



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS
INFECCIOSAS

CLÁUDIA DE CARVALHO FALCI BEZERRA

**AUTENTICAÇÃO MOLECULAR DE 65 ISOLADOS
CLÍNICOS E AMBIENTAIS DE *Coccidioides* spp. E
SEQUENCIAMENTO DO GENE CSA**

Rio de Janeiro

2011

**Autenticação molecular de 65 isolados clínicos
e ambientais de *Coccidioides* spp. e
seqüenciamento do gene *CSA***

CLÁUDIA DE CARVALHO FALCI BEZERRA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadores: Dr. Bodo Wanke
Dr^a. Luciana Trilles

Rio de Janeiro

2011

B574

Bezerra, Claudia de Carvalho Falci.

Autenticação molecular de 65 isolados clínicos e ambientais de *Coccidioides* spp. e seqüenciamento do gene *esa* / Claudia de Carvalho Falci Bezerra. – Rio de Janeiro, 2011.
xvii, 62 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2011.

Bibliografia: f. 44-58

1. *Coccidioides*. 2. Autenticação. 3. Seqüenciamento. I. Título.

CDD 571.995

CLÁUDIA DE CARVALHO FALCI BEZERA

Autenticação molecular de 65 isolados clínicos e
ambientais de *Coccidioides* spp. e seqüenciamento do
gene *CSA*

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-
Graduação em Pesquisa Clínica em
Doenças Infecciosas do Instituto de
Pesquisa Clínica Evandro Chagas para
obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Dr. Bodo Wanke
Co-orientadora: Dr^a. Luciana Trilles

Aprovada em: 14 /12 / 2011.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a. Márcia dos Santos Lazéra
Pesquisadora Médica do IPEC/FIOCRUZ
Doutora em Medicina (Doenças Infecciosas e Parasitárias)

Prof^a Dr^a. Cíntia de Moraes Borba
Pesquisadora Titular do Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz
Doutora em Biologia Parasitária

Prof^o Dr. Kelsen Dantas Eulálio
Professor Assistente da Universidade Federal do Piauí (UFPI)
Doutor em Medicina Tropical

Dedico este trabalho aos meus queridos e eternos: padrinho - Gabriel de Bittencourt Fontoura, avô - Edgard Falci e pai - Francisco Octavio da Silva Bezerra - que infelizmente não puderam estar presentes neste momento.

Eternas saudades.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter me dado forças, perseverança e coragem para não desistir diante das derrotas da vida.

Ao corpo docente e discente do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC – FIOCRUZ), meu muito obrigada!

Aos meus filhos Luiz Octávio (ou “Sofio” como ele é conhecido aqui no laboratório) Gabriel, Anna Luíza, minha irmã Andréa e minha mãe Marlene pelo carinho e compreensão nos momentos em que me ausentei mesmo estando fisicamente em casa.

Aos meus orientadores Dr. Bodo Wanke e Dr^a. Luciana Trilles, muito obrigada pela orientação, compreensão e paciência.

A Dr^a. Márcia dos Santos Lazéra, muito obrigada pelo incentivo constante, colaboração e amizade.

A Ana Carolina Peixoto Souto pelo trabalho com a edição das sequências.

Ao Prof. Dr. Kelsen Dantas Eulálio, Msc. Liline Maria Soares Martins, Prof. Dr. Antônio de Deus Filho e Dr^a Maria do Amparo Salmito Cavalcanti por enviarem os isolados suspeitos para identificação com os quais consegui realizar o presente trabalho.

A Dra. Cíntia de Moraes Borba que me ensinou como executar corretamente o procedimento de extração de ADN. Obrigada Cíntia!

À Gláucia Gonçalves Barbosa que dividiu comigo as alegrias, angústias e frustrações.

À Marília Martins Nishikawa, Gabriella de Azevedo Ramalho e Érika Gomes de Lima Bispo pelo incentivo constante.

À “Família Leitão” por ter abrigado meus filhos por alguns dias neste ano de 2011, permitindo que eu pudesse me dedicar mais a este trabalho.

Às minhas amigas “Queenriocas”: Marta, Niége, Teresa e Milene pela torcida e incentivo desde a etapa de seleção para o mestrado.

