

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

ECOLOGIA MOLECULAR DE FUNGOS PATOGÊNICOS
ONYGENALES EM ANIMAIS SILVESTRES DO INTERIOR
DO ESTADO DE SÃO PAULO

VIRGÍNIA BODELÃO RICHINI PEREIRA

**Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Câmpus de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Doutor no Programa de Pós-Graduação
em Biologia Geral e Aplicada.**

BOTUCATU - SP

2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

ECOLOGIA MOLECULAR DE FUNGOS PATOGÊNICOS
ONYGENALES EM ANIMAIS SILVESTRES DO INTERIOR
DO ESTADO DE SÃO PAULO

Virgínia Bodelão Richini Pereira

Orientador: Prof^o Dr^o Eduardo Bagagli

Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Sandra de Moraes Gimenes Bosco

**Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Câmpus de Botucatu,
UNESP, para obtenção do título de
Doutor no Programa de Pós-Graduação
em Biologia Geral e Aplicada.**

BOTUCATU - SP

2009

Dedicatória:

A Deus

Por se mostrar presente em todos os momentos da minha vida, iluminando meu caminho, perdoando meus erros, e me concedendo sempre novas oportunidades de acertar e também por enviar pessoas maravilhosas em minha vida.

Ao meu orientador:

Profº Drº Eduardo Bagagli

Pelas palavras de incentivo e elogio que foram fundamentais para tornar esse trabalho muito prazeroso, pela valiosa orientação, amizade, paciência, e acima de tudo por contribuir para meu enriquecimento profissional e pessoal.

A minha co-orientadora e amiga:

Profª Drª Sandra de Moraes Gimenes Bosco

Obrigada por me ensinar a Biologia Molecular, pela paciente leitura tantas vezes realizada, pela atenção em todo o tempo, inclusive priorizando a vida profissional mesmo na véspera do nascimento da Beatriz.



Aos meus familiares:

Que mesmo à distância torcem por mim, nunca faltando palavras de apoio.

As minhas mães: Nilca e Hélia

Exemplos de luta e dedicação, que com muito amor foram responsáveis por minha educação e valores. Por sempre torcerem para que minha vida fosse repleta de realizações.



Ao meu amado marido: Sérgio Pereira

Pelo apoio constante em todos esses anos de nossas vidas, por todos os momentos compartilhados que guardarei sempre na memória, pelo amor, carinho e preocupação principalmente nos momentos mais decisivos desta etapa.



Palavras não são suficientes para expressar minha gratidão

Eu amo muito vocês!

Agradecimentos

Agradeço a todos que me auxiliaram para que este trabalho se concretizasse, especialmente:

Ao corpo docente do **Programa de Pós Graduação em Biologia Geral e Aplicada** pelo estímulo na busca pelo aperfeiçoamento profissional;

Ao **Departamento de Microbiologia e Imunologia** do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu por possibilitar a realização deste projeto;

A **Prof^a Dr^a Terezinha Serrão Peraçoli** pela confiança em me orientar “burocraticamente” no início, sem me conhecer;

Aos docentes do Departamento de Microbiologia e Imunologia, especialmente a **Prof^a Dr^a Vera Lúcia Moraes Rall** pela oportunidade de aprendizado no estágio de docência;

Aos funcionários do departamento, **Pedro, Isaltino, Luiz, Ademival** e, especialmente, ao “**Lula**” pelo auxílio com os tatus capturados;

Às secretárias do departamento, **Sônia** e **Nice**, pela atenção;

Às funcionárias da limpeza, por tornar agradável o ambiente de trabalho;

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, **Sérgio, Herivaldo, Luciene** e **Maria Helena**, pelos serviços e esclarecimentos sempre quando solicitados;

Ao **Serviço de Biblioteca e Documentação da UNESP – Botucatu**, pela elaboração da ficha catalográfica e revisão das referências;

Aos amigos de laboratório **Ariane Nascimento, Assis Macoris, Gabriela Reis, Gisela Terçarioli, Hélio Jr., Keila Siqueira, Lígia Barrozo, Raquel Sanzovo, Raquel Theodoro, Sandra Bosco, Sandra Olbrich** e **Sílvia Pedrini** pelos momentos de aprendizado e descontração no dia a dia;

Aos funcionários do **Departamento de Estradas de Rodagem de São Paulo (DER)**, pelo aviso sobre os animais silvestres atropelados;

À **Lígia Barrozo** pelo auxílio no Sistema de Informação Geográfica (SIG), na elaboração dos mapas e amizade;

Ao **Profº Drº Reinaldo José da Silva** e **Juliana Griese** pela parceria de trabalho no aproveitamento dos animais atropelados;

Ao Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL), especialmente, às pesquisadoras **Patrícia Sammarco Rosa** e **Silvia Pedrini** que apoiaram a pesquisa com os tatus dessa região;

A **Profª Drª Márcia Guimarães**, pela oportunidade de estágio no laboratório de Patologia;

Ao Departamento de Anatomia, especialmente ao **Profº Drº Sérgio Pereira** por confeccionar as lâminas do histopatológico;

Ao **Setor de Sequenciamento da USP**, pelo sequenciamento das amostras de DNA;

Ao **Departamento de Recursos Naturais/Ciências do Solo**, pela análise físico-química do solo das tocas de tatus;

Aos proprietários dos Sítios em Cerqueira César, **Srº Benedito Pinto Cardoso**, **Srº Eder Ferreira da Silva** e **Srº Rui Correa**, que gentilmente permitiram os trabalhos de campo;

Ao **Profº Drº Eduardo Bagagli**, **Raquel Cordeiro** e **Nilca Richini**, por compartilharem as aventuras de campo e pelo auxílio na coleta dos tatus;

Aos amigos, **Raquel Domeniconi**, **Carol Luchini**, **Justulin**, **Priscila Martins**, **Shirlei** e a **“Turma da Dança de Salão”**, pela amizade, alto astral e conversas agradáveis.

À **Assessoria científica da FAPESP** pelas sugestões durante a realização do projeto;

Ao **IBAMA** e **Comitê de Ética** pela autorização na captura e coleta dos animais silvestres;

Auxílio financeiro

Fundunesp

Processo nº 0015006

The logo for FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) features a stylized graphic of a person's head and shoulders in profile, facing right, positioned to the left of the acronym 'FAPESP' in a bold, sans-serif font.

Processos nº 05/56771-9 e nº 06/03597-4

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

Introdução	11
Fungos patogênicos	11
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	13
<i>P. brasiliensis</i> e animais	14
Animais silvestres atropelados	15
Biologia molecular	16
Sistema de Informação Geográfica (SIG)	17
 Capítulo I: Molecular approaches for eco-epidemiological studies of <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	18
 Capítulo II: Molecular detection of <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> in road-killed wild animals	37
 Capítulo III: Detecção de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> em tatus (<i>Dasypus novemcinctus</i>) provenientes de uma reserva de cerrado do Instituto Lauro de Souza Lima (Bauru-SP).....	51
 Capítulo IV: Role of the Xenarthra Superorder in the epidemiology of Paracoccidioidomycosis	66
 Capítulo V: Animais silvestres atropelados: um problema atual de preservação, mas com grande potencial para estudos eco-epidemiológicos de patógenos	79
 Conclusões	98
 Referências	99

Resumo

A Paracoccidiodomicose (PCM) é uma micose sistêmica e a de maior ocorrência na América Latina, causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. Apesar dos esforços contínuos de diversos grupos de pesquisa principalmente do Brasil, Colômbia, Venezuela e Argentina, a fase ambiental produtora de propágulos infectantes, seu nicho ecológico e outros aspectos fundamentais da biologia deste patógeno ainda representa um enigma. Sabe-se, no entanto, que há alguns indicadores biológicos onde se constata a infecção natural do *P. brasiliensis* em espécies de tatu *Dasypus novemcinctus* em áreas endêmicas. Assim, o isolamento sistemático deste patógeno nesta espécie animal tem despertado o interesse em avaliar outras espécies animais cuja distribuição geográfica seja coincidente com a da PCM. O conhecimento de reservatórios naturais de fungos patogênicos e o mapeamento de regiões habitadas pelos fungos são dados fundamentais para elucidar a eco-epidemiologia da PCM. O presente projeto focalizou a detecção ambiental do *P. brasiliensis*, bem como de outros fungos patogênicos geneticamente relacionados, em animais silvestres, pelo emprego de métodos moleculares em amostras de tecido de animais atropelados em beiras de estradas. Sabe-se que esse material é muitas vezes negligenciado, sendo utilizado em estudos de conservação biológica e de parasitologia. Esta abordagem é inédita e útil no estudo da eco-epidemiologia da PCM. Foram avaliados também tatus (*D. novemcinctus*) capturados em regiões geograficamente definidas, visando o isolamento fúngico do *P. brasiliensis*, bem como de outros fungos patogênicos, por cultura de órgãos, histopatologia e técnicas moleculares. A integração dos dados micológicos, moleculares e a aplicação de técnicas de geoprocessamento permitiu a caracterização da área geográfica dos animais avaliados e contribuiu para um melhor conhecimento sobre a ocorrência do patógeno no hospedeiro animal e dos fatores bióticos e abióticos associados.

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*, Paracoccidiodomicose, animais silvestres atropelados, biologia molecular, *Dasypus novemcinctus*

Abstract

Paracoccidioidomycosis (PCM) is the most prevalent systemic mycosis of Latin America, caused by fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Despite the continuous efforts by several research groups mainly from Brazil, Colombia, Venezuela and Argentina, the saprobic form producing infective propagula, its exact niche in nature and other fundamental aspects of the biology of this pathogen still remains enigmatic. It is known however that some biological indicators where there is a natural infection of *P. brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus* in an endemic area. Thus, the systematic isolation of this pathogen in this species has increased the necessity in evaluating several wild mammals whose geographical distribution is coincident of PCM. The knowledge about natural reservoirs of pathogenic fungi and mapping landscape of areas inhabited by fungi may be clarified the eco-epidemiology of PCM. This work focused on the environmental detection of *P. brasiliensis*, as well as other related pathogenic fungi in wild animals, the use of molecular tools in tissue samples from road-killed wild animals. While road-killed animals proved to be useful both for parasitological and conservative studies, these materials have been neglected in the area of infectious disease. This approach is new and has been useful to elucidate PCM eco-epidemiology. It was evaluated armadillos (*D. novemcinctus*) captured in some restricted areas, such as from Savanna and a County considered to be hyperendemic for PCM, by culture, histopathology and molecular techniques, in order to confirm if *P. brasiliensis* also occurs in such defined ecological conditions. The use of Geographical Information Systems (GIS), thus contributing to a better understanding about the occurrence of the pathogen in the host animal and the associated biotic and abiotic factors.

Key words: *Paracoccidioides brasiliensis*, Paracoccidioidomycosis, road-killed wild animals, molecular biology, *Dasypus novemcinctus*

Introdução

Fungos patogênicos

A distribuição cosmopolita dos fungos sugere a adaptação em diversas condições ambientais (Figura 1, adaptada de MOSS, 1987).

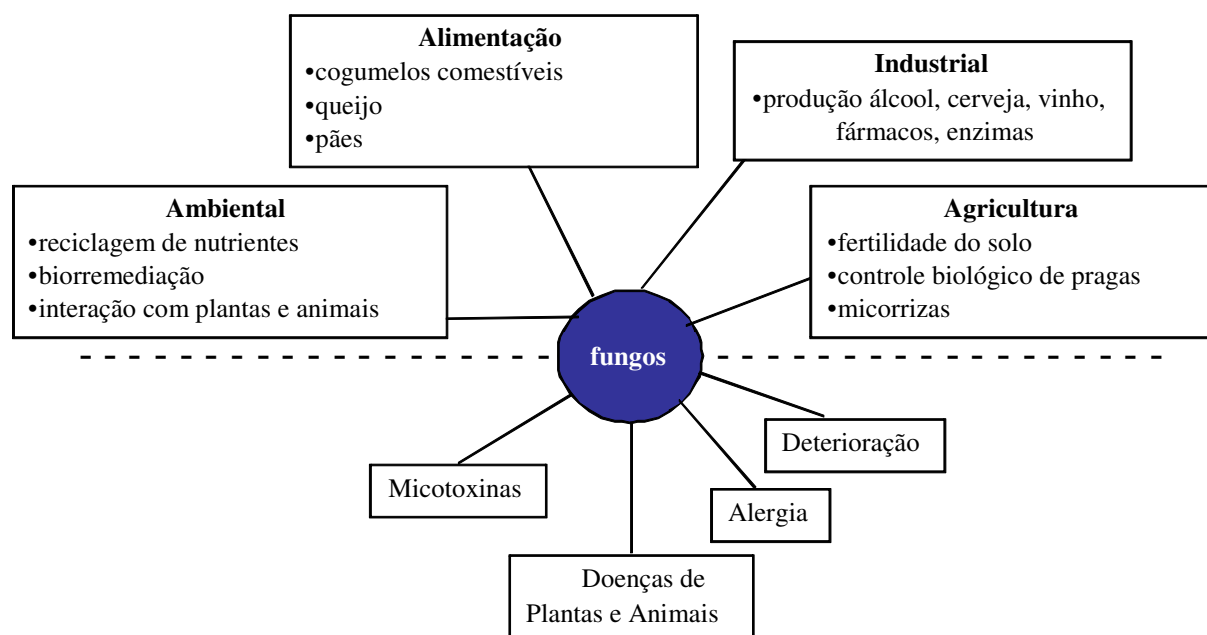


Figura 1: Resumo das principais atividades fúngicas.

A diversidade fúngica é estimada em 1,5 milhões de espécies, porém cerca de 100 mil espécies são conhecidas e menos de 200 espécies são consideradas patogênicas para humanos e outros mamíferos. Infecções causadas por fungos constituem um importante problema de saúde pública e uma das principais causas de morte em todo o mundo. Os principais fungos de importância médica, causadores de micoses sistêmicas, apresentam várias características micológicas e ecológicas em comum como: dimorfismo (forma filamentosa em condições saprofíticas e leveduriforme na condição patogênica), distribuição geográfica restrita limitada às chamadas áreas endêmicas, ocorrência saprofítica em micro-habitats com produção de propágulos infectantes, que penetram no hospedeiro principalmente pelo trato respiratório (HAWKSWORTH, 2001; CHAKRABARTI, 2005).

Dentre eles destacam-se: *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Emmonsia* spp. e *Paracoccidioides brasiliensis*. Trata-se de fungos ascomicetos, pertencentes à Ordem Onygenales e Família Onygenaceae (PETERSON & SIEGLER, 1998; BIALEK et al., 2000; HERR et al., 2001; SAN-BLAS et al., 2002). Essa

Família apresenta duas características micológicas importantes: a) presença de arthroconídias, as quais se apresentam intercaladas por células estéreis que facilitam sua liberação, e aleuroconídias (formas terminais ou laterais, de parede espessa) e b) crescimento em substratos e habitats relacionados com solo enriquecido com queratina (pele, pelo, unha de animais e penas de aves) ou fezes de animais ou aves (ALEXOPOULOS et al., 1996). Além de compartilhar características micológicas e moleculares semelhantes, os membros desta família apresentam uma ecologia normalmente associada a uma fase saprofítica ambiental em solos e fase parasitária associada a hospedeiros vertebrados (TAYLOR et al., 2000; BIALEK et al., 2000; HERR et al., 2001; UNTEREINER et al., 2004).

Um clado distinto da Família Onygenaceae foi reconhecido como uma nova Família denominada Ajellomycetaceae que inclui os gêneros *B. dermatitidis*, *H. capsulatum*, *Emmonsia* spp. e o *P. brasiliensis*. Estudos filogenéticos avaliando as relações de *Lacazia loboi* com outros membros da Família Ajellomycetaceae mostraram que esta espécie está contida dentro desta Família e que é grupo-irmão de *P. brasiliensis* (HERR et al., 2001; UNTEREINER et al., 2004) (Figura 2).

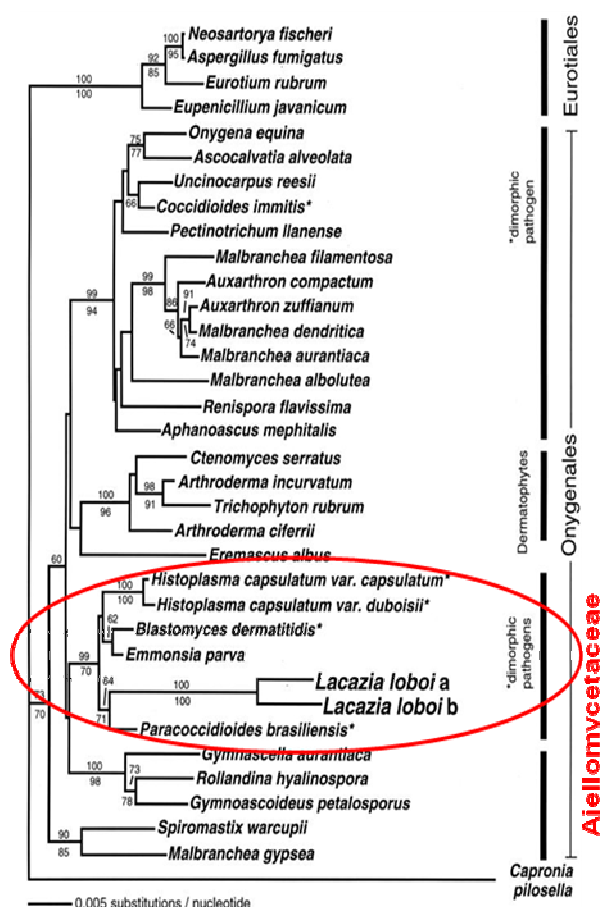


Figura 2: Relações filogenéticas da Família Ajellomycetaceae (extraído de Herr, et al. (2001) com adaptações de Untereiner et al. (2004)).

Relacionando filogenia com ecologia, curiosamente observa-se que as espécies *P. brasiliensis*, *L. loboi* e *B. dermatitidis*, além de serem próximas filogeneticamente, são também as menos compreendidas ecologicamente. Importante ressaltar que *L. loboi* é espécie ainda não cultivável em meios tradicionais, sendo considerado um parasita obrigatório (TABORDA et al., 1999). Torna-se importante o conhecimento desses fungos e em particular o *P. brasiliensis* por ser o agente etiológico da micose sistêmica mais importante na América Latina (TAYLOR et al., 2000; BIALEK et al., 2000; HERR et al., 2001; UNTEREINER et al., 2004).

Paracoccidioides brasiliensis

P. brasiliensis é o fungo causador da Paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica endêmica na América Latina. Esse microrganismo apresenta-se na forma de levedura em condições de parasitismo ou quando cultivados a 35-37°C, e micelial quando na forma saprofítica ambiental ou cultivo a 22-25°C (LACAZ et al., 2002). As leveduras apresentam forma arredondada a oval, caracterizadas por apresentarem brotamentos múltiplos originados por evaginações da célula-mãe, apresentando um aspecto de “roda de leme”. A forma micelial é caracterizada pela formação de hifas alongadas, geralmente ramificadas, com produção de conídias (Figura 3).

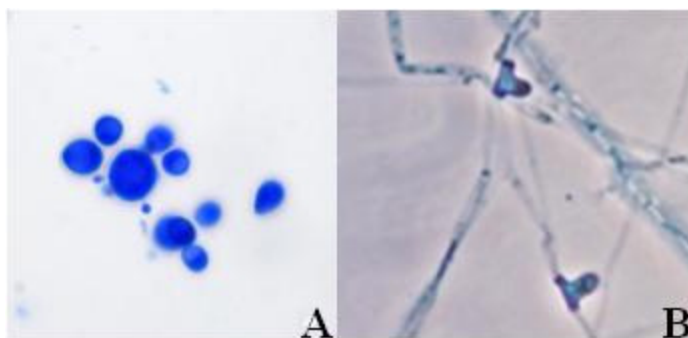


Figura 3: **A)** Fase leveduriforme do *P. brasiliensis*, coradas com lactophenol azul algodão, aumento 40X. **B)** Fase micelial com produção de conídias, coradas com lactophenol azul algodão, aumento 100X.

A PCM usualmente infecta o hospedeiro humano pela inalação de propágulos em suspensão que vão se alojar predominantemente nos pulmões. Ao atingir o alvéolo pulmonar, o fungo transforma-se em células leveduriformes adaptadas à temperatura corporal (RESTREPO, 1986; MEDOFF et al., 1987). Uma vez no organismo o fungo pode ser completamente destruído ou então persistir e multiplicar-se, podendo disseminar por vias hematogênica ou

linfática acometendo outros órgão e sistemas como fígado, baço, glândula adrenal, ossos e sistema nervoso central (SAN-BLAS, 1993; CAMARGO & FRANCO, 2000; VALERA et al., 2008). A evolução e as consequências da infecção vão depender da interação de fatores relacionados ao fungo, como virulência e composição antigênica; do hospedeiro, como características genéticas e imunidade e ao meio ambiente (CALICH et al., 1985 e 1987).

O fungo e as manifestações clínicas da infecção vêm merecendo atenção de vários grupos de pesquisadores (FRANCO et al., 1993; RESTREPO et al., 2001; SAN-BLAS et al., 2002; FELIPE et al., 2005; CAMARGO, 2008; PUCCIA et al., 2008) principalmente pelas características peculiares da doença: a) longo período de latência, b) ausência de surtos epidêmicos e c) pequeno número de casos agudos (BRUMMER et al., 1993; RESTREPO, et al., 2000; LACAZ et al., 2002). Essas circunstâncias dificultam a determinação da origem do foco de infecção, assim como o hábitat do fungo, além disso, a repercussão da infecção primária e o tempo real do período de incubação ainda continuam intrigando os pesquisadores (RESTREPO, 1985; WANKE & LONDERO, 1994; RESTREPO et al., 2000).

***P. brasiliensis* e animais**

A PCM foi pouco avaliada em animais, os quais podem representar importantes indicadores biológicos da ocorrência do fungo em uma determinada área (RESTREPO, 1985). Em 1965, Grose & Tamsitt isolaram *P. brasiliensis* de trato intestinal de morcegos. Estudos epidemiológicos empregando-se a paracoccidiodina mostraram que tanto animais domésticos quanto silvestres apresentam-se positivos para o *P. brasiliensis* (CONTI-DÍAZ et al., 1972; COSTA et al., 1995). Testes sorológicos (ELISA) realizados em cães (ONO et al., 2001; FAGUNDES, 2002) e macacos (CORTE et al., 2007) mostraram que estes animais apresentam-se naturalmente infectados. Ricci et al. (2004) e Farias et al., 2005 relataram dois casos de PCM em cães, sendo obtida cultura fúngica apenas para o segundo caso. O isolado foi caracterizado molecular e morfológicamente (BOSCO et al., 2005).

Porém, somente após a constatação de que os tatus (*D. novemcinctus*) apresentam-se infectados pelo *P. brasiliensis* em alta frequência nas áreas endêmicas de PCM, é que novas perspectivas de estudos eco-epidemiológicos se consolidaram, pois esta espécie vem sendo apontada como um seguro indicador epidemiológico para rastreamento dos locais de ocorrência do patógeno (BAGAGLI et al., 2003). Este fato foi inicialmente confirmado por Naiff et al. (1986, 1989) na região Amazônica e, posteriormente em outras regiões (BAGAGLI et al., 1998, 2003; CORREDOR et al., 1999; MACEDO et al., 1999; RESTREPO et al., 2000; SILVA-VERGARA et al., 2000). Além da espécie *D. novemcinctus*, o fungo também foi isolado do tatu

Cabassous centralis, em Caldas, Colômbia, indicando que outras espécies além do tatu-de-nove-bandas também podem estar infectadas com o patógeno (CORREDOR et al., 2005).

Estes animais possuem hábito escavatório, cuja distribuição geográfica costuma coincidir com a observada na PCM (RESTREPO-MORENO, 1994). O contato com estes animais está associado a um aumento dos fatores de riscos para a infecção em pessoas residentes nas áreas endêmicas da doença (CADAVID & RESTREPO, 1993). Por apresentar temperatura corporal e imunidade celular relativamente baixa (PURTILO et al., 1975; ULRICH et al., 1976), o tatu parece favorecer o desenvolvimento de infecções, podendo inclusive ter desempenhado algum papel na evolução do *P. brasiliensis* a condição zoofílica (adaptada ao tecido animal) (BAGAGLI et al., 2006), proporcionando uma tendência ao estabelecimento de lesões crônicas nos hospedeiros e a baixa produção de conídias (McEWEN et al., 1987), o que poderia explicar também o difícil isolamento ambiental deste fungo a partir da sua fase saprofítica (FRANCO et al., 2000).

Assim, a pesquisa de fungos patogênicos avaliados em diversos exemplares de animais silvestres mortos por atropelamento, bem como de tatus (*D. novemcinctus*) capturados em áreas ainda não avaliadas, possibilita um impacto positivo no melhor entendimento da PCM.

Animais silvestres atropelados

As pesquisas com animais silvestres são cada vez mais restritivas, principalmente tratando-se de métodos que necessitam de anestesia e/ou eutanásia do animal, assim a detecção molecular de patógenos fúngicos em animais silvestres mortos por atropelamento atende a necessidade de se buscar alternativas para o uso de animais em pesquisa, como indicado pelos comitês de ética em experimentação animal. O número e a diversidade de animais mortos em rodovias brasileiras aumenta a cada ano e o problema se agrava principalmente pelo aumento do fluxo de automóveis e também porque a rodovia corta áreas potencialmente ricas em fauna e flora, interferindo no deslocamento natural da espécie (FORMAN & ALEXANDER, 1998; RODRIGUES et al., 2002; PRADA, 2004). Desta maneira, os atropelamentos de mamíferos silvestres contribuem para o declínio e dificuldades na recuperação de populações, principalmente aquelas em risco de extinção (TROMBULAK & FRISSEL, 2000). Estudos de conservação biológica, principalmente de levantamentos quantitativos e qualitativos das ocorrências de atropelamento da fauna são realizados (VIEIRA, 1996; CANDIDO Jr. et al., 2002; RODRIGUES et al., 2002; PRADA, 2004; PINOWSKI, 2005), porém são poucos os trabalhos que aproveitam as carcaças dos animais para outros estudos, como por exemplo,

helmintológico, morfológico e genético (COYNER et al., 1996; FOSTER et al., 2003; NELDER & REEVES 2005; GRIESE, 2007).

Mesmo com as dificuldades para o cultivo e análise histopatológica das amostras de tecido de animais atropelados, técnicas moleculares podem ser utilizadas na identificação e tipagem de patógenos nestes materiais.

Biologia molecular

Os recentes avanços nas técnicas de Biologia Molecular proporcionaram o surgimento de várias técnicas de identificação e tipagem de patógenos, através da PCR (reação em cadeia da polimerase), com o uso de *primers* específicos, que apresentam alta especificidade e sensibilidade para a amplificação de um determinado fragmento de DNA específico do patógeno (BOWMAN et al., 1993). Já a Nested-PCR é um avanço da técnica de PCR, pois trata-se de duas amplificações seguidas, utilizando-se primeiramente *outer primers* e depois *inner primers*.

Diversos alvos dentro do genoma de fungos têm sido avaliados, em especial áreas da sequência dentro do DNA ribossomal (rDNA) (ANDERSON et al., 2001; UETAKE et al., 2002). Essa região do genoma é importante para detecção e identificação de fungos patogênicos, pois apresenta sequências de nucleotídeos relativamente conservadas entre os fungos e também regiões variáveis chamadas ITS (internal transcribed spacer), sendo utilizadas na diferenciação de espécies ou entre linhagens da mesma espécie (ESTEVEZARZOSO et al., 1999; HENRY et al., 2000; IWEN et al., 2002). Por apresentar cerca de centenas de cópias por genoma, esta região confere maior sensibilidade e especificidade, representando um importante alvo para identificação fúngica.

Várias metodologias moleculares são empregadas para a identificação do *P. brasiliensis* tanto para materiais clínicos como amostras ambientais. Motoyama et al. (2000) desenvolveram um método de identificação do *P. brasiliensis* amplificando e sequenciando regiões de DNA ribossomal 5.8S e 28S e regiões intergênicas, o que possibilitou diferenciar o *P. brasiliensis* de outros fungos patogênicos. Imai et al. (2000) amplificaram e sequenciaram a região ITS (sequências que separam os genes 18S, 5.8S e 28S e são transcritas e processadas para dar origem ao DNA ribossômico maduro), incluindo o gene 5.8S, e deduziram um par de *primers* que amplifica um fragmento de 418 pares de bases, específico de *P. brasiliensis*, em 29 isolados testados, provenientes do Brasil, Costa Rica, Japão, Argentina. Gomes et al. (2000) avaliaram várias combinações de *primers*, todos derivados do gene da gp43, e observaram que o par de *primers* (PC2-PC6) apresentou alta sensibilidade, tanto em

amplificação direta, como em reação de nested PCR, após um primeiro ciclo com PC1-PC5 (*outer primers*). Bialek et al. (2000) também desenharam dois pares de *primers* do gene da gp43, para uso em Nested-PCR, cuja sensibilidade é alta, em amostras de tecidos infectados com conídias de *P. brasiliensis*, e também específico pois não amplificam DNA de *H. capsulatum*. Em 2005, San-Blas et al. desenharam *primers* derivados de sequências randômicas do DNA que foram específicos para *P. brasiliensis* na detecção em amostras clínicas. Em nosso laboratório foram desenhados *primers* que se anelam na região do rDNA, particularmente nas regiões espaçadoras ITS1 e ITS2 conservadas para os isolados de *P. brasiliensis*, e polimórficas para *B. dermatitidis*, segundo o sequenciamento feito por Hebel-Barbosa et al. (2003). Estes *primers* (PbITSE e PbITSR) são utilizados como *inner primers*, em condição de Nested-PCR com os *outer primers* (ITS4 e ITS5) universais para fungos e mostraram ser promissores para estudos de ocorrência ambiental do patógeno (THEODORO et al., 2005).

