

*Sandra de Moraes Gimenes Bosco*

**Infecção natural do *Paracoccidioides brasiliensis* em  
tatus: aspectos ecológicos, patológicos, micológicos e  
moleculares**

Tese apresentada ao Programa de  
pós-Graduação em Patologia,  
Faculdade de Medicina de Botucatu,  
Universidade Estadual Paulista –  
UNESP, para obtenção do título de  
Doutor em Patologia.

Orientador: Prof<sup>o</sup> Adj. Eduardo  
Bagagli

Botucatu  
2005

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Bosco, Sandra de Moraes Gimenes.

Infecção natural do *Paracoccidioides brasiliensis* em tatus: aspectos ecológicos, patológicos, micológicos e moleculares / Sandra de Moraes Gimenes Bosco. – Botucatu : [s.n.], 2005.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2005.

Orientador: Prof. Adj. Eduardo Bagagli  
Assunto CAPES: 21200009

1. Microbiologia. 2. *Paracoccidioides brasiliensis* – Aspectos imunológicos.

CDD 576

Palavras chave: *Dasypus novemcinctus*; Ecologia; *Paracoccidioides brasiliensis*; Paracoccidioidomicose; PCR; rDNA; Tatus.

*Gostaria de agradecer a Deus por todos os momentos maravilhosos que tenho tido em minha vida. Por todos os momentos felizes e também pelos tristes, pois muitas coisas aprendi com eles, muitos valores guardei e muitas vitórias conquistei.*

*O Senhor é minha luz e salvação. O Senhor é o protetor de minha vida.*

*Salmos 26*

### *Pegadas na Areia*

*Uma noite eu tive um sonho...*

*Sonhei que estava andando na praia com o Senhor e através do céu, passavam cenas da minha vida.*

*Para cada cena que passava, percebi que eram deixados dois pares de pegadas na areia: um era meu e o outro era do Senhor.*

*Quando a última cena passou diante de nós, olhei para trás, para as pegadas na areia e notei que muitas vezes, no caminho da minha vida, havia apenas um par de pegadas na areia.*

*Notei também que isso aconteceu nos momentos mais difíceis e angustiosos do meu viver. Isso me aborreceu deveras e perguntei então ao Senhor:*

*- Senhor, Tu me disseste que, uma vez que resolvi te seguir, Tu andarias sempre comigo, em todo o caminho. Contudo, notei que durante as maiores atribulações do meu viver, havia apenas um par de pegadas na areia. Não compreendo porque nas horas em que eu mais necessitava de Ti, Tu me deixaste sozinho.*

*O Senhor me respondeu:*

*- Meu querido filho. Jamais eu te deixaria nas horas de provas e de sofrimento. Quando viste, na areia, apenas um par de pegadas, eram as minhas. Foi exatamente aí que eu te carreguei nos braços.*



*Meus pais, Odete e Manoel, que me deram a vida, amor e muito carinho e ao meu irmão Márcio, que sempre foi meu companheiro. A vocês que compartilharam os meus ideais e os alimentaram, incentivando-me a prosseguir na jornada, fossem quais fossem os obstáculos. Sem a participação e o auxílio de vocês eu não teria chegado até aqui. A vocês dedico esta conquista, com a mais profunda gratidão e carinho.*

*Ao meu esposo, Luiz Fernando, e à minha filha Fernanda, que sempre estiveram ao meu lado, dando-me muito amor, apoio, carinho, dedicação, incentivo e compreensão em todos os momentos, principalmente nos que tive que me fazer ausente.*



*Aos meus sogros, João (in memoriam) e Elydia, que me acolheram como filha e me incentivaram ao longo destes anos de convivência.*

*Amo muito vocês!!!*

*Ao meu orientador e amigo,*

*Profº Eduardo Bagagli*

*Mais uma vez, Eduardo, sou grata pela oportunidade que tive de trabalhar com você sob sua orientação segura e dedicada.*

*Obrigada por seus ensinamentos, paciência, confiança, apoio, convivência, carinho, amizade e também pelos "puxões-de-orelha".*

*Obrigada por ter compartilhado as alegrias das conquistas obtidas e ter me estimulado, principalmente, nos momentos mais difíceis.*

*Obrigada por seu exemplo, tanto profissional quanto pessoal, o qual tenho o mais profundo respeito e admiração.*

*Este trabalho é mais um fruto de muito esforço, dedicação, discussão e incentivo. É com muito carinho que o dedico.*

*Aos animais: Nunca serei suficientemente grata aos hamsters e tatus que utilizei neste trabalho, pois eles doaram o maior bem que possuíam: suas vidas!*

*Ao Professor Dr. Mário Rubens Montenegro (in Memoriam), por seu exemplo e dedicação ao ensino e pesquisa na *Paracoccidiodomicose*,*

*Aos docentes do curso de Pós-Graduação em Patologia, em especial à Professora Daisy Maria Fávero Salvadori pelo apoio, estímulo e empenho ao desenvolvimento dos trabalhos frente à coordenação deste curso de Pós-Graduação,*

*Ao Instituto Lauro de Souza Lima, em especial nas pessoas: Diltor V. A. Opromola (in memoriam), pelo pioneirismo no trabalho com tatus como modelo experimental e por ter aberto as portas do Instituto para a realização desta pesquisa,*

*As Médicas Veterinárias Patricia Sammarco Rosa e Sílvia Cristina Barbosa Pedrini, pelo incentivo e carinho e aos funcionários do Biotério Silvio Carlos de Oliveira e Luiz Antonio Damata pelo auxílio na manutenção dos tatus para a realização deste trabalho,*

*Ao Professor Marcello Franco pela análise histopatológica dos tecidos dos tatus,*

*Ao Centro de Isótopos Estáveis, em especial na pessoa do Prof Dr. Carlos Ducatti, pelo fornecimento de nitrogênio líquido utilizado neste trabalho,*

*Ao Centro de Estudos do Genoma Humano, em especial na pessoa da Dra. Vanessa Naomi van Opstal Takahashi, pelo auxílio nas reações de sequenciamento de DNA,*

*Aos proprietários da Ilha do Serrito, Edson Gruppi, Edson Luiz Gruppi e Sílvia José Gruppi pela oportunidade concedida para explorar este "tesouro",*

*Aos amigos da seção de Pós-Graduação, Tânia, Regina e Natanael, pela amizade, paciência e atenção dispensada durante a vigência do curso,*

*Ao Ibama (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) pela autorização de captura dos tatus aqui utilizados,*

*À Fapesp (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela assessoria científica e por todo apoio financeiro prestado,*

*Aos meus amigos e companheiros de trabalho*

*Lígia, Raquelzinha, Keila, Gabriele, Gabriela, Gisela, Padula, Assis, Hélio, Jack, Rosana, Cristina e Erika pelo carinho, companheirismo, pela força e pela convivência agradável e divertida ao longo desses anos.*

*A todo corpo docente e funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia, em especial. Sônia Faraldo, Nice, Lula, Ademival, Pedro, Tino, Fátima, Ary, Teruê, Vera, Fátima Sugizaki, Lourdinha, Josias, João Pandeiros, João Pessoa, Terezinha, Ângela, Silvío, Maurício, Ramon e Alexandrina.*

*Aos meus cunhados e sobrinhos que me apoiaram, em especial, Pleusa, Paulo, Paula, Pláudia, Chico, Sueli e Aline*

*Ao Pe. Anderson Antonio Pedroso e aos meus amigos do Patebrincando e Pastoral da Família pela força e carinho.*

*Muito obrigada a todos vocês!!!*



*"Um homem que esteja cheio do amor de Deus não se contenta apenas em abençoar sua família, mas pensa em todas as pessoas do mundo, ansioso por abençoar toda a raça humana."*

*Joseph Smith (1805-1844)*

*Sumário*

## Sumário

### Capítulo 1

Revisão de Literatura .....	1
Referências Bibliográficas .....	12
Objetivos .....	22

### Capítulo 2

Captive <i>Dasypus novemcinctus</i> armadillos: conditions for the development of Paracoccidioidimycosis .....	23
Abstract .....	24
Introduction.....	25
Material and Methods.....	26
Site of capture and captive maintenance.....	26
Animal procedures and samples collection .....	26
Molecular assays.....	27
Standardization of the DNA extraction.....	27
PCR protocols .....	28
Results .....	29
Animal evaluation .....	29
Molecular assays.....	30
Discussion .....	30
Aknowledgements .....	33
References .....	34
Figure .....	37
Table .....	38

### Capítulo 3

New approaches to study the ecology of <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> : a naturally infected population of armadillos in a fluvial island.....	39
Abstract .....	40
Introduction.....	41
Material and Methods.....	42
Capture of armadillo and processing for fungal culture .....	42
Histopathological analys.....	42

Molecular analysis .....	43
Spatial analysis.....	44
Results .....	45
Animal evaluation and fungal isolation .....	45
Histopathological analysis .....	45
Molecular analysis .....	45
Spatial and environmental analysis .....	45
Discussion .....	46
Aknowledgements .....	48
References .....	48
Figures .....	52
Capítulo 4	
Discussão .....	53
Referências Bibliográficas .....	60
Conclusões.....	65

## *Capítulo 1*

## 1 - Aspectos históricos, etiológicos, clínicos, eco-epidemiológicos e moleculares da Paracoccidioidomicose

A Paracoccidioidomicose (PCM), ou Blastomicose Sul-Americana, é uma micose sistêmica que se caracteriza pelo desenvolvimento de lesões granulomatosas em pulmão, pele, membranas mucosas e outros tecidos.

Esta doença foi inicialmente descrita no Brasil por ADOLPHO LUTZ em 1908, o qual chamou a atenção para as lesões que eram freqüentemente encontradas na cavidade oral dos pacientes. Lutz estudando a morfologia do parasita, tanto nas lesões quanto em cultivo, já demonstrou a natureza fúngica do agente ao observar que as culturas apresentavam aspecto característico filamentoso e que foram, na época, comparadas a pêlos de ratinhos brancos. No entanto, naquele momento, Lutz não descreveu a nova espécie e, ao analisar o parasita nas lesões, já verificava certas diferenças com o *Coccidioides immitis*, agente etiológico da Coccidioidomicose, uma micose sistêmica descrita em 1892 por POSADAS & WERNICKE na Argentina.

ALFONSO SPLENDORE fez vários estudos sobre a doença e sobre o cultivo do agente etiológico e, em 1912, propôs a denominação *Zymonema brasiliense* para o agente etiológico desta enfermidade. A denominação *Paracoccidioides brasiliensis*, que é conhecida até hoje, foi proposta por ALMEIDA em 1930, que revalidou e redescreveu a espécie proposta por Splendore.

O nome Paracoccidioidomicose proposto para designar esta enfermidade só foi oficialmente reconhecido em 1971 em Medellín, Colômbia, durante a realização de um encontro para micologistas das Américas (LAGAZ, 1994).

*Paracoccidioides brasiliensis* foi inicialmente classificado por Ajello (AJELLO, 1977) como pertencente à seguinte categoria taxonômica: Reino Fungi, Filo Eumycota (Deuteromycotina), Classe Hyphomycetes, Ordem Moniliales, Família Moniliaceae, Gênero *Paracoccidioides*, Espécie *brasiliensis*. Esta taxonomia já não é mais aceita na atualidade, pois estudos filogenéticos com o uso de ferramentas moleculares posicionaram o *P. brasiliensis* junto aos demais fungos dimórficos *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis* e *Histoplasma capsulatum* como pertencentes à seguinte categoria taxonômica:

Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Plectomycetes, Ordem Onygenales, Família Onygenaceae, Gênero *Paracoccidioides*, Espécie *brasiliensis* (TAYLOR, 1995, PETERSON & SIGLER, 1998, BIALEK et al., 2000, HERR et al., 2001, SAN BLAS et al., 2002)

*P. brasiliensis* é um fungo dimórfico termo-dependente, onde à temperatura ambiente (20 a 25°C) encontra-se sob a forma miceliana, a qual se caracteriza, *in vitro*, por apresentar crescimento mais lento, cerca de 15 a 20 dias, desenvolvendo-se muito bem nos meios Sabouraud Dextrose Agar, Mycosel e Batata Dextrose Agar. Inicialmente a colônia é esbranquiçada, de aspecto algodinoso, podendo apresentar fissuras e elevações de coloração amarronzada, o que a torna com aspecto semelhante ao de “pipoca estourada”. Colônias miceliais de aspecto glabro também são observadas entre os isolados de *P. brasiliensis*. A forma micelial é também denominada saprofítica, ou saprobiótica, e é esta a forma infectante do fungo que está presente na natureza (RESTREPO, 1985). Microscopicamente, a fase saprofítica caracteriza-se por apresentar hifas delgadas, hialinas, septadas, multinucleadas e ramificadas com produção de clamidósporos terminais ou intercalados e conídios (artro e aleuroconídios), sem a presença de um corpo de frutificação. Outra forma vista em *P. brasiliensis* quando este é cultivado a 35 - 37°C é a levedura, a qual se caracteriza macroscopicamente por apresentar coloração creme e aspecto cerebriforme. A forma de levedura cresce bem em meios Sabouraud Dextrose Agar e GPY (glicose, peptona e extrato de levedura), principalmente se o meio for enriquecido com soro de cavalo e fator de crescimento (SINGER-VERMES et al., 1992), desenvolvendo-se em 5 a 7 dias de cultivo. Microscopicamente esta forma se caracteriza por apresentar uma célula-mãe arredondada, com parede celular espessa, birrefringente, rodeada por mutibrotamentos (células-filhas) que conferem a clássica denominação de “roda-de-leme”. A fase leveduriforme também é conhecida como parasitária, pois é esta a forma encontrada causando lesões nos tecidos do hospedeiro, quer seja humano ou animal (LACAZ, 1994).

Durante muito tempo acreditou-se que a infecção era adquirida por via oral, haja visto o grande número de pacientes que relatavam o hábito de levar talos de capim à boca e que apresentavam lesões em mucosa da cavidade oral e as lesões pulmonares eram inaparentes ao exame radiográfico. Desde 1956,

com estudos de GONZÁLES-OCHOA no México (1956), consolidou-se a teoria de que o contágio da PCM ocorria pela via inalatória e que as manifestações em mucosa oral e cutânea seriam secundárias e resultantes de disseminação hematogênica e linfática do fungo a partir do tecido pulmonar. Esta via inalatória de infecção proposta é aceita atualmente e é evidenciada por vários aspectos, dentre eles destacam-se as tentativas de isolamento deste patógeno em amostras vegetais, as quais não revelaram sua presença (ALQUATI, 1999), o freqüente achado de lesões pulmonares em exames de necropsias (MONTENEGRO & FRANCO, 1994) e o isolamento do agente em amostras de escarro e de lavado brônquico em pacientes com lesões pulmonares inaparentes (RESTREPO et al., 1976).

Uma vez inalado, o fungo pode ser destruído no parênquima pulmonar por células fagocíticas inespecíficas ou multiplicar-se e produzir um foco primário, o qual é drenado para o linfonodo regional localizado no hilo pulmonar, constituindo, desta forma, o complexo primário na PCM. A disseminação do fungo ocorre por via hematogênica com a produção de focos metastáticos em diferentes tecidos. Neste momento, a infecção é assintomática ou oligossintomática e pode evoluir para uma das seguintes formas: resolução completa e cicatrização, involução com manutenção de fungos viáveis em focos quiescentes, ou evoluir para doença progressiva pulmonar e/ou multissistêmica (PADILHA-GONÇALVES, 1987).

Nos tecidos, a reatividade do hospedeiro induz uma reação inflamatória que culmina na formação de granuloma, o qual foi inicialmente descrito por MOTTA (1935). O granuloma representa uma resposta do hospedeiro contra o fungo, na tentativa de bloquear e restringir seu crescimento, impedindo sua multiplicação e disseminação pelos tecidos do hospedeiro (FRANCO et al., 1993). A evolução do granuloma parece estar relacionada à resposta imune do hospedeiro e aos componentes de parede liberados pelo fungo (FIGUEIREDO et al., 1986). O granuloma é composto por células gigantes multinucleadas e células epitelióides, cujo centro contém uma ou mais células fúngicas em contato com leucócitos polimorfonucleares. Ao redor do granuloma observa-se um halo de células mononucleares (de BRITO & FRANCO, 1994). Essa formação granulomatosa pode estar presente tanto na forma aguda quanto crônica da PCM (MONTENEGRO & FRANCO, 1994).



Duas formas de PCM são reconhecidas atualmente: a PCM-infecção e a PCM-doença. A PCM-infecção é designada a pacientes que são paracoccidioidina-positivos e que não apresentam manifestações clínicas e laboratoriais de doença. Correspondem aos indivíduos que se infectaram, desenvolveram o complexo-primário, mas não progrediram para doença. Diversos inquéritos epidemiológicos têm sido realizados nas áreas endêmicas de PCM utilizando-se teste intradérmico com o antígeno paracoccidioidina, evidenciando que a PCM-infecção pode ocorrer em freqüências relativamente altas em algumas regiões endêmicas (CADAVID & RESTREPO, 1993, COSTA et al., 1995a, b, FAVA & FAVA NETTO, 1998, KALMAR et al., 2004). A PCM-doença decorre da progressão do complexo primário, da reativação de foco quiescente (reinfecção endógena) ou por reinfecção exógena. Duas formas principais são observadas na PCM-doença: i) aguda ou juvenil, que acomete crianças e adultos jovens (geralmente menores que 30 anos) e ii) crônica ou adulta. A PCM aguda ou juvenil ocorre em ambos os sexos e representa menos que 10% da casuística geral da PCM. As manifestações clínicas são decorrentes do rápido e progressivo envolvimento do sistema mononuclear fagocítico, sendo principalmente representado por adenomegalia difusa superficial e profunda, hepatoesplenomegalia e eventual disfunção de medula óssea. Manifestações cutâneas e lesões ósseas também podem ser observadas nesta forma. Febre e emagrecimento também acompanham este quadro que rapidamente leva ao comprometimento geral do paciente. A forma juvenil pode ser dividida em moderada ou grave, de acordo com o grau de disseminação. Recentemente foi descrito na literatura um caso de PCM disseminada fatal em uma criança de 2 anos de idade, a qual inicialmente manifestava febre, adinamia, perda de peso e linfadenopatia (PEREIRA et al., 2004). A PCM crônica é responsável pela maior parte dos casos de PCM, cerca de 90%. É principalmente observada em adultos do sexo masculino, entre 40 e 60 anos de idade, que apresentam como principal atividade profissional o trabalho agrícola ou que apresentem contatos freqüentes com solos e/ou outras partículas, como pedreiros, tratoristas, etc (WANKE & LONDERO, 1994). Em mulheres a doença não é comumente observada, pois já está constatado que o hormônio feminino (estrógeno)

confere certa proteção, impedindo a transformação dos conídios inalados em leveduras no parênquima pulmonar (ARISTIZABAL et al., 1998, SALAZAR et al., 1988). Fatores como o tabagismo, etilismo e desnutrição, também estão associados à predisposição da PCM (FORJAZ, 1989, SANTOS et al., 2003). A PCM crônica, por sua vez, é classificada em: unifocal e multifocal, as quais se observam quadros leves, moderados e graves. Outra forma de PCM-doença observada é a associada à imunodepressão e a sequelar. A classificação das formas clínicas aqui mencionadas fazem parte do consenso do Comitê de Experts Reunidos no Colóquio Internacional sobre a PCM, realizado em 1986, na Colômbia, e publicado em 1987 (FRANCO et al., 1987).