À minha avó Dr^a. Miridan Britto Knox Falci pelo incentivo constante.

À todos os colegas e amigos do Laboratório de Micologia e Setor de Lavagem e Esterilização do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos integrantes da Plataforma de Sequenciamento do Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz pelo sequenciamento dos isolados.

Ao CNPQ por ter dado auxílio financeiro para este projeto (processo nº: 307592/2003-0).

E por último - mas como diz o ditado “os últimos serão os primeiros” - agradeço à minha sempre amiga Dr^a. Marta Cristina de Freitas da Silva – que Deus permitiu que eu reencontrasse no V Congresso Brasileiro de Micologia em Recife em 2007 - por ter, naquele ano de 1991 me trazido até a Fundação Oswaldo Cruz para que eu fizesse uma entrevista para uma vaga de estágio no então Serviço de Micologia do Hospital Evandro Chagas, atual Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

Martinha, muitas pessoas me ajudaram nesta caminhada, mas com certeza sem a sua ajuda eu não estaria aqui hoje. Serei eternamente grata à você.

E as boas coisas acontecem para aqueles que esperam

RESUMO

Coccidioidomicose é micose sistêmica causada pelos fungos dimórficos *Coccidioides immitis* e *C. posadasii*, adquirida através de inalação de artroconídios infectantes. Em parasitismo, expressa forma característica em esférula, repleta de endósporos. Em saprofitismo e em cultivo as colônias possuem aspecto macroscópico algodoado, de cor branca a marrom-claro, e microscopicamente apresentam hifas hialinas, septadas e ramificadas com espaços interseptais cheios de citoplasma alternados com áreas interseptais vazias, formando artroconídios intercalares, unidades infectantes facilmente aerossolizáveis. O semi-árido brasileiro foi recentemente incluído como área endêmica de coccidioidomicose. Por ser altamente infectante, é importante implantar uma técnica de identificação molecular de *Coccidioides* spp., para minimizar os riscos de manipulação do operador. Também é importante conhecer a dinâmica do fungo no Brasil através de um estudo de variabilidade molecular. Este estudo objetivou identificar os isolados suspeitos por meio de marcador molecular específico (gene *CSA*) que reconhece o gênero, e analisar a variabilidade molecular de linhagens brasileiras de *Coccidioides* spp. através de sequenciamento. A extração de ADN foi realizada de 65 linhagens (58 do Piauí, Brasil; seis dos Estados Unidos da América (EUA) e uma da Argentina), mantidas em Coleção de Cultura conforme técnica previamente descrita (Burt *et al*, 1995). Para a identificação do gênero foi utilizado um par de *primers* específicos (Ci 1 – 5' AAG TTC TCA CTC CTC AGC GCT ATC G 3' e Ci 2 – 5' ACA TTA AGG TTC CTC CCC TTC AAC C 3') que se anela ao gene *CSA*. Para a tipagem molecular, foi realizada Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) com os *primers* específicos de 57 linhagens. Após esta etapa, o produto amplificado foi purificado com kit de purificação e posteriormente seqüenciado na Plataforma de Seqüenciamento de ADN PDTIS/FIOCRUZ. Como resultado, obtivemos 100% de positividade na identificação das linhagens estudadas e em nenhuma das linhagens controle foi detectada a banda, demonstrando que o método foi 100% específico e sensível. No seqüenciamento do gene *CSA*, realizado de 57 linhagens, 56 foram caracterizadas como *Coccidioides posadasii* e uma linhagem, proveniente dos EUA, foi caracterizada como *Coccidioides immitis*.