Sistema de Informação Geográfica (SIG)

Outra potente ferramenta para estudos eco-epidemiológicos é a utilização do Sistema de Informação Geográfica (SIG), a qual já vem sendo amplamente utilizada na análise da distribuição geográfica e dinâmica de diversas doenças, das mais variadas etiologias (LINTHICUM et al., 1987; ROGERS & RANDOLPH, 1991; BECK et al., 1994), inclusive no estudo da Coccidioiodomicose (BAPTISTA-ROSA et al., 2007), Blastomicose (REED et al., 2008) e PCM, realizado em nosso laboratório (SIMÕES et al., 2004).

A aplicação de Geoprocessamento no estudo da ecologia de *P. brasiliensis* pode auxiliar na identificação do seu hábitat, além de estabelecer indicadores ambientais facilmente mapeáveis, permitindo a identificação das áreas de risco à infecção.

Desta forma, a pesquisa de novos hospedeiros utilizando-se da combinação das técnicas de Biologia Molecular e de SIG são um diferencial nos estudos de eco-epidemiologia do *P. brasiliensis*, bem como de outros patógenos Onygenales.

Molecular approaches for eco-epidemiological studies of *Paracoccidioides brasiliensis*

Submitted: Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

Virgínia Bodelão Richini-Pereira¹, Sandra de Moraes Gimenes Bosco¹, Raquel Cordeiro Theodoro¹, Severino Assis da Graça Macoris¹, Eduardo Bagagli^{1*}

¹ Dept. Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP-Botucatu.

Summary

Medical mycology has greatly benefited from the introduction of molecular techniques. The advances in our understanding about several aspects of pathogenic fungi have been notable in the latest years, providing both theoretical and practical support. Considering *Paracoccidioides brasiliensis* in particular, important eco-epidemiological aspects, such as environmental distribution, and new hosts were learnt through molecular approaches. These methodologies also contributed to a better understanding about the genetic variability of this pathogen; thus, *P. brasiliensis* is now assumed to represent a species complex. The present review focuses on some recent findings about the current taxonomic status of *P. brasiliensis* species complex, its phylogenetic and speciation processes, as well as on some practical applications for the molecular detection of this pathogen in environmental and clinical materials.

Key words: *Paracoccidioides brasiliensis*, eco-epidemiology, PCR

Sponsorships: Fapesp (05/56771-9 and 06/03597-4)

Paracoccidioides brasiliensis

Paracoccidioidomycosis (PCM) is the most important and prevalent systemic mycosis in Latin America, mainly in Brazil, Colombia and Venezuela (Wanke & Londero 1994). It is caused by *Paracoccidioides brasiliensis*, a thermally dimorphic fungus that grows as a yeast-like structure in the host tissues or when cultured at 35-37°C and as a mycelium under saprobic conditions or when cultured at room temperature, 18-23°C (Lacaz 1994).

Similarly to other systemic mycosis also caused by dimorphic fungi in which the lung is the main compromised organ, PCM-infection is believed to be acquired through the

inhalation of conidia present in the environment (Gonzales-Ochoa 1956, Bustamante et al. 1985).

Although PCM is considered an endemic disease in many regions, there are few reports in literature about the isolation of this pathogen from the environment, which has made ecological studies on *P. brasiliensis* a hard work for mycologists (Shome & Batista 1963, Negroni 1966, Albornoz 1971, Restrepo 1985, Silva-Vergara et al. 1998, Franco et al. 2000). There is evidence of *P. brasiliensis* isolation from bat and penguin feces and dog food. However, these were casual remarks with no reproducibility (Grose & Tamsitt 1965, Gezuele 1989, Ferreira et al. 1990). Besides, the lack of outbreaks and the prolonged latency period of this disease, associated with human migration, lead the exact infection source to remain unknown (Restrepo 1985).

An important clue for ecological studies on *P. brasiliensis* was the finding that the nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*) is naturally infected with this pathogen (Naiff et al. 1986, Bagagli et al. 1998, 2003, Corredor et al. 1999, Silva-Vergara 1999). The fungus was also isolated from another armadillo species, *Cabassous centralis*, reinforcing that armadillos are in constant contact with the pathogen in the environment (Corredor et al. 2005). The systematic recovery of *P. brasiliensis* from armadillo tissues has demonstrated the importance of this animal in PCM endemic areas, helping locate hot spots of the fungus occurrence in some environments, and suggested valuable insights about the pathogen evolutionary aspects (Bagagli et al. 2006, 2008).

The environment represented by the armadillo burrow and its surroundings, associated with biotic and abiotic features, may contribute to the development of the fungus saprobic stage in nature, as already demonstrated by Terçarioli et al. (2007).

For a long time, armadillos had been the unique animal species in which the fungus recovery from tissue cultures was possible, although many attempts have been made in other animal species from PCM endemic areas. Recently, other wild mammals such as guinea pig (*Cavia aperea*), porcupine (*Sphiggurus spinosus*), raccoon (*Procyon cancrivorus*) and grison (*Gallictis vittata*) have been recognized through molecular methods as new hosts for this infection (Richini-Pereira et al. 2008).

Learning about the natural reservoirs of this pathogenic fungus may contribute to map endemic areas and to better understand its eco-epidemiological features.

However, some questions still need to be elucidated, such as: Does the fungus need some special substrate or a specific period to grow? Which are the most appropriate

environmental conditions, climate and soil type? Which kind of host-parasite relationship does the fungus establish? Is there another infection route, besides the airborne route?

Medical mycology has extensively benefited from the great development of molecular biology in the latest years. Thus, the aim of this review is to present some recent advances in the understanding about the eco-epidemiology of *P. brasiliensis* and related species through molecular approaches.

Molecular Biology demonstrated that *P. brasiliensis* belongs to a peculiar Ascomycota Family

Morphological and molecular findings have suggested that the main pathogenic fungi causing systemic mycosis had been classified into Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales, which includes fungi of the genera *Histoplasma*, *Blastomyces*, *Emmonsia* and *Paracoccidioides* (Untereiner et al. 2004). The correct taxonomic position of these fungi has opened new possibilities for the study and understanding about their eco-epidemiological relationships with their respective hosts.

This fungal group (Onygenales, Onygenaceae *sensu lato*) presents several common mycological and ecological features such as dimorphism, arthroconidia and restricted geographic distribution. In addition, the natural affinity of some of its members, such as *Blastomyces dermatitidis* and *Histoplasma capsulatum*, for animal product derivatives or remnants like feces and uric acid is well documented (Baumgardner & Paretsky 1999, Restrepo et al. 2000, Untereiner et al. 2004).

Several evidence lines indicate that *P. brasiliensis* is phylogenetically closer to *Lacazia loboi* than to *B. dermatitidis*, *E. parva* and *H. capsulatum* (Bialek et al. 2000, Herr et al. 2001). It must be emphasized that *L. loboi* could not yet be cultured on standard media and is therefore considered an obligate parasite (Taborda et al. 1999, Herr et al. 2001). This suggests a possible tendency for reduction or extinction of the fungus saprobic form in nature. Lacaziosis, a mycosis caused by *L. loboi*, is acquired through traumatic route and has a typical chronic form, occurring in a restricted region of South America; it has also been observed in some wild aquatic mammals, specially dolphins (Herr et al. 2001).

It must be considered that this phylogenetic group (Onygenales) includes the species *Emmonsia parva* and *E. crescens* which cause adiaspiromycosis, a localized lung infection of cosmopolite distribution, both in wild animals and humans (Hubalék et al. 1998). Some aspects of their saprobic and parasitic stages have led *Emmonsia* species to be considered close relatives of dimorphic fungi (Emmons & Ashburn 1942, Sigler 1996, Peterson & Sigler

1998). Their occurrence has been related to the agroecosystem, and the highest abundance was observed in plant remnants and rodent burrows (Hubalék et al. 1998). The presence of this fungus has been reported in domestic and wild rodents (Zlatanov & Genov 1975, Hubalék et al. 1998), carnivores (Krivanec et al. 1980), and armadillos (Santos 1999).

Studies have also indicated that the different Onygenaceae (*sensu lato*) species may originated in the Americas around 3-20 million years ago (Fisher et al. 2000), and some of the most important ones, such as *Histoplasma* and *Paracoccidioides* species, had certainly evolved in South America, prior to the Panamanian Isthmus connection (Kasuga et al. 1999, 2003).

Molecular Phylogenetics indicates that *P. brasiliensis* is a species complex

Like all living organisms, *P. brasiliensis* has been shown to present variable characters (both morphologic and molecular), and the correlation of these different features with its clinical manifestations (in animals and humans) is the new challenge for several studies on PCM.

Isolates obtained from armadillos and humans presented a significant diversity in virulence (Calcagno et al. 1998, Sano et al. 1999, Hebelers-Barbosa et al. 2003a, 2003b). Hebelers-Barbosa et al. (2003a, 2003b) compared these isolates with those obtained from human patients, concerning virulence (in hamster model), through RAPD and ITS1-5.8S-ITS2 sequencing. They did not recognize any separation between armadillo and human isolates, concluding that the host, in this case, was not a differentiation factor among them. Therefore, human and animals can be infected with the same ecopathogenotypes (Bagagli et al. 1998, Franco et al. 2000, Restrepo et al. 2000), which makes this aspect useful for mapping *P. brasiliensis* genotypes that cause human infections in risk areas.

Recent phylogenetic studies have revealed cryptic speciation for *P. brasiliensis* through Multi-Locus Sequence Type (MLST). Differently from the morphological and biological recognition of species, which is rarely successfully applicable to separate fungus species (Taylor et al. 2000), MLST is more reliable as it deals with several nuclear genes and detects the species limits through genealogical concordance (the clade must be present in the majority of the single-locus genealogies) with high bootstrap and posterior probability values supporting the clades. Matute et al. (2006) analyzed eight regions of five nuclear coding genes: chitin synthase (promoter-exon1 and exon 2 to 4), β -glucan synthase (exon2 and exon 3), α -tubulin (exons 2-4), adenylylation factor (exons 2-3) and *PbGP43* (promoter-exon 1 and exon 2), and detected three distinct, previously unrecognized species: S1 (species 1

from Brazil, Argentina, Paraguay, Peru and Venezuela), PS2 (phylogenetic species 2 from Brazil and Venezuela) and PS3 (phylogenetic species from Colombia). They also observed that S1 and PS2 were recombining sexual species, whereas PS3 was shown to be clonal. It is interesting to note that S1 and PS2 are sympatric and reproductively isolated, although they have sexual reproductive attributes (Matute et al. 2006). These data were corroborated by microsatellite analysis of the same isolates used in the previous gene genealogy (Matute et al. 2006), and the divergence time between PS2 and PS3 was estimated as 8.04-8.37mya through *chitin synthase* gene analysis (Matute et al. 2007). Those authors suggested that the speciation of PS3, geographically restricted to Colombia, could be attributed to dispersal, leading to genetic isolation of PS3 from S1 (allopatric speciation). The other speciation event that originated PS2 is still poorly understood. S1 and PS2 may be the result of sympatric speciation, the initial step of which is the existence of polymorphism, much more abundant in recombining species such as PS2 and S1. Therefore, two forms of one single species can be adapted to different conditions in their niche, leading to negatively selected interbreeding due to the low adaptive value of the hybrids (Coyne & Orr 2004).

Recently, more *P. brasiliensis* isolates from the central region of Brazil were included in a new MLST analysis and showed a significant genetic divergence when compared with other S1, PS2 and PS3 isolates (Carrero et al. 2008, Teixeira 2008). This cluster of isolates was named Pb01-like, since the first studies that revealed such divergence were carried out with Pb01 isolate. Phylogenetic analyses with several nuclear encoding regions such as *GP43*, *CH4*, *Actin*, *ODC*, *URA3*, *CHS2*, *FKS1*, *HSP70*, *Hydrophobin*, *Kex*, *Catalase A*, *Catalase P*, *Formamidase*, and *Glyoxalase* showed a significant genetic distance between Pb01 and the remaining genetic groups (Carrero et al. 2008). Pb01-like isolates form a well supported clade for several nuclear coding genes, suggesting the existence of one more cryptic species of *P. brasiliensis* (Teixeira 2008, Carrero et al. 2008). The divergence time between Pb01-like and the remaining clades was estimated as 20mya, a long evolutionary time (Teixeira 2008). However, it is not clear yet which factors (geographic, biotic and abiotic) could have contributed to the genetic isolation of this group right in the central region of Brazil. This Pb01 isolate, which has been the subject of genome and transcriptome projects (Felipe et al. 2005), also substantially differs from the others as to the *hsp70* gene that encodes a conservative heat shock protein (Teixeira et al. 2005, Theodoro et al. 2008). Four large insertions: one of 4 nucleotides, one of 16, a third one of 23, and another one of 21 (the latter corresponds to a CT microsatellite), were observed in the *hsp70* gene of Pb01, relative to *P. brasiliensis* isolates from the other species (Teixeira et al. 2005, Theodoro et al. 2008).

An additional molecular marker, *prp8* gene intein, was used to recognize *P. brasiliensis* isolates of the different genetic groups (Theodoro et al. *in press*). Inteins are coding sequences that are transcribed and translated with flanking sequences (exeins). After translation, inteins are excised by an autocatalytic process; then, the host protein assumes its normal conformation and can develop its function (Cooper et al. 1995). These parasitic genes have been found in several vital proteins in all three life domains and are largely spread in fungi; among them, PRP8 intein is known to occur in important pathogens such as *Cryptococcus neoformans* (varieties *grubii* and *neoformans*), *C. gattii*, *Histoplasma capsulatum*, and *P. brasiliensis* (Butler & Poulter 2005, Butler et al. 2006). There are two intein types, mini-inteins and full-length inteins, both of which have a Splicing domain. Full-length inteins additionally present an Endonuclease domain that can play a homing function (Homing Endonuclease Gene or HEG), which makes intein a mobile genetic element, resulting in both the occupation of empty alleles and the duplication of parasitic genetic element (Liu 2000). These large inteins are expected to have more sequence variation in the Endonuclease domain than in the Splicing domain due to a more relaxed selection, especially if the HEG is no longer active (Gorgaten & Hilario 2006), which constitutes thus a promising source of phylogenetic information.

In this assay, PRP8 intein was sequenced for 22 *P. brasiliensis* isolates belonging to all four previously recognized species. The phylogenetic analysis clearly separated the isolates from the four species and revealed a significant difference between Pb01-like and the remaining species (Theodoro et al. *in press*). All evaluated *P. brasiliensis* isolates presented full-length intein in *prp8* gene. The HEG domain of PRP8 intein from *P. brasiliensis* appears to be inactive due to a substitution in the second aspartic acid residue, which is indispensable to its functionality. Although the polymorphism degree in PRP8 intein from *P. brasiliensis* was not as high as that in the commonly used nuclear-coding, this sequence contains sufficient phylogenetic information to separate cryptic species of *P. brasiliensis*, constituting therefore a reliable additional molecular marker for this pathogen.

Distinct cryptic species have been recognized through molecular techniques, which also facilitate the detection of other biological features that could be associated with the different genetic groups. Theodoro et al. (2008) detected some microscopic features of S1 and PS2 isolates that could be important candidates for a morphological differentiation between these two species. The isolates T10 and Bt84, representing PS2, seemed to have elongated yeast cells and presented slower M-L transition when compared with the other isolates. In addition, Terçarioli et al. (2007) studied fungal growth and conidia production on

Soil Extract Agar and observed that most isolates of S1 group produced large quantities of conidia; the same was not observed in PS2 group isolates. Both S1 and PS2 genetic groups are sympatric in the same endemic area; however, S1 is curiously much more frequent in both patients and armadillos, probably due to its higher conidium production (Bagagli et al. 2008). As a large number of isolates from different areas are molecularly characterized, the geographical distribution of such strains becomes clearer. Thus, S1 appears to be widely distributed, sympatrically occurring with PS2 in several endemic areas; PS3 group is centralized in Colombia; and Pb01-like, in the central region of Brazil. The geographic distribution of the different genetic groups of *P. brasiliensis* species complex is summarized in Figure 1, according to the currently available data.

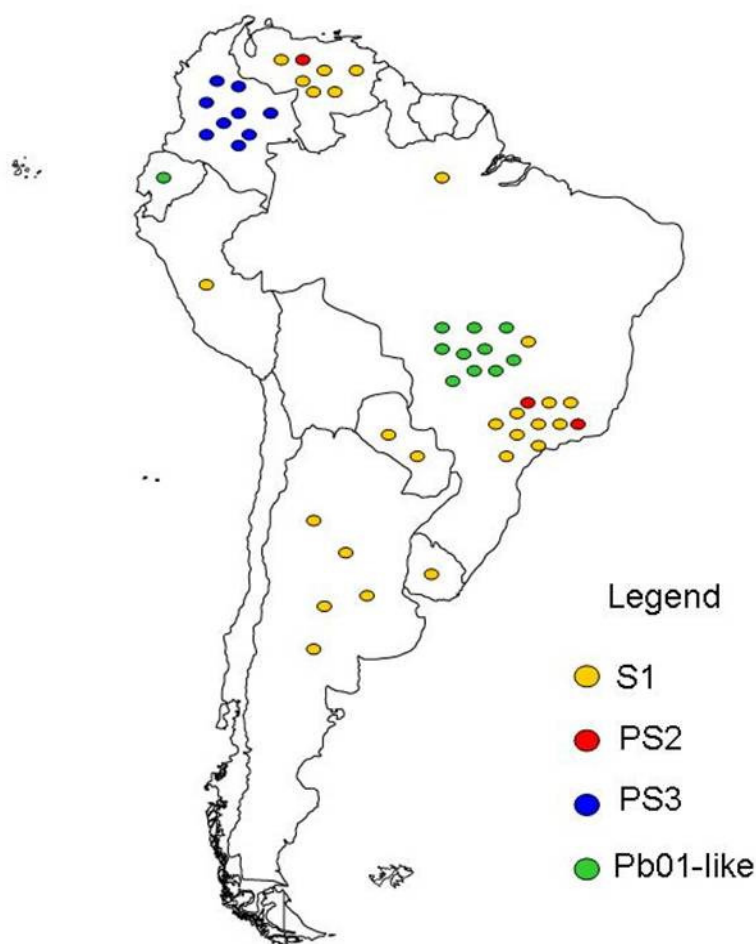


Figure 1 - Geographic distribution of the different genetic groups of *P. brasiliensis* species complex, according to the actual available data.

Since prophylactic or treatment measures must preferentially include all genotypes and/or phenotypes of *P. brasiliensis*, which causes PCM, the discovery of cryptic species

increased the importance of comparative studies aim at detecting some phenotypic differences among species. These studies will provide important evidence for correct diagnosis, specially regarding antigen variation, clinical presentation and distinct responses to antifungal drugs.

Pathogen detection – clinical and environmental sources

PCM diagnosis can be traditionally made through culture, microscopic detection of yeast cells in clinical specimens, histopathology, and serological tests, specially including gp43, a reference *P. brasiliensis* antigen (Lacaz 1994). Each of these procedures has advantages and disadvantages. Although a definitive diagnosis can be made through fungal culture, it must be considered that such procedure involves high contamination risk, long incubation period and low sensitivity due to the fungus scarcity in clinical samples (Salina et al. 1998, Sano et al. 2001). In histological sections, the etiological agent can be lost or confused with other dimorphic fungi (Bialek et al. 2000). Several serology techniques using different *P. brasiliensis* antigen types have been employed for both diagnosis and monitoring therapy of patients; however, some problems such as anergy, cross reactivity, and the technique specificity and sensitivity must be considered (Albuquerque et al. 2005).

Recent advances in molecular biology, mainly based on polymerase chain reaction (PCR), provided powerful tools for the detection, identification and typing of different pathogen groups. The main genomic regions employed for primer designs that have been applied for *P. brasiliensis*, both clinical and environmental samples, are listed in Table 1.

Table 1 - Primer used for detection of *P. brasiliensis*

primers	gene	amplicon size	primers sequences	evaluated samples	references	
Primer 1	β-actin	62bp	5'-TCGTTATCCTCATCGAA-3'	fungal culture serum (mice inoculated)	Goldani et al. (1995) Goldani & Sugar (1998)	
Primer 2			5'-AAGAGTCTTCCCTCGC-3'			
PC1	gp43	1030bp	5'-TCATCTCACGTCGCATCTCACATT-3'	clinical (sputum)	Gomes et al. (2000)	
PC5			5'-AGCGCCAGATGGTTTGCCCGCTAGGAACGAA-3'			
PC2			600bp			5'-ATAGAGGGAGAGCCATATGTACAAGGT-3'
PC6						5'-GGCTCCTCAAAGTCTGCCATGAGGAAG 3'
para I	gp43	355 bp	5'-AAC TAG AAT ATC TCA CTC CCA GTC C-3'	fungal culture tissue (mice inoculated and paraffin embedded)	Bialek et al. (2000) Ricci et al. (2007)	
para II			5'-TGTAGACGTTCTTGTATGTCTTGGG-3'			
para III			196bp			5'-GATCGCCATCCATACTCTCGCAATC-3'
para IV						5'-GGGCAGAGAAGCATCCGAAATTGCG-3'
LO	p27	536bp	5'-CAACTCTTGGCTTTGGTTGAAG-3'	tissue (armadillos, mice inoculated)	Diéz et al. (1999) Corredor et al. (1999)	
UP			5'-CTGTTGTTCCGTCCTTGCGC-3'			
MG2(1)F	genomic DNA	285 bp	5'-GGGATTCCCTAGGCAAACACTTGTGTGA- 3'	fungal culture clinical (sputum, CSF)	San-Blas et al. (2005)	
MG2(1)R			5'-GTGCAGTTATCCACAAGCCATATATTC-3'			
MG2(2)F			288 bp			5'-GGAGATGATCTGACGTTAGTACGTGATG- 3'
MG2(2)R						5'-ATGCTAATTTATGTCATTCCGCGTCTG-3'
OL3	rDNA	203bp	5'-CTCAGCGGGCACTT-3'	fungal culture	Motoyama et al. (2000)	
UNI-R			5'-GGTCCGTGTTTCAAGACG-3'			
PbITS1s*	rDNA	418 bp	5'-CCGCCGGGGACACCGTTG-3'	fungal culture	Imai et al. (2000)	
PbITS3a*			5'-AAGGGTGTGCGATCGAGAG-3'			
Pb-ITS-E*	rDNA	387 bp	5'-GAGCTTTGACGCTGAGACC-3'	fungal culture tissue (armadillos and road- killed wild animals)	Theodoro et al. (2005) Terçarioli et al. (2007) Richini-Pereira et al. (2008)	
Pb-ITS-R*			5'-AAGGGTGTGCGATCGAGAGAG-3'			

*The first PCR was carried out using panfungal primers such as ITS1, ITS4 and ITS5 (White et al. 1990).

Goldani et al. (1995) designed specific primers based on β -actin gene which amplified a 62bp-fragment not detected in other fungi such as *H. capsulatum*, *B. dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Sacharomyces cerevisiae*, and *Pneumocystis carinii*. Later, Goldani & Sugar (1998) used the same set of primers and obtained positivity in sera from five experimentally infected mice. Those authors suggested further evaluation of different PCM clinical forms to assess the true value of this diagnostic approach.

PCR assays targeting gp43 gene (PbGP43) have been widely used for the molecular detection of *P. brasiliensis* DNA in several samples. Cisalpino et al. (1996) cloned and characterized the entire coding region of gp43 gene, which is constituted of 2 exons interrupted by a 78bp-intron. After this study, several sets of primers were designed and employed for molecular diagnosis. Gomes et al. (2000) combined five primer pairs and suggested a PCR using PC2-PC6 primer pair for direct amplification from clinical material (sputum) or Nested-PCR following the PC1-PC5 primer set amplification. In an experimental model infected with the yeasts *H. capsulatum* and *P. brasiliensis*, Bialek et al. (2000) employed a Nested-PCR, also based on gp43 gene, with high sensitivity and specificity for the sets of primers para I/II and para III/IV. Using these same sets of primers, Ricci et al. (2007) demonstrated 30% positivity in pathogen detection in biopsies from PCM-patients. Those authors emphasized that this low positivity might be due to the procedures used for fixation, paraffin embedding and storage of the material, which favored DNA degradation, and the use of primers of gp43 regions that have been proved to be polymorphic. This fact may have interfered with the perfect annealing of the employed primers (San-Blas et al. 2002, Morais et al. 2000). Since gp43 showed to be one of the most polymorphic genes that clearly separates the four cryptic species of *P. brasiliensis* (Matute et al. 2006, Carrero et al. 2008, Teixeira 2008), PCR based on this genomic region is now indicated not only for the pathogen detection, but also for its genotyping in clinical samples. By using this strategy, Ricci et al. (2008) evaluated and distinguished between S1 and PS2 from paraffin-embedded tissue.

Besides gp43 glycoprotein, a 27-kDa antigen protein was cloned, sequenced and characterized by McEwen et al. (1996). The use of LO and UP primer combination allowed the detection of *P. brasiliensis* DNA in tissue samples of armadillos, inoculated mice and artificially contaminated soil (Corredor et al. 1999, Díez et al. 1999).

Internal transcribed spacer (ITS) regions, including the 5.8S ribosomal DNA of *P. brasiliensis*, are also employed for molecular detection and distinction from other fungal

species. It is known that ribosomal DNA (rDNA) genes are present in all microorganisms and have regions that accumulate mutations both at slow (28S, 5.8S and 18S) and high (ITS1 and ITS2) rates over time. The first regions provide molecular basis for establishing phylogenetic relationships among taxonomic levels above genus, and the second regions are useful for the separation between genera and species. Besides, this target provides higher sensitivity to PCR due to its several copies per genome (more than 100 copies) (White et al. 1990, Iwen et al. 2002). This region has been considered the main candidate for Barcoding system in fungal identification (Buckley 2008).

PCR of rDNA (5.8S-ITS) can be amplified by panfungal primers and the sensitivity and specificity of this reaction may be significantly improved by Nested-PCR with species-specific inner primers. Using this method, Imai et al. (2000) designed a set of primers, PbITS1s and PbITS3a, for Nested-PCR and identified 29 *P. brasiliensis* strains by means of a specific 418bp-fragment, which was not detected in *A. fumigatus*, *B. dermatididis*, *C. albicans*, *C. neoformans*, *H. capsulatum* and *P. marneffeii*. Motoyama et al. (2000) employed the OL3 and UNI-R primer combination for PCR and obtained a 203bp-fragment when *P. brasiliensis* (Pb01) DNA was used as the template. These primers were capable of discriminating between *P. brasiliensis* and *H. capsulatum*. Nested-PCR, also using species-specific inner primers (PbITSE and PbITSR) derived from ITS-5.8S rDNA, was developed for *P. brasiliensis* detection in soil (Theodoro et al. 2005, Terçarioli et al. 2007). This technique also proved to be useful for fungal detection in road-killed wild animals (Richini-Pereira et al. 2008).

Since *P. brasiliensis* actually consists of a species complex with distinct genetic groups, it must be emphasized that all molecular protocols should be re-evaluated both *in silico* and experimentally to detect any genotype that cause PCM in endemic areas.

References

- Albornoz MB 1971. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. *Sabouraudia* 9: 248-253.
- Albuquerque CF, Silva SHM, Camargo ZP 2005. Improvement of the specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol* 43(4): 1944-1946.
- Bagagli E, Sano A, Coelho KIR, Alquati S, Miyaji M, Camargo ZP, Gomes G, Franco M, Montenegro MR 1998. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus*

novemcinctus) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg* 58: 505-512.

Bagagli E, Franco M, Bosco SMG, Hebler-Barbosa F, Trinca LA, Montenegro MR 2003. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillo (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. *Med Mycol* 41: 217-223.

Bagagli E, Bosco SMG, Theodoro RC, Franco M 2006. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. *Infect Genet Evol* 6(5): 344-351.

Bagagli E, Theodoro RC, Bosco SMG, McEwen J 2008. *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. *Mycopathologia* 165: 197-207.

Baumgardner DJ, Paretsky DP 1999. The in vitro isolation of *Blastomyces dermatitidis* from a woodpile in north central Wisconsin, USA. *Med Mycol* 37(3): 163-168.

Bialek R, Ibricevic A, Aepinus C, Najvar Lk, Fothergill AW, Knobloch J, Graybill JR 2000. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue samples by a Nested PCR assay. *J Clin Microbiol* 38: 2940-2942.

Buckley M 2008. *The fungal kingdom diverse and essential roles in earth's ecosystem*. American Academy of Microbiology, Washington, 44p.

Bustamante B, McEwen JG, Tabares, AM, Arango M, Restrepo A 1985. Characteristics of the conidia produced by the mycelial form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia* 23: 407-414.

Butler ML, Poulter RTM 2005. The PRP8 inteins in *Cryptococcus* are a source of phylogenetic and epidemiological information. *Fungal Genet Biol* 42: 452-463.

Butler ML, Gray J, Goodwin TJD, Poulter RTM 2006. The distribution and evolutionary history of the PRP8 intein. *BMC Evol Biol* 6:1-26.