A PCM apresenta distribuição geográfica restrita aos países latino-americanos, ocorrendo com maior incidência no Brasil, Colômbia, Venezuela e Argentina (WANKE & LONDERO, 1994). Por causar uma doença grave no ser humano, levando-o a óbito em alguns casos, e por ocorrer de forma endêmica nestes países, este agente despertou a atenção de vários grupos de pesquisadores, principalmente Latino-americanos (NEGRONI, 1966, ALBORNOZ, 1971, FRANCO et al., 1994). Diferentemente de outras micoses sistêmicas, como a histoplasmose e coccidioidomicose, o *P. brasiliensis* tem sua ecologia muito pouco conhecida. Apesar de significantes progressos obtidos na ecologia do *P. brasiliensis*, este fungo ainda continua a desafiar os pesquisadores quanto ao seu nicho ecológico. Sabe-se que este patógeno vive saprofiticamente em solo, tendo sido isolado em seis ocasiões. Inicialmente em Recife (SHOME & BATISTA, 1963), onde este isolado foi invalidado por algum tempo e, recentemente, estudos demonstraram a autenticidade do mesmo (FRANCO et al., 2000). Outros isolados de *P. brasiliensis* a partir de solo foram obtidos por NEGRONI (1966) na Argentina (uma única vez), por ALBORNOZ (1971) na Venezuela (três vezes) e, mais recentemente, em uma amostra proveniente de plantação de café em Ibiá, Minas Gerais (SILVA-VERGARA et al., 1998). Também merecem destaque as tentativas de isolamento do agente em amostras de solo, provenientes de áreas endêmicas de PCM, mas que, no entanto, não foram bem sucedidas (MENDELOVICI et al., 1974, MONTENEGRO et al., 1996). Embora ainda existam outras citações de

isolamento do *P. brasiliensis* em trato intestinal de morcegos (GROSE & TRAMSITT, 1965), fezes de pingüim (GEZUELE, 1989) e ração canina, provavelmente contaminada com solo (FERREIRA et al., 1990), estes dados não são totalmente conclusivos, principalmente devido ao caráter casual e não repetitivo destas observações. Aliado às dificuldades de isolamento ambiental deste patógeno, a doença tem um prolongado período de latência, não existem relatos de surtos epidêmicos e foi muito pouco pesquisada em animais silvestres e/ou domésticos, os quais podem representar importantes sinalizadores da presença do agente em determinados ambientes.

Experimentalmente, vários animais de laboratório, como camundongos e hamsters, mostram ser sensíveis à infecção pelo fungo (COELHO, 1973, DEFAVERI et al., 1982). Até hoje estes animais são empregados para caracterização de virulência de diferentes isolados fúngicos e estudos imunológicos, principalmente utilizando-se como modelo experimental o hamster (PERAÇOLI et al., 1999, PARISE-FORTES et., 2000, HEBELER-BARBOSA et al., 2003, MACORIS et al., *submitted*). Evidência histopatológica, em lesões hepáticas, da presença do *P. brasiliensis* em “saguís” (*Saimiri sciureus*) também é relatada em um animal proveniente da Bolívia (JOHNSON & LANG, 1977).

Estudos utilizando-se de reações sorológicas pelas técnicas de fixação do complemento e de reação de precipitação realizados por MÓS & FAVA NETTO (1974), em cães provenientes dos municípios de São Paulo e Botucatu, revelaram positividade à reação de fixação do complemento em 74,33% e 78,12%, respectivamente. Estes mesmos autores também tentaram o isolamento do agente a partir de tecidos destes animais, porém, sem sucesso. Ensaio imunoenzimáticos, como o de ELISA, também foram utilizados para a pesquisa de anticorpos específicos contra o *P. brasiliensis* em cães. Em avaliação de animais procedentes da zona rural e urbana do município de Londrina, PR, obteve-se uma positividade de 89,47% e 14, 81%, respectivamente (ONO et al., 2001). Em ensaio semelhante, porém com animais procedentes da área rural dos municípios da área endêmica de PCM de Botucatu, obteve-se 35% de positividade (FAGUNDES, 2002).

Inquéritos epidemiológicos com o uso da paracoccidioidina têm-se mostrado de grande importância para o conhecimento da epidemiologia desta

micose em Medicina Veterinária, uma vez que o isolamento do agente, como visto, é muito pouco relatado em animais. Com relação aos animais domésticos, tem sido observada uma alta positividade em equinos, seguido de bovinos e ovinos (COSTA & FAVA NETTO, 1978, COSTA et al., 1995a). Em animais silvestres, uma maior positividade tem sido observada em grupos de animais terrestres (82,98%) quando comparado aos arbóreos (22,45%) (COSTA et al., 1995b). Dentre as espécies de animais silvestres, observou-se uma alta positividade (94,6%) em quatis (*Nasua nasua*) (COSTA et al., 1995a), os quais são animais que vivem tanto em ambientes arbóreos quanto terrestres, com hábito fossatório, como o de remexer o solo. A distribuição geográfica desta espécie animal compreende países das Américas Central e do Sul (FOWLER, 1986). Tentativas de isolamento do *P. brasiliensis* a partir de amostras de tecido destes animais, mesmo tendo sido procedentes de área endêmica de PCM não foram bem sucedidas, tendo sido observado apenas reação positiva à paracoccidioidina em um animal, de um total de 3 avaliados (BOSCO, 2000).

Na década de 80, *P. brasiliensis* foi isolado a partir de tatus (*Dasypus novemcinctus*) capturados na região Sul do Pará, constituindo assim no primeiro isolamento fúngico em tecido animal (NAIFF et al., 1986, 1989). Posteriormente este achado foi confirmado por outros pesquisadores em diversas áreas endêmicas da doença (BAGAGLI et al., 1998, 2003, CORREDOR et al., 1999, SILVA-VERGARA et al., 2000). A frequência de animais infectados, com isolamento fúngico positivo, é bastante alta, chegando a 100% em um dos Municípios (Manduri, SP) da área endêmica de Botucatu (RESTREPO et al., 2000, BAGAGLI et al., 2003). Esta espécie de tatu, popularmente conhecida como “tatu-galinha”, é comumente utilizada como suplemento alimentar em muitas comunidades rurais, tendo sido, por este motivo, exaustivamente caçada por moradores destas comunidades. Sua distribuição geográfica é semelhante à distribuição da paracoccidioidomicose (RESTREPO-MORENO, 1994) e o contato com estes animais está associado a um aumento nos fatores de riscos para a infecção em pessoas residentes nas áreas endêmicas da doença (CADAVID & RESTREPO, 1993). Esta espécie animal apresenta contato íntimo com o solo devido ao constante hábito escavatório, tanto para obtenção de alimentos, quanto para a construção de

tocas de moradia. O ecossistema compreendido pelo tatu, sua toca e ambiente peridomiciliar, parece ter desempenhado importante papel na evolução do *P. brasiliensis* à patogenicidade, levando o fungo a uma possível condição zoofílica, ou seja, boa adaptação ao tecido animal (BAGAGLI et al., 1998, FRANCO et al., 2000). Segundo estes autores, o isolamento do *P. brasiliensis* a partir de amostras de solo é difícil devido a uma baixa produção de conídias na forma saprofítica ambiental e também pela tendência que este fungo tem em produzir lesões de caráter crônico nos hospedeiros, quer seja humano ou animal (FRANCO et al., 2000).

Os tatus pertencem à Ordem Xenarthra e são mamíferos muito antigos cuja origem é a América do Sul. Estes animais apresentam temperatura corporal baixa, uma fraca resposta imune celular e têm sido muito empregados como modelo para estudos de doenças infecciosas, destacando-se a hanseníase causada pelo *Micobacterium leprae* (OPROMOLLA et al., 1980, JOB et al., 1985, 1991, 2003). O tatu-galinha apresenta intenso contato com o solo, onde ele constrói sua toca para moradia e alimentação, não apresenta hábitos migratórios e tem uma área de vida (“home range”) restrita, ou seja, este animal vive toda sua existência em uma área limitada (LAYNE & GLOVER, 1977, BREECE & DUSI, 1985, LOUGRHY & MACDONOUGH, 1997), fato este que o torna um animal sentinela, ideal para demarcar áreas de ocorrência do *P. brasiliensis* na natureza (RESTREPO et al., 2000, BAGAGLI et al., 2003). O freqüente achado de que esta espécie animal apresenta-se naturalmente infectada por este patógeno tem possibilitado inúmeras perspectivas para o estudo da eco-epidemiologia e importantes aspectos biológicos da interação patógeno/hospedeiro. Seria esta relação obrigatória ou facultativa? Os tatus podem manifestar a PCM-doença? E ainda, poderiam os tatus eliminar o *P. brasiliensis* através de suas secreções e/ou excreções, contribuindo assim para a disseminação do patógeno no ambiente?

Embora os tatus tenham uma fraca resposta imunológica celular, eles produzem as várias classes de imunoglobulinas, as quais podem ser detectadas pelo método de ELISA (TRUMAN et al., 1990, VADIEE et al., 1988, SANTOS ARGUMEDO et al., 1995). A técnica de ELISA em soros de tatus vem sendo empregada para inquéritos epidemiológicos, acompanhamento da patogenicidade e também para a evolução da infecção pelo *Mycobacterium*

*leparae* (JOB et al., 1992, VADIEE et al., 1990, TRUMAN et al., 1991, ROJAS-ESPINOSA & LOVIK, 2001). Esta técnica também foi recentemente introduzida para avaliação de níveis de IgM e IgG contra *P. brasiliensis* em soros de tatus (*D. novemcinctus*) utilizando-se como antígeno as proteínas gp43 e gp70 purificadas (FERNANDES et al., 2004).

Os recentes avanços na Biologia Molecular proporcionaram o surgimento de várias técnicas de identificação e tipagem de patógenos. Por se tratarem de métodos não invasivos, seguros e de rápido diagnóstico, tais técnicas vêm sendo cada vez mais aprimoradas e empregadas, ainda que em nível de pesquisa, no diagnóstico da PCM. Algumas regiões genômicas em particular, tais como de DNA ribossomal, têm se mostrado muito úteis como alvos para detecção molecular. Estes genes, principalmente 18S, 5.8S e 28S, são encontrados em todos os fungos e têm a tendência em se manterem conservados nas mais diversas espécies fúngicas. As regiões espaçadoras internas 1 e 2 (Internal Transcribed Spacer – ITS) são regiões encontradas entre os genes e, ao contrário do que ocorre com os genes, estas regiões são altamente variáveis entre as diferentes espécies fúngicas, constituindo-se em alvos para classificação e identificação molecular (IWEN et al., 2002). Baseados nesta região genômica, diversos estudos foram realizados, tais como MOTOYAMA et al., (2000), que propuseram a utilização de primers que amplificam a região 5.8S do rDNA e observaram que a combinação dos primers ITS1 e OL5 amplificaram um fragmento de 496 pares de bases do *P. brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum*. Esta combinação de primers não amplificou tal região nas outras espécies de fungos amostradas (*Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Sacharomices cerevisiae*), bem como na amostra de DNA humano, utilizados como fita molde. Uma maior especificidade da técnica foi observada quando se utilizou a combinação dos primers OL3 e UNI-R, os quais amplificaram um fragmento de 203 pares de bases, observado somente no *P. brasiliensis*. Estes autores propõem a realização de um duplo PCR, utilizando os primers acima mencionados, para o diagnóstico da PCM. Também empregando primers que amplificam a região gênica 5.8 S do DNA ribossomal do *P. brasiliensis*, IMAI et al., (2000) descrevem a utilização dos primers *Pb-ITS1s* e *Pb-ITS3a* para 29 cepas de *P. brasiliensis*, as quais incluíam 2 cepas mutantes, e este par de

primers foi capaz de promover 100% de identidade para este fungo. Para a determinação de especificidade destes primers, os autores também os testaram em *A. fumigatus*, *B. dermatitidis*, *C. albicans*, *C. neoformans*, *H. capsulatum* e *Penicillium marneffeii*, e verificaram que não houve a amplificação de 418 pares de bases, os quais foram vistos somente nas cepas de *P. brasiliensis*. Estes autores concluem que este par de primer é específico e útil para o diagnóstico da PCM, bem como sua utilização em estudos epidemiológicos, e sugerem até mesmo a utilização dos primers *Pb-ITS1s* e *Pb-ITS3a* como "inner" primer para a reação de nested-PCR, utilizando-se os primers ITS1 e ITS4 como "outer" primer.

A região de DNA ribossomal de diversos isolados de *P. brasiliensis* obtidos de tatus já foi estudada e caracterizada em termos de seqüenciamento das regiões ITS1-5.8S-ITS2 (HEBELER-BARBOSA et al., 2003). Baseado na análise deste sequenciamento desenvolveu-se um par de "primers", *Pb-ITS-E* e *Pb-ITS-R*, utilizando-o como "inner primer" (THEODORO et al. *submitted*) quando a reação de Nested-PCR é precedida pela utilização do par de "primer" universal para fungos ITS4/ITS5 (WHITE et al., 1990). A reação de Nested-PCR com os "primers" *Pb-ITS-E/Pb-ITS-R* foi empregada para avaliar amostras de solo provenientes de tocas de tatus da região endêmica de PCM de Botucatu, onde se obteve uma amostra de solo positiva (THEODORO et al. *submitted*).

Uma outra importante região genômica do *P. brasiliensis* muito utilizada em pesquisa é a *gp43*, uma proteína imunogênica muito importante (PUCCIA et al., 1986, 1991). GOMES et al. (2000) demonstraram a utilidade da PCR como método diagnóstico da PCM ao desenvolverem "primers" sensíveis e específicos capazes de detectar 10 células fúngicas por mL de amostra clínica (escarro) em pacientes com a forma pulmonar da doença. Estes mesmos autores utilizaram várias combinações dos primers PC1, PC2, PC3, PC5 e PC6, todos derivados do gene da *gp 43*, e verificaram que os pares de primers empregados foram capazes de detectar o DNA do *P. brasiliensis* em todas as amostras de escarro avaliadas, as quais por sua vez também foram positivas ao exame microscópico. BIALEK et al. (2000) desenvolveram uma técnica de Nested-PCR, usando "primers" derivados da *gp 43*, cujo produto amplificado continha 196 pares de bases. Estes autores ainda concluem em seu trabalho

que a técnica apresenta alta sensibilidade, sendo muito útil sua aplicação para o diagnóstico da PCM em tecido humano, e também uma alta especificidade, uma vez que não amplificou o DNA de *Histoplasma capsulatum* em órgãos de camundongos infectados por este patógeno.

Além da gp 43, uma outra proteína importante e específica do *P. brasiliensis* e que também é empregada em estudos moleculares é a p27 (McEWEN et al., 1996). Reações de PCR utilizando-se de “primers” que amplificavam especificamente esta proteína mostraram-se positivas em amostras de solo artificialmente contaminadas com *P. brasiliensis*, bem como amostras de tecido de tatus naturalmente infectados e de camundongos experimentalmente inoculados (DÍEZ et al., 1999, CORREDOR, et al., 1999).

Da mesma forma que a biologia molecular mostrou-se útil aos estudos eco-epidemiológicos do *P. brasiliensis*, a introdução de técnicas de Sistema de Informação Geográfica (SIG) e de Sensoriamento Remoto (SR), duas potentes ferramentas, têm sido empregadas com sucesso para a elucidação da distribuição de várias enfermidades (LINTHICUM et al., 1987, KITRON et al., 1991, ROGERS et al., 1991, WOOD et al., 1991, BECK et al., 1994), incluindo a Coccidioidomicose (C.D.C., 2003). A utilização destas duas ferramentas, empregadas para se caracterizar a área endêmica de PCM de Botucatu, permitiu verificar que a doença não ocorre de forma aleatória dentro dessa área, o que indica que existem condições ambientais possivelmente favoráveis à manutenção do fungo nesta área, facilitando a infecção humana e animal (SIMÕES et al., 2004). Dentre as variáveis estudadas, destaca-se a umidade, um fato que já vem sendo mencionado na literatura como importante para a manutenção do fungo no ambiente (RESTREPO et al., 2000, BAGAGLI et al. 2003).



## 2 – Referências Bibliográficas\*

- AJELLO, L. Medically important infectious fungi. **Contrib. Microbiol Immunol**, v. 3, p. 7, 1977.
- ALBORNOZ, M. B. de. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. **Sabouraudia**, v. 9, p. 248-53, 1971.
- ALMEIDA, F. Estudos comparativos do granuloma coccidióico dos Estados Unidos e do Brasil. Novo gênero para o parasito brasileiro. **An. Fac. Med. São Paulo**, v. 5, 125, 1930.
- ALQUATI, S. A. B. ***Paracoccidioides brasiliensis* não ocorre na forma endofítica em gramíneas da região de Botucatu, SP-Brasil**. Botucatu, 1999. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.
- ARISTIZABAL, B. H., CLEMONS, K. V., STEVENS, D. A., RESTREPO, A. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: *in vivo* inhibition in females. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 5587-91, 1998.
- BAGAGLI, E., FRANCO, M., BOSCO, S. M. G., HEBELER-BARBOSA, F., TRINCA, L., MONTENEGRO, M. R. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. **Med. Mycol.**, v. 41, p. 217-23, 2003.
- BAGAGLI, E., SANO, A., COELHO, K. I., ALQUATI, S., MIAJI, M., CAMARGO, Z. P., GOMES, G. M., FRANCO, M., MONTENEGRO, M. R. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in na endemic area of paracoccidioidomycosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 58, p. 505-12, 1998.
- BECK, L. R., RODRÍGUEZ, M. H., DISTER, S. W., *et al.* Remote sensing as a landscape epidemiologic tool to identify villages at high risk for malaria transmission. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 51, p. 271-80, 1994.
- BIALEK, R., IBRICEVIC, A., AEPINUS, C., NAJVAR, L. K., FOTHERGILL, A. W., KNOBLOCH, J., GRAYBILL, J. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue samples by a Nested-PCR assay. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 2940-2, 2000.

---

\*UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas. **Normas para publicações da UNESP**. São Paulo : Editora UNESP, 1994. V. 2: Referências bibliográficas.

BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS previews database**. Philadelphia, 1991. 451p.

