

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**PESQUISA DO *Paracoccidioides brasiliensis* EM AEROSSÓIS AMBIENTAIS:
PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA E AVALIAÇÃO DE AMOSTRAS
RELACIONADAS AO HABITAT DE TATUS POSITIVOS.**

Raquel Sanzovo Pires de Campos

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Eduardo Bagagli

Relatório de Instrumentação apresentado ao
Departamento de Microbiologia e Imunologia
do Instituto de Biociência, Universidade
Estadual Paulista – UNESP, Campus de
Botucatu, para a obtenção de título de
Bacharelado em Ciências Biológicas

BOTUCATU– SP
2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CAMPUS DE BOTUCATU

**PESQUISA DO *Paracoccidioides brasiliensis* EM AEROSSÓIS AMBIENTAIS:
PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA E AVALIAÇÃO DE AMOSTRAS
RELACIONADAS AO HABITAT DE TATUS POSITIVOS.**

Raquel Sanzovo Pires de Campos

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Eduardo Bagagli

Relatório de Instrumentação apresentado ao Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociência, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Botucatu, para a obtenção de título de Bacharelado em Ciências Biológicas

BOTUCATU– SP
2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Campos, Raquel Sanzovo Pires de.

Pesquisa do *Paracoccidioides brasiliensis* em aerossóis ambientais:
padronização de metodologia e avaliação de amostras relacionadas ao habitat
de tatus positivos / Raquel Sanzovo Pires de Campos. – Botucatu : [s.n.],
2008.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas) – Universidade
Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2008

Orientador: Eduardo Bagagli

1. Paracoccidioidomiose 2. Microbiologia 3. Fungos

Palavras-chave: Meios seletivos; PCR; *Paracoccidioides brasiliensis*; Solo;
Teias de aranha

Dedicatória

Prof. Dr. Eduardo Bagagli, pela sabedoria e experiência de um orientador, aliadas ao seu jeito simples e cativante de um amigo.

Agradecimentos

Agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, em particular:

Aos meus pais *Francisco Pires de Campos* e *Regina Sanzovo Pires de Campos* e demais familiares, os maiores incentivadores deste trabalho.

À Prof. Dra. *Sandra de Moraes Gimenes Bosco* pela disponibilidade e pelas sugestões na revisão do texto.

Aos colegas de laboratório, *Ariane C. M. O. Bruder Nascimento*, *Raquel Cordeiro Theodoro*, *Sandra R. L. R. Olbrich*, *Sandra Bosco*, *Severino Assis da Graça Macoris* e *Virgínia Bodelão Richini-Pereira*, que sempre atenderam aos meus inúmeros chamados de dúvidas e fizeram do Laboratório de Genética de fungos um ambiente prazeroso e divertido.

Ao Prof. Dr. *Flávio de Queiroz Telles* da Universidade Federal do Paraná pela sugestão de coleta de esporos por meio de teias de aranhas.

Ao Prof. Dr. *Dennis J. Baumgardner* pela sugestão do meio de cultura aqui empregado, o Meio sólido de Amônia.

Ao *Aldo Francisco Lorenzon*, pela companhia, carinho e amor em tantos momentos.

Aos Amigos,

da XL turma de Ciências Biológicas, *Ana Carolina, Bruna Fernandes, Ciamara, Fernando Carelli, Leonardo, Luciana, Maria Cristina, Maria Isabel e Patrícia Texeira.*

da República JS, que tanto estiveram ao meu lado nestes cinco anos que já não é mais possível separar a minha vivência em Botucatu com a história de cada uma.

de longa data, que mesmo longe, estiveram sempre por perto.

Aos funcionários do Depto. de Microbiologia e Imunologia, que tornaram este trabalho possível.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro.

*“A man travels the world over in search of
what he needs, and returns home to find it.”*

George Moore

“Pesquisa do *Paracoccidioides brasiliensis* em aerossóis ambientais: Padronização de metodologia e avaliação de amostras relacionadas ao habitat de tatus positivos”

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*, meios seletivos, solo, teias de aranha, PCR.

I) Resumo

P. brasiliensis é o agente etiológico da Paracoccidioidomicose, micose sistêmica mais importante na América Latina. A fase saprofítica produtora dos propágulos infectantes e outros aspectos ecológicos deste patógeno são ainda pouco conhecidos, o que impede a adoção de medidas preventivas. Diversas evidências indicam que o fungo se desenvolve no solo, porém o seu isolamento a partir destes materiais é raro e apenas eventual. O presente projeto visou desenvolver uma metodologia para obtenção de amostras ambientais na forma de aerossóis em locais onde a ocorrência do fungo já foi evidenciada pelo seu isolamento em tatus *Dasytus novemcinctus* e avaliar a ocorrência do patógeno nestes materiais por cultura direta e por biologia molecular em reações de PCR com “primers” específicos, já desenvolvidos em nosso laboratório. Para tal, avaliamos o padrão de crescimento do *P. brasiliensis* em quatro diferentes meios ditos como seletivos. Entre estes meios, encontra-se o Meio Sólido de amônia que, por nunca ter sido testado em *P. brasiliensis*, necessitava de testes quanto à viabilidade de uso e ajuste de concentração. Depois de testado a funcionalidade dos meios e observado o padrão de crescimento que o fungo exibe nesses diferentes meios, partimos para a tentativa de isolamento ambiental do *P. brasiliensis* através de amostras de solo em forma de aerossóis com o auxílio deles. Tendo em vista os resultados obtidos, optamos, também, por realizar a coleta de teias de aranhas, devido a grande aderência que exerce sobre aerossóis ambientais. Os isolados de *P. brasiliensis* cultivados apresentaram desenvolvimento semelhante nos quatro meios utilizados, indicando a possibilidade de uso destes meios seletivos para estudos ambientais. *P. brasiliensis* não foi isolado nestas amostras ambientais avaliadas utilizando-se dos presentes meios seletivos. Em uma das coletas, foi possível obter o DNA do *P. brasiliensis* em teias de aranhas. Este achado pode sugerir a associação entre teia e fungo, indicando um caminho promissor para o melhor entendimento da ecologia de *P. brasiliensis*. Mais estudos, portanto, são necessários.

II) Introdução

O *Paracoccidioides brasiliensis* é a fase anamórfica (mitospórica) de um ascomiceto pertencente à Ordem Onygenales, Família Onygenaceae, recentemente reclassificado na nova família Ajellomycetaceae, a qual representa a um clado monofilético que inclui também os gêneros Blastomyces, Emmonsia e Histoplasma (UNTEREINER et al., 2004).

É um fungo termodimórfico que se apresenta na forma de levedura em condições de parasitismo ou quando cultivado em temperatura entre 35°-37°C e micelial na sua forma saprofítica ambiental ou quando cultivado a 25°C. (SAN-BLAS & SAN-BLAS, 1994). Sua importância é referente ao fato de ser agente etiológico da Paracoccidioidiomíose (PCM), micose sistêmica e endêmica de alta prevalência na América do Sul e, em especial, no Brasil (WANKE & LONDERO, 1994).

Visto que a PCM inicia-se nos pulmões através da inalação de conídias assexuadas infectantes, podemos considerar a forma saprofítica, produtora destes propágulos, como a responsável pela transmissão da doença (RESTREPO-MORENO, 1994). Entretanto, a adoção de medidas preventivas é prejudicada pela carência de informação sobre esta fase e de outros aspectos ecológicos do patógeno. Pois, embora o *P. brasiliensis* já tenha sido isolado na sua forma saprofítica a partir do solo (SHOME & BATISTA, 1963, NEGRONI, 1966, ALBORNOZ, 1971,) materiais vegetais (SILVA-VERGARA et al., 1998) e outros, os dados não podem ser aceitos como conclusivos já que esses achados exprimem caráter casual e não reprodutível (FRANCO et al. 2000).

