



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

BIANCA OLIVEIRA SILVA

Leveduras isoladas em abrigos urbanos colonizados por morcegos em  
Maringá, Paraná.

Maringá  
2014

BIANCA OLIVEIRA SILVA

Leveduras isoladas em abrigos urbanos colonizados por morcegos em  
Maringá, Paraná.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia das Interações Orgânicas.

**Orientador:** Prof. Dr. Henrique Ortêncio Filho

**Co-orientadora:** Profa. Dra. Terezinha Inez Estivalet Svidzinski

Maringá  
2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

S586L Silva, Bianca Oliveira  
Leveduras isoladas em abrigos urbanos colonizados por morcegos em Maringá, Paraná / Bianca Oliveira Silva. - Maringá, 2014.  
63 f. : il., color, tabs., figs., quadros

Orientador: Prof. Dr. Henrique Ortêncio Filho.  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Terezinha Inez Estivalet Svidzinski.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, 2014.

1. Quirópteros. 2. Morcegos. 3. Fungos. 4. Fezes. I. Ortêncio Filho, Henrique, orient. II. Svidzinski, Terezinha Inez Estivalet, co-orient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada. IV. Título.

CDD 22.ed. 599.4

MGC-001415

# FOLHA DE APROVAÇÃO

BIANCA OLIVEIRA SILVA

Leveduras isoladas em abrigos urbanos colonizados por morcegos em  
Maringá, Paraná.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia das Interações Orgânicas pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

## COMISSÃO JULGADORA

Prof. Dr. Henrique Ortêncio Filho  
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta  
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dra. Erika Seki Kioshima Cotica  
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 29 de agosto de 2014.

Local de defesa: Bloco G90, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os anjos que Deus colocou em minha vida que, de certa forma, contribuíram para a realização de um sonho.

## AGRADECIMENTOS

Nesta página muito especial deste trabalho, gostaria de agradecer a algumas pessoas, dentre as muitas que me ajudaram a realizá-lo.

Em especial...

Ao Cláudio Henrique Zawadzki que me acolheu nessa Universidade, e me forneceu a oportunidade de me especializar em nível de Mestrado.

Ao meu queridíssimo orientador Henrique Ortêncio Filho, que me estendeu a mão quando mais precisei, que me motivou a não desistir e acreditou no meu trabalho.

Aos meus amigos e companheiros Janaina Gazarini e Luiz Pesenti, que contribuíram muito para o meu desenvolvimento como pesquisadora, e ainda me proporcionaram a alegria de tê-los presentes em minha vida.

À professora Terezinha Inez Estivalet Svidzinski que nos deu a oportunidade de desenvolver essa pesquisa em parceria ao Laboratório de Micologia Médica da Universidade Estadual de Maringá.

À Tânia Pereira Salci e Melyssa Fernanda Norman Negri as quais foram essenciais para o desenvolvimento dessa pesquisa, sou muito grata por todas as sugestões, ensinamentos, e críticas que me proporcionaram.

Às professoras Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta, Dra. Erika Seki Kioshima Cotica, Dra. Elaine Antoniassi Luiz Kashiwaqui e ao professor Dr. Benício Alves de Abreu Filho pelo aceite em compor a banca avaliadora deste trabalho.

A todos os parceiros e amigos que me ajudaram em campo: Alexandre Polizel, Luiz Pesenti, Janaína Gazarini e Vanessa Leilane.

A todos colegas do mestrado, professores desta Universidade que, de certa forma, contribuíram com o meu trabalho.

A todos os meus amigos pessoais que contribuíram com um ombro amigo nos momentos mais difíceis e àqueles que também comemoraram as minhas conquistas.

Ao CCZ (Centro de Controle de Zoonoses de Maringá), o qual em parceria nos forneceu os contatos das residências de Maringá colonizadas por morcegos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, Universidade Estadual de Maringá, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

À minha família: “Os momentos mais felizes da minha vida foram aqueles, poucos, que pude passar em minha casa, com a minha família”.

À Deus meu senhor e meu pastor que nada me deixou faltar.

## Leveduras isoladas em abrigos urbanos colonizados por morcegos em Maringá, Paraná.

### RESUMO

No Estado do Paraná, foram identificadas cinco famílias de morcegos (Phyllostomidae, Molossidae, Vespertilionidae, Noctilionidae e Emballonuridae), as quais se agrupam devido às características morfológicas, genéticas e comportamentais semelhantes. A família Molossidae, destaca-se por apresentar as espécies mais comuns em abrigos urbanos: *Molossus rufus*, *Molossus molossus*, *Nyctinomops laticaudatus*, *Nyctinomops macrotis* e *Eumops glaucinus*. Quando esses morcegos abrigam-se em construções, podem não ser tolerados pelas pessoas, principalmente quando são encontrados em grandes concentrações. Os moradores se incomodam com as fezes acumuladas no chão e no sótão das casas e com o ruído que os morcegos fazem à noite. Porém, a grande preocupação para saúde pública deve-se ao possível contato dos moradores com fezes de quirópteros, pois esses excrementos podem atuar como substrato adequado para o crescimento, desenvolvimento e disseminação de microrganismos. Assim, teve-se como objetivo investigar a ocorrência de leveduras a partir das fezes de morcegos. A coleta de material ocorreu no período de junho a outubro de 2013, em abrigos urbanos colonizados por morcegos na cidade de Maringá. Após amostragem, as fezes foram encaminhadas ao laboratório de Micologia Médica da Universidade Estadual de Maringá, dentro de 24 horas. Diferentes processamentos das amostras foram testados a fim de verificar qual a forma mais eficiente em isolar as leveduras de interesse. Levando em consideração o resultado obtido, fez-se o processamento das fezes e isolamento das leveduras. As espécies obtidas nesse estudo, *Cryptococcus* spp., *Rhodotorula* spp., *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* e *Candida guilhermondii*, foram diferenciadas por meio de testes morfológicos e bioquímicos. Considerando que esses agentes causam severas infecções e que os morcegos, via de dispersão desses microrganismos, estão cada vez mais próximos aos seres humanos, medidas de controle e manejo para evitar possíveis infecções devem ser realizadas. Além disso, mais estudos são necessários para entender melhor a relação epidemiológica desses fungos com os quirópteros.

**Palavras-chave:** Quirópteros, fezes, fungos, contaminação ambiental

*Cryptococcus* and other yeasts associated to bats in urban shelters of Maringá, Paraná.

**ABSTRACT**

In the State of Paraná, were identified five families of bats (Phyllostomidae, Vespertilionidae, and Molossidae Noctilionidae Emballonuridae) which group due to morphological, behavioral and genetic similar. The family Molossidae, is notable for featuring the most common species in urban shelters: *Molossus Molossus molossus rufus*, *Nyctinomops laticaudatus*, *Nyctinomops macrotis* and *Eumops glaucinus*. When those bats shelter in buildings may not be tolerated by people, especially when they are found in large concentrations. The villagers bother with accumulated feces on the floor and in the attic of the houses and with the noise that bats do at night. However, the major concern for public health due to the possible contact of the residents with feces of bats, because these excrements can act as suitable culture medium for the growth, development and dissemination of microorganisms. Thus, the objective has been to investigate the occurrence of opportunistic yeast and/or pathogenic from the feces of bats. The collection of material occurred in the period from June to October 2013 in urban shelters colonized by bats in the city of Maringá. After sampling, the stools were forwarded to the Medical Mycology Laboratory at the State University of Maringá, in 24 hours. Different processing of the samples were tested in order to verify what the most efficient way to isolate the yeasts of interest. Considering the result obtained, was the processing of stool and isolation of yeasts. The species obtained in this study, *Cryptococcus* spp., *Rhodotorula* spp., *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* and *Candida guilhermondi* were differentiated by means of morphological and biochemical tests. Whereas these agents cause severe infections and bats, that are dispersal of microorganisms, are each time closer to human beings, control and management measures to prevent possible infections must be performed. In addition, further studies are needed to better understand the epidemiological relationship of these fungi with the chiropteran.

**Keywords:** Chiroptera, feces, fungi, environmental contamination.

# SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	11
<b>Revisão Bibliográfica</b> .....	11
<b>1. Introdução</b> .....	12
<b>2. Revisão Bibliográfica</b> .....	13
2.1. <i>Aspectos gerais dos morcegos</i> .....	13
2.2. <i>Morcegos e Saúde: potencial para transmissão de doenças ao homem e a outros animais</i> .....	15
2.3. <i>Considerações finais</i> .....	21
<b>3. Referências</b> .....	21
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	29
<b>Comparação de métodos para isolar leveduras em fezes de morcegos.</b> .....	29
<b>ANEXO 1</b> .....	30
<b>RESUMO</b> .....	36
<b>1. Introdução</b> .....	37
<b>2. Material e Métodos</b> .....	38
2.1. Coleta das amostras .....	38
2.2. Meio de cultura utilizado e incubação .....	38
2.3. Processamento 1- Amostra homogeneizada .....	39
2.4. Processamento 2- Amostra decantada .....	39
2.5. Processamento 3- Amostra centrifugada .....	39
2.6. Critérios de interpretação das colônias .....	39
<b>3. Resultados</b> .....	39
<b>4. Discussão</b> .....	41
<b>5. Conclusão</b> .....	43
<b>6. Referências</b> .....	43
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	47
<b>Leveduras isoladas em abrigos urbanos colonizados por morcegos em Maringá, Paraná.</b> .....	47
<b>ANEXO 2</b> .....	48
<b>RESUMO</b> .....	51
<b>1. Introdução</b> .....	52
<b>2. Material e Métodos</b> .....	53
2.1. <i>Área de estudo</i> .....	53
2.2. <i>Coleta do material</i> .....	54
2.3. <i>Processamento das amostras e isolamento dos fungos</i> .....	55
2.4. <i>Identificação dos fungos</i> .....	55
<b>3. Resultados</b> .....	56
<b>4. Discussão</b> .....	58
<b>5. Conclusão</b> .....	61
<b>6. Referências</b> .....	61

# **CAPÍTULO 1**

## **Revisão Bibliográfica**

## 1. Introdução

No Brasil, os quirópteros representam o segundo maior grupo de mamíferos em diversidade, contendo 172 espécies (REIS *et al.*, 2011). No Estado do Paraná, foram identificadas cinco famílias, agrupadas devido às características morfológicas, genéticas e comportamentais semelhantes (REIS *et al.*, 2008). Phyllostomidae (27 espécies) é melhor representada, seguida por Molossidae e Vespertilionidae (15 espécies por família), Noctilionidae (02 espécies) e Emballonuridae (01 espécie) (REIS *et al.*, 2008). A família Molossidae, destaca-se por apresentar as espécies mais comuns em abrigos urbanos: *Molossus rufus*, *Molossus molossus*, *Nyctinomops laticaudatus*, *Nyctinomops macrotis* e *Eumops glaucinus* (REIS *et al.*, 2002).

Os abrigos caracterizam-se por oferecer condições mínimas que permitam o acasalamento; parto e a criação de filhotes; interações sociais e a digestão do alimento consumido durante a noite; proteção contra intempéries ambientais e contra possíveis predadores (BREDT *et al.*, 1998). Os morcegos podem ocupar cavernas, frestas em rochas, folhagens, copas de árvores e palmeiras. Também podem ser encontrados em edificações, como, telhados, juntas de dilatação de prédios, porões, sótãos, cumeeiras sem vedação (JARDIM, 2008). Geralmente, fatores como temperatura ambiente, umidade relativa do ar e a luminosidade são limitantes para a adaptação dos morcegos em cidades, já que, a maioria, procura características semelhantes às encontradas nos refúgios naturais (PACHECO *et al.*, 2010). Contudo, quando abrigados em construções, a presença dos morcegos pode não ser tolerada pelas pessoas, principalmente quando esses animais são encontrados em grandes concentrações (JARDIM, 2008).

As pessoas se incomodam com as fezes acumuladas no chão e no sótão das casas e com os ruídos oriundos das interações entre os grupos (JARDIM, 2008). Além disso, fezes de quirópteros podem atuar como importante fonte de nitrogênio, sendo consideradas como substrato adequado para o crescimento, desenvolvimento e disseminação de microrganismos (CANO & HAJJEH, 2001). Dessa forma, fungos patogênicos já foram encontrados em morcegos ou em guano desses animais (EMMONS, 1958; KAJIHIRO, 1965; FAVA NETO *et al.*, 1967; DISALVO *et al.*, 1969; SCHIMIDT *et al.*, 1973; DE REZENDE *et al.*, 2003; LYON *et al.*, 2004; SUGITA *et al.*, 2005; ULLOA *et al.*, 2006; BOTELHO *et al.*, 2012; TENCATE *et al.*, 2012). Esses fungos, encontram-se envolvidos na epidemiologia de doenças importantes, tais como a histoplasmose, paracoccidíoides, blastomicose, esporotricose,

criptococose, esporotricose humana e candidíase. Outras doenças, causadas por vírus, bactérias, protozoários e parasitas intracelulares, também podem estar associadas aos morcegos (BREDT *et al.*, 1998).

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1. Aspectos gerais dos morcegos

Os morcegos pertencem à ordem Chiroptera e são os únicos mamíferos que apresentam estruturas especializadas ao voo. Essa ordem apresenta 1.120 espécies conhecidas, atualmente, o que representa 22% das espécies de mamíferos descritos (REIS *et al.*, 2007). É dividida nas subordens: Yinpterochiroptera (6 famílias) e Yangochiroptera (13 famílias) (WETTERER *et al.*, em revisão, a, b). A segunda subordem está amplamente distribuída por todo o globo (SIMMONS, 2005), ocupando quase todos os ambientes terrestres, sendo encontrados em todos os continentes, exceto em algumas ilhas do Pacífico e regiões muito frias, como as calotas polares ou regiões de altitude extrema.

A maioria dos quirópteros utiliza um sistema muito eficiente de emissão e recepção de sons, a ecolocalização. Sons de alta frequência são emitidos pela boca ou pelo nariz, assim, esses animais conseguem orientar-se nas trilhas no interior de florestas, dentro de cavernas e, também, para a captura de presas (como os insetos alados) durante o voo (FENTON *et al.*, 1992).

A ecolocalização contribuiu para a diversificação de refúgios como cavernas, locas de pedra, minas, fendas em rochas e casca de árvores, cavidades nos troncos das árvores, folhagens, cupinzeiros e construções humanas; podendo os morcegos formar numerosas colônias ou de poucos indivíduos (REIS *et al.*, 2011).

A falta de planejamento nos ambientes urbanos também contribuiu para adaptação dos morcegos à cidade, pois as plantas utilizadas na arborização das vias públicas representam potencial fonte de alimento para os morcegos filostomídeos (MULLER & REIS, 1992; UIEDA, 1996). Igualmente, a iluminação pública é oportuna para os insetívoros, já que permite maior concentração dos insetos em torno dos pontos de luz (BLAKE *et al.*, 1994; RYDELL & RACEY, 1995).

Esses refúgios podem ser classificados em: **1) naturais**, aqueles produzidos como parte da dinâmica dos ecossistemas e **2) artificiais**, que costumam derivar da presença de

edificações humanas nas proximidades. Muitas espécies habitam mais de um tipo. Tais ambientes, de importantes implicações socioecológicas, classificam-se em diurnos e noturnos, de acordo com o período do dia em que são preferencialmente utilizados (FONSECA, 2006).