Calgagno AM, Nino-Veja G, San-Blas F, San-Blas G 1998. Geographic discrimination of *Paracoccidioides brasiliensis* strains by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol* 36: 1733-1736.

Carrero LL, Niño-Vega G, Teixeira MM, Carvalho MJA, Soares CMA, Pereira M, Jesuino RSA, McEween JG, Mendoza L, Taylor J W, Felipe MS, San-Blas G 2008. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. *Fung Genet Biol* 45(5): 605-612.

Cisalpino PS, Puccia R, Yamauchi LM, Cano MI, Silveira JF, Travassos LR 1996. Cloning, characterization, and epitope expression of the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Biol Chem* 271: 4553-4560.

Cooper AA, Stevens TH 1995. Protein splicing: self-splicing of genetically mobile elements at the protein level. *Trends Biochem Sci* 20: 351-356.

Corredor GG, Castaño JH, Peralta LA, Díez S, Arango M, McEwen J, Restrepo A 1999. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. *Rev Iberoam Micol* 16: 216-220.

Corredor GG, Peralta LA, Castaño JH, Zuluaga JS, Henao B, Arango M, Tabares AM, Matute DR, McEwen JG, Restrepo A 2005. The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. *Med Mycol* 43(3): 275-280.

Coyne JA, Orr HA 2004. *Speciation*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Díez S, Garcia EA, Pino PA, Botero S, Corredor GG, Peralta LA, Castaño JH, Restrepo A, McEwen JG 1999. PCR with *Paracoccidioides brasiliensis* specific primers: potential use in ecological studies. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 41(6): 351-358.

Emmons CW, Ashburn LL 1942. The isolation of *Haplosporangium parvum* n. sp. and *Coccidioides immitis* from wild rodents. *Public Health Rep* 57: 1715-1727.

Felipe MS, Torres FA, Maranhão AQ, Silva-Pereira I, Poças-Fonseca MJ, Campos EG, Moraes LM, Arraes FB, Carvalho MJ, Andrade RV, Nicola AM, Teixeira MM, Jesuino RS, Pereira M, Soares CM, Brígido MM 2005. Functional genome of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fems Immunol Med Microbiol* 45(3): 369-381.

Ferreira MS, Freitas LS, Lacaz CS, Del Negro GM, Aiello NT, Garcia NM, Assis CM, Salebian A, Heris-Vaccari EM 1990. Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain in dogfood probably contaminated with soil in Uberlândia, Brazil. *J Med Vet Mycol* 28: 253-256.

Fisher MC, Koenig GL, White TJ, Taylor JW 2000. A test for concordance between the multilocus genealogies of genes and microsatellites in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Mol Biol Evol* 17:1164-1174.

Franco M, Bagagli E, Scapolio S, Lacaz CS 2000. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. *Med Mycol* 38: 185-191.

Gezuele E 1989. Aislamiento de *Paracoccidioides sp.* de heces de pinguino de la Antártida. In: International Meeting on Paracoccidioidomycosis, 4, Caracas. (Abstract B2).

Goldani LZ, Maia AL, Sugar AM 1995. Cloning and nucleotide sequence of a specific DNA fragment from *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol* 33: 1652-1654.

Goldani LZ, Sugar AM 1998. Short report: use of the polymerase chain reaction to detect *Paracoccidioides brasiliensis* in murine paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg* 58: 152-153.

Gomes GM, Cisalpino PS, Taborda CP, Camargo ZP 2000. PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol* 38: 3478-3480.

Gonzales-Ochoa A 1956. Clasificación clínica de las micosis. *Rev Int Salubr Enferm Trop (Mex)* 16: 1.

Gorgaten JP, Hilario E 2006. Inteins, introns, and homing endonucleases: recent revelations about the life cycle of parasitic genetic elements. *BMC Evol Biol* 6:1-5.

Grose E, Tamsitt JR 1965. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia, S.A. *Sabouraudia* 4: 124-125.

Hebeler-Barbosa F, Montenegro MR, Bagagli E 2003a. Virulence profiles of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from armadillos (*Dasypus novemcinctus*). *Med Mycol* 41: 89-96.

Hebeler-Barbosa F, Morais FV, Montenegro MR, Kuramae EE, Montes B, McEwen JG, Puccia R, Bagagli E 2003b. Sequence comparison of the internal transcribed spacer regions and gp43 in *Paracoccidioides brasiliensis* for patients and armadillos *Dasypus novemcinctus*. *J Clin Microbiol* 41: 5735-5737.

Herr RA, Tarcha EJ, Taborda PR, Taylor JW, Ajello L, Mendoza L 2001. Phylogenetic analysis of *Lacazia loboi* places this previously uncharacterized pathogen within the dimorphic Onygenales. *J Clin Microbiol* 39 (1): 309-314.

Hubalék Z, Nesvadbova J, Halouzka J 1998. Emmonsiosis of rodents in an agroecosystem. *Med Mycol* 36(6): 387-390.

Imai T, Sano A, Mikami Y 2000. A new PCR primer for the identification of *Paracoccidioides brasiliensis* based on rRNA sequences coding the internal transcribed spacers (ITS) and 5.8 regions. *Med Mycol* 38: 323-326.

Iwen PC, Hinrichs SH, Rupp ME 2002. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Med Mycol* 40(1): 87-109.

Kasuga T, Taylor JW, White TJ 1999. Phylogenetics relationships of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* darling. *J Clin Microbiol* 37: 653-663.

Kasuga T, White TJ, Koenig G, McEwen J, Restrepo A, Castañeda E, Lacaz CS, Heins-Vaccari, EM, Freitas RS, Zancopé-Oliveira RM, Qin Z, Negroni R, Carter DA, Mikami Y, Tamura M, Taylor ML, Miller GF, Poonwan N, Taylor JW 2003. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Mol Ecol* 12: 3383-3401.

Krivanec K, Otcenasek M, Slais J 1980. Adiaspiromycosis in large free living carnivores. *Mycopathologia* 71: 125-126.

Lacaz CS 1994. Historical evolution or the knowledge on Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent, *Paracoccidioides brasiliensis* In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo A, Del Negro G eds. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton, FL: CRC Press, 410p.

- Liu XQ 2000. Protein-splicing intein: genetic mobility, origin, and evolution. *Ann Rev Genet* 34: 61-76.
- Matute DR, McEween JG, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, Rauscher JT, Restrepo A, Morais F, Nino-Veja G, Taylor JW 2006. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol* 23: 65-73.
- Matute DR, Torres IP, Salgado-Salazar C, Restrepo A, McEwen JG 2007. Background selection at the chitin synthase II (*chs2*) locus in *Paracoccidioides brasiliensis* species complex. *Fungal Genet Biol* 44(5): 357-367.
- McEwen JG, Ortiz BL, Garcia AM, Florez AM, Botero S, Restrepo A 1996. Molecular cloning, nucleotide sequencing, and characterization of a 27-kDa antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol* 20: 125-131.
- Morais FV, Barros TF, Fukada MK, Cisalpino PS, Puccia R 2000. Polymorphism in the gene coding for the immunodominant antigen gp43 from the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol* 38(11): 3960-3966.
- Motoyama AB, Venancio EJ, Brandão GO, Petrofeza-Silva S, Pereira IS, Soares CM, Felipe MS 2000. Molecular identification of *Paracoccidioides brasiliensis* by PCR amplification of ribosomal DNA. *J Clin Microbiol* 38(8): 3106-3109.
- Naiff RD, Ferreira LCP, Barret TV, Naiff MF, Arias JR 1986. Paracoccidioidomicose enzoótica em tatus (*Dasypus novemcinctus*) no Estado do Pará. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 28: 19-27.
- Negróni P 1966. El *Paracoccidioides brasiliensis* vive saprofiticamente en el suelo Argentino. *Prensa Med Argent* 53: 2381-2382.
- Peterson SW, Sigler L 1998. 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* 36: 2918-2925.
- Restrepo A 1985. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *J Med Vet Mycol* 23: 323-334.

Restrepo A 2000. Morphological aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* in lymph nodes: implications for the prolonged latency of paracoccidioidomycosis? *Med Mycol* 38: 317-322.

Ricci G, Silva ID, Sano A, Borra RC, Franco M 2007. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* by PCR in biopsies from patients with paracoccidioidomycosis: correlation with the histopathological pattern. *Pathologica* 99(2): 41-45.

Ricci G, Zelck U, Mota F, Lass-Flörl C, Franco MF, Bialek R 2008. Genotyping of *Paracoccidioides brasiliensis* directly from paraffin embedded tissue. *Med Mycol* 43(1): 31-34.

Richini-Pereira VB, Bosco SMG, Griese J, Theodoro RC, Macoris SAG, Silva RJ, Barrozo L, Tavares PMS, Zancopé-Oliveira RM 2008. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. *Med Mycol* 46(1): 35-40.

Salina MA, Shikanai-Yasuda MA, Mendes RP, Barraviera B, Mendes-Giannini MJ 1998. Detection of circulating *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in urine of paracoccidioidomycosis patients before and during treatment. *J Clin Microbiol* 36: 1723-1728.

San-Blas G, Nino-Veja G, Iturriaga T 2002. *Paracoccidioides brasiliensis* and Paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol* 40: 225-242.

Sano A, Tanaka R, Yokoyama K, Franco M, Bagagli E, Montenegro MR, Mikami Y, Miyaji M, Nishimura K 1999. Comparison between human and armadillo *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. *Mycopathologia* 143(3): 165-169.

Sano A, Yokoyama K, Tamura M, Mikami Y, Takahashi I, Fukushima K, Miyaji M, Nishimura K 2001. Detection of gp43 and ITS1-5.8S-ITS2 ribosomal RNA genes of *Paracoccidioides brasiliensis* in paraffin-embedded tissue. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 42: 23-27.

Santos VM 1999. Comportamento em cultura e diagnóstico morfológico da *Emmonsia crescens* em tatus. *Rev Soc Bras Med Trop* 32(3): 307.

Shome SK, Batista AC 1963. Occurrence of *Paracoccidioides brasiliensis* in the soil of Recife, Brazil. *Rev Fac Med Fed Ceará* 3: 90-94.

Sigler L 1996. *Ajellomyces crescens* sp. nv., taxonomy of *Emmonsia* spp., and relatedness with *Blastomyces dermatitidis* (teleomorph *Ajellomyces dermatitidis*) *J Med Vet Mycol* 34: 303-314.

Silva-Vergara ML, Martínez R, Chadu A, Madeira M, Freitas-Silva G, Leite Maffei CM 1998. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá, State of Minas Gerais, Brazil. *Med Mycol* 36: 37-42.

Silva-Vergara ML, Martínez R 1999. Role of the armadillo *Dasypus novemcinctus* in the epidemiology of Paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 144: 131-133.

Taborda PR, Taborda VA, McGinnis MR 1999. *Lacazia loboi* gen. nov., comb. nov., the etiologic agent of lobomycosis. *J Clin Microbiol* 37(6): 2031-2033.

Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, Fisher MC 2000. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genet Biol* 31(1): 21-32.

Teixeira MM, Carvalho MJA, Dantas AS, Felipe MSS 2005. The hsp70 gene presents sequence differences among isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 47(suppl14): 48.

Teixeira MM 2008. *Tipagem molecular e evolução do gênero Paracoccidioides*. Master Thesis, Universidade de Brasília, Faculdade de Medicina, 154pp.

Terçarioli GR, Bagagli E, Reis GM, Theodoro RC, Bosco SMG, Macoris SAG, Richini-Pereira VB 2007. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. *BMC Microbiol* 7(92): 1-8.

Theodoro RC, Candeias JMG, Araújo Jr JP, Bosco SMG, Macoris SAG, Padula Jr LO, Franco M, Bagagli E 2005. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. *Med Mycol* 43: 725-729.

Theodoro RC, Bosco SMG, Araújo Jr JP, Candeias JMG, Macoris SAG, Trinca LA, Franco M, Bagagli E 2008. Dimorphism, Thermal Tolerance, Virulence and Heat Shock Protein 70 Transcription in Different Isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathologia* 165(6): 355-365.

Theodoro RC, Bagagli E, Oliveira C. Phylogenetic analysis of PRP8 intein in *Paracoccidioides brasiliensis* species complex. *Fung Genet Biol* in press.

Wanke B, Londero AT 1994. Epidemiology and Paracoccidioidomycosis infection. In: Franco M, Lacaz CS, Del Negro G, eds. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton, FL: CRC Press, 109-120.

Untereiner WA, Scott JA, Naveau FA, Sigler L, Bachewish J, Angus A 2004. The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associate Onygenales. *Mycol* 96(4): 812-821.

White TJ, Brunis T, Lee S, Taylor J 1990. 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: Academic Press, Inc, 315-322.

Zlatonov Z, Genov T 1975. Isolation of *Emmonsia crescens* et Jellison 1960 from small mammals in Bulgaria. *Mycopathol* 56(1): 1-3.

Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals

Medical Mycology: 46(1): 35-40, 2008

Short title: *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed animals

Virgínia Bodelão Richini-Pereira^{*}, Sandra de Moraes Gimenes Bosco^{*}, Juliana Griese[†], Raquel Cordeiro Theodoro^{*}, Severino Assis da Graça Macoris¹, Reinaldo José da Silva[†], Lígia Barrozo[‡], Patrícia Morais e Silva Tavares[§], Rosely Maria Zancopé-Oliveira[§], Eduardo Bagagli^{*}

^{*} Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, [†] Departamento de Parasitologia, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, [‡] Departamento de Geografia, Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP and [§] Serviço de Micologia, Departamento de Micro-Imuno-Parasitologia, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Summary

Paracoccidioides brasiliensis infection have been little studied in wild and/or domestic animals, which may represent an important indicator of the presence of the pathogen in nature. Road-killed wild animals have been used for surveillance of vectors of zoonotic pathogens and may offer new opportunities for eco-epidemiological studies of paracoccidioidomycosis (PCM). The presence of *P. brasiliensis* infection was evaluated by Nested-PCR in tissue samples collected from 19 road-killed animals; 3 *Cavia aperea* (guinea pig), 5 *Cerdocyon thous* (crab-eating-fox), 1 *Dasyopus novemcinctus* (nine-banded armadillo), 1 *Dasyopus septemcinctus* (seven-banded armadillo), 2 *Didelphis albiventris* (white-eared opossum), 1 *Eira barbara* (tayra), 2 *Gallictis vittata* (grison), 2 *Procyon cancrivorus* (raccoon) and 2 *Sphiggurus spinosus* (porcupine). Specific *P. brasiliensis* amplicons were detected in (a) several organs of the two armadillos and one guinea pig, (b) the lung and liver of the porcupine, and (c) the lungs of raccoons and grisons. *P. brasiliensis* infection in wild animals from endemic area might be more common than initially postulated. Molecular techniques can be used for detecting new hosts and mapping “hot spot” areas of PCM.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*, Paracoccidioidomycosis, road-killed animals, molecular epidemiology

Introduction

Paracoccidioides brasiliensis is the etiological agent of Paracoccidioidomycosis (PCM), the most important and prevalent systemic mycosis in Latin America, mainly in Brazil, Colombia and Venezuela [1]. The fungus is thermo-dimorphic, growing as multi-budding yeast cells in the hosts or when cultured at 35-37°C and as a mold under saprobic condition of 28-30°C. It is in the latter phase that the fungus produces its infective propagula [2]. Since the recovery of *P. brasiliensis* from environmental sources is a rare event and since the disease has a prolonged latency period (with no outbreaks), its exact niche in nature remains a mystery. The observation that the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, an primitive mammal that evolved in the same geographic area as *P. brasiliensis*, is naturally infected by the fungus opened up new research opportunities. The animal has been used as both a sentinel for locating risk areas of the disease and for supplying insights about the pathogen's evolution [3]. Could the pathogen's association with animal hosts be a primary strategy for the fungus to survive in nature or is the infection just a blind alley? These questions point to the necessity of looking for the fungus in several wild mammals. Wild animals, by living outdoors all the time and being constantly exposed to airborne pathogens, have been considered better environmental indicators of human risk than companion animals [4]. Since preservation of wildlife is a real concern, we are proposing herein to use highly sensitive molecular techniques with road-killed wild animals to detect the fungus. This approach, which has already been applied in parasitological studies, could also be useful to elucidate PCM eco-epidemiology. The use of sensitive and specific molecular tools would overcome the difficulties encountered in detecting the pathogen in host tissue through either culture or histopathological analysis. PCR reaction with panfungal primers from rDNA genomic region can be considered more sensitive because they usually target a multicopy gene [5]. The combined use of specific primers derived from this genomic region with Nested-PCR may increase the specificity of molecular detection of *P. brasiliensis* [6]. The present work aimed to describe possible new hosts of PCM by using molecular tools to detect *P. brasiliensis* in tissues of road-killed animals that had lived in endemic areas of the disease.

Materials and Methods

Study Area and Animals:

The road-killed animals were collected in the Botucatu endemic PCM area by the Departamento de Estradas de Rodagem do Estado de São Paulo (DER) team that routinely patrol the roads. Only animals that appeared to have been recently killed (1-7 hours) and had not completely disfigured were placed into plastic bags, labelled as to dates, hour and geographic location and sent to the laboratory where they were necropsied. The animal organs were collected and processed for DNA extraction at necropsy or preserved at -80°C. The taxonomical data of the animals, including their home ranges, sex and the tissue analysed are summarised on Table 1.

The geographic positions of the road-killed animals, established through GPS (Global Positioning System), were plotted on a digital map using a geographic database by the IDRISI32[®]GIS and Surfer (Figure 1).

This study was developed after receiving authorization from the Brazilian Protection Agency (IBAMA) and Animal Ethics Committees (CEEA) at the Institute of Biosciences/UNESP-Botucatu, SP, Brazil.

Molecular analyses:

The DNA extraction was performed by grinding the liquid-nitrogen frozen tissue sample with mortar and pestle as proposed by Corredor et al. [8]. The DNA pellet was suspended in 100µL of ultra-pure water and the quality was checked by 1% agarose gel electrophoresis using Low Mass DNA Ladder (Invitrogen) as molecular marker. The molecular detection was carried out by Nested-PCR reactions, using as outer primers the panfungal primers ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') and ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAACG-3'), annealing temperature of 60°C [5] and inner primers PbITSE (5'-GAGCTTTGACGTCTGAGACC-3') and PbITSR (5'-AAGGGTGTCGATCGAGAGAG-3'), annealing temperature of 62°C [6], and matching from 162 to 548 nucleotides at GenBank (AY374339) access. The specificity of the Nested-PCR was evaluated in a blind test against a panel of 16 DNA samples from *Emmonsia parva*, *Histoplasma capsulatum*, *P. brasiliensis*, *Renispora* spp. and *Sporothrix schenckii*, provided by Setor de Imunodiagnóstico do Serviço de Micologia (IPEC/FIOCRUZ). The samples code numbers and identities were revealed only after amplifications. The Nested PCR amplicons were purified by the commercial kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (Amersham

Biosciences) and the sequencing reactions were carried out in both strands in a MegaBace™ 1000 (Amersham Biosciences). The sequences were compared to the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Table 1: Taxonomical data of the road-killed animals, including the species home range, sex, evaluated tissues and nested-PCR results.

Order	Family	Species	Home range* (ha)	Animal	Sex	Tissue/Nestec-PCR (+ or -)			
Carnivora	Canidae	<i>Cerdocyon thous</i>	0.1	Ct1	Male	lu (-), s (-), l (-), k (-), h (-), mln (-)			
				Ct2	Male	lu (-), s (-), l (-), k (-), h (-), mln (-)			
				Ct3	Na	lu (-), s (-), l (-), k (-), h (-), mln (-)			
				Ct4	Male	lu (-), s (-), l (-), k (-), h (-)			
				Ct5	Male	lu (-), s (-), h (-), mln (-)			
	Mustelidae	<i>Eira barbara</i>	2.44	Eb1	Male	lu (-), s (-), l (-), h (-), mln (-)			
				Gv1	Male	lu (+) , s (-), l (-), k (-), h (-)			
					Gv2	Male	lu (-), s (-), l (-), h (-)		
				Procyonidae	<i>Procyon cancrivorus</i>	NA	Pc1	Male	lu (+) , l (-), k (-), h (-), mln (-)
							Pc2	Female	lu (-), s (-), l (-), k (-), h (-), mln (-)
Didelphimorphia	Didelphidae	<i>Didelphis albiventris</i>	0.57	Da1	Female	lu (-), s (-), l (-), mln (-)			
				Da2	Male	lu (-), s (-), l (-), mln (-)			
				Rodentia	Cavidae	<i>Cavia aperea</i>	0.1	Ca1	Female
Ca2	Male	lu (-), s (-), h (-), mln (-)							
Ca3	Female	lu (-), s (-), l (-), k (-), h (-), mln (-)							
Xenarthra	Erethizontidae	<i>Sphiggurus spinosus</i>	15-20	Ss1	Female	lu (-), s (-), l (+) , k (-), h (-)			
				Ss2	Male	lu (+) , s (-), k (-)			
				Dn1	Female	lu (+), s (+), l (+), k (+), h (-), mln (+)			
					Ds1	Male	lu (+), s (+), l (+), k (-), h (-), mln (+)		
				Dasyrodentia	Dasyrodentidae	<i>Dasypus novemcinctus</i>	3.4-15		
Dasyrodentidae	<i>Dasypus septemcinctus</i>	Na							

lu, lung; s, spleen; l, liver; k, kidney; h, heart; mln, mesenteric lymph node; ag, adrenal gland.

*According to Eisenberg & Redford 1999 [7].

NA, not available.

Results

Area of discovery of animals

Fig. 1 illustrates the geographic location of all the road-killed animals evaluated.

Fig. 2 illustrates the road-killed animals evaluated (*figura não consta no artigo publicado).

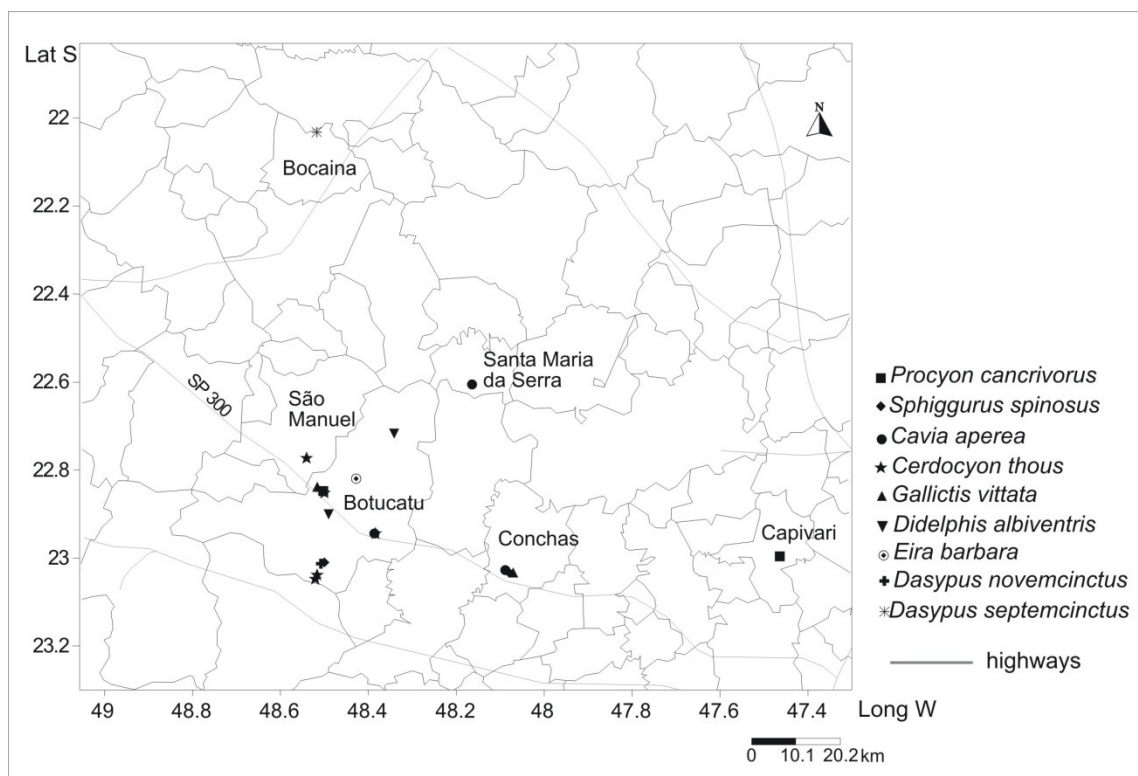


Fig. 1- Geographic location of the road-killed animals employed for *Paracoccidioides brasiliensis* molecular detection.





Fig. 2: Road-killed wild animals, A) *C. thous* - Ct1, B) *C. thous* - Ct2, C) *C. thous* - Ct3, D) *C. thous* - Ct4, E) *C. thous* - Ct5, F) *E. barbara* - Eb1, G) *G. vittata* - Gv1, H) *G. vittata* - Gv2, I) *P. cancrivorus* - Pc1, J) *P. cancrivorus* - Pc2, K) *C. aperea* - Ca1, L) *C. aperea* - Ca3, M) *S. spinosus* - Ss1, N) *S. spinosus* - Ss2, O) *D. novemcinctus* - Dn1 and P) *D. septemcinctus* - Ds1.

DNA Amplification

The specificity of the PbITSE/PbITSR primers were successfully tested against a panel of DNA samples from several fungi such as *S. schenckii*, *Renispora* spp., *H. capsulatum*, *E. parva* as well as from *P. brasiliensis*. Overall, the panfungal PCR with ITS4/ITS5 primers amplified a 650bp DNA fragment in all fungi tested, but the PbITSE/PbITSR primers in the PCR showed an amplicon of 387bp only in DNA samples obtained from *P. brasiliensis* (Fig. 3). With respect to animal samples, predictive specific amplicons of *P. brasiliensis* were detected by Nested-PCR reactions in tissue fragments from: (i) several organs of the two armadillo species (Dn1 and Ds1) and a guinea pig (animal Ca1), (ii) porcupine liver (Ss1) and (iii) the lungs of raccoon (Pc1), grison (Gv1) and porcupine (Ss2) (Table 1). The molecular identities of the amplicons from the guinea pig (Ca1), raccoon (Pc1) and porcupine (Ss1) were confirmed by direct double-strand sequencing. The latter studies produced unambiguous fragments, varying from 332 to 340 bp, which showed 100% similarity with *P. brasiliensis* DNA sequences deposited at Gen Bank, with included 44 different accession numbers, obtained both from armadillo (AY374339) and human isolates (AF416745, ATCC 32069).

Fig. 4 illustrates the Nested-PCR sensitivity with ITS4/ITS5 as outer primers and PbITSE/PbITSR as inner primers (*figura não consta no artigo publicado).

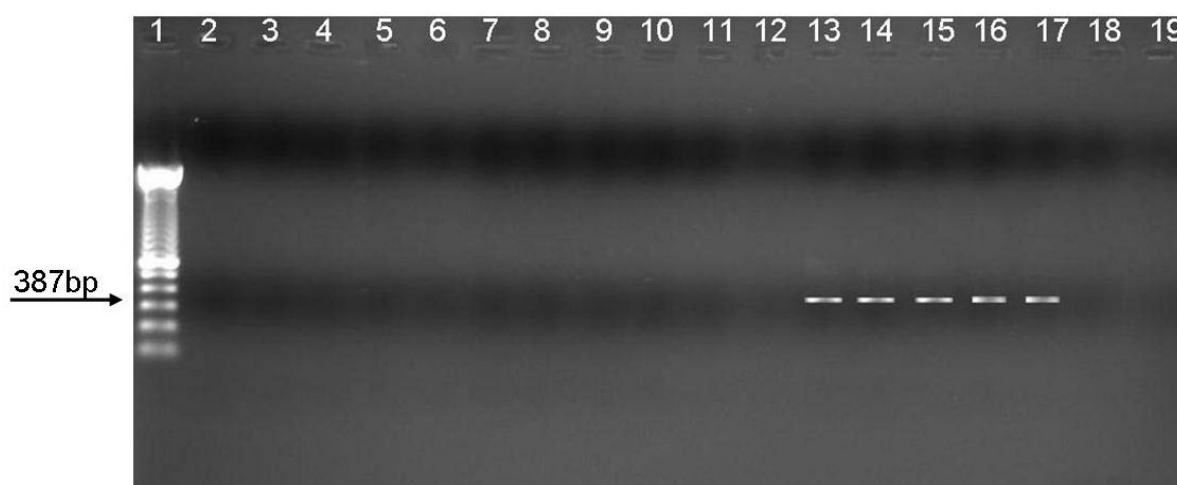


Fig. 3 - Specificity testing of the Nested-PCR using DNA from several fungi: Lane 1-19: (1) 100bp DNA ladder (Invitrogen), (2-6) *S. schenckii*, (7-11) *H. capsulatum*, (12) *Renispora* spp. (13-17) *P. brasiliensis*, (18) *Emmonsia* spp. and (19) negative control.

