Instituto de Biociências

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

PG-BGA

Detecção de *Paracoccidioides* sp. em amostras ambientais aerossóis

THALES DOMINGOS ARANTES

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia de Parasitas e Microorganismos*.

Orientador: Prof. Titular Eduardo Bagagli

BOTUCATU – SP

2012

Instituto de Biociências
unesp
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu
PG-BGA

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Detecção de *Paracoccidioides* sp. em amostras ambientais aerossóis

THALES DOMINGOS ARANTES
RAQUEL CORDEIRO THEODORO
SEVERINO ASSIS DA GRAÇA MACORIS
EDUARDO BAGAGLI

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia de Parasitas e Microorganismos*.

Orientador: Prof. Titular Eduardo Bagagli

BOTUCATU – SP

2012

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

Arantes, Thales Domingos.
Detecção de *Paracoccidioides* sp. em amostras ambientais aerossóis / Thales Domingos Arantes. – Botucatu : [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2012
Orientador: Eduardo Bagagli
Capes: 2120100

1. *Paracoccidioides brasiliensis*. 2. Paracoccidioidomicose.

Palavras-chave: Amostras ambientais; Amostrador ciclônico; *Paracoccidioides brasiliensis*; Paracoccidioidomicose.

Agradecimentos

Quero agradecer a toda minha família, minha mãe, Tia Marlene, Talita, "Thor", por sempre acreditarem em mim, mesmo nos momentos difíceis e conturbados no decorrer deste mestrado, sempre me apoiando e me dando forças para continuar e seguir meu caminho. Obrigado, amo muito vocês!

Aos amigos do Dep. de Doenças Tropicais, onde passei dois anos de muito trabalho e grandes alegrias, obrigado.

Carlinhos (Fião), obrigado por sua amizade nesses anos, amigo para todas as horas... você é o cara!

Aos amigos da República Ventania, Du, Renato, Vinícius, Simonilha, Flá, Nat, Michele, Xibaba, véia da rep. e chupeta, obrigado por estarem comigo sempre, foram os melhores anos da minha vida ao lado de verdadeiros amigos e irmãos... para sempre.

Ao Prof. Eduardo Bagagli que ao longo do mestrado acreditou em mim, depositando sua fé e trabalho, mesmo para um projeto audacioso e inédito... tenho você como um bom amigo! Obrigado Eduardo.

Ao amigos do Laboratório de Biologia de Fungos-IBB, Tâmara (chuck), Gabriel (Lacrimoso e Mãozinha), Ariane (Palmirinha), Thiago (Marido), Juliana G. (Cabelo do Carrapicho), Juliana R. (Pag-Leve), Tarsila (Tarsilão), Mariana (Piruca), Raquel (Grozéia), Profa. Sandra, muito obrigado, devo tudo o que aprendi ao longo do mestrado a vocês, grandes amigos, que me receberam de braços abertos no laboratório e me apoiaram muito! Valeu!

Ao amigo Assis, pelo apoio ao longo do trabalho, foram muitas coletas em campo, tatu e hamsters, ferros, aulas e mais PCRs, aprendi muito com você meu amigo! Obrigado.

A minha namorada e amiga Raquel, pelo apoio nesta pesquisa e em minha vida, sempre me ajudando independente da situação... muito obrigado. Neste mestrado aprendi muito com a pesquisa, mas também aprendi com a vida e com você, obrigado, te amo!

Aos amigos do Departamento de Micro/Imuno, Lula (presidente), Ademival, Carlos (Charrrles), Taísa, Sônia, Nice, Prof. Silvio e aos demais amigos e docentes, muito obrigado.

Ao Dr. Brett Green e ao CDC de Morgentown-USA, por conceder o equipamento de amostragem ciclônica para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos da Fazenda Lageado, João e Bidias, obrigado por me ajudarem nas coletas e captura do animal, obrigado pelas conversas matinais e causos contados... bons tempos... muito obrigado!

Ao amigo Marcos, muito obrigado por sua amizade! Valeu meu velho!

Obrigado a Profa. Terue, que durante o mestrado sempre me apoiou muito e me ajudou a entender que bons professores derivam de ótimas pessoas dentro e fora da instituição! Obrigado Teruca!

"Não sou religioso, mas acredito no amor divino! Sou a soma de uma vida de amizades e amores incondicionais... nessa vida para que o mal triunfe basta que os bons não façam nada, busco fazer minha parte da melhor forma possível, obrigado a Deus e a todos!."

SUMÁRIO

Capítulo 01 – Revisão - Ecologia do *Paracoccidioides brasiliensis:* Análise histórica de isolamento ambiental, atualidades e perspectivas

1. O AGENTE *Paracoccidioides brasiliensis*.....01

2. A DOENÇA PARACOCCIDIOIDOMICOSE (PCM).....04

3. RELATOS DOS ISOLAMENTOS AMBIENTAIS DE *P. brasiliensis*.....07

4. TÉCNICAS PARA ISOLAMENTO E DETECÇÃO AMBIENTAL.....14

4.1. DETECÇÃO MOLECULAR.....14

4.2. AMOSTRAGEM E DETECÇÃO EM AEROSSÓIS.....16

4.3. ISOLAMENTO POR CULTIVO DIRETO.....21

5. PARACOCCIDIOIDOMICOSE EXPERIMENTAL.....22

6. PERSPECTIVAS PARA O ESTUDO ECOLÓGICO DO GÊNERO *Paracoccidioides*.....24

7. REFERÊNCIAS.....27

Capítulo 02 – Artigo Submetido

Detecção de *Paracoccidiodes* sp. em amostras ambientais aerossóis.....37

Capítulo 01 – Revisão - Ecologia do *Paracoccidioides brasiliensis:* Análise histórica de isolamento ambiental, atualidades e perspectivas.

1. O AGENTE *Paracoccidioides brasiliensis*

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (SPLENDORE 1910 & ALMEIDA 1930), foi relatado pela primeira vez, em 1908, por Adolfo Lutz, que reconheceu a natureza fúngica do agente causador de uma nova micose no homem. *P. brasiliensis* pertence ao filo Ascomycota, sendo caracterizado como agente da mais importante micose sistêmica da América Latina, a paracoccidioidomicose (BRUMMER et al., 1993). Trata-se de um fungo termodimórfico, com apresentação de sua forma micelial à temperatura ambiente e leveduriforme a 35ºC. A forma micelial é produtora dos esporos infectantes ou conídios, que quando inalados pelos hospedeiros susceptíveis e estando em condições ideais de temperatura entre 35 e 37ºC e de disponibilidade de nutrientes, se transformam em células individualizadas (leveduras) com multi-brotamentos, forma normalmente encontrada nos tecidos dos hospedeiros susceptíveis, causando a doença (LACAZ et al., 2002). A população mais acometida pela doença nas áreas endêmicas são trabalhadores rurais, que ao manipular o solo, geram aerossóis contendo conídios fúngicos, os quais são assim inalados (FRANCO et al., 2000).

O *P. brasiliensis* tem seu habitat (local físico e geográfico de distribuição) provavelmente localizado no solo, mas seu nicho ecológico (somatório de todas as interações do microrganismo com os fatores bióticos e abióticos do meio) ainda não foi corretamente determinado, o que impede um melhor conhecimento da forma e do momento exato que os indivíduos são infectados pelo patógeno (BALABANOV et al., 1964).

Por algum tempo este fungo foi considerado um fungo imperfeito por sua fase sexual não ter sido detectada. Contudo, nos últimos anos, com os avanços de técnicas moleculares, *P. brasiliensis* foi colocado na família Onygenaceae (Onygenales Ordem, Ascomycota), no mesmo grupo de fungos como *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides*

immitis, *Histoplasma capsulatum* e *Lacazia loboi*. Recentemente, um novo clado na ordem Onygenales foi proposto como uma nova família denominada de Ajellomycetaceae que constitui um grupo monofilético incluindo os gêneros anamorfos *Blastomyces*, *Emmonsia*, *Histoplasma* e *Paracoccidioides* (BIALEK et al., 2000; HERR et al., 2001; UNTEREINER et al., 2004; BAGAGLI et al., 2008).

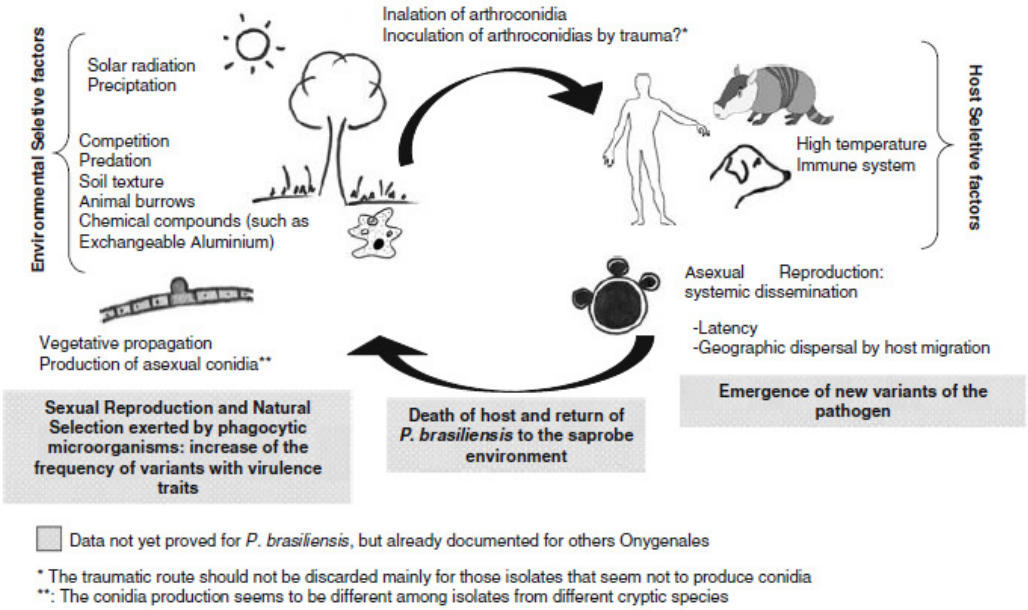


Figura 1: Aspectos ecológicos do *P. brasiliensis* quando em fase saprobiótica e parasitária (BAGAGLI et al., 2008).

O fungo é difícil de ser isolado a partir do ambiente, e a doença caracteristicamente apresenta um prolongado período de latência, com relatos de 30 ou mais anos, dificultado assim o avanço no estudo da ecologia deste patógeno (BALABANOV et al., 1964). Segundo Restrepo et al. (1985), os aspectos mencionados acima, associado às frequentes migrações das populações de áreas endêmicas, tornam praticamente impossível a identificação dos locais onde a infecção foi adquirida.

Foi observado no estudo de Terçarioli et al (2007), que o fungo *P. brasiliensis* tem bom crescimento, tanto em solos com texturas argilosa e/ou arenosa, em condições de grande umidade e pouco crescimento em condições de baixa umidade. Neste estudo também foi observado que o *P. brasiliensis* é incapaz de crescer em alguns solos com elevados teores de alumínio trocável (H^+ Al^-). Estas condições adversas do solo para o crescimento deste fungo não são encontradas em áreas de endemicidade da doença ou com positividade para isolamentos ambientais (TERÇARIOLI et al., 2007).

Estudos sobre a ecologia do *P. brasiliensis* ganharam novas perspectivas nos últimos anos, principalmente com a descoberta de hospedeiros naturais silvestres, pelo desenvolvimento de metodologias de biologia molecular e também pela aplicação de métodos de geoprocessamento (BARROZO et al., 2009 e 2010; THEODORO et al., 2008). A ecologia do *P. brasiliensis* ainda necessita de muitos estudos para ser melhor fundamentada, em especial dados de isolamento ambiental, que ao longo dos anos após a descrição do fungo, vem sendo apenas esporadicamente realizado refletindo muitas vezes em discordâncias nos dados obtidos (FRANCO et al., 2000).

Enquanto os conhecimentos sobre a ecologia e em particular sobre o nicho ecológico e habitat do *P. brasiliensis* tiveram poucos avanços nos últimos anos, os conhecimentos sobre o conceito de espécie do patógeno avançaram um pouco mais, principalmente pela aplicação de técnicas de biologia molecular e bioinformática. Matute et al (2006), realizaram um estudo filogenético por genealogia de multi loci, no qual constatou um complexo de três espécies crípticas em *P. brasiliensis.*

Espécies crípticas são espécies que possuem divergências morfológicas imperceptíveis por identificação micológica clássica, como por exemplo, tamanho de conídios ou leveduras, mas que geneticamente apresentam divergências e estão reprodutivamente isoladas.

O resultado do estudo realizado por Matute et al (2006) demonstrou a existência de um grupo parafilético, denominado S1, e dois monofiléticos PS2 e PS3. A ocorrência destes achados fica restrita as áreas geográficas da Argentina, Brasil, Peru, Paraguai e Venezuela (S1 e PS2) e Colômbia (PS3).

Dois anos após esta descoberta, Carrero et al (2008), ao analisarem 14 genes de um total de 21 isolados, observaram que o isolado Pb01 proveniente da região centro-oeste brasileira, não se agrupava com nenhuma das três espécies crípticas descritas por Matute et al (2006). Utilizando então um maior número de isolados (17) sendo 16 da região centro-oeste brasileira e um do Equador, Teixeira et al (2009), determinou que estes novos isolados pertenciam ao grupo que não se agrupava as espécies S1, PS2 e PS3, mas que constituíam uma nova espécie, denominada inicialmente como Pb01-*like*. Esta espécie é a mais divergente e atualmente descrita como uma nova espécie de *Paracoccidioides*, denominada de *P. lutzii*, em homenagem ao médico Adolfo Lutz.

Os estudos filogenéticos, associados aos caracteres morfo/fisiológicos, no gênero *Paracoccidoides* podem contribuir para uma melhor compreensão das relações patógeno-hospedeiro, nas variadas formas clínicas da doença, sua apresentação diagnóstica inicial, prognóstico, resposta ao tratamento com drogas antifúngicas, bem como os padrões ecoepidemiológicos.

2. A doença Paracoccidioidomicose (PCM)

A PCM tem grande importância sócio-econômica, por tratar-se de uma doença que acomete principalmente homens trabalhadores rurais, na faixa etária de 30 a 50 anos que, após o desenvolvimento da doença tem sua atividade trabalhista reduzida ou interrompida (BRUMMER et al., 1993; MENDES et al., 2003). A PCM também se encaixa no grupo das doenças infecciosas consideradas “negligenciadas”, principalmente por receber pouca

atenção, tanto das instituições envolvidas em termos de políticas de saúde pública, como da indústria farmacêutica, que pouco ou quase nada investe no desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento desta micose (HOTEZ et al., 2008; MARTINEZ et al., 2010).

As principais formas clínicas da PCM são: aguda, subaguda e crônica. A forma aguda/subaguda, também chamada juvenil, em geral compromete crianças, adolescentes e adultos jovens, apresenta história clínica de curta duração (mediana de dois meses), (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). A forma aguda é responsável por 20 a 25% dos casos, caracteriza-se por apresentar instalação mais rápida da doença, variando de algumas semanas a poucos meses, além de apresentar envolvimento predominante do sistema fagocítico mononuclear, sendo este: baço, fígado, nódulos linfáticos e medula óssea. A forma crônica ocorre em 75% dos casos e apresenta história clínica de longa duração, em geral acima de seis meses. Nesta forma clínica as manifestações pulmonares são muito frequentes, diferentemente da forma aguda onde estas são pouco comuns, predominando as lesões de pele e mucosa, porém outros sistemas e órgão podem ser acometidos, com o Sistema Nervoso Central e glândulas adrenais (MENDES, 1994).

