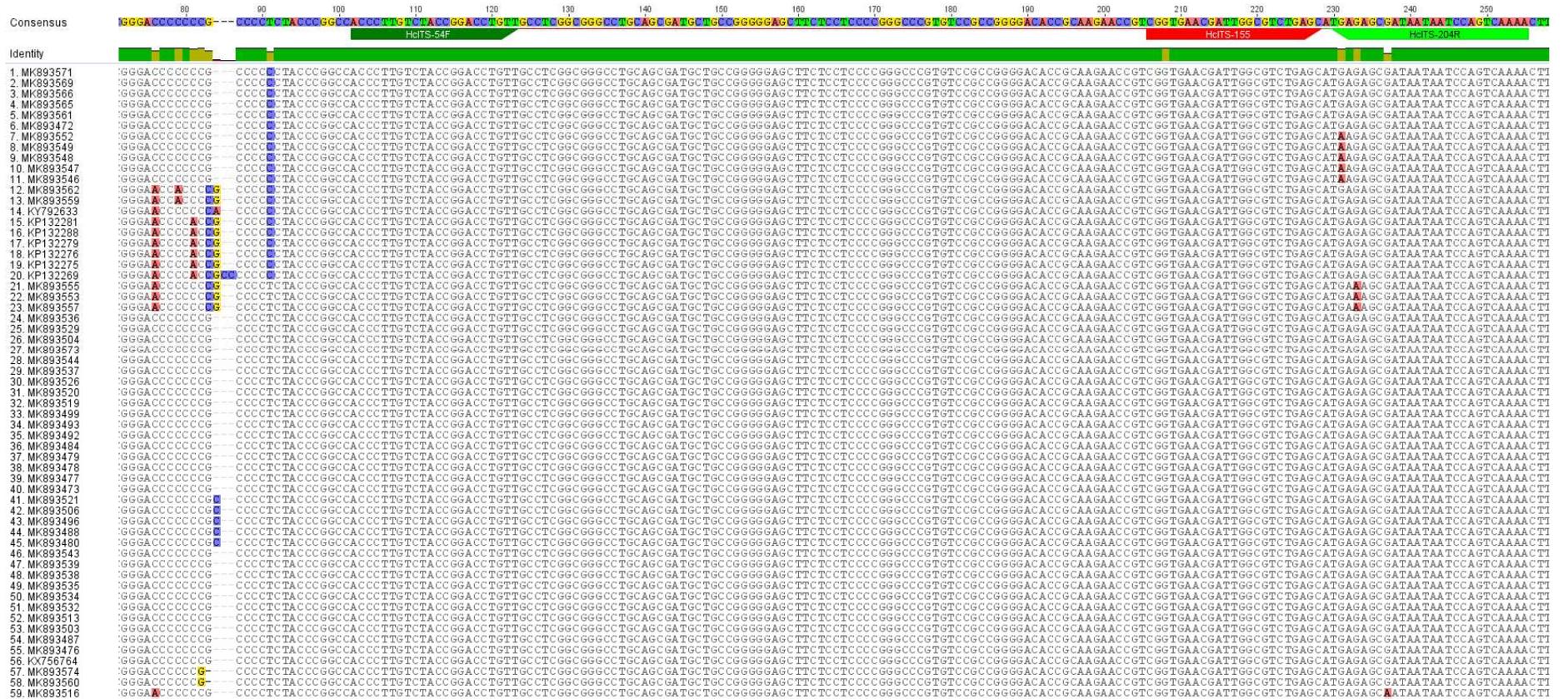


FIGURA 5. ALINHAMENTO DE 99 SEQUÊNCIAS DA REGIÃO ITS1 DO DNA RIBOSSOMAL DE *H. CAPSULATUM*.

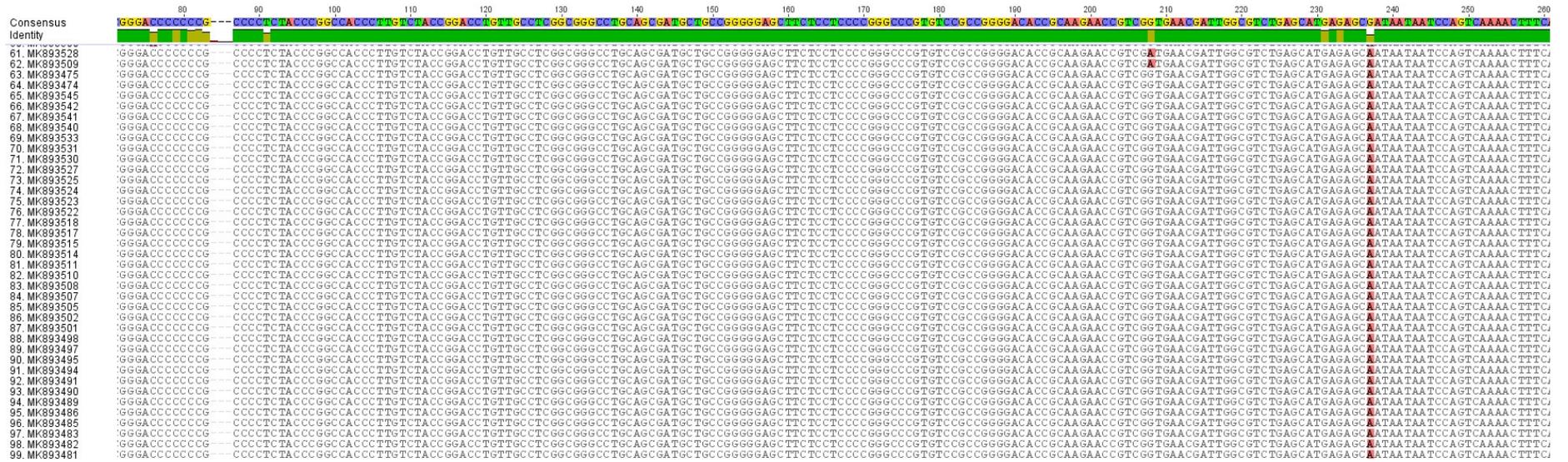


FIGURA 6. ALINHAMENTO DE 99 SEQUÊNCIAS DA REGIÃO ITS1 DO DNA RIBOSSOMAL DE *H. CAPSULATUM* (CONTINUAÇÃO)

Desenho de novo conjunto *primers* e sonda de hidrólise para *H. capsulatum*

Diante das variações nucleotídicas observadas na região ITS de diversos isolados de *H. capsulatum*, optou-se por desenhar novos *primers* e sonda de hidrólise para a detecção de *H. capsulatum* por qPCR.

Quatro novos conjuntos de *primers* e sonda de hidrólise foram gerados pelo software Geneious, a fim de se obter um tamanho de produto de PCR entre 80-130 pb e para se hibridizarem à região mais conservada da sequência ITS de *H. capsulatum* (Figura 7).

As sequências dos novos *primers*, temperatura de *melting* (T_m), porcentagem de guanina (G) e citosina (C), e tamanhos dos *amplicons*, estão descritos na Tabela 7, onde; MGB: *Minor Groove Binder*; NFQ: *Non-Fluorescent Quencher*.

Identificação	Sequência 5' - 3'	T _m	% GC	<i>Amplicon</i> (pares de base)
HcITS-106F	<u>TTGTCTACCGGACCTGTTGC</u>	60,0	55,0	100 pb
HcITS-205R	ACGGTTCTTGCGGTGTCC	60,0	61,1	
HcITS-106F	<u>TTGTCTACCGGACCTGTTGC</u>	60,0	55,0	101 pb
HcITS-206R	GACGGTTCTTGCGGTGTCC	61,3	63,2	
HcITS-106F	<u>TTGTCTACCGGACCTGTTGC</u>	60,0	55,0	102 pb
HcITS-207R	CGACGGTTCTTGCGGTGTC	61,7	63,2	
HcITS-106F	<u>TTGTCTACCGGACCTGTTGC</u>	60,0	55,0	102 pb
HcITS-207R'	CGACGGTTCTTGCGGTGT	60,7	61,1	
HcITS-127P	6FAM-TCGGCGGGCCTGCAGCGA- MGB-NFQ	69,7	77,8	-

TABELA 7. CONJUNTOS DE *PRIMERS* E SONDA PARA DETECÇÃO DE *HISTOPLASMA CAPSULATUM* GERADOS PELO SOFTWARE GENEIOUS

A região sublinhada do *primer* HcITS-106F compartilha a sequência do *primer* HcITS-54F, utilizada no estudo de Buitrago et al., (2013).

Para o presente estudo, o conjunto de *primers*/sonda HcITS-106F/HcITS-205R/HcITS-127P foi escolhido para síntese.