Em média, os morcegos têm um filhote por ano, mas podem ter dois ou três e, raramente, quatro (REIS *et al.*, 2007). Os insetívoros têm um período de gestação de dois a três meses, enquanto que os fitófagos, em torno de três a cinco meses. O mais longo período de gestação pertence aos morcegos hematófagos com, pelo menos, duas das três espécies tendo gestação de sete meses. O parto dos quirópteros, em geral, ocorre no abrigo, tanto no período diurno como no noturno, e os filhotes nascem sem pelos, em algumas espécies, ou já com uma pelagem tênue, em outras (BREDDT *et al.*, 1998).

Nos primeiros meses são alimentados com leite materno e, gradativamente, começam a ingerir o mesmo alimento dos adultos. Geralmente, as mães ensinam aos seus filhotes como conseguir e onde encontrar o alimento (BREDDT *et al.*, 1998).

Os recursos tróficos dos morcegos adultos são muito diversificados. Esses animais podem se alimentar de insetos, artrópodes, frutos, sementes, folhas, flores, pólen, néctar, pequenos vertebrados e sangue (REIS *et al.*, 2011). Devido a essa variedade de hábitos alimentares, cumprem importantes funções nos ecossistemas tropicais (GARDNER, 1977).

Os frugívoros por possuírem grande mobilidade (BERNARD & FENTON, 2003), são considerados importantes dispersores de sementes, o que é crucial na dinâmica e regeneração de florestas (WHITAKER & JONES, 1994). Várias espécies de vegetais dependem deles para a sua sobrevivência, seja para carregar o pólen de uma flor à outra, como também espalhar as sementes, incrementando as chances de germinar um novo exemplar distante da planta mãe (ESBÉRARD *et al.*, 1999).

Os insetívoros, que compreendem a maior parte das espécies (cerca de 70%) dos mamíferos voadores, auxiliam no controle de populações de diversos tipos de insetos, como besouros, mariposas, percevejos e pernilongos (BREDDT *et al.*, 1998). Estima-se que algumas espécies possam comer quantidades correspondentes a uma vez e meia o seu peso em uma única noite (GOODWIN & GREENHALL, 1961). A alimentação da maioria dos morcegos insetívoros, provavelmente, reflete a variação temporal, sazonal e geográfica na abundância de insetos, tendo eles alguma flexibilidade para selecionar suas presas (WHITAKER *et al.*, 1995; WHITAKER *et al.*, 1996).

Os morcegos podem ser utilizados como recurso alimentar para alguns povos na África e para algumas tribos no Brasil (SETZ & SAZIMA, 1987; SETZ, 1991); em estudos epidemiológicos, farmacológicos, de mecanismos de resistência a doenças e no desenvolvimento de vacinas (YALDEN & MORRIS, 1975) e ainda como fertilizante em países de clima temperado por meio das suas fezes (REIS *et al.*, 2007).

No entanto, apesar dos benefícios que esses mamíferos proporcionam à população, existem muitas crenças a respeito dos morcegos como, por exemplo, que são vampiros, gostam de se enrolar nos cabelos das mulheres ou, ainda, são “ratos velhos que criaram asas” (JARDIM, 2008). Além dessas crenças, esses animais são mal vistos devido: ao incômodo que causam, como, ao adentramento em edificações; às vocalizações emitidas; ao mau cheiro, decorrente da presença de colônias e do acúmulo de suas fezes e urina nos abrigos; à presença de fezes no interior dos cômodos ou em paredes, muros, bancos, carros; e aos voos rasantes realizados pelos morcegos fitófagos junto à fonte de alimento (PACHECO *et al.*, 2010).

Essa proximidade dos quirópteros com o ambiente urbano é uma grande preocupação em relação à saúde pública, uma vez que, esses animais podem constantemente veicular e transmitir zoonoses ao homem, tais como certas viroses, bacterioses e micoses. E podem abrigar uma diversidade de organismos endoparasitas e ectoparasitas, os quais podem causar ou veicular agentes patogênicos como protozoários, helmintos e artrópodes parasitas (BREDT *et al.*, 1998).

## *2.2. Morcegos e Saúde: potencial para transmissão de doenças ao homem e a outros animais*

### *2.2.1. Doenças emergentes e reemergentes*

Doenças emergentes são doenças que vêm surgindo nos últimos anos ou que já existiam e que vêm aumentando sua incidência. Quando se trata de doenças infecciosas emergentes e reemergentes, verificam-se dois principais focos de atenção: o surgimento ou identificação de novos problemas de saúde e novos agentes infecciosos; e a mudança no comportamento epidemiológico de doenças já descritas, incluindo a introdução de agentes conhecidos em novas populações de hospedeiros suscetíveis (CARVALHO *et al.*, 2009).

Os estudos relacionados com o aumento da incidência dessas doenças no mundo, mostram que as zoonoses são os principais aspectos que contribuem para essa ascensão, uma vez que, os animais são a origem de infecção em, aproximadamente, 75% dos casos de enfermidades causadas por patógenos. A emergência das doenças infecciosas ocorre tanto em

ambientes construídos ou transformados pelo homem, bem como em ambientes naturais (CONFALONIEIRI, 2010).

Os principais surtos de doenças infecciosas emergentes e reemergentes, documentados mundialmente nos últimos trinta anos são de origem animal e, grande parte deles, são provocados por vírus e bactérias (VERONA, 2008). Uma possível explicação para esclarecer a importância dos morcegos na transmissão e manutenção dessas doenças, está relacionada à diversidade de espécies de quirópteros, juntamente com a sua distribuição em todo o mundo, contribuindo para a biodiversidade de seus agentes patogênicos (KUZMIN *et al.*, 2011). É provável que esses patógenos utilizem-se da adaptação ao voo que esses animais apresentam como rota de dispersão e possibilidade de aquisição de novos nichos (DOBSON, 2005; CONFALONIEIRI, 2010). Os morcegos frugívoros podem dispersar agentes infecciosos presentes em sua saliva durante o voo ao lançar os frutos parcialmente digeridos no solo. Comportamento semelhante ocorre em espécies insetívoras, que eliminam as partes mais pesadas do corpo dos insetos que comem (DOBSON, 2005).

## 2.2.2. Principais patógenos humanos associados aos morcegos

### 2.2.2.1. Vírus

Os morcegos desempenham um importante papel na manutenção de vírus zoonóticos, atuando como vetores ou reservatórios naturais (SILVA, 2011). A mobilidade dos morcegos, associada à plasticidade no uso de abrigos e à diversidade de hábitos e itens alimentares, indica que eles podem transportar material viral para muitas espécies de animais (WOO *et al.*, 2009; KUZMIN *et al.*, 2011).

#### 2.2.2.1.1. *Lyssavirus*

Entre os vírus associados aos quirópteros, *Lyssavirus*, agente etiológico da raiva, é um dos mais importantes. A raiva é uma doença neural exclusiva dos mamíferos, afeta o sistema nervoso central e apresenta uma taxa de letalidade próxima a 100%. Os mamíferos carnívoros estão diretamente relacionados com sua transmissão, principalmente o cão e o gato na área urbana (SILVA *et al.*, 2011). Os morcegos hematófagos quando desenvolvem a raiva, podem apresentar mudanças em seu comportamento, como: atividade alimentar diurna, hiperexcitabilidade, agressividade, tremores, falta de coordenação dos movimentos, contrações musculares e paralisia. Já nos não hematófagos ocorre paralisia sem agressividade e excitabilidade, sendo encontrados, geralmente, em locais não habituais (PACHECO *et al.*,

2010). Entretanto, todos os morcegos infectados, assim como outros mamíferos silvestres e domésticos, morrem.

O papel dos morcegos hematófagos na transmissão de *Lyssavirus* é bem conhecido (RUPPRECHT *et al.*, 2002; SCHNEIDER *et al.*, 2009), entretanto, mais recentemente, esses animais passaram a receber maior atenção pela constatação em estarem envolvidos na transmissão dos agentes de outras doenças emergentes, como os vírus *Nipah*, *Hendra*, *Marburg*, *Menangle*, *Tioman*, *coronavirus* do tipo SARS e *Ebola* (KUZMIN *et al.*, 2011).

#### 2.2.2.1.2. *Ebola*

EVD (Ebola Viral Disease) é uma doença grave, considerada uma das doenças mais virulentas do mundo. É causada pelo vírus *Ebola* o qual teve as duas primeiras espécies (SUDV e ZEBOV) reconhecidas inicialmente, em 1976, durante os surtos simultâneos no Sudão e República Democrática do Congo (FORMENTY, 2008). O vírus é transmitido por contato direto com o sangue, fluidos corporais e tecidos, de animais infectados ou pessoas (OMS, 2014). Pourrut *et al.* (2007), identificou três espécies de morcegos frugívoros (*Hypsignathus monstrosus*, *Epomops franqueti* e *Myonycteris torquata*) em contato com o *Ebola*, indicando que estes animais podem estar agindo como um reservatório natural para o vírus mortal. Atualmente, o *Ebola* é responsável por uma epidemia no oeste da África que já matou mais de mil pessoas. Devido a este fato, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou emergência de saúde pública de alcance mundial (OMS, 2014).

#### 2.2.2.2. *Bactérias*

Muitas informações sobre a microbiota bacteriana gastrointestinal normal de morcegos e da presença ou ausência de bactérias patogênicas vêm de estudos microbiológicos tradicionais (ARATA *et al.*, 1968.; GORDON & FITZGIBB, 1999; DI BELLA *et al.*, 2003; ADESIYUN *et al.*, 2009). A maioria destes estudos, até agora, concentram em espécies bacterianas que podem representar uma ameaça potencial à saúde para os seres humanos ou animais domésticos (ARATA *et al.*, 1968.; ADESIYUN *et al.*, 2009; REYES *et al.*, 2011). Agentes patogênicos entéricos, tais como, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* e *Campylobacter*, ocasionalmente, têm sido encontrados em quirópteros (MUHLDORFER, 2013). Outras bactérias como *Borrelia*, *Bartonella* e *Neorickettsiaristicii* foram detectadas no sangue e em tecidos de órgãos de morcegos (HANSON, 1970; CONCANNON *et al.*, 2005; EVANS *et al.*, 2009; KOSOY *et al.*, 2010; LIN *et al.*, 2012). *Leptospira*, por sua vez, foi encontrada, em sua

maioria, em morcegos da família Phyllostomidae e, ocasionalmente, em espécies das famílias Vespertilionidae e Molossidae (MATTHIAS *et al.*, 2005; BESSA *et al.*, 2010).

#### 2.2.2.3. Protozoários

##### 2.2.2.3.1. Trypanosoma

A presença de *Trypanosomas* em quirópteros nas Américas e outras partes do mundo é conhecida desde 1898 (DIAS, 1935). As infecções mais frequentes são causadas por espécies dos subgêneros *Megatrypanum* e *Schizotrypanum* como: *T. heybergi*, *T. pessoai*, *T. dionisii*, *T. vespertilionis*, *T. rangeli*, *T. conorhini*, *T. cruzi marinkellei*, *T. cruzi*, entre outras (LIMA, 2011).

*Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da tripanossomíase americana. É transmitido por insetos triatomíneos, pela transfusão de sangue e transplante de órgãos (KIRCHHOFF, 2009; NOIREAU *et al.*, 2009). Infecções por *T. cruzi* têm sido observadas em hospedeiros mamíferos, incluindo as ordens: Carnivora, Chiroptera, Didelphimorphia, Primates, Rodentia e Xernathra (LISBOA *et al.*, 2008, 2009). Morcegos brasileiros apresentaram hemocultura positiva para *T. cruzi* (80% dos morcegos *Phyllostomus hastatus* capturados em uma mesma palmeira) (LISBOA *et al.*, 2008). Outras famílias de morcegos encontradas infectadas (15%) foram Molossidae, Noctilionidae e Vespertilionidae (NOIREAU *et al.*, 2009).

#### 2.2.2.4. Fungos

Nos últimos anos, tem sido comum a relação crescente de cepas resistentes a antifúngicos, bem como o aumento do número de infecções causadas por fungos ambientais, nunca antes diagnosticados como patógenos aos humanos e animais (NUCCI & MARR, 2005). Os morcegos podem participar do ciclo biológico de diversas espécies fúngicas e podem, também, ser vitimados por esses patógenos (SILVA, 2011). Por isso, a presença desses animais em um dado ambiente pode ser considerada um fator importante para o aumento do risco de aquisição de infecções (GALVÃO DIAS *et al.*, 2010).

##### 2.2.2.4.1. *Histoplasma capsulatum*

A relação dos morcegos com o fungo patogênico *H. capsulatum*, agente da histoplasmose, é conhecida há mais de cinco décadas. Emmons (1958) investigou o crescimento desse fungo em solos contaminados por fezes de morcegos ao estudar uma família que se mudou para uma casa em área rural em (Maryland, EUA), cujo sótão era habitado por morcegos. A presença de guano no sótão e nas áreas adjacentes à casa e o

isolamento de *H. capsulatum* de vários lugares ao redor da residência, sugeriram que essa era a fonte de infecção da doença. O fungo já foi isolado, tanto de amostras ambientais, tais como em solo e fezes de morcegos, quanto de amostras clínicas provenientes de animais silvestres e domésticos e do próprio homem (ZANCOPÉ-OLIVEIRA & WANKE, 1986; NAIF *et al.*, 1996).

Vários casos de histoplasmose disseminada em humanos têm sido assinalados em lactantes, idosos, transplantados, imunodeprimidos e pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (ALVES, 1998, CASSOTI *et al.*, 2006). Entretanto, a doença não se restringe somente a estas populações, pois trata-se de um fungo patogênico o qual não depende somente de fatores predisponentes do hospedeiro. No Brasil, Lacaz *et al.* (1999) e Levi *et al.* (2003) relataram casos de histoplasmose em indivíduos saudáveis.

#### 2.2.2.4.2. *Pneumocystis*

*Pneumocystis jirovecii* em pacientes imunocomprometidos, provoca pneumonia intersticial. Acredita-se que *Pneumocystis* coevoluíram com seus hospedeiros específicos, esses que compreendem primatas, roedores, carnívoros, morcegos, lagomorfos e marsupiais (ZUPAN & MLAKAR, 2011).

#### 2.2.2.4.3. *Blastomyces*

*Blastomyces dermatitidis* é endêmico na América do Norte. Esse fungo se desenvolve em água morna, solo úmido, especialmente o solo ácido, em áreas florestais marcada pela presença de entulho e vegetação decadente (RAYMOND *et al.*, 1997; CHAPMAN & SULLIVAN, 2009). É responsável por causar a blastomicose, uma doença granulomatosa crônica que envolve primariamente os pulmões, podendo, posteriormente, disseminar-se para vários órgãos e sistemas, originando lesões secundárias que ocorrem, frequentemente, nas mucosas, nos linfonodos, na pele e nas glândulas adrenais (LOPES *et al.*, 2011). Na literatura, esse fungo foi isolado em algumas espécies de morcegos (RANDHAWA *et al.*, 1985; RAYMOND *et al.*, 1997; CHAPMAN & SULLIVAN, 2009).