O tratamento da PCM é baseado principalmente na associação do sufametoxazol-trimetoprim (SMZ-TMP), droga antibacteriana, mas que apresenta bons resultados frente ao tratamento desta micose. Dependendo da forma clínica apresentada pelo paciente, existem outras drogas disponíveis, como os agentes antifúngicos derivados azólicos Itraconazol, Cetoconazol e Voriconazol. Nos casos graves da doença e com necessidade de resposta imediata a droga, pode-se utilizar a Anfotericina B, um derivado poliênico, com vários efeitos colaterais e que necessita ser empregado apenas pela via intravenosa. Portanto, o paciente deve permanecer internado por mais tempo para monitorar seu estado geral (MENDES et al., 2003).

O diagnóstico padrão ouro da paracoccidoidomicose é a demonstração de achados fúngicos em amostras clínicas variadas, como por exemplo, escarro, raspados de lesão em pele e mucosa, aspirados de linfonodos, lavados bronco-alveolares, e fragmentos de biópsia. A demonstração do agente pode ser realizada através de exames direto em lâmina, corada com lactofenol-azul-de-algodão, ou clarificadas com hidróxido de potássio KOH em concentrações variantes de 10 a 40%, ou mesmo em biópsias coradas com hematoxilina-eosina e Gomori Grocott, ambas as preparações observadas em microscopia óptica em objetivas de 40X e 100X respectivamente. Esta forma de diagnóstico muitas vezes é de difícil execução, pois, o paciente não possui condições para fornecer um bom material clínico ou já está em fase de tratamento, o que dificulta a identificação do agente nas amostras biológicas (MENDES et al., 2003).

Outra forma diagnóstica muito utilizada na paracoccidioidomicose é a sorologia, através do exame laboratorial de Imunodifusão Dupla em Gel de Ágar, por tratar-se de um exame laboratorial de baixo custo, com uma boa sensibilidade e especificidade (LACAZ et al., 2002). O teste de imunodifusão baseia-se no princípio de reação entre anticorpos circulantes contra epítopos do fungo no organismo do paciente e um preparado antigênico que irá reagir formando um imunocomplexo, visualizado a olho nu pela formação de uma linha de precipitação em lâmina. Alguns trabalhos relatam a glicoproteína de 43 kDa, denominada gp43, como o antígeno imunodominante em *P. brasiliensis*. Esta glicoproteína exerce papel importante frente à adesão a laminina, o que favorece a infecção e disseminação do fungo para os tecidos (VICENTINI et al., 1994; BLOTTA et al., 1993). Este antígeno está presente em grandes concentrações em pacientes acometidos com a forma aguda da PCM, consequentemente estes pacientes apresentam elevadas concentrações de anticorpos anti-gp43, apresentando bons resultados frente ao teste de imunodifusão (MENDES-GIANNINI et al., 1990; BLOTTA et al., 1993).

Este exame laboratorial é realizado principalmente para o diagnóstico inicial da doença e é associado a outros métodos de diagnósticos laboratoriais e clínicos, além de ser o método de acompanhamento ao tratamento frente à droga de escolha. De acordo com o tratamento, os níveis de anticorpos, tendem a diminuir no soro dos pacientes e consequentemente a carga quantificada na sorologia é reduzida até que atinja sua negatividade (VICENTINI et al., 1994; GESZTESI et al., 1996; MENDES-GIANNINI et al., 2006). Os testes sorológicos apresentam bons resultados frente ao antígeno padrão produzidos com os isolados B-339 (espécie S1) e 550B (espécie *P. lutzii*).

Estes testes sorológicos apresentam bons resultados para pacientes provenientes das áreas onde há presença destes isolados, sendo região Sudeste e região Centro-Oeste respectivamente. Quando cruzados soros entre as regiões com sorologias para o antígeno padrão da área, a sensibilidade é reduzida (TAKAYAMA et al., 2010). Este fato pode ser explicado frente à diminuição ou não produção da gp43 por alguns genótipos do patógeno, principalmente aos pertencentes à espécie *P. lutzii* (BATISTA Jr. et al., 2010).

3. Relatos dos isolamentos ambientais de *P. brasiliensis*

Dos trabalhos descritos na literatura, alguns relatam o isolamento do *P. brasiliensis* do solo e de outras amostras ambientais e animais, sendo que, de uma forma geral, estes achados são raros e sem repetibilidade (SHOME & BATISTA 1963; NEGRONI 1967; ALBORNOZ 1971; FERREIRA et al., 1990; SILVA-VERGARA et al., 1998; FRANCO et al., 2000).

O primeiro relato de isolamento em amostras de solo foi em 1962 e 1963, no Recife, onde pesquisadores descreveram o isolamento de *P. brasiliensis* em amostras do solo em uma fazenda de criação de gado. As amostras de suspensão de solo foram cultivadas em placas de Petri contendo meio Sabouraud Glicose Ágar (SGA) acrescido de Thiamina e Ágar Sangue,

incubadas de 25 a 37°C por sete dias. Os pesquisadores obtiveram diversas colônias distintas e apenas uma apresentou termodimorfismo e características macroscópicas e microscópicas de *P. brasiliensis*. Entretanto uma posterior identificação micológica do mesmo isolado, realizada por Borelli (1968), identificou o isolado como sendo o fungo *Aspergillus penicillioides*, mas acredita-se que esta identificação posterior possa ter devido a uma possível contaminação durante o transporte da amostra, além da região de isolamento não ser reconhecida como área endêmica para paracoccidioidomicose (SHOME & BATISTA, 1963).

Em 1967, outro trabalho relatou o isolamento de *P. brasiliensis* do solo, na cidade de Chaco – Argentina, onde pesquisadores obtiveram 12 amostras do solo da zona rural, as amostras foram cultivadas em meio líquido Sabouraud Glicose contendo 0-5% de extrato de levedura, 100 µg/mL de cloranfenicol e 300 µg/mL de cicloheximida, estes foram incubados a 28° C por 10 dias, para enriquecimento e maior esporulação dos fungos obtidos nas amostras. Do total de 12 amostras, 10 revelaram a presença de multibrotamentos, estes foram semeados em meio sólido e seis amostras foram processadas para inoculação animal. Das amostras inoculadas uma revelou características de lesão positiva condizente com *P. brasiliensis*, que recuperada após eutanásia do animal, cujo órgão em questão (testículo) foi semeado em meio próprio obtendo-se a recuperação do crescimento fúngico. O isolado desta recuperação apresentou características micológicas da espécie *P. brasiliensis*. Este isolado é aceito como verdadeiro, entretanto, seria necessário o envio da amostra para centros de referência para confirmação da identificação micológica do achado (NEGRONI, 1967).

O isolamento de *P. brasiliensis* foi descrito também em 1971, na Venezuela, na cidade de Paracotos, onde pesquisadores isolaram o fungo dentre 87 amostras de solo obtidas no período de março a setembro de 1970. Na primeira tentativa, os pesquisadores obtiveram 10 amostras de solo com isolados fúngicos suspeitos para *P. brasiliensis*, estas foram processadas e preparadas para a inoculação animal indireta. Dentre as amostras inoculadas, um animal apresentou recuperação fungica com características morfológicas e virulência

compatíveis com *P. brasiliensis*, este fungo foi isolado de um fragmento pulmonar obtido a partir de um camundongo inoculado por via intravenosa com uma das amostras de solo. No segundo experimento utilizando um protocolo semelhante, 77 amostras do solo de uma plantação de café na mesma região foram analisadas. Os camundongos inoculados foram mantidos vivos até que desenvolvessem sinais e sintomas da doença. Após 65 dias, um camundongo apresentou dispnéia, um sintoma clássico de infecção por *P. brasiliensis*, o fungo foi então isolado do pulmão que mostrou lesões nodulares difusas, estas também características da PCM. Esta cepa mostrou dimorfismo térmico e virulência em cobaias e camundongos. Dois outros animais apresentaram um quadro de dispnéia mais desenvolvido, um deles apresentou um típico exame histopatológico pulmonar com lesões características da PCM. O pulmão do outro animal, não apresentou evidências macroscópicas de lesões, entretanto foi positivo para o isolamento de *P. brasiliensis* em ágar infusão de cérebro-coração (BHI) incubado a 37°C. Este isolado também provou ser virulento em cobaias e camundongos inoculados posteriormente. O trabalho não exclarece a metodologia de inoculação animal a partir das amostras de solo, fato este que leva a diversas dúvidas sobre uma possível contaminação ou modo de infecção. Este estudo é o único no qual o *P. brasiliensis* foi isolado mais de uma vez na mesma área de estudo, e como todas amostras foram obtidas do solo, o trabalho sugere que este é seu provável habitat e que o isolamento não é apenas fruto da dispersão dos propágulos fúngicos pelo ar, que levaria à positividade destas amostras. Três destes isolados foram disponibilizados em uma micoteca (Coleção American Type Culture, Manassas, VA, EUA; cepas ATCC 24015, 24016, 24017) proporcionando acesso da comunidade científica para demais estudos (ALBORNOZ, 1971).

Gezuele (1989), pesquisador uruguaio realizou o isolamento de um fungo com características semelhantes ao *Paracoccidioides brasiliensis*, este isolado foi obtido a partir da cultura direta de sete amostras de fezes de pingüins (*Pygoscelis adeliae*) coletadas na base militar uruguaia na ilha de King George's, na região Antartica. O isolado mostrou

termodimorfismo, e uma morfologia típica de *P. brasiliensis*, além de virulência após inoculação animal em ratos, hamsters e porquinhos da índia. Este trabalho foi apresentado na forma de resumo nos anais de uma conferência, não apresentando detalhes do meio de cultura e metodologias empregadas no estudo. Este isolado, é conservado em várias coleções de fungos, o que favoreceu sua posterior identificação laboratorial confirmando sua identidade como *P. brasiliensis*. Esta identificação posterior incluiu metodologias como, por exemplo, a demonstração de gp43 em preparações antigênicas, além de caracterização micológica e molecular e avaliação de virulência através da inoculação animais experimental, realizada em cobaias pela via intra-testicular (CALEGARI et al., 1989; CAMARGO et al., 1992; GARCIA et al., 1993). O grupo sustentou a hipótese de se tratar de uma nova espécie de *Paracoccidoides*, devido à nova fonte de isolamento ambiental, denominando o novo isolado de *Paracoccidioides antarcticus*. Garcia et al (1993) na seqüência dos trabalhos de 1992, realizou provas de cultivo, imunoquímicas, produção de antígenos, SDS-PAGE e imunoeletroforese, confirmando a identidade do fungo de Gezuele como sendo *P. brasiliensis*, descartando portanto, a proposta uruguaia de classificação desta como sendo uma nova espécie (GARCIA et al., 1993).

Ferreira et al (1990), realizou o isolamento de *Paracoccidioides brasiliensis* em ração de cachorro, provavelmente devido ao contato quase que direto do alimento com o solo, uma vez que o saco com a ração do animal foi aberto e estocado no quintal de terra, além da provável contaminação da comida através das patas do animal. A cepa foi isolada por técnicas de cultivos diretos das amostras de ração, estas foram semeadas em ágar Sabouraud acrescido de glicose (SGA) em placas incubadas a temperatura ambiente e em placas de ágar sangue incubadas a 35ºC por um período de 10 a 20 dias. Esta cepa foi identificada e caracterizada micológica e imunologicamente, como produtora do substrato antigênico característico de *P. brasiliensis* (gp43) em um teste de imunodifusão dupla em gel de ágar, realizada frente ao

soro de um paciente controle de PCM. A virulência foi confirmada por inoculação animal experimental em cobaias por via intratesticular (FERREIRA et al., 1990).

No trabalho de Silva-Vergara et al (1998), onde foi realizada uma coleta de solo em uma plantação de café no município de Ibiá-MG, foram coletadas neste estudo um total de 760 amostras, sendo estas de solo, folhas do café, frutos e palha. No trabalho os autores utilizaram métodos tanto diretos (cultura) e indiretos (inoculação animal). Uma suspensão de amostras de solo foi inoculada, via intraperitoneal, em um rato e após 90 dias, o fungo *P. brasiliensis* foi isolado em culturas de lesões hepáticas do animal.

Micologicamente, os aspectos macroscópicos e microscópicos do isolado revelaram características semelhantes a espécie *P. brasiliensis*, principalmente pelo seu termodimorfismo e presença de células leveduriformes com múltiplos brotamentos, a temperatura de 35°C. O isolado foi também submetido a uma análise antigênica frente a testes sorológicos de imunodifusão e imunofluorescencia contra um soro controle de paciente com PCM, além de testes de avaliação do padrão de proteínas por eletroforese em gel de sulfato de sódio dodecil poliacrilamida (SDS-PAGE), que revelou a presença da proteína de 43kDa (gp43), o antígeno dominante na espécie *P. brasiliensis*. Outro dado importante frente ao estudo deste isolado é o dos componentes imunogênicos por *Western*-blot, que documentou a presença de gp43, seguido de estudo genético com a demonstração do gene da gp43 e demonstração da virulência com a indução de doença em ratos e cobaias. Este isolado denominado Ibiá é mantido em micotecas de universidades públicas visando fornecer dados comparativos e para futuros estudos sobre o patógeno (SILVA-VERGARA et al., 1998).

Dois casos de PCM em cães já foram relatados um por Ricci et al (2004) e outro por Farias et al (2005) com obtenção de cultura fúngica característica de *P. brasiliensis* apenas no segundo caso. O isolado foi caracterizado molecular e morfologicamente (BOSCO et al., 2005), por técnicas como PCR (*Polimerase Chain Reaction*) de rDNA fúngico por *primers* universais, seguido de amplificação com *primers* específicos para *P. brasiliensis*, além de

análises microscópicas de cultura. Este achado é de grande importância para o estudo epidemiológico da PCM, pois representa o primeiro isolamento do *P. brasiliensis* de um animal doméstico, cujo contato com humanos é infinitamente superior se comparado com animais silvestres (RICCI et al., 2004; FARIAS et al., 2011).

No trabalho de Richini-Pereira et al (2008), onde o *P. brasiliensis* foi detectado molecularmente por técnica de Nested PCR em animais silvestres atropelados, servindo como mapeamento das áreas onde estes foram encontrados, podendo auxiliar no estudo epidemiológico da doença e nos aspectos ecológicos do fungo.

Outro dado confirmatório do *P. brasiliensis* no solo é a alta incidência deste fungo em tatus da espécie *Dasypus novemcinctus* observado por diversos autores (NAIFF et al., 1986; BAGAGLI et al., 1998 e 2003; CORREDOR et al., 1999; MACEDO et al., 1999; CORREDOR 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 de tatu além do "tatu-galinha" também podem estar infectadas com o patógeno (CORREDOR et al., 2005). Recentemente foi descrito além do tatu, outro animal silvestre com isolamento positivo para o fungo *P. brasiliensis*, o bicho preguiça *Choloepus didactylus*, aumentando a evidência do habitat (solo) deste agente fúngico, e novas possibilidades de infecção a diferentes hospedeiros animais (TREJO-CHÁVES et al., 2011).

A distribuição geográfica destes animais, em particular a da espécie *D. novemcinctus*, coincide com a observada na PCM humana. Existem evidências de que o contato direto com estes animais pode ser um fator de risco para que ocorra o desenvolvimento da doença no homem (CADAVID & RESTREPO, 1993).

Os tatus apresentam intenso contato com solo, pois possuem hábito de escavar túneis e residir em tocas subterrâneas, o que poderia contribuir para a dispersão dos esporos do *P. brasiliensis* no ambiente. Por apresentar uma temperatura corporal ideal e imunidade

celular relativamente baixa, o tatu pode favorecer o desenvolvimento de infecções, podendo inclusive ter desempenhado algum papel na evolução do *P. brasiliensis* à condição zoofílica (adaptada ao tecido animal), (BAGAGLI et al., 2006), proporcionando uma tendência ao estabelecimento de lesões crônicas nos hospedeiros e uma baixa produção de conídios (McEWEN et al., 1987), o que poderia explicar o difícil isolamento ambiental deste fungo a partir da sua fase saprofítica (FRANCO et al., 2000).