Mas, ao mesmo tempo em que o fungo é dificilmente isolado a partir de sua forma saprofítica ambiental, observou-se que o mesmo pode ser isolado a partir de tecidos de tatu (tatu-de-nove-bandas *Dasybus novemcinctus*), com repetibilidade, em altas frequências e nas diversas regiões onde a PCM ocorre (NAIFF et al., 1986, BAGAGLI et al., 1998, 2003, MACEDO et al., 1999, SILVIA-VERGARA et al., 2000, CORREDOR et al., 1999). O tatu-de-nove-bandas apresenta sistema imune celular pouco ativo e temperatura corporal baixa em relação aos outros mamíferos (TALMAGE & BUCCHANAN, 1954, ULRICH et al., 1976, PURTILO et al., 1975). E, além dessas suscetibilidades, apresentam hábitos escavatórios estando, portanto, intimamente ligados à terra em que vivem. Esta constatação é um forte indício ambiental da presença do patógeno em solo, principalmente em áreas de tocas do tatu, que poderia apresentar provável

responsabilidade quanto ao habitat da forma saprofítica do fungo e, assim, surge a necessidade de seu estudo.

Uma das dificuldades mais frequentemente apontadas para o isolamento do *P.brasiliensis* na sua forma ambiental é a baixa sensibilidade das técnicas microbiológicas tradicionais que, devido à grande quantidade de outros microrganismos existentes em material de solo, mostram-se falhas mesmo em áreas endêmicas da Paracoccidioidomicose (FRANCO et al., 2000). Um determinante muito forte desta baixa sensibilidade é a presença de fungos saprofíticos de crescimento rápido, que podem, em pouco tempo, cobrir toda a extensão da placa de *Petri* e dificultando, assim, a identificação do fungo de interesse. Uma forma de contornar este problema poderia ser o emprego dos chamados “meios seletivos”.

Quando se tem como objetivo a obtenção de patógenos específicos, a utilização de meios seletivos torna-se uma ferramenta de grande valor, pois evita o desenvolvimento de contaminantes e favorece a detecção e a identificação do patógeno-alvo (RICHARDSON, 1985).

Entre estes meios podemos citar o Mycosel Ágar®, meio seletivo que contém em sua composição, ciclohexamina e clorofenicol. É importante salientar que, devido à sua eficácia, é amplamente usado para o isolamento dos fungos patogênicos principalmente quando o material contém uma grande quantidade de flora ou alguns outros fungos e bactérias. (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992, WEITZMAN et al., 1995).

Rotineiramente utilizado em laboratório de análise de fungos, o meio de cultura ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol também pode ser considerado um meio seletivo. Isso se deve ao fato do Cloranfenicol ser capaz de inibir o crescimento de bactérias presentes na amostra e o Dicloran e o Rosa de Bengala reduzirem o diâmetro das colônias. Por este motivo, promovem a recuperação de extenso número de colônias em comparação a outros meios.

Há também outro meio, que tem mostrado uma boa eficiência no isolamento de fungos específicos. Sugerido pelo nosso laboratório, trata-se da combinação de Ágar *Sabouraud*, frequentemente utilizado como meio para crescimento de fungos saprofíticos, com cloranfenicol e Rosa Bengala. Em trabalho prévio desenvolvido, proporcionou boa recuperação de fungos ambientais através de amostras aerossóis.

Além de meios seletivos, a utilização de inibidores fúngicos pode, e muito, auxiliar no isolamento de fungos específicos. Um exemplo disso é a amônia, reconhecida em longa data como um inibidor fúngico seletivo, por ser considerada tóxica para muitos, senão a maioria fungos (TOMKINS, 1932, HAWKER 1950).

Em trabalho ainda não publicado, Dr Dennis Baumgardner (University of Wisconsin) propõe para o isolamento de *Blastomyces dermatitidis*, espécie filogeneticamente muito próxima do *P. brasiliensis* (Onygenacea, Onygenales, Ascomycota) e, que também apresenta sua ecologia não totalmente conhecida, a utilização de Amônia como recurso para a obtenção de maior número de colônias de *B. dermatitidis*. Pois, segundo o autor, a mesma poderia estar atuando como um fator importante na eliminação de fungos competidores e assim, no sucesso do *B. dermatitidis*. Tendo em vista a similaridade filogenética entre *B. dermatitidis* e *P. brasiliensis*, existe a possibilidade que este meio apresente alguma seletividade também para o *P. brasiliensis*. Este pesquisador, com o qual temos tido alguma colaboração, vem realizando importantes trabalhos sobre a ecologia do *B. dermatitidis* (BAUMGARDNER et al, 1999; 2000).

Outra maneira, um tanto quanto mais eficiente e precisa para a identificação e isolamento de fungo patogênico em materiais ambientais é aplicação de técnicas moleculares na qual não há exigência de cultivo (THEODORO et al., 2005). Regiões gênicas como as de rDNA, importante para estudos filogenéticos, possuem certa repetibilidade no genoma e são constituídas por seqüências não variáveis (universais), como 18S (Nuclear Small rDNA), 5.8S e 28S (Nuclear Large rDNA), usadas para estudar organismos mais distantes e por seqüências variáveis, as ITS (Internal Transcribed Spacer) que separam as regiões 18S, 5.8S e 28S, são transcritas e processadas para dar origem ao rRNA maduro e podem variar entre diferentes gêneros ou até mesmo dentro de uma única população (WHITE et al., 1990), podendo assim serem usadas para a identificação específica de um microrganismo. Assim, a biologia molecular passa a ser uma importante ferramenta para a identificação ambiental de um determinado patógeno sem a necessidade de cultivo, através da PCR (SAIKI et al., 1985).

Mas, apesar de suas vantagens, as técnicas moleculares apresentam uma barreira quando se refere à aplicação em algumas amostras ambientais. Nesses protocolos são empregadas amostras de solo as quais normalmente são processados na forma aquosa. Nessas amostras há a presença de ácidos húmicos que, por possuírem grupos fenólicos, são

capazes de desnaturar ou oxidar moléculas biológicas formando quinonas que se ligam covalentemente ao DNA e proteínas, inibindo a atuação da enzima Taq Polimerase (MOREIRA, 1998) e, assim interferindo na sensibilidade da técnica.

Além disso, essas formas experimentais citadas acima não mimetizam com fidelidade a teoria mais sustentada pelos estudos recentes na qual a infecção se dá por via aérea, por inalação de conídias infectantes, através da exposição à poeira contaminada.

Por esses motivos, torna-se necessário a criação de um novo sistema para isolamento do *P. brasiliensis* que, ao invés de amostras de solo total, deverá obter amostras de aerossóis ambientais infectantes. Propomos para tal, o desenvolvimento de uma metodologia para esta recuperação e a utilização de meios de cultura seletivos expostos em ambientes com tatus-galinha já identificados molecularmente como positivos para o *P. brasiliensis* e em outros ambientes de provável ocorrência. Com isso, além de mimetizarmos com maior fidelidade o que acontece na transmissão da doença, este procedimento também apresentará vantagens por não reter ácidos húmicos e não apresentar carga microbiana elevada.