- BIALEK, R., IBRICEVIC, A., FOTHERGILL, A., BEGEROW, D. Small subunit ribosomal DNA sequence shows *Paracoccidioides brasiliensis* closely related to *Blastomyces dermatitidis*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 3190-3, 2000.
- BOSCO, S. M. G. **Pesquisa do *paracoccidioides brasiliensis* e de outros fungos patogênicos dimórficos em animais silvestres**. 2000. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.
- BREECE, G. A., DUSI, J. L. Food habits and home ranges of the common long-nosed armadillo *Dasypus novemcinctus* in Alabama. In: MONTGOMERY, G. G. (Ed.) **The evolution and ecology of armadillos, sloths, and vermilinguas**. Washington : Smithsonian Institution, 1985. p.19-27.
- CADAVID, D., RESTREPO, A. Factors associated with *Paracoccidioides brasiliensis* infection among permanent residents of three endemic areas in Colombia. **Epidemiol. Infect.**, v. 111, p. 121-33, 1993.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Increase in Coccidioidomycosis – Arizona, 1998-2001. **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, v. 52(RR-6), p. 109-12, 2003.
- COELHO, K. I. R. **Blastomicose sul-americana experimental em hamster**. Botucatu, 1973. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas, Universidade Estadual Paulista.
- CORREDOR, G. G., CASTAÑO, J. H., PERALTA, A., DÍEZ, S., ARANGO, M., MCEWEN, J., RESTREPO, A. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in na endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. **Rev. Iber. Micol.**, v. 16, p. 216-20, 1999.
- COSTA, E. O., DINIZ, L. S. M., FAVA NETTO, C. The prevalence of positive intradermal reactions to paracoccidioidin in domestic and wild animals in São Paulo, Brazil. **Vet. Res. Commun.**, v. 19, p. 127-30, 1995a.
- COSTA, E. O., DINIZ, L. S. M., FAVA-NETTO, C., ARRUDA, C., DAGLI, M. L. Z. Delayed hypersensitivity test with paracoccidioidin in captive Latin American wild mammals. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 33, p. 39-42, 1995b.
- COSTA, E. O., FAVA NETTO, C. Contribution to the epidemiology of Paracoccidioidomycosis and Histoplasmosis in the State of São Paulo, Brazil. Paracoccidioidin and Histoplasmin intradermic tests in domestic animals. **Saboraudia**, v. 16, p. 93-101, 1978.
- de BRITO, T., FRANCO, M. F. Granulomatous infection. **Rev. inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 36, p. 185-92, 1994.

- DEFAVERI, J., REZKALLAH-IWASSO, M. T., FRANCO, M. F. Experimental pulmonary paracoccidioidomycosis in the mice: morphology and correlation of lesions with humoral and cellular immune response. **Mycopathologia**, v. 77, p. 3-11, 1982.
- DÍEZ, S., GARCIA, E. A., PINO, P. A., BOTERO, S., CORREDOR, G. G., PERALTA, L. A., CASTAÑO, J. H., RESTREPO, A., MCEWEN, J. G. PCR with *Paracoccidioides brasiliensis* specific primers: potential use in ecological studies. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 41, p. 351-7, 1999.
- FAGUNDES, R. Q. **Pesquisa da paracoccidioidomicose em cães (iCanis familiaris) na região endêmica de Botucatu, São Paulo**. Botucatu, 2002. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.
- FAVA, S. C., Fava Netto, C. Epidemiologic surveys of histoplasmin and paracoccidioidin sensitivity in Brazil. **Ver. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 40, p. 155-64, 1998.
- FERNANDES, G. F., DEPS, P., TOMIMORI-YAMASHITA, J., CAMARGO, Z. P. IgM and IgG antibody response to *Paracoccidioides brasiliensis* in naturally infected wild armadillos (*Dasypus novemcinctus*). **Med. Mycol.**, v. 42, p. 363-8, 2004.
- FIGUEIREDO, F., SILVA, C. L., ALVES, L. M. C., ROSSI, M. A. Participation of *Paracoccidioides brasiliensis* lipids and polysaccharides in the evolution of granulomas. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 19, p. 615, 1986.
- FORJAZ, M. H. H. **Estudo da epidemiologia da paracoccidioidomicose. Rastreamento de áreas endêmicas e de “reserváreas”, no Brasil, através do traçado do perfil migratório residencial-profissional de pacientes diagnosticados em São Paulo**. São Paulo, Tese (Doutorado). Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1989.
- FOWLER, M. E. **Zoo and wild animal medicine**. 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1986. 1227p.
- FRANCO, M., BAGAGLI, E., SCAPOLIO, S., LACAZ, C. S. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. **Med. Mycol.**, v. 38, p. 185-91, 2000.
- FRANCO, M., LACAZ, C.S., RESTREPO-MORENO, A., DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC Press, 1994. 407 p.
- FRANCO, M., MONTENEGRO, M. R., MENDES, R. P. Paracoccidioidomycosis: A recently proposed classification of its clinical forms. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 20, p. 32, 1987.

- FRANCO, M., PERAÇOLI, M. T. S., SOARES, A. M. V. C., MONTENEGRO, M. R., MENDES, R. P., MEIRA, D. A. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. **Curr. Top. Med. Mycol.**, v. 5, p. 115-49, 1993.
- GEZUELE, E. Aislamento de *Paracoccidioides sp.* de heces de pinguino de la Antártida. In: INTERNATIONAL MEETING ON PARACOCIDIIDOMYCOSIS, 4, 1989, Caracas. **Abstracts...** Caracas, 1989. (Abstract B2).
- GOMES, G. M., CISALPINO, P. S., TABORDA, C. P., CAMARGO, Z. P. PCR for diagnosis of Paracoccidioidomycosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 3478-80, 2000.
- GONZALES-OCHOA, A. Clasificación clínica de las micosis. **Rev. Int. Salubr. Enferm. Trop. (Méx)**, v. 16, p. 1, 1956.
- GROSE, E., TRAMSITT, J. R. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia, S.A. **Sabouraudia**, v. 4, p. 124-5, 1965.
- HEBELER-BARBOSA, F., MONTENEGRO, M. R., BAGAGLI, E. Virulence profiles of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from armadillos (*Dasypus novemcinctus*). **Med. Mycol.**, v. 41, p. 89-96, 2003.
- HEBELER-BARBOSA, F., MORAIS, F. V., MONTENEGRO, M. R., KURAMAE, E. E., MONTES, B., MCEWEN, J. G., BAGAGLI, E., PUCCIA, R. Comparison of the sequences of the internal transcribed spacer regions and PBGP43 genes of *Paracoccidioides brasiliensis* from patients and armadillos (*Dasypus novemcinctus*). **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 5735-7, 2003.
- HERR, R. A., TARCHA, E. J., TABORDA, P. R., TAYLOR, J. W., AJELLO, L., MENDOZA, L. Phylogenetic analysis of *Lacazia loboi* places this previously uncharacterized pathogen within the dimorphic Onygenales. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 309-14, 2001.
- IMAI, T., SANO, A., MIKAMI, Y., WATANABE, K., AOKI, F. H., BRANCHINI, M. L. M., NEGRONI, R., NISHIMURA, K., MIYAJI, M. A new PCR primer for the identification of *Paracoccidioides brasiliensis* based on rRNA sequences coding the internal transcribed spacers (ITS) and 5.8S regions. **Med. Mycol.**, v. 38, p. 323-6, 2000.
- IWEN, P. C., HINRICHS, S. H., RUPP, M. E. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. **Med. Mycol.**, v. 40, p. 87-109, 2002.
- JOB, C. K. Nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*) as an animal model for leprosy. **Indian. J. Lepr.**, v. 63, p. 356-61, 1991.
- JOB, C. K. Nine-banded armadillo and leprosy research. **Indian. J. Pathol. Microbiol.**, v. 46, p. 541-50, 2003.

- JOB, C. K., DRAIN, V., TRUMAN, R., DEMING, A. T., SANCHEZ, R. M., HASTINGS, R. C. The pathogenesis of leprosy in the nine-banded armadillo and the significance of IgM antibodies to PGL-1. **Indian. J. Lepr.**, v. 64, p. 137-51, 1992.
- JOB, C. K., SANCHEZ, R. M., HASTINGS, R. C. Manifestations of experimental leprosy in the armadillo. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 34, p. 151-61, 1985.
- JOHNSON, W. D., LANG, C. M. Paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis) in squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). **Vet. Pathol.**, v. 14, p. 368-71, 1977.
- KALMAR, E. M., ALENCAR, F. E., ALVES, F. P., PANG, L. W., DEL NEGRO, G. M., CAMARGO, Z. P., SHIKANAI-YASUDA, M. A. Paracoccidioidomycosis: an epidemiologic survey in a pediatric population from the Brazilian Amazon using skin tests. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 71, p. 82-6, 2004.
- KITRON, U., BOUSEMAN, J., JONES, C. Use of ARC/INFO GIS to study the distribution of Lyme disease ticks in an Illinois county. **Prev. Vet. Med.** v. 11, p. 243-8, 1991.
- LACAZ, C. S. Historical evolution of the knowledge on Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent, *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Franco, M., Lacaz, C. S., Restrepo, A., Del Negro, G. (Eds). **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRS Press, 1994. 410 p.
- LAYNE JN, GLOVER D. Home range of the armadillo in Florida. **J. Mammal.**, v. 58, p. 411-3, 1977.
- LINTHICUM, K. J., BAILEY, C. L., DAVIES, F. G., TUCKER, C. J. Detection of Rift Valley fever viral activity in Kenya by satellite remote sensing imagery. **Science**, v. 235, p.1656-9, 1987.
- LOUGHRY, W.J., MCDONOUGH, C.M. Spacial patterns in a population of nine-banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*). **Am. Midl. Nat.**, v. 140, p. 161-9, 1997.
- LUTZ, A. Uma mycose pseudococcidica localisada na boca e observada no Brasil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomycoses americanas. **Bras-Méd.**, v. 22, 121, 1908.
- MACORIS, S. A. G., SUGIZAKI, M. F., PERAÇOLI, M. T. S., BOSCO, S. M. G., HEBELER-BARBOSA, F., SIMÕES, L. B., THEODORO, R. C., TRINCA, L., BAGAGLI, E. Virulence attenuation and phenotypic variation of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from armadillos and patients. (submitted)

- MCEWEN, J. G., ORTIZ, B. L., GARCIA, A. M., FLORES, A. M., BOTERO, S., RESTREPO, A. Molecular cloning, nucleotide sequencing and characterization of a 27 Kda antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal. Genet. Biol.**, v. 20, p. 125-31, 1996.
- MENDELOVICI, K., SALFELDER, E., ROMAN, A. R. Intento de aislamiento del *Paracoccidioides brasiliensis* del suelo. **Mycopathol. Mycol. Appl.**, v. 52, p. 45-53, 1974.
- MONTENEGRO, M. R., FRANCO, M. Pathology. In: FRANCO, M., LACAZ, C. S., RESTREPO, A., DEL NEGRO, G. (eds). **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRS Press, 1994. cap. 9, 410 p.
- MONTENEGRO, M. R., MIYAJI, M., FRANCO, M. et al. Isolation of fungi from nature in the region of Botucatu, São Paulo, Brazil, an endemic area of Paracoccidioidomycosis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 11, p. 665-70, 1996.
- MÓS, E. N., FAVA-NETTO, C. Contribuição ao estudo da paracoccidioidomicose. I - Possível papel epidemiológico dos cães. Estudo sorológico e anátomo-patológico. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 16, p. 151-9, 1974.
- MOTOYAMA, A. B., VENANCIO, E. J., BRANDÃO, G. O., PETROFEZA-SILVA, S., PEREIRA, I., SOARES, C. M. A., FELIPE, M. S. S. Molecular identification of *Paracoccidioides brasiliensis* by PCR amplification of ribosomal DNA. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 3106-9, 2000.
- MOTTA, L. C. granulomatose paracoccidioidica. **An. Fac. Med. São Paulo**, v. 11, p. 293, 1935.
- NAIFF, R. D., FERREIRA, L. C. P., BARRETO, T. V., NAIFF, M. F., ARIAS, J. R. Enzootic paracoccidioidomycosis in armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in the State of Para. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 28, p. 19-27, 1986.
- NAIFF, R.D., BARRETO, T. V. Novos registros de *Paracoccidioides brasiliensis* em tatus (*Dasypus novemcinctus*). In: Congresso Brasileiro De Parasitologia, 1989, Rio de Janeiro. **Proceedings...** Rio de Janeiro, 1989. p.197
- NEGRONI, P. El *Paracoccidioides brasiliensis* vive saprofiticamente en el suelo Argentino. **Prensa Med. Argent.**, v. 53, p. 2381-82, 1966.
- ONO, M. A., BRACARENSE, A. P. F. R. L., MORAIS, H. S. A., TRAPPS, S. M., BELITARDO, D. R., CAMARGO, Z. P. Canine paracoccidioidomycosis: a seroepidemic study. **Med. Mycol.**, v. 39, p. 277-82, 2001.
- OPROMOLLA, D. V. A., DE ARRUDA, O. S., FLEURY, R. N. Manutenção de tatus em cativeiro e resultados da inoculação com *Micobacterium leprae*. **Hansenol. Int.**, v. 5, p. 28-36, 1980.

- PADILHA-GONÇALVES, A. Paracoccidioidomicose-doença. Infecção sistêmica. **Ann. Brasil. Dermatol.**, v. 62, p. 293, 1987.
- PARISE-FORTES, M. R., DA SILVA, M. F., SUGIZAKI, M. F., DEFAVERI, J., MONTENEGRO, M. R., SOARES, A. M., PERAÇOLI, M. T. Experimental paracoccidioidomycosis of the Syrian hamster: fungicidal activity and production of inflammatory cytokines by macrophages. **Med. Mycol.**, v. 38, p. 51-60, 2000.
- PERAÇOLI, M. T., SUGIZAKI, M. F., MENDES, R. P., NAIFF, R., MONTENEGRO, M. R. *Paracoccidioides brasiliensis* isolated from armadillos is virulent to Syrian hamsters. **Mycopathologia**, v. 148, 123-30, 1999.
- PEREIRA, R. M., TRESOLDI, A. T., SILVA, M. T. N., BUCARETCHI, F. Fatal disseminated paracoccidioidomycosis in a two-year-old child. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 46, p. 37-9, 2004.
- PETERSON, S. W., SIGLER, L. Molecular genetic variation in *Emmonsia crescens* and *Emmonsia parva*, etiologic agents of adiaspiromycosis, and their phylogenetic relationship to *Blastomyces dermatitidis* (*Ajellomyces dermatitidis*) and other systemic fungal pathogens. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 2918-25, 1998.
- POSADAS, A. Un nuevo caso de micosis fungoidea con psorospermios. **Circ. Med. Arg.**, v. 15, p. 585, 1892.
- PUCCIA, R. SCHENCKMAN, S., GORIN, P. A., TRAVASSOS, L. R. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. **Infect. Immun.**, v. 53, 199, 1986.
- PUCCIA, R., TAKAOKA, D. T., TRAVASSOS, L. R. Purification of the 43 kDa glycoprotein from exocellular components excreted by *Paracoccidioides brasiliensis* in liquid culture (TOM medium). **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 29, p. 57, 1991.
- RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 23, p. 323, 1985.
- RESTREPO-MORENO, A. Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*. In: FRANCO, M., LACAZ, C. S., RESTREPO, A., DEL NEGRO, G. (Eds). **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRS Press, 1994.
- RESTREPO, A., BAUMGARDNER, D. J., BAGAGLI, E., COOPER, C. R., MCGINNIS, M. R., LAZERA, M. S., BARBOSA, F. H., BOSCO, S. M. G., CAMARGO, Z. P., COELHO, K. I., FORTES, S. T., FRANCO, M., MONTENEGRO, M. R., SANO, A., WANKE, B. Clues to the presence of

- pathogenic fungi in certain environments. **Med. Mycol.**, v. 38, p. 67-77, 2000.
- RESTREPO, M. A., ROBLEDO, M., GIRALDO, R., HERNANDEZ, H., SIERRA, F. GUTIERREZ, F. LONDONO, F., LOPES, R. CALLE, G. The gamut of paracoccidioidomycosis. **Am. J. Med.**, v. 61, p. 33, 1976.
- ROGERS, D., RANDOLPH, S. Mortality rates and population of tsetse flies correlated with satellite imagery. **Nature**, v. 351, p. 739-41, 1991.
- ROJAS-ESPINOSA, O., LOVIK, M. *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium lepraemurium* infections in domestic and wild animals. **Rev. Sci. Tech.**, v. 20, p. 219-51, 2001.
- SALAZAR, M. E., RESTREPO, A., STEVENS, D. A. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infect. Immun.**, v. 56, p. 711-3, 1988.
- SAN BLAS, G., NINO-VEGA, G., ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med. Mycol.**, v. 40, p. 225-42, 2002.
- SANTOS, W. A., SILVA, B. M., PASSOS, E. D., ZANDONADE, E., FALQUETO, A. Associação entre tabagismo e paracoccidioidomicose: um estudo de caso-controle no Espírito Santo, Brasil. **Cad. Saúde Pública RJ**, v. 19, p. 245-53, 2003.
- SANTOS-ARGUMEDO L., GUERRA-INFANTE, F., QUESADA-PASCUAL, F., ESTRADA-PARRA, S. Identification and purification of armadillo (*Dasypus novemcinctus*) immunoglobulins: preparation of specific antisera to evaluate the immune response in these animals. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**, v. 63, p. 56-61, 1995.
- SHOME, S. K., BATISTA, A. C. Occurrence of *Paracoccidioides brasiliensis* in the soil of Recife, Brazil. **Rev. Fac. Med. Fed. Ceará**, v. 3, p. 90-4, 1963.
- SILVA-VERGARA, M.L., MARTÍNEZ , R., CHADU, A., MADEIRA, M., FREITAS-SILVA, G. LEITE MAFFEI, C. M. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá, State of Minas Gerais, Brazil. **Med. Mycol.**, v. 36, p. 37-42, 1998.
- SILVA-VERGARA, M. L., MARTÍNEZ , R., CAMARGO, Z. P., MALTA, M. H., MAFFEI, C. L., CHADU, J. B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from aramditos (*Dasypus novemcinctus*) in na área where the fungus was recently isolated from soil. **Med. Mycol.**, v. 38, p. 193-9, 2000.
- SIMÕES, L. B., MARQUES, S. A., BAGAGLI, E. Distribution of Paracoccidioidomycosis: determination of ecologic correlates through



- Geographic Information System and spatial analyzes **Med. Mycol.**, v. 42, p. 517-23, 2004.
- SINGER-VERMES, L. M., CIAVAGLIA, M. C., KASHINO, S. S., BURGER, E., CALICH, V. L. The source of growth-promoting factor(s) affects the plating efficiency of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 30, p. 261-4, 1992.
- SPLENDORE, A. Un'afezione micotica con localizzazione nella mucosa della bocca, osservata in Brasile, determinata da fungí appartenenti alla tribu degli Exoascei (*Zymonema brasiliense* n.n sp.), in Volume in onore del Prof. Celle nel 25<sup>o</sup> anno di insegnamento, G. Bertero, Roma, 421, 1912.
- TAYLOR, J. W. Molecular Phylogenetic classification of fungi. **Arch. Med. Res.**, v. 26, p. 307-14, 1995.
- THEODORO, R. C., CANDEIAS, J. M. G., ARAÚJO JR., J. P., BOSCO, S. M. G., MACORIS, S. A. G., PADULA JR. L. O., FRANCO, M. BAGAGLI E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. (submitted)
- TRUMAN, R. W., JOB, C. K., HASTINGS, R. C. Antibodies to the phenolic glycolipid-1 antigen for epidemiologic investigations of enzootic leprosy in armadillos (*Dasypus novemcinctus*). **Lepr. Rev.**, v. 61, p. 19-24,1990.
- TRUMAN, R. W., KUMARESAN, J. A., MCDONOUGH, C.M., JOB, C. K., HASTINGS, R. C. Seasonal and spatial trends in the detectability of leprosy in wild armadillos. **Epidemiol. Infect.**, v. 106, p. 549-60, 1991.
- VADIEE, A. R., HARRIS, E., SHANNON, E. J. The evolution of antibody response in armadillos inoculated with *Mycobacterium leprae*. **Lepr. Rev.**, v. 61, p.215-26,1990.
- VADIEE, A. R., SHANNON, E. J., GILLIS, T. P., MSHANA, R. N., HASTINGS, R. C. Armadillo IgG and IgM antibody responses to phenolic glycolipid-I during experimental infection with *M. leprae*. **Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.**, v. 56, p. 422-7, 1988.
- WANKE, B., LONDERO, A. T. Epidemiology and Paracoccidioidomycosis infection. *In*: FRANCO, M., LACAZ, C. S., RESTREPO, A., DEL NEGRO, G. (Eds). **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRS Press, 1994.
- WERNICKE, R. Ueber einen Protozoenbefundbei Mycosis Fungoides. **Zentralbl. Bacteriol.**, v. 12, 859, 1892.
- WHITE, T. J., BURNS, T., LEE, S., TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: INNIS MA, GELFAND DH, SNINSKY JJ, WHITE TJ. (eds). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego, California: Academic Press, Inc, 1990.