ABSTRACT

Coccidioidomycosis is a systemic mycosis caused by the dimorphic fungi *Coccidioides immitis* and *C. posadasii*, acquired through inhalation of infective spores. In parasitism shows a characteristic spherule full of endospores. In saprophytism and in suspected cultures it presents as a cotton-like colony ranging from white to light brown. Microscopically it shows septate hyaline branching hyphae, alternating degenerated empty interseptal spaces and cytoplasm forming arthroconidia. Recently, the Brazilian northeast semiarid region was included as an endemic area for coccidioidomycosis. As *Coccidioides* spp. are the most infective pathogenic fungi, it is important to develop a molecular tool for their identification, to protect the technicians. It is also important to better understand the fungal dynamic in Brazil, which can be achieved through a molecular variability study. The objective of this study was to identify the genus of suspected isolates, through a specific molecular method, that identifies the specific gene *CSA*, and also to analyze the molecular variability of Brazilian lineages of *Coccidioides* spp. by sequence analysis. DNA extraction was done from 65 lineages (58 from Piauí state, Brasil, six from the United States of America (USA) and one from Argentina) of Culture Collection as previously described (Burt *et al*, 1995). For genus identification we used a pair of specific *primers* (Ci 1 – 5' AAG TTC TCA CTC CTC AGC GCT ATC G 3' e Ci 2 – 5' ACA TTA AGG TTC CTC CCC TTC AAC C 3') that recognizes the specific gene. For molecular typing, we first performed PCR (Polimerase Chain Reaction) with the specific primer from 57 lineages. After this step, amplicon was purified with the purification kit and then sequenced on PDTIS/FIOCRUZ DNA Sequencing Platform. As results we obtained 100% of positivity for the molecular identification of all lineages studied. In contrast, all the control strains didn't show the specific band, demonstrating that the method was 100% specific and sensitive. On the sequencing of *CSA* gene of 57 lineages, 56 were characterized as *Coccidioides posadasii*. The only lineage identified as *Coccidioides immitis* was from USA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Ocorrência endêmica de Coccidioidomicose no Brasil | 9 |
| Figura 2 – Arthroconídios de <i>Coccidioides</i> spp | 11 |
| Figura 3 – Cultivo de <i>Coccidioides immitis</i> em Sabouraud agar | 11 |
| Figura 4 – Esférula de <i>Coccidioides</i> spp. | 12 |
| Figura 5 – Ciclo de vida de <i>Coccidioides</i> spp. - fases sasprofitica e parasitária | 13 |
| Figura 6 – Tatu <i>Dasypus novemcinctus</i> | 15 |
| Figura 7 – Mapa da distribuição das espécies de <i>Coccidioides immitis</i> e <i>C. posadasii</i> nas Américas | 19 |
| Figura 8 – - Distribuição da Coccidioidomicose na América Latina | 23 |
| Figura 9 – Eletroforese em gel de agarose demonstrando o amplificado de 519 pb | 38 |
| Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose dos isolados controle | 39 |
| Figura 11 – Árvore filogenética obtida através do método Neighbor-Joining | 40 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Isolados de <i>Coccidioides</i> spp. estudados na autenticação molecular | 32 |
| Tabela 2 – Isolados de <i>Coccidioides</i> spp. seqüenciados | 35 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------------------|--|
| μL | Microlitro |
| μm | Micrômetro |
| $^{\circ}\text{C}$ | Graus Celsius |
| ADN | Ácido desoxirribonucléico |
| ARN | Ácido ribonucléico |
| CA | Califórnia, Estados Unidos |
| CNPq | Conselho Nacional de Pesquisa |
| dNTP | Desoxirribonucleotídeos |
| EDTA | Ácido Etilenodiaminotetraacético |
| Fiocruz | Fundação Oswaldo Cruz |
| ID | Imunodifusão dupla |
| IPEC | Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas |
| kDa | Kilodaltons |
| km^2 | Quilômetros quadrados |
| LM | Laboratório de Micologia |
| M | Molar |
| mg | Miligrama |
| min. | Minuto |
| ml | Mililitro |
| mm | Milímetro |
| mM | Milimolar |
| NaCl | Cloreto de Sódio |
| ng | Nanograma |
| non-CA | Não Califórnia |
| pb | Pares de base |
| PCR | Reação em Cadeia de Polimerase |
| pmol | Picomol |