#### 2.2.2.4.4. *Paracoccidioides*

Grose & Tamsitt (1965) isolaram *P. brasiliensis* em amostras de fezes de *Artibeus lituratus*. Greer & Molaños (1977) procuraram esclarecer a função dos morcegos na ecologia de *P. brasiliensis*, no entanto, não conseguiram isolar o fungo do trato digestivo de *A. lituratus*, sugerindo que essa espécie provavelmente não tem um papel importante na disseminação do fungo na natureza.

#### 2.2.2.4.5. *Candida*

*Candida* é um fungo oportunista responsável por causar infecções fúngicas conhecidas como candidíases. Esse fungo está amplamente distribuído no ambiente a partir de dejetos de animais (mamíferos) e, frequentemente, coloniza pele e mucosas (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992; LACAZ *et al.*, 2002; CLEFF *et al.*, 2005; ANDRADE, 2006). Algumas espécies fazem parte da microbiota do trato gastrointestinal e reprodutivo em indivíduos saudáveis. Porém, são agentes causadoras mais frequentes de infecção fatal em indivíduos imunocomprometidos (COLOMBO *et al.*, 2006).

Esse gênero foi reportado por pesquisadores (MOK *et al.*, 1982; ULLOA *et al.*, 2006; BOTELHO *et al.*, 2012) em fezes e órgãos de morcegos. No entanto, além de *Candida* spp., outros fungos responsáveis por infecções cutâneas como *Microsporum* e *Trichophyton*, também foram associados aos quirópteros (KAJIHIRO, 1965; TENCATE *et al.*, 2012).

#### 2.2.2.4.6. *Cryptococcus*

*Cryptococcus* spp. são leveduras capsuladas, pertencentes a classe Basidiomycetes, que apresentam capacidade de infectar e causar doenças em uma larga variedade de hospedeiros, incluindo mamíferos, insetos e aves. Dentro do gênero *Cryptococcus*, existem, aproximadamente, 39 espécies descritas, porém *C. neoformans* e *C. gattii* destacam-se como os agentes etiológicos mais comuns da criptococose, micose oportunista, que acomete, principalmente, pacientes com imunidade celular comprometida (MORETTI *et al.*, 2008; COSTA, 2009).

*C. neoformans* e *C. gattii* podem ser encontrados em uma variedade de nichos, incluindo substratos orgânicos e habitats relacionados (construções antigas, torres de igreja, estábulos, forros, porões, barracões e cavernas), além de excretas de aves, fezes de morcegos e baratas, ninhos de vespas, frutas, sucos de frutas fermentados, microbiota intestinal de cavalos, leite, cavidade nasal e pele de cães, gatos e coalas, recintos de coelhos, buracos de tatus, solos, vegetais em decomposição e ocos de várias espécies de árvores (NIGRO *et al.*, 1987; LAZÉRA *et al.*, 1993; CASADEVALL & PERFECT, 1998; CONNOLLY *et al.*, 1999; TRILLES *et al.*, 2003). Apesar de *C. neoformans* e *C. Gatti* estarem associados aos morcegos (KAJIHIRO, 1965; TENCATE *et al.*, 2012), o primeiro relaciona-se, na maioria das vezes, com excretas acumuladas de aves, principalmente, pombos domésticos (GRANADOS & CASTAÑEDA, 2005; KOBAYASHI *et al.*, 2005). As excretas de aves, ricas em fonte de

nitrogênio, como ureia e creatinina, oferecem condições adequadas ao desenvolvimento deste fungo. Além disto, as aves servem como carreadoras, transportando a levedura em suas penas, patas e bicos (LIN, 2009). Apesar de, também, ser capaz de assimilar a creatinina, *C. gattii*, geralmente, não está associado às excretas de aves, devido, possivelmente, à regulação diferenciada de enzimas responsáveis por esse metabolismo (CASALI *et al.*, 2001). Entretanto, esse fungo mostrou-se presente em folhas, partes ocas do tronco e madeira em decomposição de eucaliptos, além de árvores nativas de espécies existentes em regiões dos continentes de clima tropical e subtropical. (ELLIS & PFEIFFER, 1990; KWON-CHUNG & BENNET, 1992; LACAZ, 2002; RANDHAWA *et al.*, 2006).

### 2.3. Considerações finais

À medida que a literatura registra casos de morcegos contaminados com microrganismos potencialmente patogênicos em múltiplos ambientes urbanos, o controle desses animais torna-se mais uma questão emergente para os serviços de saúde pública (GERMANO, 1994; CUNHA *et al.*, 2006). No entanto, a crença popular de que todos os morcegos são portadores de muitas doenças é errônea. Apesar de saber-se que já foram encontrados morcegos albergando uma variedade de microrganismos nocivos ou, potencialmente nocivos, a transmissão de zoonoses aos seres humanos não é frequente (BREDT *et al.*, 1998). No entanto, devem ser efetuadas medidas de controle e manejo para evitar possíveis infecções. As ações recomendadas para auxiliar na solução de problemas causados por morcegos em áreas urbanas envolvem um monitoramento constante e adequação das edificações para evitar os problemas decorrentes da instalação de colônias (JARDIM, 2008).

## 3. Referências

ADESIYUN, A. A.; STEWART-JOHNSON, A.; THOMPSON, N. N. Isolation of enteric pathogens from bats in Trinidad. **Journal of Wildlife Diseases**. v. 45, p. 952-961, 2009.

ALVES, K. S. **Histoplasmoze disseminada e síndrome de imunodeficiência adquirida: estudo clínico-laboratorial de 28 casos**. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

ANDRADE, J. B. **Estudo Microbiológico e Citológico do Trato Genital de Gatas Domésticas**. Seropédica: UFRRJ, 2006. 43f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Veterinária)- Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2006.

- ARATA, A. A. et al. *Salmonella* and *Shigella* infections in bats in selected areas of Columbia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 17, p. 92-95, 1968.
- BERNARD, E.; FENTON, M. B. Bat mobility and Roosts in a Fragmented Landscape in Central Amazonia, Brazil. **Biotropica**. v. 35, n. 2, p. 262-277, 2003.
- BESSA, T. A. A. et al. The contribution of bats to leptospirosis transmission in São Paulo City, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 82, p. 315-317, 2010.
- BLAKE, D. et al. Use of lamplit roads by foraging bats in southern England. **Journal of Zoology**. v. 234, p. 453-462, 1994.
- BLEHERT, D. S.; HICKS, A. C.; BEHR, M. et al. Bat white-nose syndrome: an emerging fungal pathogen? **Science**. p. 323;227, 2009.
- BOTELHO, N. S. et al. *Candida* Species Isolated from Urban Bats of Londrina-Paraná, Brazil and their Potential Virulence. **Zoonoses and public health**. v. 59, n. 1, p. 16-22, 2012.
- BREDT, A. et al. Morcegos em áreas urbanas e rurais: manual de manejo e controle. Brasília, DF: Fundação Nacional de Saúde. Ministério da Saúde. 1998.
- CANO, M. V. C.; HAJJEH, R. A. The epidemiology of histoplasmosis: a review. **Seminars in Respiratory Infections**. v. 16, n. 2, p. 109-118, 2001.
- CHAPMAN, S. W.; SULLIVAN, D. C. *Blastomyces dermatitidis*. In: MANDEL G. L.; BENNETT, J. E. Dolin, editors. **Principles and practice of infectious diseases**. Philadelphia: Elsevier, 2009. p. 3319-3332.
- CARVALHO, J. A. et al. Doenças emergentes: uma análise sobre a relação do homem com o seu ambiente. **Revista Práxis**. v. 1, 2009.
- CASADEVALL, A.; PERFECT, J. R. *Cryptococcus neoformans*. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 1998. 541 p.
- CASALI, A. K. et al. *Cryptococcus neoformans*: aspectos moleculares e epidemiológicos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.20, p.34-37, 2001.
- CASSOTI, J. A. S. et al. Disseminated histoplasmosis in HIV positive patients in Espírito Santo State, Brazil: a clinical-laboratory study of 12 cases (1999-2001). **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 10. n. 5, p. 327-330, 2006.
- CLEFF, M. B. et al. Isolation of *Candida* spp from vaginal microbiota of healthy canine females during estrous cycle. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 201-204, 2005.
- COLOMBO, A. L. et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 44, p. 2816-2823, 2006.
- CONCANNON, R. et al. Molecular characterization of haemoparasites infecting bats (Microchiroptera) in Cornwall, UK. **Parasitology**. v. 131, p. 489-496, 2005.

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

CONNOLLY, J. H. et al. Asymptomatic carriage of *Cryptococcus neoformans* in the nasal cavity of the koala (*Phascolarctos cinereus*). **Medical Mycology**, v.37, p.331-8, 1999.

COSTA, A. K. F. **Análise fenotípica e molecular de cepas de *Cryptococcus* spp. obtidas de fontes ambientais e clínicas**. Ceará: UEC, 2009. Tese (Doutorado)- Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, Ceará, 2009.

CUNHA, E. M. et al. Bat rabies in the north-northwestern regions of the state of São Paulo, Brazil: 1997-2002. **Revista de Saúde Pública**. v. 40, p. 1082-1086, 2006.

DE REZENDE, C. C.; DUARTE, D.C.; FILIÚ, W. F. O. Pesquisa de *Cryptococcus neoformans* e *Histoplasma capsulatum* na gruta lago azul, Bonito-MS. In: CONGRESSO DE ESPELEOLOGIA, 2003, Januária- MG. **Anais XXVII Congresso Brasileiro de Espeleologia**, Januária: 2003. CD-ROM.

DIAS, E. Revisão geral dos hemoflagelados de Chirópteros. Estudo experimental do *Schizotrypanum cruzi*. Identidade com *Schizotrypanum cruzi*. O grupo Vespertilionis. **IX Reunião da Sociedade Argentina de Patologia Regional**. v. 1, p. 10-88, 1935.

DI BELLA, C. et al. Enteric microflora in Italian Chiroptera. **Journal Mountain cology**. v. 7, p. 221-224, 2003.

DI SALVO, A. F. et al. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from Arizona bats. **American journal of epidemiology**. v. 89, n. 5, p. 606-614, 1969.

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

ELLIS, D. H.; PFEIFFER, T. J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, p.1642-4, 1990.

EMMONS, C.W. Association of Bats with Histoplasmosis. **Public Health Reports**. v. 73, n.7, p. 590-595, 1958.

ESBÉRARD, C.E.L. et al. Um Falso Perigo: Morcegos Urbanos. **Vetores & Pragmas**. v. 1, p. 20-29, 1999.

EVANS, N. J. et al. Fatal borreliosis in bat caused by relapsing fever spirochete, United Kingdom. **Emerging Infectious Diseases**. v. 15, p. 1331-1333, 2009.

FAVA-NETTO, C. et al. Histoplasmosse epidêmica. Estudo clínico, radiológico, micológico e imunológico de surto ocorrido no Estado de São Paulo, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**. São Paulo, v. 9, p. 222-232, 1967.

FENTON, M. B. et al. Phyllostomid bats (Chiroptera: Phyllostomidae) as indicators of habitat disruption in the neotropics. **Biotropica**. v. 24, n. 3, p. 440-446, 1992.

FONSECA, R. T. D. **Diversidade da Quiropterofauna (Mammalia) no Parque Ecológico de Gunma, Santa Bárbara do Pará.** Belém: UFPA, 2006. 106 p. Dissertação (Mestrado)-Museu Paraense Emilio Goeldi, Universidade Federal do Pará, Belém, 2006.

FORMENTY, P. Ebola-Marburg viral diseases. In: HEYMANN, D. L. **Control of communicable diseases manual.** Washington: American Public Health Association, 2008.

GALVÃO DIAS, M. A. et al. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from bats in the urban area of São Paulo State, Brazil. **Epidemiology and Infectious**, p. 1-3, 2010.

GARDNER, A. Feeding habits. In: BAKER, R.J.; JONES, J.K.; CARTER, D.C. (Eds.). **Biology of bats of the new world family Phyllostomatidae. Part II.** Huston: Special Publications Museum Texas Tech University, 1977. p. 293-350.

GERMANO, P. M. L. Avanços na Pesquisa da raiva. **Revista de Saúde Pública.** v. 1, p. 86-91, 1994.

GOODWIN, C. G.; GREENHALL, A. M. A review of the bats of Trinidad and Tobago. **Bulletin of the American Museum of Natural History.** v. 122, p. 187-302, 1961.

GORDON, D. M.; FITZGIBBON, F. The distribution of enteric bacteria from Australian mammals: host and geographical effects. **Microbiology.** v. 145, p. 2663-2671, 1999.

GRANADOS, D. P.; CASTAÑEDA, E. Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* varieties recovered from natural sources in Bogotá, Colombia, and study of ecological conditions in the area. **Microbial Ecology.** v.49, p. 282-90, 2005.

GREER, D. L.; MOLANOS, B. Role of bats in the ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: the of *Paracoccidioides brasiliensis* in the intestinal tract of frugivorous bat, *Artibeus lituratus*. **Sabouraudia.** v. 15, p. 273-282, 1977.

GROSE, E.; TAMSITT, J. R. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia, S.A. **Sabouraudia**, v. 4, p. 124-125, 1965.

HANSON, A. W. Isolation of spirochaetes from primates and other mammalian species. **The British Journal of Venereal Diseases.** v. 46, p. 303-306, 1970.

JARDIM, M. M. A. **Morcegos urbanos: Sugestões para o controle em escolas públicas estaduais de Porto Alegre.** Museu de Ciências Naturais: Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul. 2008.

KAJIHIRO, E. S. Occurrence of dermatophytes in fresh bat guano. **Applied microbiology.** v. 13, n. 5, p. 720-724, 1965.

KIRCHHOFF, L. V. *Trypanosma* species (American trypanosomiasis, Chagas' disease): biology of trypanosomes. In: Mandell G. L.; Bennett J. E. Dolin, editors. **Principles and practice of infectious diseases.** Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, 2009. p. 3481-3488.

KNOW-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. **Medical Mycology.** Philadelphia: Lea e Figiber, 1992.

KOBAYASHI, C. C. B. A. et al. Characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from urban environmental sources in Goiânia, Goiás, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v.47, n.4, p. 203-207, 2005.

KOSOY, M. et al. *Bartonella* spp. in bats, Kenya. **Emerging Infectious Diseases**. v. 16, p. 1875-1881, 2010.

KUZMIN, I. et al. Bats, emerging infectious diseases, and the rabies paradigm revisited. **Emerging Health**, 2011.

LACAZ, C.S. et al. Histoplasmose cutânea disseminada atípica em criança imunocompetente, causada por uma variedade “aberrante” de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 1, n. 3, p. 195- 202, 1999.

LACAZ, C. S. Histoplasmose. In: LACAZ, C. S. et al.(ed.). **Tratado de Micologia Médica Lacaz**. São Paulo: Sarvier. p. 594-617. 2002.

LAZÉRA, M. S.; WANKE, B.; NISHIKAWA, M. M. Isolation of both varieties of *Cryptococcus neoformans* from saprophytic sources in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**. v. 31, p. 449-54, 1993.

LEVI, G. C. et al. Histoplasmose do Sistema Nervoso Central como única manifestação da doença em pacientes imunocompetentes: apresentação de dois casos. **Arquivos de Neuropsiquiatria**. v. 61, n. 3B, p. 859-863, 2003.