WOOD, B., BECK, L., WASHINO, R. Spectral and spatial characteristics of rice field mosquito habitat. **Int. J. Remote Sens.**, v. 12, 621-6, 1991.

*Objetivos*

Tendo em vista a importância que os tatus, *Dasypus novemcinctus*, representam na eco-epidemiologia da paracoccidiodomicose e que esta espécie animal pode auxiliar na compreensão dos aspectos ecológicos e biológicos do *Paracoccidioides brasiliensis*, o presente trabalho teve como objetivos:

- 1) padronização de técnicas moleculares para a detecção do *P. brasiliensis* em amostras de tecido, urina, fezes e sangue de tatus;
- 2) avaliação de um grupo de tatus mantidos em condições de cativeiro, capturados em área endêmica, para se avaliar o possível desenvolvimento da doença;
- 3) avaliar uma população isolada de tatus a fim de se detectar a presença do patógeno empregando-se cultura de tecidos e detecção molecular;
- 4) avaliar se estes animais apresentam o *P. brasiliensis* em seus excrementos, contribuindo para uma possível disseminação do patógeno para o ambiente;
- 5) fazer a caracterização ambiental da ilha do Serrito empregando-se para isto o Sistema de Informação Geográfica (SIG) e Sensoriamento Remoto (SR).

## *Capítulo 2*

**Evaluation of a group of armadillos *Dasypus novemcinctus* in captive conditions for development of Paracoccidioidimycosis\***

Bosco SMG<sup>1</sup>, Rosa PS<sup>2</sup>, Theodoro RC<sup>1</sup>, Pereira Jr HRJ<sup>1</sup>, Franco<sup>3</sup> M, Bagagli, E<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> - Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP

<sup>2</sup> - Instituto Lauro Souza Lima, Bauru, São Paulo

<sup>3</sup> - Departamento de Patologia, Escola Paulista de Medicina, UNIFESP

\* Corresponding author:

Eduardo Bagagli

[bagagli@ibb.unesp.br](mailto:bagagli@ibb.unesp.br)

Dept<sup>o</sup> de Microbiologia e Imunologia,

Instituto de Biociências de Botucatu – IBB

UNESP/Botucatu

Distrito de Rubião Jr, s/n<sup>o</sup>

Botucatu/SP – Brasil

CEP: 18618-000

Phone +55 14 3811-6058

Fax +55 14 3815-3744

**Abstract**

*Paracoccidioides brasiliensis* is the etiological agent of Paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic mycosis characterized by granulomatous lesions in lungs, skin, mucous membranes and other tissues. PCM occurs in Latin American countries, being endemic mainly in some regions of Brazil, Colombia, Venezuela and Argentina. The ecology and biology of *P. brasiliensis* remains poorly comprehended until nowadays. The finding that the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus* is naturally infected by this pathogen opened new opportunities to study its ecology, epidemiology and other aspects of the host/pathogen interactions. Is this relation fortuitous or obligatory? May the armadillo develop PCM disease? May the armadillo eliminate the fungus to environment, contributing for dissemination of the pathogen in nature? The present study aimed to study a group of 8 armadillos in relation to the development of PCM disease and also the possible dissemination of the fungus to the environment through urine and feces. The animals were captured in an hyperendemic area of PCM and have been evaluated clinically, micologically and molecularly in captive condition for a period of 24 months. A Nested-PCR assay, based on rDNA specific for *P. brasiliensis* was developed for detecting the fungus presence in different animal materials. Four animals died during this period and the fungus was detected by Nested-PCR in spleen, mesenteric lymph node and lung of two animals without any clinical and histopathological evidence of PCM disease. In urine and blood samples the Nested-PCR has been negative for all animals. The four remaining alive animals are still under evaluation and in the feces of one of them, the Nested-PCR showed to be positive. These results indicate the importance in allying molecular technologies to classical tools for the fungus eco-epidemiological studies.

**Key words:** *Paracoccidioides brasiliensis*, Paracoccidioidomycosis, *Dasypus novemcinctus*, armadillo, captive, PCR, ITS, rDNA

## Introduction

Paracoccidioimycosis (PCM) is the most important systemic mycosis of Latin America, occurring with high incidence in Brazil, Colombia, Venezuela and Argentina [1]. It is caused by the thermodimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*, and, despite of the firsts cases were been reported in the earlier 20<sup>th</sup> century, its ecology still remains a great mystery and has proved to be a difficult task for mycologists [2]. It is believed that the natural habitat of *P. brasiliensis* must be the soil, but several attempts to isolate it were carried out and few of them yielded good results [3-8]. Some evidences of the occurrence of this fungus in bat and penguin stools and dog food, probably contaminated with soil, were reported [9-11], but they were casual observations with no reproducibility. The observation that the armadillo *Dasypus novemcinctus* is naturally infected by this pathogen was confirmed in different endemic areas of PCM [12-14] and this fact may be a promising clue to understand the ecology of this fungus [2, 15]. The armadillos have some particular features, such as low body temperature and a weak cellular immune response [16, 17] that makes it suitable model for studying infectious diseases, such as Hansen disease [18]. The nine-banded armadillo was introduced 25 years ago as an animal model for experimental leprosy in United States and have proved to be naturally infected by *Mycobacterium leprae*. This findings suggest the possibility that nine-banded armadillo plays a role in the transmission of human leprosy in this country [19]. In experimental leprosy model, some armadillos could exhibit signs of leprosy while some of them seem to be genetic resistant to disease [20].

The use of molecular biology procedures, especially PCR, has proved to be powerful tools for ecological surveys, since they are very sensitive and specific techniques. Most of these techniques are based on the detection of the 43 KDa glycoprotein, the immunodominant antigenic protein of *P. brasiliensis*, and the 27 KDa protein that is also an antigenic protein [21, 22]. Both proteins genes were already detected in PCR assays carried out in armadillos' tissues [14, 23], experimental mouse infections [24] and in human clinical material [25]. Primers derivate from the rDNA regions has improved the PCR reactions, since these genes are present in high copy number and the sensitivity of their detection may be dramatically increased by the use of nested-PCR assays [26].



DNA sequencing of this region carried out with different isolates of *P. brasiliensis*, both from human patients and armadillos, has allowed to design a set of primers specific for *P. brasiliensis* and the Nested-PCR using these primers has detected the DNA of this pathogen in soil samples from our endemic region for PCM [27, 28].

The present paper aimed to study a group of armadillo captured in an hyperendemic area of PCM [15] and maintained under captive conditions to evaluate the development of PCM disease and the dissemination of the fungus to the environment, by using both traditional mycological and molecular tools.

## **Material and Methods**

### **Site of capture and captive maintenance**

With the authorization of the Brazilian Protection Agency (IBAMA) it was captured 8 armadillos *Dasypus novemcinctus* (3 females and 5 males). These animals were proceeded from Manduri, São Paulo State, Brazil, a county belonging to PCM endemic region and where previous studies showed 100% of culture positive armadillos [15]. The animals were submitted to captive conditions in individual stalls in an animal facility at Lauro de Souza Lima Institute, located at Bauru, São Paulo State, and distant about 90 Km of our laboratory.

These animals were fed with commercial canine food supplemented with cooked eggs and raw meat once a day and the water was provided *ad libitum*.

### **Animal procedures and samples collection**

Periodically, by each 3 months, the animals were submitted to anesthetize with atropin (0,044mg/kg) and thiletamine and zolazepan chloride (Zoletil – Virbac – 0,2 mL/Kg). The animals were clinically evaluated by an external inspection, weight and biometrically measures were taken. Samples of blood, urine and feces were also collected every time that the animals were anesthetized and used for molecular approaches.

Intradermal testes using particulate antigen (Fava Netto) and metabolic (R antigen) [29] were carried out in the inguinal regions of armadillos. The

concentrations of both antigens were 2mg/mL and 7mg/mL, respectively. The sites of inoculation were demarcated with India ink and the readings were performed after 48 hours for the evaluation of eritema and/or endurance.

Armadillos, which naturally died, were necropsied and their organs (liver, lung, spleen and mesenteric lymph nodes) were rapidly washed in ethanol 70 and sterile saline, minced and cultured at Mycosel® agar plus gentamicin (50 µg/mL) and incubated at 35°C for 4 – 5 weeks. Part of these organs were frozen at –70°C until DNA extractions were performed. Fragments of these organs were also fixed in 10% formalin and processed for histopathological sections with Hematoxilin-Eosin (HE) and Gomori methanamine Stain (GMS) stains.

## **Molecular assays**

### **Standardization of the DNA extraction**

With the aim to standardize the DNA extraction and PCR reactions, it was inoculated 0,2 mL of 10<sup>6</sup> yeasts of *P. brasiliensis* (an armadillo isolate) by intratesticular route in 10 golden Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). After 4 and 8 weeks, half of the cage were anesthetized with thiletamine and zolazepan chloride (Zoletil – Virbac – 15 mg/kg) and then killed by blood cardiac puncture. The organs (spleen, liver, lungs, mesenteric lymph nodes and testis) were collected and cultured as mentioned above. The DNA extraction was performed by grinding with mortar and pestle of the frozen sample with liquid nitrogen. The grind sample was transferred to a sterile micro tube containing 600 µL of extraction buffer (Tris-HCl 7,7 mM, pH 7.2, EDTA 7,7 mM, SDS 1% and 2-mercaptoethanol 0,015%), 200 µg/mL of proteinase K, submitted in water bath at 65°C for 2 hours and after that it was added 500 µL of phenol/chlorophorm/isoamilic alcohol (PHE/CHL/IAA - 25:24:1), homogenized and centrifuged at 14000rpm for 15 minutes. The aqueous phase was re-extracted with PHE/CHL/IAA and CHL/IAA 2:1, respectively. The DNA pellet was suspended in 100 µL of ultra pure water and its purity was determined by 1% agarose gel electrophoresis using as molecular marker Low mass DNA ladder (Invitrogen). The same procedure was employed for the armadillo's tissues.

Samples of blood, urine and stools of armadillos were processed using commercial available kits (GFX™ Genomic Blood DNA purification Kit, Amershan Biosciences and QIAamp® DNA Stool, QIAGEN).

### PCR protocols

The PCR reactions were carried out to evaluate the presence of the fungus in the different animal samples, such as tissues, blood, urine and feces. It was used a Nested-PCR assay, using as outer primers the universal fungal primers ITS4 (5'–TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC–3') and ITS5 (5'–GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G–3') [30]. The inner primers employed, Pb-ITS-E (5'–GAGCTTTGACGTCTGAGACC–3') and Pb-ITS-R (5'–AAGGGTGTTCGATCGAGAGAG –3'), were specific for *P. brasiliensis* amplification and it was designed based on ITS1-5.8S-ITS2 sequences of different isolates of *P. brasiliensis* obtained in our lab [27, 28]. The PCR reactions were carried out in 25 µl of reaction mixtures buffered with 20 mM Tris-HCl [pH 8.4], containing 10 ng of genomic DNA, 20 µM of each primer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> 50 mM KCl, 0.2 mM of each dNTP, and 0,2 U of *Taq* DNA polymerase (Amersham Biosciences). The PCR reactions were performed in a PTC-150 Minicycler™ (MJ Research, Inc, USA). Thermal cycling conditions for the universal ITS4/ITS5 and PC1/PC2 primer pairs were 94° (5 min), 25 cycles of 95° (1 min), 60° (2 min) and 72° (2 min) and a final extension of 72°C for 7 min. For Pb-ITS-E/Pb-ITS-R the conditions were similar but the annealing temperature was 62°C. The PCR products were identified by agarose gel electrophoresis.

The amplicon of the stool sample was purified in GFX column (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit – Amersham Biosciences) and sequenced for rDNA region. The sequencing was carried out in both strands in a MegaBace™ 1000 (Amershan Biosciences) and the reactions were performed according to DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Amershan Biosciences). The sequences were submitted to BLASTn (Basic Local Search Alignment Tool for nucleotide) and aligned using Clustal W program.

## Results

### Animal evaluation

At the moment of arrival for captive conditions, the animals, in general, presented some small lesions in limbs, probably due to the occurrence of injuries during capture and transportation. Clinical signs of any kind of disease were not observed, except in one exemplar, a female (Man-2), which at arrival did not feed well and presented an intense diarrhea without known etiology, and died few days after its capture. At the necroscopical examination, no gross lesions were observed in its internal organs in general, and the culture of the fragments of mesenteric lymph nodes for *P. brasiliensis* isolating was negative.

Two another animals (Man-3, Man-6) were found dead in the stall after 4 and 8 months, respectively, of arrival in captive. At necropsy it was observed that Man-03 presented an ulcerated and edematous lesion in the right hind limb extending until the abdominal region, which contained high amounts of pus and necrotic material. The other organs showed no gross lesions but mesenteric lymph node seemed to be discretely enlarged. The culture of pus from the lesion, as well as from the liver, spleen and mesenteric lymph node fragments yielded no *P. brasiliensis* isolation. The animal Man-06 was also found dead in its stall and at necropsy it was observed a mild enlargement of the mesenteric lymph nodes and the lungs were edematiated. The culture of their mesenteric lymph nodes, spleen and lung fragments were also negative for *P. brasiliensis*. The last animal, which died, was Man-08, a female. This animal showed signs of depression and was transported from Bauru to Botucatu alive. Few hours after its arrival, this animal died and, at necropsy, it was detected that this animal was in advanced stage of pregnancy, which the four fetuses well developed. The culture of its spleen and mesenteric lymph node was also negative.

The weight of all animals, in general, showed an increase in about 600g after the captive condition. The only exception is Man-03, which at arrival weighted 4.1 kg and at death weighted around 3.6 kg. The biometrical evaluations indicate that these animals are adults, around 3 and 4 years old.

The intradermal tests carried out with both antigens were negative after 48 hours of inoculation.

The histopathological sections, for all died armadillos, showed no signs of PCM-disease and neither the presence of the fungus in the tissues evaluated, even when carried out with GMS stain.

The four remaining animals are alive and under evaluation and seems to be in good health conditions.

These results can be seen summarized on Table 1, which contains data about each animal evaluated to mycological and molecular approaches.

### **Molecular assays**

A Nested-PCR using the rDNA primer pairs was standardized to detect the presence of the pathogen in the tissues of the infected hamsters, used as a positive control, and after employed in armadillos' tissues and samples of blood, urine and feces. The positive PCR in the tissues of hamsters showed the dissemination of the pathogen to spleen, liver and lungs, besides the site of inoculation, the testis. The same was not observed in the culture of its tissue's fragments, in which the fungus recovering was restricted at the site of inoculation.

Concerning the armadillos tissue samples, the PCR reactions revealed the presence of the pathogen in samples of spleen of Man-03 and spleen, mesenteric lymph nodes and lung of Man-06 (figure 1). The samples of blood and urine were all negative for the rDNA detection. It was detected the specific fragment of 387 bp for *P. brasiliensis* in one sample of the feces, of Man-01 animal, after 9 months of evaluation. This sample was sequenced and submitted to BLASTn and produced significant alignment with several deposited sequences of *P. brasiliensis*, such as a strain from a Peruvian (Pb10) and Venezuelan (Pb2) patients [27] and the newest isolate of a Colombian naked-tailed armadillo (*Cabassous centralis*) [31], accession numbers: AY 374339, 374338 and 631237, respectively.

### **Discussion**

Armadillos are the only animals in which *P. brasiliensis* can be recovered from tissues with high frequency [12-15, 30, 31]. In the middle of 80's, when

Naiff et al. [12] discovered that the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus* harbor this pathogen, a new and promising opportunity was opened for studying the ecological aspects of this fungus. Nine-banded armadillo lives in an extensive region of the Americas, from the South Central USA to Argentina, along the west of the Andean ridge, a distribution that partially coincides with that of human PCM [33]. This animal has frequent contact with soil, mainly for digging its burrow and for foraging [34, 35]. These activities probably may expose the armadillos to the infective propagula present in the environment. Armadillos have a low body temperature and a weak cell mediate immune response, two special features that make it a good model for studying several infectious diseases, including leprosy [16-18]. The nine-banded armadillo is well recognized as a host for the human pathogen *Mycobacterium leprae* and high rates of infection have been reported among armadillos in the United States [36]. This animal species has been introduced for leprosy model approximately 25 years ago and animals submitted at captive conditions could exhibit signs of Hansen disease, although some of them seem to be genetically resistant [20].

The present work aimed to evaluate a group of 8 animals for the development of PCM disease and the possibility of these animals eliminate this pathogen through urine and feces. To help in this study, a molecular approach was standardized in a hamster model for a positive control. The infection produced in these animals showed a poor recovering of *P. brasiliensis* in their tissues, being restricted only to testis. The isolated employed was classified as presenting high virulence, according to Hebelers-Barbosa study [37]. This isolate has been maintained in our lab for 6 years and this long time of subculturing has lead to the attenuation of its virulence, a common fact observed in several labs, which was well documented by Macoris et al. [38]. However, the molecular assay showed that the fungus could be disseminated to spleen, liver and lungs of the hamster infected, showing a great sensitive of the rDNA primer pairs in detecting the pathogen.

In armadillo's tissues, while culturing of the organs was negative for recovering *P. brasiliensis*, the same was not observed in DNA detection. By using the Nested-PCR here applied, we also obtained success in detecting the fungus in soil from an armadillo burrow [28]. The specific primer used in the

---

second round of Nested-PCR reactions, could detect the armadillo infection in different kind of tissues (spleen, mesenteric lymph nodes and lung) in two animals, Man-03 and Man-06. The samples of urine and blood remained all negatives, and these results in blood samples were not surprise, since there are some evidences that *P. brasiliensis* is difficult to be detected in this kind of sample. The DNA concentration of fungi in blood may be very low and it needs a more sensitivity technique, such as real time PCR, for detecting it [39, 40].