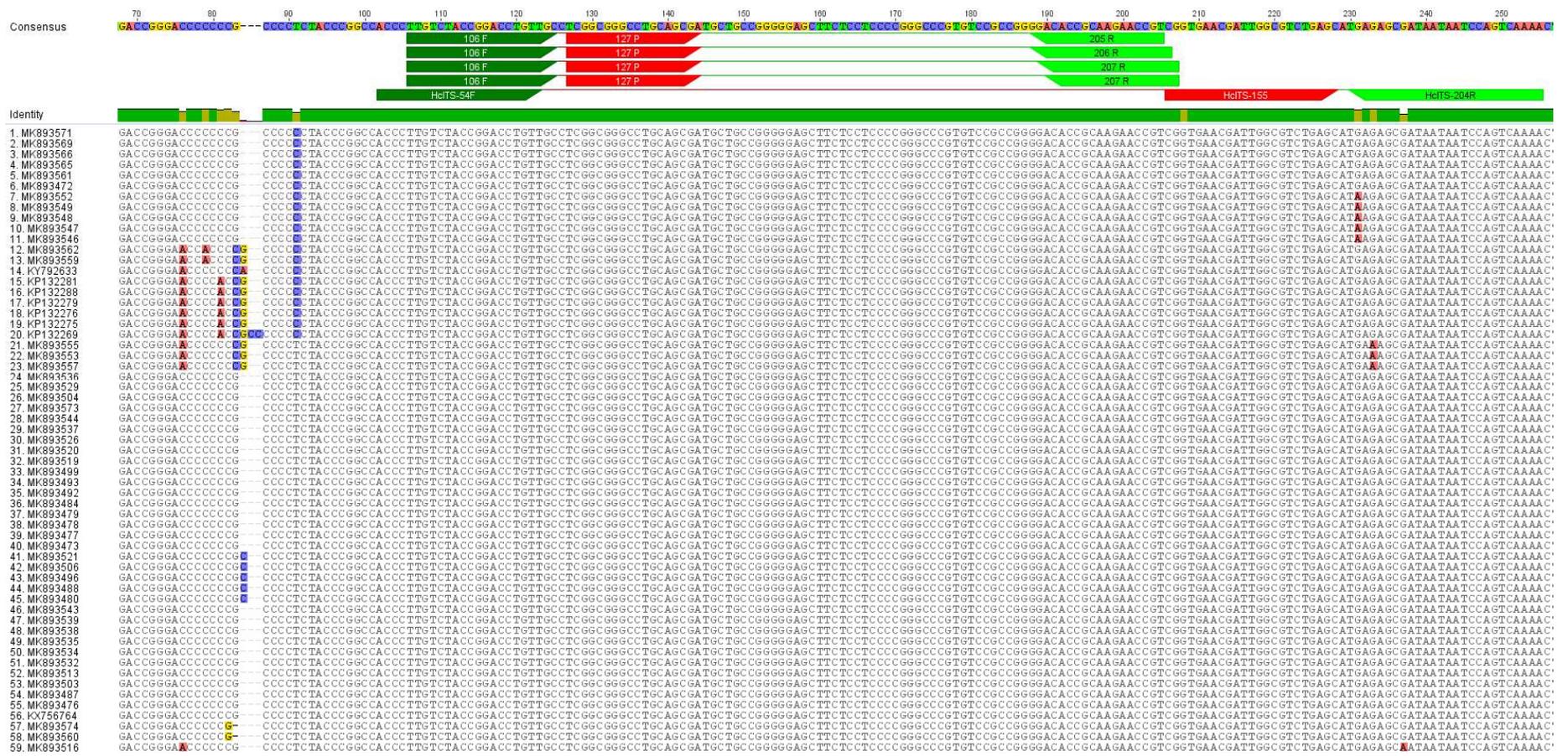


FIGURA 7. CONJUNTOS DE PRIMERS E SONDA PARA A REGIÃO CONSERVADA DE ITS DO DNA RIBOSSOMAL DE *H. CAPSULATUM* GERADOS PELO SOFTWARE GENEIOUS.

3.2 Padronização das reações de PCR em tempo real

3.2.1 - Curva padrão

Com o objetivo de avaliar a cinética de reação e a qualidade dos *primers* e sonda, as eficiências e correlações lineares (R^2) das reações de amplificação foram avaliadas. Para tanto, foram construídas curvas padrão (Figura 9) usando 2 μL de diluições decimais seriadas (11 ng a 110 fg de DNA de *H. capsulatum*/ μL) dos controles positivos FMT3417. A eficiência para o conjunto de sonda e *primers* para o *Histoplasma capsulatum* foi 92,31% e a correlação (R^2) 0,97 (Figura 9).

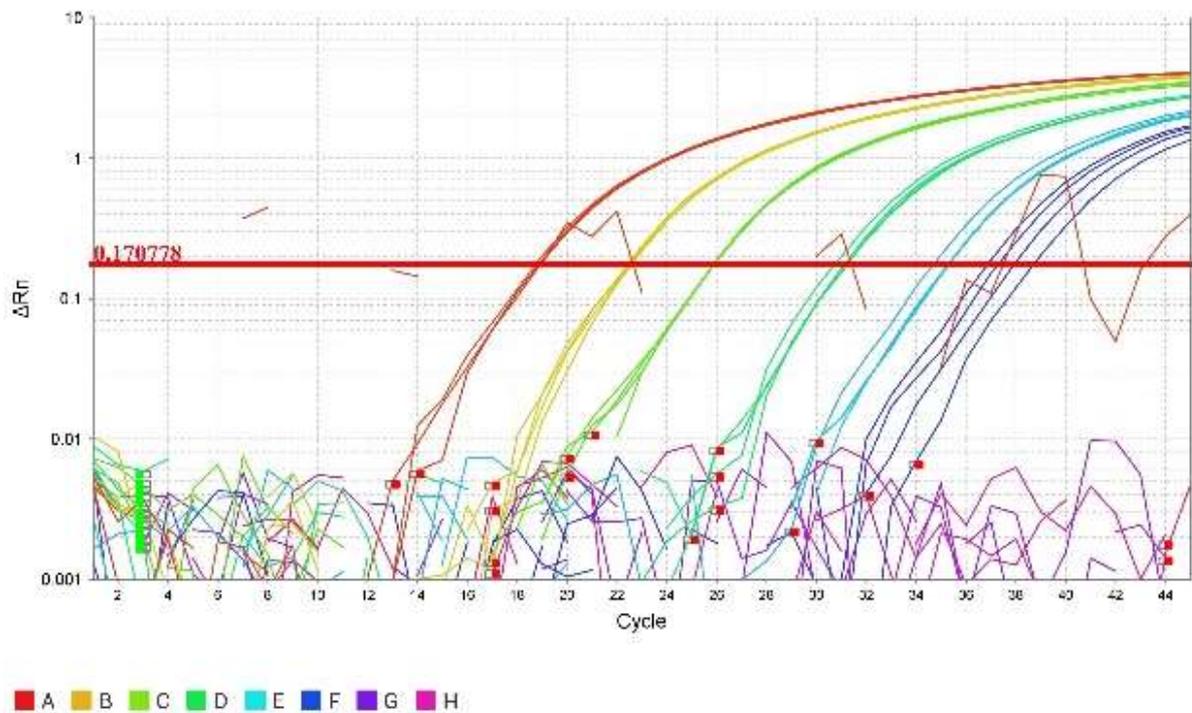


FIGURA 8. CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO COM AMOSTRAS EM QUADRUPLICATA DE DILUIÇÕES EM SERIE DE 10 VEZES CORRESPONDENDO A 11 NG (A), 1,1 NG (B), 0,11 NG (C), 0,011 NG (D) E 0,0011 (E) E 0,00011 NG (110 FG) DE DNA DE *H. CAPSULATUM*/ μL ; COM DOIS CONTROLES NEGATIVOS (G E H).

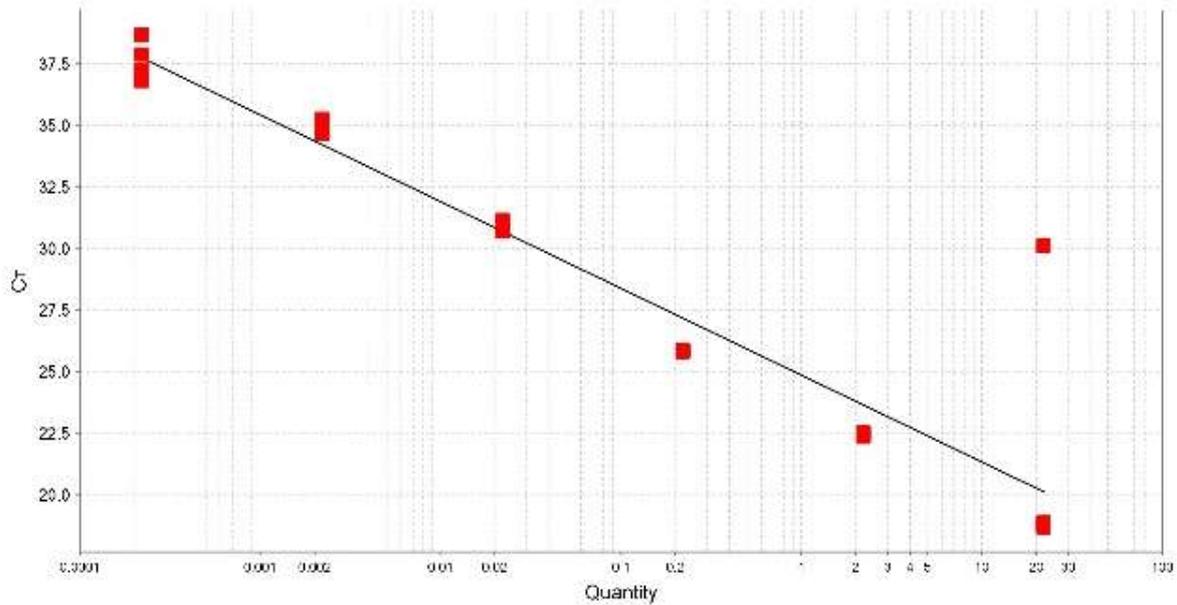


FIGURA 9. CURVA PADRÃO PARA *H. CAPSULATUM*, COM R^2 : 0,97; SLOPE: -3,521; EFICIÊNCIA: 92,31%, REPRESENTANDO A REGRESSÃO LINEAR PARA CICLO LIMAR (CYCLETHRESHOLD-Ct) VERSUS QUANTIDADE DE DNA (NG) POR CADA 2 μ L USADOS EM CADA DE REAÇÃO.

Foram realizados experimentos com concentrações mais baixas de DNA que foram capazes de amplificar até reações de 10 fg/ μ L de uma forma mais instável e assumimos esse como limite de detecção da reação.

3.2.2 – Cálculo do erro experimental

O erro experimental foi calculado a partir de três diluições seriadas do controle positivo, DNA de *H. capsulatum* (Cepa FMT 3342) de 1,1 ng para 0,11 ng e 0,01 ng/ μ L em microtubos com água MiliQ em corrida de qPCR realizada com 4 réplicas de cada uma das 3 concentrações como descrito no item 2.4, utilizando o controle interno beta-actina, utilizando o mesmo lote de reagentes e preparadas por um único operador, tem seus resultados assim como de medias e desvio padrão exibidos na tabela 8.

Concentração (ng/ μ L)/ cepa	Ct Ensaio 1	Ct Ensaio 2	Ct Ensaio 3	Ct Ensaio 4	Ct Médio	Desvio Padrão	% Erro experimental
1,1/ (FMT 3342)	22,34446	22,52621	22,47459	22,40644	22,448	0,094	0,417218
0,11/ (FMT 3342)	25,82078	25,8575	25,79805	25,81154	25,825	0,030	0,116164
0,01/(FMT 3342)	31,11742	31,13474	31,13474	31,04158	31,129	0,010	0,032118

TABELA 8. RESULTADOS DO ENSAIO CÁLCULO DO ERRO EXPERIMENTAL.

3.2.3 Amplificação de DNA de cultura de cepas padrão: verificação de reações cruzadas

Para estudar a possibilidade de reações cruzadas *in vitro* com outros microorganismos foram realizados conforme padronizado, reações de qPCR contemplando DNA na concentração de 20 ng dos fungos *Candida albicans* (LM 6222), *Criptococcus neoformans* (LM 5428), *CrYptococcus gatti* (LM 5424), *Aspergillus niger* (LM 01), um mix de Dna dos fungos citados, *Fusarium oxysourum* (LM 563), DNA das micobacterias *Mycobacterium abcessus*, *Mycobacterium chelonae* *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium tuberculosis* e DNA de *H. capsulatum*. As amostras de fungos também foram testadas em PCR com primer para ITS (Pan fungal) para conferir a presença de DNA amplificável.

As reações não apresentaram reatividade cruzada com os fungos e micobactérias testados e o DNA de *H. capsulatum* assim como o DNA alvo apresentaram curva de detecção. Resultados estão na tabela 9.