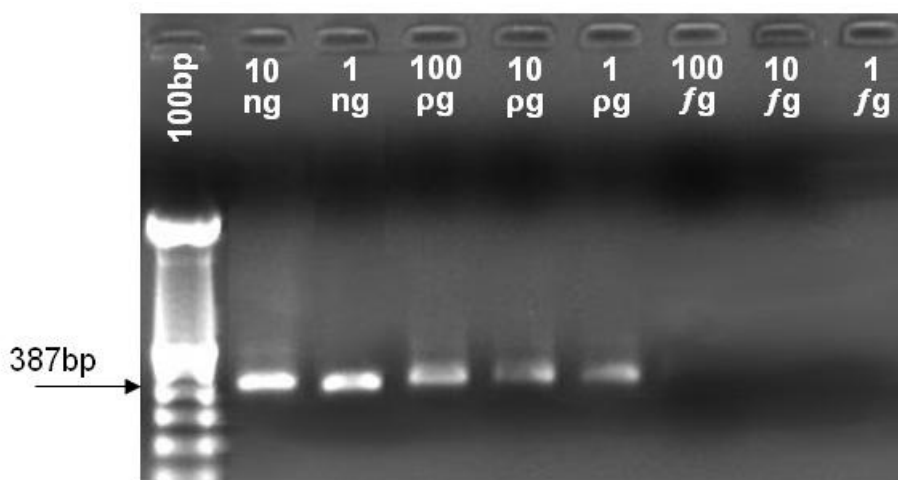


Fig. 4 - Nested-PCR sensitivity in decreasing concentrations of *P. brasiliensis* DNA.

Discussion

PCM in both in domestic and wild animals has been reported in the literature based on the use of intradermal reactions with paracoccidioidin. It was shown that some of these animals showed high rates of infection, especially those whose habitats are related to soil [9, 10]. Serological surveys have also been employed to determine PCM in dogs [11], equines [2], bovines [13], free-living monkeys [14] and armadillos [15], thus showing that a wide variety of mammals can be infected by *P. brasiliensis*.

The systematic isolation of *P. brasiliensis* in armadillo tissues demonstrated the importance of this animal as a natural of the etiologic agent in endemic areas. It has been suggested that armadillos were the only animals that could acquire PCR [16,17]. However, the natural occurrence of PCM was confirmed in two dogs with generalized lymphadenitis by the recovery of *P. brasiliensis* in culture, as well as by histopathological, immunohistochemical and molecular detection of the gp43 gene [18,19].

In order to increase our knowledge on the ecology of *P. brasiliensis* and the epidemiology of PCM, we developed a new approach that combined molecular tools to identify *P. brasiliensis* in other hosts by demonstrating fungal DNA in animal tissue.

In the present study, panfungal primers ITS4/ITS5 amplified an amplicon of around 650 bp in lungs of *C. aperea* (guinea pig), *D. albiventris* (white-eared opossum), *P. cancrivorus* (raccoon) and *S. spinosus* (porcupine), thus demonstrating previous contact and the existence of fungi, but not necessarily *P. brasiliensis*. This data corroborates that the

airborne route is the major means of transmission of several pathogenic and non-pathogenic fungi in animals [20].

A serious limitation for any molecular protocol is the occurrence of nonspecific annealing when a common DNA sequence is present. Since it has been estimated that there are approximately 1.5 million fungal species [21], it is possible that DNA sequences of phylogenetically closely related fungi, mainly environmental ones, have not yet been deposited in the Gen Bank. *P. brasiliensis* has been recently classified as a member of Ajellomycetaceae, a new family of saprobic and pathogenic vertebrate-associated fungi, which includes *Histoplasma*, *Blastomyces*, *Emmonsia* and *Paracoccidioides* [22]. Up to now, the use of Nested-PCR with PbitSE/PbitSR primers has proven to be specific for the detection of only *P. brasiliensis* since any amplification occurs for the several other related genera.

Concerning the members of the Carnivora order evaluated, which are biologically related to the domestic dog, *P. brasiliensis* DNA was detected only in the lung of *P. cancrivorus* (raccoon) and *G. vittata* (grison), while all organs of *C. thous* (crab-eating-fox) and *E. barbara* (tayra) remained negative. It is known that high temperatures are limiting factors for the growth of major fungal species and that domestic dogs have a body temperature around 37.5-38.5°C [23]. This might be a factor contributing to the limited number of cases involving *P. brasiliensis* in Carnivora members. It appears that the members of the Didelphidae Family, are also not frequently infected by fungi as already reported by Silva-Vergara *et al.*[24].

P. brasiliensis infections does not necessarily indicate systemic PCM. The histopathological studies of armadillo tissues showed that if the disease occurred, it was a mild form [25]. The molecular detection of *P. brasiliensis* DNA in organs of *C. aperea* (guinea pig) demonstrated that the fungus indeed disseminated from the lung. We also detected the pathogen in the liver and lung of *S. spinosus* (porcupine). The importance of rodents as a reservoir of other fungal pathogens such as in *Coccidioides immitis* [26], *Emmonsia* spp. [27] and *Penicillium marneffeii* [28,29] has previously been demonstrated. As expected, the two armadillos evaluated in this investigation provided positive amplification in several organs.

The molecular detection of *P. brasiliensis* in tissues from organs such as the adrenal gland, liver, spleen, kidney and mesenteric lymph node also might exclude the possibility of the presence of non-pathogenic fungi because the latter do not have the capacity to disseminate to extra-pulmonary organs. Since in all evaluated animals the integrity of the organs was preserved we believe that the risk of cross-contamination in this investigation was

low. While problems with PCR sensitivity and inhibition can not be excluded completely, we have observed a DNA detection limit of 1.0 µg. In addition, the specific amplification of the target sequence of *P. brasiliensis* was not inhibited even when using only one µg of fungal DNA mixed with a relatively large amount of animal DNA (around 100-200 µg).

The detection of *P. brasiliensis* in different organs from different species show that the fungus could have different dissemination profiles. This in turn may indicate different interactions of *P. brasiliensis* with several host species studied and possibly different genotypes of this etiologic agent. It is known that *P. brasiliensis* presents at least three cryptic species [30]. This divergence must be studied in order to evaluate how some genetic differences may indicate distinct host-pathogen interactions as well as distinct ecological niches.

Without the necessity of applying a laborious sampling effort, it was possible to evaluate nine different wild species, belonging to seven different taxonomic families. In fact, the numbers and diversity of road-killed animals are considerably higher and, in general, they are killed in their own habitat, because the roads invade their natural habitats [31]. In this manner, the geographic coordinates of the places where the infected animals might be are well-integrated in databases that use the Geographical Information Systems (GIS), thus contributing to a better understanding of pathogen distribution and the associated biotic and abiotic factors. In summary, our results show that road-killed animals can be important in the eco-epidemiological study of *P. brasiliensis*.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-nº 05/56771-9 and 06/03597-4) and Fundação para o Desenvolvimento da Unesp (FUNDUNESP-nº 0015006). The authors thank the Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) for permission to collect road-killed animals.

We also thank the Departamento de Estradas de Rodagem do Estado de São Paulo (DER) for information about the road-killed animals and Helio Rubens Jacinto Pereira Júnior for animal identification.

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. 109-120.
- 2 Restrepo A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Sabouraudia* 1985, **23**: 323-334.
- 3 Bagagli E, Bosco SMG, Theodoro RC, Franco M. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. *Infect Gen Evol* 2006, **6 (5)**: 344-351.
- 4 Duncan C, Schwantje H, Stephen C, Campbell J, Bartlett K. *Cryptococcus gattii* in Wildlife of Vancouver Island, British Columbia, Canada. *J Wildl Dis* 2006, **42(1)**: 175-176.
- 5 White TJ, Bruns 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: Academic Press. 1990. 315-322.
- 6 Theodoro RC, Candeias JMG, Araújo Jr JP, et al. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. *Med Mycol* 2005, **43(8)**: 725-729.
- 7 Eisenberg JF, Redford K. eds. Mammals of The Neotropics. The University of Chicago Press, Chicago and London, 1999.
- 8 Corredor GG, Castaño JH, Peralta LA, et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in an endemic area for Paracoccidioidomycosis in Colombia. *Rev Iberoam Micol* 1999, **16**: 216-220.
- 9 Costa EO, Diniz LSM, 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.
- 10 Costa EO, Diniz LSM, Fava-Netto C, Arruda C, Dagli MLZ. Delayed hypersensitivity test with paracoccidioidin in captive Latin American wild mammals. *J Med Vet Mycol* 1995, **33**: 39-42.

- 11 Ono MA, Bracarense APFRL, Morais HAS, Trapp SM, Belitardo DR. Canine Paracoccidioidomycosis: a seroepidemiologic study. *Med Mycol* 2001, **39**: 277-282.
- 12 Corte AC, Itano EM, Ono MA, Camargo ZP. Paracoccidioidomycosis-infection in horses in the north Paraná state, Brazil [abstract]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2005, **Suppl.14**: 62.
- 13 Silveira, LH, Paes, RCS, Medeiros EV, et al. Paracoccidioidomycosis-infection in bovine from microregions of Mato Grosso do Sul – Brazil [abstract]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2005, **Suppl 14**: 32.
- 14 Corte AC, Itano EN, Ono MA, et al. Paracoccidioidomycosis-infection in free-living monkeys of northwest Paraná state, Brazil [abstract]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2005, **Suppl 14**: 62.
- 15 Fernandes GR, Deps P, Tomimori-Yamashita J, Camargo ZP. IgM and IgG antibody response to *Paracoccidioides brasiliensis* in naturally infected wild armadillos (*Dasypus novemcinctus*). *Med Mycol* 2004, **42(4)**: 363-368.
- 16 Silva-Vergara ML, Martínez R, Camargo ZP. 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.
- 17 Corredor GG, Peralta LA, Castano JH, 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)**: 275-280.
- 18 Ricci G, Mota FT, Wakamatsu A. Canine paracoccidioidomycosis. *Med Mycol* 2004, **42**: 379-383.
- 19 Farias MR, Werner J, Muro M, et al. Canine paracoccidioidomycosis: case report of generalized lymphadenitis [abstract]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2005, **Suppl 14**: 64.
- 20 Montenegro MR, Franco M. Pathology. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, eds. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton: CRS Press, 1994: 131-150.
- 21 Hawksworth DL. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol Res* 2001, **105**: 1422-1432.

- 22 Untereiner WA, Scott JA, Naveau FA, et al. The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales. *Mycol* 2004, **96(4)**: 812-821.
- 23 Fagundes RQ. Pesquisa da PCM em cães (*Canis familiaris*) na região endêmica de Botucatu, São Paulo. PhD thesis, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia; 2002.
- 24 Silva-Vergara ML, Martinez R, Malta MHB, Ramirez LE, Franco FA. The marsupial *Didelphis albiventris* is an improbable host of *Paracoccidioides brasiliensis* in an endemic area of Paracoccidioidomycosis in Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001, **96(6)**: 771-772.
- 25 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.
- 26 Emmons CW. Isolation of *Coccidioides* from soil and rodents. *Public Health Rep* 1942, **57**: 109-111.
- 27 Hubalék Z. Emmonsiosis of wild rodents and insectivores in Czechland. *J Wildl Dis* 1999, **35 (2)**: 243-249.
- 28 Ajello L, Padhye AA, Sukroongreung S, Nilakul CH, Tantimavanic S. Occurrence of *Penicillium marneffei* infections among wild bamboo rats in Thailand. *Mycopathologia* 1995, **131**: 1-8.
- 29 Chariyalertsak S, Vanittanakom P, Nelson KE, Sirisanthana T, Vanittanakom N. *Rhizomys sumatrensis* and *Cannomys badius*, new natural animal hosts of *Penicillium marneffei*. *J Med Vet Mycol* 1996, **34**: 105-110.
- 30 Matute DR, McEwen JG, Puccia R, et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol* 2006, **23 (1)**: 65-73.
- 31 Vieira EM. Highway mortality of mammals in Central Brazil. *Cienc Cult* 1996, **48(4)**: 270-271.

Detecção de *Paracoccidioides brasiliensis* em tatus (*Dasyus novemcinctus*) provenientes de uma reserva de Cerrado do Instituto Lauro de Souza Lima (Bauru-SP)

Boletim Epidemiológico Paulista (BEPA): 5(56): 4-8, 2008

Virgínia Bodelão Richini-Pereira¹, Sandra de Moraes Gimenes Bosco¹, Severino Assis da Graça Macoris¹, Raquel Cordeiro Theodoro¹, Silvia Cristina Barbosa Pedrini², Patrícia Sammarco Rosa², Eduardo Bagagli¹

¹ UNESP/Botucatu, SP, ² Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP

Apoio financeiro: FAPESP (05/56771-9 e 06/03597-4)

Resumo

A constatação de que o tatu *Dasyus novemcinctus* se infecta naturalmente pelo *Paracoccidioides brasiliensis* abriu perspectivas para estudos eco-epidemiológicos e de evolução deste patógeno. No presente estudo foi investigada a ocorrência do *P. brasiliensis* em tatus capturados em uma reserva de Cerrado em Bauru/SP. Foram avaliados 4 animais (C1-C4), dos quais após a eutanásia foi feita a coleta de pulmão, fígado, baço e linfonodos mesentéricos para avaliação micológica e molecular. Fragmentos de DNA ribossomal foram amplificados por PCR e Nested-PCR utilizando *primers* específicos para *P. brasiliensis*. O isolamento fúngico foi positivo em 3 animais, nas amostras de linfonodo (C1), fígado (C4) e baço (C2 e C4). *Amplicons* de 387pb foram identificados em amostras de tecido de 3 exemplares. A detecção de animais infectados na reserva de Cerrado aponta para a importância de utilizar esses animais como sinalizadores da presença do patógeno no ambiente, sendo esta uma avaliação inédita no município de Bauru/SP.

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*, Paracoccidioidomicose, *Dasyus novemcinctus*.

Abstract

The finding of naturally infected *Dasypus novemcinctus* armadillos by the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* opened new perspectives for eco-epidemiological and evolution studies with this pathogen. In the present study the occurrence of *P. brasiliensis* in armadillos captured in the Savanna Reservation area of Bauru/SP was evaluated. Four animals were captured (C1-C4) and after euthanasia lung, liver, spleen and mesenteric lymph nodes were collected for mycological and molecular evaluation. Ribosomal DNA fragments were amplified by PCR and Nested-PCR using *P. brasiliensis* specific primers. The fungus was isolated in three animals from lymph node (C1), liver (C4) and spleen samples (C2 and C4). In 3 tissue samples 387bp amplicons were identified. The detection of infected animals in the Savanna Reservation area reinforce the use of these animals as sentinels for the presence of the pathogen in the environment. This is the first description of such evaluation in Bauru municipality.

Key words: *Paracoccidioides brasiliensis*, Paracoccidioidomycosis, *Dasypus novemcinctus*.

Introdução

Fungos patogênicos são aqueles capazes de invadir tecidos sadios, se multiplicar e provocar dano tecidual no hospedeiro imunocompetente. Os principais fungos patogênicos causadores de micoses sistêmicas são termodimórficos e apresentam: distribuição geográfica restrita limitada às chamadas áreas endêmicas; ocorrência saprofítica em micro-nichos com produção de propágulos infectantes, que penetram no hospedeiro principalmente pelo trato respiratório¹. Dentre eles destacam-se: *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Emmonsia* spp. e *Paracoccidioides brasiliensis*. Tratam-se de fungos ascomicetos, pertencentes à Ordem Onygenales e Família Onygenaceae.

Estudos recentes de filogenia molecular em diferentes espécies da Família Onygenaceae *sensu lato* indicam que o *B. dermatitidis* (*A. dermatitidis*), juntamente com o *H. capsulatum* (*Ajellomyces capsulatus*), *E. crescens* (*Ajellomyces crescens*) e o *P. brasiliensis* (fase sexuada ainda desconhecida) representam um clado natural, reconhecido com uma nova família, denominada Ajellomycetaceae². Além de compartilhar características micológicas e moleculares semelhantes, os membros desta família apresentam uma ecologia normalmente associada a uma fase saprofítica ambiental em solos e fase parasitária associada a hospedeiros vertebrados².

O conhecimento da biologia do *P. brasiliensis* vem aumentando nos últimos anos, principalmente devido à introdução de métodos moleculares para seu estudo. Este fungo é o causador da Paracoccidioidomicose (PCM), micose sistêmica de natureza granulomatosa com frequente evolução crônica, envolvendo principalmente a pele, linfonodos, pulmões e membranas nasal, oral e gastrointestinal³. A PCM é observada predominantemente em trabalhadores rurais ou pessoas com frequentes contatos com alguns materiais ambientais (solo). Alguns fatores como alcoolismo, tabagismos e certo grau de desnutrição estão associados a uma maior ocorrência da doença⁴. A área de maior prevalência é a América do Sul, sendo Brasil, Venezuela e Colômbia os países com maior número de pacientes⁵. Como a PCM não é uma doença de notificação compulsória, sua real prevalência e incidência não podem ser calculadas. Entretanto, no Brasil, centro da área endêmica, estimativas indicam uma taxa de incidência anual de 1 a 3 por 100.000 habitantes e uma taxa média de mortalidade de 0,14 por 100.000 habitantes, sendo considerada a oitava causa de morte relacionada a doença de origem infecciosa⁶.

Apesar dos esforços contínuos de diversos grupos de pesquisa principalmente do Brasil, Colômbia, Venezuela e Argentina, a fase ambiental produtora de propágulos infectantes, seu nicho ecológico e outros aspectos fundamentais da biologia deste patógeno ainda representam um enigma. Sabe-se, no entanto, que o tatu de nove-bandas (*Dasypus novemcinctus*), um mamífero que evoluiu na mesma área geográfica que o fungo *P. brasiliensis*, se infecta naturalmente pelo fungo, permitindo novas perspectivas para estudos eco-epidemiológicos e também para fornecer dados sobre a evolução do patógeno⁷. O frequente achado que o tatu apresenta-se infectado pelo *P. brasiliensis* nos leva ao seguinte questionamento: a associação deste patógeno com o hospedeiro animal poderia ser uma estratégia para o fungo sobreviver na natureza ou a infecção ocorre ao acaso? Este fato aponta para a necessidade de um melhor entendimento da relação parasita-hospedeiro estabelecida entre o tatu e o *P. brasiliensis*, bem como procurar o fungo em outros hospedeiros animais além dos tatus.

O conhecimento de reservatórios naturais de fungos patogênicos poderá contribuir para o mapeamento de regiões habitadas pelos fungos e o melhor conhecimento da epidemiologia das micoses.

Objetivo

O presente estudo teve como objetivo investigar a ocorrência do *P. brasiliensis* em tatus capturados em uma área de reserva de Cerrado localizada no Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru/SP.

Material e Métodos

Os animais foram capturados com armadilhas colocadas nas trilhas e/ou tocas dos animais, com a sua exata localização geográfica demarcada (22°19'55.90''S, 48°57'28.82''O), sob licença do IBAMA (n° 187/2005, processo 02027.015113/95-07). Foram avaliados 4 animais machos (C1-C4), os quais foram anestesiados (Zoletil 50 – Virbac, 0,2mL/Kg) e posteriormente submetidos à eutanásia para a coleta dos órgãos (pulmão, fígado, baço e linfonodos mesentéricos) tanto para avaliação micológica quanto molecular (Figura 1A). Foi realizada a prévia assepsia dos órgãos, seguido por semeadura de 70-80 fragmentos de 2-4mm³ de cada tecido em meio Mycosel[®] (placas em triplicata) com incubação a 35°C por um período de 8 semanas⁸. Colônias com características macro e microscópicas semelhantes ao *P. brasiliensis* foram isoladas em tubos contendo GPY e BDA, estocadas e caracterizadas por métodos moleculares. A análise molecular consistiu da extração de DNA, empregando-se o Kit Genomic Prep[™] Cells and Tissue DNA Isolation (GE Healthcare) e amplificação por reações de PCR e Nested-PCR, com *primers* específicos para *P. brasiliensis* derivados da região do DNA ribossomal.

Resultados

O isolamento fúngico positivo de *P. brasiliensis* foi observado nas amostras de linfonodo mesentérico (animal C1), fígado (animal C1, C2, C4) e baço (animais C2 e C4), fato este que confirma a alta frequência de infecção e facilidade de recuperação fúngica nesta espécie animal (Figura 1B). *Amplicons* específicos de 387pb também foram identificados em amostras de tecido de 3 exemplares (animais C1, C2 e C4), como ilustrado na Figura 1C.

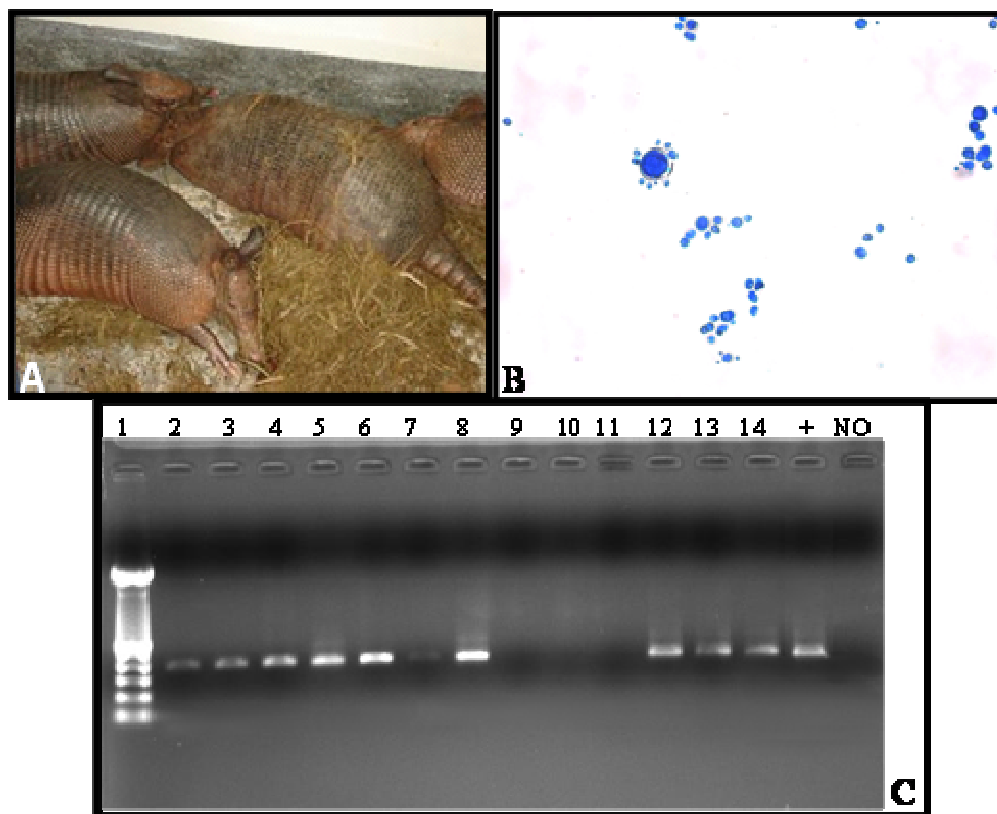


Figura 1: **A.** *Dasyus novemcinctus* capturados no Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP. **B.** Microscopia do *P. brasiliensis* em sua fase leveduriforme, obtido do fígado do tatu C2, coloração com lactophenol azul algodão e aumento 400X. **C.** Nested-PCR com os *primers* PbITSE/PbITSR em amostras de DNA extraídas das vísceras de tatus (C1-C4). Linhas 1-13: **1)** Marcador de peso molecular 100pb (Invitrogen), **2)** pulmão (C1), **3)** fígado (C1), **4)** baço (C1), **5)** linfonodo mesentérico (C1), **6)** pulmão (C2), **7)** fígado (C2), **8)** baço (C2), **9)** pulmão (C3), **10)** fígado (C3), **11)** baço (C1), **12)** pulmão (C4), **13)** fígado (C4), **14)** baço (C4), **15)** controle positivo (DNA de cultura de *P. brasiliensis*), **16)** controle negativo.

Discussão

A constatação de que a infecção natural pelo *P. brasiliensis* nos tatus é alta e que estes animais são importantes sinalizadores da ocorrência do patógeno no ambiente já esta bem documentada, isto abriu novas oportunidades para os estudos ecológicos deste fungo^{7,9}.

No nosso trabalho, 75% dos animais (3/4) estavam infectados, esse índice foi semelhante ao encontrado na região de Botucatu/SP⁸, porém os isolamentos de *P. brasiliensis* em tatus apresentam uma variação de 20 a 75% de positividade nos animais investigados. Naiff *et al.*,^{10,11} detectou *P. brasiliensis* em 22/50 (44%) tatus capturados no estado do Pará. Silva-Vergara *et al.*,^{12,13} isolou *P. brasiliensis* de 5 tatus dos 37 avaliados em Minas Gerais e Corredor

et al.,^{14,15} obteve isolamento positivo em 2 tatus, sendo um *D. novemcinctus* e outro *Cabassous centralis* na Colômbia. Muitas circunstâncias fazem os tatus importantes animais para pesquisas. O tatu de nove-bandas vive em uma extensa região das Américas, uma distribuição que parcialmente coincide com a PCM em humanos¹⁶. Este animal exibe contato frequente com o solo, principalmente pelo seu hábito escavatório. Essa atividade pode expor os tatus aos propágulos infecciosos presentes no ambiente. Estudos de caracterização molecular de isolados humanos e animais indicam que os mesmos ecopatogênótipos devem estar infectando ambos os grupos de hospedeiros (humanos e tatus)^{17,18}.

A detecção de tatus naturalmente infectados na reserva de Cerrado do ILSL aponta para um importante fator que é a utilização desses animais como indicadores da presença do *P. brasiliensis* neste ambiente, uma vez que essa avaliação é inédita no município de Bauru/SP. A área de ocorrência do patógeno nesses animais é considerada de preservação ambiental, contendo vários hectares de vegetação natural, onde está inserido o Instituto, que é centro de referência para o tratamento da hanseníase e outras moléstias infecciosas, incluindo as fúngicas.

Nesta área existem pacientes portadores de hanseníase, já tratados e sob tratamento, que moram em casas do Instituto há décadas. Para estes pacientes especiais, portanto, a proximidade com o hábitat do *P. brasiliensis* parece ser uma realidade concreta. Embora seja necessária uma melhor avaliação do possível significado desses animais infectados como facilitadores da infecção humana, até o momento não existe qualquer evidência de que o *P. brasiliensis* possa estar infectando as pessoas que frequentam este local.

Os resultados aqui obtidos apontam para os aspectos práticos em relação à infecção dos tatus, bem como a importância dessa reserva natural para estudos posteriores sobre a ecologia do patógeno, os quais poderão possibilitar a estruturação de novas hipóteses para um melhor entendimento sobre a biologia deste patógeno.

Referências bibliográficas

1. Marques SA; Porro AM; Mendonça IRS; Haus Filho G. Micoses oportunistas e de comportamento oportunista no Brasil. **An Bras Dermatol** 1996; 71(2): 25-29.
2. Untereiner WA; Scott JA; Naveau FA; Sigler L; Angus JBA. The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales. **Mycologia** 2004; 96(4): 812-21.
3. Ramos-Silva M; Saraiva LE; Paracoccidioidomycosis. **Dermatol Clin** 2008; 26(2): 257-69.

4. Martinez R; Moya MJ. The relationship between paracoccidioidomycosis and alcoholism. **Rev Saude Publica** 1992; 26(1): 12-6.
5. Wanke B; Londero AT. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. In: Franco MF; Lacaz CS; Restrepo A.; Del Negro G. eds. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton, FL., CRC Press, 1994.
- 6 Coutinho ZF; Silva D; Lazera M; Petri V; Oliveira RM; Sabroza PC; Wanke B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cad Saude Publica** 2002; 18(5): 1441-54.
7. Bagagli E; Bosco SMG; Theodoro RC; Franco M. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. **Infect Gen Evol** 2006; 6(5): 344-51.
8. Bagagli E, Sano A, Coelho KIR, Alquati S, Miyaji M, Camargo ZP, *et al.*. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic area of Paracoccidioidomycosis. **Am J Trop Med Hyg** 1998; 58: 505-12.
9. Bagagli E; Franco M; Bosco SMG; Hebelers-Barbosa F; Trinca L; Montenegro MR. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. **Med Mycol** 2003; 41: 217-23.
10. Naiff RD; Ferreira LCP; Barret TV; Naiff MF; Arias JR. Paracoccidioidomycose enzoótica em tatus (*Dasypus novemcinctus*) no Estado do Pará. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1986; 28: 19-27.
11. Naiff RD; Barret TV. Novos registros de *Paracoccidioides brasiliensis* em tatus (*Dasypus novemcinctus*). In: Congresso Brasileiro Parasitologia, 1989, Rio de Janeiro, p. 197.
12. Silva-Vergara ML; Martinez R. Role of the armadillo *Dasypus novemcinctus* in the epidemiology of Paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia** 1999; 144(3): 131-3.
13. Silva-Vergara ML; Martinez R; Camargo ZP; Malta MHB; Maffei CML; Chadu JB. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. **Med Mycol** 2000; 38: 193-99.

14. Corredor GG; Castaño JH; Peralta LA; Díez S; Arango M; McEwen J, *et al.* Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. **Rev Iberoam Micol** 1999; 16: 216-20.
15. 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.
16. Restrepo A. Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Franco M; Lacaz CS; Restrepo A; Del Negro G; eds. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton CRS Press, 1994.
17. Hebel-Barbosa F; Morais FV; Montenegro MR; Kuramae EE; Montes B; McEwen JG; *et al.* Sequence comparison of the internal transcribed spacer regions and gp 43 in *Paracoccidioides brasiliensis* for patients and armadillos *Dasypus novemcinctus*. **J Clin Microbiol** 2003; 41: 5735-37.
18. Sano A; Tanaka R; Yokoyama K; Franco M; Bagagli E; Montenegro MR; *et al.* Comparison between human and armadillo *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. **Mycopathologia** 1999; 143(3): 165-9.