III) Justificativa e Objetivos

Diversas evidências indicam que o do *P.brasiliensis* se desenvolve no solo e produz conídias infectantes as quais são responsáveis pelas infecções humana e animal, na forma de aerossóis. Tendo em vista que o *P.brasiliensis* tem um crescimento relativamente lento em comparação aos demais microrganismos do solo, a busca de meios seletivos pode ser uma boa estratégia para propiciar o seu crescimento a partir de amostras ambientais.

Portanto, o presente trabalho teve os seguintes objetivos:

- 1) Avaliar o padrão de crescimento do *P. brasiliensis* em quatro diferentes meios de culturas relativamente seletivos.
- 2) Realizar tentativas de isolamento de do *P. brasiliensis* em amostras de aerossóis ambientais.

VI) Materiais e Métodos

1.0 Teste da viabilidade de *P.brasiliensis* em meio sólido com diferentes concentrações de Amônia.

Foi avaliada a viabilidade de *P.brasiliensis* no meio Sólido de Amônia, proposto por Baumgardner e colaboradores (2008) em diferentes concentrações Sulfato de Amônio: 5, 25 e 50g/L. Foi testado, também, este mesmo meio sem a adição de Sulfato de Amônio para fins comparativos.

Para cada concentração, foi testado o desenvolvimento de três isolados de *P. brasiliensis* produtores de conídias (ILSL57, T9B1 e Pbcão), anteriormente cultivados a 25°C em Batata Dextrose Ágar (BDA). Cada isolado foi transferido com o auxílio de uma alça, para 04 placas de *Petri* preenchidos com o meio, em cada concentração proposta de Amônia, sendo que metade foi encaminhada para cultura a 25°C e metade foi encaminhada para cultura a 37°C, conforme esquematizado abaixo:



Todo processo foi realizado dentro de uma cabine de segurança biológica (Forma Scientific).

2.0 Avaliação do padrão de crescimento do *P.brasiliensis* em diferentes meios

2.1 Meios de cultura avaliados

O padrão de crescimento do *P.brasiliensis* foi avaliado nos seguintes meios de cultura: BBL™MycoseI™ Agar (MYC), Ágar Base Dicloran Rosa de Bengala

Cloranfenicol (DRBC), Ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol e Rosa Bengala (S+RB+C) e, por último, Meio Sólido de Amônia 5g/L (MSA5). A adição de Cloranfenicol nos meios Sólido de Amônia e Sabouraud tem como finalidade tornar a comparação entre os meios mais fidedigna, uma vez que o Mycosel® e o DRBC, já apresentam em sua composição este antibiótico. A composição de cada de meio é descrita mais detalhadamente na Tabela 01.

2.2 Avaliação do padrão de crescimento

Foi avaliado o desenvolvimento de três diferentes cepas de isolados de *P.brasiliensis* (Pbcão, ILSL57 e T9B1) anteriormente cultivados na forma micelial em Batata Dextrose Agar (BDA) a 25°C, por 30 dias.

A transferência do inóculo para os diferentes meios foi realizada (em triplicata) através de uma alça de platina, dentro de cabine de segurança biológica. Depois de semeadas, as placas foram cultivadas a 25°C, lacradas com filme de PVC transparente e observadas semanalmente.

3.0 Tentativa de isolamento ambiental do *P.brasiliensis* através de amostras de solo em forma de aerossóis.

3.1 Área de Estudo

As amostras foram coletadas em área já identificadas como positivas para o fungo, por cultivo de órgãos de tatus *D. novemcinctus*, em estudos anteriores pelo nosso grupo (BAGAGLI et al., 1998; BAGAGLI et al., 2003). Nesta primeira fase, os estudos foram concentrados na Fazenda Lageado, mata da piscicultura. Foram realizadas duas coletas e, em ambas, o tempo estava ensolarado e apresentavam pouca umidade.

Usaram-se máscaras (tipo semi-facial Top Air II) e botas de borracha do tipo galocha como proteção individual.

3.2 Obtenção das Amostras em Campo

Utilizou-se uma colher de sopa presa a um longo cano para coletar o solo do interior de cada toca de tatu-galinha e seus arredores. Algumas continham muitos materiais orgânicos como folhas e pequenos galhos.

3.2.1 Processamento das amostras obtidas para cultura

As amostras de solo, assim que obtidas, foram passadas em peneiras metálicas comuns (malha de 1-2 mm), com o objetivo de se gerar partículas. Estas partículas foram recolhidas pela exposição, por 2 minutos, de 08 placas de *Petri* abertas (contendo os quatro meios de cultura estudados neste trabalho em duplicata), as quais foram vedadas com filme de PVC.

Na primeira coleta, realizada no dia 25 de abril, foram obtidas 10 amostras de 05 tocas de tatus e todas foram cultivadas a 25°C. Já na segunda coleta, realizada no dia 02 de setembro, foram obtidas 08 amostras, das quais 04 foram cultivadas a 25 e 37°C, e outras 04 amostras precedentes somente foram cultivadas a 37°C.

3.2.1 Encaminhamento das amostras obtidas para identificação molecular

Algumas amostras (n= 04) de solo obtidas das mesmas tocas foram armazenadas em recipientes estéreis para posterior extração molecular.

3.3 Avaliação das colônias obtidas por cultivo

O crescimento fúngico observado nas placas foi avaliado desde o 3º até o 10º dia.

O número total de colônias foi estimado e aquelas que macroscopicamente se assemelhavam ao *P. brasiliensis* foram selecionadas, semeadas em tubo inclinado contendo BDA e GPY e cultivadas a 37°C para avaliação do termodimorfismo. Fragmentos destas colônias também foram avaliados microscopicamente, com coloração com lactofenol-azul algodão.

3.4 Controle positivo do desenvolvimento de *P. brasiliensis*

Procurou-se obter e semear conídias de *P. brasiliensis* nos mesmos meios seletivos, utilizando-se de fragmentos de carpete estéreis (9cm²) colocados em contato com a superfície de colônias miceliais de isolados de *P. brasiliensis* produtores de conídias e transferidos para placas de *Petri* contendo os meios seletivos, as quais foram então incubadas a 25°C, lacradas com filme de PVC transparente e observadas semanalmente. O esquema a seguir simplifica este procedimento:



3.5 Detecção molecular do fungo nas amostras obtidas

3.5.1 Extração pelo kit Fast DNA Spin for Soil

Para a detecção molecular do *P. brasiliensis* nas amostras obtidas, foi realizado a extração de DNA extração pelo kit DNA Spin for Soil, como tentativa de se obter um DNA purificado, sem a presença de ácidos húmicos, fragmentos celulares, proteínas e polissacarídeos que pudessem interferir na PCR. Este procedimento foi realizado em cabine de segurança biológica. Homogeneizou-se o solo correspondente a 1/4 da placa com o fragmento micelial (com um mês de crescimento), colocou-se cerca de 0,5g deste solo contaminado em um tubo Lysing Matrix E e adicionou-se 978uL de tampão Fosfato de Sódio e 122uL de tampão MT. A amostra foi então processada, por 30 segundos a velocidade 4.0 no Fast Prep Instrument (agitador apropriado para extrações de DNA feita com este kit) e depois centrifugada a 13000g por 1 minuto. O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo, ao qual se adicionou 250uL de PPS (Solução de Precipitação de Proteínas). Misturou-se a solução manualmente, 10 vezes. A solução foi centrifugada a 13000g por 10 minutos para a precipitação do pellet. Transferiu-se o sobrenadante para um tubo falcon de 15mL e adicionou-se 1mL da solução Binding Matrix (contém sílica) previamente homogeneizada. A solução foi invertida com as mãos por 2 minutos para permitir a ligação do DNA à matrix de sílica e mantida em repouso durante 3 minutos. Removeu-se 500uL do sobrenadante e a matrix Binding foi resuspendida no restante do

sobrenadante. Cerca de 600uL da mistura foi transferida para um filtro (do próprio kit) e centrifugado a 13000g por 2 minutos, esvaziou-se o tubo coletor, adicionou-se o restante do sobrenadante no filtro e centrifugou-se novamente. Adicionou-se ao filtro 500uL da solução SEWS-S (contém etanol) para lavagem e centrifugou-se a 13000g por 2 minutos. Descartou-se o que passou para o tubo coletor e centrifugou-se novamente a 13000g por 4 minutos a fim de secar a matrix dos resíduos da solução de lavagem. O filtro foi removido para um tubo coletor limpo e deixado aberto por 5 minutos para secar. Para a etapa final de eluição adicionou-se ao filtro 50uL de DES (Dnase/ Pyrogen Free Water), misturando-o à matrix com o auxílio de um palito de dente esterilizado e depois centrifugou-se a 13000g por 2 minutos para transferir o DNA eluído para o tubo coletor.