LIMA, L. **Diversidade morfológica, biológica e genética, e relações filogenéticas de *trypanosomas* de morcegos do Brasil e Moçambique (África)**. São Paulo: USP, 2011. 57 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

LIN, J. W. et al. Identification of novel *Bartonella* spp. in bats and evidence of Asian gray shrew as a new potential reservoir of *Bartonella*. **Veterinary Microbiology**. v. 156, p. 119-126, 2012.

LIN, X. *Cryptococcus neoformans*: Morphogenesis, infection, and evolution. **Infection, Genetics and Evolution**. v. 9, p. 401-416, 2009;

LISBOA, C. V.; PINHO, A. P.; HERRERA, H. M. et al. *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) genotypes in neotropical bats in Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 156, p. 314-318, 2008.

LISBOA, C. V. et al. Ecology of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle: dispersion of zymodeme 3 (Z3) in wild hosts from Brazilian biomes. **Veterinary Parasitology**. v. 165, p. 19-24, 2009.

LOPES, G. et al. Blastomicose sul americana - apresentação de caso clínico tratado com associação de inidazóis sistêmico e tópico. **Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial**. v. 52, n. 2, p. 83-88, 2011.

LYON, G. M. et al. Histoplasmosis associated with exploring a bat-inhabited cave in Costa Rica, 1998-1999. **American Journal of Tropical Hygiene**. v. 70, n. 4, p. 438-442, 2004.

- MATTHIAS, M. A. et al. Diversity of bat-associated *Leptospira* in the Peruvian Amazon inferred by babesian phylogenetic analysis of 16S ribosomal DNA sequences. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 73, p. 964-974, 2005.
- MOK, W. Y.; LUIZÃO, R. C.; BARRETO, M. S. Isolation of fungi from bats of the Amazon basin. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 44, n. 3, p. 570, 1982.
- MORETTI, M. L. et al. Consenso em criptococose-2008. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 41, n. 5, p. 524-44, 2008.
- MÜHLDORFER, K. Bats and Bacterial Pathogens: A Review. **Zoonoses and Public Health**. v. 60, p. 93-103, 2013.
- MULLER, M. F.; REIS, N. R. Partição de recursos alimentares entre quatro espécies de morcegos frugívoros (Chiroptera, Phyllostomidae). **Revista brasileira de Zoologia**. v. 9, n.3-4, p. 345-355, 1992.
- NAIFF, R.D. et al. New records of *Histoplasma capsulatum* from wild animals in the Brazilian Amazon. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 38, n. 4 p.273-277, 1996.
- NIGRO, N. T. M. R. C. et al. Isolamento de *Cryptococcus neoformans* de fezes de pombos, do solo e ninhos de pombos. **Revista Brasileira de Medicina**. v. 44, n. 1-2, p. 6-9, 1987.
- NOIREAU, F.; DIOSQUE, P.; JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi*: adaption to its vectors and its hosts. **Veterinary Research**. v. 40, p. 26, 2009.
- NUCCI, M.; MARR, K. A. Emerging fungal diseases. **Emerging Infectious Diseases**, v. 41, p. 521-526, 2005.
- OMS. **Ebola virus disease (EVD)**, 2014. Disponível em: < <http://www.who.int/en/>>. Acesso em: 12 de Ago. 2014.
- PACHECO, S. M. et al. Morcegos urbanos: status do conhecimento e plano de ação para a conservação no Brasil. **Chiroptera neotropical**. v. 16, n. 1, p. 629-647, 2010.
- POURRUT, X. et al. Spatial and temporal patterns of Zaire ebolavirus antibody prevalence in the possible reservoir bat species. **The Journal of infectious diseases**. v. 2, p. 176-183, 2007.
- PUECHMAILLE, S. J.; VERDEYROUX, P., FULLER, H. et al. White-nose syndrome fungus (*Geomyces destructans*) in bat, France. **Emerging Infectious Diseases**. v. 16, p. 290-293. 2010.
- RANDHAWA, H. S. et al. *Blastomyces dermatitidis* in bats: first report of its isolation from the liver of *Rhinopoma hardwickei hardwickei*, gray. **Sabouraudia**. v. 23, p. 69-76, 1985.
- RANDHAWA, H. S. et al. Distribution of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* in decayed trunk wood of *Syzygium cumini* trees in north-western India. **Medical Mycology**. v. 44, n. 7, p. 623-630, 2006.
- RAYMOND, J. T. et al. Pulmonary blastomycosis in an Indian fruit bat (*Pteropus giganteus*). **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 9, p. 85-87. 1997.

REIS, N. R.; LIMA, I. P.; PERACCHI, A. L. Morcegos (Chiroptera) da área urbana de Londrina Paraná- Brasil. **Rev. Bras. Zool.** v. 19, n. 3, p. 739-746, 2002.

REIS, N. R. et al. **Mamíferos do Brasil**. Londrina: Nélío R. dos Reis, 2011.

REIS, N. R. et al. **Morcegos do Brasil**. Londrina: Nélío R. dos Reis, 2007.

REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; SANTOS, G. A. S. D. **Ecologia de Morcegos**. Technical Books, 2008.

REYES, A. W. et al. Polymerase chain reaction assay and conventional isolation of *Salmonella* spp. from Philippine bats. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 39, p. 947, 2011.

RUPPRECHT, C.; HANLON, C.; HEMACHUDHA, T. Rabies re-examined. **The Lancet Infectious Diseases**. v. 2, n. 6, p. 327-343, 2002.

RYDELL, J.; RACEY, P. A. Street lamps and the feeding ecology of insectivorous bats. **Zoological Symposium**. v. 67, p. 291-307, 1995.

SCHMIDT, S.; MACHADO, O. P.; GALVÃO, A. B. Microepidemia de histoplasmose na zona rural de Brasília, DF, 1967. II. Estudos epidemiológico e parasitológico da fonte de infecção. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. São Paulo, v. 8, p. 159-165, 1973.

SCHNEIDER, M. C. et al. Rabies transmitted by vampire bats to humans: an emerging zoonotic disease in Latin America? **Pan American Journal of Public Health**. v. 25, p. 260-269, 2009.

SETZ, E. Z. F. Animals In The Nambiquara Diet: Methods Of Collection And Processing. **Journal of Ethnobiology**. v. 11, n. 1, p. 1-22, 1991.

SETZ, E. Z. F.; SAZIMA, I. Bats eaten by Nambiquara indians in Western Brazil. **Biotropica**. Washington, v. 19, n. 2, p. 190-190, 1987.

SILVA, K. R. C. **Quirópteros como hospedeiros do fungo *Coccidioides posadasii*: descrição do primeiro registro de isolamento**. Fortaleza: UFC, 2011. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Ceará, 2011.

SILVA, R. C.; LANGONI, H.; SU, C.; SILVA, A. V. Genotypic characterization of *Toxoplasma gondii* in sheep from Brazilian slaughterhouses: new atypical genotypes and the clonal type II strain identified. **Veterinary Parasitology**. Amsterdam, v. 175, n. 1-2, p. 173-177, 2011.

SIMMONS, N. B. Order Chiroptera. In: WILSON, D. E.; REEDER, D. M. (Eds.). **Mammal Species of the World: a taxonomic and geographic reference**. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2005.

SUGITA, T. et al. *Trichosporon* species isolated from guano samples obtained from bat-inhabited caves in Japan. **Applied and environmental microbiology**. v. 71, n. 11 p. 7626-7629, 2005.

TENCATE, L. N. et al. Estudo da microbiota fúngica gastrintestinal de morcegos (Mammalia, Chiroptera) da região noroeste do estado de São Paulo: potencial zoonótico. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. São Paulo, v. 49, n. 2, p. 146-152, 2012.

TRILLES, L. et al. Genetic characterization of environmental isolates of the *Cryptococcus neoformans* species complex from Brazil. **Medical Mycology**, v.41, p.383-90, 2003.

UIEDA, W. Morcegos fitófagos e a arborização de Brasília, Distrito Federal. Relatório Final. FAPESP/UNESP. p. 77, 1996.

ULLOA, M. et al. Contribution to the study of the mycobiota present in the natural habitats of *Histoplasma capsulatum*: an integrative study in Guerrero, Mexico. **Revista Mexicana de Biodiversidad**. v. 77, n. 2, p. 153-168, 2006.

VERONA, C. E. S. **Parasitos em sagui-de-tufo-branco (Callithrix jacchus) no Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008. 116 p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, 2008.

WETTERER, A. L.; SIMMONS, N. B.; GUNNELL, G. F. Yangochiroptera. In: QUEIROZ, K.; GAUTHIER, J.; CANTINO, P. (eds.). **The Phylocode Companion Volume**. University of California Press. (em revisão, a).

\_\_\_\_\_. Yinpterochiroptera. In: QUEIROZ, K.; GAUTHIER, J.; CANTINO, P. (eds.). **The Phylocode Companion Volume**. University of California Press. (em revisão, b).

WHITAKER, R. J. et al. Dietary Variation in the Mexican Free-Tailed Bat (*Tadarida brasiliensis mexicana*). **Journal of Mammalogy**. v. 77, n. 3, p. 716-724, 1996.

WHITAKER, R. J. et al. Food of the big brown bat *Eptesicus fuscus* from maternity colonies in Indiana and Illinois. **American Midland Naturalist**. v. 134, p. 346-360, 1995.

WHITAKER, R. J.; JONES, S. H. The role of frugivorous bats and birds in the rebuilding of a tropical forest ecosystem, Krakatau, Indonesia. **Journal of Biogeography**. v. 21, p. 245-258, 1994.

WOO, P. C. et al. *Coronavirus* diversity, phylogeny and interspecies jumping. **Experimental Biology and Medicine**. v. 234, p. 1117-1127, 2009.

YALDEN, D. W.; MORRIS, P. A. **The lives of bats**. London: Red Wood Burn, 1975.

ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; WANKE, B. Isolamento do *Histoplasma capsulatum* de animais silvestres no município do Rio de Janeiro. **Cadernos de Saúde Pública**. v. 2, p. 42-53, 1986.

ZUPAN, J. L.; MLAKAR, S. L. **Bats: Biology, behavior and conservation**. New York: Nova, 2011.

## CAPÍTULO 2

### **Comparação de métodos para isolar leveduras em fezes de morcegos.**

Artigo elaborado e formatado conforme as normas para publicação científica no periódico *Journal of Microbiological Methods*.

## ANEXO 1

### Instruções para preparação de manuscritos

#### *Use of word processing software*

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

#### *Subdivision - numbered sections*

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

#### *Introduction*

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

#### *Material and methods*

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

#### *Theory/calculation*

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

#### *Results*

Results should be clear and concise.

#### *Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

#### *Conclusions*

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

#### *Glossary*

Please supply, as a separate list, the definitions of field-specific terms used in your article.

#### *Appendices*

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

### ***Essential title page information***

- ***Title.*** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- ***Author names and affiliations.*** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.
- ***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### ***Abstract***

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. For 'Notes' Abstract should be no longer than 50 words.

### ***Graphical abstract***

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of  $531 \times 1328$  pixels (h  $\times$  w) or proportionally more. The image should be readable at a size of  $5 \times 13$  cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

### ***Highlights***

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

**Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

**Abbreviations**

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

**Acknowledgements**

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

**Database linking**

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

**Footnotes**

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

**Table footnotes**

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

**Image manipulation**

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

**Electronic artwork****General points**

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.

- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

### *Formats*

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

### *Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

### *Figure captions*

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

### *Text graphics*

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. If you are working with LaTeX and have such features embedded in the text, these can be left. See further under Electronic artwork.

### *Tables*

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article. Tables should be compiled on separate pages with a short descriptive title, and legend if required, and numbered consecutively.

### *References*

#### *Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with

either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

### *Reference links*

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

### *Reference formatting*

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

References should be listed by author name and year of publication in parentheses in the body of the text [i.e.(Crissman and Hadley, 1995) two authors; (Crissman et al., 1998) more than two authors] and listed alphabetically in the reference section. References to journals should contain the names and initials of all authors, the year of publication, the title of the paper, the title of the periodical abbreviated according to List of Serial Title Word Abbreviations (available from the International Serials Data System, 20 rue Bachaumont, 75002 Paris, France. ISBN 2-904938-02-8), the volume number, and page number. References to books should also include the title of the book, the editors, and publishers. See examples below.

Schüler, D., Uhl, R., Bäuerlein, E., 1995. A simple light scattering method to assay magnetism in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. FEMS Microbiol. Lett. 132, 139--145.

Tyssen, P., 1993. Hybridization with nucleic acid probes. In: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 24, Elsevier, Amsterdam, pp. 375-436.

Shockman, G.D., Höltje, J.-V., 1994. Microbial peptidoglycan (murein) hydrolase. In: Ghuysen, J.-M., Hakenbeck, R.(Eds.), Bacterial Cell Wall. Elsevier, Amsterdam, pp. 131- 166.

### *Reference style*

*Text:* All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically. Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al.(2010) have recently shown ....'

*List:* References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

*Examples:*

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book: Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

## RESUMO

Estudos das interações entre morcegos e agentes patogênicos humanos vêm crescendo desde a década de 50. A associação das fezes de morcegos à disseminação de patógenos reflete nas questões de saúde pública e, portanto, esses animais encontram-se envolvidos na epidemiologia de doenças importantes, tal como a criptococose, ocasionada pelo fungo *Cryptococcus* sp. Para obter o isolamento desses agentes, diversas metodologias têm sido utilizadas. No entanto, apesar dessa diversidade, não existe uma definida como a mais eficaz para esses tipos de isolamentos. Dessa forma, teve-se o objetivo de comparar diferentes processamentos de amostras de fezes de morcegos em laboratório, a fim de verificar qual a forma mais eficiente para isolar leveduras desse material. Com base nas metodologias descritas na literatura, foram definidas três formas distintas para processar as amostras. A partir de uma suspensão inicial (fezes e salina), foram realizados os processamentos. O processamento 1 caracterizou-se pela homogeneização da suspensão, o processamento 2 pela decantação, e o processamento 3 pela centrifugação. Após experimento, verificou-se que o processamento 2, caracterizado pela decantação da suspensão, proporcionou melhor crescimento de leveduras, ou seja, maior isolamento e menor crescimento de contaminantes; e, portanto, foi considerado a forma mais eficiente para isolar leveduras potencialmente patogênicas em fezes de morcegos nesse estudo.

**Palavras-chave:** Quirópteros, guano, microrganismos, técnica, leveduras

## 1. Introdução

As áreas urbanas fornecem meios de sobrevivência para muitas espécies de morcegos (Jardim, 2008). As edificações, bem como a arborização, propiciam diversos abrigos a esses animais (Kotait et al., 2003). Além disso, nessas áreas, os morcegos também encontram alimentos disponíveis como, insetos, flores e frutos (Jardim, 2008), tornando-os, assim, mais próximos ao homem. Essa proximidade dos quirópteros com o ambiente urbano é uma grande preocupação em relação à saúde pública, uma vez que, esses animais podem veicular e transmitir agentes importantes responsáveis por zoonoses ao homem, tais como, viroses, bacterioses e micoses (Bredt et al., 1998). Um exemplo a este fato, é a presença frequente de leveduras potencialmente patogênicas ao homem em amostras de fezes de quirópteros (Emmons, 1958; Kajihiro, 1965; De Rezende et al., 2003; Sugita et al., 2005; Ulloa et al., 2006; Tencate et al., 2012). Uma possível explicação para essa interação (fungos e fezes de morcegos) estaria relacionada às características físico-químicas do ambiente, como, textura e acidez do solo, associadas às excretas de morcegos, as quais podem atuar como substrato adequado para crescimento, desenvolvimento e disseminação de microrganismos (Cano e Hajjeh, 2001).