Com o emprego de técnicas de geoprocessamento e de associação entre fatores climáticos e diagnóstico clínico de PCM aguda, Barrozo et al (2009 e 2010), indicaram que o *P. brasiliensis* deve ocorrer preferencialmente em locais de solo com um bom índice pluviométrico e ótima permeabilidade associado a uma alta umidade relativa do ar. O volume hídrico no período de chuvas deve ser satisfatório, e a temperatura variável entre 18 e 28º C, o que tornaria favorável a esporulação e dispersão do fungo. O conjunto destas condições, supostamente aumenta o índice de infecção dos indivíduos, na região endêmica de Botucatu – SP, onde este estudo foi realizado.

Embora as metodologias de microbiologia ambiental apresentem um nível de desenvolvimento razoável, como por exemplo, na quantificação de microrganismos anemófilos e/ou alérgenos, o mesmo não tem sido verificado em fungos patogênicos. Para detecção de fungos as técnicas devem ser aperfeiçoadas, já que no caso do *P. brasiliensis*, seu isolamento torna-se uma tarefa difícil, devido ao grau de contaminação por outros microrganismos e a própria dificuldade de cultivo *in vitro* do fungo a partir de amostras ambientais. Considerando que o isolamento deste fungo direto do solo é uma tarefa extremamente difícil, o emprego de novas metodologias para a detecção do *P. brasiliensis* tornam-se ferramentas de extrema importância.

4. Técnicas para isolamento e detecção ambiental de *Paracoccidioides*

4.1. Detecção Molecular

A detecção molecular de agentes fúngicos em amostras ambientais, tornou-se uma ferramenta de grande importância no estudo de frequência, área de ocorrência e epidemiologia. O isolamento de agentes patogênicos fúngicos obtido a partir de amostras ambientais, sejam elas: solo, água, ar, vegetação, sendo muito difíceis de serem obtidos. A interferência de agentes químicos e a grande diversidade de microrganismos fazem com que técnicas de cultivo e inoculação animal, métodos muito utilizados para estes estudos, se tornem problemáticas. A detecção molecular do fungo *P. brasiliensis*, tornou-se técnica de referência para estudos da ecologia deste agente, uma vez que a cada ano, estas vão sendo aprimoradas e tornam-se cada vez mais sensíveis e específicas (BAGAGLI et al., 2010 e 2011).

A principal técnica descrita é a PCR (Polymerase Chain Reaction), na qual fragmentos do DNA fúngico, previamente extraído de amostras de solo têm sua amplificação delimitada pelo anelamento de *primers* espécie-específicos. Os fragmentos amplificados são então identificados segundo seu tamanho em pares de base, em um gel de Agarose ou Poliacrilamida pelo método de eletroforese. Isto vem sendo particularmente realizado utilizando-se de DNA ribossomal (MOTOYAMA et al., 2000; THEODORO et al., 2005a; TERÇARIOLI et al., 2007).

O material que é amplificado na PCR (*amplicom* ambiental) pode ser também seqüenciado para comparação e identificação das espécies. Existem atualmente bancos de dados de genes de diversos fungos na internet, por exemplo, o GenBank disponível no site (*www.ncbi.nlm.nih.gov)* e o Broad Institute (*www.broadinstitute.org*), ambos com a

ferramenta *Blastn*, uma ferramenta de busca que se baseia em um algoritmo para identificar sequências de nucleotídeos semelhantes à depositada pelo pesquisador, indicando o organismo que possui maior identidade. Para o fungo *P. brasiliensis*, uma boa técnica de detecção é a Nested PCR, onde inicialmente são definidas e amplificadas regiões gênicas relativamente menos específicas, comuns em praticamente todos os fungos e de maior tamanho, e em uma segunda reação, procede-se a amplificação de uma região menor, interna a primeira reação de amplificação, porém específica da espécie de interesse (THEODORO et al., 2005a; TERÇARIOLI et al., 2007). Para a utilização desta técnica em fungos, os *primers* genéricos mais utilizados são (*Internal Transcribed Spacer*) ITS4 e ITS5, dispostos entre as regiões gênicas 18S e 28S, descritos por White et al (1990). Para o segundo PCR, *primers* internos específicos para *P. brasiliensis* foram desenhados (Pb-ITSE e Pb-ITSR) e se anelam nas regiões ITS1 e ITS2. Estes *primers* vêm sendo usados para a detecção do *P. brasiliensis* em amostras ambientais (THEODORO et al., 2005a) (Figura 2).

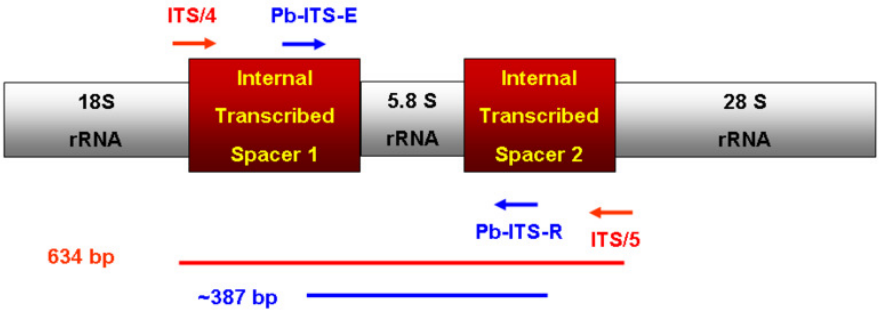


Figura 2: Esquema de região gênica de rDNA fúngico para amplificação com primers específicos de *Paracoccidioides brasiliensis*.

A pesquisa molecular em amostras de solo requer sempre muito cuidado para evitar contaminações, uma vez que a fase pré-analítica torna-se fundamental para a fidedignidade dos resultados. Por se tratar de amostras altamente contaminadas, o solo é coletado em frascos estéreis, e lacrados até o processamento laboratorial da amostra. O material de coleta, como espátulas, colheres, pás, devem ser limpos de um local para o outro, e sempre seguir uma

rigorosa identificação de cada amostra. No laboratório as amostras de solos são pesadas e preparadas para o processo de extração de DNA, que por ser realizado por métodos caseiros ou por Kits comerciais, que normalmente apresentam uma melhor extração o que fornece um DNA de melhor qualidade no final do procedimento.

Esta metodologia foi empregada em amostras de solo retiradas de tocas de tatus em áreas com positividade para o isolamento do patógeno nestes animais, onde foram identificados DNAs fúngicos com identidade de *P. brasiliensis*, confirmando a presença ambiental do fungo nestas áreas (THEODORO et al., 2005a; TERÇARIOLI et al., 2007). Esta detecção no solo pode ser utilizada também para qualquer outro tipo de amostra ambiental, seguindo sempre o rigor metodológico no seu processamento. A detecção molecular ambiental fornece dados para estabelecermos a espécie de *Paracoccidioides* prevalente no local, correlacionando com isolados de animais e de pacientes provenientes da mesma área de estudo.

4.2. Amostragem e detecção em aerossóis

Embora a suspeita inicial da forma de infecção da PCM tenha sido a via traumática ou contato direto da mucosa oral pelo hábito de mascar capins e/ou fragmentos vegetais, existe hoje uma ampla base de dados que indica que a infecção deve ocorrer pela via inalatória, semelhante a outras micoses sistêmicas também causadas por fungos patogênicos filogeneticamente relacionados (BAGAGLI et al., 2008). Seguindo a via inalatória, a infecção primária da PCM é a pulmonar (MONTENEGRO & FRANCO, 1994), portanto o fungo necessariamente deve estar se apresentando em sua forma dispersiva, ou seja, conídios aerossolizados. Desta forma, a captação dos conídios no ar pode ser uma excelente estratégia para a detecção ambiental do fungo, principalmente em áreas endêmicas de paracoccidioidomicose e com positividade em animais silvestres.

Visando a captação, quantificação e identificação de espécies fúngicas presentes no ar, em aerossóis e para a detecção de partículas alergênicas em casas e ambiente de trabalho, para casos de doença ocupacional, pesquisadores do CDC Centers for Disease Control and Prevention of Morgantown WV. – USA, desenvolveram um sistema de amostragem ciclônica de ar. O equipamento, denominado NIOSH BC-251 (Figuras 3 e 4), capta amostras de ar de forma ininterrupta, com um controle de volume de ar, de forma a separar somente aquelas partículas cujo tamanho é definido pela velocidade e volume de ar captado (LINDSLEY et al., 2006).

Figura 3. Fotografia do amostrador de ar NIOSH Cyclone Samplers Modelo BC 251 (CDC), acoplado à bomba de sucção de ar do tipo SKC Universal Pumps Modelo 224-44XR.

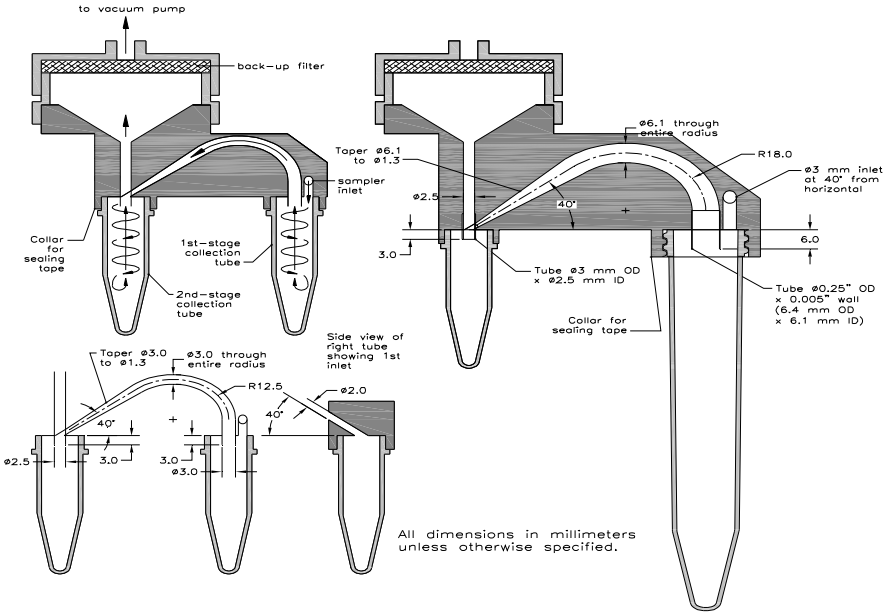


Figura 4. Esquema do amostrador de ar NIOSH Cyclone Samplers Modelo BC 251 (CDC), com detalhes das dimensões e física de trabalho.

O captador de partículas aerossóis NIOSH trabalha de forma ciclônica, ou seja, quando o ar é captado para dentro do aparelho, ele passa por um tubo onde um ciclone de ar é formado. As partículas que entram nos tubos batem nas paredes e decantam por peso, as partículas não decantadas nos tubos ficam retidas no filtro de ar antes da saída do aparelho, sendo que este pode ser estudado quanto a outras partículas do ambiente de peso inferiores ou superiores as de interesse no estudo (Figuras 3 e 4). O material coletado pode ser aproveitado para a realização de técnicas de identificação molecular, cultura ou até mesmo microscopia direta e infecção animal. A coleta do material facilita o trabalho de identificação molecular, pois os tubos permanecem estéreis até o momento da coleta. Adhikari et al (2009), comparou a eficácia deste tipo de amostrador com outros para realizar a captação de fungos na cidade de New Orleans – USA, após o acidente climático Katrina que provocou enchentes e aumentou a taxa de umidade do ar, causando intensa proliferação fúngica e dispersão de esporos fúngicos

nos ambientes fechados. Neste estudo, o amostrador NIOSH BC-251 trabalhou com um volume de captação de 3,5 litros, com um filtro de membrana de 0,8µm de Policarbonato, com diâmetro de 37 mm, realizando assim o isolamento de esporos fúngicos em maior concentração no segundo estágio do amostrador, revelando após métodos de cultivo, microscopia e outros estudos de proteínas fúngicas a prevalência de espécies como *Penicillium* sp. e *Aspergillus* spp. Outros trabalhos utilizam esta metodologia de amostragem aerossol para captar esporos fúngicos em ambientes abertos e fechados, para os trabalhos de estudos ambientais de fungos em lavouras. Além do equipamento de captação, os pesquisadores e empresas especializadas neste tipo de coleta, desenvolvem suportes, ou "casas" para proteger o equipamento que muitas vezes constitui-se de partes elétricas sensíveis a chuvas e umidade excessiva, ou mesmo desenvolveram equipamentos para coleta em ambiente aberto por longos períodos de tempo, totalmente automatizados (Figuras 5 e 6).

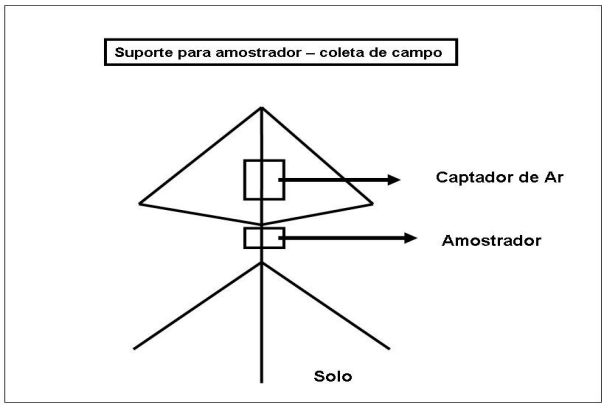


Figura 5. Esquema de suporte para proteção de amostrador e bomba em campo aberto, desenvolvido por Arantes (2010).

Figura 6. Amostrador ciclônico de ar automático para coleta em campo – Burkard.

4.3. Isolamento por cultivo direto

O isolamento do gênero *Paracoccidioides* é realizado com freqüência em amostras biológicas de pacientes em centros de referência para o tratamento da doença, ou mesmo em hospitais localizados em áreas endêmicas da PCM. As técnicas de isolamento em amostras biológicas como citadas anteriormente no diagnóstico da PCM, por exemplo, escarro e raspado de lesão, apresentam boa sensibilidade, porém de difícil execução principalmente frente à dificuldade em obtenção de uma boa amostra ou ao início de tratamento prévio a coleta da amostra, o que diminui muito as chances de se isolar o patógeno (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; BATISTA Jr. et al., 2010).

A cultura é sem dúvida um ótimo método para a obtenção de isolados clínicos, porém para as amostras ambientais, esta técnica apresenta pouca sensibilidade. Para as amostras de solo, plantas, ração animal, entre outras descritas anteriormente, a cultura sofre interferência de outros microrganismos que apresentam maior concentração nestas. Por exemplo, em uma amostra de solo, o número de esporos fúngicos de outras espécies interfere no crescimento do *P. brasiliensis*, por este apresentar um crescimento fastidioso, e maior demanda nutricional. Assim, outros fungos como, por exemplo, *Aspergillus* spp. e *Penicillium* sp. tendem a crescer mais rapidamente, recobrindo toda a placa, inibindo um possível crescimento ou visualização do *P. brasiliensis*.

Diversos estudos e a vivencia em nosso laboratório de pesquisa nos leva a crer que o isolamento por cultivo direto do *P. brasiliensis* é uma tarefa extremamente difícil de ser realizada, uma vez que mesmo a conversão termodimórfica deste agente, isolado em subcultivos é muito complicada, variando de cepa para cepa e de espécie para espécie.