3.5.2 Amplificação do DNA PCR e Nested-PCR

Foram realizadas reações de PCR e Nested-PCR, empregando-se os *primers* ITS4/ITS5 (WHITE et al., 1990) e PbITSE/PbITSR (THEODORO et al., 2005) respectivamente. As reações de PCR foram feitas em volume final de 25uL contendo em uL, 17,8 de ÁguaMQ, 2,5 Taqbuffer, 0,5 dNTPmix, 0,2 Taq polymerase (Amersham) e 1 de cada primer e 2,0 uL de DNA. As reações foram realizadas em termociclador (Mastercycler gradient-epENDORF) e a seqüência dos primer e perfil de ciclagem estão ilustrados na Tabela 02.

3.5.3 Corrida eletroforética

As eletroforeses realizadas com os produtos da amplificação de PCR (primers ITS4/ITS5 e Nested PCR (primers ITS4/ITS5) foram feitas em gel de agarose a 1,5% a 60V por 15 minutos e 80V por mais 30 minutos. Dissolveu-se a agarose em TBE 1X (Tris Borato EDTA) esquentando a solução em forno microondas. Adicionou-se SYBR® Safe DNA gel stain da Invitrogen™ (cerca de 1uL para cada 10ml de gel) ao gel não muito quente. O gel foi colocado em fôrma apropriada previamente nivelada com o pente encaixado. Esperou-se até que estivesse solidificado para então colocá-lo em cuba eletroforética com adição de TBE 1X na cuba. Colocou-se em um orifício 0,4uL do marcador molecular (DNA ladder de 2000pb a 100pb), juntamente com 2uL de tampão de

corrida. Nos outros orifícios foram adicionados 2,0uL de tampão de corrida + 8,0uL de amostra.

3.5.4 Leitura

Finalizada a corrida, procedeu-se leitura e registro em fotodocumentador Alphamalmager®EC.

4.0 Detecção de *P. brasiliensis* em amostras de teias de aranha.

4.1 Área de estudo

As amostras foram obtidas no mesmo local das demais coletas, na Fazenda Lageado, mata da piscicultura. Foram realizadas duas coletas e, em ambas, o tempo estava ensolarado. Na primeira coleta o ar apresentava pouca umidade e, na segunda, o tempo estava bastante úmido, pois chovia nos dias anteriores.

4.2 Obtenção das amostras

As teias de aranhas foram recolhidas em tubo de ensaio com palito de madeira do tipo espeto para churrasco, previamente autoclavados. As amostras obtidas foram encaminhadas para o laboratório, pesadas e preparadas para a detecção molecular.

Foi obtido o total de 16 amostras de teias de aranhas e/ou materiais relacionados (restos de abdômen e céfalo-tórax de aranha), em diferentes locais e alturas.

4.3 Detecção molecular do *P. brasiliensis*

A detecção molecular do fungo procedeu-se da mesma maneira que as amostras de solo obtidas nas tocas, passando pelas fases de extração, amplificação, corrida eletroforética e leitura, já descritas no tópico 3.5. Para maior confiabilidade, foi feita a repetição das fases de amplificação, corrida e leitura.

V - Resultados

1.0 Teste da viabilidade de *P.brasiliensis* em meio sólido com diferentes concentrações de Amônia.

O meio Sólido, testado com a adição de sulfato de amônio, apresentou um pronunciado efeito inibitório, dependente da concentração, quando comparado a outros meios como *Sabouraud* e Batata Dextrose Ágar (BDA), como observado na Figura 01.

Dentre as concentrações de Amônia testadas em Meio Sólido de Amônia neste trabalho, a concentração de 5g/L (MSA5) foi a que apresentou melhor desempenho, inibindo o desenvolvimento de alguns contaminantes e inibindo de maneira razoável o fungo de interesse, o *P .brasiliensis*.

A concentração 25g/L apresentou maior restrição ao crescimento do fungo e finalmente, a concentração de 50g/L não permitiu o desenvolvimento do fungo.

2.0 Avaliação do padrão de crescimento do *P.brasiliensis* em diferentes meios

O crescimento do *P. brasiliensis* foi semelhante nos meios MYC, S+RB+C e DRBC, apresentando aspecto característico, com colônias pequenas, razoavelmente algodonosas, relevo crateriforme e, em algumas, pode-se observar a presença de pigmentação marrom clara.

No meio MSA5 observou-se pequeno crescimento do *P. brasiliensis* nos três isolados avaliados, com surgimento de colônias somente após 07 dias de cultivo (Figura 01).

3.0 Tentativa de isolamento ambiental do *P.brasiliensis* através de amostras de solo em forma de aerossóis.

O número de total de colônias avaliadas visualmente nas diferentes repetições e meios de culturas está elucidado na Tabela 03 (coleta 01) e Tabela 04 e 05 (coleta 02).

Foi possível observar no MSA5 a inibição de colônias mucóides e a inibição do crescimento e esporulação de alguns fungos, como zigomicetos.

Entre os meios analisados, o meio de cultura ágar DRBC foi o que promoveu maior visualização de colônias individualizadas, distanciadas entre si.

De todas as colônias inspecionadas visualmente, apenas 05 apresentaram uma morfologia macroscópica similar à forma micelial do *P. brasiliensis* e, embora apresentassem aspecto crateriforme e algodinoso a 25°C (Figura 02), não se desenvolveram bem a 37°C, não apresentaram dimorfismo e na análise microscópica foram negativas para o *P. brasiliensis*.

4.0 Detecção de *P. brasiliensis* em amostras de teias de aranha.

Na coleta 01, a reação de PCR e Nested PCR da região ITS foi positiva para as amostras de DNA de algumas teias provenientes da extração de DNA. Este resultado foi observado para as 06 amostras de teias e confirmado pela repetição do procedimento (Figura 03). Na coleta 02, as reações de PCR e Nested PCR da região ITS foram negativas (Figura 04).

VI – Discussão

No teste da viabilidade e crescimento de *P. brasiliensis* em meio sólido com diferentes concentrações de amônia, houve significativa inibição do crescimento de fungos contaminantes e também do desenvolvimento do patógeno, dependente da concentração de amônia, em comparação a outros meios estudados. No ensaio de isolamento ambiental, o MSA5 apresentou número médio de colônias e estas apresentaram-se relativamente pequenas, pela inibição da amônia. Esta substância é reconhecida em longa data como um inibidor fúngico seletivo, por ser considerada tóxica para muitos, senão para a maioria dos fungos (TOMKINS, 1932, HAWKER 1950). Segundo Baumgardner, pesquisador que vem realizando importantes trabalhos sobre a ecologia do *Blastomyces dermatitidis* (BAUMGARDNER et al, 1999; 2000), a mesma poderia estar atuando como um fator importante na eliminação de fungos competidores, permitindo assim o sucesso do desenvolvimento do *B. dermatitidis*, espécie filogeneticamente muito próxima do *P. brasiliensis* (Ajellomycetaceae, Onygenales, Ascomycota) e que também apresenta sua ecologia não totalmente conhecida (BAUMGARDNER et al, 2008).