These results of intradermal tests for both antigens were negative and this fact was expected, since in former armadillos evaluated by Fava Netto's antigen showed to be negative too (unpublished data). These data corroborate with the ones showed in the literature that mention weak cell immunity in this animal species [36].

The finding that the DNA of *P. brasiliensis* was present in one sample of feces of an apparently health armadillo may suggest a possibility of this animal eliminate the fungus to the environment. The presence of *P. brasiliensis* in fecal material has already been reported in bats and penguins [9, 10]. This fact was also detected in another dimorphic fungi, *Blastomyces dermatitidis*, where it was recovered from feces of a dog with acute blastomycosis [41]. The sequencing of the amplified DNA from the fecal material showed significant alignment with several DNA of *P. brasiliensis* deposited at Gen Bank, including the newest isolate from the naked-tailed armadillo [31].

Otherwise leprosy model, the evaluation of armadillo model for PCM is new and had never been tried before. Some difficulties in carry out this study were found, such as the lack of experience in housing armadillos. To solve this problem we associated to a renowned Institute, in which armadillos have been maintained under captive conditions for many years to study leprosy [42]. Four animals died naturally without a defined cause of death. It is possible that animal Man-02 had arrived to captive with some subclinical disease and the stress condition must have accelerated the process leading it to death. For Man-03, despite of being PCR positive in mesenteric lymph node, it is quite possible that the cause of the death of this animal must be a bacterial septicemia, due to the extensive lesion in the limb, which drained pus and necrotic material. The animal Man-06 was the one who less gain weight during the evaluation, and despite of being the only animal with positive PCR in

several organs, no histopathological lesions of PCM were observed. The female Man-08 seems to die due to some complications of its pregnancy, since the necroscopic examination and the histopathological analysis did not show lesions.

Although our data about the development of the PCM disease in a captive group of armadillos is yet in a half term and underway, they seem to appoint that these animal can harbour the fungus without developing active disease. On the other hand, the literature suggests the possibility of PCM-disease, by demonstrating the presence of granuloma in liver and lung in some animals [13, 43]. PCM-disease has been recently demonstrated, by histopathological analysis and detection of gp43 gene, in a dog with intense involvement of the lymphatic tissue [44].

The armadillos, that also harbors a great variety of pathogens, such as *Leishmania* spp., *Tripanossoma cruzi*, *Leptospira* spp., *Coccidioides immitis*, *Emonsia parva* and also can be infected by rabies virus [45-50], represents a natural and unique animal model for studies in PCM. The combined use of new molecular and traditional mycological tools, such as culture and histopathology, may contribute for a better comprehension of this host/pathogen relationship and the role of this animal in the eco-epidemiology of PCM.

## **Aknowledgements**

We would like to thank Dr. Diltor V. A. Opromola to be the precursor in housing armadillos in captive conditions in Brazil and for the opportunity in collaborate with us in our research. We are also thankful to FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) for the financial support and fellow conceded (Grants numbers: 01/13026-0 and 02/00466-5) and for IBAMA (Brazilian Protection Agency) for the environmental license.



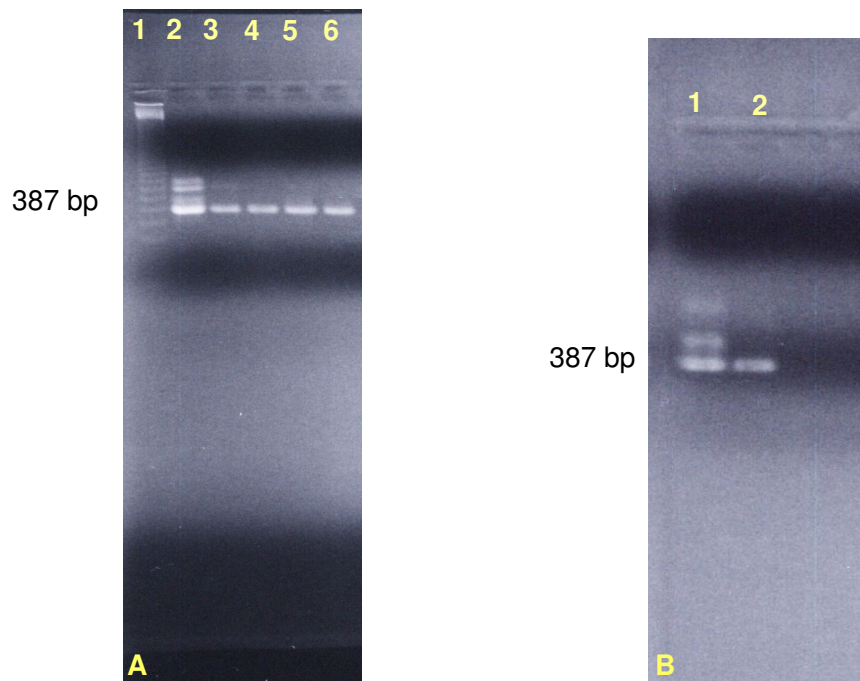
---

## References

- 1 Wanke B, Londero AT. Epidemiology and Paracoccidioidomycosis infection. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo A, Del Negro G, eds. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRS Press, 1994.
- 2 Restrepo A, Baumgardner DJ, Bagagli E, *et al.* Clues to the presence of pathogenic fungi in certain environments. *Med Mycol* 2000; **38**: 67-77.
- 3 Shome SK, Batista AC. Occurrence of *Paracoccidioides brasiliensis* in the soil of Recife, Brazil. *Rev Fac Med Fed Ceará* 1963; **3**: 90-94.
- 4 Negroni P. El *Paracoccidioides brasiliensis* vive saprofiticamente en el suelo Argentino. *Prensa Med Argent* 1966; **53**: 2381-2382.
- 5 Albornoz MB. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. *Sabouraudia* 1971; **9**: 248-253.
- 6 Silva-Vergara ML, Martínez R, Chadu A, *et al.* Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá, State of Minas Gerais, Brazil. *Med Mycol* 1998; **36**: 37-42.
- 7 Mendelovici K, Salfelder E, Roman AR. Intento de aislamiento Del *Paracoccidioides brasiliensis* Del suelo. *Mycopathol Mycol Appl* 1974; **52**: 45-53.
- 8 Montenegro MR, Miyahi M, Franco M, *et al.* isolation of fungi from nature in the region of botucatu, SP, brazil, an endemic area of paracoccidioidomycosis. *Mem inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro* 1996; **11**: 665-670.
- 9 Grose E, Tramsitt JR. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia, S.A. *Sabouraudia* 1965; **4**: 124-125.
- 10 Gezuele E. Aislamiento de *Paracoccidioides sp.* de heces de pinguino de la Antártida. In: International Meeting on Paracoccidioidomycosis, 4, 1989, Caracas. **Abstracts...** Caracas, 1989. (Abstract B2).
- 11 Ferreira MS, Freitas LS, Lacaz CS, *et al.* Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain in dogfood probably contaminated with soil in Uberlândia, Brazil. *J Med Ve. Mycol* 1990; **28**: 253-256.
- 12 Naiff, R. D., Ferreira, L. C. P., Barreto, *et al.* Enzootic paracoccidioidomycosis in armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in the State of Para. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1986; **28**: 19-27.
- 13 Bagagli E, Sano A, Coelho KI, *et al.* Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg* 1998; **58**: 505-512.
- 14 Corredor GG, Castaño JH, Peralta A, *et al.* Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in na endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. *Rev Iber Micol* 1999; **16**: 216-220.
- 15 Bagagli E, Franco M, Bosco SMG, *et al.* High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. *Med Mycol* 2003; **41**: 217-223.
- 16 Storrs EE, Walsh GP, Burschfield HP, Binford CH. Leprosy in the armadillo: new model for biomedical research. *Science* 1974; **183**: 851-852.
- 17 Purtilo DT, Walsh GP, Storrs EE, Gannon C. The immune system of the nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus* Linn). *Anat Rec Philad* 1975; **181**: 725-734.

- 18 Job CK. Nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*) as an animal model for leprosy. *Indian J Lepr* 1991; **63**: 356-361.
- 19 Bruce S, Schroeder TL, Ellner K, et al. Armadillo exposure and Hansen's disease: an epidemiologic survey in southern Texas. *J Am Acad Dermatol* 2000; **43**: 223-228.
- 20 Job CK, Sanchez RM, Hastings RC. Manifestations of experimental leprosy in the armadillo. *Am J Trop Med Hyg* 1985; **34**: 151-161.
- 21 Cisalpino PS, Puccia R, Yamauchi LM, et al. Cloning characterization end epitope expresión of the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Biol Chem* 1996; **271**: 4553-4560.
- 22 McEwen JG, Ortiz BL, Garcia AM, et al. Molecular cloning, nucleotide sequencing and characterization of a 27 kDa antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol* 1996; **20**: 125-131.
- 23 Díez S, Garcia EA, Pino PA et al. PCR with *Paracoccidioides brasiliensis* specific primers: potential use in ecological studies. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1999; **41**: 351-357.
- 24 Bialek R, Ibricevic A, Aepinus C et al. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue samples. *J Clin Microbiol* 2000; **38**: 2940-2942.
- 25 Gomes G, Cisalpino OS, Taborda CP, Camargo ZP. PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol* 2000; **38**: 3478-3480.
- 26 Iwen Pc, Hinrichs Sh, Rupp Me. Utilization of the Internal transcribed Spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Med Mycol* 2002; **40**: 87-109.
- 27 Hebeler-Barbosa F, Morais FV, Montenegro MR, Kuramae EE, Montes B, McEwen JG, Bagagli E, Puccia R. Comparison of the sequences of the internal transcribed spacer regions and PBGP43 genes of *Paracoccidioides brasiliensis* from patients and armadillos (*Dasypus novemcinctus*). *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 5735-5737.
- 28 Theodoro RC, Candeias JMG, Araújo Jr JP, Bosco SMG, Macoris SAG, Padula Jr LO, Franco M, Bagagli E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. *submitted*.
- 29 Marques M, Soares A, Franco M, Camargo ZP, et al. Evaluation of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigen in the detection of delayed dermal hypersensitivity in experimental and human paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol* 1996; **34**: 265-272.
- 30 White TJ, Burns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, San Diego, California: Academic Press, Inc, 1990.
- 31 Corredor GG, Peralta LA, Castaño JH, et al. The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. *Med Mycol* 2004;
- 32 Silva-Vergara MI, Martínez R, Camargo Zp, et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillo (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. *Med Mycol* 2000; **38**: 185-191.
- 33 Restrepo A. Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo A, Del Negro G, eds. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRS Press, 1994.

- 34 Taber FW Contribution on the life story and ecology of the nine-banded armadillo. *J Mammal* 1945; **26**: 211-216.
- 35 Talmage RV, Buchanan GD. The armadillo *Dasypus novemcinctus* – a review of its natural history, ecology, anatomy and reproductive physiology. *Rice Inst Pamphlet Houston* vol. 41. 1954.
- 36 Walsh GP, Meyers WM, Binford CH. Naturally acquired leprosy in the nine-banded armadillo: a decade of experience 1975-1985. *J Leukoc Biol* 1986; **40**: 645-656.
- 37 Hebel-Barbosa F, Montenegro MR, Bagagli E. Virulence profiles of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from armadillos (*Dasypus novemcinctus*). *Med Mycol* 2003; **41**: 89-96.
- 38 Macoris SAG, Sugizaky MF, Peraçoli MTS, *et al.* Virulence attenuation and phenotypic variation of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from armadillos and patients. *submitted*
- 39 Costa C, Vidaud D, Olivi M, *et al.* Development of two real-time quantitative TaqMn PCR assays to detect circulating *Aspergillus fumigatus* DNA in serum. *J Microbiol Methods* 2001; **44**: 263-269.
- 40 Pham AS, Tarrand JJ, May GS, *et al.* Diagnosis of invasive mold infection by real-time quantitative PCR. *Am J Clin Pathol* 2003; **119**: 11-13.
- 41 Baumgardner DJ, Parestky DP. Identification of *Blastomyces dermatitidis* in the stool of a dog with acute pulmonary blastomycosis. *J Med Vet mycol* 1997; **35**: 419-421.
- 42 Opromola DV, Arruda OS, Fleury RN. Maintenance of armadillos in captivity and results of the inoculation of *Mycobacterium leprae*. *Hansenol Int* 1980; **5**: 28-36.
- 43 Silva-Vergara ML, Martínez R. Role of the armadillo *Dasypus novemcinctus* in the epidemiology of paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 1999; **144**: 131-133.
- 44 Ricci G, Mota FT, Wakamatsu A, *et al.* Canine paracoccidioidomycosis. *Med Mycol* 2004; **42**: 379-383.
- 45 Lainson R, Shaw JJ, Miles MA, Pova M. Leishmaniasis in Brazil: isolation of *Leishmania* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) and observation on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in North Para State. *Trans R Soc trop Med Hyg* 1979; **73**: 239-242.
- 46 Paige CF, Scholl DT, Truman RW. Prevalence and incidence density of *Mycobacterium leprae* and *Trypanosoma cruzi* infections within a population of wild nine-banded armadillos. *Am J trop Med Hyg* 2002; **67**: 528-532.
- 47 Meyers DM, Caparo AC, Moreno JP. Isolation of serotype hardjo and other leptospirae from armadillos in Argentina. *Bull Pan Am Health Organ* 1977; **11**: 131-139.
- 48 Eulalio KD, Macedo RI, Cavalcanti MA, *et al.* *Coccidioides immitis* isolated from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in the state of Piauí, northeast Brazil. *Mycopathol* 2001; **149**: 57-61.
- 49 Santos VM. Culture development and morphology diagnosis of *Emonsia crescens* in armadillos. *Rev Soc Bras Med trop* 1999; **32**: 307.
- 50 Leffingwell LM, Neill SU. Naturally acquired rabies in an armadillo (*Dasypus novemcinctus*) in Texas. *J Clin Microbiol* 1989; **27**: 174-175.



**Figure 1.** (A) Lane 1: Ladder 100 bp (Amershan Biosciences), Lane 2: DNA of *P. brasiliensis* positive control, Lane 3: *P. brasiliensis* DNA in sample of spleen from Man 03, Lane 4: *P. brasiliensis* DNA in sample of spleen from Man 06, Lane 5: *P. brasiliensis* DNA in sample of mesenteric lymphnode from Man 06, Lane 6: *P. brasiliensis* DNA in sample lung from Man 06. (B) Lane 1: DNA of *P. brasiliensis* positive control, Lane 2: *P. brasiliensis* DNA in sample of feces from Man 01.

**Table 1:** Data concerning sex, dates of arrival and death in captivity, period of maintenance in captive conditions and laboratorial procedures with tissues from armadillos *Dasypus novemcinctus* evaluated.

animal	sex	Date of capture	Date of death	Period of captivity	Laboratorial procedures and results		
					Culture of tissues	Histopathological analysis	Molecular detection
Man-01	M	March 23 <sup>rd</sup> , 2003	*	33 months	*	*	*
Man-02	F	March 28 <sup>th</sup> , 2003	May 06 <sup>th</sup> , 2003	38 days	-	-	-
Man-03	M	April 01 <sup>st</sup> , 2003	August 06 <sup>th</sup> , 2003	4 months	-	-	+ (spleen)
Man-04	M	April 06 <sup>th</sup> , 2003	*	33 months	*	*	*
Man-05	M	April 06 <sup>th</sup> , 2003	*	33 months	*	*	*
Man-06	M	April 21 <sup>st</sup> , 2003	December 01 <sup>st</sup> , 2003	7 months	-	-	+ (spleen, lung and mesenteric lymph node)
Man-07	F	April 25 <sup>th</sup> , 2003	May 21 <sup>st</sup> , 2005	27 months	-	ND	ND
Man-08	F	April 25 <sup>th</sup> , 2003	December 29 <sup>th</sup> , 2003	8 months	-	-	-

M = male F = female ND = not done - = negative for *P. brasiliensis* demonstration + = positive for *P. brasiliensis* demonstration  
 \* animals alive in captivity

## *Capítulo 3*

## **New approaches to study the ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a naturally infected population of armadillos in a fluvial island**

Bosco SMG<sup>1</sup>, Simões LB<sup>1</sup>, Theodoro RC<sup>1</sup>, Pereira Jr HRJ<sup>1</sup>, Macoris SAG<sup>1</sup>, Franco MF<sup>2</sup>, Bagagli E<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> – Dept<sup>o</sup> de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP/Botucatu, SP

<sup>2</sup> – Dept<sup>o</sup> de Patologia, Escola Paulista de Medicina, UNIFESP, SP

\* Corresponding author:

Eduardo Bagagli

[bagagli@ibb.unesp.br](mailto:bagagli@ibb.unesp.br)

Dept<sup>o</sup> de Microbiologia e Imunologia,

Instituto de Biociências de Botucatu – IBB

UNESP/Botucatu

Distrito de Rubião Jr, s/n<sup>o</sup>

Botucatu/SP – Brasil

CEP: 18618-000

Phone +55 14 3811-6058

Fax +55 14 3815-3744

---

**Abstract**

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis caused by *Paracoccidioides brasiliensis*, a thermal-dimorphic fungus whose ecology still remains enigmatic. Surveys that pointed out the armadillo species *Dasypus novemcinctus* as being naturally infected by this pathogen opened new possibilities to study the eco-epidemiological features of the fungus and its disease. Studies on the ecology of this pathogen and its relation of this animal species are now focused in evaluating a population of armadillos proceeded from a fluvial island, in the Tietê River, belonging to an important endemic area of PCM in São Paulo State. The first exemplar of *D. novemcinctus* evaluated showed to be positive for *P. brasiliensis*. Fragments of liver, spleen, lung and mesenteric lymph nodes were cultured on Mycosel agar and incubated at 35°C. *P. brasiliensis* was isolated from 44 fragments of mesenteric lymph nodes and 1 of spleen out of 101 and 284 samples, respectively. The fungus was also detected by PCR in the faeces of the animal. Geographical and environmental features of the Island have been analyzed by Geographic Information System (GIS). Located between 48°25'50'' and 48°25'11'' of Long. W and 22°34'12'' and 22°35'31'' of Lat. S, with an area about 193.26 ha, a mean annual precipitation of 1383 mm and a mean annual temperature of 22.07°C, this fluvial island was established 40 years ago, after the construction of Barra Bonita Dam, when the armadillo population became isolated. The island contains a remaining vegetation of a semi-deciduous forest mixed with shrubs and grasses. The human presence in the island has been only sporadic, mainly for recreational purpose, including armadillo hunting. The study of isolated populations of naturally infected armadillos, associated with molecular tools and geographical analysis, may represent a new and promise strategy to pinpoint the whereabouts of *P. brasiliensis* in nature.