Existem registros de microepidemias de histoplasmose e criptococose, doenças ocasionadas por *Histoplasma capsulatum* e *Cryptococcus* sp., respectivamente, em pessoas que foram infectadas após visitarem locais que possuíam contaminação maciça de fezes de morcegos ou aves (Fava Netto et al., 1967; Schmidt et al., 1973; Fava Netto et al., 1976; Machado et al., 1993; Suzaki et al., 1995; Taylor et al., 1999; Peçanha-Martins et al., 2000; Cury et al., 2001; Julg et al., 2008; Vicentini-Moreira et al., 2008). Na literatura, outros fungos, como, *Acremonium* sp., *Aspergillus* spp., *Candida* spp., *Cladosporium* sp., *Coccidioides* spp., *Fusarium* sp., *Microsporum* spp., *Paracoccidioides brasiliensis*, *Penicillium* spp., *Sporothrix* sp., *Rhodotorula* sp., *Sporotrichum* sp., *Trichophyton* spp. e *Trichosporons* spp., também já foram descritos em fezes de morcegos (Kajihiro, 1965; Sugita et al., 2005; Ulloa et al., 2006; Botelho et al., 2012; Tencate et al., 2012).

Entretanto, para isolar leveduras em fezes de quirópteros, diversas metodologias têm sido propostas. Sugita et al. (2005) investigaram a suspensão das fezes em Caldo Malte Levedura (YM) e inoculação do sobrenadante em placa de Ágar Malte Levedura (YM). Botelho et al. (2012), amostraram as fezes de morcegos, diretamente do ânus, utilizando swab, o qual foi mergulhado em Sabouraud Caldo Dextrose (SDB) para obter o crescimento de leveduras. Em contrapartida, Chichon et al. (2011); De Rezende et al. (2003) e Kajihiro

(1965), diluíram amostras coletadas em solução salina, e após decantação dos resíduos, semearam o sobrenadante em placas de petri contendo o meio de cultivo Ágar Níger (NSA). Outra forma também verificada, foi a centrifugação do sobrenadante (resultante da suspensão das fezes em salina) e sua inoculação nos meios Brain Heart Infusion (BHI) e Mycobiotic agar (MA) (Ulloa et al., 2006).

Apesar das diferentes metodologias reportadas, não existe uma definida como a mais eficaz para esses tipos de isolamentos. Sendo assim, esse estudo teve como objetivo comparar diferentes processamentos de amostras em laboratório, a fim de verificar qual o mais eficiente em isolar leveduras potencialmente patogênicas a partir das fezes de morcegos.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Coleta das amostras**

As amostras de fezes de morcegos, utilizadas no presente estudo, foram provenientes de um forro residencial colonizado por morcegos, em Maringá, o qual de acordo com informações fornecidas pelo morador, permanecia sempre fechado e raramente era frequentado. A coleta do material foi efetuada em 21 de junho de 2013, às 9 horas. Foram determinados 4 locais de amostragem (I, II, III, e IV), os quais caracterizavam-se pela maciça quantidade de fezes de morcegos. As amostras coletadas (Amostra A e Amostra B), foram condicionadas em frasco coletor universal de polipropileno estéril (80 ml). Buscou-se abranger em um único frasco os 4 locais pré-determinados, assim, cada amostra apresentava aproximadamente 3g de fezes por local, totalizando 12g ao final. Após coleta, o material foi encaminhado ao Laboratório de Micologia Médica da Universidade Estadual de Maringá- PR, dentro de 24 horas. Para garantir a biossegurança e evitar contaminação dos materiais, o experimento foi realizado em cabine de proteção biológica modelo BIO seg 06-classe II tipo A1. Todos os procedimentos empregados foram realizados de acordo com a licença permanente para coleta de material zoológico do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio sob número: 17869-3 (data da emissão: 14/09/2012), da aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Maringá e da Secretaria de Saúde do Município.

### **2.2. Meio de cultura utilizado e incubação**

Independente do processamento realizado na amostra, foi utilizado para cultura dos microrganismos, o meio Saboraud Dextrose Ágar (Himedia, Mumbai Índia), pH 5.6, acrescido de 200 µg/mL de cloranfenicol (Sigma) (SDAC) em placa de Petri 90x15 mm. Para suspensão da amostra foi utilizado solução salina 0,85%, acrescida de 200 µg/mL de cloranfenicol (SC). Os processamentos foram feitos em duplicata, e as amostras foram semeadas para o meio selecionado (SDAC) com auxílio de pérolas de vidro esterilizadas, as quais, após o uso, eram descartadas. O período de incubação foi de 1 até 5 dias a 25°C, sendo verificado diariamente.

### 2.3. Processamento 1- Amostra homogeneizada

Um grama da amostra pura, macerada, foi inserida em tubo cônico de 50 mL. Foram adicionados 30 mL de solução salina (SC). A suspensão foi agitada em Vórtex por 30 segundos e, imediatamente após a homogeneização, 100 µL foi semeada em meio SDAC.

### 2.4. Processamento 2- Amostra decantada

Um grama da amostra pura, macerada, foi inserida em tubo cônico de 50 mL. Foram adicionados 30 mL de solução salina (SC). A suspensão foi agitada em Vórtex por 30 segundos. Após homogeneização, permaneceu em repouso para decantação, por 30 minutos. Posteriormente, 100 µL do sobrenadante foi semeado para meio de cultura SDAC.

### 2.5. Processamento 3- Amostra centrifugada

Um grama da amostra pura, macerada, foi inserida em tubo cônico de 50 mL. Foram adicionados 30 mL de solução salina (SC). A suspensão foi agitada em Vórtex por 30 segundos. Após decantação, 1,5mL do sobrenadante foi transferido para eppendorf de 2 mL e submetido à centrifugação por 13000 RPM, por 5 minutos. Um total de 100 µL do *pellet* e parte inferior do sobrenadante foram semeados para meio SDAC.

### 2.6. Critérios de interpretação das colônias

Para diferenciar as colônias de fungos (leveduriformes e filamentosas) e bactérias, seguiram-se os critérios segundo a ANVISA (Levy et al., 2004). considerando: o crescimento do isolado em SDAC; a microscopia direta e a observação macroscópica. Os aspectos microscópicos observados foram: estruturas fúngicas globosas, ovaladas, ovaladas-alongadas, arredondadas, presença de cápsula, tamanho das células; e aspectos macroscópicos: superfície lisa ou rugosa, coloração, aspecto cremoso, mucoide ou seco.

## 3. Resultados

Os resultados dos processamentos testados foram obtidos após três dias de incubação das placas. Nas placas do processamento 1 (Fig. 1.a) houve o crescimento de colônias filamentosas bem delimitadas, o que não prejudicou o isolamento de leveduras, entretanto, a presença de colônias leveduriformes foi mínima.

Nas placas do processamento 2 (Fig. 1.b), houve o crescimento de colônias filamentosas bem delimitadas. Esse tratamento permitiu o isolamento do maior número de colônias leveduriformes.

Nas placas do processamento 3 (Fig. 1.c), a presença de contaminantes filamentosos não ocorreu em 100% da superfície do SDAC, contudo, as colônias de aspecto leveduriforme, foram escassas.

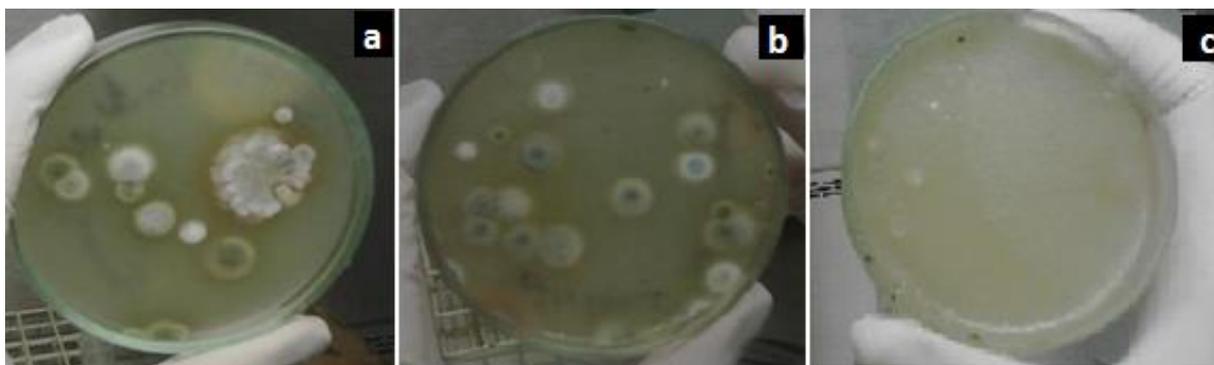


Fig. 1. Crescimento de colônias fúngicas provenientes de fezes de morcegos em diferentes processamentos da amostra. (a) processamento 1; (b) processamento 2; (c) processamento 3.

Em relação às colônias cremosas, foram obtidas leveduras e, também, bactérias. Esse crescimento variou de acordo com o processamento aplicado (Tabela 1).

#### Tabela 1

Crescimento de microrganismos em SDAC após diferentes processamentos das fezes de morcegos e incubadas a 25°C por 72 horas.

Amostras	Processamentos	Crescimento		Presença	
		Filamentosas	Cremosas (UFC/mL)	Leveduras	Bactérias
<b>A</b>	1A	Sim	10	Não	Sim
	1a	Sim	20	Não	Sim
	2A	Sim	10	Não	Sim
	2a	Sim	40	Sim	Sim
	3A	Sim	0	Não	Não
	3a	Sim	0	Não	Não
<b>B</b>	1B	Sim	0	Não	Não
	1b	Sim	0	Não	Não
	2B	Sim	> 40	Sim	Não
	2b	Sim	10	Sim	Não
	3B	Sim	10	Não	Sim
	3b	Sim	0	Não	Não

a,b = duplicata > = maior UFC= unidade formadora de colônia

#### 4. Discussão

Amostras ambientais têm como característica a presença de uma variedade de fungos filamentosos especializados, cuja dispersão de estruturas reprodutivas ocorre pelo ar atmosférico, conhecidos como fungos anemófilos (Gambale, 2012). Esses fungos frequentemente acabam por contaminar amostras biológicas, predominando no meio de cultura por rápido desenvolvimento e/ou pela produção de substâncias antimicrobianas e, muitas vezes, inibindo o crescimento de outros microrganismos de interesse clínico (Gambale, 2012). Fezes são amostras biológicas com consideráveis quantidades de microrganismos, os quais podem sobrepor em uma cultura quando se faz a pesquisa de um agente em específico (Arantes, 2012). Assim, a associação desses dois fatores, fezes e ambiente, acabam por dificultar, ainda mais, o isolamento de determinados microrganismos como no caso, as leveduras potencialmente patogênicas ao homem contidas nas fezes de morcegos encontradas em forros de residências colonizadas por esses animais.

De modo geral, independente do processamento empregado na amostra, houve baixo número de leveduras isoladas. Este fato pode ser consequência da interferência, principalmente, por fungos filamentosos. Além disso, o cultivo direto de amostras ambientais,

pode sofrer a influência do clima, como resultado de uma menor esporulação do fungo durante a época de coleta das amostras ou, ainda, a não adequação da profundidade da amostra obtida ou mesmo a ausência do microrganismo no local estudado (Barrozo et al., 2009 e 2010). Goodman e Larsh (1967), estabeleceram que a umidade e temperatura ambiental afetam a sobrevivência de *H. capsulatum* no solo. Granados e Castañeda (2006), corroboraram a hipótese de que diferentes sorotipos do complexo de espécies de *Cryptococcus* poderiam ter diferentes exigências climáticas (temperatura e umidade), o que poderia explicar as diferenças na distribuição geográfica e nichos ecológicos encontradas desse fungo.

*Histoplasma capsulatum* não foi isolado a partir das metodologias empregadas. Para o isolamento desse fungo, a disponibilidade de oxigênio e pH, ligeiramente ácido, são fatores que influenciam diretamente os resultados, uma vez que *Histoplasma* apresenta melhor crescimento nessas condições (Berliner e Biundo, 1973; Mendelovici, 1974). No entanto, sua relação com fezes de morcego foi provada por outros estudos (Emmons, 1958; Al-Doory e Rhoades, 1968; Di salvo et al., 1969; Bartlett et al., 1982; Julg et al., 2008).

Em relação às metodologias testadas, pôde-se observar variações específicas nos resultados obtidos, conforme o método aplicado. O fato de que não foi possível observar o crescimento de leveduras, mas somente a presença de bactérias no processamento 1, pode estar relacionado com a transferência em maior quantidade de resíduos em salina para a placa de SDAC. Isto pode ter sido crucial na determinação do crescimento desses fungos, pois, quanto maior o número de contaminantes (sujeira), maior a dificuldade em isolar o microrganismo de interesse.

O processamento 2 caracterizou-se pelo processo sedimentação, o qual, por ação da gravidade, as partículas tenderam a se depositar no fundo do recipiente. Ham e Curtis (1938), observaram a partir do processo de separação de células sanguíneas, que o tamanho das células tinha influência sobre a velocidade de sedimentação. Tomando como princípio o estudo de Ham e Curtis (1938), pressupõe-se que as leveduras isoladas no tratamento 3 tiveram baixa velocidade de sedimentação, ou seja, não se depositaram e, conseqüentemente, ficaram presentes no sobrenadante.

Ropes et al. (1939) propuseram como explicação para seus estudos, que alterações nas taxas de sedimentação estariam relacionadas a mudanças no estado coloidal do plasma. O sistema coloidal caracteriza-se pelo tamanho das partículas, as quais podem interferir nos processos de difusão, espalhamento de luz ou sedimentação; pelas propriedades superficiais

como fenômenos de adsorção ou dupla camada elétrica; e por interações partícula-partícula e partícula-solvente (emulsões, aerossóis, suspensões) (Shaw, 1975). A suspensão utilizada nesse tratamento constituinte da amostra de fezes e salina caracterizou-se como um sistema coloidal o qual influenciou o processo de sedimentação. Entretanto, não pode ser afirmado que todas as leveduras suspensas estavam presentes no sobrenadante. Apesar disso, como o resultado obtido foi mais eficiente em relação aos outros tratamentos, sugere-se que a forma de amostra decantada (processamento 2) proporcionou melhor crescimento de leveduras, ou seja, maior isolamento e menor crescimento de contaminantes.

As amostras que foram submetidas ao processamento 3 apresentaram apenas o crescimento de bactérias, assim como no processamento 1. A centrifugação que têm por princípio a sedimentação de células, deveria ser eficiente para separar os componentes da suspensão por meio das diferenças de densidade das partículas de sedimentação e com a densidade e viscosidade do meio (Cuttis et al., 1967), no entanto, o tempo e a velocidade de centrifugação empregados nesse tratamento podem não ter sido suficientes para obter o resultado esperado, uma vez que, estão diretamente relacionados à taxa de sedimentação. Além disso, deve ser considerada, também, a centrifugação do sobrenadante, e não a suspensão inicial. Isso sugere uma redução no número de leveduras presentes no processamento 3 comparado com os processamentos 1 e 2.