Amostras	PCR ITS (Pan Fungal)	qPCR
DNA de cultura <i>C. albicans</i> (LM 6222)	+	Negativo
DNA de cultura <i>C. neoformans</i> (LM 5428)	+	Negativo
DNA de cultura <i>C. gattii</i> (LM 5424)	+	Negativo
DNA cultura de <i>Aspergillus niger</i> (LM 01)	+	Negativo
DNA cultura de <i>Fusarium oxysporum</i> (LM 5634)	+	Negativo
DNA da cultura de <i>Candida albicans</i> , <i>C. neoformans</i> e <i>Aspergillus niger</i>	+	Negativo
DNA de cultura de <i>Mycobacterium abcessus</i> *	NR	Negativo
DNA de cultura de <i>Mycobacterium chelonae</i> *	NR	Negativo
DNA de cultura de <i>Mycobacterium fortuitum</i> *	NR	Negativo
DNA de cultura de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> *	NR	Negativo
DNA de cultura de <i>H. capsulatum</i> (FMT 34 17)	+	Positivo
DNA de cultura de <i>H. capsulatum</i> (FMT 3342)	+	Positivo

NR - Reação não realizada. *DNA extraído e identificado pela metodologia de Leão et al., 2004.

TABELA 9. RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DE REAÇÕES CRUZADAS COM FUNGOS QUE PODEM ESTAR PRESENTES EM AMOSTRAS CLÍNICAS E NO MEIO AMBIENTES INTERFERINDO NA ESPECIFICIDADE DA REAÇÃO.

3.2.4 Avaliação da sensibilidade e especificidade da qPCR frente a amostras contaminadas com DNA de cultura de *H. capsulatum*

Na definição da sensibilidade e especificidade da metodologia, 2 amostras de DNA de *H. capsulatum* (cepas FMT 3417 e 3342) foram diluídos em água MiliQ em diferentes

concentrações de 20 ng, 2 ng e 0,2 ng/ μ L, cada amostra foi diluída em triplicata em cada uma das 3 concentrações somando 9 diluições de cada cepa e 18 diluições no total. Estas diluições mais outras 18 amostras negativas (água MiliQ) foram submetidas a análise pela qPCR. Foram feitos os cálculos de sensibilidade e especificidade. Os resultados dos testes de sensibilidade e especificidade foram de 100% (Tabela 10).

Teste	Presença de DNA	
	Positivo	Negativo
Positivo	18	0
Negativo	0	18

TABELA 10. RESULTADOS DA RELAÇÃO DA PRESENÇA DO DNA COM O RESULTADO DO TESTE

3.2.5 Avaliação da ferramenta com amostras de solo das cavernas de Presidente Figueiredo

Com a finalidade de avaliar a reação de qPCR desenvolvida frente a amostras de solo, 30 amostras de solo oriundas de grutas de Presidente Figueiredo analisadas. As amostras foram coletadas de diferentes cavernas e foram extraídas com duas metodologias distintas de extração de DNA de solo. Os resultados podem ser vistos na tabela 11.

Amostra	Caverna	Coodenadas do GPS	Extração Purelink	Extração Devi et al (2015)
1	Maroaga	2°02'42.0"S 59°59'36.9"W	Negativo	Negativo
2	Maroaga	2°02'42.1"S 59°59'36.5"W	Negativo	Negativo
3	Maroaga	2°02'41.9"S 59°59'36.9"W	Negativo	Negativo
4	Maroaga	2°02'41.5"S 59°59'37.4"W	Negativo	Negativo
5	Maroaga	2°02'41.8"S 59°59'37.0"W	Negativo	Negativo
6	Maroaga	2°02'41.9"S 59°59'36.9"W	Positivo	Negativo
7	Maroaga	2°02'41.8"S 59°59'36.7"W	Negativo	Negativo
8	Maroaga	2°02'41.8"S 59°59'37.0"W	Negativo	Negativo
9	Maroaga	2°02'42.0"S 59°59'36.9"W	Negativo	Negativo
10	Maroaga	2°02'41.7"S 59°59'36.6"W	Negativo	Negativo
1	Onça	2°02'42.0"S 59°59'37.0"W	Negativo	Negativo
2	Onça	2°03'10.2"S 59°58'04.8"W	Negativo	Negativo
3	Onça	2°03'09.9"S 59°58'04.6"W	Negativo	Negativo
4	Onça	2°03'11.1"S 59°58'04.8"W	Negativo	Negativo
5	Onça	2°03'10.3"S 59°58'04.6"W	Negativo	Negativo

6	Onça	2°03'10.7"S 59°58'05.0"W	Negativo	Negativo
7	Onça	2°03'11.1"S 59°58'04.5"W	Negativo	Negativo
8	Onça	2°03'10.7"S 59°58'04.7"W	Negativo	Negativo
9	Onça	2°03'10.3"S 59°58'04.5"W	Negativo	Negativo
10	Onça	2°03'10.0"S 59°58'04.8"W	Negativo	Negativo
1	Judeia	1°59'13.2"S 60°03'34.7"W	Negativo	Negativo
2	Judeia	1°59'12.4"S 60°03'34.4"W	Negativo	Negativo
3	Judeia	1°59'11.4"S 60°03'35.7"W	Negativo	Negativo
4	Judeia	1°59'11.6"S 60°03'35.5"W	Negativo	Negativo
5	Judeia	1°59'11.5"S 60°03'35.5"W	Negativo	Negativo
6	Judeia	1°59'11.7"S 60°03'35.5"W	Negativo	Negativo
7	Judeia	1°59'11.6"S 60°03'35.2"W	Negativo	Negativo
8	Judeia	1°59'12.0"S 60°03'35.3"W	Negativo	Negativo
9	Judeia	1°59'11.7"S 60°03'35.7"W	Negativo	Negativo
10	Judeia	1°59'12.5"S 60°03'36.5"W	Negativo	Negativo

TABELA 11. LOCALIZAÇÃO POR GRUTA/CAVERNA E POR GPS DAS AMOSTRAS COLETADAS EM PRESIDENTE FIGUEIREDO E OS RESULTADOS DA QPCR.

4 Discussão

No presente trabalho foi desenvolvido um novo par de *primers* e sonda para detecção *H. capsulatum* para uso em tempo real (qPCR) tendo como alvo a região ITS do DNAr. O desenho desenvolvido demonstrou *in silico* ser tão ou mais adequado que outras propostas de *primers* e sonda. O novo conjunto de *primers* e sonda foram adequados para a detecção do DNA de *H. capsulatum* obtido de culturas. O conjunto de *primers* e sonda demonstrou resultados satisfatórios quanto limite de detecção, curva padrão adequada, baixo erro experimental, ausência de reação cruzada com outros organismos patogênicos e sensibilidade e especificidade adequados. Os experimentos aplicando o novo conjunto de *primers* e sonda em 30 amostras de solo de grutas/cavernas do Município de Presidente Figueiredo demonstraram a presença de DNA de *H. capsulatum* em uma amostra de solo. Esses resultados fornecem nova opção de detecção do fungo *H. capsulatum* com bons resultados que pode ser usado para diagnóstico clínico, assim como na detecção ambiental.

O uso das metodologias moleculares tem se tornado cada vez mais frequentes no diagnóstico pois existem vários microrganismos como o *H. capsulatum* de difícil e prolongada detecção por cultivo e de acordo com Vasconcellos et al., (2020) têm o potencial de facilitar a rotina diagnóstica de histoplasmose em muitas circunstâncias. Este estudo foi o primeiro a aplicar a metodologia de qPCR em amostras ambientais da região Norte para detecção de *H.*

capsulatum. Essas amostras pertencentes a cavernas e gruta do município de Presidente Figueiredo revelaram a presença do fungo *H. capsulatum*.

Este estudo que utilizou *primers* e sonda desenvolvidos a partir do banco de dados BLAST (NCBI) e testados do software de alinhamento Geneious, nos levou a uma nova reação como opção para estudos ambientais como também clínicos. Existem outras alternativas de alvo na região do ITS para os *primers* para qPCR como os utilizados por Martagon-Vilamil et al., (2002), Buitrago et al., (2013) e Amorim-Conselheiro et al., (2019) que estudaram outras sequencias do alvo HC Its do RNA_r (Tabela 12).

Autor, ano	Primer qPCR	Sequências dos primers e sonda
Buitrago et al., 2006	Hcits 1-1 Hcits 1-2 Probes	5'-CCACCCTTGTCTACC-3' 5'-GGAACCAAGAGATCCGT-3' HC1-Fluos 5'GTCGGTGAACGATTGGCGT3'- LCFluorescein HC1-Red 5'LCRED640- GAGCATGA GAGCGATAATAATCCAGT3'- (Tibmolbiol)
Simon et al., 2009	HcITS-167F HcITS-229R HcITS-188P	5'-AACGATTGGCGTCTGAGCAT-3' 5'-GAGATCCGTTGT T GAAAGTTTTGA-3' 5'-6-FAM-AGAGCGATAATAATCC-MGB-3'.
Buitrago et al., 2013	HcITS-54F HcITS-204R HcITS-155	5'-ACCCTTGTCTACCGGACCTGTT-3' 5'-TTTTGACTGGATTATTATCGCTCTCA-3' 5-FAM-CGGTGAACGATTGGCGTCTGAGC- TAMRA-3'
Conselheiro et al., 2019	HcITS-54F HcITS-204R HcITS-155	5'-ACCCTTGTCTACCGGACCTGTT-3' 5'-TTTTGACTGGATTATTATCGCTCTCA-3' 5'-FAM-CGGTGAACGATTGGCGTCTGAGC- TAMRA-3'
Estudo atual, 2021	HcITS-106F HcITS-205R HcITS-127P	5'-TTGTCTACCGGACCTGTTGC-3' 5'-ACGGTTCCTTGGCGGTGCC-3' 5'-FAMTCGGCGGGCCTGCAGCGA-MGB-3'

TABELA 12. ESTUDOS REALIZADOS COM QPCR COM ALVO NA REGIÃO ITS DO *H. CAPSULATUM*.

O desenho do *primer* foi desenvolvido para região ITS do *H. capsulatum* tendo como referência os *primers* e sonda descritas por Buitrago et al., (2013) e Amorim-Conselheiro et al., (2019) com modificações ao desenho destes, com o objetivo de aumentar sensibilidade, pois o desenho inicial em avaliação *in silico* por meio de comparação de sequencias no banco de dados público BLAST não contemplava todas as variações genéticas encontradas. Foi realizado o alinhamento das sequencias de Its do DNA do *H. capsulatum* no software Geneious, amplamente utilizado. O alinhamento apresentou ausência de discrepâncias entre as sequencias

de DNA de *H. capsulatum* analisadas, ou seja, os *primers* e sonda seriam capazes de amplificar todos as amostras de DNA de *H. capsulatum* testadas, diferente dos *primers* utilizados pelos autores acima. Após desenho também foi realizada uma avaliação *in silico* por meio da comparação das sequências dos *primers* e sondas com sequencias de banco de dados públicos disponíveis, a fim de verificar as similaridades com outros organismos.