Material Suplementar ao artigo publicado:

Posteriormente a publicação do artigo foram realizadas as análises histopatológicas, sequenciamento dos *amplicons* obtidos nas reações de PCR e Nested-PCR das amostras de tecido dos animais, avaliação da produção de conídias de um isolado obtido e análise dos dados ambientais do sítio de coleta dos animais.

Os tecidos dos animais (C1-C4) foram preparados para a avaliação histopatológica por Hematoxilina-Eosina (HE) e para a realização de técnicas de histoquímica como Periodic Acid Schiff (PAS) e Gomori-Grocott (GMS). Depois de coradas as lâminas foram visualizadas em Microscópio Axiophot 2 e fotografadas através do sistema de análise de imagem AxioVision 4.0.

Para o sequenciamento, os *amplicons* foram purificados empregando-se o Kit comercial GFX PCR DNA and Gel Band (GE Healthcare) e depois quantificados por eletroforese em gel de agarose. O sequenciamento foi realizado para confirmar a identidade

dos *amplicons* obtidos nas reações de PCR e Nested-PCR com sequências de fungos depositadas na base de dados do GenBank, conforme descrito por Theodoro et al. (2005). As reações de sequenciamento foram feitas em sequenciador automático MegaBace™ 1000 (Amersham Biosciences) empregando-se o Kit DYEnamicET Dye Terminator Cycle Sequencing (Amersham Biosciences).

As sequências *sense* e *antisense* obtidas foram visualizadas através do software Chromas 2.3, na forma de eletroferograma, alinhadas pelo programa MEGA4, submetidas ao BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) e comparadas com as sequências depositadas nos bancos de dados.

A produção de conídias foi avaliada por microcultivo e por lâmina Durex em duplicata nos meios BDA (Batata Dextrose Agar – Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) e Ágar extrato de solo, preparado de acordo com Kwon-Chung (1967). A contagem de conídias foi realizada em cinco campos de cada lâmina corada com lactophenol azul algodão. Esta análise foi realizada conjuntamente com a aluna de doutorado Raquel Cordeiro Theodoro.



Figura 1: Local de captura do tatu C1-C4, ILSL-Bauru/SP. A) região de vegetação natural - cerrado B) toca do tatu.

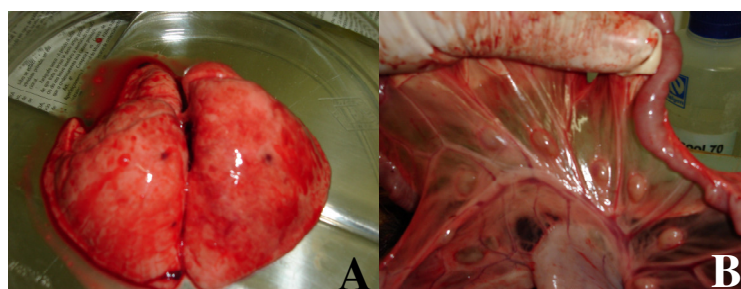


Figura 2: A) exame necroscópico mostrando pequenos nódulos pulmonares, B) aumento dos linfonodos mesentéricos.

A exata localização geográfica de cada animal foi estabelecida utilizando GPS

(Global Positioning System) e as mesmas foram inseridas em um banco de dados digital utilizando interface georeferenciada do Google Earth (<http://earth.google.com>) e por meio do Atlas **SinBiota - Sistema de Informação Ambiental do Biota**, que foi desenvolvido com o objetivo de integrar informações geradas pelos pesquisadores vinculados ao Programa Biota/FAPESP, relacioná-las a uma base cartográfica digital de qualidade, provendo assim, mecanismos de difusão da informação sobre a biodiversidade paulista para a comunidade científica, tomadores de decisão, formuladores de políticas ambientais e educadores. A análise físico-química do solo foi realizada junto ao Laboratório de Física e Química de Solos do Departamento de Solos da Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, Botucatu, utilizando-se protocolos padronizados internacionalmente (“Sistema IAC”).

Os resultados de isolamento fúngico de cultura demonstraram, juntamente com o *P. brasiliensis*, a presença de *Aspergillus flavus* que foi isolado de cultura de pulmão do animal C1 e *Trichosporon* spp em cultura de baço do animal C3 (Figura 3).

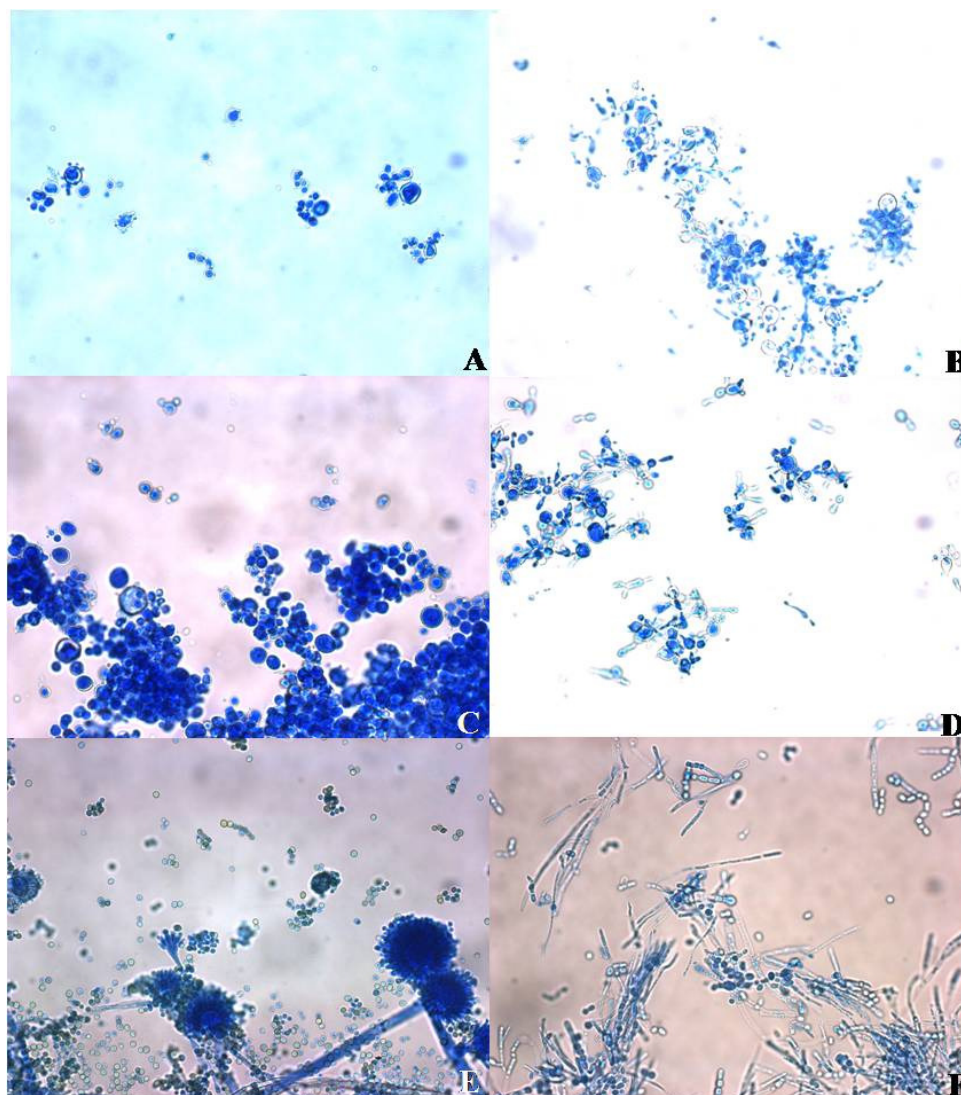


Figura 3: Lâminas de cultivo coradas com lactophenol azul algodão. **A)** *P.brasiliensis* – C1-fígado; **C)** *P. brasiliensis* – C4-fígado; **D)** *P. brasiliensis* – C2-baço; **E)** *P. brasiliensis* C4-baço; **F)** *A. flavus* – C1-pulmão; **G)** *Trichosporon* spp. – C3-baço.

A análise histopatológica realizada em cortes de tecido dos animais capturados no ILSL (C1-C4) demonstraram a presença de pequenos infiltrados no pulmão do animal C1, que apresentou também granulomas no fígado os quais eram compactos e bem organizados, a maioria deles era constituído de macrófagos, células epitelióides e início de formação de células gigantes; também observou-se a presença de alguns aglomerados arranjados de polimorfonucleares, indicativo de resposta inflamatória inespecífica. Deve ser salientado que esse órgão apresentou isolamento positivo do *P. brasiliensis*, porém este não foi detectado nos cortes histológicos. A presença de granuloma em amostra de fígado do tatu demonstra que o hospedeiro apresenta uma resposta inflamatória na tentativa de destruir, bloquear e

circunscrever o parasita prevenindo sua multiplicação, ao mesmo tempo em que produz grande dano ao tecido (FRANCO, 1986). Entretanto, a presença do fungo não foi detectada, como já observado anteriormente por Bosco et al. (2005).

A cultura do *P. brasiliensis* do animal C1, foi testada para verificar a produção de conídias (Figura 4). Uma hipótese a respeito da infecção por *P. brasiliensis*, baseado em outras micoses sistêmicas também causadas por fungos dimórficos, é que o pulmão seja o órgão mais afetado, e que o fungo viva saprofiticamente no solo e/ou vegetais, produzindo estruturas assexuadas na forma de artroconídias (BUSTAMANTE et al., 1985), as quais são as responsáveis pela infecção principalmente pelo trato respiratório (McEWEN et al., 1987). Assim, neste estudo, observou-se uma alta produção de conídias (>50 conídias por campo avaliado), os quais correspondem à forma infectante do patógeno.

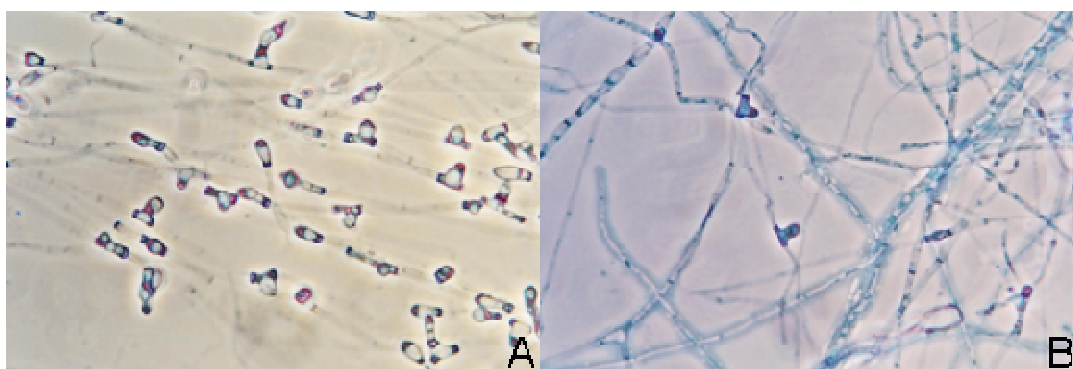


Figura 4: Produção de conídias em cultura de *P. brasiliensis* **A)** produção de conídias em lâmina Durex (meio BDA) **B)** produção de conídias em lâmina Durex (meio ágar extrato de solo), lactophenol azul algodão 100X.

As sequências consenso obtidas pelo sequenciamento dos *amplicons* de DNA das amostras de tecido dos animais foram comparadas com aquelas depositadas no GenBank e estão sumarizadas na tabela 1. Enquanto os *amplicons* obtidos dos diversos tecidos dos animais C1, C2 e C4 deram identidade com *P. brasiliensis*, um *amplicon* obtido da cultura fúngica do pulmão do animal C1 proporcionou identidade com o *Aspergillus flavus*, e o *amplicon* obtido da amostra da cultura do baço do animal C3 apresentou 99% de similaridade com diversas espécies de *Trichosporon* como: *T. coremiiforme*, *T. faecale*, *T. asahii*, *T. asteróides* e *T. japonicum*.

Tabela 1: Análise das sequências consenso dos *amplicons* obtidos nas reações de PCR e Nested-PCR das amostras de tecido e cultura dos animais avaliados e a comparação com as sequências depositadas no GenBank.

Amostra	Espécie depositada GenBank	% identidade/ n° de acesso
C1-pulmão	<i>P. brasiliensis</i>	99%/ AB30448.1
C1-fígado	<i>P. brasiliensis</i>	99%/ AB30448.1
C1-baço	<i>P. brasiliensis</i>	99%/ AB30448.1
C1-linfonodo mesentérico	<i>P. brasiliensis</i>	99%/ AB30448.1
C2-pulmão	<i>P. brasiliensis</i>	99%/ AB30448.1
C2-fígado	<i>P. brasiliensis</i>	99%/ AB30448.1
C2-baço	<i>P. brasiliensis</i>	99%/ AB30448.1
C4-pulmão	<i>P. brasiliensis</i>	99%/ AB30448.1
C4-fígado	<i>P. brasiliensis</i>	99%/ AB30448.1
C4-baço	<i>P. brasiliensis</i>	99%/ AB30448.1
C1-cultura pulmão	<i>Aspergillus flavus</i>	99%/ EF409804.1
C3-cultura baço	<i>Trichosporon coremiiforme</i> <i>Trichosporon faecale</i> <i>Trichosporon asahii</i> <i>Trichosporon asteróides</i> <i>Trichosporon japonicum</i>	99%/ AF444434.1 99%/ AF444419.1 99%/ AB369919.1 99%/ AF444416.1 99%/ AF444473.1

Os dados sobre localização e biomas das áreas de coleta dos animais estão sumarizados na figura 5, utilizando-se o Atlas *SinBiota*.

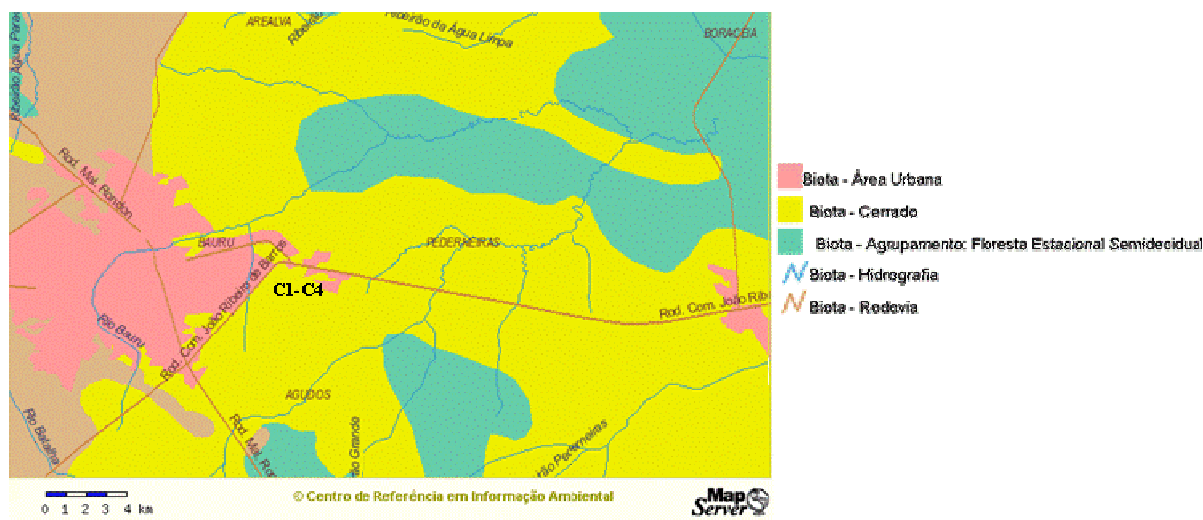


Figura 5: Área dos animais capturados no ILSL (C1-C4) de acordo com as características do respectivo bioma.

A área de estudo dos animais avaliados, corresponde exclusivamente ao Bioma-Cerrado, caracterizado por um solo com textura arenosa, pH 3.8 e alumínio trocável (H+Al) 58 mmol/dm³. É sugerido que características do solo como textura não esteja diretamente relacionada ao crescimento fúngico, porém valores de alumínio trocável superiores a 80

mmol/dm³ sejam limitantes ao crescimento fúngico e que fatores ambientais favoráveis, como a permanência da umidade do solo correspondam às condições favoráveis de maior risco para a infecção pelo *P. brasiliensis* (SIMÕES et al., 2004; RESTREPO et al., 2001; TERÇARIOLI et al., 2007). Essa umidade mínima pode ser observada pelas várias plantas do cerrado que possuem estruturas capazes de armazenar água, como por exemplo, a família Bromeliaceae (bromélias e abacaxis). Desta forma, o ambiente representado pelas tocas dos tatus e seus arredores, constituem um local preferencial para o desenvolvimento do patógeno na sua fase saprofítica, com os fatores bióticos e abióticos associados, como já demonstrado por Terçarioli et al. (2007).

Referências

- BOSCO, S.M.G.; ROSA, P.S.; SIMÕES, L.B.; THEODORO, R.C.; MACORIS, S.A.G.; PEREIRA Jr, H.R.J.; FRANCO, M.; BAGAGLI, E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* DNA in stool and tissue samples of naturally infected armadillos. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.**, v. 47(suppl 14), p. 62, 2005.
- BUSTAMANTE, B.; McEWEN, J.G.; TABARES, A.M.; ARANGO, M.; RESTREPO, A. Characteristics of the conidia produced by the mycelial form of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Sabouraudia**, v. 23, p. 407-14, 1985.
- FRANCO, M. Host-parasite relationships in Paracoccidioidomycosis. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 25, p. 5-18, 1986.
- KWON-CHUNG, K.J. Studies on the sexuality of *Nannizzia*. I Heterothallism vs. fertile isolates. **Sabouraudia**, v.6, p. 5-13, 1967.
- McEWEN, J.G.; BEDOYA, V.; PATINO, M.M., SALAZAR, M.E.; RESTREPO, A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 25, p. 165-75, 1987.
- RESTREPO, A.; McEWEN, J.G.; CASTAÑEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Med. Mycol.**, v.39, p. 233-41, 2001.

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(6), p. 517-23, 2004.

TERÇARIOLI, G.R.; BAGAGLI, E.; REIS, G.M.; THEODORO, R.C.; BOSCO, S.M.G.; MACORIS, S.A.G.; RICHINI-PEREIRA, V.B. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. **BMC Microbiology**, v. 7(92), p. 1-8, 2007.

THEODORO, R.C. CANDEIAS, J.M.G.; ARAÚJO, J.P.Jr.; BOSCO, S.M.G.; MACORIS, S.A.G.; PADULA Jr, L.O. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. **Med. Mycol.**, v.43 (8), p. 725-729, 2005.

Role of the Xenarthra Superorder in the epidemiology of Paracoccidioidomycosis

Draft

Short title: Xenarthra Superorder and Paracoccidioidomycosis

Virgínia Bodelão Richini-Pereira¹, Sandra de Moraes Gimenes Bosco¹, Raquel Cordeiro Theodoro¹, Lígia Barrozo², Silvia Cristina Barbosa Pedrini³, Patrícia Sammarco Rosa³, Eduardo Bagagli^{1*}

¹Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil; ²Departamento de Geografia, Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil; ³Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP, Brasil.

Summary

Several pathogens that cause important zoonotic diseases have been frequently associated with armadillos and other xenarthrans. Natural infection of armadillos with *Paracoccidioides brasiliensis* in hyperendemic areas has provided a valuable opportunity for understanding the role of this mammal in the eco-epidemiology of Paracoccidioidomycosis (PCM). This study, evaluated the occurrence of *P. brasiliensis* in 6 road-killed animals (2 *Dasypus novemcinctus*, 1 *Euphractus sexcinctus*, 1 *Tamandua tetradactyla*, 2 *Myrmecophaga tridactyla*) and 19 armadillos captured (2 *D. novemcinctus* in Cerqueira César County, 16 *D. novemcinctus* and 1 *Cabassous* spp. in the Savanna Reservation area of Bauru/SP). The animals were autopsied and tissue fragments processed for mycological and molecular evaluation. The fungus was isolated in tissue samples from 1 captured animal and specific *P. brasiliensis* amplicons were detected in several organs of the 7 armadillos and 2 *M. tridactyla*. Members of Xenarthra, especially armadillos, have some characteristics, including a weak immune system and low body temperature, which make them suitable models for studying host-pathogen interaction. *P. brasiliensis* infection in wild animals, from PCM endemic areas, may be more common than initially postulated and reinforces the use of these animals as sentinels for the presence of the pathogen in the environment.

Key words: *Paracoccidioides brasiliensis*, Xenarthra, road-killed animals, molecular epidemiology

Introduction

Great advances have been made over the last few years in understanding the evolutionary aspects of fungal groups with animal hosts [1]. Xenarthrans (armadillos, sloths and anteaters) are ancient mammals that appeared in South America 65 million years ago. While many members of Xenarthras became extinct on account of different factors (environmental changes, anthropic actions) and some of them are still considered critically endangered or vulnerable, armadillos are still particularly abundant in the central and southern regions of South America, despite intensive hunting [2-3]. The ancient South American ancestry of Xenarthras, and their terrestrial and arboreal niches, suggest that they may have coexisted in close proximity with several Neotropical pathogens, including onygenalean fungi such as *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum* and *Coccidioides immitis* [1].

Paracoccidioides brasiliensis is an important pathogenic fungi causing Paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic mycosis with broad distribution in Latin America [4]. The fungus is thermodimorphic, that is, it grows as a yeast-like structure in the host tissue or when cultured at 35-37°C, and as mycelium in the saprobic condition or when cultured at room temperature 22-25°C. The infection is caused by inhalation of airborne propagules of the mycelial phase of the fungus, that reach the lungs and differentiate into the yeast parasitic phase [4].

The precise habitat of *P. brasiliensis* has remained undefined, but the high frequency of isolation or molecular detection in armadillos has created new opportunities for the study of the role of this mammal group in the ecology of this microorganism. The first isolation of *P. brasiliensis* was observed in armadillos obtained from the Amazon region [6], a finding that has been confirmed by several other research groups in Brazil [7-11] and Colombia [12-14].

The present study aimed to evaluate the *P. brasiliensis* in several samples of this animal group using traditional mycological procedures, histopathological and molecular techniques on captured and road-killed animals. The data indicate that, besides armadillos, the pathogen may occur in several terrestrial species of Xenarthra.

Materials and Methods

Animals and Study Area

Two armadillos were captured in Cerqueira César County, São Paulo State, Brazil, a county already indicated by previous studies as presenting one of the highest human prevalences of PCM disease (Figure 1, supplemental material); six road-killed animals (three

armadillos and three anteaters) were collected in the Botucatu endemic PCM area (Figure 2, supplemental material); and seventeen armadillos (16 *Dasyus novemcinctus* and 01 *Cabassous* spp.), having died naturally, in captivity (n=9) or in the field (n=8), under investigation of the Lauro de Souza Lima Institute (leprosy studies), in a Savanna Reservation area of Bauru, São Paulo State, Brazil, were studied. Fragments of lung, spleen, liver, kidney and mesenteric lymph node were evaluated by either mycological or histopathological and molecular detection. The data on the animals, including sex and the tissue analyzed, as well as their geographic positions and some environmental data from the area, are summarized in Table 1.

This study was developed after receiving authorization from the Brazilian Protection Agency (IBAMA) and Animal Research Ethics Committees (CEEA) at the Institute of Biosciences/UNESP-Botucatu, SP, Brazil.

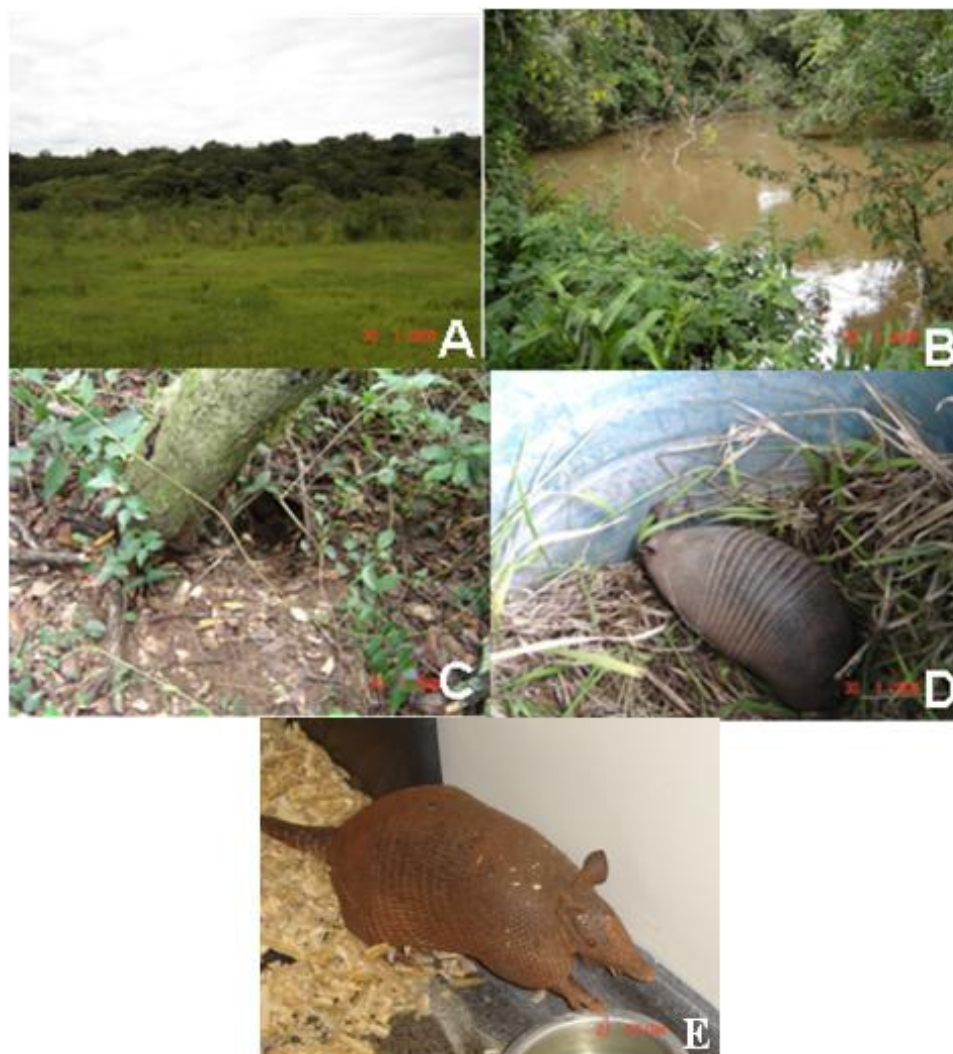


Figure 1: Some details of the exact capture site (Pictures A, B) and burrow (C) of armadillo C1 (D), and armadillo C2 (Picture E), from Cerqueira César County, São Paulo.

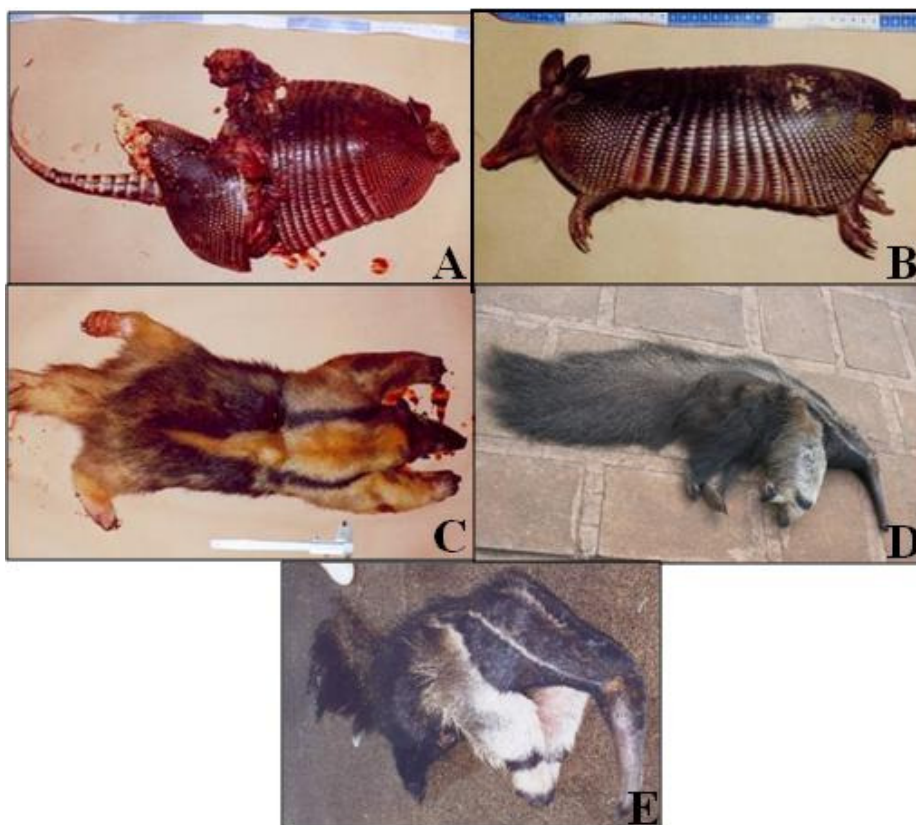


Figure 2: Road-killed wild animals, **A)** animal 3- *D. novemcinctus*, **B)** animal 4 *D. novemcinctus*, **C)** animal 6 -*T. tetradactyla*, **D)** animal 7 -*T. tetradactyla* and **E)** animal 8- *M. tridactyla*.