## 5. Conclusão

Considerando que detectar fungos em amostras ambientais é uma tarefa de grande dificuldade, padronizar metodologias se torna crucial para conhecer cada vez mais a frequência e distribuição das espécies desses microrganismos relacionadas aos quirópteros. Na busca por padronizar essas técnicas, pôde-se observar, que as amostras submetidas ao processo de decantação da suspensão (processamento 2), resultaram melhor crescimento de leveduras. Desta forma, o processamento 2 foi considerado a forma mais eficiente para isolar leveduras a partir das fezes de morcegos, em relação aos outros tratamentos empregados neste estudo.

## 6. Referências

Al-Doory, Y.; Rhoades, E. R. 1968. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from a Texas cave. *Mycopathologia et Mycologia applicata*. 35, 201-207.

Arantes, T. D. 2012. Detecção de *Paracoccidioides* sp. em amostras ambientais aerossóis. Botucatu: UNESP, 2012. 67 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada. Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Barrozo, L.V. et al. 2009. Climate and acute/subacute Paracoccidioidomycosis in a hyper-endemic area in Brazil. *International Journal of Epidemiology*.

Barrozo, L.V. et al. 2010. First description of a cluster of acute/subacute Paracoccidioidomycosis cases and its association with a climate-anomaly. *Neglected Tropical Diseases*.

Bartlett, P. C. et al. 1982 Bats in the belfry: an outbreak of histoplasmosis. *American journal of public health*. 72, 1369-1372.

Berliner, M. D.; Biundo, N. 1973. Effects of continuous light and total darkness on cultures of *Histoplasma capsulatum*. *Sabouraudia*. 11, 48-51.

Botelho, N.S. et al. 2012. *Candida* Species Isolated from Urban Bats of Londrina-Paraná, Brazil and their Potential Virulence. *Zoonoses and public health*. 59(1), 16-22.

Bredt, A. et al. 1998. Morcegos em áreas urbanas e rurais: manual de manejo e controle. Brasília, DF: Fundação Nacional de Saúde. Ministério da Saúde.

Cano, M. V. C.; Hajjeh, R. A. 2011. The epidemiology of histoplasmosis: a review. *Seminars in Respiratory Infections*. 16 (2), 109-118.

Cichon, M. et al. 2011. Isolamento de *Cryptococcus neoformans* de amostras ambientais de Curitiba e região metropolitana (Paraná, Brasil) e testes de suscetibilidade frente a drogas antifúngicas. *Revista brasileira de análises clínicas*. 43(3), 176-179.

Cury, G. C. et al. 2001. Surto de histoplasmose em Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 34, 483-486.

Cutts, J. H.; Noble, P. B.; Brinkman, T. 1967. Federation of American Societies for Experimental Biology. 10, 136.

De Rezende, C. C.; Duarte, D.C.; Filiú, W. F. O. 2003. Pesquisa de *Cryptococcus neoformans* e *Histoplasma capsulatum* na gruta lago azul, Bonito-MS. In: CONGRESSO DE ESPELEOLOGIA, Januária- MG. Anais XXVII Congresso Brasileiro de Espeleologia, Januária: 2003. CD-ROM.

DI Salvo, A. F. 1969. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from Arizona bats. *American journal of epidemiology*. 89(5), 606-614.

Emmons, C.W. 1958. Association of Bats with Histoplasmosis. *Public Health Reports*. 73(7), 590-595.

Fava-Netto C. et al. 1976. Histoplasmose epidêmica. Novos surtos ocorridos no litoral norte do Estado de São Paulo. Inquérito epidemiológico com histoplasmina e paracoccidioidina. Revista do Instituto de Medicina Tropical. São Paulo. 18, 108-112.

Fava-Netto, C. et al. 1967. Histoplasmose epidêmica. Estudo clínico, radiológico, micológico e imunológico de surto ocorrido no Estado de São Paulo, Brasil. Revista do Instituto de Medicina Tropical. São Paulo. 9, 222-232.

Filiú, W. F. O. et al. 2002. Cativoiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 35, 591-595.

Gambale, W. 2012. Fungos Contaminantes, in: Zaitz, C.; Campbell, I.; Marques, S. A.; Ruiz, L. R. B.; Souza, V. M. (Eds.), Compêndio de micologia médica. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 99-107.

Goodman, N. L.; Larsh, H. W. 1967. Environmental factors and growth of *Histoplasma capsulatum* in soil. Mycopathologica et Mycologia Applicata. 33, 145-156.

Granados, D. P.; Castañeda, E. 2006. Influence of climatic conditions on the isolation of members of the *Cryptococcus neoformans* species complex from trees in Colombia from 1992-2004. FEMS Yeast Research. 6, 636-644.

Ham, T. H.; Curtis, F.C. 1938. Medicine. 17, 413.

Jardim, M. M. A. 2008. Morcegos urbanos: Sugestões para o controle em escolas públicas estaduais de Porto Alegre. Museu de Ciências Naturais: Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul.

Julg, B. et al. 2008. Bat-associated histoplasmosis can be transmitted at entrances of bat caves and not only inside the caves. Journal of Travel Medicine. 15, 133-136.

Kajihiro, E. S. 1965. Occurrence of dermatophytes in fresh bat guano. Applied microbiology. 13, 720-724.

Kotait, I. et al. 2003. Manejo de quirópteros em áreas urbanas. São Paulo, Instituto Pasteur, (Manual Técnico nº 7).

Levy, C. E. et al. 2004. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde.

Machado, C. C.; Amaral, A. A.; Severo, L. C. 1993. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* isolated from soil. Revista do Instituto de Medicina Tropical. São Paulo, 35, 77-79.

Mendelovici, K.; Salfelder, E.; Roman, A. R. 1974. Intento de aislamiento del *Paracoccidioides brasiliensis* del suelo. Mycopathologica et Mycologia Applicata. 52, 45-53.

Peçanha-Martins, A. C. et al. 2000. Histoplasmosis presenting as acute respiratory distress syndrome after exposure to bat feces in a home basement. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 4, 103-106.

Ropes, M. W.; Rossmeisl, E.; Bauer, W. J., 1939. *Journal of Clinical Investigation* 18, 791.

Schmidt, S.; Machado, O. P.; Galvão, A. B. 1973. Microepidemia de histoplasmose na zona rural de Brasília, DF, 1967. II. Estudos epidemiológico e parasitológico da fonte de infecção. *Revista do Instituto de Medicina Tropical. São Paulo*, 8, 159-165.

Shaw, D. J. 1975. *Introdução à Química dos Colóides e de Superfícies*. Edgar Blucher Ltda., São Paulo.

Sugita, T. et al. 2005. *Trichosporon* species isolated from guano samples obtained from bat-inhabited caves in Japan. *Applied and environmental microbiology*. 71, 7626-7629.

Suzaki, A. et al. 1995. An outbreak of acute pulmonary histoplasmosis among travelers to a bat-inhabited cave in Brazil. *Journal of Medical Mycology*. 5, 40-43.

Taylor, M. L. et al. 1999. Environmental conditions favoring bat infection with *Histoplasma capsulatum* in Mexican shelters. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 61, 914-919.

Tencate, L. N. et al. 2012. Estudo da microbiota fúngica gastrintestinal de morcegos (Mammalia, Chiroptera) da região noroeste do estado de São Paulo: potencial zoonótico. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. São Paulo, 49, 146-152.

Ulloa, M. et al. 2006. Contribution to the study of the mycobiota present in the natural habitats of *Histoplasma capsulatum*: an integrative study in Guerrero, Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 77, 153-168.

Vicentini-Moreira, A. P. et al. 2008. Microepidemia de histoplasmose no município de Arapeí, São Paulo. *Bepa*. 5 (58).

## **CAPÍTULO 3**

### **Leveduras isoladas em abrigos urbanos colonizados por morcegos em Maringá, Paraná.**

Artigo elaborado e formatado conforme as normas para publicação científica no periódico *Microbial Ecology*.

## ANEXO 2

### Instruções para preparação de manuscritos

#### Title Page

The title page should include:

The name(s) of the author(s)

The affiliation(s) and address(es) of the author(s)

The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

#### Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

#### Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

#### Text Formatting

- Manuscripts should be submitted in Word.
- The text of a research paper should be divided into Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, Conflict of Interest, and References.
- Materials and Methods must include statement of Human and Animal Rights.
- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).
- Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.
- LaTeX macro package (zip, 182 kB)

#### Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

#### Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

#### Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables. Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and

other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols. Always use footnotes instead of endnotes.

### **Acknowledgments**

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full. Scientific style

Please use the standard mathematical notation for formulae, symbols etc.:

- Italic for single letters that denote mathematical constants, variables, and unknown quantities
- Roman/upright for numerals, operators, and punctuation, and commonly defined functions or abbreviations, e.g., cos, det, e or exp, lim, log, max, min, sin, tan, d (for derivative)
- Bold for vectors, tensors, and matrices.

### **Nomenclature**

The Handbook of Biochemistry and Molecular Biology (3rd ed., Fasman, G.D., ed., CRC Press, Inc.) should be consulted for biochemical abbreviations and names. Unusual abbreviations should be defined and introduced parenthetically the first time they appear in the text. Enzyme activity should be stated in terms of international units (Enzyme Nomenclature, Elsevier Publishing Co., 1965) and the EC number should be given parenthetically at the first use in the text. For microorganisms, the correct name conforming with international rules of nomenclature, must be given.

### **References**

#### Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

#### Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

#### Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

#### Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med.* doi:10.1007/s001090000086

Book

South J, Blass B (2001) The future of modern genomics. Blackwell, London

Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) The rise of modern genomics, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Dissertation

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see [ISSN.org LTWA](http://www.issn.org/LTWA) . For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

End Notestyle (zip, 2 kB)

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file spbasic.bst which is included in Springer's LaTeX macro package.

**Tables**

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

## RESUMO

No meio urbano, os morcegos estão constantemente presentes e, com isso, mais próximos aos humanos. Essa proximidade traz algumas preocupações, especialmente para a saúde pública, pois esses animais estão associados a fungos responsáveis por causarem doenças graves, como a criptococose por exemplo. Desta forma, buscou-se investigar a ocorrência de leveduras a partir das fezes de morcegos, a fim de verificar a possível relação do animal na disseminação desses fungos. As amostras foram obtidas em nove abrigos urbanos da cidade de Maringá-PR, especificamente em forros residenciais colonizados por morcegos, e processadas no Laboratório de Micologia Médica da Universidade Estadual de Maringá, em um intervalo de 24 horas. As leveduras isoladas foram: *Cryptococcus* spp., *Rhodotorula* spp., *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* e *Candida guilliermondii*. Além desse estudo, outros também reportaram as interações entre morcegos e fungos, ressaltando a presença desses microrganismos em meio urbano. Por isso, é relevante conhecer a frequência e distribuição das espécies de fungos relacionadas a morcegos, considerando a exposição de humanos, especialmente os imunocomprometidos oferecendo riscos de infecções fúngicas.

**Palavras-chave:** Quirópteros, fezes, leveduras, abrigos urbanos

## 1. Introdução

No Brasil, os quirópteros representam o segundo grupo de mamíferos em diversidade, contendo 172 espécies [48]. A família Molossidae é representada pelas espécies que, mais comumente, habitam abrigos urbanos no noroeste do Paraná: *Molossus rufus*, *Molossus molossus*, *Nyctinomops laticaudatus*, *Nyctinomops macrotis* e *Eumops glaucinus* [50]. No meio urbano, esses animais podem ser encontrados em edificações, por isso, sua presença pode não ser tolerada pelas pessoas, devido à ocorrência de acúmulo de excrementos e de ruído [25]. Entretanto, para a saúde pública, o principal problema é relacionado à disseminação de microrganismos, pois o guano de quirópteros é uma importante fonte de nitrogênio, atuando como substrato adequado para o crescimento e desenvolvimento dos mesmos [5].

Algumas pesquisas mostraram a presença de leveduras patogênicas em fezes de morcegos. De Rezende et al [11], Disalvo et al [12], Lyon [34] e Schimidt [53] isolaram *Histoplasma capsulatum* em guano acumulado em cavernas/grutas habitadas por quirópteros. Em residências, a presença desse fungo foi reportada por Emmons [14], Fava Neto et al [19] e Peçanha-Martins [46]. Outras espécies de fungos como: *Aspergillus* spp., *Aphanoascus fulvescens*, *Blastomyces* sp., *Candida* spp., *Cephalotrichum* sp., *Chaetomidium* sp., *Chrysosporium speluncarum*, *Cladosporium* sp., *Coccidioides* spp., *Cryptococcus* spp., *Emericella rugulosa*, *Eurotium amstelodani*, *Fusarium* sp., *Gliocladium roseum*, *Gymnascella citrina*, *Gymnoascus dankaliensis*, *Leuconeurospora* spp., *Malassezia* spp., *Malbranchea aurantiaca*, *Microsporum* spp., *Mortierella* spp., *Mucor* spp., *Paecilomyces variotii*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Penicillium* spp., *Purpureocillium lilacinum*, *Rhizopus* spp., *Rhodotorula* sp., *Sporothrix* sp., *Sporotrichum* sp., *Trichoderma viride*, *Trichophyton* spp., *Trichosporons* spp., *Wangiella dermatitidis*; também foram encontradas associadas aos morcegos [3, 20, 24, 28, 42, 47, 51, 52, 54, 56, 58, 59, 60]. Esses dados são relevantes, uma vez que a frequência de micoses invasivas causadas por fungos oportunistas tem aumentado significativamente a partir da década 50. Esse aumento está associado a índices muito elevados de morbidade e mortalidade e diretamente relacionado a populações cada vez maiores de pacientes em risco de desenvolvimento de infecções fúngicas graves [41].

Uma das principais micoses oportunistas é a criptococose, doença causada pelos fungos *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gatti* os quais sobrevivem no solo contaminado por guano de aves e morcegos. Em seres humanos, a infecção ocorre através da inalação de propágulos ou leveduras dessecadas de fontes ambientais [33]. Esses por sua vez,

colonizam primariamente os pulmões podendo causar doença aguda, subaguda ou crônica e, subsequentemente, invadem o sistema nervoso central, podendo acarretar quadros de meningite, encefalite ou meningo-encefalite [6, 7].

O presente estudo teve por objetivo investigar a ocorrência de leveduras a partir das fezes de morcegos, a fim de verificar a possível relação do animal na disseminação desses microrganismos.

## **2. Material e Métodos**

### *2.1. Área de estudo*

Maringá (23° 25' S e 51° 56' O) localiza-se no Terceiro Planalto paranaense na região Sul do Brasil, noroeste do Estado do Paraná. O clima da região é classificado como subtropical temperado, onde a temperatura média anual é em torno 20 a 21 °C, com média das máximas entre 27 a 28° C e das mínimas entre 16 e 17° C. A precipitação média anual é elevada, geralmente entre 1.500 mm a 1.600 mm, bem distribuídos ao longo do ano [36]. As amostragens foram realizadas em abrigos urbanos, especificamente em 9 forros residenciais colonizados por morcegos (Fig. 1). Esses abrigos foram informados por moradores da cidade de Maringá, mediante solicitação de atendimento pelo Centro de Controle de Zoonoses, Prefeitura Municipal de Maringá, o qual tem parceria com o Grupo de Estudos em Ecologia de Mamíferos e Educação Ambiental (GEEMEA) da Universidade Estadual de Maringá. Os critérios para seleção das casas a serem coletas foram: a) viabilidade para entrar no forro, pois alguns forros não eram acessíveis; b) receptividade do morador em receber a equipe para realização da pesquisa.