A qPCR com os *primers* e sonda desenhados apresentou limite de detecção de 10fg de DNA/ μ L. Este resultado (10fg) é satisfatório e similar a outros ensaios de qPCR utilizados em rotina laboratorial; mesmo encontrado por Buitrago et al., 2013 que comparou protocolos de PCR, dentre eles duas qPCR para detecção de *H. capsulatum* que apresentaram sensibilidade para concentrações de 10 fg do DNA alvo/ μ L assim como Simon et al., 2010). Lopez et al., 2017 desenvolveu qPCR que alcançou sensibilidade de 1 fg de DNA/ μ L, assim como Gago et al., 2014, que apresentou qPCR com limite de detecção de 1fg/ μ L. Como esperado os resultados foram superiores a pesquisas com Nested PCR, como o estudo de Moquet et al., (2013) que encontrou limite de detecção de 1 pg e Gomez et al., (2018) que alcançou limite de detecção de 0,1 pg/ μ L de DNA.

A curva padrão para o conjunto de *primers* e sondas desenvolvido no presente trabalho apresentou slope -3,521, eficiência 92,31% e coeficiente de regressão, $R^2 = 0,97$, o que está de acordo com esperado conforme o fabricante Apliebiosystem (2015) que preconiza eficiência de 100% que corresponde a um valor amplificação de exponencial de 2, indicando a duplicação do DNA molde a cada ciclo; slope 3,32 e $R^2 = 1$, valor que indica um ajuste perfeito entre a linha de regressão os pontos de dados. O que mostra que a reação testada é adequada para detecção do *H. capsulatum* em amostras clínicas e ambientais. Simon et al (2010) encontrou slope de -3,35 e R^2 de 0,998848. Enquanto Kikushi et al., (2008) observou $R^2 = 0,999$ e Lopez et al., (2017) obteve $R^2 > 0,99$.

No experimento que avaliou o erro experimental, os desvios padrão foram menores que 1% do valor médio. Esse tipo de erro experimental baixo é esperado nesse tipo de equipamento.

Os experimentos para testagem de reação cruzada dos *primers* com o DNA de amostras de outros microorganismos, foi realizado com outros fungos patogênicos, fungos do ambiente que podem ser contaminantes da reação e com micobactérias que promovem doença com sintomas similares ao da histoplasmose. Os resultados foram os mesmos observados em trabalhos prévios com qPCR, como Babady et al., (2011) que descreveu ausência de detecção frente a outros microorganismos assim como nos experimentos executados por Simon et al., (2010) Babady et al., (2011), Koempell et al., (2012) e Lopez et al., (2017)

No experimento de avaliação de sensibilidade e especificidade utilizando-se 18 amostras sabidamente positivas e 18 amostras sabidamente negativas e dois operadores distintos onde um preparou as amostras e o segundo analisou as amostras; a sensibilidade e especificidade alcançadas foram de 100%. Esse resultado era esperado e similar ao encontrado em outras pesquisas como Babady et al., (2011) que encontrou sensibilidade de 94,5%; Martagon-Vilamil et al., (2002) e Lopes et al., (2017) que alcançaram 100 % de sensibilidade.

Nas condições experimentais a reação de qPCR foi positiva para *H capsulatum* em 1 das 30 amostras de solo avaliadas. Possivelmente os resultados foram mascarados pela presença de ácidos húmicos no solo que inibem reação de PCR. As metodologias de extração devem ser aperfeiçoadas com mais etapas para retirada dos inibidores da PCR para posterior uso. A detecção do fungo neste ambiente de turismo e lazer, sugere que este pode ser um local de infecção e possível surto futuro portanto medidas de precaução e informação podem ser tomadas como prevenção; como já ocorre no presente, algumas áreas com maior número de morcegos têm circulação restrita.

Além de confirmar a presença do fungo *H. capsulatum* na caverna Maroaga, o que eleva a importância das medidas de segurança que mantem o distanciamento das pessoas dos ambientes mais frequentados pelos morcegos, já disseminadas nessa caverna; que permite a entrada de pessoas até 50 m adentro; assim como proíbe a entrada na caverna da lateral esquerda devido a presença de grande quantidade de morcegos.

Na tabela 13 temos estudos de detecção ambiental de *H. capsulatum* por biologia molecular, que vem sendo empregada com frequência atualmente em pesquisas de microrganismos de difícil ou inatingível cultivo, ganhando cada vez mais importância pelos resultados positivos.

Autor, ano/Local	Amostras	Metodologia/ Alvo do primer	Positividade
Reid & Schafer, 1999/ EUA	Solo com adição de esporos	Nested PCR/HcITS 5.8S	-
Kikushi et al., 2008/Japão	Solo de cavernas	Nested PCR /HC 100 qPCR/HcITS	0%
Moquet et al., 2012/ Guiana Francesa	Solo	qPCR/Não informado	12,90%
Norkaew et al., (2013)/Tailândia	Solo de cavernas	Nested PCR/Hc100	7,95%

	Solo com fezes de pombo	Nested PCR/Hc100	4,76%
	Solo com fezes de galinha	Nested PCR/Hc 100	10,99%
Frías-de-Leon et al., (2016)/México	Amostras ambientais	Nested PCR/HC100	14,28%
Gómez et al., (2018)/Colômbia	Fertilizantes	Nested PCR/HC100	10,50%
Amorim-Conselheiro et al., (2019)/Brasil	Fezes de morcego	qPCR/HC ITS	15,25%

TABELA 13. ESTUDOS DE DETECÇÃO AMBIENTAL DE *H. CAPSULATUM* POR BIOLOGIA MOLECULAR

Neste estudo encontramos três limitações: 1) falta ensaios de validação para verificar a exatidão da metodologia, 2) necessidade de repetição dos estudos de solo com nova técnica de extração e a 3) ausência do sequenciamento do produto de amplificação. Para validação deverá ainda ser realizado um ensaio Inter laboratorial para verificar a exatidão da quantificação. Quanto a metodologia de extração, otimizações deverão ser testadas com o objetivo de diminuir a quantidade de inibidores da PCR como ácidos húmicos, pois sua presença de acordo com Wnuk et al., (2020) afeta qualidade do DNA extraído, sendo necessária adicional purificação que tornam o rendimento de DNA reduzidos e inadequados para análises metagenômicas e esses ácidos podem, conforme Sidstedt et al., (2010) também inibir a fluorescência da qPCR. Quanto, a amostra que amplificou em Presidente Figueiredo faz-se necessário sequenciar do produto de amplificação tendo como meta certificar que o produto amplificado se trata do DNA alvo de *H. capsulatum*.

Neste estudo foi desenvolvido um novo par de *primers* e sonda para detecção *H. capsulatum*, para uso em PCR e PCR em tempo real (qPCR), tendo como alvo a região ITS do DNAr, foi observado que o desenho desenvolvido demonstrou *in silico* ser tão adequado que outras propostas de *primers* e sonda. Também se mostraram adequados para a detecção do DNA de *H. capsulatum* obtido de culturas. E demonstrou resultados satisfatórios quanto limite de detecção, curva padrão adequada, baixo erro experimental, ausência de reação cruzada com outros organismos patogênicos e sensibilidade e especificidade adequados. O novo conjunto de *primers* e sonda, quando aplicado em experimento com solo 30 amostras de solo de grutas/cavernas do Município de Presidente Figueiredo, demonstrou a presença de DNA de *H. capsulatum* em somente uma amostra.

Assim, para detecção do *H. capsulatum*, com este estudo temos à disposição de laboratórios clínicos e de pesquisa, uma nova opção na metodologia de qPCR. E quanto a

detecção do fungo na caverna Maroaga, nos traz a certeza que os métodos de controle de fluxo de visitantes deve ser rigidamente executado.

5 Referências

- AMORIM-CONSELHEIRO, J. et al. Molecular detection of *Histoplasma capsulatum* indoors: A public health approach. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 36, n. 2, p. 79–82, 2019.
- AMPLIEDBIOSYSTEMS. **Applied Biosystems Step-one and step one plus Real-Time PCR systems. Reagent Guide** Applied Biosystems Step-one and step one plus Real-Time PCR systems. **Reagent Guide**, 2015.
- BAHR, N. C. et al. Histoplasmosis Infections Worldwide: Thinking Outside of the Ohio River Valley. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 2, n. 2, p. 70–80, 2015.
- BABADY, N. E. et al. Detection of *Blastomyces dermatitidis* and *Histoplasma capsulatum* from culture isolates and clinical specimens by use of real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 9, p. 3204–3208, 2011.
- BEERS, M. H. **The merck manual of diagnosis and therapy**. 2011.
- BENEDICT, K.; MODY, R. K. Epidemiology of histoplasmosis outbreaks, United States, 1938-2013. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 3, p. 370–378, 2016.
- BROWN, E. M. et al. Epidemiology and geographic distribution of blastomycosis, histoplasmosis, and coccidioidomycosis, Ontario, Canada, 1990–2015. **Emerging Infectious Diseases**, v. 24, n. 7, p. 1257–1266, 2018
- BUITRAGO, M. J. et al. Detection of imported histoplasmosis in serum of HIV-infected patients using a real-time PCR-based assay. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 25, n. 10, p. 665–668, 2006.
- BUITRAGO, M. J. et al. Comparison of PCR protocols for detecting *Histoplasma capsulatum* DNA through a multicenter study. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 30, n. 4, p. 256–260, 2013.
- CORREIA, F. G. S. et al. Spatial distribution of disseminated histoplasmosis and AIDS co-infection in an endemic area of Northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 2, p. 227–231, 2016.
- EMMONS, C. W. Association of Schools of Public Health. **Public Health**, v. 64, n. 28, p. 892–896, 1949.
- DEVI, S. G. et al. A rapid and economical method for efficient DNA extraction from diverse soils suitable for metagenomic applications. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–16, 2015.