Trabalhos como os de Mendelovici et al (1974) e Montenegro et al (1996), nos quais a tentativa de isolamento de *P. brasiliensis* em amostras de solo por cultivo direto foi negativa

apontam a dificuldade de realizar o isolamento deste fungo. O cultivo direto de amostras ambientais, pode sofrer também a interferência do clima, como resultado de uma menor esporulação do fungo durante a época de coleta das amostras, ou ainda uma não adequação da profundidade da amostra obtida ou mesmo a ausência do patógeno no local estudado (BARROZO et al., 2009 e 2010).

A técnica de cultivo de amostras ambientais ganhou reforço com uma vertente denominada Técnica de Cultivo por Extinção, que trabalha com meios seletivos para o crescimento fúngico e bacteriano, dispostos em micro-placas de cultivo celular. As amostras são então diluídas em grandes volumes e distribuídas nos poços das placas, de modo que esta diluição é realizada para que um menor número de esporos fúngicos seja depositado na superfície do meio de cultura, para que desta forma cada poço receba um esporo fúngico viável para formar uma colônia única, facilitando a posterior identificação da espécie isolada. Para um bom resultado, espera-se que no máximo 50-70% dos poços apresentem crescimento e estes com apenas uma colônia. Esta técnica é muito utilizada para estudo de fungos fitopatógenos, para os quais as amostras de folhas e frutos são processadas, diluídas e semeadas nos meios de cultivo, podendo assim estimar quais espécies estão causando lesão no vegetal, além de estudar a microbiota fúngica destas amostras (COLLADO et al., 2007).

5. Paracoccidioidomicose experimental

A utilização dos modelos experimentais na PCM tem gerado muitas vertentes de pesquisa e estudo, o que vem contribuindo para melhor entendimento da doença em seus aspectos ecológicos, imunológico e clínicos. O modelo animal permite avaliar a interação parasita-hospedeiro, a morfologia do fungo nos tecidos, o estudo da resposta imune celular e humoral, a progressão da doença desde o momento da infecção, sua disseminação, o papel da

resposta imune no desenvolvimento da doença, o estudo de ação de medicamentos e o dimorfismo do fungo (COELHO et al., 1994).

Após Lutz, Splendore (1910), tentou reproduzir a PCM em cobaias, gatos, cachorros e macacos, mas não conseguiu. Pereira & Viana (1911), a partir do pus colhido de um paciente que morreu com PCM, conseguiram infectar macacos sagui, cães, gatos, ratos brancos e coelhos, além de isolar o *P. brasiliensis* em meios de cultura. Montenegro (1927) infectou cobaias pela via intratesticular, com fungos obtidos de um paciente.

Lacaz (1949) conseguiu reproduzir a PCM em camundongos após inoculação do fungo por via intravenosa e intraperitoneal, causando infecção disseminada em pulmões, fígado, baço, linfonodos, cavidade peritoneal e coração. O autor observou que animais infectados pela via intravenosa apresentavam lesões mais extensas (SPLENDORE, 1910; PEREIRA & VIANA, 1911; MONTENEGRO et al., 1927; LACAZ et al., 1949).

Embora os modelos experimentais tenham apresentado bons resultados na infecção com o *P. brasiliensis*, nenhum modelo animal conseguiu ainda um maior mimetismo da clínica no humano, o que leva a uma intensificação dos trabalhos em pesquisa com animais. Dentre os animais de laboratório mais utilizados, destacam-se cobaias, coelhos, camundongos, hamsters e ratos. No entanto, além da espécie animal, vários outros fatores podem interferir nos resultados das pesquisas, tais como sexo do animal, idade, habitat e linhagem, além da virulência da cepa utilizada, concentração do inóculo e a via de inoculação (COELHO et al., 1994; RESTREPO, 1985).

Pesquisadores do Campus Universitário de Botucatu, liderados pelo Professor Mário Rubens Guimarães Montenegro, avaliaram a infecção experimental de hamsters, que trouxe grande contribuição ao conhecimento da interação parasita-hospedeiro na PCM, assim como para o seu tratamento (IABUKI et al., 1979; PERAÇOLI et al., 1982; MOTA et al., 1984; REZKALLAH-IWASSO et al., 1992).

A experiência acumulada demonstrou que hamsters e camundongos são bons modelos experimentais para o estudo da PCM, pois apresentam lesões disseminadas com quadro histopatológico muito semelhante ao do homem. Tanto a via endovenosa como a intraperitoneal, intratesticular e a intratraqueal são adequadas para obtenção de infecção disseminada. O grupo liderado pela Dra. Vera L. G. Calich, do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, selecionou camundongos sensíveis e resistentes à infecção pelo *P. brasiliensis*, que haviam sido infectados com amostras pouco e muito virulentas desse fungo (SINGER-VERMES et al.,1993; CALICH et al., 1985).

As diversas combinações possíveis nas metodologias experimentais permitiram a realização de grande número de estudos e estes trouxeram importante contribuição ao conhecimento da imunopatogenia da PCM.

6. Perspectivas para o estudo ecológico do gênero *Paracoccidioides*

Alguns aspectos fundamentais da ecologia do gênero *Paracoccidioides* ainda não foram solucionados, passados mais de 100 anos desde a sua descoberta. Trata-se de um fungo de difícil isolamento e as metodologias de coleta das amostras ambientais (solo, água e fezes de animais) e clínicas em áreas endêmicas de estudo devem ser revistas e aprimoradas, além de se buscar novas metodologias de estudo. Um exemplo é a tentativa de isolamento e detecção molecular do patógeno em amostras aerossóis, desenvolvido neste trabalho de pesquisa de mestrado, referência para esta revisão. O emprego da técnica de cultivo por extinção nestas mesmas amostras ambientais parece ser uma boa estratégia, e vem sendo aqui também empregada.

No campo da biologia molecular, novas técnicas, como as que enfocam o estudo de fungos não cultiváveis em amostras ambientais diversas (água, solo, etc.) vêm sendo desenvolvidas sendo possível detectar todo um grupo de fungos até então desconhecidos, através de anticorpos monoclonais marcados com sondas de vários genes fúngicos, como por

exemplo, o gene codificador da alpha-tubulina, marcado com um agente fluoróforo visualizado em microscópio de fluorescência. Os autores denominaram este novo grupo de *Cryptomycota* (JONES et al., 2011). Esta abordagem pode ser uma nova vertente para pesquisas ambientais com o gênero *Paracoccidioides* e outros fungos de difícil isolamento ambiental, como por exemplo, a espécie *Lacazia loboi* única espécie patogênica não cultivável da família Ajellomycetaceae (LACAZ et al., 2002).

Técnicas moleculares que discriminam rapidamente as várias espécies do gênero *Paracoccidioides* também vêm sendo desenvolvidas e aplicadas em amostras de fungos em culturas, estas devem ainda ser testadas tanto em materiais clínicos quanto em ambientais para avaliação de sua sensibilidade e especificidade (THEODORO et al. submetido), uma vez muitos deste genes marcadores são de cópia única, o que torna difícil a identificação do DNA de *P. brasiliensis*, geralmente escasso nas amostras ambientais. A disponibilização do genoma dos principais genótipos de *Paracoccidioides* sp. e a busca de novos marcadores moleculares também poderão ser úteis a estes estudos.

A detecção molecular atualmente tornou-se alvo de muitos estudos de sucesso por parte da pesquisa mundial para fungos ambientais, tendo em vista a rápida execução dos métodos, elevadas taxas de sensibilidade e especificidade, mas estas técnicas ainda esbarram no alto custo dos reagentes e materiais necessários para sua realização, como por exemplo, o Pirosequenciamento, que favorece a detecção de vários materiais genéticos em diversas amostras em larga escala e em um período de tempo razoável. O Pirosequenciamento é capaz de detectar mais facilmente a presença de diferentes alelos, facilitando o estudo de vários genes em diferentes organismos em uma mesma amostra. Nesta técnica os alelos são sequenciados e detectados independentemente, características como “Ultra-Deep Sequencing” permitem detectar um pool de variantes genéticos em quantidades pequenas de amostras de DNA. Aplicações em áreas de pesquisa clínica e de pesquisa ambiental são as principais vertentes desta técnica. Com uma grande capacidade de leitura (400-600 milhões de bases por

10 horas de corrida), a técnica contribui para a rápida identificação de microrganismos (HARISMENDY, 2009).

Recentemente foram descobertos elementos genéticos parasitas, denominados *inteins* ou inteínas em genes geralmente conservados, ou seja, com baixa taxa de mutação e vitais para a célula hospedeira (BUTLER et al., 2006). Os *intein*s são conhecidos como elementos genéticos parasitas, pois utilizam o maquinário celular de replicação para se manter e em alguns casos se propagar na população. São sequências de nucleotídeos que se encontram dentro de sequencias codificadoras, porém, diferente dos *introns*, são transcritos e traduzidos juntamente com o fragmento hospedeiro para então serem excisados auto cataliticamente, permitindo a funcionalidade normal da proteína hospedeira ou *extein*. Estes elementos genéticos já foram empregados como marcadores para a detecção e diferenciação das espécies de *Paracoccidioides* e de *Cryptococcus* (THEODORO et al., 2008; BUTLER & POULTER, 2005). Além do potencial filogenético, os *inteins* também constituem novos alvos terapêuticos, uma vez, que realizam um processo de auto-*splicing* a partir da proteína hospedeira, não comprometendo a função da mesma. Assim, drogas inibidoras deste *splicing* poderiam então ser empregadas na terapêutica, sendo teoricamente seguras uma vez que o homem não possui este *intein*.

De modo geral, sob todas as condições e aspectos apresentados nesta revisão, constata-se que o estudo ecológico de *Paracoccidioides* sp. ainda é tarefa de extrema importância para que sejam desvendados o habitat preciso deste agente, seu correto nicho ecológico, formas de infecção, variadas formas clínicas da doença, bem como auxiliar no diagnóstico e tratamento de pacientes que sofrem diariamente e até por longos períodos de tempo com esta micose sistêmica. Por essa razão, neste trabalho, buscamos novos métodos na detecção deste fungo em amostras ambientais, particularmente por meio de amostragem ciclônica de partículas fúngicas aerossóis associada com a detecção molecular por Nested PCR.

7. REFERÊNCIAS

ADHIKARI, A. et al. **Aerossolization of fungi, (1→3)-ß-D glucan and endotoxin from flood-affected materials collected in New Orleans homes**. Envir. Research. 2009.

ALBORNOZ, M. B. **Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela**. *Sabouraudia.* v.9. p.248–253.1971.

ALMEIDA, F. P. **Estudos comparativos do granuloma coccidióico nos Estados Unidos e no Brasil. Novo gênero para o parasito brasileiro.** An Fac Med Univ São Paulo. v. 5. p. 125-41. 1930.

BAGAGLI, E. et al. **High frequency of study. Medical Mycology**. v.41. n.3. p.217-223. 2003.

BAGAGLI, E. et al. **Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus)* captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis**. Am. J. Trop. Med. Hyg. v.58. p.505-12. 1998.

BAGAGLI, E. et al. **Paracoccidioides brasiliensis: phylogenetic and ecological aspects. Mycopathologia**. v. 165. p. 197–207. 2008.

BAGAGLI, E., BOSCO, S. M. G., RICHINI-PEREIRA, V.B., THEODORO, R. C., MARQUES, S. A. ***Paracoccidioides*** (chapter 40) In: **Molecular detection of human fungal pathogens** ed.Sydney. Australia. CRC Press. v.1. p.311-322. 2011.

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. Genet. Evol. v.6(5). p. 44-51. 2006.

BAGAGLI, E., MARQUES, S. A. **Micologia médica molecular: Impacto na epidemiologia e ecologia dos fungos.** In: **Compêndio de Micologia Médica**. ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.v.2. p.123-137. 2010.

BALABANOV, K.; BALABANOFF, V. A.; ANGELOV, N. **Blastomycose sud-americaine chez um laboureur bulgare renevu depuis 30 ans de Brasil**. Mycopathologia (Den Haag). p. 265-70. 1964.

BARROZO, L. V. et al. **Climate and acute/subacute Paracoccidioidomycosis in a hyper-endemic area in Brazil**. Inter. Journ. of Epidemiol. 2009.

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

BATISTA Jr, J. et aI. **The geographical origin of a *Paracoccidioides brasiliensis* isolate important for antigen production for regional diagnosis of paracoccidioidomycosis?** Mycoses. v.53(2). p.176-80. 2010.

BIALEK, R.; IBRICEVIC, A.; FOTHERGILL, A.; BEGEROW, D. **Small subunit ribosomal DNA sequence shows *Paracoccidioides brasiliensis* closely related to *Blastomyces dermatitidis***. J. Clin. Microbiol. v. 38. p.3190–3. 2000.

BLOTTA, M. H. S. L.; CAMARGO, Z. P. **Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis.** J. Clin. Microbiol. v.31. p.671-6. 1993.

BORELLI, D. **Lobomicosis. Nomenclatura de su agente**. Med. Cut. v.2. p. 151–156. 1968.

BOSCO, S. M. G. et al. **Morphological and molecular characterization of the first isolate of *Paracoccidioides brasiliensis* from dog (*Canis familiars*).** Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, v.47 (14) p.62-3. 2005.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. **Paracoccidiodomycosis: an update.** Clinical Mycrobiol. Rer. v.6. n.2. p.89-117. 1993.

BUTLER, M. I.; GRAY, J.; GOODWIN, T. J.; POULTER, R. T .M. **The distribution and evolutionary history of the PRP8 intein**. BMC Evol. Biol. v. 6. p. 1-26. 2006.

BUTLER, M. I.; POULTER, R.T. **The PRP8 inteins in Cryptococcus are a source of phylogenetic and epidemiological information**. Fungal Genet. Biol. v. 42. p. 452-463. 2005.

CADAVID, D.; RESTREPO, A. **Factors associated with *Paracoccidioides brasiliensis* infection among permanent residents of three endemic areas in Colombia**. Epidemiol. Infect. v.111. p.121-33. 1993.

CALEGARI, L. et al. **Comparación antigénica entre *P. antarcticus y P. brasiliensis***. In: CONGRESSO ARGENTINO DE MICOLOGIA. 4ª JORNADA ARGENTINA DE MICOLOGIA. 14, Huerta Grande, Córdoba. 1989. Anais. Córdoba. 1989.

CALICH, V. L. G.; 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. 585-94. 1985.

CAMARGO, Z. P; TABORDA, C. P.; RODRIGUES, E. G.; UNTERKIRCHERER, C. ***Paracoccidioides* sp. isolado das fezes de pinguim da Antártica pertence a espécie brasiliensis?** Rev. Argent Micol.15: 32. 1992.

CARRERO, L. L. et al. **New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen.** Fungal Genet. Biol. v.45(5). p.605-12. 2008.

COELHO, K. I. R.; DEFAVERI, J.; REZKALLAH-IWASSO, M. T.; PERAÇOLI, M. T. S. **Experimental paracoccidioidomycosis**. In: Franco, M.; Lacaz, C. S.; Restrepo-Moreno, A.; Del Negro, G. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC Press. p.87-107. 1994.

COLLADO, J. et al. **High-throughput culturing of fungi fromplant litter bya dilution-to-extinction technique**. FEMS. v.60. Iss.3. 2007.

CORREDOR, G. G. et al. **Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia**. Rev. Iberoam. Micol. v.16(4). p.216-20. 1999.

CORREDOR, G.G. et al. **The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to Paracoccidioides brasiliensis. Molecular identification of the isolate**. Med. Mycol. v.43(3). p.275-80. 2005.

FARIAS, M.R., et al. **Canine paracoccidioidomycosis: case report of generalized lymphadenitis**. Rev. Inst. Med. Trop. v.47(14). p.64. 2005.