O Ágar Mycosel® é amplamente utilizado para o isolamento de fungos patogênicos principalmente quando o material contém uma grande quantidade de outros fungos e bactérias, considerados contaminantes (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992, WEITZMAN et al., 1995). Já o Ágar *Sabouraud* é freqüentemente utilizado como meio para crescimento dos diversos grupos de fungos, patogênicos e saprofitos. Como as amostras ambientais foram obtidas pela agitação e exposição às partículas de solo, substrato rico em microrganismos saprofitos, foi recolhido maior número de colônias em S+RB+C em comparação ao Agar Mycosel®, como esperado. A combinação de Ágar *Sabouraud* com cloranfenicol e Rosa Bengala (agente redutor do tamanho de colônias) apresentou um crescimento médio de colônias.

O maior espaçamento entre as colônias recuperadas no meio DRBC pode ser explicado pelo fato do Cloranfenicol ser capaz de inibir o crescimento de bactérias presentes na amostra e pela presença de Dicloran e Rosa de Bengala, os quais inibem alguns fungos de crescimento rápido e reduzem o diâmetro das colônias (LAZARETTI et al., 2000), o que permitiu colônias mais isoladas.

Uma das maiores dificuldades para o isolamento do *P. brasiliensis* na sua forma ambiental é a baixa adequação das técnicas microbiológicas tradicionais que, devido à grande quantidade de outros microrganismos existentes em material de solo, mostram-se ineficazes, mesmo em áreas endêmicas da Paracoccidioidomicose (FRANCO et al., 2000). Um determinante muito forte desta baixa adequação foi a presença de fungos saprofíticos de crescimento rápido que, em pouco tempo, cobriram toda a extensão da placa de *Petri*. Estes fungos poderiam ter inibido, impedido ou mascarado o desenvolvimento do patógeno, uma vez que o *P. brasiliensis* desenvolve-se mais lentamente. O emprego dos chamados meios seletivos poderia ser uma forma de contornar este problema, entretanto, nestas amostras ambientais avaliadas o isolamento do *P. brasiliensis* não foi possível de ser realizado.

Outras técnicas as quais não há exigência de cultivo poderiam ser, portanto, mais eficientes, tal como a aplicação de técnicas moleculares, na qual não há exigência de cultivo (THEODORO et al., 2005). A identificação molecular em amostras de solo no local do estudo tem sido freqüente nos últimos estudos, mostrando sua eficácia (THEODORO et al., 2005; TERÇARIOLI et al., 2007).

Apesar de não conseguimos identificar o *P. brasiliensis* nas amostras de aerossóis cultivadas obtidas neste estudo, corroborando com dados da literatura que mencionam a dificuldade de isolamento ambiental (FRANCO et al. 2000), a presença de DNA do fungo em teias de aranhas foi possível. Em uma mesma coleta foi possível identificar 06 *amplificons* das 09 amostras obtidas. Importante ressaltar que as condições de amplificação aqui empregadas foram as mesmas empregadas por RICHINI-PEREIRA e colaboradores (2008), os quais realizaram cuidadosos testes de sensibilidade e especificidade, minimizando assim a possível ocorrência de falsos positivos. Curiosamente, os resultados de amplificação positivos foram obtidos nas teias de aranhas coletadas em época de seca, supostamente com maior presença de aerossóis aderidos, enquanto que na segunda coleta, com ocorrência de chuvas nos dias e/ou semanas anteriores, supostamente com menor presença de aerossóis, as amostras foram negativas. Torna-se necessário avaliar mais amostras, de diferentes épocas do ano, bem como purificar e seqüenciar estes *amplicons* ambientais de teia de aranha para confirmar sua identidade e assim descartar a possível presença de outros fungos, filogeneticamente próximos ao *P. brasiliensis*. O achado de DNA em teias de aranhas pode sugerir a associação entre teia e fungo, indicando um

caminho promissor para estudo da ecologia de *P.brasiliensis* e para o melhor entendimento dela. Nessas técnicas moleculares, porém, não é possível avaliar a viabilidade neste substrato, já que o fungo propriamente dito não é isolado. Teias de aranhas estão distribuídas em praticamente todos os ambientes, o que poderia significar possibilidade de grande dispersão do patógeno, se os mesmos estivessem associados. Tentativas para o isolamento do *P. brasiliensis* destes materiais, tanto por cultivo direto como por inoculação animal, também deverão ser realizadas.

VII – Conclusões

- Os 03 isolados de *P. brasiliensis* cultivados como controle e referência positiva mostraram desenvolvimento semelhante nos quatro meios utilizados, indicando a possibilidade de uso destes meios relativamente seletivos para estudos ambientais.

- O isolamento do *P. brasiliensis* a partir das amostras ambientais até o momento não foi possível, confirmando dados de literatura que apontam que este patógeno tem crescimento fastidioso e uma ecologia peculiar.

- Teias de aranhas podem indicar um caminho promissor para o melhor entendimento da ecologia de *P. brasiliensis*.

IX – Tabelas

Tabela 01: Composição dos diferentes meios empregados no presente estudo.

Meio	Composição
MYC	Consiste em, g/L, de farinha de soja digerida por enzimas papaícas 10,0; Dextrose 10,0; Agar 15,5; Ciclohexamina 0,4; Cloranfenicol 0,05.
DRBC	Consiste em, g/L, Peptona 5,0; glicose 10,0; fosfato de potássio monobásico 1,0; Sulfato de magnésio 0,5; Dicloran 0,002; Rosa de Bengala 0,025 e ágar 15,0; pH 5,6.
S+RB+C	Consiste em, g/L, de Concentrado enzimático de Caseína 10,0; Dextrose 40,0; Agar 15,0.
MSA5	Consiste em base de minerais E-N modificada (OWENS & KEDDIE, 1969), contendo em mg/L: K ₂ HPO ₄ , 1040; KH ₂ PO ₄ , 750; MgSO ₄ ·7H ₂ O, 200; NaCl, 100; CaCl ₂ ·6H ₂ O, 50; EDTANa ₂ ·2H ₂ O, 19·1; ZnSO ₄ ·7H ₂ O, 6·6; MnSO ₄ ·4H ₂ O, 1·7; FeSO ₄ ·7H ₂ O, 1·5; CoCl ₂ ·6H ₂ O, 0·48; CuSO ₄ ·5H ₂ O, 0·47; Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O, 0·45; e H ₃ BO ₃ , 0·69; pH 7·0., tampão HEPPS (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-3-propanesulphonic acid; BDH 44179) 0·01 mol, Ágar 15g/L, dextrose 1g/L, Cloranfenicol 0,05g/L e Sulfato de Amônio (NH ₄) ₂ SO ₄ 5g/L

Tabela 02: Característica dos *primers* utilizados nas reações de PCR e Nested-PCR.