- FRÍAS-DE-LEÓN, M. G.; RAMÍREZ-BÁRCENAS, J. A.; REYES-MONTES, M. R. Usefulness of molecular markers in the diagnosis of occupational and recreational histoplasmosis outbreaks. **Folia Microbiologica**, n. 3000, 2016.
- GAGO, S. et al. A multiplex real-time PCR assay for identification of pneumocystis jirovecii, *Histoplasma capsulatum*, and *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* in samples from AIDS patients with opportunistic pneumonia in AIDS patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 1168–1176, 2014.
- GÓMES, L. F. et al. Detection of *Histoplasma capsulatum* in Organic Fertilizers by Hc100 Nested Polymerase Chain Reaction and Its Correlation with the Physicochemical and Microbiological Characteristics of the Samples. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 5, p. 1303–1312, 2018.
- GIACOMAZZI, J. et al. The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses**, v. 59, p. 145–150, 2016.
- KOEPSSELL, S. A.; HINRICHS, S. H.; IWEN, P. C. Applying a real-time PCR assay for *Histoplasma capsulatum* to clinically relevant formalin-fixed paraffin-embedded human tissue. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 10, p. 3395–3397, 2012.
- KIKUCHI, K. et al. Is *Histoplasma capsulatum* a native inhabitant of Japan? **Microbiology and Immunology**, v. 52, n. 9, p. 455–459, 2008.
- LEÃO, S.C. et al. **Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria**. Brussels: European Commission International Co-operation (INCO) for Developing countries (DEV) concerted Action (CA), 165p. 2004.
- LINDER, K. A.; KAUFFMAN, C. A. Histoplasmosis: Epidemiology, Diagnosis, and Clinical Manifestations. **Current Fungal Infection Reports**, 2019.
- LÓPEZ, L. F. et al. Standardization and validation of real time PCR assays for the diagnosis of histoplasmosis using three molecular targets in an animal model. **Plos One**, v. 12, n. 12, p. 1/15, 2017.
- MARTAGON-VILLAMIL, J. et al. Identification of *Histoplasma capsulatum* from culture extracts by real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 1295–1298, 2003.
- MENESCAL, L. S. F. et al. **Histoplasmose em pacientes HIV/AIDS diagnosticados em um hospital de referência de Manaus-Amazonas**. Congresso Brasileiro de Micologia 2019. **Anais...2019**
- MOQUET, O. et al. *Histoplasma capsulatum* in Cayenne, French Guiana. **Mycopathologia**, v. 174, n. 4, p. 331–334, 2012.

- NACHER, M. et al. Disseminated Histoplasmosis in HIV-Infected Patients in South America: A Neglected Killer Continues on Its Rampage. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 11, p. e2319, 2013.
- NAIFF, R. D. et al. New records of *Histoplasma capsulatum* from wild animals in the Brazilian Amazon. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, n. 4, p. 273–278, 1996.
- NORKAEW, T. et al. Detection of Environmental Sources of *Histoplasma capsulatum* in Chiang Mai, Thailand, by Nested PCR. **Mycopathologia**, v. 176, n. 5–6, p. 395–402, 2013.
- OLIVEIRA, J. C. DE. **Tópicos em Micologia Médica**. 4. ed. Rio de Janeiro: [s.n.].
- REID, T. M.; SCHAFFER, M. P. Direct detection of *Histoplasma capsulatum* in soil suspensions by two-stage PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v. 13, n. 4, p. 269–273, 1999.
- ROCHA-SILVA, F. et al. Histoplasmosis outbreak in Tamboril cave - Minas Gerais state, BRAZIL. **Medical Mycology Case Reports**, v. 4, n. 1, p. 1–4, 2014.
- SIDSTEDT, M.; RÅDSTRÖM, P.; HEDMAN, J. PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS—mechanisms and solutions. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 412, n. 9, p. 2009–2023, 2020.
- SILVA, T. C. et al. Prevalence and lethality among patients with histoplasmosis and AIDS in the Midwest Region of Brazil. **Mycoses**, v. 60, n. 1, p. 59–65, 2017.
- SIMON, S. et al. Detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human samples by real-time polymerase chain reaction. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 66, n. 3, p. 268–273, 2010.
- SOUZA, S. L. S. et al. Causas de óbito em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida, necropsiados na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 3, p. 247–251, 2008.
- SUZAKI, AI; KIMURA, MIKIO, KIMURA, SATOSHI, MIYAJI, MAKOTO; KAUFFMAN, L. An outbreak of Acute Pulmonary Histoplasmosis among Travelers to a Bat-Inhabited Cave in Brazil. **Kansenshogaku Zasshi**, v. 69 associaç, p. 444–449, 1995.
- TAYLOR, E. L. S.; STOIANOFF, M. A. DE R.; FERREIRA, R. L. Mycological study for a management plan of a neotropical show cave (Brazil). **International Journal of Speleology**, v. 42, n. 3, p. 267–277, 2013.
- VASCONCELLOS, I. C. DA S.; LANA, D. F. D.; PASQUALOTTO, A. C. The role of molecular tests in the diagnosis of disseminated histoplasmosis. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 1, p. 10–17, 2020.

WHEAT, L. J. et al. Histoplasmosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 207–227, 2016.

WNUK, E. et al. The effects of humic substances on DNA isolation from soils. **PeerJ**, v. 8, p. 1–15, 2020.

ZEIDBERG, D. et al. *Hisplasma capsulatum*. **American journal of public health**, v. 42, p. 930–935, 1952.

6 CONCLUSÃO DA DISSERTAÇÃO

Foi desenvolvido um novo par de *primers* e sonda para detecção *H. capsulatum* para uso em PCR e PCR em tempo real (qPCR) tendo como alvo a região ITS do DNAr. O desenho desenvolvido demonstrou *in silico* ser tão ou mais adequado que outras propostas de *primers* e sonda.

O novo conjunto de *primers* e sonda foram adequados para a detecção do DNA de *H. capsulatum* obtido de culturas. O conjunto demonstrou resultados satisfatórios quanto limite de detecção, curva padrão adequada, baixo erro experimental, ausência de reação cruzada com outros organismos patogênicos e sensibilidade e especificidade adequados.

Os experimentos aplicando o novo conjunto de *primers* e sonda em 30 amostras de solo de grutas/cavernas do Município de Presidente Figueiredo demonstraram a presença de DNA de *H. capsulatum* em somente uma amostra.

7 REFERÊNCIAS DA DISSERTAÇÃO

- ADENIS, A. A. et al. Burden of HIV-associated histoplasmosis compared with tuberculosis in Latin America: a modelling study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 10, 2018.
- ALIDJINOU, E. K.; BOCKET, L.; HOBBER, D. Quantification of viral DNA during HIV-1 infection: A review of relevant clinical uses and laboratory methods. **Pathologie Biologie**, p. 1–7, 2014.
- AMORIM-CONSELHEIRO, J. et al. Molecular detection of *Histoplasma capsulatum* indoors: A public health approach. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 36, n. 2, p. 79–82, 2019.
- ARMSTRONG, P. A. et al. Multistate epidemiology of histoplasmosis, united states, 2011–2014. **Emerging Infectious Diseases**, v. 24, n. 3, p. 425–431, 2018.
- ASSI, M. et al. Histoplasmosis after solid organ transplant. **Clinical Infectious Diseases**, v. 57, n. 11, p. 1542–1549, 2013.
- AZAR, M. M. et al. Clinical and epidemiological characterization of histoplasmosis cases in a nonendemic area, Connecticut, United States. **Medical Mycology**, v. 56, n. 7, p. 896–899, 2017.
- AZAR, M. M.; HAGE, C. A. Laboratory Diagnostics for Histoplasmosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 1612–1620, 2017.
- BAHR, N. C. et al. Histoplasmosis Infections Worldwide: Thinking Outside of the Ohio River Valley. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 2, n. 2, p. 70–80, 2015.
- BABADY, N. E. et al. Detection of *Blastomyces dermatitidis* and *Histoplasma capsulatum* from culture isolates and clinical specimens by use of real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 9, p. 3204–3208, 2011.
- BEERS, M. H. **The merck manual of diagnosis and therapy**. 2011.
- BENEDICT, K.; MODY, R. K. Epidemiology of histoplasmosis outbreaks, United States, 1938-2013. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 3, p. 370–378, 2016.
- BROWN, E. M. et al. Epidemiology and geographic distribution of blastomycosis, histoplasmosis, and coccidioidomycosis, Ontario, Canada, 1990–2015. **Emerging Infectious Diseases**, v. 24, n. 7, p. 1257–1266, 2018
- BIALEK, R. et al. Evaluation of Two Nested PCR Assays for Detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in Human Tissue. **Jornal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 5, p. 1644–1647, 2002.
- BRASIL, M. DA S. **PORTARIA NO - 204, DE 17 DE FEVEREIRO DE 2016**. Brazil, 2016.

- BUITRAGO, M. J. et al. Detection of imported histoplasmosis in serum of HIV-infected patients using a real-time PCR-based assay. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 25, n. 10, p. 665–668, 2006.
- BUITRAGO, M. J. et al. Comparison of PCR protocols for detecting *Histoplasma capsulatum* DNA through a multicenter study. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 30, n. 4, p. 256–260, 2013.
- CAMUNAS-SOLER, J. et al. Noninvasive Prenatal Diagnosis of Single-Gene Disorders by Use of Droplet Digital PCR METHODS: RESULTS: **Clinical Chemistry**, v. 64, n. 2, p. 1–10, 2018.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, THE NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, AND THE HIV MEDICINE ASSOCIATION OF THE INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA, Guidelines for the Prevention and Treatment of Opportunistic Infections in HIV-Infected Adults and adolescents. 2017
- CARRETO-BINAGHI, L. E. et al. *Histoplasma capsulatum* and *Pneumocystis jirovecii* coinfection in hospitalized HIV and non-HIV patients from a tertiary care hospital in Mexico. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 86, p. 65–72, 2019.
- COLOMBO, A. L. et al. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. **Medical Mycology**, v 49, p. 785–798, 2011.
- CORREIA, F. G. S. et al. Spatial distribution of disseminated histoplasmosis and AIDS co-infection in an endemic area of Northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 2, p. 227–231, 2016.
- DANTAS, K. C. et al. The use of nested Polymerase Chain Reaction (nested PCR) for the early diagnosis of *Histoplasma capsulatum* infection in serum and whole blood of HIV-positive patients. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 88, n. 1, p. 141–3, 2013.
- DEVI, S. G. et al. A rapid and economical method for efficient DNA extraction from diverse soils suitable for metagenomic applications. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–16, 2015.
- DIAZ, J. H. Environmental and Wilderness-Related Risk Factors for Histoplasmosis: More Than Bats in Caves. **Wilderness and Environmental Medicine**, v.29, n.4, p.1-13, 2018.
- DISMUKES, W. E.; PAPPAS, P. G.; SOBEL, J.D. **Clinical Mycology** 2003.
- EMMONS, C. W. Association of Schools of Public Health. **Public Health**, v. 64, n. 28, p. 892–896, 1949.
- EMMONS, C. W. Isolation of *Histoplasma capsulatum* From Soil in Washington, D. C. **Public Health Reports**, v. 76, p. 591–595, 1961.