FERREIRA, M. S.; FREITAS, L. H.; LACAZ, C. S., *et al*. **Isolation and characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* strain from a dog food probably contaminated with soil in Uberlândia, Brasil**. J. Med. Vet. Mycol. 28: 253–256. 1990.

FRANCO, M., BAGAGLI, E., SCAPOLIO, S., LACAZ, C.S. **A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil.** Med. Mycol. v.38 p.185-91. 2000.

GARCIA, N. M. et al. ***Paracoccidiodes brasiliensis*, nova amostra isolada de fezes de um pinguim (*Pygoceles adeliae*)**. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.v. 35. p. 227–235. 1993.

GESZTESI, J. L. et al. **Monoclonal antibodies against the 43,000 Da glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis* modulate laminin-mediated fungal adhesion to epithelial cells and pathogenesis.** Hybridoma v.15. p.415-22. 1996.

GEZUELE, E. **Aislamiento de *Paracoccidioides* sp. de heces de pingüino de la Antartida**. In: San-Blas G, ed. *Proceedings IV Encuentro Internacional sobre Paracoccidioidomicosis*. Caracas, Venezuela: Instituto Venezolano de Investigaciones Cientificas (IVIC). Abstract B2. 1989.

GREEN, B. J.; SCHMECHEL, D. TOVEY, E. R. **Detection of aerosolized Alternaria alternate conidia, hyphae, and fragments by using a novel double-immunostaining technique**. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. v.12. p. 1114-1116. 2005.

HARISMENDY, O. **Evaluation of next generation sequencing platforms for population targeted sequencing studies**. Genome Biology. 2009.

HERR, R. A. et al. **Phylogenetic analysis of *Lacazia loboi* places this previously uncharacterized pathogen within thedimorphic Onygenales**. J. Clin. Microbiol. v. 39. p. 309–14. 2001.

HOTEZ, P. J. et al. **The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a road map for control and elimination**. PLoS. Negl. Trop. Dis. 2(9):e300. 2008.

IABUKI, K.; MONTENEGRO, M. R. **Experimental paracoccidioidomycosis in the Syrian hamster: morphology, ultrastructure and correlation of lesions with the presence of specific antigens and serum levels of antibodies**. Mycopathologia. v. 67. p.131-41. 1979.

JONES, M. D. M. et al. **Discovery of novel intermediate forms redefines the fungal tree of life.** Nature. v. 474. p. 200-3. 2011.

LACAZ, C. S. et al. **Blastomicose experimental**. O Hospital. 35(3): 341-9. 1949.

LACAZ, C. S. et al. **Tratado de Micologia Médica Lacaz**. São Paulo. Ed. Sarvier. 2002.

LINDSLEY, W. G.; SCHMECHEL, D.; CHEN. B. T. **A two-stage cyclone using microcentrifuge tubes for personal bioaerosol sampling**. Journ. of Envir. Monit. 2006.

LUTZ, A. **Uma micose pseudococcícida localizada na boca, observada no Brasil. Contribuição ao Conhecimento das hifoblastomicoses americanas.** Bras. Med. v.22. p. 121-4. 1908.

MACEDO, R. C. L. et al. ***Paracoccidioides brasiliensis*-Infecção natural em tatus. Estudo em Serra da Mesa, Goiás, Brasil**. In: VII International Meeting on Paracoccidioidomycosis. Campos do Jordão, São Paulo, Brasil. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina. D-06. 1999.

MARTINEZ, R. **Paracoccidioidomycosis: the dimension of the problem of a neglected disease.** Ver. Soc. Bras. Med. Trop. v. 43(4). p. 480. 2010.

MATUTE, D. R. et al. **Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies**. Mol. Biol. Evol. v.23. p.65-73. 2006.

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.

MENDELOVICI, K.; SALFELDER, E.; ROMAN, A. R. **Intento de aislamento del *Paracoccidioides brasiliensis* del suelo**. Myc.l Myco. Appl. v.52. p. 45-53. 1974.

MENDELOVICI,K.; SALFELDER, E.; ROMAN, A. R. **Intento de aislamento del *Paracoccidioides brasiliensis* del suelo**. Mycopathol. Mycol. Appl. v. 52. p. 45–53. 1974.

MENDES, R. P. **The gamut of clinical manifestations**. In: Franco, M.; Lacaz, C. S.; Restrepo-Moreno, A.; Del Negro, G. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC Press. p.233-58. 1994.

MENDES, R. P.; SHIKANAI-YASUDA, M. A. **Paracoccidioidomicose**. In: Cimerman, S.; Cimerman, B. Medicina Tropical. São Paulo: Atheneu. p.505-45. 2003.

MENDES-GIANNINI, M. J. et al. **Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis***. Microbes Infect. v. 8. p. 1550–9. 2006.

MENDES-GIANNINI, M. J. S. et al. **Antibody response to 43KDa glycoprotein of Paracoccidioides brasiliensis as a marker for the evaluation of patients under treatment**. Am. J. Trop. Med. & Hyg. v. 43. n. 2. p. 200-6. 1990.

MONTENEGRO, J. **Acerca da inoculabilidade da blastomicose no Brasil**. Bras. Med. v. 41. p. 808-12. 1927.

MONTENEGRO, M. R. et al. **Isolation of fungi from nature in the region of Botucatu, SP, Brazil, an endemic area of paracoccidioidomycosis**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. v. 11. p. 665–670. 1996.

MONTENEGRO, M. R. G.; FRANCO, M. Pathology. In: FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO, M. A.; DEL NEGRO, G. eds. ***Paracoccidioidomycosis***. 1st edn.: 131–150. Boca Raton: CRC Press. 1994.

MONTENEGRO, M. R. **Isolation of fungi from nature in the region of Botucatu, SP, Brazil, an endemic area of paracoccidioidomycosis**. Mem Inst Oswaldo Cruz. v.11. p. 665–670. 1996.

MOTA, N. G. S. **The effect of Ketoconazole on experimental paracoccidioidomycosis in the Syrian hamster: immunological and histopathological study**. Mycopathologia. v. 88(2/3). p. 141-8. 1984.

MOTOYAMA, A. B. et al. **Molecular identification of Paracoccidioides brasiliensis by PCR amplification of ribosomal DNA.** Journ. Clin. Microbiol. v.38(8). p. 3106-9. 2000.

NAIFF, R. D.; FERREIRA, L. C. L.; BARRETT, T. V.; NAIFF, M. F.; ARIAS, J. R. **Paracoccidioidomicose enzoótica em tatus (*Dasypus novemcinctus*) no estado do Pará**. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. v. 28(1). p.19-27. 1986.

NEGRONI, P. **Aislamento del *Paracoccidioides brasiliensis* de una muestra de tierra del Chaco Argentino**. Bol Acad Nac Med Buenos Aires; 45**:** 513–516. 8 Negroni, P. Estudios sobre la ecologia. 1967.

PERAÇOLI, M. T. S.; MOTA, N. G. S.; MONTENEGRO, M. R. **Experimental paracoccidioidomycosis in the Syrian hamster: morphology and correlation of lesions with humoral and cell-mediated immunity**. Mycopathologia. v. 79. p. 7-17. 1982.

PEREIRA, M., VIANNA, G. **A propósito de um caso de blastomycose (Phyohemia blastomicótica)**. Arq. Bras. Med. v.1. p. 63-83.1911.

RESTREPO, A. et al. **Clues to the presence of pathogenic fungi in certain environments**. Med. Mycol. v.38. p.67-77. 2000.

RESTREPO, A. **The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved**. Sabouraudia: J. Med. Vet. Mycol. v.23. p. 323-34. 1985.

REZKALLAH-IWASSO M. T., VILLAS BOAS M. L. F., SOARES A., et al. **Experimental paracoccidioidomycosis of hamsters and mice: treatment with a new triazole Sch 39304**. Rev. Iberoam. Micol. v.9. p. 72-5. 1992.

RICCI, G. et al. **Canine paracoccidioidomycosis**. Med. Mycol. v.42. p.379-83. 2004.

RICHINI-PEREIRA, V. B. et al. **Molecular Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in Road Killed wild animals.** Med. Mycol. v.18. p.1-6. 2007.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. **Guidelines in paracoccidioidomycosis**. Rev Soc. Bras. Med. Trop. v. 39. p. 297-310. 2006.

SHOME, S. K.; BATISTA, A. C. **Occurrence of *Paracoccidioides brasiliensis* In the soil of Recife (Brazil)**. *Rev. Fac. Med. Uni. Ceara.* v.3: 90–94. 1963

SILVA-VERGARA, M. L. et al. **Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis*** strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá , State of Minas Gerais, Brazil. Med. Mycol. v.36. p. 37–42. 1998.

SILVA-VERGARA, M. L. et al. **Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* form armadillos *(Dasypus novemcinctus)* in an area where the fungus was recently isolated from soil**. Med. Mycol. v.38. p.193-9. 2000.

SINGER-VERMES, L. M. et al. **Advances in experimental paracoccidioidomycosis using on isogenic murine model**. Arch. Med. Res. v.24(3). p. 239-45. 1993.

SPLENDORE, A. **Blastomycoses Americanas**. Rev. Bras. Med. v.24:153-7. 1910.

SPLENDORE, A. **Zymonematozi com localizzazione nella cavita della bocca, osservada in Brasile**. Bull. Soc. Path. Exot. v. 5. p. 313-9. 1912.

TAKAYAMA, A. et al. **An atypical *Paracoccidioides brasiliensis* clinical isolate based on multiple gene analysis.** Med. Mycol. v.48. p. 64-72. 2010.

TEIXEIRA, M. M. et al. **Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus.** Mol. Phylog. Evol. v. 52(2). p. 273-83. 2009.

TERÇARIOLI, G.R. et al. **Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* In soil: growth ability, conidia production and molecular detection**. BMC Microbiology (Online). v.7. p.92. 2007.

THEODORO, R. C. et al. **Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil**. Med. Mycol. v.43(8). p.725-9. 2005a.

THEODORO, R. C. et al. **Phylogenetic analysis of PRP8 intein in Paracoccidioides brasiliensis species complex.** Fungal Genetic. and Biology. v. 45. p. 1284-1291. 2008.

THEODORO, R. C. et al. Submetido. **Paracoccidioides Genus: Species Recognition and Biogeographic Aspects**. PlosOne.

TREJO-CHÁVEZ, A., et al. **Disseminated paracoccidioidomycosis in a Southern two-toed sloth (*Choloepus didactylus*)**. *Journ Comp Pathol* 2011; 144:231-234.

UNTERAINER, W. A. et al. **The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales**. Mycology. v.96. p. 812–61. 2004.

VICENTINI, A.P, GESZTESI, J., GESZTESI, J.L., FRANCO, M.F. **Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis**. Infect. Immun. v.62. p.1465-9. 1994.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. **Amplification and direct sequencing of fungal ribossomal 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 p.315-22.Press. 1990.

Capítulo 2 - Artigo submetido: Detection of *Paracoccidioides* sp. in environmental aerosol samples

Title:

Detection of *Paracoccidioides* sp. in environmental aerosol samples

Authors

Thales Domingos Arantes[1], Raquel Cordeiro Theodoro[1], Severino Assis da Graça Macoris[2], Eduardo Bagagli[1]*

[1]- Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP

[2]- Instituto Adolfo Lutz

***Corresponding author:**

Dept of Microbiology and Immunology

Institute of Biosciences, Unesp

Distrito de Rubião Júnior, Botucatu, SP, Brazil

Zip Code: 18618-970

Email address: bagagli@ibb.unesp.br

Abstract

Taking into account that paracoccidioidomycosis infection occurs by inhalation of the asexual conidia produced by *Paracoccidioides* sp. in its saprobic phase, this work presents the collection of aerosol samples as an option for environmental detection of this pathogen, by positioning a cyclonic air sampler at the entrance of armadillo burrows. Detection strategies included: direct culture, extinction technique culture and Nested PCR of the ITS1-5.8S-ITS2 region, as well as the evaluation of one armadillo (*D. novemcinctus*) as positive control for the studied area. Although the pathogen could not be isolated by the culturing strategies, the aerosol sampling associated with molecular detection by Nested PCR proved the best method for detecting *Paracoccidioides* sp. in the environment. Most of the ITS sequences obtained herein presented high similarity with the homologous sequences of *P. lutzii* from GenBank database, suggesting that this *Paracoccidioides* species may be not exclusive to mid-western Brazil as proposed so far.

Key-words: *Paracoccidioides brasiliensis*; Environmental samples; Cyclone Sampler ; Paracoccidioidomycosis.

Introduction

The fungus *Paracoccidioides brasiliensis* [1, 2], an Ascomycete from the Ajellomycetaceae family, is the etiological agent of paracoccidioidomycosis, the most important systemic mycosis of Latin America [3]. It is a thermo-dimorphic fungus, presenting its mycelial form at room temperature and as yeast at 35-37ºC or in mammalian host tissues. The mycelial phase produces the infectious spores, known as conidia or arthrospores, which might be aerosolized, infecting susceptible hosts by inhalation. After infection, the conidia become individualized as multi-budding yeast cells causing disease [4]. Paracoccidioidomycosis is a disease of considerable socio-economic impact, since it affects highly productive rural male workers aged 30 to 50 years, preventing them from returning to their job functions [5, 6].

While this fungus has been rarely isolated from saprobiotic sources, it has been frequently recovered from human clinical samples and from internal tissues of armadillos, namely, two armadillo species, the nine-banded *Dasypus novemcinctus* [7, 8, 9, 10] and the naked-tailed *Cabassous centralis* [11]. It was also detected in and isolated from dogs [12, 13] and from the two-toed sloth *Choloepus didactylus* [14].

Although the habitat (physical location) of *P. brasiliensis* may be on soil, its ecological niche, defined as the sum of all its interactions with the biotic and non-biotic factors in the environment, has not been correctly determined, which prevents elucidation of the mode and the exact moment of infection. Recently, four distinct cryptic species of the *Paracoccidioides* genus (S1, PS2, PS3 and *P. lutzii*) were described. These species cannot be distinguished by morphological characteristics, but are genetically distinct and reproductively isolated [15, 16, 17, 18]. These studies have focused mainly on human isolates, including a few samples from

armadillos, and practically no environmental (from soil) isolates. The few reported cases of environmental isolation of this pathogen were obtained from soil, dog food or penguin feces, almost casually, with little or no repeatability [19], greatly limiting our understanding of the ecology and the actual geographic distribution of the different species.

The *Paracoccidioides* species appear to be typical K-strategist organisms [20], with low reproductive rate and low spore production, when in saprobiosis. Still, compared with other soil fungi, *P. brasiliensis* and *P. lutzii* grow very slowly, which greatly hampers their environmental isolation, either by direct culture or by animal inoculation [19]. For that reason, in this work we introduce new methods that improve the detection of this pathogen in environmental samples, particularly by using aerosol sampling associated with molecular detection by Nested PCR.

Material and Methods

Studied area and Field procedure

The studied area consisted of five thousand square meters, located at Lageado Farm (-22° 50' 14.36" latitude and -48° 25' 31.35" longitude) (Supplementary Material 1), encompassing a riparian secondary forest, where *P. brasiliensis* had already been isolated from some *D. novemcinctus* armadillos [8, 21, 22] and detected in soil by Nested PCR [23].

Six armadillo burrows and two trails, which presented signs of recent animal activity, were chosen and identified as burrows 1, 2, 3, 6, 7 and 8 and trails 4 and 5.

Soil and Aerosol sampling

The NIOSH Cyclone Samplers Model BC 251, developed at the CDC (Centers for Disease Control and Prevention, Morgentown - WV, USA), with an implemented air

collection pump (SKC Universal Pumps Model 224-44XR) [24, 25, 26] was used to collect aerosol samples from the armadillo burrows. This cyclone sampler works via two sampling stages: in the first stage the air goes through a 15 mL conic tube that retains particles of 4.9-2.1µm and in the second stage the air goes through a 1.5 mL micro tube that retains particles of 1.7-0.41µm for a drainage speed of 3.5 liters/minute. This speed was settled to enable the collection of *P. brasiliensis* conidia, which range from 2.8 to 3.0 µm [27].