Fungal culture and histopathological analysis

Fungal culture and histopathological analysis were performed on the two armadillos captured in Cerqueira César County. 70-80 fragments ($2-4\text{mm}^3$) of tissue from captured animals were cultured in Mycosel® agar at 36°C for 4 weeks. Suspected colonies were examined microscopically using lactophenol cotton-blue staining and their colony and dimorphic aspects were evaluated by culturing at 25° and 35°C in PDA (Potato Dextrose Agar) and GPY (glucose, peptone and yeast extract) respectively. Tissues fragments were fixed in 10% formalin and processed for histology, and stained with hematoxylin and eosin, periodic acid-Schiff, and Gomori-Grocott methenamine silver stain.

Molecular detection:

The DNA extraction was performed by grinding the liquid-nitrogen frozen tissue sample with mortar and pestle as proposed by Corredor et al. [12] or Genomic Prep™ Cells and Tissue DNA Isolation Kit (GE Healthcare –Amersham Biosciences). The DNA pellet was

suspended in 100 μ L of ultra-pure water and the quality was checked by 1% agarose gel electrophoresis using Low Mass DNA Ladder (Invitrogen) as molecular marker. The molecular detection was carried out by Nested-PCR reactions, using as outer primers the panfungal primers ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') and ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAACG-3'), at the annealing temperature of 60°C [15] and inner primers PbITSE (5'-GAGCTTTGACGTCTGAGACC-3') and PbITSR (5'-AAGGGTGTTCGATCGAGAGAG-3'), annealed at 62°C [16], and matching from 162 to 548 nucleotides accessed at GenBank (AY374339). The Nested PCR amplicons were purified by the commercial kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (Amersham Biosciences) and the sequencing reactions were carried out on both strands in a MegaBaceTM 1000 (Amersham Biosciences). The sequences were compared to the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Results

Isolation of P. brasiliensis

P. brasiliensis was isolated, by direct organ culture, from one armadillo captured in Cerqueira César County. Colonies were isolated from the spleen and mesenteric lymph nodes (Figure 3, supplemental material). The second armadillo, captured in the same county but at another site that presents some different ecological conditions (Table 1), was culture negative.



Figure 3: *P. brasiliensis* isolation in the armadillo C1, captured in Cerqueira César County. **A)** Fragments of mesenteric lymph nodes seeded in Mycosel Agar at 36°C with the typical positive yeast growth in *P. brasiliensis* colonies; **B)** Macroscopic aspect of the mycelial and yeast forms of the isolate; **C)** Microscopic aspect of the isolate's yeast form, prepared with lactophenol cotton blue, 40X.

Histopathological analysis

In the histopathological sections of lung, liver, spleen and mesenteric lymph nodes, no fungal structures were revealed by hematoxylin and eosin, periodic acid Schiff or Gomori-Grocott methenamine-stained slides.

Molecular detection

Positive amplifications of predictive specific amplicons of *P. brasiliensis* were detected in several tissue fragments of seven *D. novemcinctus* armadillos, in lung, liver, spleen, lymph node and kidney, and of two *M. tridactyla* anteaters, in lung, liver, spleen, and lymph node (Table 1). The molecular identities of the amplicons were confirmed by direct double-strand sequencing, which showed 99% similarity with *P. brasiliensis* DNA sequences deposited at Gen Bank.

In the armadillos from the Savanna Reservation area of Bauru/SP that had died of natural causes, the positivity was high (5 of 8 animals 62.5%) among the ones found dead in the field or that had been recently introduced into captivity, when compared with the ones that had died after a long period in captivity (9 animals negative).

When submitted at BLASTn analysis, the purified and sequenced amplicons showed 99% of identity with *P. brasiliensis* sequences deposited at the GenBank (Table 2).

Table 1: Data on wild animal species, sex and geographic position, which were evaluated by Nested-PCR for infection by *P.brasiliensis*.

Animal	characteristics	species	Sex	Geographic position	Environmental features	Tissue/Nestec-PCR (+ or -)
1	captured Cerqueira César County	<i>D. novemcintus</i>	male	22°55'66''S 49°05'18.7''W	Semideciduous tropical forest. AR:1360mm. soil: sandy, latosol, pH 5.2, H+Al 25mmol/dm ³ .	lu(+), s(+), l(+), k(-), mln(+), ag(-)
2			male	23°03'21.69''S 49°11'29.41''W	Semideciduous tropical forest AR:1360mm soil: clayed, latosol, pH 4.5, H+Al 81mmol/dm ³ .	lu(-), s(-), l(-), k(-), h(-), mln(-), ag(-)
3		<i>D. novemcintus</i>	NA	23°04'00.58''S 47°36'24.50''W	Ombrophylous forest. soil: ultisol. AR:1280mm	lu(-), h(-)
4			male	22°53'09.20''S 48°27'35.59''W	Contact Savanna/Semideciduous tropical forest. soil: latosol. AR 1360mm	lu(+), s(+), l(+), k(+), h(-), mln(+)
5	road-killed	<i>E. sexcinctus</i>	male	22°46'8.09''S 48°33'45.80''W	Semideciduous tropical forest. soil: ultisol. AR:1400mm	lu(-), s(-), l(-), mln(-)
6		<i>T. tetradactyla</i>	male	23°02'38.94''S 48°31'10.59''W	Semideciduous tropical forest. soil: ultisol. AR:1400mm	lu(+), s(+), l(-), mln(+)
7		<i>M. tridactyla</i>	male	22°55'57.01''S 48°20'34.05''W	Semideciduous tropical forest. soil: ultisol. AR:1400mm	lu(+), s(+), l(-), mln(+)
8			female	23°01'51.18''S 48°30'47.26''W	Semideciduous tropical forest. soil: latosol. AR:1400mm	lu(+), s(+), l(+), k(-), h(-), mln(+), ag(-)
9	found dead in the field or soon after being introduced into captivity	<i>D. novemcintus</i>	female	22°19'39.52"S 48°57'31.09"W range 2525m ²	Savanna. AR 1360mm. soil: sandy, latosol, pH 3.8, H+Al 58mmol/dm ³ .	lu(-), s(-), l(+), mln(-)
10			female			lu(-), s(+), l(-), mln(-)
11			male			lu(-), s(-), l(-), mln(-)
12			female			lu(+), s(-), l(-), mln(-)
13			male			lu(-), s(+), l(+), mln(+)
14			female			lu(+), s(+), l(+), mln(+)
15			male			lu(-), s(-), l(-), mln(-)
16			male			lu(-), s(-), l(-), mln(-)
17			male			lu(-), s(-), l(-), mln(-)
18			male			lu(-), s(-), l(-), mln(-)
19	male	lu(-), s(-), l(-), mln(-)				
20	died of natural causes after long captivity	<i>Cabassous spp</i>	male	lu(-), s(-), l(-), mln(-)		
21			male	lu(-), s(-), l(-), mln(-)		
22			male	lu(-), s(-), l(-), mln(-)		
23			male	s(-), l(-), mln(-)		
24			female	s(-), l(-), mln(-)		
25	female	lu(-), s(-), l(-), mln(-)				

lu, lung; s, spleen;l, liver; k, kidney; h, heart; mln, mesenteric lymph node; ag, adrenal gland. AR-annual rainfall, NA-not available

Table 2: Identity of the amplicons obtained by Nested-PCR in the positive wild animals, as determined by BLASTn.

animal	DNA sequence deposited at GenBank	% identity/ access number
1	<i>P. brasiliensis</i>	99%/ AB30448.1
4	<i>P. brasiliensis</i>	99%/ AY374336.1
7	<i>P. brasiliensis</i>	99%/ AY374336.1
8	<i>P. brasiliensis</i>	99%/ AY374336.1
9	<i>P. brasiliensis</i>	99%/ AB30448.1
10	<i>P. brasiliensis</i>	99%/ AB30448.1
12	<i>P. brasiliensis</i>	99%/ AB30448.1
13	<i>P. brasiliensis</i>	99%/ AB30448.1
14	<i>P. brasiliensis</i>	99%/ AB30448.1

Discussion

The present study confirms the frequent occurrence of *P. brasiliensis* in the 9-banded armadillos and also in *M. tridactyla*, another xenarthran member that also has the habit of foraging in soil. In a previous paper, we found that the 7-banded armadillo (*Dasypus septemcinctus*) could also be infected by the fungus; and Restrepo's group also confirmed that *P. brasiliensis* had been isolated from *Cabassous centralis*, in Colombia [14,17]. As already suggested, *P. brasiliensis* infection in wild animals, from PCM endemic area, may be more common than initially postulated, especially in armadillos and probably other xenarthrans. These animals have some peculiar physiological and ecological characteristics including a weak immune system and low body temperature, besides the fact they live literally immersed in soil and organic matter, mainly in tropical and subtropical regions, under biotic and abiotic conditions that promote multiple encounters with a diverse group of pathogens and vectors. Taken together, these factors make xenarthrans suitable models for studying host-pathogen interaction [18].

Epidemiological studies have identified Cerqueira César County as presenting one of the highest prevalences of human PCM cases [19,20,21]. *P. brasiliensis* was isolated in the spleen and mesenteric lymph node from one of the two armadillos captured in this county. In addition, fungal DNA amplification with specific primer was positive in the same specimen. Previous studies indicate that both human and animals may be infected by the same fungal "ecopathogenotype". This animal was captured in an area of natural vegetation, corresponding to a semideciduous tropical forest, near a watercourse. The ecological characteristics of the location where the positive animal was captured indicate that *P. brasiliensis* has great affinity for shade and moist vegetation, near rivers [4,20]. Thus the armadillo burrows and their

surrounding areas must be considered important sites of infection risk, with associated biotic and abiotic factors, as already demonstrated by Terçarioli et al. [22]. Since the 9-banded armadillo presents a restricted home range, these findings may contribute to mapping risk areas for infection as well as to the understanding the fungus's ecology and disease epidemiology. Histopathological observations of the organs did not reveal fungal lesions. However, histopathology presented a higher sensitivity than molecular and culture protocol, when applied in biopsy fragments from patients with dermatological lesions [23]. The lower sensitivity of histology compared to culture and molecular detection has been demonstrated by other authors [7,9,24].

In the group of armadillos captured in the Savanna Reservation area of Bauru/SP, under the supervision at the Lauro Souza Lima Institute, the positivity of Nested-PCR appears to show two distinct situations: While the positivity was relatively high in the animals found dead of natural causes in the field and in those that died soon after being introduced into captivity, the molecular detection was negative in all the samples from animals submitted to long period of captivity. Although keeping the animal corpses frozen until the autopsy may harm the molecular analysis, it could also be argued that during captivity, the animals had become free of the pathogen. Recently, we have also confirmed that the armadillos living in this area are highly infected by the fungus, since *P. brasiliensis* was detected in three of the four animals captured and evaluated by fungal culture and molecular detection [11]. In studying another group of eight armadillos in captivity that had been captured in Manduri County, also a hyperendemic area for PCM, we found that all previously evaluated animals proved to be culture positive for *P. brasiliensis* [8]. After being maintained in captivity for a period of three years, PCM disease was not developed and the pathogen was not recovered by culture from any animals. These findings support the idea that when armadillos live freely in the endemic area they may be acquiring the fungus continuously through their daily contact with soil and, that when they are removed from the natural infection sources, a process of fungus clearance from the animal tissues can occur [25].

The detection of *P. brasiliensis* in armadillos from the Savanna area reinforces the importance of these animals as sentinels to indicate the presence of the pathogen in this environment that tends toward and acidic pH and a large quantity of aluminum cations (H+Al), considered unsuitable for the fungus [8,22]. However, the amount of aluminum cations (H+Al) in this fragment from the Savanna area that provided positive armadillos proved to be nearly as low, while at one defined site of Cerqueira Cesar in which one animal was negative, the values of H+Al were relatively high. Obviously, more data are still needed

to reach further conclusions on the role of these abiotic factors in the fungal ecology.

In conclusion, studies on *P. brasiliensis* detection in armadillos and other xenarthran members, in connection with the associated ecological factors, represent an apt strategy to obtain fundamental information about the pathogen's ecology as well as the manner in which this fungus interacts with its several hosts, including humans.

Acknowledgements

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-nº 05/56771-9, 06/03597-4). The authors thank the Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) for permission to collect road-killed animals.

We also thank the Departamento de Estradas de Rodagem do Estado de São Paulo (DER), as well as Profº Drº Reinaldo José da Silva and Juliana Griese for information on the road-killed animals.

References

1. Bagagli E, Bosco SMG, Theodoro RC, Franco M. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. *Infect Gen Evol* 2006; **6(5)**: 344-351.
2. Wetzel RM. Systematics, distribution, ecology, and conservation of South American edentates. In: Mares MA and Genoways HH, Editors, *Mammalian Biology in South America, Pymatuning Symposia in Ecology 6, Special Publication Series*, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA (1982), pp. 345–375.
3. Nowak RM. *Walker's mammals of the world*. 6thed., Baltimore, The Johns Hopkins University Press, vol. 1, 1999.
4. Restrepo A, McEwen JG, Castañeda E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol*, 2001; **39**: 233-241.
5. Montenegro MR, Franco M. Pathology. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, eds. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton: CRS Press, 1994: 131-150.

6. Naiff RD, Ferreira LCP, Barret TV, Naiff MF, Arias JR. Paracoccidioidomycose enzoótica em tatus (*Dasyus novemcinctus*) no Estado do Pará. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1986; **28**: 19-27.
7. Bagagli E, Sano A, Coelho KIR, Alquati S, Miyaji M, Camargo ZP, *et al.* Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasyus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg* 1998; **58**: 505-512.
8. Bagagli E, Franco M, Bosco SMG, Hebler-Barbosa F, Trinca L, Montenegro MR. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasyus novemcinctus*): an ecological study. *Med Mycol* 2003; **41**: 217-223.
9. Silva-Vergara ML, Martinez R. Role of the armadillo *Dasyus novemcinctus* in the epidemiology of Paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 1999; **144(3)**: 131-133.
10. Silva-Vergara ML, Martínez R, Camargo ZP. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillo (*Dasyus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. *Med. Mycol* 2000; **38**: 185-191.
11. Richini-Pereira VB, Bosco SMG, Macoris SAG, Theodoro RC, Pedrini SCB, Rosa PS, Bagagli E. Detecção do *Paracoccidioides brasiliensis* em tatus (*Dasyus novemcinctus*) provenientes de uma Reserva de Cerrado do Instituto Lauro de Souza Lima (Bauru-SP). *Boletim epidemiológico paulista (BEPA)*, 2008; **5(56)**: 4-8.
12. Corredor GG, Castaño JH, Peralta LA, *et al.* Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasyus novemcinctus*, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. *Rev Iberoam Micol* 1999; **16**: 216-220.
13. Restrepo A, McEwen JG, Castañeda E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med. Mycol* 2001; **39**: 233-241.
14. Corredor GG, Peralta LA, Castano JH, *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)**: 275-280.
- 15 White TJ, Bruns 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: Academic Press. 1990. 315-322.

16. Theodoro RC, Candeias JMG, Araújo Jr JP, *et al.* Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. *Med Mycol* 2005; **43(8)**: 725-729.

17. Richini-Pereira VB, Bosco SMG, Griese J, Theodoro RC, Macoris SAG, Silva RJ, Barrozo L, Tavares PMS, Zancopé-Oliveira RM. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. *Med Mycol* 2008; **46(1)**: 35-40.

18. Bagagli E, Bosco SMG. Armadillos and dimorphic pathogenic fungi: Ecological and evolutionary aspects. In: Viscaíno SF, Loughry WJ. *The biology of the Xenarthra*, University Press of Florida, Gainesville, FL (2008), pp. 103-110.

19. Marques SA, Franco M, Mendes R, *et al.* Aspectos epidemiológicos da Paracoccidioidomicose na área endêmica de Botucatu (São Paulo-Brasil). *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1983; **25**: 87-92.

20. Simões LB, Marques SA, Bagagli E. Distribution of Paracoccidioidomycosis: determination of ecologic correlates through Geographic Information System and spatial analyzes. *Med Mycol* 2004; **42(6)**: 517-523.

21. Barrozo LV, Gonzalez CR, Santana MS, Mendes RP, Marques SA, Bagagli E. Spatial distribution of chronic Paracoccidioidomycosis in a hyperendemic area in Brazil. *Rev Inst Nacional Salud* 2008; **28(suppl 1)**: 162.

22. Terçarioli GR, Bagagli E, Reis GM, Theodoro RC, Bosco SMG, Macoris SAG, Richini-Pereira VB. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. *BMC Microbiol* 2007; **7(92)**: 1-8.

23. Siqueira KZ. Detecção molecular de *Paracoccidioides brasiliensis* em amostras de tecido e sangue periférico de pacientes portadores de Paracoccidioidomicose. Correlação com perfis histopatológico, sorológico e produção de TNF- α . PhD thesis, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2008.

24. Bosco SMG. Infecção natural do *Paracoccidioides brasiliensis* em tatus: aspectos ecológicos, patológicos, micológicos e moleculares. PhD thesis, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu; 2005.

25. Bosco SMG, Bagagli E. *Paracoccidioides brasiliensis* and Paracoccidioidomycosis in armadillos: an update. 2008, *submitted*.

Animais silvestres atropelados: Um problema atual de preservação, mas com grande potencial para estudos eco-epidemiológicos de patógenos

Road-killed wild animals: a recent problem for preservation, but also useful for eco-epidemiological studies of pathogens

Resumo e Introdução:

Um grande número de animais silvestres são mortos por atropelamento em beira de rodovias, sendo que a maioria ocorre porque a rodovia corta o hábitat natural dos animais, interferindo no deslocamento natural e na disponibilidade de alimento ao longo da estrada que podem funcionar como um atrativo para a fauna. Esses animais podem oferecer novas oportunidades nos estudos eco-epidemiológicos de patógenos, pois prioriza os métodos alternativos em pesquisas. Além disso, a utilização de animais silvestres mortos por atropelamento apresenta várias vantagens sobre os métodos tradicionais, pois eles não precisam ser anestesiados ou eutanaziados, um fator importante em termos de conservação biológica. Embora o cultivo das amostras dos tecidos seja difícil, a utilização de ferramentas moleculares representa um método alternativo para a detecção de patógenos. Os animais silvestres foram coletados em rodovias atendidas pela equipe do Departamento de Estradas de Rodagem do Estado de São Paulo (DER), foram acondicionados e identificados de acordo com a espécie e localização geográfica. Foram coletados 41 animais (1 *Callithrix penicillata*, 3 *Cavia aperea*, 1 *Cebus apella*, 9 *Cerdocyon thous*, 3 *Dasyopus novemcinctus*, 1 *Dasyopus septemcinctus*, 3 *Didelphis albiventris*, 1 *Eira barbara*, 1 *Euphractus sexcinctus*, 2 *Gallictitis vittata*, 1 Leporidae, 2 *Lutreolina crassicaudata*, 1 *Mazama gouazoubira*, 1 *Myocastor coypus*, 2 *Myrmecophaga tridactyla*, 3 *Procyon cancrivorus*, 1 *Puma concolor*, 4 *Sphiggurus spinosus* e 1 *Tamandua tetradactyla*). Amostras de tecido foram coletadas para a extração de DNA. Resultados, utilizando-se PCR com *primers* universais para fungos e Nested-PCR com *primers* específicos, indicaram que alguns animais estão infectados naturalmente com *Amauroascus aureus* ou *Metarhizium anisopliae*, *Aspergillus flavus* ou *A. oryzae*, *Emmonsia parva*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Pichia stipitis*. A abordagem empregada neste trabalho contribuiu para a detecção ambiental de vários fungos, bem como a determinação de reservatórios naturais em animais silvestres e facilitou a compreensão da relação hospedeiro/parasita.

Palavras-chave: fungos, DNA, animais silvestres atropelados

Abstract and Introduction:

A great number of road-killed wild animals have been observed, most frequently due to the presence of roadways in their habitat that interfere with natural trails and the availability of food along the road that may attract for fauna. These carcasses provide new opportunities for eco-epidemiological studies of pathogens, especially given the increased restrictions on the use of live animals for scientific research, a context that favors alternative methods. Furthermore, the use of road-killed animals has several advantages over conventional methods, because they do not need to be anesthetized or killed, an important fact in terms of conserving biological aspects. Even when culturing of tissues samples is not possible in these materials, the use of molecular tools represents an alternative method for pathogen detection. The wild animals were collected by the Departamento de Estradas de Rodagem do Estado de São Paulo (DER), and were conditioned and identified according to species and geographic location. Forty-one animals were collected (1 *Callithrix penicillata*, 3 *Cavia aperea*, 1 *Cebus apella*, 9 *Cerdocyon thous*, 3 *Dasyopus novemcinctus*, 1 *Dasyopus septemcinctus*, 3 *Didelphis albiventris*, 1 *Eira barbara*, 1 *Euphractus sexcinctus*, 2 *Gallicictis vittata*, 1 Leporidae, 2 *Lutreolina crassicaudata*, 1 *Mazama gouazoubira*, 1 *Myocastor coypus*, 2 *Myrmecophaga tridactyla*, 3 *Procyon cancrivorus*, 1 *Puma concolor*, 4 *Sphiggurus spinosus* and 1 *Tamandua tetradactyla*). The necropsies were carried out and tissue samples were collected for DNA extraction. Results, using PCR with a panfungal primer pair and a Nested-PCR with specific primers, indicated that some animals are naturally infected with *Amauroascus aureus* or *Metarhizium anisopliae*, *Aspergillus flavus* or *A. oryzae*, *Emmonsia parva*, *Paracoccidioides brasiliensis* and *Pichia stipitis*. The approach employed herein proved useful for detecting the environmental occurrence of several fungi, as well as determining natural reservoirs in wild animals and facilitating understanding of the host/pathogen relationships.

Keywords: fungal, DNA, road-killed wild animals

Material e métodos:**Animais avaliados e amostras coletadas**

Avaliou-se 41 animais silvestres mortos por atropelamento de diferentes espécies. Os animais foram recolhidos, acondicionados em saco plástico, etiquetados (com informações de data, hora e local) e as coordenadas geográficas obtidas por GPS (Global Positioning System). A identificação dos animais foi feita até o máximo grau taxonômico possível. A necropsia foi

realizada e fragmentos de órgãos foram armazenados em microtubos e congelados a -70°C até o processamento para extração de DNA. Esse estudo está de acordo com a Instrução normativa nº119, de 11 de outubro de 2006, Capítulo VI, Art.26 do IBAMA que autoriza o recolhimento e o transporte de animais encontrados mortos, para aproveitamento científico ou didático e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal desta Instituição (nº052/05).

Extração e quantificação de DNA

A extração de DNA das amostras de tecidos dos animais foi realizada empregando-se o Kit Genomic Prep™ Cells and Tissue DNA Isolation (GE Healthcare –Amersham Biosciences) ou Kit Illustra Tissue & Cells genomic Prep Mini Spin (GE Healthcare).

A quantificação de DNA foi avaliada através de corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5% adicionado de 0,5µg/mL de brometo de etídio. A corrida eletroforética foi realizada em cuba horizontal contendo TBE 1X (89 nM Tris-HCl, 89 mM ácido bórico e 20 mM EDTA) e a voltagem empregada foi 65V. Após o término da corrida o gel foi visualizado em transluminador de luz UV e a imagem foi capturada pelo sistema AlphaImager®.

Foi utilizado 4 µL do DNA low mass ladder (Invitrogen) como marcador molecular e 5 µL da amostra. Em cada amostra avaliada, bem como para o marcador molecular, foi adicionado 2 µL do tampão de amostra (0,25% azul de bromophenol, 0,25% xileno cianol, 30% glicerol, 70% água Milli-Q).

Amplificação do DNA

Foram realizadas reações de PCR, empregando-se os *primers* ITS4/ITS5 universais para fungos que mostraram-se promissores para estudos de ocorrência ambiental de patógenos (WHITE et al., 1990) e para a amplificação específica do *P. brasiliensis* foi realizada a Nested-PCR com os *primers* PbITSE/PbITSR (THEODORO et al., 2005).

As reações de PCR foram realizadas em microtubo de 0,5mL com volumes totais de 25 µL contendo tampão de reação 10mM Tris HCl pH 8.0, 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 0,2mM dNTP, 20pM de cada *primer*, 0,2 unidades de *Taq* DNA polymerase (GE/Healthcare-Amersham Biosciences) e 10ng de DNA genômico. A incubação foi realizada em termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf).

Sequenciamento do produto amplificado por PCR

Os *amplicons* foram purificados empregando-se o Kit Illustra™ DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare), quantificados por eletroforese em gel de agarose. O sequenciamento foi realizado para verificar a identidade dos *amplicons* obtidos nas reações PCR com sequências de patógenos depositadas na base de dados do GenBank. As reações de sequenciamento foram feitas em sequenciador automático MegaBace™ 1000 (GE Healthcare) empregando-se o Kit DYEnamicET Dye Terminator Cycle Sequencing (com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase) e analisadas pelo software Sequence Analyser utilizando o Base Caller Cimarron 3.12.

As sequências sense e antisense obtidas foram visualizadas (software Chromas 2.3.), na forma de eletroferograma, alinhadas pelo programa MEGA4, submetidas ao BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) e comparadas com as sequências depositadas nos bancos de dados.

Estudos ecológicos e aplicação de Sistema de Informação Geográfica

A exata localização geográfica de cada animal foi estabelecida utilizando GPS (Global Positioning System) e as mesmas foram inseridas em um banco de dados digital utilizando interface georeferenciada do Google Earth (<http://earth.google.com>). Dados ambientais foram analisados pelo software IDRISI® GIS e Surfer e os biomas correspondentes foram delimitados no Atlas *SinBiota - Sistema de Informação Ambiental do Biota*.

Resultados:

Animais atropelados

A Tabela 1 refere-se à identificação taxonômica, sexo, localização geográfica e órgãos coletados dos animais atropelados, a Figura 1 ilustra alguns dos animais atropelados, a Figura 2 ilustra por espécie a localização geográfica dos animais, a Figura 3 mostra os municípios da área de estudo, a Figura 4 mostra os dados de precipitação anual e a Figura 5 as características dos solos das regiões estudadas.

Tabela 1: Animais atropelados avaliados segundo a ordem, família, espécie, nome popular, sexo, localização geográfica e órgãos coletados.

Animal	Ordem	Família	Espécie	Nome popular	Sexo	Localização geográfica	Órgãos coletados*
A1	Carnivora	Procyonidae	<i>Procyon cancrivorus</i>	mão-pelada	M	22° 59' 46.02'' S 47° 27' 50.61'' W	P,F,R,C,L.M.
A2	Rodentia	Erethizontidae	<i>Sphiggurus spinosus</i>	ouriço cacheiro	F	23° 01' 53.00'' S 48° 04' 53.19'' W	P,F,B,R,C.
A3	Rodentia	Cavidae	<i>Cavia aperea</i>	preá	M	22° 56' 39.26'' S 48° 23' 10.64'' W	P,F,B,R,C,L.M.,A.
A4	Carnivora	Canidae	<i>Cerdocyon thous</i>	cachorro-do-mato	M	23° 02' 46.85'' S 48° 31' 14.66'' W	P,F,B,R,C,L.M., L.SUBM.
A5	Carnivora	Mustelidae	<i>Gallictis vittata</i>	furão	M	22° 50' 16.64'' S 48° 30' 58.44'' W	P,F,B,R,C
A6	Carnivora	Canidae	<i>C. thous</i>	cachorro-do-mato	M	22° 51' 02.34'' S 48° 30' 00.43'' W	P,F,B,R,C,L.M.
A7	Carnivora	Canidae	<i>C. thous</i>	cachorro-do-mato	M	22° 56' 35.64'' S 48° 23' 01.33'' W	P,F,B,R,C.
A8	Carnivora	Mustelidae	<i>G. vittata</i>	furão	M	23° 01' 58.08'' S 48° 04' 14.68'' W	P,F,B,C.
A9	Carnivora	Procyonidae	<i>P. cancrivorus</i>	mão-pelada	M	22° 50' 51.83'' S 48° 30' 09.69'' W	P,F,B,R,C,L.M.
A10	Carnivora	Canidae	<i>C. thous</i>	cachorro-do-mato	#	22° 53' 36.49'' S 48° 28' 35.76'' W	P,F,B,R,C,L.M.
A11	Didelphimorphia	Didelphidae	<i>Didelphis albiventris</i>	gambá	F	22° 54' 02.20'' S 48° 29' 25.11'' W	P,F,B,L.M.
A12	Didelphimorphia	Didelphidae	<i>D. albiventris</i>	gambá	F	22° 43' 01.56'' S 48° 20' 29.14'' W	P,F,B,L.M.
A13	Carnivora	Mustelidae	<i>Eira barbara</i>	irara	M	22° 49' 10.08'' S 48° 25' 40.03'' W	P,F,B,C,L.M.
A14	Cingulata	Dasypodidae	<i>Dasypus novemcinctus</i>	tatu galinha	F	23° 00' 46.64'' S 48° 30' 28.59'' W	P,F,B,R,C,L.M.