<i>primers</i>	gene	amplicon	seqüência	perfil de ciclagem
ITS4	rDNA	634 bp	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	94 ⁰ C-5min
ITS5			5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAACG-3'	25X { 94 ⁰ C-1min 60 ⁰ C-2min 72 ⁰ C-2min 72 ⁰ C-7min
PbITSR	rDNA	387 bp	5'-GAGCTTTGACGTCTGAGACC-3'	94 ⁰ C-5min
PbITSE			5'-AAGGGTGTCGATCGAGAGAG-3'	25X { 94 ⁰ C-1min 62 ⁰ C-2min 72 ⁰ C-2min 72 ⁰ C-10min

Tabela 03: Número de colônias obtidas do cultivo a 25°C em cada meio das diversas amostras ambientais de aerossóis coletadas de solo de tocas de tatus da Fazenda Lageado na primeira coleta realizada.

Tocas	Amostras		MYC	S+RB+C	MSA5	DRBC
01	01	A	6	19	16	3
		B	4	21	50	6
	02	A	40	>60*	22	30
		B	13	12	28	15
02	03	A	>60*	>60*	>60*	>60*
		B	>60*	>60*	>60*	>60*
	04	A	3	>60*	16	58
		B	>60*	49	36	>60*
03	05	A	11	>60*	11	28
		B	2	19	25	26
	06	A	60	14	11	19
		B	29	34	23	15
04	07	A	1	7	16	17
		B	5	47	13	11
	08	A	7	43	11	10
		B	0	25	3	25
05	09	A	2	17	6	30
		B	1	8	7	5
	10	A	10	16	7	11
		B	6	25	9	11
Total aproximado:			Maior que 380	Maior que 650	Maior que 500	Maior que 430

* Foi considerado como ">60" quando o número de colônias recolhidas foi maior que 60, dificultando sua contagem.

Tabela 04: Número de colônias obtidas em amostras ambientais de aerossóis coletadas de solo de tocas de tatus da Fazenda Lageado (segunda coleta), pelo cultivo em diferentes meios seletivos, a 25°C.

Amostras a 25°C	MYC	DRBC	S+RB+C	MSA5
01	43	>60*	23	>60*
02	43	10	5	>60*
03	>60*	>60*	>60*	>60*
04	26	40	>60*	35
Total aproximado:	Maior que 172	Maior que 170	Maior que 148	Maior que 215

* Foi considerado como “>60” quando o número de colônias recolhidas foi maior que 60, dificultando sua contagem.

Tabela 05: Número de colônias obtidas em amostras ambientais de aerossóis coletadas de solo de tocas de tatus da Fazenda Lageado (segunda coleta), pelo cultivo em diferentes meios seletivos, a 37°C.

Amostras a 37°C	MYC	DRBC	S+RB+C	MSA5
01	0	1	0	1
02	0	0	1	2
03	>60*	15	>60*	14
04	1	1	4	0
05	20	>60*	>60*	>60*
06	8	4	17	0
07	3	>60*	13	>60*
08	0	34	10	14
Total aproximado:	Maior que 92	Maior que 175	Maior que 165	Maior que 151

* Foi considerado como “>60” quando o número de colônias recolhidas foi maior que 60, dificultando sua contagem.

X –Figuras

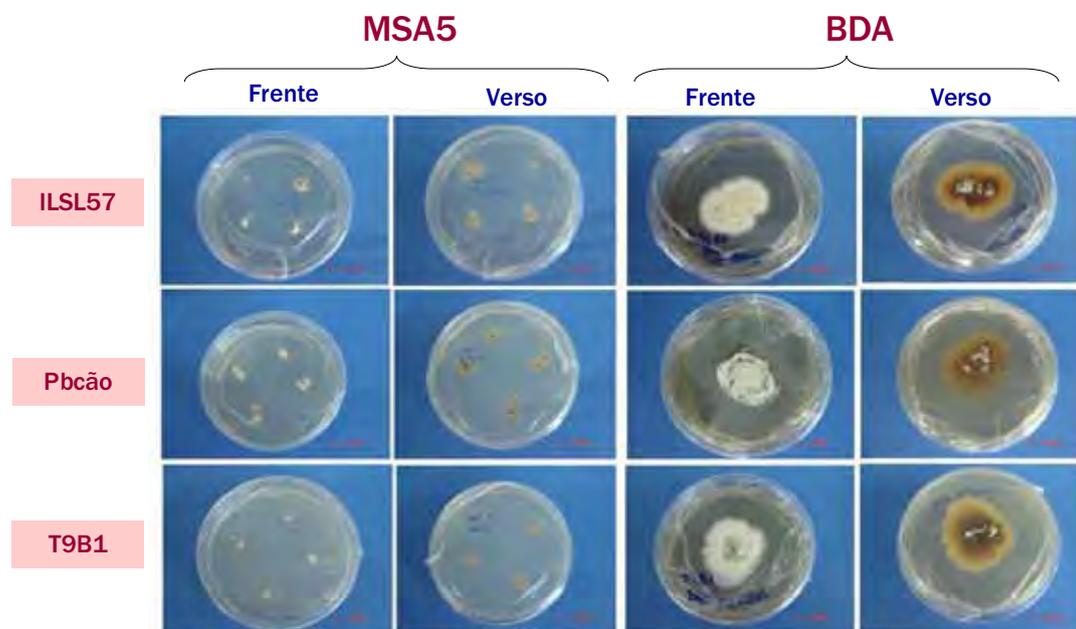


Figura 01: Aspectos macroscópicos de culturas de três diferentes isolados de *P. brasiliensis* (ILSL57, Pbcão e T9B1), em Meio Sólido de Amônia 5g/L (MSA5) e meio Batata dextrose Ágar (BDA), após 04 meses de cultivo a 25°C.

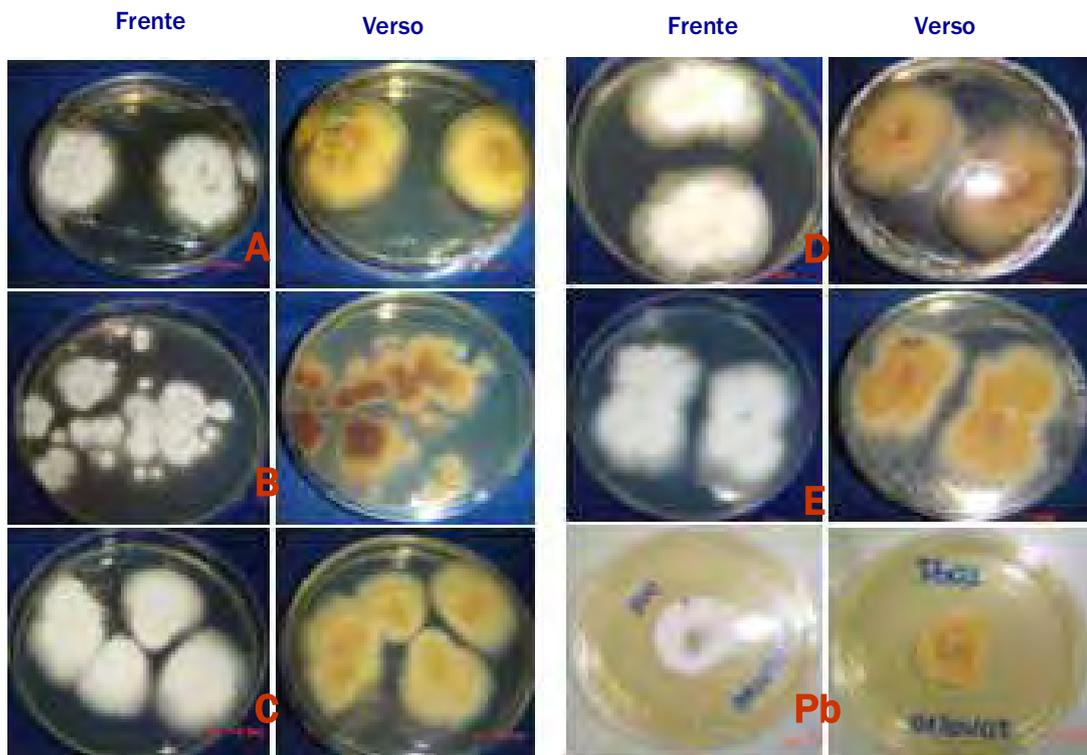


Figura 02: Registro macroscópico dos isolados ambientais que apresentaram aspecto algodonooso e crateriforme (A, B, C, D, E) e um isolado de *P. brasiliensis* (Pb).