- LÓPEZ, L. F. et al. Standardization and validation of real time PCR assays for the diagnosis of histoplasmosis using three molecular targets in an animal model. **Plos One**, v. 12, n. 12, p. 1/15, 2017.
- FALCI, D. R. et al. Progressive disseminated histoplasmosis: a systematic review on the performance of non-culture-based diagnostic tests. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 7–11, 2017.
- FAVA, S. D. C.; FAVA NETTO, C. Epidemiologic survey of histoplasmin and paracoccidioidin in brasil. **Rev. Inst. trop. S. Paulo**, v. 40, n. 3, p. 155–164, 1998.
- FOROOTAN, A. et al. Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). **Biomolecular Detection and Quantification**, n. June, p. 0–1, 2017.
- GAGO, S. et al. A multiplex real-time PCR assay for identification of *Pneumocystis jirovecii*, *Histoplasma capsulatum*, and *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* in samples from AIDS patients with opportunistic pneumonia in AIDS patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 1168–1176, 2014.
- GIACOMAZZI, J. et al. The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses**, v. 59, p. 145–150, 2016.
- GARFOOT, A. L.; RAPPLEYE, C. A. *Histoplasma capsulatum* surmounts obstacles to intracellular pathogenesis. **The FEBS journal**, v. 283, p. 619–633, 2016.
- GÓMES, L. F. et al. Detection of *Histoplasma capsulatum* in Organic Fertilizers by Hc100 Nested Polymerase Chain Reaction and Its Correlation with the Physicochemical and Microbiological Characteristics of the Samples. v. 98, n. 5, p. 1303–1312, 2018.
- HAGE, C. A. et al. Histoplasmosis: Up-to-Date Evidence-Based Approach to Diagnosis and Management. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 36, n. 5, p. 729–745, 2015.
- HALDAR, N. et al. Isolation of *Cryptococcus spp.* and *Histoplasma capsulatum* from soil and Bird Droppings at Kulik Bird Sanctuary, Raiganj, West Bengal, India. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n. 2, p. 367–378, 2017.
- INVITROGEN. PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit. **Invitrogen**, v. 10024, p. 2–5, 2015.
- JOVANOVIC, J. V. et al. Establishing optimal quantitative-polymerase chain reaction assays for routine diagnosis and tracking of minimal residual disease in JAK2-V617F-associated myeloproliferative neoplasms: A joint European LeukemiaNet/MPN&MPNr-EuroNet (COST action BM0902) study. **Leukemia**, v. 27, n. 10, p. 2032–2039, 2013.

- KIKUCHI, K. et al. Is *Histoplasma capsulatum* a native inhabitant of Japan? **Microbiology and Immunology**, v. 52, n. 9, p. 455–459, 2008.
- KIRK P.M. (2019). Species Fungorum (version Oct 2017). In: Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2019 Annual Checklist (Roskov Y., Ower G., Orrell T., Nicolson D., Bailly N., Kirk P.M., Bourgoin T., DeWalt R.E., Decock W., Nieukerken E.van, Zarucchi J., Penev L., eds.). Digital resource at www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2019. Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands. ISSN 2405-884X.
- KOEPSSELL, S. A.; HINRICHS, S. H.; IWEN, P. C. Applying a real-time PCR assay for *Histoplasma capsulatum* to clinically relevant formalin-fixed paraffin-embedded human tissue. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 10, p. 3395–3397, 2012.
- LACAZ C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. Tratado de Micologia Médica, 9a ed., Sarvier, São Paulo, 2002.
- LINDER, K. A.; KAUFFMAN, C. A. Histoplasmosis: Epidemiology, Diagnosis, and Clinical Manifestations. **Current Fungal Infection Reports**, 2019.
- LÓPEZ, L. F. et al. Standardization and validation of real time PCR assays for the diagnosis of histoplasmosis using three molecular targets in an animal model. **Plos One**, v. 12, n. 12, p. 1/15, 2017.
- LOTTENBERG, R. et al. Pulmonary histoplasmosis associated with exploration of a bat cave. **American Journal of Epidemiology**, v. 110, n. 2, p. 156–161, 1979.
- MAUBON, D.; SIMON, S.; AZNAR, C. Histoplasmosis diagnosis using a polymerase chain reaction method. Application on human samples in French Guiana, South America. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 58, n. 4, p. 441–444, 2007.
- MAIGA, A. W. et al. Mapping *Histoplasma capsulatum* exposure, United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 24, n. 10, p. 1835–1839, 2018.
- MANDENGUE, C. E. NGANDJIO, A.; ATANGANA, P. J. A. Histoplasmosis in HIV-Infected Persons., v. 21, n. 11, p. 2094–2096, 2015.
- MENESCAL, L. S. F. et al. **Histoplasmose em pacientes HIV/AIDS diagnosticados em um hospital de referência de Manaus-Amazonas**. Congresso Brasileiro de Micologia 2019. **Anais...2019**.
- MOK, W. V.; AYRES, C. H.; MCMILLEN, S. Levantamento sorológico de quatro micoses profundas no Estado do Amazonas, Brasil (*). v. 9, n. 1, p. 75–78, 1979.
- MOQUET, O. et al. *Histoplasma capsulatum* in Cayenne, French Guiana. **Mycopathologia**, v. 174, n. 4, p. 331–334, 2012

- MUÑOZ, C. et al. Validation and Clinical Application of a Molecular Method for Identification of *Histoplasma capsulatum* in Human Specimens in Colombia, South America. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 1, p. 62–67, 2010.
- MULLIS, K. et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Quantitative biology**, v. LI, p. 263–273, 1986.
- MURAOSA, Y. et al. Detection of *Histoplasma capsulatum* from clinical specimens by cycling probe-based real-time PCR and nested real-time PCR. **Medical Mycology**, v. 54, n. 4, p. 433–438, 2016.
- NACHER, M. et al. Disseminated Histoplasmosis in HIV-Infected Patients in South America: A Neglected Killer Continues on Its Rampage. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 11, p. e2319, 2013.
- NAIFF, R. D. et al. New records of *Histoplasma capsulatum* from wild animals in the Brazilian Amazon. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.38, p.273-277, 1996.
- NORKAEW, T. et al. Detection of Environmental Sources of *Histoplasma capsulatum* in Chiang Mai, Thailand, by Nested PCR. **Mycopathologia**, v. 176, n. 5–6, p. 395–402, 2013.
- OLIVEIRA, J. C. DE. **Tópicos em Micologia Médica**. 2014. 4. ed. Rio de Janeiro.
- PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION AND JOINT UNITED NATIONS PROGRAMME ON HIV/AIDS. **HIV prevention in the SPOTLIGHT. An analysis from the perspective of the health sector in Latin America and the Caribbean**. 2017. Ed. PAHO, UNAIDS. Washington, D.C.
- PASQUALOTTO, A. C.; QUIEROZ-TELLES, F. Comment Histoplasmosis dethrones tuberculosis in Latin America. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3099, n. 18, p. 2–3, 2018.
- PATEL, V. B. et al. Diagnostic Accuracy of Quantitative PCR (Xpert MTB / RIF) for Tuberculous Meningitis in a High Burden Setting: A Prospective Study. **Plos Medicine**, v. 10, n. 10, p. 1–14, 2013.
- REID, T. M.; SCHAFER, M. P. Direct detection of *Histoplasma capsulatum* in soil suspensions by two-stage PCR. **Molecular and Cellular Probes**, v. 13, n. 4, p. 269–273, 1999.
- ROCHA-SILVA, F. et al. Histoplasmosis outbreak in Tamboril cave - Minas Gerais state, Brazil. **Medical Mycology Case Reports**, v. 4, n. 1, p. 1–4, 2014.
- SAMPAIO, I. DE L. et al. Selection and optimization of PCR-based methods for the detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 29, n. 1, p. 34–39, 2012.
- SAMPAIO, I. DE LIMA. **Seleção e otimização de protocolos para detecção de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* por reação em cadeia da polimerase (PCR)**. p. 59, 2010.

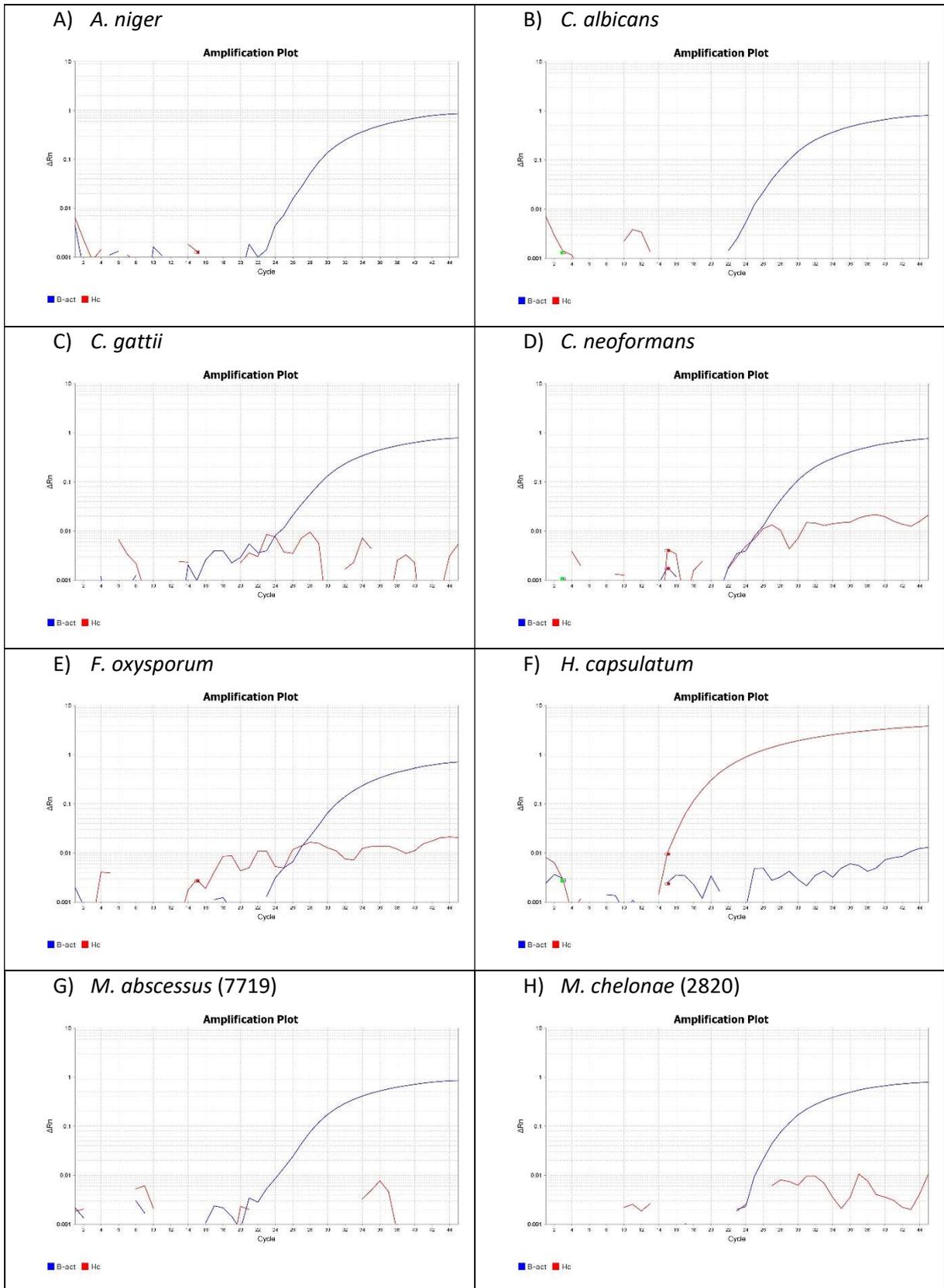
- SCULLY, M. C.; BADDLEY, J. W. Epidemiology of Histoplasmosis. **Current Fungal Infection Reports**, v. 12, p. 51-58, 2018.
- SIMÃO, M.; BORGES, A. S. Histoplasmosose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 2, p. 192–198, 2009.
- SIMON, S. et al. Detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human samples by real-time polymerase chain reaction. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 66, n. 3, p. 268–273, 2010.
- SILVA, T. C. et al. Prevalence and lethality among patients with histoplasmosis and AIDS in the Midwest Region of Brazil. **Mycoses**, v. 60, n. 1, p. 59–65, 2017.
- SOUZA, S. L. S. et al. Causas de óbito em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida, necropsiados na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 3, p. 247–251, 2008.
- SUZAKI, AI; KIMURA, MIKIO, KIMURA, SATOSHI, MIYAJI, MAKOTO; KAUFFMAN, L. An outbreak of Acute Pulmonary Histoplasmosis among Travelers to a Bat-Inhabited Cave in Brazil. **Kansenshogaku Zasshi**, v. 69, p. 444–449, 1995.
- TAYLOR, E. L. S.; STOIANOFF, M. A. DE R.; FERREIRA, R. L. Mycological study for a management plan of a neotropical show cave (Brazil). **International Journal of Speleology**, v. 42, n. 3, p. 267–277, 2013.
- WHEAT, L. J. et al. Histoplasmosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 207–227, 2016.
- ZEIDEBERG, L. D. et al. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil. **American journal of public health**, v. 42, p. 930–935, 1952.