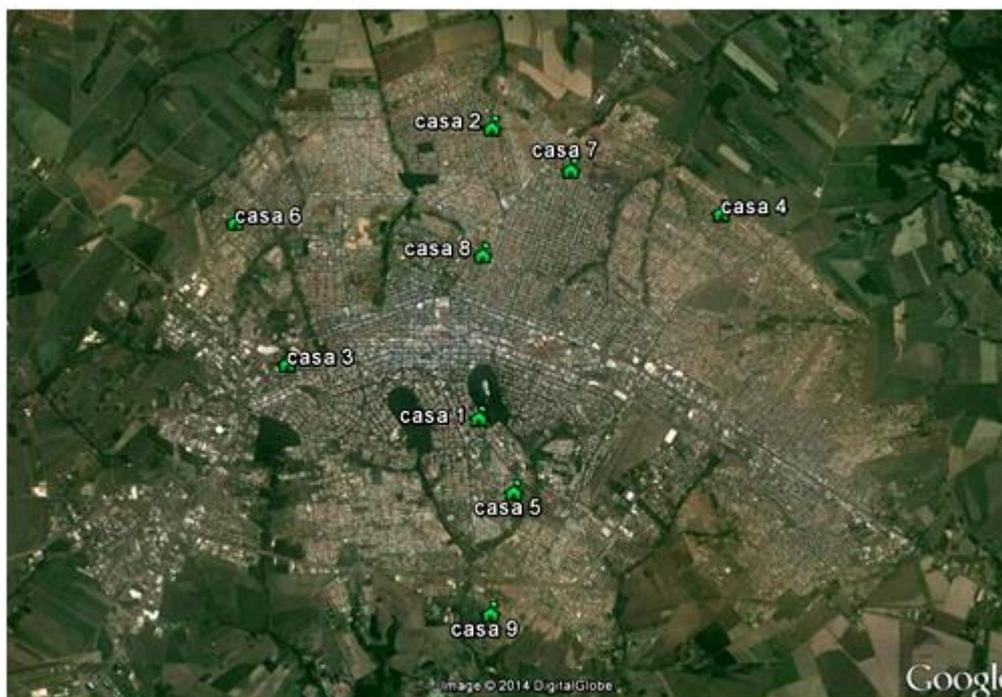


Fig. 1. Localização das residências nas quais foram coletadas fezes de morcegos, em Maringá, Paraná.

## 2.2. Coleta do material

No período de junho e outubro de 2013 entre 9 a 11 horas, foram efetuadas as coletas. A entrada nos abrigos se fez com o uso de equipamentos de proteção individual, como, máscara de proteção respiratória, luva descartável e óculos. Os morcegos capturados foram contidos manualmente com luvas de raspa de couro. Foi anotada, no local de amostragem, a identificação taxonômica, seguindo critérios de Gregorin e Taddei [22], Jones e Carter [26], Miranda [38], Vizotto e Taddei [62]. Foi coletada uma amostra de, aproximadamente, 10g de fezes por residência, abrangendo-se o maior número de locais onde os excrementos eram visualizados. A amostra foi condicionada em um frasco coletor universal de polipropileno esterelizado (80 ml). Além disso, uma placa de Petri 90x15 mm contendo o meio Sabouraud Dextrose Ágar acrescido de 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de cloranfenicol (SDAC) era exposta por 15 minutos em cada abrigo, a fim de verificar se as leveduras presentes no ar atmosférico seriam as mesmas isoladas nas fezes.

Após a coleta de informações, os morcegos foram soltos e as amostras processadas no laboratório de Micologia Médica da Universidade Estadual de Maringá dentro de 24 horas. Todos os procedimentos empregados foram realizados de acordo com a licença permanente para coleta de material zoológico do Instituto Chico Mendes de Conservação da

Biodiversidade - ICMBio sob número: 17869-3 (data da emissão: 14/09/2012) e da aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Maringá e da Secretaria de Saúde do Município.

### 2.3. *Processamento das amostras e isolamento dos fungos*

Um grama da amostra de fezes pura macerada foi inserido em tubo cônico de 50 mL. Foram adicionados 30 mL de solução salina 0,85% acrescida de 200 µg/mL de cloranfenicol (Sigma). A suspensão foi homogeneizada em Vórtex por 30 segundos e, em seguida, permaneceu em repouso por 30 minutos. Após decantação, 100 µL do sobrenadante foram semeados no meio de cultura Ágar Níger, e homogeneizados com o auxílio de pérolas de vidro esterelizadas, as quais, após o uso, eram descartadas. Para cada amostra foram semeadas três placas e incubadas a 25°C, 37°C e em temperatura ambiente. As placas de Petri expostas no abrigo foram incubadas em temperatura ambiente. O crescimento dos fungos foi monitorado diariamente.

### 2.4. *Identificação dos fungos*

Foi realizada a identificação pelo método clássico para as espécies após 24-48 h do isolamento das colônias. Técnicas para o isolamento do fungo *Histoplasma capsulatum* não foram empregadas, e, portanto, a identificação teve como foco leveduras cômodos gêneros *Candida*, *Cryptococcus* ou *Rhodotorula*. Colônias cremosas características de leveduras foram isoladas e processadas para identificação e diferenciação das espécies. O esquema de identificação e diferenciação das espécies de *Candida* e *Cryptococcus* está representado na figura 2.

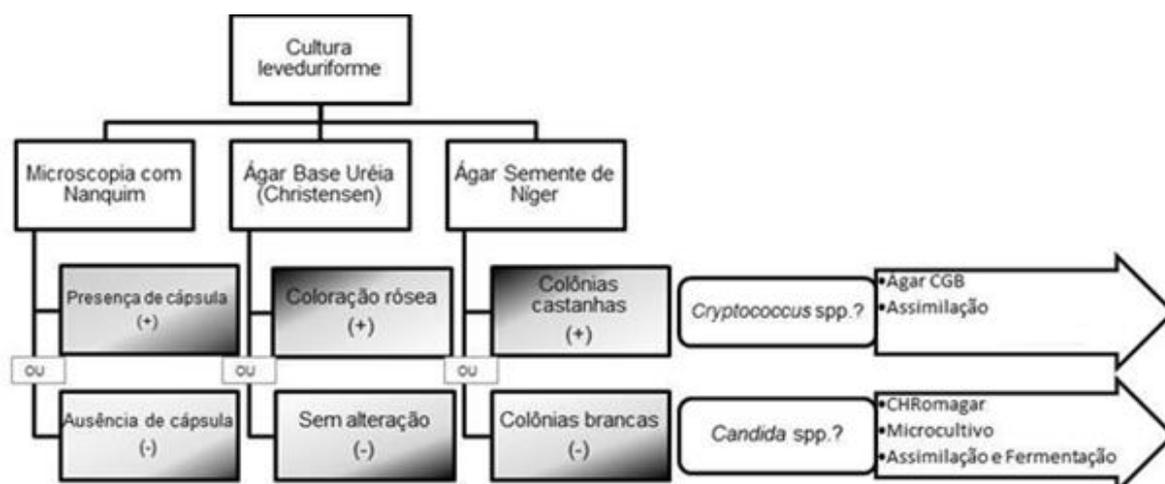


Fig. 2. Testes morfológicos e bioquímicos para diferenciação e identificação das espécies de *Candida* e *Cryptococcus*.

Os meios diferenciais, Ágar Base Ureia (Christensen) e Ágar Semente de Níger (NSA), foram utilizados para auxiliar na identificação da espécie. Paralelamente, os isolados foram preparados processados com tinta nanquim (diluição 1:2) e observados em microscópio óptico quanto à presença de cápsula. Quando o crescimento nos meios diferenciais eram positivos e não era possível observar a presença de cápsula após uso da tinta nanquim, as células eram estimuladas para a produção da mesma de acordo com método proposto por Zaragoza [64].

Após identificação presuntiva do gênero *Cryptococcus* pela presença de cápsula e características bioquímicas, foram realizados testes para identificação de espécie, como o cultivo em ágar-canavanina-glicina-azul de bromotimol e assimilação de carboidratos.

Para as leveduras que apresentaram coloração branca em NSA, ausência de crescimento em meio Christensen e fermentação de açúcares positiva, foram realizados testes adicionais para identificação de *Candida* spp, tais como: cultivo em CHROMagar *Candida*®, assimilação de açúcares, microcultivo em ágar-fubá e Tween 80.

### 3. Resultados

As espécies *Molossus molossus* e *Molossus rufus* foram as únicas encontradas nesses abrigos (Fig. 3), no entanto, houve casas em que a presença dessas espécies não foi identificada durante a amostragem.

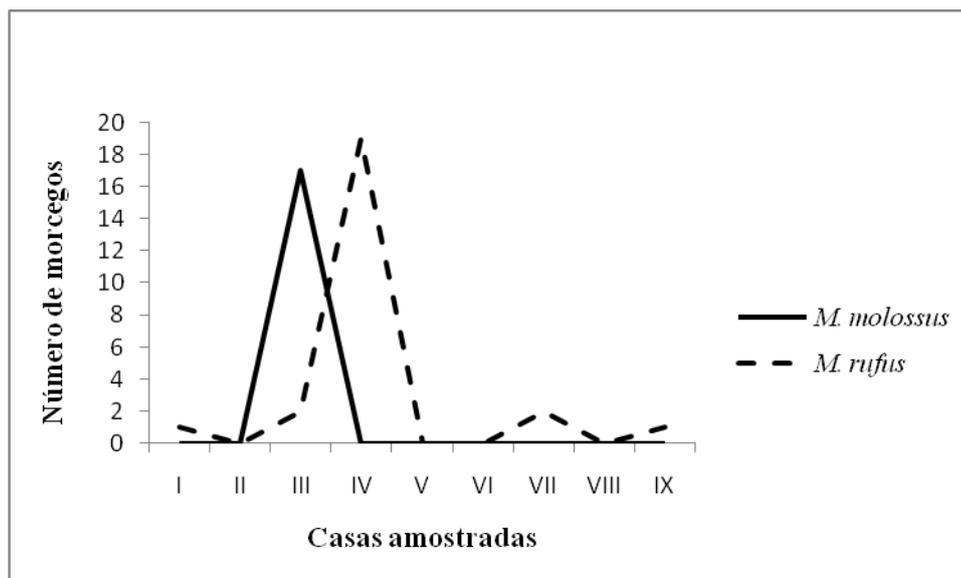


Fig. 3. Número de exemplares de *Molossus molossus* e *Molossus rufus* capturados em abrigos urbanos de Maringá, Paraná.

*Cryptococcus* spp. foram isolados nas casas V, VIII, IX e *Rhodotorula* spp. nas casas I, V, IX. *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* e *Candida guilliermondii*, apesar da menor frequência, também foram isoladas (Tabela 1). Não houve relação entre as leveduras isoladas nas fezes com as isoladas do ar, salvo a exceção da levedura *Rhodotorula* sp. a qual foi isolada na casa V de ambas amostras (fezes e ar). As outras leveduras identificadas eram provenientes somente da amostra do ar ou somente da amostra de fezes. As cepas isoladas nesse estudo foram oriundas das casas I, V, VIII, IX, essas que se caracterizaram por apresentarem pouco ou nenhum morcego colonizando o forro.

Os forros amostrados foram caracterizados em dois tipos: aberto, quando apresentavam um lado do cômodo totalmente aberto e ausente de porta; e fechado, quando caracterizavam-se por um cômodo totalmente fechado, tendo acesso apenas por uma porta. Foram denominados locais, os lugares no forro que apresentavam acúmulo de excrementos de morcegos. Quando o forro apresentava 1 ou 2 locais, era denominado insatisfatório. Quando apresentava de 3 a 6 locais era considerado regular, e acima de 6 locais, satisfatório (Tabela 2).

Tabela 1. Leveduras isoladas em forros residenciais colonizados por morcegos na cidade de Maringá, PR.

Casas	Nº de morcegos amostrados	<i>Cryptococcus</i> spp.		<i>Candida glabrata</i>		<i>Candida parapsilosis</i>		<i>Candida guilliermondii</i>		<i>Rhodotorula</i> spp.		Nº de leveduras NID
		Fezes	Ar	Fezes	Ar	Fezes	Ar	Fezes	Ar	Fezes	Ar	
<b>I</b>	1	NI	NI	NI	NI	IS	NI	NI	NI	IS	NI	0
<b>II</b>	0	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	0
<b>III</b>	19	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	0
<b>IV</b>	19	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	0
<b>V</b>	0	IS	NI	IS	NI	NI	NI	NI	NI	IS	IS	1
<b>VI</b>	0	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	0
<b>VII</b>	2	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	0
<b>VIII</b>	0	NI	IS	NI	NI	NI	NI	IS	NI	NI	NI	1
<b>IX</b>	1	NI	IS	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	IS	0

S= isolado NI= não isolado NID= não identificado

Tabela 2. Características dos forros amostrados na cidade de Maringá, PR.

Casa	Tipo de forro	Locais contendo fezes de morcego
<b>I</b>	Fechado	Regular
<b>II</b>	Fechado	Insatisfatório
<b>III</b>	Aberto	Regular
<b>IV</b>	Aberto	Insatisfatório
<b>V</b>	Fechado	Satisfatório
<b>VI</b>	Fechado	Insatisfatório
<b>VII</b>	Fechado	Insatisfatório
<b>VIII</b>	Fechado	Regular
<b>IX</b>	Fechado	Satisfatório

#### 4. Discussão

No estado do Paraná as colônias de *M. molossus* e *M. rufus* em ambiente urbano são comumente verificadas [44, 49]. Dentre as espécies encontradas nesses ambientes, *M.*

*molossus*, mostra ser a mais oportunista na escolha de seus abrigos, pois explora uma diversidade de estruturas nas edificações [44]. A presença de ambas espécies em forros residenciais amostrados nesse estudo apresentou oscilações. Talvez, o fato de se obter um número maior de leveduras em residências que se caracterizavam por apresentarem pouco ou nenhum morcego colonizando os forros (casas I, V, VIII e IX), esteja relacionado às fezes mais antigas nesses ambientes, as quais influenciam no crescimento de microrganismos por meio de variações em fatores como temperatura, umidade [1, 2] e pH [37]. No entanto, não foi possível verificar a influência do tempo de exposição das fezes ao número de leveduras isoladas, pois os aspectos diretamente relacionados como: atividade reprodutiva; método de amostragem; uso de múltiplos refúgios, troca constante de abrigos [17], não foram avaliados nesse estudo.

As características dos forros descritas nos resultados obtidos podem ter influenciado o isolamento de leveduras a partir das fezes. A casa V, por exemplo, caracterizada por conter forro fechado e satisfatório, foi a que apresentou maior abundância e riqueza em espécie de leveduras. Em contrapartida, não houve isolamento de colônias leveduriformes nas casas que apresentavam forros abertos e/ou insatisfatórios. Desta forma, sugere-se que a quantidade de excrementos presente no ambiente e a caracterização do mesmo, podem influenciar na ocorrência de fungos em fezes de morcegos.