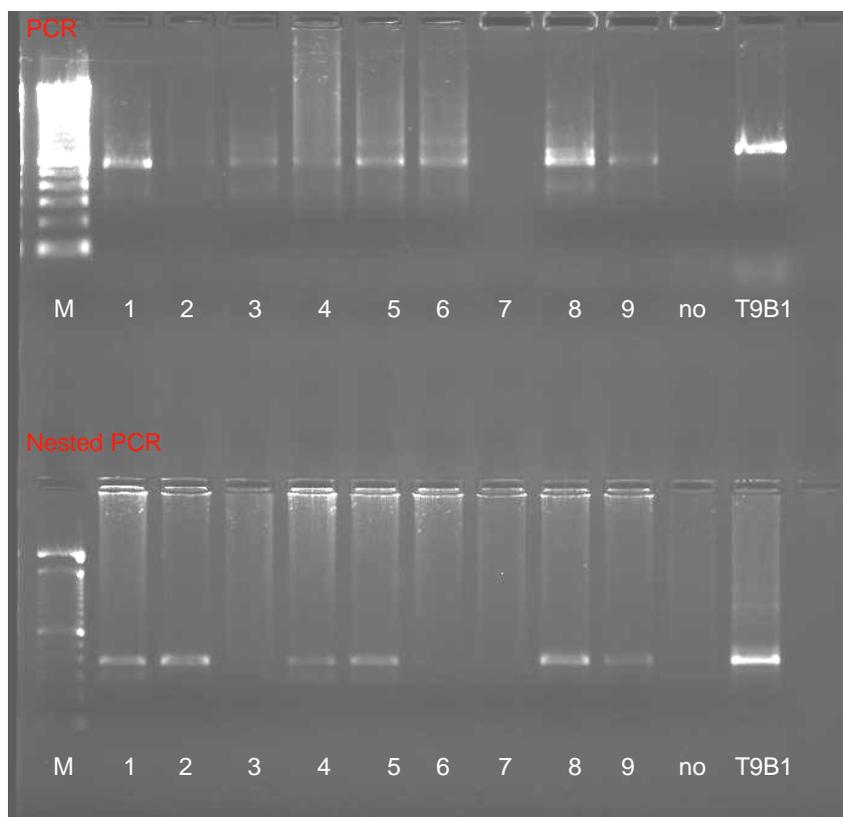


Figura 3: PCR (*primers* ITS4 e ITS5) e Nested-PCR (*primers* PbITSE/PbITSR) de *P. brasiliensis* em gel de agarose com DNA de amostras de teia de aranhas obtidas da coleta 01 (época de seca). Legenda: M) marcador molecular 100pb; 1-9) PCR de amostras com seus respectivos números de teias; no) controle negativo; T9B1) Isolado clínico T9B1 de *P. brasiliensis*.

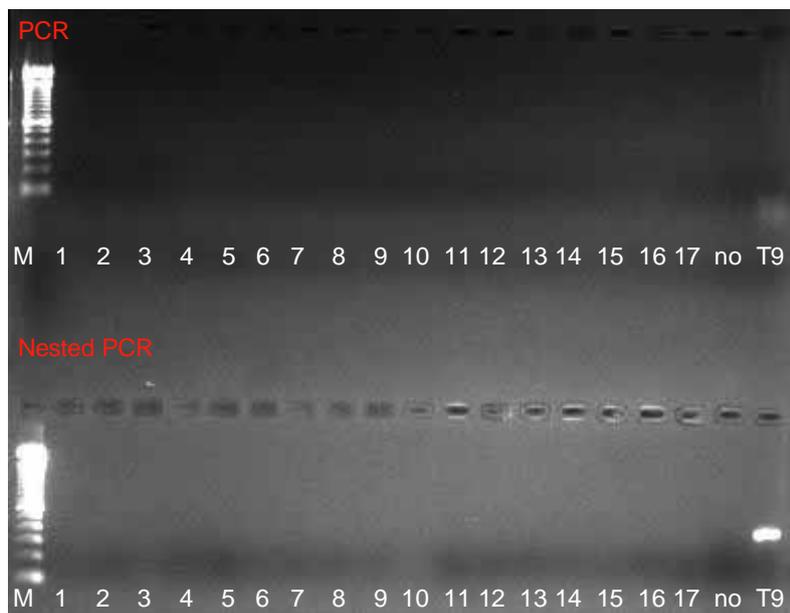


Figura 4: PCR (*primers* ITS4 e ITS5) e Nested-PCR (*primers* PbITSE/PbITSR) de *P. brasiliensis* em gel de agarose com DNA de amostras de teia de aranhas obtidas da coleta 02 (época chuvosa). Legenda: M) marcador molecular 100pb; 1-17) PCR de amostras com seus respectivos números de teias; no) controle negativo; T9) Isolado clínico T9B1 de *P. brasiliensis*.

XI – Anexos

1) Resumo apresentado no XX Congresso de Iniciação Científica, realizado em 30/10 a 01/11 em São José dos Campos, SP.

AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE *Paracoccidioides brasiliensis* EM MEIOS SELETIVOS E TENTATIVAS DE ISOLAMENTO EM AMOSTRAS AEROSSÓIS AMBIENTAIS.

Raquel Sanzovo Pires de Campos e Eduardo Bagagli

Paracoccidioides brasiliensis é o agente etiológico da Paracoccidioidomicose, a mais importante e prevalente micose sistêmica da América Latina, adquirida principalmente pela inalação de conídias infectantes produzidas na fase micelial. O isolamento do *P. brasiliensis* de amostras de solo é raro e geralmente não pode ser repetido. No presente estudo, visamos avaliar o desenvolvimento do *P. brasiliensis* em diferentes meios seletivos, para então promover o isolamento do *P. brasiliensis* na forma de aerossóis a partir de amostras de solo. Fragmentos de carpete estéreis foram colocados em contato com a superfície de colônias miceliais de isolados de *P. brasiliensis* produtores de conídias e transferidos para placas de *Petri* contendo os seguintes meios seletivos: *DRBC*; *Mycosel*; *Saboraud* acrescido de *Cloranfenicol* e *Rosa bengala*; e meio sólido de amônia (5g/L), preparado de acordo com Baumgardner et al (2008). As colônias de *P. brasiliensis* obtidas nestes meios seletivos também serviram de referência ou controle positivo. Para o isolamento ambiental, as amostras foram coletadas de 05 tocas de tatus e seus arredores, e imediatamente peneiradas de maneira a gerar partículas aerossóis, as quais foram recolhidas por placas de *Petri*, expostas por 2 minutos, contendo os mesmos meios de culturas seletivos. As placas foram incubadas a 25 e 37°C por até oito semanas. O número total de colônias foi estimado a aquelas que macroscopicamente se assemelhavam com o *P. brasiliensis* foram selecionadas para identificação posterior. De um total de 1200 colônias avaliadas visualmente, 05 foram selecionadas como suspeitas por apresentarem aspecto algodonoso e crateriforme. Entretanto, nenhuma delas apresentou termodimorfismo e características microscópicas compatíveis de *P. brasiliensis*. Em resumo: *P. brasiliensis* não foi isolado nas amostras ambientais avaliadas utilizando-se dos presentes meios seletivos.