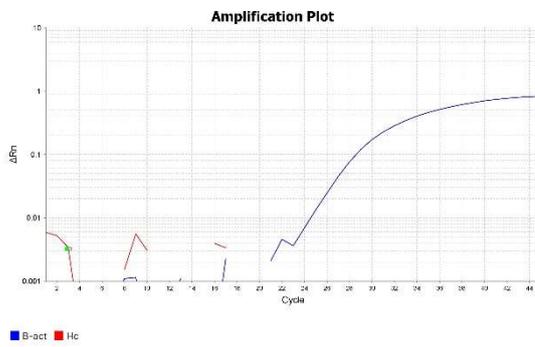
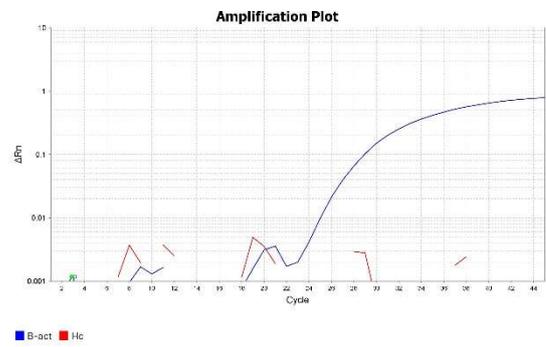
8 APÊNDICE

APÊNDICE A. RESULTADOS DA CURVA PADRÃO FORNECIDOS PELO QUANTSTUDIO™3SYSTEM

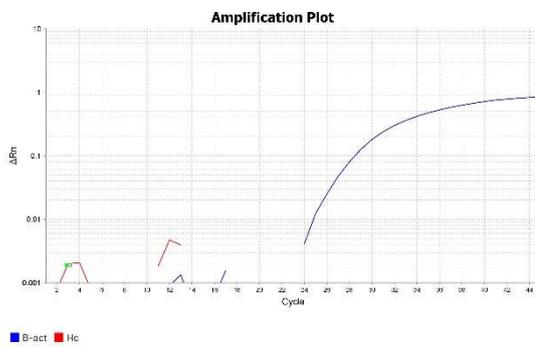
Instru QuantStudio™ 3 System																
Pass# ROX																
Post-r																
Pre-re																
Quant Ct																
Signa true																
Stage, Stage2, Step2																
User Name																
Well	Well Po	Omit	San Target	Task	Reporte	Quencher	CT	Ct Mean	Ct SD	Quantity	Qu	Qu	Y-Intercep	R(supers)	Slope	Efficiency
5	A5	FALSO	Hc	STANDAR FAM	NFQ-MGB	18,794	21,607	5,663	22,00000				24,853	0,875	-3,521	92,317 \
6	A6	FALSO	Hc	STANDAR FAM	NFQ-MGB	18,863	21,607	5,663	22,00000				24,853	0,875	-3,521	92,317 \
7	A7	FALSO	Hc	STANDAR FAM	NFQ-MGB	30,100	21,607	5,663	22,00000				24,853	0,875	-3,521	92,317 \
8	A8	FALSO	Hc	STANDAR FAM	NFQ-MGB	18,670	21,607	5,663	22,00000				24,853	0,875	-3,521	92,317 \
17	B5	FALSO	Hc	STANDAR FAM	NFQ-MGB	22,344	22,438	0,079	2,20000				24,853	0,875	-3,521	92,317 \
18	B6	FALSO	Hc	STANDAR FAM	NFQ-MGB	22,526	22,438	0,079	2,20000				24,853	0,875	-3,521	92,317 \
19	B7	FALSO	Hc	STANDAR FAM	NFQ-MGB	22,475	22,438	0,079	2,20000				24,853	0,875	-3,521	92,317 \
20	B8	FALSO	Hc	STANDAR FAM	NFQ-MGB	22,406	22,438	0,079	2,20000				24,853	0,875	-3,521	92,317 \
29	C5	FALSO	Hc	STANDAR FAM	NFQ-MGB	25,821	25,822	0,025	0,22000				24,853	0,875	-3,521	92,317 \
30	C6	FALSO	Hc	STANDAR FAM	NFQ-MGB	25,858	25,822	0,025	0,22000				24,853	0,875	-3,521	92,317 \
31	C7	FALSO	Hc	STANDAR FAM	NFQ-MGB	25,798	25,822	0,025	0,22000				24,853	0,875	-3,521	92,317 \
32	C8	FALSO	Hc	STANDAR FAM	NFQ-MGB	25,812	25,822	0,025	0,22000				24,853	0,875	-3,521	92,317 \
41	D5	FALSO	Hc	STANDAR FAM	NFQ-MGB	31,117	30,992	0,216	0,02200				24,853	0,875	-3,521	92,317 \
42	D6	FALSO	Hc	STANDAR FAM	NFQ-MGB	31,135	30,992	0,216	0,02200				24,853	0,875	-3,521	92,317 \
43	D7	FALSO	Hc	STANDAR FAM	NFQ-MGB	30,674	30,992	0,216	0,02200				24,853	0,875	-3,521	92,317 \
44	D8	FALSO	Hc	STANDAR FAM	NFQ-MGB	31,042	30,992	0,216	0,02200				24,853	0,875	-3,521	92,317 \
53	E5	FALSO	Hc	STANDAR FAM	NFQ-MGB	35,242	35,076	0,286	0,00220				24,853	0,875	-3,521	92,317 \
54	E6	FALSO	Hc	STANDAR FAM	NFQ-MGB	35,190	35,076	0,286	0,00220				24,853	0,875	-3,521	92,317 \
55	E7	FALSO	Hc	STANDAR FAM	NFQ-MGB	35,223	35,076	0,286	0,00220				24,853	0,875	-3,521	92,317 \
56	E8	FALSO	Hc	STANDAR FAM	NFQ-MGB	34,648	35,076	0,286	0,00220				24,853	0,875	-3,521	92,317 \
65	F5	FALSO	Hc	STANDAR FAM	NFQ-MGB	37,228	37,637	0,809	0,00022				24,853	0,875	-3,521	92,317 \
66	F6	FALSO	Hc	STANDAR FAM	NFQ-MGB	38,657	37,637	0,809	0,00022				24,853	0,875	-3,521	92,317 \
67	F7	FALSO	Hc	STANDAR FAM	NFQ-MGB	37,864	37,637	0,809	0,00022				24,853	0,875	-3,521	92,317 \
68	F8	FALSO	Hc	STANDAR FAM	NFQ-MGB	36,797	37,637	0,809	0,00022				24,853	0,875	-3,521	92,317 \
77	G5	FALSO	Hc	UNKNOW FAM	NFQ-MGB	Undeterm							24,853	0,875	-3,521	92,317 \
78	G6	FALSO	Hc	UNKNOW FAM	NFQ-MGB	Undeterm							24,853	0,875	-3,521	92,317 \
79	G7	FALSO	Hc	UNKNOW FAM	NFQ-MGB	Undeterm							24,853	0,875	-3,521	92,317 \
80	G8	FALSO	Hc	UNKNOW FAM	NFQ-MGB	Undeterm							24,853	0,875	-3,521	92,317 \
89	H5	FALSO	Hc	NTC FAM	NFQ-MGB	Undeterm							24,853	0,875	-3,521	92,317 \
90	H6	FALSO	Hc	NTC FAM	NFQ-MGB	Undeterm							24,853	0,875	-3,521	92,317 \
91	H7	FALSO	Hc	NTC FAM	NFQ-MGB	Undeterm							24,853	0,875	-3,521	92,317 \
92	H8	FALSO	Hc	NTC FAM	NFQ-MGB	Undeterm							24,853	0,875	-3,521	92,317 \

APÊNDICE B. CURVAS DE AMPLIFICAÇÃO DO TESTE DE REAÇÃO CRUZADA COM OUTROS MICROORGANISMOS.