**Key words:** *Paracoccidioides brasiliensis*, *Dasypus novemcinctus*, armadillo population, ecology, Geographic Information System (GIS), PCR



## Introduction

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis, which occurs in Latin American countries as an endemic disease. The disease is characterized by granulomatous lesions in skin, mucous membrane and other organs. It is caused by *Paracoccidioides brasiliensis*, a thermal-dimorphic fungus belonging to Order Onygenales, Family Onygenaceae, whose habitat remains enigmatic [1]. *P. brasiliensis* has its saprobe phase related to soil, but the exact place and conditions are not determined yet. Many attempts to isolate the fungus from the environment have been conducted, but few of them were positive [2–6] and some of them negative, even when carried out in hyperendemic areas of PCM [7, 8].

The search for *P. brasiliensis* in animals represents a good strategy for ecological studies. The fungus occurrence has been reported in the faeces of bat and penguin [9, 10]. In addition natural infection in wild and domestic animals have been reported by intradermal testing with paracoccidioidin [11-13]. *P. brasiliensis* was recovered once from a dogfood probably contaminated with soil [14] and the first case of canine PCM with great involvement of the lymphatic tissue was described recently [15]. The major animal group, that has been systematically culture positive for *P. brasiliensis* is the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus* [16-18]. Nine-banded armadillos live preferentially in riparian vegetation along watercourses and is widely distributed along PCM endemic areas and has no migratory behavior [19, 20], a fact that helps mapping the places where the fungus occurs in nature [21]. Another armadillo species, *Cabassous centralis* (“naked-tailed armadillo”), has been also confirmed to be culture positive for *P. brasiliensis*, in Colombia [22].

Mapping landscape conditions can be useful to study the *P. brasiliensis*’ habitat. If positive armadillos can be mapped in an endemic area, it is possible to model spatially the environmental preferences of the fungus. Vegetation and humidity might be key elements since they vary according to the environmental features and can be sensed remotely. In this context, Geographic Information Systems (GIS) and remotely sensed data are valuable to understand the connections between landscape and the distribution of *P. brasiliensis* in nature [23]. Remote sensing and geographic information systems (GIS) have been

successfully applied to other epidemiologic studies [24-28], including coccidiomycosis [29].

The aim of this study was to evaluate an isolated population of nine-banded armadillos proceeded from a fluvial island in Botucatu endemic area of PCM using ancillary mycological procedures, molecular tools and geographical analysis in an attempt to clarify the relations among *P. brasiliensis*, armadillos and the environment.

## **Material and Methods**

### **Capture of armadillo and processing for fungal culture**

With the authorization of the Brazilian Protection Agency (IBAMA), and the island owners, one male nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus* was captured in the Serrito Island, at Tietê River, São Manuel county, São Paulo State, Brazil. The Island is located within an hyperendemic area of PCM [23, 30]. An external examination of the animal was performed *ante mortem*. The animal was anesthetized with thiletamine and zolazepan chloride (Zoletil – Virbac – 0,2 mL/Kg) and killed by cardiac puncture to cause hypovolemia. A necropsy was carried out and samples of liver, spleen, mesenteric lymph nodes and lungs were collected aseptically for culture. The organs were washed rapidly in alcohol 70 and sterile saline solution, minced and cultured on Mycosel® agar at 35°C for 4 – 5 weeks. Suspected colonies were examined microscopically with lactophenol cotton-blue staining and cultured at 25° and 35°C on PDA (Potato Dextrose Agar) and GPY (Glicose, peptone and yeast extract), respectively.

### **Histopathological analysis**

Fragments of lung, spleen, liver and mesenteric lymph nodes were fixed in 10% formalin and processed for routine histopathology. Four µm sections were stained with Hematoxilin-Eosin (HE) and Gomori Methanamine Silver (GMS).

## Molecular analysis

It was carried out for the molecular identification of the isolates and to evaluate the presence of the fungus in different samples of the animal, such as blood, urine and stools. The DNA extraction for culture was performed according the glass-beads protocol proposed by Van Burik et al. [31]. Briefly, a small fragment of the colony was submitted to continuous vortexing with 500 mg of acid-washed glass beads (0.4 to 0.6 mm; Sigma, St. Louis, MO), 400 µl of extraction buffer (2% Triton, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA). The aqueous phase was treated with 400 µl of phenol/chloroform/iso-amyl alcohol (Phe/Chl/IAA) (25:24:1), followed by phenol-chlorophorm (2:1) extraction and the DNA pellet was suspended in 350 µl of ultra pure water. Samples of blood, urine and stools were processed using commercial available kits (GFX™ Genomic Blood DNA purification Kit, Amershan Biosciences and QIAamp® DNA Stool, QIAGEN).

The PCR reactions were performed to characterize the isolate with specific *P. brasiliensis* sets of primers. For the gp43 gene PC1 (5'–TCATCTCACGTTCGCATCTCACATT–3') and PC2 (5'–GGCTCCTCAAAGTCTGCCATGAGGAAG–3') primer pair was used, as proposed by Gomes et al. [32] was performed. For the rDNA region, a Nested-PCR assay, using as outer primers the universal fungal primers ITS4 (5'–TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC–3') and ITS5 (5'–GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G–3') [33]. The inner primers employed, Pb-ITS-E (5'–GAGCTTTGACGTCTGAGACC–3') and Pb-ITS-R (5'–AAGGGTGTTCGATCGAGAGAG –3'), were specific for *P. brasiliensis* amplification and it was designed based on ITS1-5.8S-ITS2 sequences of different isolates of *P. brasiliensis* obtained in our laboratory [34, 35]. The PCR reactions were carried out in 25 µl of reaction mixtures buffered with 20 mM Tris-HCl [pH 8.4], containing 10 ng of genomic DNA, 10 µM of each primer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> 50 mM KCl, 0.2 mM of each dNTP, and 0,2 U of *Taq* DNA polymerase (Amersham Biosciences). The PCR reactions were performed in a PTC-150 Minicycler™ (MJ Reasearch, Inc, USA). Thermal cycling conditions for the universal ITS4/ITS5 and PC1/PC2 primer pairs were 94° (5 min), 25 cycles of 95° (1 min), 60° (2 min) and 72° (2 min) and a final extension of 72°C

for 7 min. For Pb-ITS-E/Pb-ITS-R the conditions were similar but the annealing temperature was 62°C. The PCR products were identified by agarose gel electrophoresis.

The amplicons were purified in GFX column (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit – Amersham Biosciences). The rDNA sequencing was carried out in both strands in a MegaBace™ 1000 (Amersham Biosciences) and the reactions were performed according to DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Biosciences). The sequences were submitted to BLASTn (Basic Local Search Alignment Tool for nucleotide) and aligned using Clustal W program.

### **Spatial analysis**

Digital data were digitized from topographic, geologic, geomorphologic and soils maps using CartaLinx® software. After editing the digital elevation data, it was possible to interpolate height values and generate a Digital Elevation Model (DEM) for the island. Triangulated Irregular networks (TIN) modeling was performed to create the DEM.

Daily rainfall statistics were obtained by using the neighboring data recorded from 1970 through 1999, georeferenced and submitted to geostatistical analysis. Precipitation data were interpolated through ordinary kriging, using Surfer® software, resulting the map of average annual precipitation. Temperature data were calculated for the same neighboring rain gauges using a regression equation [36] that related elevation, latitude and temperature for São Paulo State. Land use was classified based on bands 3, 4 and 5 of the image of Landsat 7 ETM+ from April 20<sup>th</sup>, 2000.

The precise geographic position of the captured armadillo was established through GPS and plotted in a digital map in a geographic database in the IDRISI32® GIS. This system allows acquiring, storing, transforming, displaying and analyzing geographic information. Resulting environmental data from the island were calculated using the GIS capabilities.

## Results

### Animal evaluation and fungal isolation

At external examination, the animal exhibited signs of lethargy. No lesions were observed neither externally nor in its internal organs but the mesenteric lymph nodes, which were greatly enlarged.

A total of 101 fragments of mesenteric lymph nodes, 284 from spleen, 99 from lung and 276 from liver were cultured. Colonies of *P. brasiliensis* were recovered from 44 fragments of mesenteric lymph nodes and from one splenic fragment after ten days of culture.

At microscopy, multiple buds cells, which characterize *P. brasiliensis* are shown in Figure 1.

### Histopathological analysis

The histopathological sections carried out in liver, spleen, lungs and mesenteric lymph nodes in both stained used showed no evidences of fungal granuloma neither the presence of the fungus.

### Molecular analysis

The identity of the isolate was confirmed molecularly by the presence of the gp43 gene (Fig. 2a) and by the sequencing of the ITS-5.8S region, which produced significant alignment with homologous *P. brasiliensis* deposited sequence in GenBank, assecion numbers AY445662 [37] and AF038360 [38].

The presence of the pathogen in blood, urine and feces was also evaluated molecularly by Nested-PCR with a specific inner primer. While blood and urine were negative, the sample of faeces was positive (Fig. 2a). This specific amplicon from faeces were purified, sequenced and showed complete similarity with the same region of the mesenteric lymph node isolate (Figure 2b).

### Spatial and environmental analysis

When the Barra Bonita Dam was built in the Tietê River and filled in 1962, the highest areas became islands. The Serrito Island is one of those

highest areas now surrounded by stream-channel branches. The shortest distance between the island and the margins of the non-flooded area is 1080 m and the longest is 3300 m (Fig. 3).

This island is located at 48°25'50" and 48°15'11" of Longitude W and between 22°34'12" and 22°35'31" of Latitude S, with 193.26 ha of area.

Geographical analysis showed that the mean annual precipitation in the island is 1383 mm and its mean annual temperature is about 22.1°C. The geology of the island comprises rocks of the Pirambóia Formation covered by the soil type LVA36 (Red Yellow Latosol). Elevation is slightly inferior to 450 m above sea level. The island is covered with a semi-deciduous forest (60.4% of the total area) mixed with shrubs and grasses (39.6%).

## Discussion

Since the confirmation that armadillos harbor *P. brasiliensis* in a high frequency in the endemic areas of PCM, we have focusing these animal host association as an opportunity to clarify the natural cycle of the fungus in the environment [21, 39]. Here we presented an unique situation, that is a fluvial island with a small area containing an isolated population of armadillos.

Historical data obtained with the owners of the island indicates that the armadillo population has been isolated since the construction of the dam, with an increase in the animal numbers in the beginnings followed by a decrease in the latest years. The human presence in the area has been only sporadic, including illegal armadillo hunters.

This island was formed about 40 years ago, when the Barra Bonita Dam was constructed, and it is located within a hyperendemic area, wherein the highest prevalence density (human cases/1000 km<sup>2</sup>) of PCM is recorded [23].

The first animal captured showed to be positive for *P. brasiliensis*, with a great number of positive fragments of mesenteric lymph nodes, which is the organ that has been frequently positive in tissue culture of armadillos [21].

The detection of specific DNA of *P. brasiliensis* in the armadillo's feces may indicate an important and new insight in the fungus biology. The literature refers to *P. brasiliensis* in feces samples in few occasions. Firstly reported by

Grose & Tramsitt [9] in the intestinal tract of three *Artibeus lituratus* fructivorous bat, in Colombia, when it was credit certain importance for the epidemiology of PCM. Latter, some authors have demonstrated, experimentally, that *P. brasiliensis* was unable to survive more than 8 hours in the digestive tract of *A. lituratus* bats, indicating the improbability of isolating this fungus from such material [40]. Experimental infections by intranasal and intraperitoneal routes carried out in the same species, did not show the elimination of *P. brasiliensis* by intestinal tract [41]. Another report of *P. brasiliensis* in fecal material was made by Gezuele [10] in seven samples of penguin (*Pigocelis adelia*) feces collected in the Antarctic region. This isolate has been characterized and confirmed as *P. brasiliensis* in further studies [42-44].

The presence of fungi in fecal material was reported in *Blastomyces dermatitidis*, both in humans [45] and dogs [46]. The hypothesis for the demonstration of *B. dermatitidis* in the stool is the swallowing of sputum by the host with the surviving of the fungus in the gastrointestinal tract [45]. The isolation of *B. dermatitidis* was also reported from a gastrointestinal tract and feces of *Rhinopoma hardwickei* insectivorous bat orally infected, suggesting that this fungus may pass through feces, but the significance of this route for environmental dissemination needs further studies [47]. The finding of *B. dermatitidis* is eliminated with viability in feces suggests that the fungus may return to the environment to be disseminated. The dissemination of fungi in feces is reported in histoplasmosis, where bats play an important role in the epidemiology of this disease [48]. It is documented in coccidioidomycosis that if secretions are drained to environment, *Coccidioides immitis* converting from its tissue form to infectious airborne spores [49]. Another way of this fungus return to nature is after the death and decay of the host resulting in the fungal reversion to its environmental and infective condition [50].

Although air bone infection seems to be the main route of infection from human and armadillo, the systematic isolation of *P. brasiliensis* in the mesenteric lymph nodes of the armadillos with the present demonstration of this fungus in feces, may suggest that the pathogen could have a gastrointestinal cycle in the animal, either for infection or dissemination of the fungus to the environment.

According to the geographical aspects of the Serrito Island, some features make it a very suitable local for studying the ecology of *P. brasiliensis*: it is located in an area of high prevalence density of human PCM, is surrounded by a very considerable water mass, which makes difficult the transposition for armadillos and, its environmental conditions are favorable for the maintenance of the fungus, according to recent data [23]. Nevertheless, the island has been isolated for more than 40 years and the fungus is still there, surviving in a restricted area associated with armadillos. All these features make this fluvial island a natural laboratory for studying the fungus ecology and also for clarifying the role of armadillos in the natural history of the pathogen.

### Acknowledgements

We would like to thank the owners of the Serrito Island, Edson Gruppi, Edson Luiz Gruppi and Silvio José Gruppi, in allowing our researches in this private area. We are also thankful to FAPESP (Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo) to the financial supported and fellows conceded (grants numbers 01/13026-0, 02/00466-5 and 02/04489-0) and for IBAMA (Brazilian Protection Agency) for the environmental license.

### References

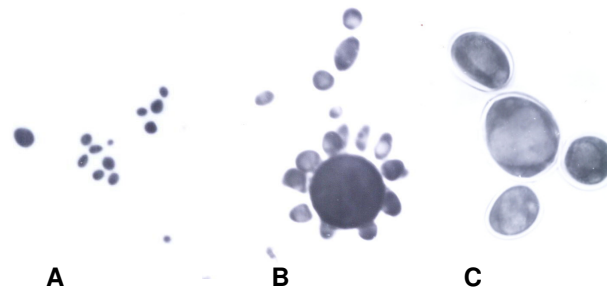
- 1 Restrepo A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *J Med Vet Mycol* 1985; **23**: 323.
- 2 Shome SK, Batista AC. Occurrence of *Paracoccidioides brasiliensis* in the soil of Recife, Brazil. *Rev Fac Med Fed Ceará* 1963; **3**: 90-94.
- 3 Negroni P. El *Paracoccidioides brasiliensis* vive saprofiticamente en el suelo Argentino. *Prensa Med Argent* 1966; **53**: 2381-2382.
- 4 Albornoz MB. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. *Sabouraudia* 1971; **9**: 248-253.
- 5 Silva-Vergara ML, Martínez R, Chada A, et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá, State of Minas Gerais, Brazil. *Med Mycol* 1998; **36**: 37-42.
- 6 Franco M, Bagagli E, Scapilio S, Lacaz CS. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. *Med Mycol* 2000; **38**:185-191.
- 7 Mendelovici K, Salfelder E, Roman AR. Intento de aislamiento Del *Paracoccidioides brasiliensis* Del suelo. *Mycopathol Mycol Appl* 1974; **52**: 45-53.



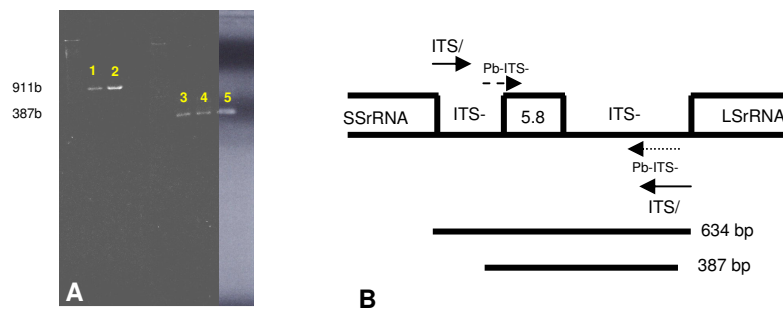
- 8 Montenegro MR, Miyahi M, Franco M, *et al.* isolation of fungi from nature in the region of botucatu, SP, Brazil, an endemic area of paracoccidioidomycosis. *Mem inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro* 1996; **11**: 665-670.
- 9 Grose E, Tramsitt JR. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia, S.A. *Saboraudia* 1965; **4**: 124-125.
- 10 Gezuele E. Aislamento de *Paracoccidioides sp.* de heces de pinguino de la Antártida. In: International Meeting on Paracoccidioidomycosis, 4, 1989, Caracas. **Abstracts...** Caracas, 1989. (Abstract B2).
- 11 Costa EO, Fava Netto C. Contribution to the epidemiology of Paracoccidioidomycosis and Histoplasmosis in the State of São Paulo, Brazil. Paracoccidioidin and Histoplasmin intradermic tests in domestic animals. *Saboraudia* 1978; **16**: 93-101.
- 12 Costa, E. O., Diniz, L. S. M., Fava Netto, C. The prevalence of positive intradermal reactions to paracoccidioidin in domestic and wild animals in São Paulo, Brazil. *Vet Res Commun* 1995; **19**: 127-130.
- 13 Costa, E. O., Diniz, L. S. M., Fava-Netto, C., Arruda, C., Dagli, M. L. Z. Delayed hypersensitivity test with paracoccidioidin in captive Latin American wild mammals. *J Med Vet Mycol* 1995; **33**: 39-42.
- 14 Ferreira MS, Freitas LS, Lacaz CS, *et al.* Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain in dogfood probably contaminated with soil in Uberlândia, Brazil. *J Med Ve. Mycol* 1990; **28**: 253-256.
- 15 Ricci G, Mota FT, Wakamatsu A, *et al.*, Canine Paracoccidioidomycosis. *Med Mycol* 2004; **42**: 379-383.
- 16 Naiff, R. D., Ferreira, L. C. P., Barreto, TV, *et al.* Enzootic paracoccidioidomycosis in armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in the State of Para. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1986; **28**: 19-27.
- 17 Bagagli E, Sano A, Coelho KI, *et al.* Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg* 1998; **58**: 505-512.
- 18 Corredor GG, Castaño JH, Peralta A, *et al.* Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. *Rev Iber Micol* 1999; **16**: 216-220.
- 19 Layne JN, Glover D. Home range of the armadillo in Florida. *J Mammal* 1977; **58**: 411-413.
- 20 Loughry WJ, McDonough CM. Spatial patterns in a population of nine-banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*). *Am Midl Nat* 1997; **140**: 161-169.
- 21 Bagagli E, Franco M, Bosco SMG, *et al.* High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. *Med Mycol* 2003; **41**: 217-223.
- 22 Corredor GG, Peralta LA, Castaño JH, Zuluaga JS, Henao B, Arango M, *et al.* The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. *Med Mycol* 2005; **43(3)**: 275-80.