For each of the six burrows, the cyclonic sampler was placed at the entrance, and an air volume of 6,720 liters was sampled in a 32h collection, resultant from four consecutive collections of 8h each. This procedure was done in triplicate for each burrow. Since the equipment (collection pump and samplers) was on for a long duration in the field, an iron support was developed in order to protect it against animals, rain and wind. The samples were evaluated by direct culture and/ or extinction technique culture, animal inoculation and Nested PCR.

Soil samples from each of the eight collection sites were obtained in triplicate. For the burrows, the soil was collected at three depths (1.0m and 0.5m and at the entrance of the burrow). An additional collection, in the Botanical Garden of the Bioscience Institute (UNESP-Botucatu), was performed as an external control.

***P. brasiliensis* isolation of a *D. novemcinctus* armadillo**

A *D. novemcinctus* individual was captured using a double-entrance trap placed on a known armadillo trail, in the same area where the environmental samples had been obtained. The animal was evaluated for fungal isolation as positive control for the studied area.

The armadillo was anesthetized with Zoletyl (0.2mg/Kg) and euthanized by total blood cardiac puncture. Liver, spleen, lung and mesenteric lymph nodes were fragmented and cultured on Mycosel® agar plates, at 35°C, as previously described [8]. Microscopic analyses,

with Lacto-Phenol-Cotton blue stain, were performed on all the fungal colonies, on the organ fragments, which resembled the yeast phase of *Paracoccidioides* genus (multi-budding cells with bi-refractive walls).

After the isolation of a *Paracoccidioides*-like fungal colony, the DNA extraction was carried out according to [28], followed by PCR with the panfungal primers ITS4 and ITS5 (WHITE et al., 1990), For the amplification reactions, 2 µL of the DNA was mixed with 2.5 µL of PCR buffer 10X (100 mM Tris-HCl pH 8.4; 1.5 mM $MgCl_2$ and 50 mM KCl), 0.2 mM of dNTP mixture, 0.8 µM of each primer and 1 unit of Taq Platinum (Invitrogen). The thermal cycling conditions were: 95°C for 4 min, followed by 40 cycles at 95°C for 1 min, 55°C for 1 min and 72°C for 1 min, followed by a final extension at 72°C for 10 sec. The PCR product was purified with Exosap-IT (GE Healthcare) according to the manufacturer's instruction and sent to the Laboratory for Molecular Diagnosis of the Department of Microbiology and Immunology (UNESP, Botucatu, SP, Brazil) for sequencing in an ABI 3500 DNA Analyzer (Applied Biosystems). Phylogenetic analysis for the identification of these environmental *amplicons* was carried out by aligning the ITS sequences obtained herein with 15 sequences of *P. brasiliensis* from GenBank (access numbers: EU870314; EU870315; EU870316; AY631235; EU118561; EU118560; EU118548; EU118554; EU118553; EU118549; EU118546; EU118547; EU118545; EU118543; EU118542) and 8 sequences of *P. lutzii* from GenBank (access numbers: EU870298; EU870303; EU870306; EU870309; EU870310; EU870311; AF092903; EU87029) in the program Clustal W implemented in MEGA v.5.0 [29], where Neighbor Joining phylogeny [30] was constructed using pairwise deletion to treat gaps and Tamura-3 parameters as the best evolutionary model defined by the software. Bootstrap re-sampling [31] was applied to assess support for individual nodes using 1000 replicates.

To distinguish to which cryptic species this new isolate belongs, multilocus sequence typing was carried out as described by Matute et al. [15] and Teixeira et al. [17], with the

same eight coding regions [promoter-exon1 and exons 2-4 of *chs2* (chitin synthase), exons 2 and 3 of *fks* (β-glucan synthase), exons 2-4 of α-tubulin, exons 2–3 of *arf* (adenyl ribosylation factor) and promoter-exon1 and exon 2 of *gp43*]. For the species identification (S1, PS2, PS3 or *P. lutzii*) of the new *Paracoccidioides* isolate, the sequences obtained from the eight coding regions were separately aligned, in Clustal W, with the 65 sequences of *P. brasiliensis* (S1, PS2 and PS3) deposited by Matute et al. [15] and with the 17 sequences of *P. lutzii,* deposited by Teixeira et al. [17]. Phylogenetic analysis by Neighbor Joining [30] was conducted, using pairwise deletion to treat gaps and Kimura 2 parameters as distance model. Bootstrap re-sampling [31] was applied to assess support for individual nodes using 1000 replicates.

Detection of *Paracoccidioides* in soil and aerosol samples

The environmental samples were processed as shown in Figure 1.

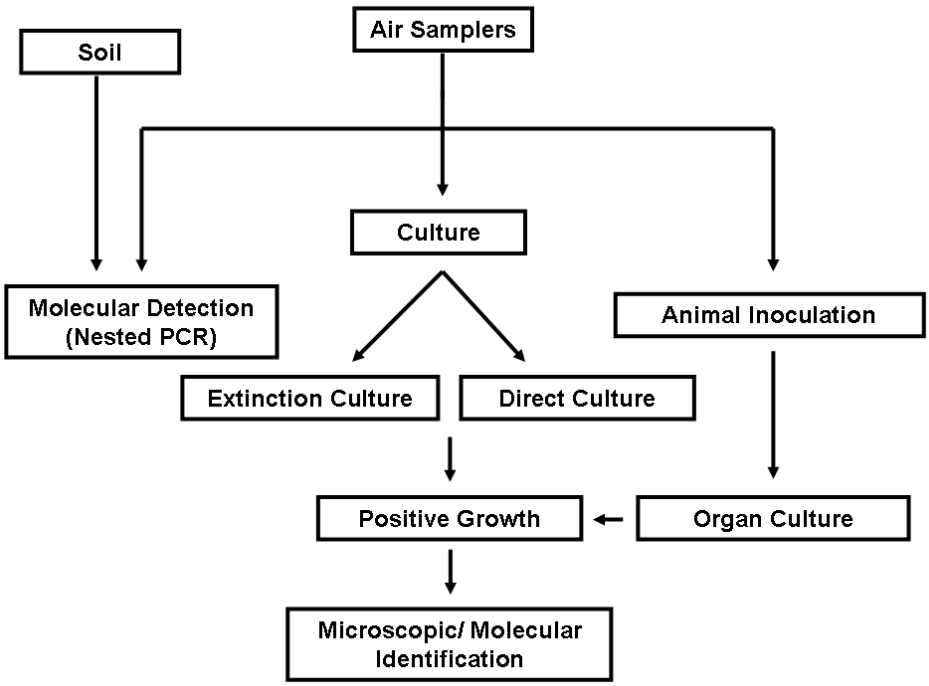


Figure 1 – Scheme for the processing of environmental samples.

Direct culture and Extinction Technique

For direct culture, the aerosol samples (from both collection tubes, 15 and 1.5mL, together) were washed with 2.0ml of 0.05% (w/v) Tween 20 solution, vortexed and cultured on Mycosel® agar plates, at 25ºC and 35ºC, for 60 days (with daily observations). Macroscopic colonies that resemble *Paracoccidioides sp* were subcultured on Mycosel® agar slants and evaluated microscopically.

For the extinction technique, the aerosol + 0.05% Tween 20 solution was diluted to 2.4mL and aliquots of 50 µL were cultured, individually, in plate wells (TPP® Test Plate for cell culture, with 12 wells), containing Mycosel® Agar. This strategy allows the culturing of the entire sample volume and the individualized growth of fungal colonies. Usually, around 50% of the wells do not present fungal growth due to the extinction of spores by the initial dilution. This procedure is recommended for isolation of slowly growing microorganisms, which, in other culture techniques, are inhibited or have their colonies hidden by rapidly growing microorganisms [32].

As positive control for this technique, we used the isolate Pbdog, known to produce a high amount of conidia [27]. The isolate was cultured in Soil Extract Agar (SEA) [33] at 25°C and 35°C for 60 days and its surface colonies were scraped with the aid of a loop to release mycelial fragments and conidia, which were processed as the environmental aerosols.

Animal inoculation

The aerosol samples, obtained from each of the six armadillo burrows, were resuspended in 0.85% NaCl solution; then 0.1 mL of the suspension was inoculated, by intra-

testicular route, in *Mesocretus auratus* (Syrian hamsters), according to previous works [34, 35, 36, 37, 38] Five animals were used per sample, two of which were evaluated after 30 days and three after 60 days. The animals were euthanized by inhaling the anesthetic Halotano (Tanohalo®) and a cardiac puncture was carried out. Spleen, liver and testicles were fragmented and cultured on Mycosel® agar plates under sterilized conditions, as described previously [39]. The plates were maintained at 35°C for at least 45 days. A positive control was included by inoculating an additional hamster with 0.1mL of saline solution containing 10^6 yeast cells of Pb-dog, a *P. brasiliensis* isolate. Microscopic analyses, with Lacto-Phenol-Cotton blue stain, were conducted on all the fungal colonies, specifically on the organ fragments that resembled the yeast phase of the *Paracoccidioides* genus.

Nested-PCR, sequencing and phylogenetic analysis of environmental samples

All aerosols and soil samples were processed for molecular detection of *Paracoccidioides sp*. The DNA was extracted from the soil samples by using the commercial kit Power Soil (MoBio® Laboratories Inc.) according to the manufacturer's instructions while the PCR with the primers ITS4 and ITS5 was done as described above.

The aerosol samples were directly processed by PCR (there was no DNA extraction procedure) by washing both capture tubes (the 15 mL and the 1.5 mL one) with 100 µL of PCR mixture containing 62.0 µL of nuclease-free water, 20.0 µL of CG buffer, 2.0 µL of 0.2 mM dNTP mixture, 10.0 µL of 30% DMSO, 2.5 µL of each primer, ITS4 and ITS5 (White et al., 1990) and 1.0 µL of Taq Phusion Polymerase (Finnzymes®). This PCR mixture was divided into four aliquots of 25 µL each and submitted to the following thermal cycling conditions: an initial denaturation at 98°C for 5 min (for breaking spore walls), followed by 40 cycles at 98°C for 10 sec, 55°C for 30 sec and 72°C for 40 sec, and a final extension of 72°C

for 10 sec. These PCR products were submitted to a second PCR with the same primers (ITS4 and ITS5) as a double PCR, in order to increase the sensitivity of the method.

The Nested PCR, for soil and aerosol *amplicons*, was performed initially with the primers PbITS-E (sense) and PbITS-R (antisense), previously designed (Theodoro et al., 2005) for the amplification of a 387 bp fragment in some of the samples. However, a new antisense primer denominated PbITS-T (5'GTATCCCTACCTGATCCGAG 3') was designed because, differently from PbITS-R, it presents 100% similarity with sequences from both *P. brasiliensis* and *P. lutzii.* The amplification of a 450bp fragment is expected with PbITS-E and PbITS-T primers. For the Nested PCR reactions, 2 µL of the first PCR product was mixed with 2.5 µL of PCR buffer 10X (100 mM Tris-HCl pH 8.4; 1.5 mM $MgCl_2$ and 50 mM KCl), 0.2 mM of dNTP mixture, 0.8 µM of each primer (sense and antisense) and 1 unit of Taq Platinum (Invitrogen). The thermal cycling conditions were: 95°C for 4 min, 40 cycles of 95°C for 1 min, 55°C for 1 min and 72°C for 1 min, followed by a final extension at 72°C for 10 sec. The standardization of PCR with the primers PbITS-E and PbITS-T was carried out by using positive DNA controls belonging to the four cryptic species of *Paracoccidioides* (S1, PS2, PS3 and *P. lutzii*).

The PCR products were identified by 1.5% agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide. The *amplicons* at their expected sizes were purified by using Exosap-IT (GE Healt*Hca*re) according to the manufacturer's instructions and sent to the Laboratory for Molecular Diagnosis at the Department of Microbiology and Immunology (UNESP, Botucatu, SP, Brazil) for sequencing in an ABI 3500 DNA Analyzer (Applied Biosystems). The sequences obtained were compared to GenBank database by the Blastn tool (at http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

Phylogenetic analysis to identify these environmental ITS *amplicons* was carried out as described above for the *Paracoccidioides* isolated from the nine-banded armadillo.

Approval of the procedures using laboratory and wild animals

This work received approval from the **Animal Experimentation Ethics Committee of** IBB-UNESP: Protocols 235 and 333 for the manipulation of hamsters and armadillos, respectively and from the **Brazilian Protection Agency (IBAMA)** for the capture of armadillos (process SISBIO/IBAMA 12408-4).

Results

Isolation of *P. brasiliensis* from one armadillo: microscopic and molecular identification

A total of 1,260 organ fragments were cultured and after 16 days of incubation at 35ºC, a spleen fragment presented a white colony with cerebriform aspect. After subculturing it on Mycosel® agar slants, it was revealed to be thermo-dimorphic and also presented budding yeast cells with bi-refractive walls, characteristic of *Paracoccidioides* sp. (Figure 2). After 45 days the other plates containing organ fragments were discarded since no other *Paracoccidioides*-like colony was observed.

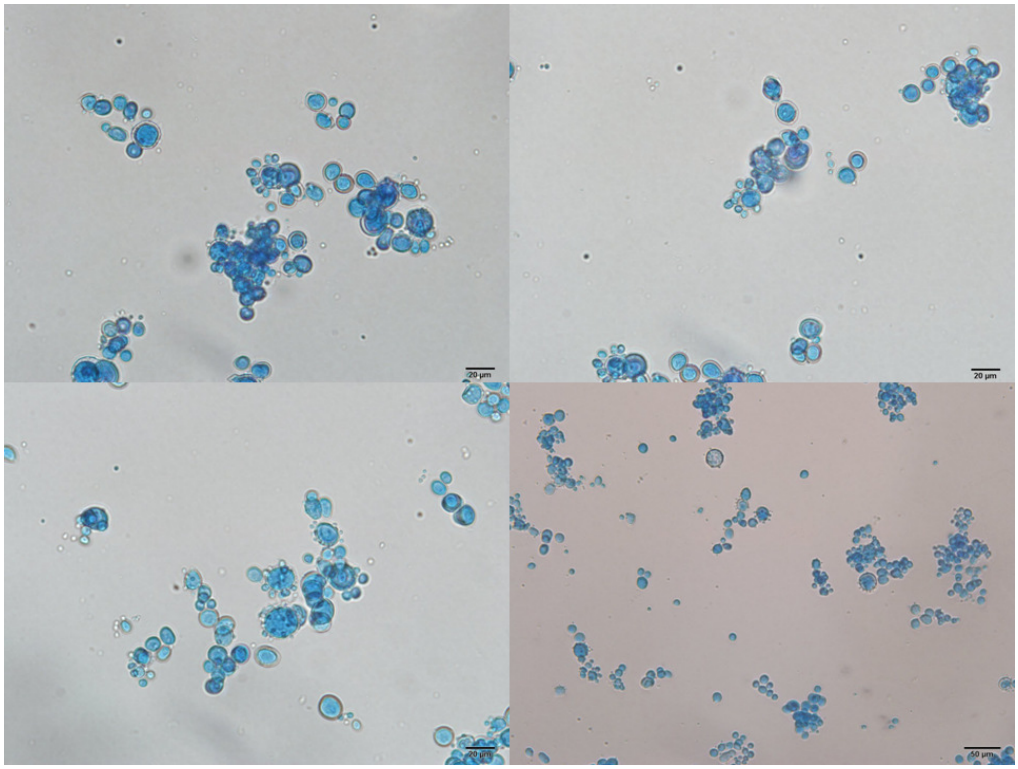


Figure 2: Budding yeast cells stained with Lacto-Phenol-Cotton blue observed in a spleen fragment from the captured armadillo (400X).