A15	Rodentia	Erethizontidae	<i>S. spinosus</i>	ouriço cacheiro	M	23° 00' 35.78'' S 48° 30' 00.28'' W	P,F,R.
A16	Carnivora	Canidae	<i>C. thous</i>	cachorro-do-mato	M	22° 46' 18.17'' S 48° 32' 25.74'' W	P,B,C,L.M.
A17	Rodentia	Cavidae	<i>C. aperea</i>	preá	M	22° 36' 19.20'' S 48° 09' 50.93'' W	P,F,C,L.M.
A18	Cingulata	Dasypodidae	<i>Dasypus septemcinctus</i>	tatu 7 bandas	M	22° 01' 55.25'' S 48° 31' 02.13'' W	P,F,B,R,C,L.M.
A19	Carnivora	Canidae	<i>C. thous</i>	cachorro-do-mato	#	23° 02' 14.35'' S 48° 30' 59.53'' W	P,F,B,R,C,L.M.
A20	Rodentia	Cavidae	<i>C. aperea</i>	preá	F	23° 01' 38.64'' S 48° 05' 18.57'' W	P,F,B,R,C,L.M.
A21	Cingulata	Dasypodidae	<i>D. novemcinctus</i>	tatu galinha	#	23°04'00.58'' S 47°36'24.50'' W	P,C.
A22	Rodentia	Erethizontidae	<i>S. spinosus</i>	ouriço-cacheiro	#	22°59'52.91'' S 47°27'16.02'' W	P,F,B,R,C.
A23	Pilosa	Myrmercophagidae	<i>Tamandua tetradactyla</i>	tamanduá mirim	M	23°02'38.94'' S 48°31'10.59'' W	P,F,B,C,L.M.
A24	Rodentia	Erethizontidae	<i>S. spinosus</i>	ouriço-cacheiro	F	22°49'58.71'' S 48°25'24.75'' W	F,B,R,C,L.M.
A25	Carnivora	Canidae	<i>C. thous</i>	cachorro-do-mato	F	22°50'16.00'' S 48°25'18.58'' W	P,F,B,C.
A26	Cingulata	Dasypodidae	<i>D. novemcinctus</i>	tatu galinha	M	22°53'09.20'' S 48°27'35.59'' W	P,F,B,R,C,L.M.
A27	Carnivora	Canidae	<i>C. thous</i>	cachorro-do-mato	M	22°58'38.55'' S 47°20.59.12'' W	P,F,B,C,L.M.
A28	Carnivora	Procyonidae	<i>P. cancrivorus</i>	mão-pelada	#	22°43'20.41'' S 48°37'49.99'' W	P,F,R,C.
A29	Carnivora	Felidae	<i>Puma concolor</i>	onça-parda	#	22°40'51.76'' S 48°40'55.80'' W	P,F,C.
A30	Artiodactyla	Cervidae	<i>Mazama gouazoubira</i>	veado	M	22°53'28.87'' S 48°28'26.63'' W	P,F,B,R,C,L.M.

A31	Primata	Cebidae	<i>Cebus apella</i>	macaco-prego	#	23°05'00.57''S 48°36'22.38''W	P,F,B,R,C,L.M.
A32	Lagomorpha	Leporidae	-	lebre	#	22°52'41.12''S 48°28'54.19''W	P,F,R,C,L.M.
A33	Didelphimorphia	Didelphidae	<i>D. albiventris</i>	gambá	M	22°53'22.06''S 48°29'18.76''W	P,F,B.
A34	Didelphimorphia	Didelphidae	<i>Lutreolina crassicaudata</i>	cuíca	M	22°53'25.52''S 48° 28'24.73''W	P,F,B.
A35	Didelphimorphia	Didelphidae	<i>L. crassicaudata</i>	cuíca	M	22°53'28.55''S 48° 29'29.25''W	P,F,B,L.M.
A36	Rodentia	Myocastoridae	<i>Myocastor coypus</i>	ratão-do-banhado	M	22°55'53.74''S 48°24'57.55''W	F
A37	Pilosa	Myrmercophagidae	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	tamanduá-bandeira	M	22°55'57.01''S 48°20'34.05''W	P,F,B,L.M.
A38	Cingulata	Dasypodidae	<i>Euphractus sexcinctus</i>	tatu-peba	M	22°46'8.09''S 48° 33'45.80''W	P,F,B,R,C,L.M.,A
A39	Pilosa	Myrmercophagidae	<i>M. tridactyla</i>	tamanduá-bandeira	F	23°1'51.18''S 48°30'47.26''W	F,B
A40	Primata	Cebidae	<i>Callithrix penicillata</i>	sagui	M	22°19'35.40''S 48°57'42.06''W	P,F,B,L.M.
A41	Carnivora	Canidae	<i>C. thous</i>	cachorro-do-mato	M	22°19'26.41''S 48°57'41.95''W	F,B,L.M.

* P (pulmão), F (fígado), B (baço), R (rim), C (coração), L.M. (linfonodo mesentérico), L.SUBM (linfonodo submandibular), A (adrenal).

impossível determinar devido à área da lesão causada pelo atropelamento.



Figura 1: Animais silvestres atropelados, **A)** *S. spinosus*-A24, **B)** *P. cancrivorus*-A28, **C)** *P. concolor*-A29, **D)** *M. gouazoubira*-A30, **E)** Leporidae-A32, **F)** *D. albiventris*-A33, **G)** *L. crassicaudata*-A34, **H)** *L. crassicaudata*-A35.

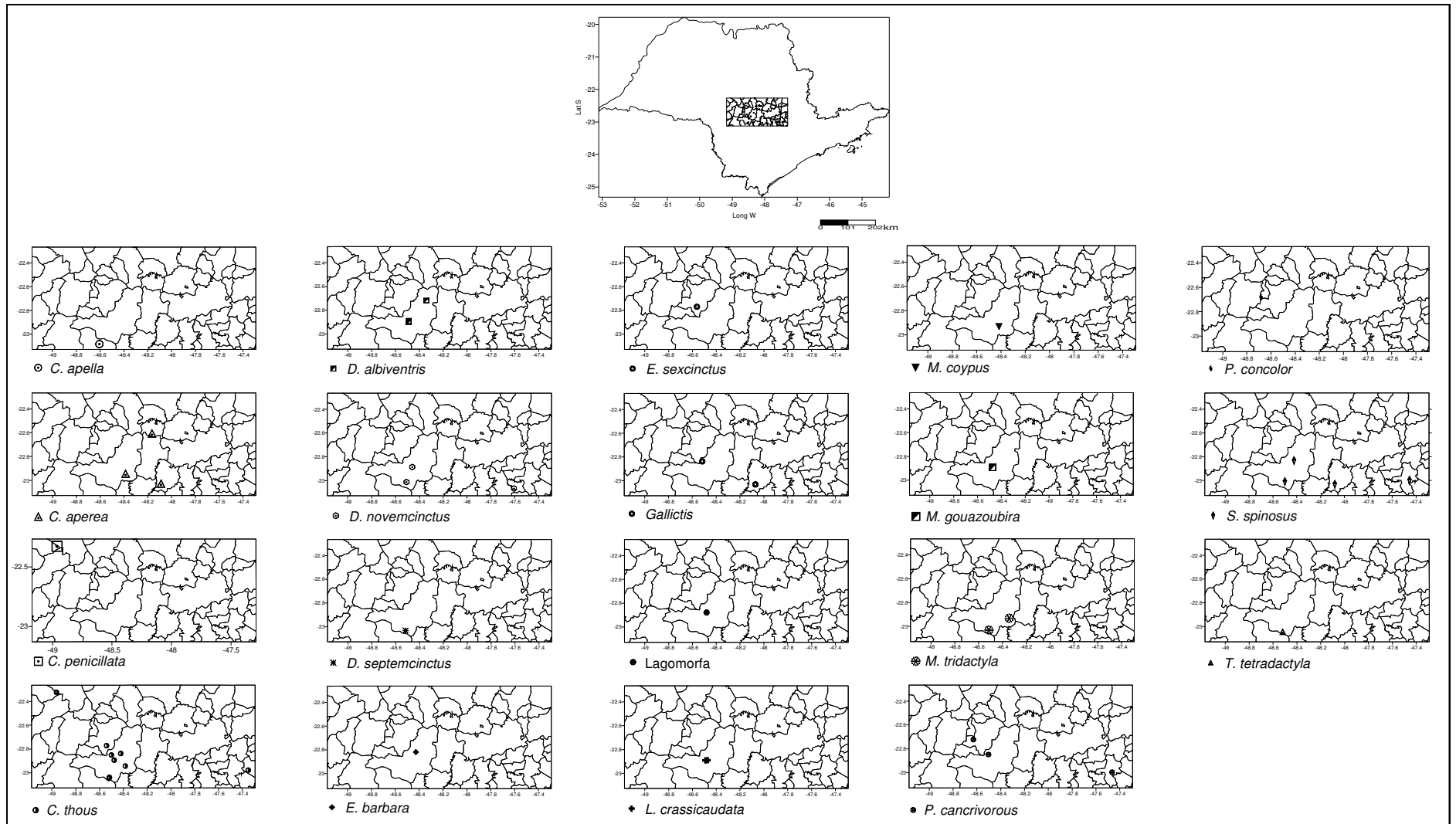


Figura 2: Localização geográfica dos animais silvestres atropelados

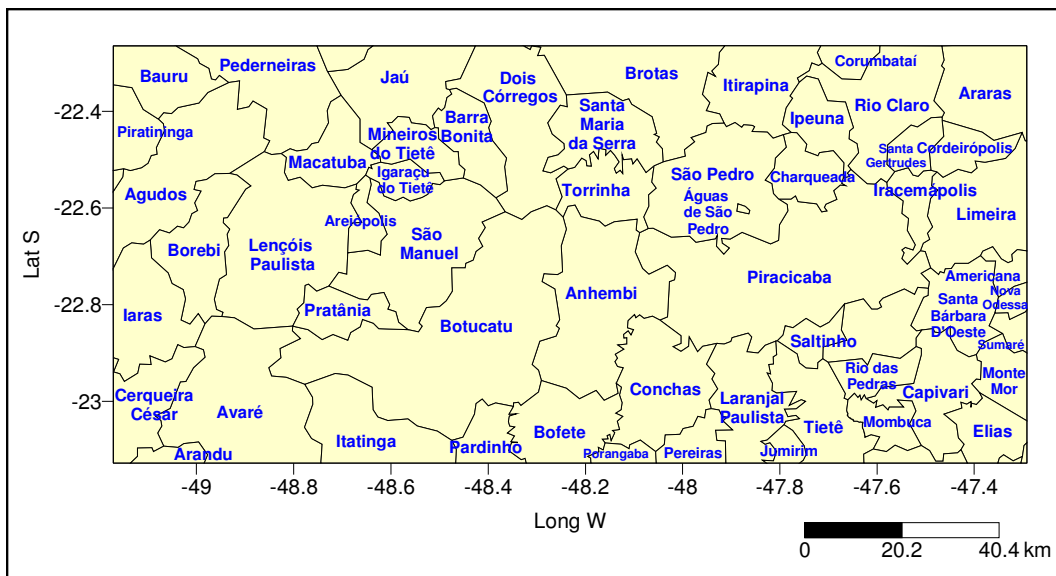


Figura 3: Municípios da área de estudo

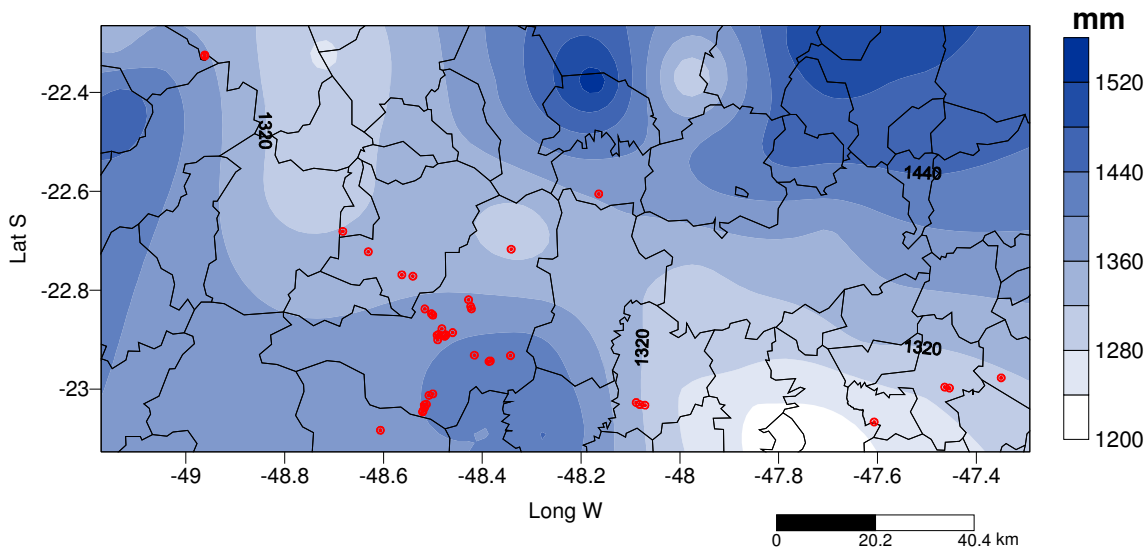


Figura 4: Dados de precipitação anual e a localização dos animais silvestres atropelados.

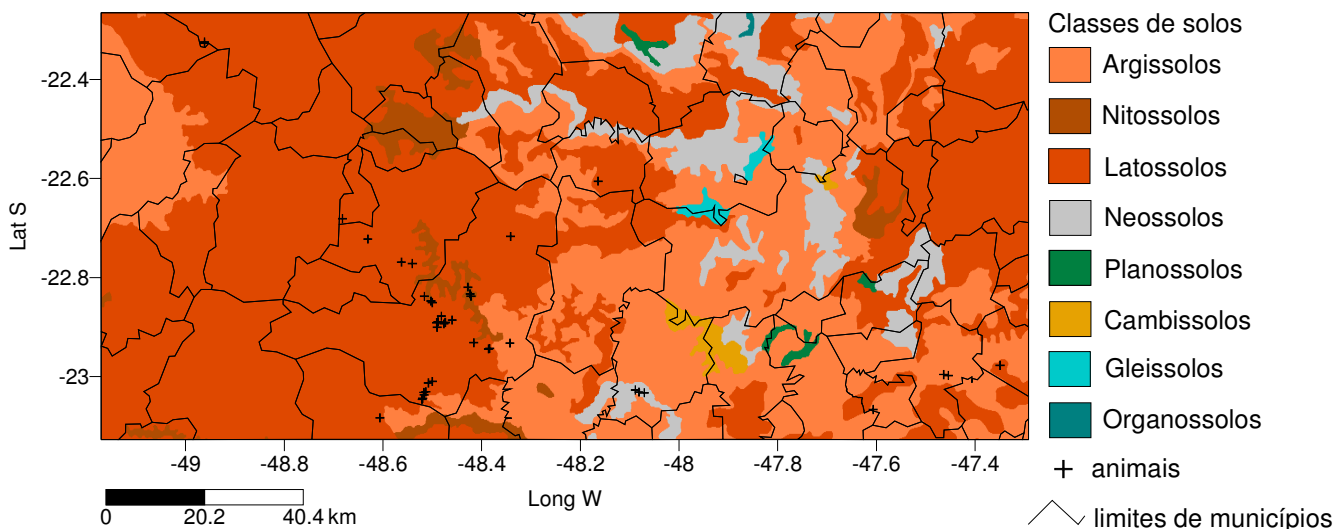


Figura 5: Classes de solos e a localização dos animais silvestres atropelados.

A tabela 2 mostra os resultados das reações de sequenciamento realizadas com *amplicons* da reação de PCR positivas para DNA fúngico nos animais atropelados avaliados e Nested-PCR para os *amplicons* específicos para *P. brasiliensis*.

Tabela 2: Distribuição dos animais com amplificação positiva de DNA para fungos na reação de PCR.

Animal	Espécie	Órgão	amplicon	publicação
A1	<i>P. cancrivorus</i>	pulmão	<i>P. brasiliensis</i>	Richini-Pereira et al., 2008
A2	<i>S. spinosus</i>	pulmão fígado	<i>Amauroascus aureus</i> ou <i>Metarhizium anisopliae</i> <i>P. brasiliensis</i>	- Richini-Pereira et al., 2008
A3	<i>C. aperea</i>	pulmão, baço, linfonodo mesentérico, rim, adrenal:	<i>P. brasiliensis</i>	Richini-Pereira et al., 2008
A5	<i>G. vittata</i>	pulmão	<i>P. brasiliensis</i>	Richini-Pereira et al., 2008
A14	<i>D. novemcinctus</i>	pulmão, fígado, linfonodo mesentérico, rim	<i>P. brasiliensis</i>	Richini-Pereira et al., 2008
A15	<i>S. spinosus</i>	pulmão	<i>Emmonsia parva</i>	-
A17	<i>C. aperea</i>	pulmão	<i>P. brasiliensis</i>	Richini-Pereira et al., 2008
A18	<i>D. septemcinctus</i>	pulmão, fígado, baço, linfonodo mesentérico	<i>Pichia stipitis</i>	Richini-Pereira et al., 2008
A24	<i>S. spinosus</i>	fígado, baço, linfonodo mesentérico, rim,	<i>P. brasiliensis</i>	-
A26	<i>D. novemcinctus</i>	pulmão, fígado, baço, linfonodo mesentérico, rim	<i>P. brasiliensis</i>	draft capítulo IV
A28	<i>P. cancrivorus</i>	pulmão	<i>Aspergillus flavus</i> ou <i>A. oryzae</i>	-
A37	<i>M. tridactyla</i>	pulmão, baço, linfonodo mesentérico	<i>P. brasiliensis</i>	-
A39	<i>M. tridactyla</i>	pulmão, fígado, baço, linfonodo mesentérico	<i>P. brasiliensis</i>	draft capítulo IV

Discussão:

A estratégia empregada para a detecção molecular em animais atropelados em beiras de estradas vem ao encontro da necessidade de se buscar novas alternativas para o uso de animais em pesquisa, como o indicado pelos comitês de ética em pesquisa animal.

O número de animais mortos em rodovias brasileiras é grande e a cada ano o problema é agravado, principalmente nas rodovias com grande fluxo de automóveis, os quais cortam áreas potencialmente ricas em fauna e flora (FORMAN & ALEXANDER, 1998; RODRIGUES et al., 2002; PRADA, 2004). Desta maneira, os atropelamentos de mamíferos silvestres contribuem para o declínio e dificuldades na recuperação de populações, principalmente aquelas em risco de extinção (TROMBULAK & FRISSEL, 2000). Nos nossos estudos, conseguimos obter uma grande diversidade de espécies de mamíferos silvestres atropelados, incluindo membros de sete das 11 Ordens que ocorrem no Brasil: Artiodactyla (Família Cervidae), Carnivora (Famílias Canidae, Felidae, Mustelidae e Procyonidae), Dideophimorphia (Família Didelphidae), Lagomorpha (Família Leporidae), Rodentia (Famílias Caviidae, Myocastoridae e Erethizontidae), Primata (Família Cebidae) e Xenarthra (Famílias Dasypodidae e Myrmecophagidae). É preciso ressaltar que não foram coletados mamíferos de pequeno porte como os pequenos roedores e também mamíferos voadores como os morcegos, pois estes nem sempre são avistados com frequência e/ou servem de alimento para os animais necrófagos. Um estudo direcionado exclusivamente ao levantamento das espécies de animais atropelados, certamente contribuiria para o fornecimento de subsídios aos órgãos de infra-estrutura viária, na perspectiva de adequar o planejamento das estradas quanto aos cuidados com a fauna.

Estudos de biologia da conservação, utilizando cervídeos atropelados indicam que 75% das mortes nas rodovias são de animais em boa ou excelente condição de saúde (NETTLES et al., 2002). Nos nossos estudos, quando realizada a necropsia, verificou-se que aparentemente não havia alteração macroscópica indicativa de processos patológicos nos órgãos avaliados dos mamíferos silvestres atropelados. Tendo em vista as dificuldades para análises da cultura e histopatologia em tais materiais, essas foram suprimidas pelo uso de ferramentas moleculares sensíveis e específicas que possibilitaram a identificação de patógenos, sem a necessidade de cultivo, como já demonstrado por San-Blas et al. (2002).

Foram avaliados 9 exemplares de Canídeos, pertencentes à espécie *C. thous* (cachorro-do-mato). Este animal pode ser encontrado em vários tipos de ambiente, do cerrado à Mata Atlântica (NOWAK, 1999) e sua abundância é devida, em parte, ao seu hábito alimentar generalista, preferencialmente noturno, deslocando-se por trilhas, em bordas de

mata e sobrevivendo em áreas degradadas e antrópicas (ROCHA et al., 2004). Podem ser observados frequentemente em beiras de estradas à procura de alimentos como os restos de outros animais atropelados, por esse motivo o *C. thous* é a espécie de carnívoro que possui elevado índice de atropelamento (MARINHO-FILHO, 1992; VIEIRA, 1996; PINOWSKI, 2005; CHEREM et al., 2007). Nos nossos estudos, esta espécie foi a mais abundante, porém não houve a detecção de fungos patogênicos neste grupo animal.

Em relação aos membros da família Procyonidae e Mustelidae, obteve-se a detecção de DNA de *P. brasiliensis* em pulmão de dois *P. cancrivorus* (mão-pelada) e um *G. vitatta* (furão). Este fato confirma que a via inalatória é a principal porta de entrada desses fungos (MONTENEGRO & FRANCO, 1994). *P. cancrivorus* é um animal que ocorre nas Américas, habitando florestas equatoriais e tropicais, sempre próximos a rios, brejos, pântanos e mangues. Possui hábitos noturnos, é um bom nadador e escalador. Sua dieta é onívora e consiste basicamente em frutos silvestres, invertebrados e pequenos vertebrados (NOWAK, 1999). A família Mustelidae representada por *E. barbara* (irara) e *G. vitatta* (furão) possui características diferentes. A irara tem hábito arbóreo, são ótimos escaladores, frequentemente vistos em árvores altas. Já o furão, possui hábito terrestre, e é comumente encontrado ocupando tocas de tatus (EISENBERG & REDFORD, 1999).

Um exemplar da família Felidae, representado pela *P. concolor* (onça parda), também mostrou ser negativa para fungos patogênicos. Esta espécie ameaçada de extinção, segundo lista do IBAMA (2003) para o território nacional, foi encontrada morta na SP-300, próximo ao município de Areiópolis, em uma área com plantação de cana-de-açúcar associada a um fragmento de Floresta Estacional Semidecidual. Da mesma forma, na literatura, encontramos achados que indicam que a área de vida dessa espécie em locais com agricultura é comum, porém sua preferência é pela vegetação nativa. Um fato curioso sobre essa espécie foi a constatação, por monitoramento, de travessias rotineiras em um trecho de intenso movimento na Rodovia Anhanguera, tornando-se alvo fácil de atropelamento (MANTOVANI, 2001).

Assim, de uma forma geral, os membros silvestres da Ordem Carnívora, que são biologicamente relacionados ao cão doméstico, representados por 16 indivíduos, apresentou somente a amplificação de DNA para *P. brasiliensis* em pulmão de 3 exemplares conforme descrito pelo nosso grupo (RICHINI-PEREIRA et al., 2008). É conhecido que temperaturas corporais mais elevadas funcionem como uma barreira para o crescimento da maioria dos fungos e que os cães domésticos possuem uma temperatura corporal por volta de 37,5-38,5°C. Esse fato poderia explicar a baixa detecção de *P. brasiliensis* em membros dessa Ordem.

Em relação às Ordens Artiodactyla (1 *M. gouazoubira*-veado), Lagomorpha (1 Leporidae-lebre) e Primata (1 *C. apella*-macaco-prego e 1 *C. penicillata*-sagui), não foi detectada a presença de DNA de fungos, como se trata da avaliação de um exemplar de cada espécie, não se pode concluir que esses grupos de animais não se infectem. Também não foi detectada a presença de DNA de *P. brasiliensis* nas amostras dos 5 exemplares da Ordem Didelphimorphia. Os membros desta ordem, representados por exemplares de *D. albiventris* (gambás), possuem hábito generalista e atualmente ocorre em áreas próximas a habitações, incluindo chácaras, quintais e centros urbanos (CÂMARA & MURTA, 2003). Este animal é considerado como reservatório de várias doenças de potencial zoonótico, incluindo viroses, bacterioses, parasitoses e algumas doenças causadas por fungos (FORRESTER, 1992). Porém, parece que os marsupiais não são frequentemente infectados por *P. brasiliensis* ou este é eficientemente bloqueado e não há disseminação, tornando o *D. albiventris* um hospedeiro improvável deste fungo como já descrito anteriormente (SILVA-VERGARA et al., 2001). *Amplicons* das amostras de tecidos de 2 *D. albiventris* foram obtidas nas reações de PCR, porém não se obteve quantidade suficiente de material amplificado que possibilitasse a purificação e o sequenciamento.

A Ordem Rodentia, foi constituída por 4 exemplares da espécie *S. spinosus* (ouriço-cacheiro), 1 *M. coypus* (ratão-do-banhado) e 3 *C. aperea* (preá). Os ouriços possuem pelos modificados em espinhos que se misturam aos pelos propriamente ditos que revestem a região dorsal. É um animal solitário e arborícola, de hábito crepuscular e noturno e sua dieta constitui-se de frutos, folhas e cascas de árvores (CÂMARA & MURTA, 2003). O animal A24 (ouriço-cacheiro) foi encontrado próximo a Fazenda Experimental Edgárdia, situada em área de Proteção Ambiental localizada na bacia do Rio Capivara no município de Botucatu-SP, com área de aproximadamente 1200 hectares (ha). Possui características de Floresta Estacional Semidecidual com remanescentes florestais pouco alterados e áreas que passaram por vários níveis de perturbações antrópicas, além de ambientes de várzea e cerrado (FONSECA & RODRIGUES, 2000; JORGE & SARTORI, 2002). Possivelmente este animal habitava um fragmento de mata natural existente na fazenda, visto que sua *home range* é de 15-20 ha, e trabalhos caracterizando a mastofauna desta região apontam para uma diversidade de indivíduos de várias ordens incluindo os Rodentia (ALMEIDA et al., 2006). O ratão-do-banhado é frequentemente encontrado em matas de galeria próximo a rios, local apontado como provável hábitat do *P. brasiliensis* e do *B. dermatitidis* (BAUMGARDNER et al., 1995; BAGAGLI et al., 1998), assim torna-se necessário a avaliação de um número maior de exemplares desta espécie. O preá é um animal terrestre e solitário, possui hábito diurno e

noturno, com maior atividade no crepúsculo, normalmente é encontrado próximo a rios e córregos, onde produzem túneis rentes ao solo. Ocupa também áreas próximas de lavouras e beiras de estradas, sendo avistados nesses locais, alimentando-se de gramíneas (MARINHO-FILHO, 1992; NOWAK, 1999). A detecção do DNA de *P. brasiliensis* em três exemplares (2 *S. spinosus* e 1 *C. aperea*) proveniente da área endêmica de PCM (Botucatu, Conchas), em diversos órgãos (fígado, baço, rim, adrenal e linfonodo mesentérico), indica que o fungo venceu a barreira primária, o pulmão, e se disseminou-se.

Assim, a Ordem Rodentia, representada por 8 exemplares, pode representar um novo reservatório de *P. brasiliensis*, visto que em nossos trabalhos encontramos um número crescente de achados positivos (5 de 8 animais avaliados) em diversos órgãos de *C. aperea* (preá) e *S. spinosus* (ouriço-cacheiro). Esse achado corrobora com os já descritos na literatura que demonstra a importância desse grupo animal como reservatório de vários patógenos de potencial zoonótico (ACHA & SZYFRES, 1986). Algumas espécies de roedores são apontadas como reservatórios do *Coccidioides immitis* (EMMONS, 1942), *Penicillium marneffei* (AJELLO et al., 1995; CHARİYALERTSAK et al., 1996) e recentemente foi descrito que roedores *Calomys callosus* são susceptíveis a infecção experimental pelo *P. brasiliensis* (BERBERT et al., 2007).

O resultado obtido do sequenciamento da região ITS-5.8S, utilizando os *primers* universais para fungos ITS4/ITS5, do *amplicon* encontrado no pulmão do A2 (ouriço-cacheiro) evidencia que este animal está exposto a mais de um fungo. A baixa porcentagem de similaridade, 87% e 85%, respectivamente para *Amauroascus aureus* e *Metarhizium anisopliae* pode ser devida a sequência gênica da espécie correspondente ao *amplicon* obtido ainda não tenha sido depositado no GenBank. De qualquer maneira, embora não totalmente conclusivo, o achado do fungo *A. aureus* é um dado interessante, pois trata-se de um fungo membro da família Onygenales (objeto do presente estudo) e ainda pouquíssimo conhecido quanto ao seu significado biológico. Da mesma forma, a detecção de um fungo não patogênico *Pichia stipitis* pode também ser devido a sequência gênica da espécie correspondente ao *amplicon* ainda não ter sido depositado no GenBank, ou talvez possa haver uma relação de simbiose ou comensalismo desse fungo com o preá.

A Ordem Xenarthra foi representada por 8 exemplares, sendo 3 *D. novemcinctus* (tatu galinha), 1 *E. sexcinctus* (tatu-peba), 1 *D. septemcinctus* (tatu de 7 bandas), 1 *T. tetradactyla* (tamanduá-mirim) e 2 *M. tridactyla* (tamanduá-bandeira). São animais terrestres, sendo mais ativos à noite, podendo ser avistados durante o dia andando em busca de alimentos (MARINHO-FILHO, 1992). De maneira geral, essas espécies possuem

movimentação lenta e são pouco ágeis, além de terem a audição apenas medianamente acurada e a visão relativamente pouco desenvolvida, motivo pelo qual podem ser cegadas pelos faróis dos carros ao cruzarem as rodovias (MELO & SANTOS-FILHO, 2007).