- 23 Simões LB, Marques SA, Bagagli E. Distribution of Paracoccidioidomycosis: determination of ecologic correlates through Geographic Information System and spatial analyzes *Med Mycol* 2004; **42**: 517-523.
- 24 Wood B, Beck L, Washino R. Spectral and spatial characteristics of rice field mosquito habitat. *Int J Remote Sens* 1991; **12**: 621-6.
- 25 Beck LR, Rodriguez MH, Dister SW, *et al.* Remote sensing as a landscape epidemiologic tool to identify villages at high risk for malaria transmission. *Am J Trop Med Hyg* 1994; **51**: 271-80.
- 26 Linthicum KJ, Bailey CL, Davies FG, Tucker CJ. Detection of Rift Valley fever viral activity in Kenya by satellite remote sensing imagery. *Science* 1987; **235**: 1656-9.
- 27 Kitron U, Bouseman J, Jones C. Use of ARC/INFO GIS to study the distribution of Lyme disease ticks in an Illinois county. *Prev Vet Med* 1991; **11**: 243-8.
- 28 Rogers D, Randolph S. Mortality rates and population of tsetse flies correlated with satellite imagery. *Nature* 1991; **351**: 739-41.
- 29 Centers for Disease Control and Prevention. Increase in Coccidioidomycosis – Arizona, 1998-2001. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2003; **52**(RR-6): 109-12.
- 30 Marques SA, Franco MF, Mendes RP, *et al.* Epidemiologic aspects of paracoccidioidomycosis in the endemic área of Botucatu (São Paulo – Brazil). *Rev Inst med Trop S Paulo* 1983; **25**: 87-92.
- 31 Van Burik JA, Schreckhise RW, White TC, Bowden RA, Myerson D. Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous fungi. *Med Mycol* 1998; **36**: 299-303.
- 32 Gomes GM, Cisalpino PS, Taborda CP, Camargo ZP. PCR for diagnosis of Paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol* 2000; **38**: 3417-3480.
- 33 White TJ, Burns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, San Diego, California: Academic Press, Inc, 1990.
- 34 Hebel-Barbosa F, Morais FV, Montenegro MR, Kuramae EE, Montes B, McEwen JG, Bagagli E, Puccia R. Comparison of the sequences of the internal transcribed spacer regions and PBGP43 genes of *Paracoccidioides brasiliensis* from patients and armadillos (*Dasypus novemcinctus*). *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 5735-5737.
- 35 Theodoro RC, Candeias JMG, Araújo Jr JP, Bosco SMG, Macoris SAG, Padula Jr LO, Franco M, Bagagli E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. *submitted*.
- 36 Pedro Jr MJ, Mello MHA, Ortolani AA, *et al.* Estimativa das temperaturas médias mensais das máximas e das mínimas para o Estado de São Paulo. *Instituto Agronômico de Campinas*, (Bol Tec 142), 1991.
- 37 Mayr A, Kirchmair M, Rainer J, *et al.* Chronic paracoccidioidomycosis in a female patient in Austria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; **23**: 916-919.
- 38 Peterson SW, Sigler C. Molecular genetic variation in *Emonsia crecens* and *E. parva*, etiologic agents of adiaspiromycosis, and their phylogenetic relationship to *Blastomyces dermatitidis* (*Ajellomyces dermatitidis*) and other systemical fungal pathogens. *J Clin Microbiol* 1998; **36**: 2918-2925.

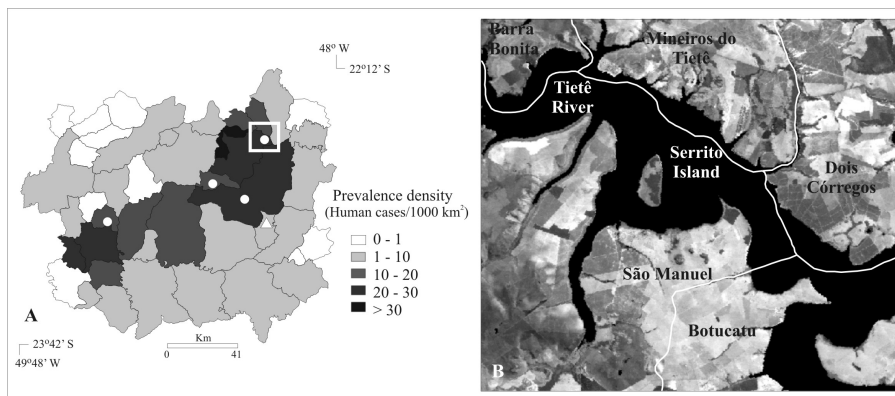
- 39 Restreo A, Baumgardner DJ, Bagagli E, *et al.* Clues to the presence of pathogenic fungi in certain environments. *Med Mycol* 2000; **38**: 67-77.
- 40 Greer DL, Bolanos B. Role of bats in the ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: the survival of *Paracoccidioides brasiliensis* in the intestinal tract of frugivorous bat, *Artibeus lituratus*. *Sabouraudia* 1977; **15**: 273-282.
- 41 Greer DL, McMurray DN. Pathogenesis and immune response to *Paracoccidioides brasiliensis* in the fructivorous bat, *Artibeus lituratus*. *Saboraudia* 1981; **19**: 165-178.
- 42 Montoya AE, Alvarez AL, Moreno MN, *et al.* Electrophoretic karyotype of environmental isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol* 1998; **37**: 219-222.
- 43 Camargo ZP, Taborda CP, Rodrigues EG, *et al.* *Paracoccidioides* sp. Isolado das fezes de pinguim da Antártica pertence à espécie *brasiliensis*? *Rev Argent Micol* 1992; **15**: 32.
- 44 Garcia MN, Del Negro GMB, Heins-Vacari EM, *et al.* *Paracoccidioides brasiliensis*, nova amostra isolada das fezes de um pingüim (*Pigoceles adeliae*). *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1993; **35**: 227-235.
- 45 Witorsch P, Utz PJ. North American blastomycosis: a study of 40 patients. *Medicine (Balt.)* 1968; **47**: 169-200.
- 46 Baumgardner DJ, Parestky DP. Identification of *Blastomyces dermatitidis* in the stool of a dog with acute pulmonary blastomycosis. *J Med Vet Mycol* 1997; **35**: 419-421.
- 47 Chaturverdi VP, Randhawa HS, Kini S, *et al.* Survival of *Blastomyces dermatitidis* in the gastrointestinal tract of an orally infected insectivorous bat, *Rhinopoma hardwickei hardwickei* Gray. *J Med Vet Mycol* 1986; **24**: 349-352.
- 48 Valdez H, Salata RA. Bat-associated histoplasmosis in returning travelers: case presentation and description of a cluster. *J Travel Med* 1999; **6**: 258-260.
- 49 Stevens, DA. Current concepts: Coccidioidomycosis. *N Engl J Med* 1995; **332**: 1077-1082.
- 50 Maddy KT, Crecelius T. In: Ajello L (ed) *Coccidioidomycosis*. Tucson, AZ: Univ Arizona Press, 1967.



**Figure 1. (A and B)** Lactophenol cotton blue stain showing the multi buds from the mother cell (x10 and x20, respectively). **(C)** Note the double-contoured wall in mother cell and its buds (x40).



**Figure 2. (A)** Electrophoresis 1% agarose gel stained with etidium bromide: Lane 1 *Pb* isolate from spleen PC1/PC2 primers, Lane 2 *Pb* isolate from mesenteric lymph node PC1/PC2 primers, Lane 3 *Pb* isolate from spleen Pb-ITS-E/Pb-ITS-R primers, Lane 4 *Pb* isolate from mesenteric lymph node Pb-ITS-E/Pb-ITS-R primers, Lane 5 *Pb* DNA detection from feces Pb-ITS-E/Pb-ITS-R primers. **(B)** Schematic representation of the rDNA ITS regions, demonstrating the annealing position between the amplicons generated with generic ITS4/ITS5 (634bp) and specific Pb-ITS-E/Pb-ITS-R (387bp) primer pairs.0



**Figure 3. (A)** Human prevalence density in the Botucatu endemic area of PCM. White circles represent positive sites for PCM-infection in armadillos and the white triangle, a negative one (Bagagli et al. [21]). **(B)** Red band of Landsat 7 ETM+ image (april, 2000) showing the Serrito Island and its geographic position (white line represents county boundaries).

## *Capítulo 4*

Desde a constatação de que os tatus (*Dasypus novemcinctus*) apresentam-se infectados pelo *Paracoccidioides brasiliensis* em alta frequência nas áreas endêmicas de Paracoccidoidomicose (PCM), nossos esforços têm se concentrado na avaliação da interação patógeno/hospedeiro como uma oportunidade para se tentar elucidar o ciclo natural do fungo na natureza (RESTREPO et al., 2000, BAGAGLI et al., 2003). Os tatus, além da espécie humana, têm sido os únicos animais com isolamento fúngico em alta frequência e repetibilidade (NAIFF et al., 1986, 1989, BAGAGLI et al., 1998, 2003, CORREDOR et al., 1999, 2004, SILVA-VERGARA et al., 1999, 2000). Esta espécie animal, em particular *D. novemcinctus*, vive em uma extensa região no continente Americano, extendendo-se desde a região Sul dos Estados Unidos até a Argentina (NOWAK, 1991). Esta distribuição é em grande parte coincidente com a da PCM humana, que se estende do México até a Argentina (RESTREPO-MORENO, 1994).

O tatu de nove-bandas, ou tatu galinha, como é popularmente conhecido no Brasil, é uma espécie muito caçada por trabalhadores da área rural, pois é utilizada como suplemento alimentar. Esses animais vivem praticamente “mergulhados” no solo, onde fazem seu forrageamento e constroem suas tocas para moradia (TABER, 1945, TALMAGE & BUCHANAN, 1954). Estas atividades provavelmente expõem o tatu à infecção pelas conídias do *P. brasiliensis* presentes no ambiente.

Acredita-se que a infecção nesta espécie animal, como no ser humano, também ocorra pela via inalatória, porém, nossos freqüentes achados de recuperação fúngica em amostras de linfonodo mesentérico e agora a detecção molecular do patógeno em amostras de fezes de dois animais capturados em locais distintos (Man-01 e tatu da Ilha do Serrito), sugerem que um possível ciclo gastrointestinal possa ocorrer com o *P. brasiliensis* no tatu.

O isolamento do *P. brasiliensis* em amostras de fezes já foi, por duas ocasiões, mencionado na literatura. Um deles foi obtido a partir de fezes de pingüim (*Pigoceles adelia*), na Antártica (GEZUELE, 1989). Este isolado foi caracterizado em diversos aspectos morfológicos e moleculares e sua identidade como *P. brasiliensis* foi validada por diversos pesquisadores (CAMARGO et al., 1992, GARCIA et al., 1993, MONTOYA et al., 1998). O

outro relato do isolamento fúngico foi em 1965, na Colômbia, a partir das fezes coletadas do trato intestinal de três exemplares de *Artibeus lituratus*, uma espécie de morcego frugívoro (GROSE & TRAMSITT, 1965). O possível papel dos morcegos na cadeia epidemiológica do patógeno foi refutado por GREER & BOLANOS (1977), onde ao realizarem infecção experimental na mesma espécie de morcego observaram que o *P. brasiliensis* não era capaz de sobreviver por mais de 8 horas no trato gastrointestinal desses animais. Um outro ensaio realizado na mesma espécie de quiróptero, com infecção fúngica pelas vias intranasal e intraperitoneal mostrou que em nenhuma das duas vias de infecção foi possível se obter o isolamento do patógeno nas amostras de fezes (GREER & MCMURRAY, 1981). Um levantamento realizado em morcegos das espécies *Desmodus rotundus* (de hábito alimentar hematófago) e *Carollia perspicilata* (frugívoro), procedentes da região endêmica de PCM de Botucatu, a partir de cultura de órgãos e fezes, também não permitiu o isolamento do *P. brasiliensis* (BOSCO, 2000).

Sabe-se que os morcegos desempenham papel importante na cadeia epidemiológica da histoplasmose, onde já foi isolado o agente, *Histoplasma capsulatum*, a partir de tecido (SHACKLETTE, 1962) e freqüentemente das fezes (ANDREU & ABRAHAM, 1984, ANDREU, 1988, VALDEZ & SALATA, 1999).

Outras espécies de fungos patogênicos dimórficos já foram relatadas associadas a fezes e/ou trato gastrointestinal de animais. Além do *H. capsulatum*, o *Blastomyces dermatitidis* também já foi isolado em fezes de morcego da espécie *Rhinopoma hardwickei* de hábito alimentar insetívoro (CHATUVERDI et al., 1986). Além dos morcegos, o *B. dermatitidis* já foi isolado a partir de amostras de fezes humanas e de cão com blastomicose (WITORSCH & UTZ, 1968, BAUMGARDNER et al., 1997). A hipótese proposta para o isolamento do fungo a partir das fezes seria a deglutição de escarro pelo hospedeiro acarretando na passagem do fungo viável pelo trato gastrointestinal (WITORSCH & UTZ, 1968). O retorno e a disseminação fúngica do *Coccidioides immitis* para o ambiente também já foi relatado como sendo possível através da eliminação de secreções, as quais contém células viáveis e que no ambiente se convertem na forma micelial (STEVENS, 1995). Outra possibilidade desta espécie fúngica retornar ao ambiente é após a morte e

decomposição de hospedeiro animal, resultando em reversão fúngica para sua condição infectante (MADDY & CRECELIUS, 1967). Dessa forma, observa-se que para as espécies dimórficas *H. capsulatum*, *B. dermatitidis* e *C. immitis*, o fungo é eliminado de forma viável para o ambiente a partir de um hospedeiro, demonstrando que a infecção fúngica no hospedeiro animal e humano provavelmente não é um “beco sem saída” para o patógeno, como mencionado por Rippon (RIPPON, 1988). Se o retorno ao ambiente, como foi mencionado, ocorre para essas espécies fúngicas dimórficas, por que o mesmo não poderia ocorrer com o *P. brasiliensis*?

A padronização de técnicas moleculares para detecção do *P. brasiliensis*, em amostras de tecido de hamsters e tatus, empregando-se a técnica de Nested-PCR com pares de “primers” específicos para *P. brasiliensis*, derivados da região ribossomal, demonstrou ser muito sensível e específica. Enquanto a infecção produzida nos hamsters, inoculados pela via intratesticular com uma cepa de *P. brasiliensis* obtida de tatu, não permitiu a recuperação fúngica nos demais órgãos, tendo sido isolado apenas no testículo, o mesmo não ocorreu com a Nested-PCR, onde detectou-se a disseminação do patógeno para pulmão, fígado e baço. O isolado empregado para a infecção dos hamsters foi classificado como altamente virulento, de acordo com estudos realizados por HEBELER-BARBOSA et al. (2003). Este isolado vem sendo mantido no nosso laboratório há 6 anos, e os constantes repiques realizados levou a uma atenuação de sua virulência, fato este comumente observado em diversos laboratórios e que foi bem documentado por MACORIS et al. (*submitted*).

Nas amostras de tecido de tatus, fato semelhante foi observado. Enquanto que a cultura dos fragmentos dos órgãos dos animais (linfonodo mesentérico, pulmão e baço, cultivados em Mycosel® à temperatura de 35°C) foi negativa, a reação de Nested-PCR foi capaz de detectar a presença do patógeno. Tal técnica mostrou-se ser mais sensível na demonstração da presença do patógeno do que a cultura. Em estudos realizados com amostras de solo, coletadas de tocas de tatus, tal técnica também mostrou-se capaz de detectar o DNA do *P. brasiliensis* (THEODORO et al. *submitted*).

O uso de tatus como modelo experimental para estudos da Hanseníase, aspectos patológicos do *Micobacterium lepre* e produção de antígenos já está



---

bem consolidado (STORRS, 1974, JOB, 1991, BRUCE et al., 2000). Esses animais apresentam-se naturalmente infectados pelo bacilo e alguns deles manifestam a doença, com o desenvolvimento de lesões cutâneas características, semelhantes às observadas em humanos (JOB, 1991, BRUCE et al., 2000). A utilização de tatus também tem sido útil para o estudo da neurite lepromatosa, um achado comum e muito pouco explorado em humanos, pois a realização de biópsias em tecido nervoso dificulta as pesquisas por poder levar os pacientes à paralisia do nervo examinado (SCOLLARD, 2000). Embora a literatura mencione que esta espécie animal é sensível para o estudo da hanseníase, alguns animais, no entanto, parecem ser resistentes à doença, provavelmente devido a alguma característica genética (JOB, 1985).

O tatu vem demonstrando um papel importante na PCM, mas ao contrário da Hanseníase, muito pouco se sabe sobre o comportamento da PCM-doença nesta espécie animal. A observação de um grupo de tatus mantidos em cativeiro para a avaliação da PCM-doença, aqui apresentado, é uma abordagem nova. Algumas dificuldades para se realizar este estudo foram encontradas, como a falta de experiência de manejo com esta espécie animal, principalmente com relação a sua instalação e alimentação. Esta dificuldade foi em boa parte sanada ao associarmos ao Instituto Lauro de Souza Lima, localizado em Bauru, SP, distante cerca de 90 km de nosso laboratório. Este Instituto apresenta um biotério para tatus bem estruturado e a manutenção destes animais em cativeiro foi introduzida pelo Dr. D.V.A. Opromola para estudos sobre a hanseníase (OPROMOLA et al., 1980).

Os animais do presente estudo estão alojados em baias individuais, de piso cimentado, e no interior de cada baia há uma caixa plástica com capim seco para o animal poder ficar “entocado”. A alimentação consiste de ração para cães, suplementada com ovo cozido e carne moída crua. Em geral, os animais adaptaram-se bem às condições de cativeiro, sendo que a maioria deles ganhou peso, cerca de 600 gramas por animal em um período de 18 meses de confinamento. Do total de oito animais avaliados, 4 já morreram naturalmente sem apresentarem, no entanto, evidências da PCM-doença. O animal Man-02 chegou ao cativeiro provavelmente com alguma infecção subclínica e o estresse produzido por tal condição deve ter acelerado o processo infeccioso, levando o animal a apresentar uma diarreia que

provavelmente levou-o a desidratação e morte. À necropsia, não foi detectado alterações grosseiras e o exame histopatológico não revelou sinais de doença ativa. Tampouco a reação de Nested-PCR revelou a presença do patógeno nas amostras de tecido, bem como a cultura permitiu o isolamento fúngico. O exemplar Man-03, apesar do patógeno ter sido detectado na reação de Nested-PCR do linfonodo mesentérico, provavelmente não morreu de PCM, uma vez que o histopatológico não revelou a presença de granuloma em nenhum órgão avaliado e a cultura dos tecidos também foi negativa. Provavelmente, o que levou esse animal à morte foi uma septicemia bacteriana devido à extensa lesão que apresentava no membro posterior direito, a qual drenava uma grande quantidade de pus com material necrótico coagulado. O animal Man-06 foi o que menos peso ganhou durante sua manutenção no cativeiro e, apesar de ter sido PCR positivo nas amostras de pulmão, baço e linfonodo mesentérico, seu exame histopatológico também não manifestou nenhuma formação de granuloma característico da PCM. A cultura realizada para as amostras de tecido também foi negativa. A fêmea Man-08, provavelmente teve como *causa mortis* alguma complicação gestacional, pois à necropsia observou-se que a progênie estava quase a termo. Durante a manutenção deste animal em cativeiro, sequer suspeitávamos de sua prenhez e este animal foi por várias vezes submetido à anestesia e manipulação. Talvez essa condição iatrogênica tenha provocado um estresse neste animal, uma vez que seu óbito ocorreu poucos dias após ter sido avaliada. O exame histopatológico também não mostrou sinais de PCM-doença, a cultura de seus órgãos e a Nested-PCR também foram negativas para a detecção do *P. brasiliensis*. O restante dos animais, 4 exemplares, estão vivos e parecem estar em boas condições de saúde.