This new isolate, denominated T16B1, was also characterized by molecular assays (ITS1-5.8S-ITS2 and multilocus sequence typings). The ITS sequence presented 100% similarity with *P. brasiliensis* in GenBank database (Blastn). This was confirmed by the phylogenetic analysis performed herein, where the isolates were grouped with *P. brasiliensis* and not with *P. lutzii* in the Neighbor Joining tree (Figure 3). For each of the eight phylogenetic trees obtained by the multilocus analysis, the isolated T16B1 was placed in the same cluster as S1 cryptic species (data not shown).

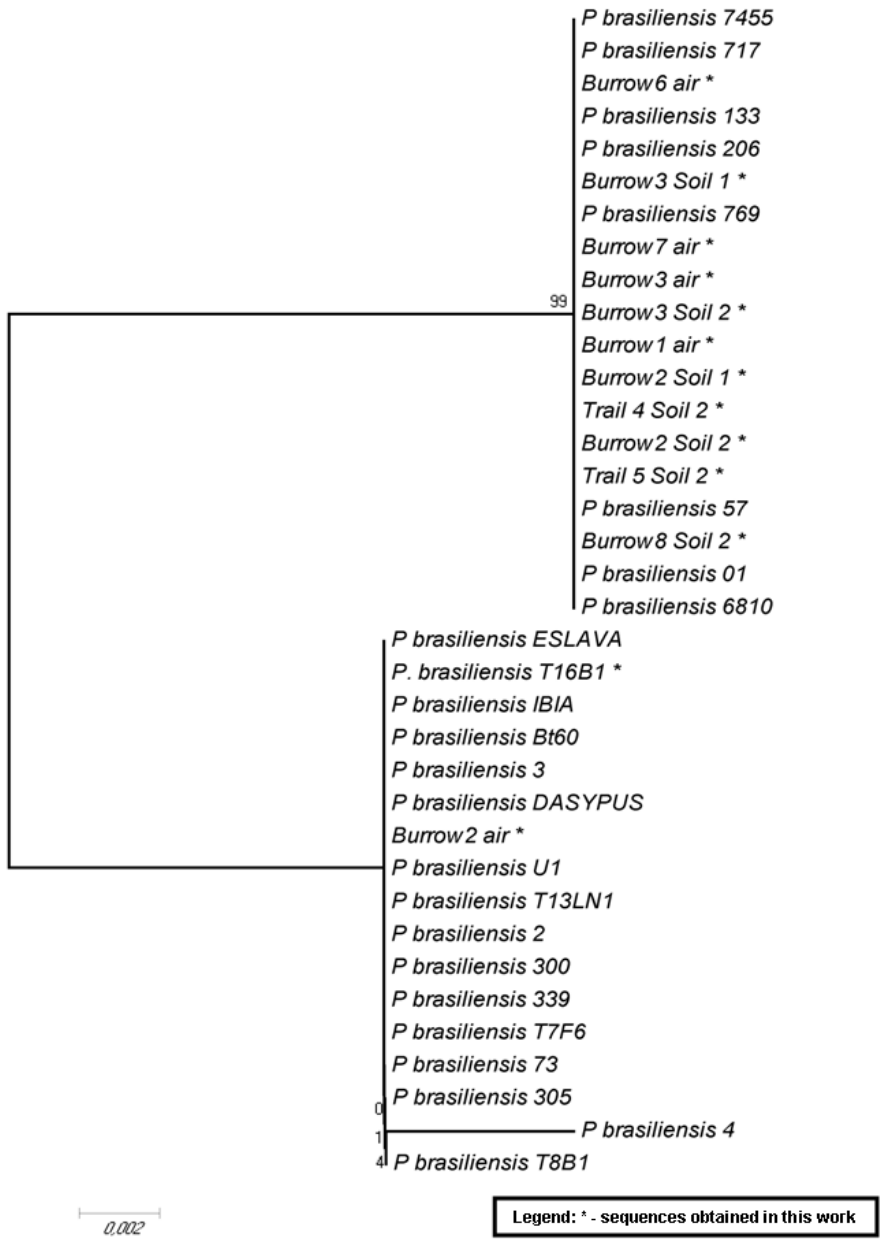


Figure 3: Molecular Phylogenetic Analysis by Neighbor Joining, using Tamura-3 parameter model. The percentages of replicate trees in which the associated isolates clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches. The analysis involved 36 nucleotide sequences. All ambiguous positions were removed in each sequence pair. The final dataset presented a total of 218 positions.

Detection of *Paracoccidioides* in soil and aerosol samples

Direct culture and extinction technique culture

The direct culture was performed on 4 of the 6 aerosols samples (Table 1), totaling 220 plates (110 at each temperature, 25 and 35°C). On most of the plates, (85%, 187 plates) a high level of uncontrolled fungal growth was observed. Ten plates at 35°C showed fungal colonies that resembled *Paracoccidioides* sp.; however, after microscopic evaluation this hypothesis was ruled out.

By the extinction technique culture, 24 plates, with 12 wells each, were evaluated. After 45 days, excessive fungal growth was shown only by sample B6 (from burrow number 6) at 25°C, making the colony identification impossible. The remaining plates presented restricted growth, allowing macro- and microscopic observation of the individual colonies. A larger number of colonies were observed at 25°C than at 35°C (Table 2). For this technique the isolation of *Paracoccidioides* SP was also negative.

The positive controls, with Pbdog isolate, presented no growth at 35°C, while 13 CFU/plate (33.3%) were observed among the plates maintained at 25°C.

Table 1: *Paracoccidioides* sp. detection in environmental samples by different techniques.

Collection Site	Sampling Method	Direct Culture	Extinction Technique	Animal Inoculation	PCR - ITS-4 and 5	Nested PbITS-E and PbITS-R/T
B1	Soil – 1	N/D	N/D	N/D	(-)	(-)
	Soil – 2	N/D	N/D	N/D	(-)	(-)
	Soil – 3	N/D	N/D	N/D	(-)	(-)
	Aerosol	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
B2	Soil – 1	N/D	N/D	N/D	(-)	(+)
	Soil – 2	N/D	N/D	N/D	(+)	(+)
	Soil – 3	N/D	N/D	N/D	(-)	(+)
	Aerosol	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
B3	Soil – 1	N/D	N/D	N/D	(+)	(+)
	Soil – 2	N/D	N/D	N/D	(-)	(+)
	Soil – 3	N/D	N/D	N/D	(-)	(-)
	Aerosol	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
B6	Soil – 1	N/D	N/D	N/D	(-)	(-)
	Soil – 2	N/D	N/D	N/D	(-)	(+)
	Soil – 3	N/D	N/D	N/D	(-)	(-)
	Aerosol	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
B7	Soil – 1	N/D	N/D	N/D	(-)	(-)
	Soil – 2	N/D	N/D	N/D	(-)	(+)
	Soil – 3	N/D	N/D	N/D	(-)	(-)
	Aerosol	N/D	(-)	(-)	(-)	(+)
B8	Soil – 1	N/D	N/D	N/D	(-)	(-)
	Soil – 2	N/D	N/D	N/D	(-)	(+)
	Soil – 3	N/D	N/D	N/D	(-)	(-)
	Aerosol	N/D	(-)	(-)	(-)	(-)
T4	Soil – 1	N/D	N/D	N/D	(-)	(-)
	Soil – 2	N/D	N/D	N/D	(-)	(-)
	Soil – 3	N/D	N/D	N/D	(-)	(-)
T5	Soil – 1	N/D	N/D	N/D	(-)	(-)
	Soil – 2	N/D	N/D	N/D	(-)	(-)
	Soil – 3	N/D	N/D	N/D	(-)	(-)

***Legend: N/D – Experiment Not Realized; (-) Negative sample; (+) Positive sample**

Formatado: Centralizado, Recuo: Primeira linha: 1,25 cm

Table 2: Fungal growth for the extinction technique culture of aerosol samples

Samples of Burrows	CFU/Sample - 25°C	CFU/Sample - 35°C
B1	14	2
B2	20	4
B3	22	8
B6	8	2
B7	20	2
B8	-	4
Total CFU	**84**	**22**

***Legend: B (1, 2, 3, 6, 7 and 8) Air samples of burrows; CFU (Colony Forming Unit)**

Animal Inoculation

A total of 372 plates with organ fragments from the inoculated hamsters were evaluated, including 360 inoculated by environmental aerosol samples and 12 positive controls (inoculation with Pbdog isolate).

Two plates with liver fragments (from animals evaluated 60 days after inoculation) presented colonies that resembled *Paracoccidioides* sp, but this hypothesis was ruled out after noting no growth at 25°C (no thermal dimorphism observed) and negative amplification by Nested PCR of the ITS region (data not shown).

In the positive control, the Pbdog isolate was recovered 60 days after inoculation from 3 spleen fragments.

Nested-PCR, sequencing and phylogenetic analysis of environmental samples

The efficiency of the new primer pair, PbITS-E and PbITS-T, used on some of the environmental samples, was confirmed for all the positive controls, which were isolates

belonging to the four cryptic species: T9B1 from S1, T10B1 from PS2 and EPM77 from PS3, corresponding to the *P. brasiliensis* complex and Pb8334 from *P. lutzii* (Figure 4).

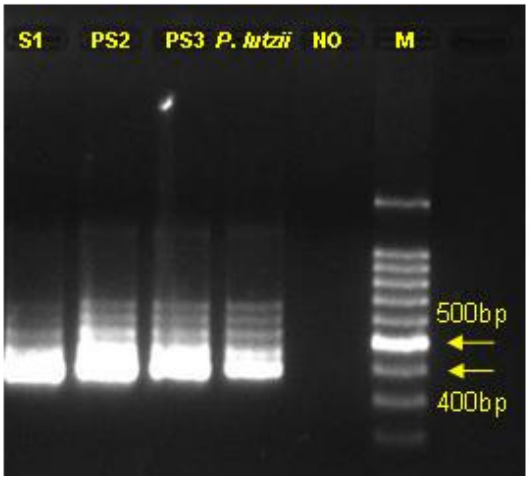
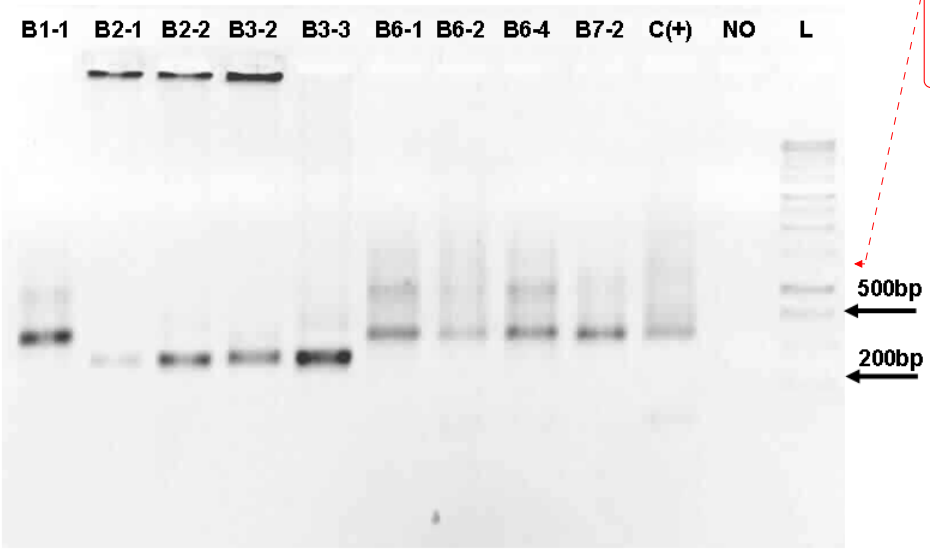


Figure 4: Agarose gel electrophoresis of the positive controls by PCR with the primers PbITS-E and PBITS-T. Lane 1: 100bp ladder (Promega), lanes 2-5: T9B1 (S1), T10B1 (PS2), EPM77 (PS3) and Pb8334 (P. lutzii), lane 6: negative control (nuclease-free water).

Using the double ITS4/ITS5 PCR, followed by the Nested PCR, with the primer pairs PbITS-E/PbITS-R or PbITS-E/PbITS-T, we observed the expected amplified fragments in 5 of the 6 aerosol samples collected in armadillo burrows (a positivity of 83.3%) (Figure 5 and Table 1)



Formatado: À direita, Recuo: À esquerda: 0,75 cm, Primeira linha: 0,75 cm, À direita: -1,25 cm, Espaçamento entre linhas: Duplo

Figure 5: Agarose gel electrophoresis of the positive Nested PCRs from the aerosol samples collected from armadillo burrows (B1, B2, B3, B6 and B7) and positive control (C+: DNA of the isolate T10B1). The samples B1, B6, B7 and C+ were amplified by the primers PbITS-E and PbITS-T, while the samples B2 and B3 were amplified via PbITS-E and PbITS-R. L is the 100bp ladder (Promega) and NO is the negative control (nuclease-free water).

Formatado: Recuo: Primeira linha: 1,27 cm, À direita: -0,03 cm, Espaçamento entre linhas: Duplo, Não ajustar espaço entre o texto latino e asiático, Não ajustar espaço entre o texto asiático e números

Out of the 27 soil samples evaluated [3 for each of the collection sites: burrows B1, B2, B3, B6, B7; trails T4 and T5 and external control (Botanical Garden of Bioscience Institute, UNESP, Botucatu)], 8 (34%) were positive for Nested-PCR by the primers PbITS-E and PbITS-T (Figure 6)

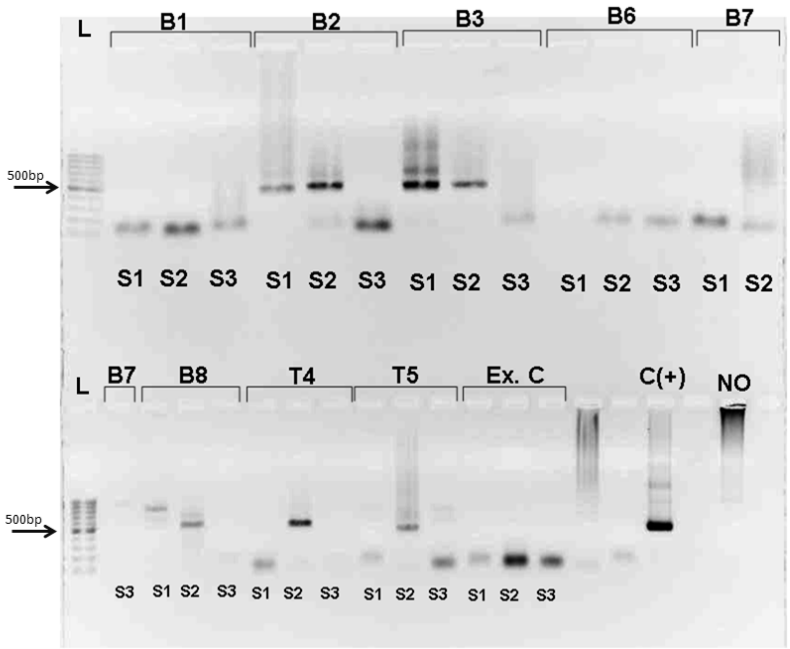


Figure 6: Agarose gel electrophoresis of the Nested PCRs, with the primers PbITS-E and PbITS-T, of the soil samples collected from armadillo burrows (B1, B2, B3, B6 and B7), trails (T4 and T5) and external control (Ex.C), as well as of positive (C+: DNA of the isolate T10B1) and negative (NO: nuclease-free water) controls. L is the 100bp ladder (Promega).