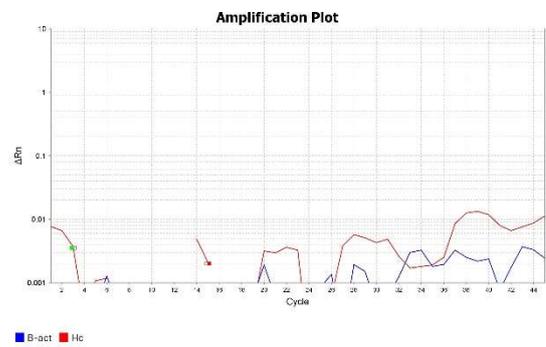


I) *M. fortuitum* (0121)J) *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC® 27294)

K) Controle Beta-actina (DNA humano)



L) Controle negativo

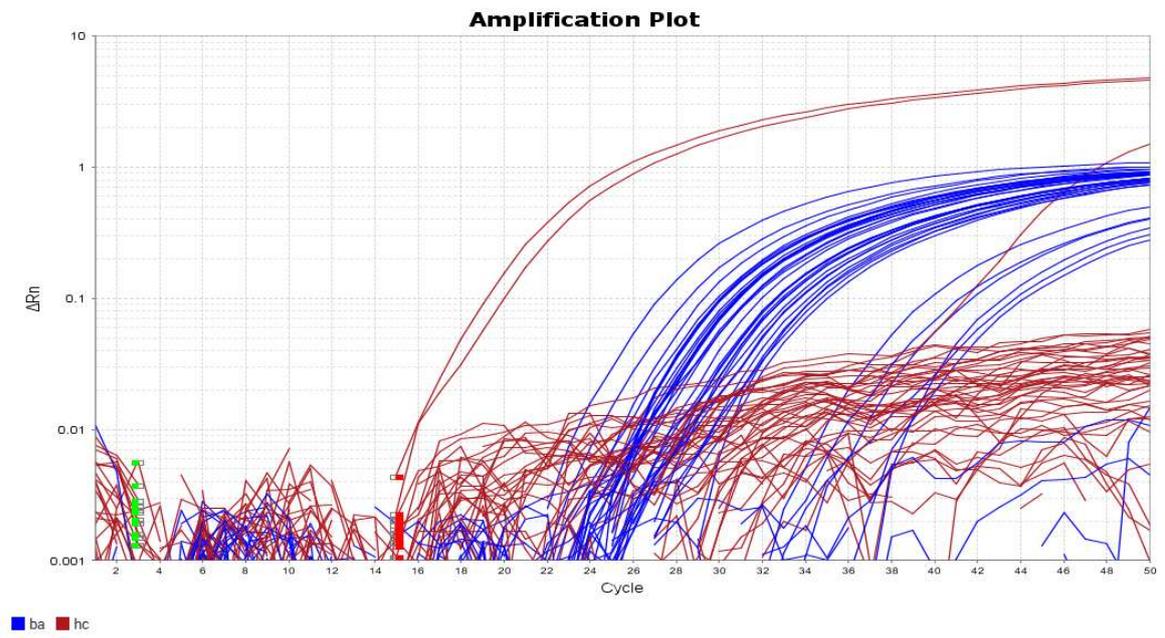


APÊNDICE C. TABELA: RESULTADO DO TESTE DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE COM 18 AMOSTRAS CONTAMINADAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE (20 NG A 0,2 NG/ μ L) DNA DE H. CAPSULATUM E 18 AMOSTRAS NEGATIVAS.

Número da Amostra	Cepa do DNA	Concentração DNA ng/ul	Resultado da qPCR
1	3342	20	+
2	Sem DNA	0	-
3	3342	20	+
4	Sem DNA	0	-
5	3342	20	+
6	Sem DNA	0	-
7	3342	2	+
8	Sem DNA	0	-
9	3342	2	+
10	Sem DNA	0	-
11	3342	2	+
12	Sem DNA	0	-
13	3342	0,2	+
14	Sem DNA	0	-
15	3342	0,2	+
16	Sem DNA	0	-
17	3342	0,2	+
18	Sem DNA	0	-
19	3417	20	+
20	Sem DNA	0	-
21	3417	20	+
22	Sem DNA	0	-
23	3417	20	+
24	Sem DNA	0	-
25	3417	2	+
26	Sem DNA	0	-
27	3417	2	+

28	Sem DNA	0	-
29	3417	2	+
30	Sem DNA	0	-
31	3417	0,2	+
32	Sem DNA	0	-
33	3417	0,2	+
34	Sem DNA	0	-
35	3417	0,2	+
36	Sem DNA	0	-

APÊNDICE D. CURVA DE AMPLIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SOLO DE PRESIDENTE FIGUEIREDO COM UMA AMOSTRA POSITIVA, DOIS CONTROLES POSITIVOS E OS CONTROLES INTERNO DE BETA-ACTINA



APÊNDICE E. AUTORIZAÇÃO PARA COLETA DE AMOSTRAS NAS CAVERNAS MAROAGA E JUDEIA (FRENTE)



PREFEITURA MUNICIPAL DE PRESIDENTE FIGUEIREDO
AMAZONAS – BRASIL – CEP 69.735-000
SECRETARIA MUNICIPAL DO MEIO AMBIENTE E SUSTENTABILIDADE - SEMMAS
DIVISÃO ADMINISTRATIVA E FINANCEIRA – DIAFI



AUTORIZAÇÃO

Autorização n°. 011/2020
Processo n°. 022/2020

A **Secretaria Municipal de Meio Ambiente e Sustentabilidade - SEMMAS**, no âmbito de sua área de atuação **autoriza** a Sr. **BIANCA KELLY NEVES IZIDIO DA SILVA**, CPF: **636.737.892-87**. Sr. **KARLISSON RICHARD GRANJEIRO PINTO**, CPF: **698.649.342-87**. Sr. **ISMAEL IZIDRO DA SILVA**, CPF: **027.160.202-30**.

A realizarem, **visita no Complexo Turístico Caverna do Maroaga e Gruta da Judéia**. Tem como objetivo: **coleta de amostra de solo**. Que será utilizadas em **experimentos dos Projetos de Pesquisa desenvolvidos pelos alunos de graduação e Programas e Pós-Graduação vinculados ao Laboratório de Micologia Médica do Instituto Nacional De pesquisas do Amazonas-INPA**.

Grupo de 03 (três) pessoas.
Data: 19/02, 20 e 21/02/2020.

Qualquer alteração deverá ser comunicada á **Secretaria Municipal do Meio Ambiente e Sustentabilidade - SEMMAS** para avaliação. A presente autorização tem validade somente para o dia acima citado. **Horário de visita das 08:00h às 16:00h no Complexo Turístico Caverna do Maroaga e Gruta da Judeia.**

Atenção:
 Esta **Autorização** é composta de **11 restrições e/ou condições** constantes no verso, cujo não cumprimento/atendimento sujeitará a sua invalidação e/ou as penalidades previstas em normas;
 Esta **Autorização** deve ser apresentada na entrada dos **Parques Municipais** aos agentes ambientais desta **SEMMA**;
 Esta **Autorização** tem validade a partir da data de sua assinatura.

Presidente Figueiredo/AM, 17 de fevereiro de 2020.



JOÃO RICARDO MATOS RODRIGUES
 Secretário Municipal de Meio Ambiente e Sustentabilidade

SEMMA

Av. Padre Callery, 518, Bairro Tancredo Neves
 Presidente Figueiredo/AM
 Tel/fax (0xx92) 3324-1158
 e-mail: semma2017pf@gmail.com





APÊNDICE F. AUTORIZAÇÃO PARA COLETA DE AMOSTRAS NAS CAVERNAS MAROAGA E JUDEIA (VERSO)



PREFEITURA MUNICIPAL DE PRESIDENTE FIGUEIREDO
 AMAZONAS – BRASIL – CEP 69.735-000
 SECRETARIA MUNICIPAL DO MEIO AMBIENTE E SUSTENTABILIDADE-SEMMAS
 DIVISÃO ADMINISTRATIVA E FINANCEIRA – DIAFI

RESTRIÇÕES E CONDICIONANTES

1. O requerente somente deverá adentrar o **COMPLEXO TURÍSTICO CAVERNA DO MAROAGA e GRUTA DA JUDEIA**, no dia constante nesta autorização.
2. Esta **Autorização** é válida apenas para **filmagem de um filme na Caverna e Gruta da Judéia**.
3. **Restringir o uso de fotografias com o uso de flash.**
4. O **horário da visita nos dias normais é das 08:00hs às 1600hs.**
5. Fica desde já designado o **COFIS** para observar e fazer cumprir as restrições, sob pena de revogação da autorização e multa (por Lei) em caso de descumprimento, o qual desde já fica fixado em valor de **15.000,00, que será revertido em favor do FMMA.**
6. Esta **Autorização não dispensa e nem substitui nenhum documento exigido pela Legislação Federal, Estadual e Municipal;**
7. **Fica o requerente ciente que toda questão de segurança, danos ao patrimônio é por conta do mesmo.**
8. O requerente deverá seguir a orientação estabelecida pela **Legislação Ambiental em vigência**, sob pena de ser autuado;
9. **Fica o requerente ciente que este tipo de autorização é precária, não pode ser emitida constantemente;**
10. **Respeitar as Áreas de Preservação Permanente - APP**, conforme dispõe os Art. 4º, 7º e § 1º da Lei Federal nº. 12.651/12;
11. **O requerente deverá seguir as recomendações contidas no verso desta Autorização, sob pena de cancelamento da Autorização, e ser autuado de acordo com a legislação ambiental vigente.**

SEMMAS

Av. Padre Callery, 516, Bairro Tancredo Neves
 Presidente Figueiredo/AM
 Tel/fax (0xx92) 3324-1158
 e-mail: semma2017pf@gmail.com



APÊNDICE G. AUTORIZAÇÃO PARA COLETA DE AMOSTRAS NA GRUTA DA ONÇA


 Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
 Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
 Grupo de Pesquisa: Micobactérias e Fungos da Amazônia
 Laboratório de Micologia - CSAS

Memorando. NR. 02/2019
 Manaus, 18 de fevereiro de 2020

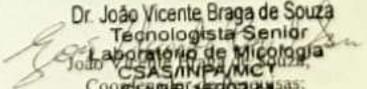
Ao
 Proprietário e/ou responsável pela caverna da Onça

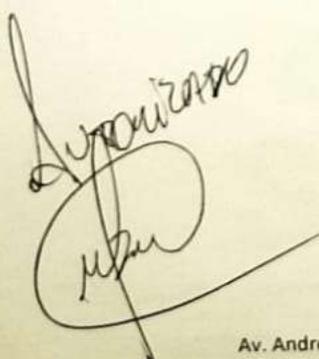
Prezado

O Laboratório de Micologia Médica do Instituto Nacional de Pesquisas do Amazonas - INPA neste ato representado por mim Pesquisador Adjunto Dr. João Vicente Braga de Souza, vem por meio desta respeitosamente solicitar a Autorização para coleta de amostras de solo da Caverna Onça.

Informo que as amostras serão utilizadas em experimentos dos Projetos de Pesquisas desenvolvidos pelos alunos de graduação e Programas de Pós-Graduação vinculados ao Laboratório de Micologia Médica do INPA e os resultados destas pesquisas não serão publicadas ao público, apenas no meio acadêmico.

Atenciosamente,


 Dr. João Vicente Braga de Souza
 Tecnologista Sênior
 Laboratório de Micologia
 CSAS/INPA/MC
 Coordenação de Ciências
 Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia;
 Coordenação de Sociedade, Ambiente e Saúde;
 Laboratório de Micologia;
 +55 92 3643-3055 ou +55 92 3643-3056;
 Av. André Araújo, 2936, Aleixo, CEP 69060-001, Manaus -AM;
<http://lattes.cnpq.br/7804981785557071>
joao.souza@inpa.gov.br



Av. André Araújo, 2936 – Petrópolis, Manaus (AM), CEP: 69080-971
 TELEFONE (92) 3643-3055