Embora a literatura mencione o fato dos tatus poderem apresentar a PCM-doença, fato constatado com a observação de granuloma em fígado e pulmão (BAGAGLI et al., 1998, SILVA-VERGARA et al., 1999), a observação deste grupo de animais em cativeiro, que ainda não está totalmente concluída, parece mostrar que estes animais estão infectados, porém sem a manifestação da doença ativa. Recentemente foi descrito na literatura a manifestação da PCM-doença em um cão, uma fêmea da raça Doberman, a qual apresentava grande comprometimento dos linfonodos da região cervical e à histopatologia

foi observado inflamação granulomatosa, contendo inúmeras leveduras características de *P. brasiliensis*. O diagnóstico foi confirmado por imunohistoquímica e pela detecção do gene da gp 43 (RICCI et al. 2004).

Esta espécie de tatu apresenta-se naturalmente infectada por outros patógenos, das mais diversas naturezas, tais como: bacterianas, *Mycobacterium leprae* e *Leptospira* spp. (PAIGE et al., 2002, MEYERS et al., 1977); fúngicas, *Coccidioides immitis* e *Emonsia crescens* (EULÁLIO et al., 2001, SANTOS, 1999), protozoárias, *Leishmania* spp., *Trypanossoma cruzi* e *Toxoplasma gondii* (LAINSON et al., 1979, BURRIDGE et al., 1979, PAIGE et al., 2002) e virais, como o relato de um caso de raiva (LEFFINGEL & NEILL, 1989).

O animal proveniente da Ilha do Serrito, além de ter sido positivo para o isolamento do *P. brasiliensis* também foi positivo para o isolamento de outros patógenos, tais como *Leptospira* spp. a partir dos rins e de *Leishmania* spp. a partir de fragmentos de baço, fígado e pulmão (comunicação pessoal com equipe de Zoonoses do Prof<sup>o</sup> Helio Langoni, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia deste Campus).

Estudos sobre a ecologia destes animais demonstram que o tatu de nove-bandas apresenta uma área de vida (“home range”) pequena, tendo toda sua existência restrita a uma determinada área geográfica (LAYNE & GLOVER, 1977, BREECE & DUSI, 1985, LOUGHRY & MACDONOUGH, 1997). Devido ao fato desta espécie animal não apresentar marcados hábitos migratórios e ter uma área de vida restrita, a literatura já menciona a possibilidade de tatus infectados auxiliarem no mapeamento de áreas de risco, bem como na caracterização ecológica, sendo considerados animais sentinela da PCM (RESTREPO et al., 2000, BAGAGLI et al., 1998, 2003).

A Ilha do Serrito representa uma situação única para o estudo da ecologia do *P. brasiliensis*. O primeiro exemplar avaliado já permitiu o isolamento fúngico a partir de fragmentos de linfonodo mesentérico. De um total de 101 fragmentos cultivados em Mycosel®, isolou-se o fungo em 44 deles, mostrando uma carga fúngica relativamente alta. Pode-se concluir, portanto, que existe uma população de tatus naturalmente infectada e isolada neste local. Por volta do ano de 1962, o Rio Tietê foi represado para a construção da Usina Hidrelétrica e da Eclusa de Barra Bonita. Com o

enchimento do lago, as áreas mais altas dentro da área de inundação ficaram isoladas, constituindo ilhas fluviais, entre elas a Ilha do Serrito. Nessa ocasião, os tatus que já se encontravam nesta área ficaram ilhados e permanecem lá desde então, uma vez que a distância mínima da ilha à margem mais próxima é de 1 km.

A análise geográfica desta ilha mostrou que a geologia compreende rochas da Formação Pirambóia, cobertas predominantemente por solos do tipo Latossolo Vermelho-Amarelo. Estudo anterior mostrou importante correlação entre o embasamento de rochas basálticas (Formação Serra Geral) e a epidemiologia da PCM humana (SIMÕES et al., 2004). Este embasamento e os solos derivados seriam particularmente importantes na configuração de um ambiente que favorecesse a manutenção da umidade devido um teor médio a alto de argila no solo. Embora a camada de basalto na Ilha do Serrito já tenha sido erodida há muito tempo atrás e predominem as rochas sedimentares da Formação Pirambóia, a condição atual de represamento a torna também local de constante umidade. As rochas sedimentares, agora cercadas por grande quantidade de água e com lençol freático elevado, agem como verdadeiras esponjas, permitindo a retenção e manutenção da condição perene de umidade. Nesse caso, embora a precipitação média anual na ilha de 1383 mm esteja no limiar inferior, de acordo com os resultados anteriores (SIMÕES et al., 2004), a condição específica da ilha é suficiente para garantir a manutenção do *P. brasiliensis* nesse ambiente. A temperatura média anual de 22.1°C e a elevação média levemente inferior a 450m estão de acordo com as características ambientais previamente encontradas na associação entre o *P. brasiliensis* e o tatu de nove-bandas (RESTREPO et al., 2000, BAGAGLI et al., 2003). Os tipos de vegetação predominantes na ilha são a mata semi-decídua (60,4%), espécies arbustivas e gramíneas (39,6%).

Todas essas características mencionadas fazem desta ilha fluvial um verdadeiro laboratório natural para o estudo da ecologia do *P. brasiliensis* e também para a compreensão do papel do tatu de nove-bandas na história natural deste patógeno.

**Referências Bibliográficas\***

ANDREU, C. F., ABRAHAM, A. M. L. Aislamento de *Histoplasma capsulatum* en la Isla de la Juventud. **Rev. Cuba. Med. Trop.**, v. 36, p. 297-304, 1984.

ANDREU, C. M. F. Aislamiento de *Histoplasma capsulatum* en murcielagos en Cuba. **Rev. Mex. Med. Trop.**, v. 40, p. 36-43, 1988.

BAGAGLI, E., FRANCO, M., BOSCO, S. M. G., HEBELER-BARBOSA, F., TRINCA, L., MONTENEGRO, M. R. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. **Med. Mycol.**, v. 41, p. 217-23, 2003.

BAGAGLI, E., SANO, A., COELHO, K. I., ALQUATI, S., MIAJI, M., CAMARGO, Z. P., GOMES, G. M., FRANCO, M., MONTENEGRO, M. R. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in na endemic area of paracoccidioidomycosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 58, p. 505-12, 1998.

BAUMGARDNER, D. J., PARESTKY, D. P. Identification of *Blastomyces dermatitidis* in the stool of a dog with acute pulmonary blastomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 35, p. 419-21, 1997.

BOSCO, S. M. G. **Pesquisa do *paracoccidioides brasiliensis* e de outros fungos patogênicos dimórficos em animais silvestres.** 2000. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

BREECE, G. A., DUSI, J. L. Food habits and home ranges of the common long-nosed armadillo *Dasypus novemcinctus* in Alabama. In: MONTGOMERY, G. G. (Ed.) **The evolution and ecology of armadillos, sloths, and vermilinguas.** Washington : Smithsonian Institution, 1985. p.19-27.

BRUCE, S., SCHROEDER, T. L., ELLNER, K., RUBIN, H., WILLIAMS, T., WOLF Jr, J. E. Armadillo exposure and Hansen's disease: an epidemiologic survey in southern Texas. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.; 43, p. 223-8, 2000.

BURRIDGE, M. J., BIGLER, W. J., FORRESTER, D. J., HENNEMANN, J. M. Serologic survey for *Toxoplasma gondii* in wild animals in Florida. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 175, p. 964-7, 1979. LAYNE JN, GLOVER D. Home range of the armadillo in Florida. **J. Mammal.**, v. 58, p. 411-3, 1977.

---

\*UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Coordenadoria Geral de Bibliotecas. **Normas para publicações da UNESP.** São Paulo : Editora UNESP, 1994. V. 2: Referências bibliográficas.

BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS previews database.** Philadelphia, 1991. 451p.

- CAMARGO, Z. P., TABORDA, C. P., RODRIGUES, E. G., UNTERKIRCHERER, C. *Paracoccidioides* sp. Isolado das fezes de pinguim da Antártica pertence a espécie brasiliensis? **Rev. Argent. Micol.**, v. 15, p. 32, 1992.
- CHATURVERDI, V. P., RANDHAWA, H. S., KINI, S., KHAN, Z. U. Survival of *Blastomyces dermatitidis* in the gastrointestinal tract of an orally infected insectivorous bat, *Rhinopoma hardwickei hardwickei* Gray. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 24, p. 349-32, 1986.
- CORREDOR, G. G., CASTAÑO, J. H., PERALTA, A., DÍEZ, S., ARANGO, M., MCEWEN, J., RESTREPO, A. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in na endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. **Rev. Iber. Micol.**, v. 16, p. 216-20, 1999.
- CORREDOR, G. G., PERALTA, L. A., CASTAÑO, J. H., ZULUAGA, J. S., HENAO, B., ARANGO, M., TABARES, A. M. R., MATUTE, G. G., McEWEN, J. G., RESTREPO, The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. **Med. Mycol.**, v. 42, p. , 2004.
- EULALIO, K. D., MACEDO, R. L., CAVALCANTI, M. A., MARTINS, L. M., LAZERA, M. S., WANKE, B. *et al.* *Coccidioides immitis* isolated from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in the state of Piauí, northeast Brazil. **Mycopathol.**, v.; 149, 57-61, 2001.
- GARCIA, N. M., DEL NEGRO, G. M. B., HEINS-VACCARI, E. M., MELO, N. T., ASSIS, C. M., LACAZ, C. S. *Paracoccidioides brasiliensis*, nova amostra isolada de fezes de pinguim (*Ipygoceles adeliae*). **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 35, p. 227-35, 1993.
- GEZUELE, E. Aislamento de *Paracoccidioides* sp. de heces de pinguino de la Antártida. In: INTERNATIONAL MEETING ON PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS, 4, 1989, Caracas. **Abstracts...** Caracas, 1989. (Abstract B2).
- GREER, D. L., BOLANOS, B. Role of bats in the ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: the survival of *Paracoccidioides brasiliensis* in the intestinal tract of frugivorous bat, *Artibeus lituratus*. **Sabouraudia**, v.15, p. 273-82, 1977.
- GREER, D. L., McMURRAY, D. N. Pathogenesis and immune response to *Paracoccidioides brasiliensis* in the fructivorous bat, *Artibeus lituratus*. **Saboraudia**, v. 19, p. 165-78, 1981.
- GROSE, E., TRAMSITT, J. R. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia, S.A. **Sabouraudia**, v. 4, p. 124-5, 1965.

- HEBELER-BARBOSA, F., MONTENEGRO, M. R., BAGAGLI, E. Virulence profiles of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from armadillos (*Dasypus novemcinctus*). **Med. Mycol.**, v. 41, p. 89-96, 2003.
- HEBELER-BARBOSA, F., MORAIS, F. V., MONTENEGRO, M. R., KURAMAE, E. E., MONTES, B., MCEWEN, J. G., BAGAGLI, E., PUCCIA, R. Comparison of the sequences of the internal transcribed spacer regions and PBGP43 genes of *Paracoccidioides brasiliensis* from patients and armadillos (*Dasypus novemcinctus*). **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, p. 5735-7, 2003.
- JOB, C. K. Nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*) as an animal model for leprosy. **Indian J. Lepr.**, v.; 63, p. 356-61, 1991.
- JOB, C. K., SANCHES, R. M., HASTINGS, R. C. Manifestations of experimental leprosy in the armadillo. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 34, p. 151-61, 1985.
- LAINSON, R., SHAW, J. J., MILES, M. A., POVOA, M. Leishmaniasis in Brazil: isolation of *Leishmania* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) and observation on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in North Para State. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**; v. 73, p. 239-42, 1979.
- LAYNE JN, GLOVER D. Home range of the armadillo in Florida. **J. Mammal.**, v. 58, p. 411-3, 1977.
- LEFFINGWELL, L. M., NEILL, S. U. Naturally acquired rabies in an armadillo (*Dasypus novemcinctus*) in Texas. **J. Clin. Microbiol.**, v. 27, p. 174-5, 1989.
- LOUGHRY, W.J., MCDONOUGH, C.M. Spatial patterns in a population of nine-banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*). **Am. Midl. Nat.**, v. 140, p. 161-9, 1997.
- MACORIS, S. A. G., SUGIZAKI, M. F., PERAÇOLI, M. T. S., BOSCO, S. M. G., HEBELER-BARBOSA, F., SIMÕES, L. B., THEODORO, R. C., TRINCA, L., BAGAGLI, E. Virulence attenuation and phenotypic variation of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from armadillos and patients. (*submitted*)
- MADDY, K. T., CRECELIUS, T. In: AJELLO, L. (ed) **Coccidioidomycosis**. Tucson, AZ: Univ Arizona Press, 1967.
- MEYERS, D. M., CAPARO, A. C., MORENO, J. P. Isolation of serotype hardjo and other leptospirae from armadillos in Argentina. **Bull. Pan. Am. Health. Organ.**; v. 11, p. 131-9, 1977.
- NAIFF, R. D., FERREIRA, L. C. P., BARRETO, T. V., NAIFF, M. F., ARIAS, J. R. Enzootic paracoccidioidomycosis in armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in the State of Para. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 28, p. 19-27, 1986.
- NAIFF, R.D., BARRETO, T. V. Novos registros de *Paracoccidioides brasiliensis* em tatus (*Dasypus novemcinctus*). In: Congresso Brasileiro De

- Parasitologia, 1989, Rio de Janeiro. **Proceedings...** Rio de Janeiro, 1989. p.197.
- NOWAK, R. M. **Walker's mammal of the world**. 5.ed. London: The Johns Hopkins University Press,1991. v.2, 1629p.
- OPROMOLLA, D. V. A., DE ARRUDA, O. S., FLEURY, R. N. Manutenção de tatus em cativeiro e resultados da inoculação com *Micobacterium leprae*. **Hansenol. Int.**, v. 5, p. 28-36, 1980.
- PAIGE, C. F., SCHOLL, D. T., TRUMAN, R. W. Prevalence and incidence density of *Mycobacterium leprae* and *Trypanosoma cruzi* infections within a population of wild nine-banded armadillos. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 67, p. 528-532, 2002.
- RESTREPO, A., BAUMGARDNER, D. J., BAGAGLI, E., COOPER, C. R., MCGINNIS, M. R., LAZERA, M. S., BARBOSA, F. H., BOSCO, S. M. G., CAMARGO, Z. P., COELHO, K. I., FORTES, S. T., FRANCO, M., MONTENEGRO, M. R., SANO, A., WANKE, B. Clues to the presence of pathogenic fungi in certain environments. **Med. Mycol.**, v. 38, p. 67-77, 2000.
- RICCI, G., MOTA, F. T., WAKAMATSU, A., SERAFÍN, R. C., BORRA, R. C., FRANCO, M. Canine paracoccidioidomycosis. **Med. Mycol.**, v. 42, p. 379-83, 2004.
- RIPPON, J. W. **Medical Mycology**: the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. 3. ed. Philadelphia : W. B. Saunders, 1988. 797 p.
- SANTOS, V. M. Culture development and morphology diagnosis of *Emonsia crescens* in armadillos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 32, 307, 1999.
- SCOLLARD, D. M. Endothelial cells and the pathogenesis of lepromatous neuritis: insights from the armadillo model. **Microb. Infect.**, v. 2, p. 1835-43, 2000.
- SHACKLETTE, M. H. *Histoplasma capsulatum* recovered from bat tissues. **Science**, v. 135, p. 1135, 1962.
- SILVA-VERGARA, M. L., MARTÍNEZ, R., CAMARGO, Z. P., MALTA, M. H., MAFFEI, C. L., CHADU, J. B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. **Med. Mycol.**, v. 38, p. 193-9, 2000.
- SILVA-VERGARA, M. L., MARTINEZ, R. Role of the armadillo *Dasypus novemcinctus* in the epidemiology of paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 144, p. 131-3, 1999.
- SIMÕES, L. B., MARQUES, S. A., BAGAGLI, E. Distribution of Paracoccidioidomycosis: determination of ecologic correlates through



- Geographic Information System and spatial analyzes **Med. Mycol.**, v. 42, p. 517-23, 2004.
- STEVENS, D. A. Current concepts: Coccidioidomycosis. **N. Engl. J. Med.**, v. 332, p. 1077-82, 1995.
- STORRS, E. E., WALSH, G. P., BURSCHFIELD, H. P., BINFORD, C. H. Leprosy in the armadillo: new model for biomedical research. **Science**; v. 183, p. 851-2, 1974.
- TABER, F. W. Contribution on the life cstory and ecology of the nine-banded armadillo. **J. Mammal.**, v. 26, p. 211-6, 1945.
- TALMAGE, R. V., BUCHANAN, G. D. The armadillo *Dasypus novemcinctus* – a review of its natural history, ecology, anatomy and reproductive physiology. **Rice Inst. Pamphlet Houston**, v. 41, 1954.
- THEODORO, R. C., CANDEIAS, J. M. G., ARAÚJO JR., J. P., BOSCO, S. M. G., MACORIS, S. A. G., PADULA JR. L. O., FRANCO, M. BAGAGLI E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. (*submitted*)
- VALDEZ, H., SALATA, R. A. Bat-associated histoplasmosis in returning travelers: case presentation and description of a cluster. **J. Travel. Med.**, v. 6, p. 258-60, 1999.
- WITORSCH, P., UTZ, P. J. North American blastomycosis: a study of 40 patients. **Medicine (Balt.)**, v. 47, p. 169-200, 1968.

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

- 1) as técnicas moleculares aqui padronizadas podem ser empregadas para estudos epidemiológicos de detecção do *P. brasiliensis* em amostras de tecido e de fezes dos tatus;
- 2) embora os tatus apresentem-se naturalmente infectados pelo *P. brasiliensis*, a manifestação clínica e histopatológica da PCM-doença, até o presente momento, não foi observada;
- 3) a presença do *P. brasiliensis* no tatu proveniente da Ilha do Serrito permite inferir que existe uma população de tatus naturalmente infectada neste local;
- 4) o tatu de nove-bandas pode estar eliminando o *P. brasiliensis* através das fezes, mantendo um possível ciclo gastrointestinal;
- 5) a utilização do Sistema de Informação Geográfica (SIG) e de Sensoriamento Remoto (SR) mostraram-se úteis como ferramentas para auxiliarem no estudo da caracterização ambiental das áreas de ocorrência do *P. brasiliensis* e da Paracoccidiodomicose.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)