Phylogenetic Analysis of the ITS sequences obtained from aerosol and soil samples.

The alignment of the 12 environmental sequences obtained in this work, together with *P. brasiliensis and P. lutzii* sequences from GenBank, revealed seven polymorphic sites. The aerosol sample from burrow B2 shares these seven polymorphisms with *P. brasiliensis* sequences while the remaining environmental samples (aerosols from burrows B1, B3, B6, B7 and soil samples from burrows B1, B2, B3, B7, B8 and from trails T4 and T5) share 6 of these seven polymorphisms with *P. lutzii*, as shown in Table 3.

Table 3: Polymorphism analysis of the environmental ITS *amplicons*.

Sequences	Polymorphic Positions*						
	307	375	384	397	413	489	486
P. brasiliensis	A	C	C/T	G	T	A	T
P. lutzii	A	T	C	A	A	G	C
B2 (aerosol sample)	**A**	**C**	**C**	**G**	**T**	**A**	**T**
B1, B3, B6 and B7 (aerosol)	G	**T**	**C**	**A**	**A**	**G**	**C**
B2, B3, B8, T4 and T5 (soil)	G	**T**	**C**	**A**	**A**	**G**	**C**

* Based on the ITS1-5.8S-ITS-2 sequence of the isolate Pb339 (Access number EU118547)

The phylogenetic Neighbor Joining tree of ITS region, encompassing *P. brasiliensis* and *P. lutzii* sequences from GenBank database, confirmed the similarity of most of the environmental *amplicons* to *P. lutzii* species, since only the aerosol sample from burrow B2 was grouped together with the *P. brasiliensis* species complex (Figure 3).

Discussion

All the evidence indicates that the PCM infection occurs by inhalation of conidia, the infective propagules, produced during the saprobic phase of *Paracoccidioides* sp [40]. For this reason, the collection of spores in aerosol samples appears to be a promising strategy for environmental detection of this pathogen.

The aerosol sampling has been successfully employed in closed places to study allergenic fungal particles [24, 25, 26]. The present work used, for the first time, this technique for ecological study of *Paracoccidioides* sp., based on the fact that its spores may be spread by environmental changes, such as wind, rain and animal activity on soil, especially by the armadillo *D. novemcinctus,* its wild host [7, 8].

The aerosol sampling herein applied resembles the susceptive host infection and was based on the principle of the separation of conidia by the cyclonic method [26]. Indeed, our results showed a higher positivity of molecular detection, by Nested PCR, for the aerosol sampling (83.3%, 5 from the 6 evaluated burrows) than for soil sampling (62.5%, 5 from the 8 collection sites, burrow and trails). This result indicates the high sensitivity of these sampling and detection methods and indicates a considerable risk of PCM infection in the studied area.

Culturing methods, namely the direct and extinction technique cultures [32], were also applied in an attempt to isolate *Paracoccidioides* sp from aerosol samples. The direct culture could not be considered a suitable strategy because of the excessive fungal growth, even in Mycosel® agar, which prevented colony differentiation and isolation. This becomes a serious problem mainly when studying fastidious fungi, such as *Paracoccidioides* sp. [19]. On the other hand, the extinction technique, despite failing to isolate *Paracoccidioides* sp., was proven ideal for culturing aerosol samples, because of the individualized growth of spores, even at 25°C, per well on the plate, which would allow the development of slow-growth fungi.

Our results also pointed out the difficulty of recovering the yeast phase of the positive control (isolate Pbdog) used in the extinction technique, after incubation at 35°C, while it was easily recovered at 25°C. This data suggests the necessity of developing culture media and methods for the isolation of the pathogen from its mycelial phase, rather than from its yeast form.

The animal inoculation technique has been extensively and successfully applied for virulence and immunological assays [33, 36, 37, 41]. The same efficiency however has not been proven for recovering *Paracoccidioides* sp from soil, since there are only two isolations reported among a very large sampling size carried out by Albornoz [42] and Silva-Vergara et al. [43]. The negative result of the present work may be due to a small sampling size in

addition to the low sensitivity of this technique, when compared to molecular procedures. For instance, the positive control for the animal inoculation is very high, 10^6 yeast cells, compared to the number of fungal propagules that may be found in the aerosol samples.

As previously reported, the isolation of *Paracoccidioides* sp. from *D. novemcinctus* armadillos is relatively easy, and therefore considered an excellent source of environmental isolation [7, 8, 22]. Nevertheless, despite its success, this technique presents some disadvantages, such as the need to manipulate and euthanize a wild animal as well as the frequent contamination of organ fragments. The armadillo isolate obtained herein, T16B1, was characterized in relation to cryptic species, so that, after multilocus phylogenetic study it was considered to be from the species S1. This was an expected result, since in our study area the species S1 and PS2 occur in sympatry and the S1 individuals are more frequent, according to Matute et al. [15].

According to Teixeira et al. [17], the species *P. lutzii* is prevalent in mid-western Brazil. Surprisingly, most of our environmental Nested PCR *amplicons* of ITS region presented high similarity to *P. lutzii* sequences. Even though the ITS region is not suitable for differentiation of the cryptic species from the *P. brasiliensis* complex (S1, PS2 and PS3), it clearly differentiates between *P. brasiliensis* and *P. lutzii* [17]. Actually, this is not the first time that a *P. lutzii* isolate has been detected outside of mid-western Brazil [44], characterized as *P. lutzii* a strain isolated from a patient resident in Londrina (Paraná state), in southern Brazil.

This unexpected result emphasizes the importance of acquiring environmental fungal isolates (from soil or aerosol samples) for phylogeographic studies of the *Paracoccidioides* genus, since the studies done so far have used mainly isolates obtained from vertebrate hosts (humans and armadillos). The occurrence of both species, *P. brasiliensis* and *P. lutzii*, in our environmental sampling may indicate that, although *P. lutzii* may be present in the studied

area, it does not seem to be infecting the hosts (humans or armadillos), since all the armadillo or human isolates from this region, evaluated until now, belong to the S1 and PS2 species.

Of course a multilocus sequence typing would be the most appropriate method for determining to which cryptic species the environmental samples belong. However, the DNA scarcity of the environmental samples prevented us from carrying out many PCRs for each sample. Still, the evidence that *P. lutzii* may occur in southeastern Brazil calls our attention to a new challenge: the development of a molecular technique that not only detects *Paracoccidioides* sp in soil, but also distinguishes the isolate in relation to species. Such a technique will certainly contribute not only to improving epidemiological studies but also to elucidating the evolutionary and biogeographic aspects of the speciation processes in this genus.

Acknowledgments

We thank Dr. Brett Green and the CDC (Centers for Diseases Control and Prevention, Morgentown – WV) for providing the cyclonic sampler used in this study. This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP grant number 2010/12669-4) and by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

[1]Splendore, A. Blastomycoses Americanas. *Rev Bras Med* 1910; **24**:153-157.

[2]Almeida FP. Comparative studies of coccidioic granuloma in the United States and Brazil. New genus for Brazilian parasite. *An Fac Med Univ São Paulo*1930. **5**: 125-141.

[3]Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidiodomycosis: an update. *Clinic Mycrobiol Rer* 1993; **6**: 89-117.

[4]Lacaz, C. S (2ª). *Tratado de Micologia Médica Lacaz*, 2nd edn. São Paulo: Sarvier, 2002.

[5]Mendes RP, Shikanai-yasuda MA. Paracoccidioidomicose. In: Cimerman, S.; Cimerman, B. *Medicina Tropical*, 1th edn. São Paulo: Atheneu, 2003: 505-545.

[6]Shikanai-yasuda MA, *et al.* Guidelines in paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; **39**: 297-310.

[7]Naiff RD, Ferreira LCL, Barrett TV, Naiff MF, Arias JR. Enzootic Paracoccidioidomycosis in armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in the state of Pará. *Rev Inst Med Trop* 1986; **28**:19-27.

[8]Bagagli E, Sano A, Coelho KIR, Alquati S, Miyaji M, Camargo ZP, Gomes G, Franco M, Montenegro MR. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus)* captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg* 1998; **58**:505-512.

[9]Silva-Vergara ML, Martinez R, Camargo ZP. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* form armadillos *(Dasypus novemcinctus)* in an area where the fungus was recently isolated from soil. *Med Mycol* 2000; **38**:193-199.

[10]Corredor GG, Castaño JH, Peralta A, *et al.* Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. *Rev Iberoam Micol* 1999; **16**: 216-20.

[11]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**: 275-280.

[12]Farias MR, Werner J, Muro MD, Marques SA, *et al*. Canine paracoccidioidomycosis: case report of generalized lymphadenitis. *Rev Inst Med Trop* 2005; **47**: 64.

[13]Ricci G, Mota FT, Wakamatsu A, Serafim RC, Borra RC, Franco M. Canine paracoccidioidomycosis. *Med Mycol* 2004; **42**:379-383.

[14]Trejo-Chávez A, Ramírez-Romero R, Ancer-Rodriguéz J, Vevárez-Garza AM, Rodríguez-Tovar LE. Disseminated paracoccidioidomycosis in a Southern two-toed sloth (*Choloepus didactylus*). *Journ Comp Pathol* 2011; **144**:231-234.

[15]Matute DR, McEween JG, Montes BA, *et al*. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol* 2006; **23**: 65-73.

[16]Carrero LL, Niño-Vega G, Teixeira MM, *et al*. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. *Fungal Genet Biol* 2008; **45**: 605-612.

[17]Teixeira MM, Theodoro RC, Carvalho MJA, *et al.* Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylog Evol* 2009; **52**: 273-283.

[18]Theodoro RC, Bagagli E, Oliveira C. Phylogenetic analysis of PRP8 intein in *Paracoccidioides brasiliensis* species complex. *Fung Gen and Biol* 2008; **45**: 1284-1291.

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

[20]Ijdo M, Schtickzelle N, Cranenbrouck S, Declerck S. Do arbuscular mycorrhizal fungi with contrasting life-history strategies differ in their responses to repeated defoliation? *FEMS Microbiol Ecol* 2010; **72**:114-122.

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

[22]Richini-Pereira VB, Bosco SMG, Griese J, *et al*. Molecular Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in Road Killed wild animals. *Med Mycol* 2007; **18**: 1-6.

[23]Theodoro RC, Candeias JMG, Araújo Jr. JP, *et al*. Molecular detection of Paracoccidioides brasiliensis in soil. *Med Mycol* 2005a; **43**:725-729.

[24]Lindsley WG, Schmechel D, Chen BT. A two-stage cyclone using microcentrifuge tubes for personal bioaerosol sampling. *Journ of Envir Monit* 2006; **8**: 1136-1142.

[25]Adhikari, A. Jung J, Reponen T, *et al*. Aerossolization of fungi, (1→3)-ß-D glucan and endotoxin from flood-affected materials collected in New Orleans homes. *Environ Res* 2009; **109**: 215-224.

[26]Green BJ, Schmechel D, Tovey ER, Detection of aerosolized *Alternaria alternata* conidia, hyphae, and fragments by using a novel double-immunostaining technique, *Clinic and Diagn Lab Immunol* 2005; **12**: 1114-1116.

[27]R. C. Theodoro, unpublished results].

[28]McCullough MJ, DiSalvo AF, Clemons KV, Park P, Stevens DA. Molecular epidemioloy of *Blastomyces dermatitidis*. *Clin Infec Dis* 2000; **30**: 328-335.

[29]Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 5.0. *Molec Biol and Evol* 2011; **24**:1596-1599.

[30]Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 1987; **4**:406-425.

[31]Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 1985; **39**:783-791.

[32]Collado J, Platas G, Paulus B, Bills GF. High-throughput culturing of fungi fromplant litter bya dilution-to-extinction technique. *FEMS Microbiol Ecol* 2007; **60**: 521-533.

[33]Terçarioli GR, Bagagli E, Reis GM, *et al*. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* In soil: growth ability, conidia production and molecular detection. *BMC Microbiol* 2007; **7**: 92.

[34]Restrepo A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Journ Med Vet Mycol* 1955; **23**: 323-334.

[35]Iabuki K, Montenegro MR. Experimental paracoccidioidomycosis in the Syrian hamster: morphology, ultrastructure and correlation of lesions with the presence of specific antigens and serum levels of antibodies. *Mycopathol* 1979; **67**: 131-141.

[36]Peraçoli MTS, Mota NGS, Montenegro MR. Experimental paracoccidioidomycosis in the Syrian hamster: morphology and correlation of lesions with humoral and cell-mediated immunity. *Mycopathol* 1982; **79**: 7-17.

[37]Mota NG, Viero RM, Rezkallah-Iwasso MT, Peraçoli MT, Soares AM, Montenegro MR. The effect of Ketoconazole on experimental paracoccidioidomycosis in the Syrian hamster: immunological and histopathological study. *Mycopathol* 1984; **88**: 141-148.

[38]Rezkallah-Iwasso MT, Villas Boas MLF, Soares A, *et al*. Experimental paracoccidioidomycosis of hamsters and mice: treatment with a new triazole Sch 39304. *Rev Iberoam Micol* 1992; **9**: 72-75.

[39]Macoris SAG, Sugizaki MF, Peraçoli MTS, *et al*. Virulence attenuation and phenotypic variation of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from armadillos and patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; **101**: 331-334.

[40]Montenegro, M. R. G.; Franco, M. Pathology. In: Franco, M.; Lacaz, C. S.; Restrepo, M. A.; Del Negro, G. eds. *Paracoccidioidomycosis*. 1st edn. Boca Raton: CRC Press, 1994: 131–150.

[41]Calich VLG, Singer-Vermes LM, Siqueira AM, Burger E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Braz Journ Exp Pathol* 1985; **66**: 585-594.

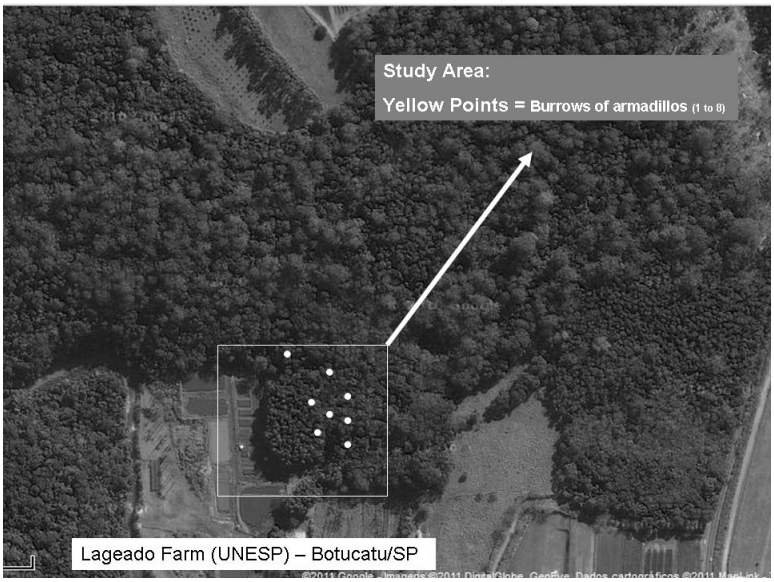
[42]Albornoz MB. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. *Sabouraudia* 1971; **9**: 248–253.

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

[44]Takayama A, Itano EN, Sano A. Ono MA, Kamei K. An atypical *Paracoccidioides brasiliensis* clinical isolate based on multiple gene analysis. *Med. Mycol* 2010; **48**: 64-72.

Supplementary Material

SM 01. Details of the system used for obtaining samples of aerosols in the field and collection points (burrows and trails).



SM 02. Study area (central geographic coordinates -22 ° 50 '14:36 ", -48 ° 25' 31.35") excerpt from Google Maps.