2) Resumo apresentado no VI Congresso Latinoamericano de Micología, realizado em 10/11 a 13/11 em Mar del Plata, Argentina.

ATTEMPTS TO ISOLATE *Paracoccidioides brasiliensis* IN ENVIRONMENTAL AEROSOL SOIL SAMPLES.

Campos RSP; Richini-Pereira VB; Theodoro RC; Macoris SAG; Bagagli E.

Paracoccidioides brasiliensis is the etiological agent of Paracoccidioidomycosis, the most important and prevalent systemic mycosis in Latin America, acquired mainly by the inhalation of infective conidia produced in the mycelial phase. The isolation of *P. brasiliensis* from soil samples are scarce and generally cannot be repeated. In the present study we aimed to isolate *P. brasiliensis* in aerosol soil samples, in order to mimic the airborne route of infection. The samples were collected from 05 different armadillo burrows and its surroundings and immediately processed by sieving it to generate aerosol particles in the presence of open Petri dishes containing selective media (*DRBC*, *Mycosel*, *Sabouraud* plus *Bengal Rose* and *Chloranphenicol*, and *BMG5*) for 2 minutes. The plates were incubated at 25 and 37°C until 8 weeks; the total number of colonies was estimated and that ones macroscopically resembling *P. brasiliensis* were selected for further identification. Sterile fragments of carpet were squashed against the surface of mycelial colonies of conidia-producing isolates and then stamped in the same selective media plates, to serve as reference or positive control. In a total of 1186 colonies scrutinized visually, 05 were chosen as suspect for presenting a whitish cotton-like morphology. However, none of them showed thermal dimorphism or conidia production. In summary: *P. brasiliensis* was not isolated in the evaluated samples. Financial support: Fapesp and Pibic.

X – Referências Bibliográficas

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

BAGAGLI, E. ; RESTREPO, A. ; PUCCIA, R. ; TAYLOR, J W ; MCEWEN, J. G. ; MONTES, B. . Pylogenetic relations among *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. In: ISHAM, 2003, COLOMBIA. Anais, 2003. v. 1. p. 346-346.

BAUMGARDNER D.J., PARETSKY, D.P. The *in vitro* isolation of *Blastomyces dermatitidis* from a woodpile in north central, Wisconsin, USA. *Med Mycol* 1999; 37: 163–168.

BAUMGARDNER, D. J., LAUNDRE, B. Studies on the molecular ecology of *Blastomyces dermatitidis*. **Mycopathologia** v.152, p. 51–58, 2000.

BAUMGARDNER, D. Microecology of *Blastomyces dermatitidis*: The ammonia hypothesis. **Biomédica**, v.28, p.216, Bogotá, Colombia, 2008.

CORREDOR, G. G., CASTAÑO, J. H., PERALTA, A., DÍEZ, S., ARANGO, M., McEWEN, J., RESTREPO, A. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus noveminctus*, in na endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. **Rev. Iber. Micol.**, v. 16, p. 216-20, 1999.

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.

HAWKER, L.E. Physiology of Fungi. London. London University Press. 1950.

KWON-CHUNG and BENNETT 1992. Medical mycology. Lea & Febiger, Philadelphia, Pa.

LAZZARETTI et al. Comparação entre os meios de cultura para contagem de fungos no controle microbiológico de erva-mate. **B.CEPPA**, Curitiba, v.18, n. 2, p.163-170, jul./dez. 2000

MACEDO, R. C. L., LAZERA, M. S., TRILLES, L., BULCÃO, A. S., SILVA JR., N. J., OLIVEIRA, N. A., WANKE, B. *Paracoccidioides brasiliensis* – Infecção natural de tatus. Estudo em Serra da Mesa, Goiás, Brasil. In: ENCONTRO INTERNACIONAL SOBRE PARACOCCIDIOIDOMICOSE, 7, 1999, Campos do Jordão. **Resumos...** Campos do Jordão, 1999. Res D-06.

MOREIRA, D. Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations. **Nucleic Acid Research**, v.26, p.3309-10, 1998.

NAIFF, R. D., FERREIRA, L. C. P., BARRETOS, T. V., NAIFF, M. F., ARIAS, J. R. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 28, p. 19-27, 1986.

PURTILO D.T., WALSH G.P., STORRS E.E., GANNON C. The immune system of the nine banded armadillo (*Dasypus novemcinctus* Linn). **Anat. Rec.**, v. 181, p. 725-34, 1975.

RICHARDSON, G.H., Standard methods for the analysis of dairy products (15th ed.), American Public Health Association, Washington, DC, USA (1985).

RESTREPO-MORENO, A. Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*. In: FRANCO, M. F., LACAZ, C. S., RESTREPO, A., DEL NEGRO, G. (Eds). **Paracoccidioidomycosis**. Boca Ratón: CRS Press, 1994. p. 121-8.

SAN BLAS, G., SAN BLAS F. Biochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis* Dimorphism. In: FRANCO, M. F., LACAZ, C. S., RESTREPO, A., DEL NEGRO, G. (Eds). Boca Ratón: CRS Press, 1994. p. 49-66.

SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of b-globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, v. 230, p. 1350-1354, 1985.

SILVA-VERGARA, M.L., MARTÍNEZ, R., CHADU, A., MADEIRA, M., FREITAS-SILVA, G. LEITE MAFFEI, C. M. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* strain from

the soil of a coffee plantation in Ibiá, State of Minas Gerais, Brazil. **Med. Mycol.**, v. 36, p. 37-42, 1998.

SILVA-VERGARA, M.L., MARTÍNEZ, R., CAMARGO, Z.P., MALTA, M.H., MAFFEI, C. M., CHADU, J.B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. **Med. Mycol.**, v. 38, p. 193-9, 2000.

TALMAGE, R.V., BUCCHANAN, G. D. The armadillo *Dasypus novemcinctus* - a review of its natural history, ecology, anatomy and reproductive physiology. **Rice Inst. Pamphlet Houston**, v. 41, p. 135, 1954.

THEODORO RC, CANDEIAS JMG, ARAÚJO Jr JP, BOSCO SMG, MACORIS SAG, PADULA Jr LO, FRANCO M, BAGAGLI E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. *Med Mycol.* 2005; 43(8): 725-9.

TOMKINS, R.G. The action of certain volatile substances and gases on the growth of mould fungi. **Proceedings of the Royal Society Series B**, v.111, p.210-226, 1932

ULRICH M., CONVIT J., CENTENO M., RAPETTI M. Immunological characteristics of the armadillo, *Dasypus sabanicola*. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 25, p. 170-6, 1976.

WANKE, B., LONDERO, A. Epidemiology and Paracoccidioidomycosis infection. In: FRANCO, M., LACAZ, C., RESTREPO, A., DEL NEGRO, G. (Eds). *Paracoccidioidomycosis*. Boca Ratón: CRC Press, 1994. p.109-20.

WEITZMAN, KANE and SUMMERBELL. 1995. In Murray, Baron, Pfaller, Tenover and Tenover (eds.), *Manual of clinical microbiology*, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Eds). **PCR Protocols: A guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p.315-22.