Os tatus possuem hábito fossorial-terrestre, crepuscular/noturno. São sociais e passam a vida construindo tocas, geralmente subterrâneas e cavoucando o solo à procura de alimentos. Possuem hábito alimentar: a) Carnívoro-onívoros - gênero *Euphractus* (tatu-peba) que se alimentam preferencialmente de pequenos vertebrados e invertebrados e algumas vezes de raízes; b) Insetívoros generalistas terrestres - gênero *Dasypus* (tatu-galinha) que se alimentam de besouros, formigas, caracóis entre outros (FELDHAMMER et al., 1999).

O tamanduá-mirim vive em florestas, savanas e cerrados desde o leste das Cordilheiras dos Andes até Venezuela e Trinidad e do norte da Argentina até o sudeste do Brasil. Esta espécie possui hábitos tanto noturnos como diurnos, preferindo o dia para descansar normalmente alojado em buracos nas árvores, assim como hábito terrícola como arborícola, preferindo o segundo. Sua *home range* é de aproximadamente 3,75Km². Quando em situação de ataque, fica apoiado num tripé, formado pelas patas traseiras e pela cauda, golpeando com as garras dos membros anteriores e expelindo um odor fétido (NOWAK, 1999).

No Brasil, o tamanduá-bandeira ocorre na região do Amazonas e Planalto Central até o Cerrado e as bordas da Mata Atlântica nos estados de São Paulo e Paraná. É o maior animal vivo na ordem Xenartra, podendo chegar a 1,20m de comprimento, sendo acrescido 60-90cm de cauda, que é peluda e adquire o formato de uma bandeira. As garras dos membros anteriores são mais desenvolvidas em relação às garras dos membros posteriores, uma vez que as utilizam para abrir formigueiros e cupinzeiros. São animais sociais e silenciosos, de hábitos crepusculares a noturnos. Sua *home range* varia de 9Km² até 25Km² (NOWAK, 1999).

Existem fortes evidências que o número de tatus atropelados seja ainda maior do que o número refletido pelos exemplares coletados, pois os funcionários do DER relatam que é comum ver esses animais atravessando as rodovias da região de Botucatu, principalmente o trecho inicial da Rodovia SP-209, popularmente chamada de Castelinho, trecho caracterizado pela presença de remanescentes florestais envoltos por plantio de Eucalipto. O fato de não encontrarmos um número maior desta espécie atropelado pode ser relacionada ao fato da carne de tatu ser muito apreciada, sendo que animais recém atropelados podem ser retirados rapidamente das rodovias para o consumo humano.

O resultado positivo de detecção de DNA de *P. brasiliensis* em 5 de 8 animais

avaliados confirma a alta frequência de infecção em tatus, como já descrito anteriormente por vários autores (NAIFF et al., 1986, 1989; BAGAGLI et al., 1998, 2003; CORREDOR et al., 1999; MACEDO et al., 1999; RESTREPO et al., 2000; SILVA-VERGARA et al., 2000; CORREDOR et al., 2005). Por outro lado, a não detecção em tatu-peba pode ser devido ao hábito alimentar e hábitat um pouco diferente do tatu-galinha. O tatu-peba alimenta-se de restos de animais mortos no solo e suas tocas são construídas em ambientes mais secos e em campos abertos (NOWAK, 1999). O achado inédito de detecção molecular de *P. brasiliensis* em tamanduás indica que este patógeno pode ocorrer em outras espécies de Xenarthras de hábito terrestre, reforçando a importância desse grupo animal como sentinelas epidemiológicas na determinação de áreas de ocorrência do fungo.

A amostra de pulmão do tatu A14 foi visualizada na reação de PCR com duas bandas, as quais foram purificadas e sequenciadas, confirmando que um *amplicom* tratava-se de *P. brasiliensis* e o outro proporcionou a detecção de DNA de *Emmonsia parva*. As espécies *E. parva* e *E. crescens* são as principais causadoras da adiaspiromicose, uma micose sistêmica que, ao contrário das micoses causadas por fungos Onygenales, não se dissemina no hospedeiro, ficando restrita ao tecido pulmonar. O gênero *Emmonsia* pertence à família Onygenaceae (*senso lato*), na qual estão inclusos os demais fungos patogênicos dimórficos causadores das principais micoses sistêmicas. Caracteristicamente, os principais patógenos da família Onygenaceae apresentam distribuição geográfica localizada, concentrando-se principalmente nas Américas, porém a distribuição geográfica de *Emmonsia* é cosmopolita. Como observado nos demais fungos dimórficos pertencentes à ordem Onygenales, o solo também parece constituir o principal hábitat da *Emmonsia* spp. Estudos mostram que sua ocorrência está relacionada com locais de mata fechada, com abundância de restos vegetais (HUBALEK et al., 1998). Vários trabalhos relatam a presença deste fungo em roedores silvestres e domésticos (ZLATANOV & GENOV, 1975, HUBALEK et al., 1998), carnívoros (KRIVANEC et al., 1980) e tatus (SANTOS, 1999). Tocas de roedores têm sido indicadas como os principais habitats deste fungo, uma vez que está presente no solo e é frequentemente encontrado nestes animais. Assim, nosso achado de infecção concomitante de *P. brasiliensis* e *Emmonsia parva* em tatus na nossa região é inédito e ainda pouco explorado.

Os dados sobre a análise da associação entre animais infectados e as diversas variáveis ecológicas (característica de solo, localização geográfica e precipitação média anual) indicam que embora as características do solo e precipitação média anual não aparente ser diretamente associada com animais positivos ou negativos, alguns fatores parecem estar associados com a presença do *P. brasiliensis*. Por exemplo, o hábito dos animais em construir

tocas e/ou utilizarem as dos tatus e também a proximidade a locais com permanência de umidade.

Em resumo, os resultados aqui obtidos mostram a problemática da larga ocorrência de animais silvestres atropelados em nossas estradas, ao mesmo tempo que enfatiza sobre o aproveitamento deste importante recurso biológico para o estudo da eco-epidemiologia de patógenos fúngicos.

Conclusões

- os animais silvestres mortos por atropelamento são importantes sinalizadores da presença de diversos fungos na natureza;

- o isolamento de *P. brasiliensis* de tatus em áreas geograficamente definidas, confirma a alta frequência deste patógeno nestes animais;

- a utilização do sistema de informação geográfica é uma ferramenta útil para a caracterização ambiental das áreas de ocorrência do *P. brasiliensis*;

- a utilização de ferramentas moleculares sensíveis e específicas são úteis para estudos epidemiológicos de detecção de fungos patogênicos Onygenales em amostras de tecido de animais.

Referências

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 2. ed. Washington: EUA, 1986. 989p.

AJELLO, L.; PADHYE, A.A.; SUKROONGREUNG, S.; NILAKUL, C.H.; TANTIMAVANIC, S. Occurrence of *Peniciliun marneffe* infections among wild bamboo rats in Thailand. **Mycopathologia**, v. 131, p. 1-8, 1995.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4. ed. New York: Wiley, 1996.

ALMEIDA, I.G.; GRIESE, J.; DELÍCIO, H.C.; CARELLI, F. Caracterização da mastofauna de médio e grande porte da mata do IB – Fazenda Experimental Edgardia – Botucatu-SP. In: CONGRESSO INTERNACIONAL SOBRE MANEJO DE FAUNA SILVESTRE NA AMAZÔNIA E AMÉRICA LATINA, 7., 2006, Ilhéus. **Anais...** Ilhéus, 2006, p. 340.

ANDERSON, I.C.; CHAMBERS, S.M.; CAIRNEY, W.G.J. ITS RFLP and ITS sequence diversity in *Pisolithus* from central and eastern Australian sclerophyll forests. **Mycol. Res.**, v. 11, p. 1304-1312, 2001.

BAGAGLI, E.; SANO, A.; COELHO, K.I.; ALQUATI, S.; MIYAJI, M.; CAMARGO, Z.P.; GOMES, G.M.; FRANCO, M.; MONTENEGRO, M.R. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus noveminctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 58, p. 505-512, 1998.

BAGAGLI, E.; FRANCO, M.; BOSCO, S.M.G.; HEBELER-BARBOSA, F.; TRINCA, L.A., MONTENEGRO, M.R. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus noveminctus*): an ecological study. **Med. Mycol.**, v.41, p. 217-223, 2003.

BAGAGLI, E.; BOSCO, S.M.G.; THEODORO, R.C., FRANCO, M. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. **Infect. Gen. Evol.**, v.6, p. 344-351, 2006.

*ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação – Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22p.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **List of journals indexed in Index Medicus**. Washington, 2001. 240p.

- BAPTISTA-ROSAS, R.C.; HINOJOSA, A.; RIQUELME, M. Ecological niche modeling of *Coccidioides* spp. in western North American deserts. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1111, p. 35-46, 2007.
- BAUMGARDNER, D.J.; PARETSKY, S.P.; YOPP, A.C. The epidemiology of blastomycosis in dogs: north central Wisconsin, USA. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 33, p. 171-176, 1995.
- BECK, L.R.; RODRIGUEZ, M.H.; DISTER, S.W. Remote sensing as a landscape epidemiologic tool to identify villages at high risk for malaria transmission. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 51, p. 271-280, 1994.
- BERBERT, A.L.C.V.; FARIA, G.G.; GENNARI-CARDOSO, M.L.; SILVA, M.M.M.D.; MINCO, J.R.; LOYOLA, A.M. Histological and serological evidence of experimental paracoccidioidomycosis in *Calomys callosus* (Rodentia: Cricetidae). **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 88, p. 55-62, 2007.
- 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. 3190-3193, 2000.
- BOSCO, S.M.G.; ROSA, P.S.; SIMÕES, L.B.; THEODORO, R.C.; MACORIS, S.A.G.; PEREIRA Jr, H.R.J.; FRANCO, M.; BAGAGLI, E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* DNA in stool and tissue samples of naturally infected armadillos. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 47, supl. 4, p. 62, 2005.
- BOWMAN, B. A Model PCR/Probe system for the identification of fungal pathogen. In: PERSING, D.H.; SMITH, T.F.; TENOVER, F.C.; WHITE, T.J. **Diagnostic molecular microbiology-principles and applications**. Washington, D.C: American Society for Microbiology, cap. 3, p. 423-430.
- BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin Microbiol Rev.**, v.6, p. 89-117, 1993.

- CADAVID, D.; RESTREPO, A. Factors associated with *Paracoccidioides brasiliensis* infection among permanent residents of three endemic areas in Colombia. **Epidemiol. Infect.**, v.111, p.121-133. 1993.
- CALICH, V.L.; SINGER-VERMES, L.M.; SIQUEIRA, A.M.; BURGER, E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Br. J. Exp. Pathol.**, v. 66, p. 585-594, 1985.
- CALICH, V.L.; FAZIOLI, R.A.; KASHINO, S.S.; BURGER, E.; SINGER-VERMES, L.M. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* in mice is controlled by a single dominant autosomal gene. **Infect. Immun.**, v. 55, p. 1919-1923, 1987
- CÂMARA, T.; MURTA, R. **Mamíferos da Serra de Cipó**. PUC – Minas. Museu de Ciências Naturais, 2003, 129p.
- CAMARGO, Z.P.; FRANCO, M.F. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 17, p. 41-48, 2000.
- CAMARGO, Z.P. Serology of paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 165, p. 289-302, 2008.
- CANDIDO Jr, J.F.; MARGARIDO, V.P.; PEGORARO, J.L.; D'AMICO, A.R.; MADEIRA, W.D.; CASALE, V.C.; ANDRADE, L. Animais atropelados na rodovia que margeia o Parque Nacional do Iguaçu, Paraná, Brasil, e seu aproveitamento para estudos da biologia da conservação In: CONGRESSO BRASILEIRO DE UNIDADES DE CONSERVAÇÃO, 3., Fortaleza. **Anais...** Fortaleza, 2002. p. 553-562.
- CHAKRABARTI, A. Microbiology of systemical fungal infections. **J. Postgrad. Med.**, v. 51 supl. 1, p. 16-20, 2005.
- CHARIYALERTSAK, S.; VANITTANAKOM, P.; NELSON, K.E.; SIRISANTHANA, T.; VANITTANAKOM, N. *Rhizomys sumatrensis* and *Cannomys badius*, new natural animal hosts of *Penicillium marneffeii*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 34, p. 105-110, 1996.
- CHEREM, J.J.; KAMMERS, M.; GHIZONI-JR., I.R.; MARTINS, A. Mamíferos de médio e grande porte atropelados em rodovias do Estado de Santa Catarina, sul do Brasil. **Biotemas**,

v. 20, p. 81-96, 2007.

CONTI-DÍAZ, I.A.; ALVAREZ, B.J.; GEZUELE, E.; GONZÁLEZ MARINI, H.; DUARTE, J.; FALCÓN, J. Intradermal reaction survey with paracoccidioidin and histoplasmin in horses. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 14, p. 372-376, 1972.

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 *Dasyus noveminctus*, in a endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 16, p. 216-220, 1999.

CORREDOR, G.G.; PERALTA, L.A.; CASTAÑO, J.H.; ZULUAGA, J.S.; HENAO, B.; ARANGO, M.; TABARES, A.M.; MATUTE, D.R.; McEWEN, J. The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. **Med. Mycol.**, v. 43, p. 275-280, 2005.

CORTE, A.C.; SVOBODA, W.K.; NAVARRO, I.T.; FREIRE, R.L.; MALANSKI, L.S.; SHIOZAWA, M.M.; LUDWIG, G.; AGUIAR, L.M.; PASSOS, F.C.; MARON, A.; CAMARGO, Z.P.; ITANO, E.N.; ONO, M.A. Paracoccidioidomycosis in wild monkeys from Paraná State, Brazil. **Mycopathologia**, v. 164, p. 225-228, 2007.

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. 127-130, 1995

COYNER, D.F.; WOODING, J.B.; FORRESTER, D.J. A comparison of parasitic helminthes and arthropods from two subspecies of fox squirrels (*Sciurus niger*) in Florida, **J. Wildl. Dis.**, v. 32, p. 492-497, 1996.

EISENBERG, J.F.; REDFORD, K. **Mammals of the Neotropics**. The University of Chicago Press, Chicago and London, 1999, 460p.

EMMONS, C.W. Isolation of *Coccidioides* from soil and rodents. **Public Health Rep.**, v. 57, p. 109-111, 1942.

ESTEVE-ZANZOSO, B.; BELLOCH, C.; URUBURU, F.; QUEROL, A. Identification of yeasts by RFLP analysis of 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 49, p. 329-337, 1999.

FAGUNDES, R.Q. **Pesquisa da PCM em cães (*Canis familiaris*) na região endêmica de Botucatu, São Paulo**. 2002. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

FARIAS, M.R.; WERNER, J.; MURO, M. D.; MARQUES, S.A.; MARQUES, M.E.A.; FRANCO, M.F.; RIBEIRO, M.G.; CUSTODIO, C. C.; CONDAS, L.A.Z.; BOSCO, S.M.G.; BAGAGLI, E. Canine paracoccidioomycosis: case report of generalized lymphadenitis. In: ENCONTRO INTERNACIONAL SOBRE PARACOCCIDIOOMICOSE, 9., 2005, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia, 2005.

FELDHAMMER, G.A.; DRICKAMER, L.C.; VESSEY, S.H.; MERRITT, J.F. **Mammalogy adaptation, diversity and ecology**. The McGraw-hill Companies, Inc, 1999.

FELIPE, M.S.; ANDRADE, R.V.; ARRAES, F.B.; NICOLA, A.M.; MARANHÃO, A.Q.; TORRES, F.A.; SILVA-PEREIRA, I.; POCAS-FONSECA, J.J.; CAMPOS, E.G.; MORAES, L.M.; ANDRADE, P.A.; TAVARES, A.H.; SILVA, S.S.; KYAW, C.M.; SOUZA, D.P.; PEREIRA, M.; JESUÍNO, R.S.; ANDRADE, E.V.; PARENTE, J.A.; OLIVEIRA, G.S.; BARBOSA, M.S.; MARTINS, N.F.; FACHIN, A.L.; CARDOSO, R.S.; PASSOS, G.A.; ALMEIDA, N.F.; WALTER, M.E.; SOARES, C.M.; CARVALHO, M.J.; BRIGIDO, M.M. Transcriptional profiles of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in mycelium and yeast cells. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 24706-24714, 2005.

FONSECA, R.C.B.; RODRIGUES, R.R. Structural analysis and aspects of the successional mosaic of a semi-deciduous forest, in Botucatu (São Paulo State, Brazil). **Scientia Forestalis**, v. 57, p. 27-43, 2000.

FORMAN, R.T.T.; ALEXANDER, L. Roads and their major ecological effects. **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, v. 29, p. 201-231, 1998.

FORRESTER, D.J. **Parasites and diseases of wild mammals in Florida**. University Press of Florida, 1992, 459p.

- FOSTER, G.W.; MAIN, M.B.; KINSELLA, J.M.; DIXON, L.M.; TERRELL, S.P.; FORRESTER, D.J. Parasitic helminths and arthropods of coyotes (*Canis latrans*) from Florida, USA. **Comp. Parasitol.**, v. 70, p. 162-166, 2003.
- FRANCO, M.; PERAÇOLI, M.T.; SOARES, A.; MONTENEGRO, R.; MENDES, R.P.; MEIRA, D.A. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. **Curr. Top. Med. Mycol.**, v. 5, p. 115-149, 1993.
- FRANCO, M.; BAGAGLI, E.; SCAPOLIO, S.; LACAZ, C.S. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. **Med. Mycol.**, v. 38, p. 185-191, 2000.
- GRIESE, J. **Helmintofauna de vertebrados atropelados em rodovias da região de Botucatu, São Paulo**. 2007. 68 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- GOMES, G.M.; CISALPINO, P.S.; TABORDA, C.P.; CAMARGO, Z.P. PCR for diagnosis of Paracoccidioidomycosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p. 3478-3480, 2000.
- GROSE, E.; TAMSITT, J.R. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia, S.A. **Sabouraudia**, v. 4, p. 124-125, 1965.
- HAWKSWORTH, D. The magnitude of fungal diversity the 1.5 million species estimate revisited. **Mycol. Res.**, v. 105, p. 1422-1432, 2001.
- 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. 5735-5737, 2003.
- HENRY, T.; IWEN, P.C.; HINRICHS, S.H. Identification of *Aspergillus* species using internal transcribed spacer regions 1 and 2. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, p.1510-1515, 2000.
- 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. 309-314, 2001.

- HUBALEK, Z.; NESVADBOVA, J.; HALOUZKA, J. Emmonsiosis of rodents in an agroecosystem. **Med. Mycol.**, v. 36, p. 387-90, 1998.
- IMAI, T.; SANO, A.; MIKAMI, Y. A new PCR primer for the identification of *Paracoccidioides brasiliensis* based on rRNA sequences coding the internal transcribed spacers (ITS) and 5.8 regions. **Med. Mycol.**, v. 38, p.323-326, 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.
- JORGE, L.A.B.; SARTORI, M.S. Uso do solo e análise temporal da ocorrência de vegetação natural na Fazenda Experimental Edgardia, em Botucatu-SP. **Rev. Árvore**, v.26, p. 585-592, 2002.
- KRIVANEC, K.; OTCENASEK, M.; SLAIS, J. Adiaspiromycosis in large free living carnivores. **Mycopathologia**, v. 71, p. 125-126, 1980.
- LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. **Tratado de Micologia Médica Lacaz**. São Paulo: Sarvier, 2002.
- 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. 1656-1659, 1987.
- MACEDO, R.C.L.; LAZERA, M.S.; TRILLES, L.; BULCÃO, A.S.; SILVA, N.J.JR.; OLIVEIRA, N.A.; WANKE, B. *Paracoccidioides brasiliensis*-Infecção natural em tatus. Estudo em Serra da Mesa, Goiás, Brasil. In: INTERNATIONAL MEETING ON PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS, 7., 1996, . Campos do Jordão. **Resumos...**São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 1999. p. D-06.
- MANTOVANI, J.L. **Telemetria convencional e via satélite na determinação das áreas de vida de três espécies de carnívoros da região nordeste do estado de São Paulo**. 2001. 118 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

- MARINHO-FILHO, J. Mamíferos da Serra do Japi. IN: MORELLATO, L. PATRÍCIA C. **História Natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no sudeste do Brasil**. UNICAMP/FAPESP: Campinas, 1992. p 264 – 287.
- McEWEN, J.G.; BEDOYA, V.; PATINO, M.M.; SALAZAR, M.E.; RESTREPO, A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 25, p. 165-175, 1987.
- MEDOFF, G.; PAINTER, A.; KOBAYASHI, G.S. Mycelial-to yeast-phase transitions of the dimorphic fungi *Blastomyces dermatitidis* and *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Bacteriol.**, v. 169, p. 4055-4060, 1987.
- MELO, E.S.; SANTOS-FILHO, M. Efeitos da BR-070 na província serrana de Cáceres, Mato Grosso, sobre a comunidade de vertebrados silvestres. **Rev. Bras. Zootecias**, v. 9, p. 185-192, 2007.
- MONTENEGRO, M.R.; FRANCO, M. Pathology. In. FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G. (Eds.) **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC Press, 1994, p. 131-150.
- MOSS, M.O. Fungal biotechnology roundup. **Mycologist**, v. 21, p. 55-58, 1987.
- MOTOYAMA, A.B.; VENANCIO, E.J.; BRANDÃO, G.O.; PETROFEZA-SILVA, S.; 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. 3106-3109, 2000.
- NAIFF, R.D.; FERREIRA, L.C.P.; BARRETE, T.V.; NAIFF, M.F.; ARIAS, J.R. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 28, p. 19-27, 1986.
- NAIFF, R.D.; BARRET, T.V. Novos registros de *P. brasiliensis* em tatus (*D. novemcinctus*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA, 1989, Rio de Janeiro. **Proceedings...** Rio de Janeiro, 1989. p.197.
- NELDER, M.P.; REEVES, W.K. Ectoparasites of road-killed vertebrates in South Carolina, USA. **Vet. Parasitol.**, v. 129, p. 313-322, 2005.

- NETTLES, V.F.; QUIST, C.F.; LOPEZ, R.R.; WILMERS, T.J.; FRANK, P.; ROBERTS, W.; CHITWOOD, S.; DAVIDSON, W.R.; Morbidity and mortality factors in key deer (*Odocoileus virginianus clavium*). **J. Wildl. Dis.**, v. 38, p. 685-692, 2002.
- NOWAK, R.M. **Walker's mammals of the world**. 6 ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 1999, 836p.
- ONO, M.A.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; MORAIS, H.S.A.; TRAPPS, S.M.; BELITARDO, D.R.; CAMARGO, Z.P. Canine paracoccidiodomycosis: a seroepidemic study. **Med. Mycol.**, v. 39, p. 277-282, 2001.
- 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. 2918-2925, 1998.
- PINOWSKI, J. Roadkills of vertebrates in Venezuela. **Rev. Bras. Zootec.**, v. 22, p. 191-196, 2005.
- PRADA, C.S. **Atropelamento de vertebrados silvestres em uma região fragmentado do nordeste do estado de São Paulo: quantificação do impacto e análise de fatores envolvidos**. 2004. 129 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- PUCCIA, R.; McEWEN, J.G.; CISALPINO, P.S. Diversity in *Paracoccidioides brasiliensis*. The PbGP43 gene as a genetic marker. **Mycopathologia**, v. 165, p. 275-287, 2008.
- PURTILO, D.T.; WALSH, G.P.; STORRS, E.E.; GANNON, C. The immune system of the nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus* Linn). **Anat. Rec. Philad.**, v. 181, p. 725-734, 1975.
- REED, K.D.; MEECE, J.K.; ARCHER, J.R.; PETERSON, A.T. Ecologic niche modeling of *Blastomyces dermatitidis* in Wisconsin. **PLoS ONE**, v. 3, p. 2034, 2008.
- RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Sabouraudia**, v. 23, p. 323-324, 1985.

- RESTREPO, A. Mycosis in Colombia. A review of the national literature. **Torax**, v. 17, p. 99-103, 1986.
- 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 Jr., C.R.; MCGINNIS, M.R.; LAZERA, M.S.; BARBOSA, F.H.; BOSCO, S.M.; 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, A.; McEWEN, J.G.; CASTAÑEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Med. Mycol.**, v. 39, p. 233-241, 2001.
- RICCI, G.; MOTA, F.T.; WAKAMATSU, A. Canine paracoccidioidomycosis. **Med. Mycol.**, v. 42, p.379-383, 2004.
- RICHINI-PEREIRA, V.B.; BOSCO, S.M.G.; GRIESE, J.; THEODORO, R.C.; MACORIS, S.A.G.; SILVA, R.J.; BARROZO, L.; TAVARES, P.M.S.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R.M. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. **Med. Mycol.** v. 46, p. 35-40, 2008.
- ROCHA, V.J.; REIS, N.R.; SEKIAMA, M.L. Dieta e dispersão de sementes por *Cerdocyon thous* (Linnaeus) (Carnívora, Canidae), em um fragmento florestal no Paraná, Brasil. **Rev. Bras. Zoo.**, v. 21, p. 871-876, 2004.
- RODRIGUES, F.H.G.; HASS, A., REZENDE, L.M.; PEREIRA, C.S.; FIGUEIREDO, D.F.; LEITE, B.F.; FRANÇA, F.G.R. Impacto de rodovias sobre a fauna da estação ecológica de Águas Emendadas, DF. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE UNIDADES DE CONSERVAÇÃO, 3., 2002, Fortaleza. **Anais...**, Fortaleza, 2002, p. 585-593.
- ROGERS, D.; RANDOLPH, S. Mortality rates and population of tsetse flies correlated with satellite imagery. **Nature**, v. 351, p. 739-741, 1991.

- SAN-BLAS, G. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 31, p. 99-113, 1993.
- SAN-BLAS, G.; NINO-VEGA, G.; ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to mophogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med. Mycol.**, v. 40, p. 225-242, 2002.
- SAN-BLAS, G.; NINO-VEGA, G.; BARRETO, L.; HEBELER-BARBOSA, F.; BAGAGLI, E.; OLIVERO DE BRICENO, R.; MENDES, R.P. Primer for clinical detection of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, p. 4255-4257, 2005.
- SANTOS, V.M. Culture development and morphological diagnosis of *Emmonsia crescens* in armadillos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 32, p. 307, 1999.
- SILVA-VERGARA, M.L.; MARTÍNEZ, R.; CAMARGO, Z.P. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillo (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. **Med. Mycol.**, v. 38, p. 185-191, 2000.
- SILVA-VERGARA, M.L.; MARTINEZ, R.; MALTA, M.H.B.; RAMIREZ, L.E.; FRANCO, F.A. The marsupial *Didelphis albiventris* is an improbable host of *Paracoccidioides brasiliensis* in an endemic area of Paracoccidioidomycosis in Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 771-772, 2001.
- 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(6), p. 517-523, 2004.
- TABORDA, P.R.; TABORDA, V.A.; McGinnis, M.R. *Lacazia loboi* gen. nov., comb. nov., the etiologic agent of lobomycosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 2031-2033, 1999.
- TAYLOR, J.W.; JACOBSON, D.J.; KROKEN, S.; KASUGA, T.; GÊISER, D.M.; HIBBETT, D.S.; FISHER, M.C. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. **Fungal Gen. Biol.**, v. 31, p. 21-32, 2000.
- THEODORO, R.C.; CANDEIAS, J.M.G.; ARAÚJO Jr.; J.P.; BOSCO, S.M.G.; MACORIS, S.A.G.; PADULA Jr., L.O. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. **Med.**

Mycol., v.43, p. 725-729, 2005.

TROMBULAK, S.C., FRISSEL, C.A. Review of ecological effects of roads on terrestrial and aquatic communities. **Conserv. Biol.**, v. 1, p. 18-30, 2000.

UETAKE, Y.; ARAKAWA, M.; NAKAMURA, H.; AKAHIRA, T.; SAYAMA, A.; CHEAH, L.H.; OKABE, I.O.; MATSUMOTO, N. Genetic relationship among violet root rot fungi as revealed by hyphal anastomosis and sequencing of the rDNA ITS regions. **Mycol. Res.**, v. 106, p. 156-163, 2002.

ULRICH, M.; CONVIT, J.; CENTENO, M.; RAPETTI, M. Immunological characteristics of the armadillo, *Dasypus sabanicola*. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 25, p. 170-176, 1976.

UNTEREINER, W.A.; SCOTT, J.A.; NAVEAU, F.A.; SIGLER, L.; ANGUS, J.B.A. The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales. **Mycologia**, v. 96, p. 812-821, 2004.

VALERA, E.T.; MORI, B.M.; ENGEL, E.E.; COSTA, I.S.; BRANDÃO, D.F.; NOGUEIRA-BARBOSA, M.H.; QUEIROZ, R.G.; SILVEIRA, V.S.; SCRIDELI, C.A.; TONE, L.G. Fungal infection by *Paracoccidioides brasiliensis* mimicking bone tumor. **Pediatr. Blood Cancer**, v. 50, p. 1284-1286, 2008.

VIEIRA, E.M. Highway mortality of mammals in central Brazil. **Ciênc. Cult.**, v. 48, p. 270-271, 1996.

ZLATANOV, Z.; GENOV, T. Isolation of *Emmonsia crescens* et Jellison 1960 from small mammals in Bulgaria. **Mycopathol.**, v.56, p. 1-3, 1975.

WANKE, B.; LONDERO, A.T. Epidemiology and Paracoccidioidomycosis Infection. In: FRANCO, M.F.; LACAZ, C.S.; RESTREPO, A.; DEL NEGRO, G. (Eds.). **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC Press, 1994. cap.7, p. 109-120.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Eds.), **PCR Protocols: A guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press. 1990. p. 315-322.