As duas vias de dispersão dos fungos analisadas (ar atmosférico e morcegos), estão estritamente relacionadas à alta produção de propágulos de disseminação, principalmente os esporos de origem assexuada. Esses propágulos quando atingem um substrato com condições adequadas, germinam e iniciam um novo ciclo [63]. Apesar da maioria das leveduras isoladas das fezes e do ar atmosférico não serem as mesmas, observou-se que alguns fungos como *Rhodotorula* e *Cryptococcus* foram isolados nas duas amostragens.

*Rhodotorula* já era esperada, pois se trata de um fungo anemófilo, disperso principalmente pelo ar, mas que pode utilizar outras vias para se dispersar. *Cryptococcus*, normalmente possui baixa frequência de dispersão por meio do ar atmosférico [63], no entanto, nesse estudo foi isolado com maior frequência nas amostras do ar quando comparado às amostras de fezes. A capacidade de *Cryptococcus* ser disperso pelo ar foi discutida por Emmons [15]. Ele sugeriu que a levedura apresentava características suficientemente resistentes (como espessura da cápsula) para se difundir através do ar atmosférico.

Independente da via que utilizam para se dispersar, os fungos podem ser responsáveis por doenças graves. A criptococose, por exemplo, é uma micose oportunista a qual está relacionada, principalmente, ao comprometimento da imunidade celular do hospedeiro,

resultante de enfermidades e atividades imunossupressoras [9, 40]. Essa doença tem como principais agentes etiológicos *C. neoformans* e *C. gattii*. O primeiro relaciona-se, na maioria das vezes, com excretas acumuladas de aves, principalmente, pombos domésticos [16, 21, 30]. O segundo encontra-se frequentemente associado com várias espécies de eucaliptos [13, 29, 31]. No entanto, as duas espécies de *Cryptococcus* podem estar associadas às fezes de quirópteros [28, 58, 59].

Assim como a criptococose, a candidíase destaca-se por ser uma micose oportunista. É causada por fungos do gênero *Candida*, que são representantes da flora normal da pele, membranas mucosas e do trato gastrointestinal. A detecção das espécies de *Candida* em quase toda a microbiota humana, faz deste microrganismo o fungo mais importante de toda área biológica quando comparado principalmente às espécies de *Rhodotorula* [29]. Isso se deve ao fato de serem agentes causadores mais frequentes de infecção fatal em indivíduos imunocomprometidos [8], e responsáveis por doenças mais comumente observadas em pacientes com AIDS [63]. Apesar disso, o gênero *Rhodotorula* não se faz menos importante, pois algumas espécies estão associadas a uma variedade de doenças ao homem, como infecções cutâneas superficiais, quadros pulmonares, renais e de SNC [63].

As espécies isoladas nesse estudo (*C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *Cryptococcus* e *Rhodotorula*), corroboram com a associação aos morcegos reportada na literatura [3, 20, 23, 28, 32, 39, 43, 58, 59], ressaltando a presença de fungos potencialmente patogênicos em meio urbano. Esses dados tornam-se preocupantes, uma vez que, morcegos estão adaptados a esses ambientes e próximos ao homem. As pessoas que habitam em residências caracterizadas pela presença de colônias de morcegos, estão mais suscetíveis a *Cryptococcus* e outros fungos. Na tentativa de limpar o cômodo da casa contendo as fezes, ou o contato diário com as mesmas, o morador pode inalar um grande número de esporos de fungos oportunistas e/ou patogênicos, correndo sérios riscos de infecção.

Na literatura, há casos de microepidemias de criptococose e histoplasnose, nas quais as pessoas foram infectadas após visitarem locais que possuíam contaminação maciça de fezes de morcegos ou aves [10, 19, 18, 27, 35, 46, 53, 55, 57, 61]. Para imunodeprimidos, o risco de infecção é mais elevado, dados oficiais indicam que a criptococose ocorre em 7% a 8% dos pacientes HIV positivos nos Estados Unidos, Europa e América do Sul; e em 35% desses pacientes na África [45]. No Brasil, a criptococose ocorre como primeira manifestação oportunista em cerca de 4,4 % dos casos de AIDS e, estima-se que em centros de referência da região sudeste essa prevalência é 8 a 12% [4].

## 5. Conclusão

Foi possível verificar que morcegos estão associados à disseminação de microrganismos potencialmente patogênicos como *Cryptococcus* spp., *Candida* spp., e *Rhodotorula* spp., uma vez que, por meio das fezes desses animais, foi possível obter o isolamentos dessas leveduras. Considerando que esses agentes podem causar severas infecções e que os morcegos, estão cada vez mais próximos aos seres humanos, medidas de controle e manejo para evitar possíveis infecções devem ser realizadas. Além disso, mais estudos são necessários para entender melhor a relação epidemiológica desses fungos com os quirópteros.

## 6. Referências

1. Barrozo LV et al (2009) Climate and acute/subacute Paracoccidioidomycosis in a hyper- endemic area in Brazil. *International Journal of Epidemiology*.
2. Barrozo LV et al (2010) First description of a cluster of acute/subacute Paracoccidioidomycosis cases and its association with a climate-anomaly. *Neglected Tropical Diseases*.
3. Botelho NS et al (2012) *Candida* Species Isolated from Urban Bats of Londrina-Paraná, Brazil and their Potential Virulence. *Zoonose and public health*. 59(1): 16-22.
4. Brasil (2012) Vigilância e Epidemiológica da Criptococose. Ministério da Saúde, Brasília.
5. Cano MVC, Hajjeh RA (2001) The epidemiology of histoplasmosis: a review. *Seminars in Respiratory Infections*. 16 (2): 109-118.
6. Casadevall A, Perfect JR (1998) *Cryptococcus neoformans*. American Society for Microbiology Press, Washington.
7. Casali AK et al (2001) *Cryptococcus neoformans*: aspectos moleculares e epidemiológicos. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento* 20: 34-37.
8. Colombo AL et al (2006) Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *Journal of Clinical Microbiology*. 44: 2816-2823.
9. Costa AKF (2009) Análise fenotípica e molecular de cepas de *Cryptococcus* spp. Obtidas de fontes ambientais e clínicas. Tese, Universidade Estadual do Ceará.
10. Cury GC et al (2001) Surto de histoplasrose em Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 34: 483-486.
11. De Rezende CC, Duarte DC, Filiú WFO (2003) Pesquisa de *Cryptococcus neoformans* e *Histoplasma capsulatum* na gruta lago azul, Bonito-MS In: Congresso de espeleologia, Januária- MG. Anais XXVII Congresso Brasileiro de Espeleologia,

- Januária: 2003. CD-ROM.
12. Di Salvo AF et al (1969) Isolation of *Histoplasma capsulatum* from Arizona bats. American journal of epidemiology. 89 (5): 606-614.
  13. Ellis DH, Pfeiffer TJ (1990) Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. Journal of Clinical Microbiology. 28: 1642-4.
  14. Emmons CW (1958) Association of Bats with Histoplasmosis. Public Health Reports. 73(7): 590-595.
  15. Emmons CW (1951) Isolation of *Cryptococcus neoformans* from soil. Journal of Bacteriology. 62(6): 685.
  16. Emmons CW (1955) Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 62: 227-232.
  17. Esbérard CEL (2011) Variation in size of colony of *Molossus molossus* and *Molossus rufus* in Rio de Janeiro state, Southeastern Brazil. Neotropical Biology and Conservation. 6(2): 71-77.
  18. Fava-Netto C et al (1976) Histoplasmose epidêmica. Novos surtos ocorridos no litoral norte do Estado de São Paulo. Inquérito epidemiológico com histoplasmina e paracoccidioidina. Revista do Instituto de Medicina Tropical. 18: 108-112.
  19. Fava-Netto C et al (1967) Histoplasmose epidêmica. Estudo clínico, radiológico, micológico e imunológico de surto ocorrido no Estado de São Paulo, Brasil. Revista do Instituto de Medicina Tropical. 9: 222-232.
  20. Gandra RFW et al (2008) *Malassezia* spp. in acoustic meatus of bats (*Molossus molossus*) of the Amazon Region, Brazil. Mycopathologia 165: 21-26.
  21. Granados DP, Castañeda E (2005) Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* varieties recovered from natural sources in Bogotá, Colombia, and study of ecological conditions in the area. Microbial Ecology. 49: 282-90.
  22. Gregorin R, Taddei VA (2002) Chave artificial para identificação de molossídeos brasileiros (Mammalia, Chiroptera). Mastozoologia Neotropical/ Neotropical Mammals 9 (1): 13-32.
  23. Grose E, Marinkelle CJ (1968) A new species of *Candida* from Colombian bats. Mycopathologia 36: 225-227.
  24. Grose E, Tamsitt JR (1965) *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia, S.A. Sabouraudia 4: 124-125.
  25. Jardim MMA (2008) Morcegos urbanos: Sugestões para o controle em escolas públicas estaduais de Porto Alegre. Museu de Ciências Naturais, Rio Grande do Sul.
  26. Jones JK, Carter DC (1976) Annotated checklist with Keys to subfamilies and genera. Biology of bats the New World family Phyllostomatidae, (10): 7-38.
  27. Julg B et al (2008) Bat-associated histoplasmosis can be transmitted at entrances of bat caves and not only inside the caves. Journal of Travel Medicine. 15: 133-136.
  28. Kajihira ES (1965) Occurrence of dermatophytes in fresh bat guano. Applied microbiology. 13(5): 720-724.

29. Know-Chung KJ, Bennett JE (1992) *Medical Mycology*. Lea e Figiber, Philadelphia.
30. Kobayashi CCBA et al (2005) Characterization of *Cryptococcus neoformans* isolated from urban environmental sources in Goiânia, Goiás, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 47(4): 203-207.
31. Lacaz CS (2002) Histoplasmose In: Lacaz CS et al (ed.) *Tratado de Micologia Médica*. Sarvier, São Paulo, PP 549-617.
32. Larcher G et al (2003) Fungal biota associated with bats in Western France. *Journal de mycologie medicale*. 13: 29-34.
33. Lin X, Heitman J (2006) *Cryptococcus neoformans* species complex. *Annual Review of Microbiology* 8: 69-105.
34. Lyon GM (2004) Histoplasmosis associated with exploring a bat-inhabited cave in Costa Rica, 1998-1999. *American Journal of Tropical Hygiene*. 70 (4): 438-442.
35. Machado CC, Amaral AA, Severo LC (1993) *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* isolated from soil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*. 35(1): 77-79.
36. Maringá (2012) *Plano Municipal de Conservação e Recuperação da Mata Atlântica*. Secretaria Municipal de Saneamento Básico e Meio Ambiente, Maringá.
37. Mendelovici K, Salfelder E, Roman AR (1974) Intento de aislamiento del *Paracoccidioides brasiliensis* del suelo. *Mycopathologica et Mycologia Applicata*.52: 45-53.
38. Miranda JMD, Bernardi IP, Passos FC (2011) *Chave ilustrada para a determinação dos morcegos da Região Sul do Brasil*. João M.D. Miranda, Curitiba.
39. Mok WY, Luizão RC, Barreto MS (1982) Isolation of fungi from bats of the Amazon basin. *Applied and Environmental Microbiology*. 44(3): 570.
40. Moretti ML et al (2008) Consenso em criptococose. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 41(5): 524-44.
41. Murray PR et al (2006) *Microbiologia Médica*. Elsevier, Rio de Janeiro.
42. Nováková A, Kolařík M (2010) *Chrysosporium speluncarum*, a new species resembling *Ajellomyces capsulatus*, obtained from bat guano in caves of temperate Europe. *Mycology Progress* 9: 253-260.
43. Oyeka CA (1994) Isolation of *Candida* species from bats in Nigeria. *Mycoses* 37: 353-355.
44. Pacheco SM et al (2010) Morcegos urbanos: status do conhecimento e plano de ação para a conservação no Brasil. *Chiroptera neotropical* 16(1): 629-647.
45. Pappalardo MCSN, Melhem MSC (2003) Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*. S. Paulo, 45: 299-305.
46. Peçanha-Martins A C et al (2000) Histoplasmosis presenting as acute respiratory distress syndrome after exposure to bat feces in a home basement. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 4(2): 103-106.
47. Randhawa HS et al (1985) *Blastomyces dermatitidis* in bats: first report of its isolation from the liver of *Rhinopoma hardwickei hardwickei*, gray. *Sabouraudia*. 23: 69-76.

48. Reis NR et al (2011) Mamíferos do Brasil. Nélío R. dos Reis, Londrina.
49. Reis NR et al (2006) Riqueza de espécies de morcegos (Mammalia, Chiroptera) em dois diferentes habitats, na região centro-sul do Paraná, sul do Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 23(3): 813-816.
50. Reis NR, Lima IP, Peracchi AL (2002) Morcegos (Chiroptera) da área urbana de Londrina Paraná- Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*. 19 (3): 739-746.
51. Reiss NR, Mok WY (1979) *Wangiella dermatitides* isolated from bats in Manaus Brazil. *Sabouraudia* 17: 213-218.
52. Rogers AL, Beneke ES Human pathogenic fungi recovered from brasilian soil. Department Botany and Plant Pathology, Michigan State University 24: 1963.
53. Schmidt S, Machado OP, Galvão AB (1973) Microepidemia de histoplasmose na zona rural de Brasília, DF, 1967. II. Estudos epidemiológico e parasitológico da fonte de infecção. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*. 8: 159-165.
54. Sugita T et al (2005) *Trichosporon* species isolated from guano samples obtained from bat-inhabited caves in Japan. *Applied and environmental microbiology*. 71(11): 7626-7629.
55. Suzaki A et al (1995) An outbreak of acute pulmonary histoplasmosis among travelers to a bat-inhabited cave in Brazil. *Journal of Medical Mycology*. 5: 40-43.
56. Taylor ELS, Resende-Stoianoff MAA, Lopes FR (2013) Mycological study for a management plan of a neotropical show cave (Brazil). *International Journal of Speleology* 42: 267-277.
57. Taylor ML et al (1999) Enviromental conditions favoring bat infection with *Histoplasma capsulatum* in Mexican shelters. *American Journal of Tropical Hygiene*. 61(6): 914-919.
58. Tencate LN et al (2012) Estudo da microbiota fúngica gastrintestinal de morcegos (Mammalia, Chiroptera) da região noroeste do estado de São Paulo: potencial zoonótico. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 49(2): 146-152.
59. Ulloa M et al (2006) Contribution to the study of the mycobiota present in the natural habitats of *Histoplasma capsulatum*: an integrative study in Guerrero, Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 77(2): 153-168.
60. Vanderwolf KJ, Malloch D, McAlpine DF, Forbes J (2013) A world review of fungi, yeasts, and slime mold in caves. *International Journal of Speleology* 42 (1): 77-96.
61. Vicentini-Moreira AP et al (2008) Microepidemia de histoplasmose no município de Arapeí, São Paulo. *Bepa*. 5(58).
62. Vizotto LD, Taddei VA (1973) Chave para determinação de quirópteros brasileiros. *Boletim De Ciências* (1): 1-72.
63. Zaitz C et al (2012) *Micologia Médica*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
64. Zaragoza O, Casadevall A (2004) Experimental modulation of capsule size in *Cryptococcus neoformans*. *Biological Procedures Online*. 6: 10-15.