| | |
|-----------------|-------------------------|
| rpm | rotações por minuto |
| S | Sul |
| SDS | Sódio dodecil sulfato |
| SNC | Sistema Nervoso Central |
| TBE | Tampão Tris Borato EDTA |
| Tris | Trizma Base |
| U | Unidade |
| W | Oeste |
| CO ₂ | Gás carbônico |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1- INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 - HISTÓRICO DA COCCIDIOIDOMICOSE NAS AMÉRICAS | 2 |
| 1.1.1 - Primeiro caso - Argentina | 2 |
| 1.1.2 - Estados Unidos | 3 |
| 1.1.3 - México | 5 |
| 1.1.4 - Honduras | 6 |
| 1.1.5 - Guatemala | 6 |
| 1.1.6 - Nicarágua | 6 |
| 1.1.7 - El Salvador | 6 |
| 1.1.8 - Venezuela | 6 |
| 1.1.9 - Colômbia | 7 |
| 1.1.10 - Equador | 7 |
| 1.1.11 - Bolívia | 7 |
| 1.1.12 - Paraguai | 7 |
| 1.1.13 - Brasil | 7 |
| 1.2 - O AGENTE | 9 |
| 1.2.1 - CICLO VITAL | 12 |
| 1.2.2 - FATORES ECOLÓGICOS | 13 |
| 1.2.3 - RESERVATÓRIOS ANIMAIS | 14 |
| 1.2.4 - MODO DE TRANSMISSÃO | 15 |
| 1.2.5 – TAXONOMIA | 16 |
| 1.2.6 – IDENTIFICAÇÃO CLÁSSICA | 16 |
| 1.2.7 – IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR | 17 |
| 1.2.8 - NOVOS ESTUDOS TAXONÔMICOS | 18 |
| 1.2.9 – O GENE CSA | 20 |
| 1.2.10 – NORMAS DE BIOSSEGURANÇA | 20 |
| 1.2.11 – <i>COCCIDIOIDES</i> spp. COMO AGENTE DE BIOTERRORISMO | 20 |
| 1.3 – A MICOSE | 21 |
| 1.3.1 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA | 21 |
| 1.3.2 - INCIDÊNCIA E PREVALÊNCIA | 21 |
| 1.3.2.1 – No mundo | 22 |
| 1.3.2.2 – Na América Latina | 22 |

| | |
|--|----|
| 1.3.2.3 – No Brasil | 23 |
| 1.3.3 - PATOGENIA | 24 |
| 1.3.3.1 – Coccidioidomicose pulmonar primária | 24 |
| 1.3.3.2 – Coccidioidomicose pulmonar progressiva | 25 |
| 1.3.3.3 – Coccidioidomicose disseminada | 25 |
| 1.4 – DIAGNÓSTICO LABORATORIAL | 25 |
| 1.4.1 – EXAME DIRETO | 25 |
| 1.4.2 – CULTIVO | 26 |
| 1.4.3 - HISTOPATOLOGIA | 26 |
| 1.4.4 - IMUNOLOGIA | 26 |
| 1.4.5 – INOCULAÇÃO ANIMAL | 26 |
| 1.4.6 – INTRADERMORREAÇÃO OU TESTE CUTÂNEO | 27 |
| 1.5 - TRATAMENTO | 27 |
| 1.6 – DESENVOLVIMENTO DE VACINAS | 27 |
| 1.7 - FATORES DE RISCO | 28 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 29 |
| 3. ASPECTOS ÉTICOS | 30 |
| 4. OBJETIVOS | 30 |
| 4.1. Objetivos gerais | 30 |
| 4.2. Objetivos específicos | 30 |
| 5. MÉTODOS | 31 |
| 5.1. Isolados de <i>Coccidioides</i> spp. | 31 |
| 5.1.1. Isolados utilizados | 31 |
| 5.2. Autenticação molecular do gênero dos isolados (<i>Coccidioides</i>) | 33 |
| 5.2.1. Crescimento e liofilização | 33 |
| 5.2.2. Extração de ADN | 33 |
| 5.2.3. Identificação molecular com <i>primers</i> específicos para o gene <i>CSA</i> (PAN & COLE, 1995) | 34 |
| 5.3. Seqüenciamento dos isolados | 35 |
| 5.4. Análise da variabilidade genética | 37 |
| 6. RESULTADOS | 38 |
| 6.1 - Autenticação molecular do gênero dos isolados (<i>Coccidioides</i>) | 38 |

| | |
|--|-----------|
| 6.2 - Análise da variabilidade genética | 39 |
| 7. DISCUSSÃO | 41 |
| 7.1 - Autenticação molecular do gênero <i>Coccidioides</i> spp. | 41 |
| 7.2 - Análise da variabilidade genética | 42 |
| 8. CONCLUSÕES | 43 |
| 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 44 |
| ANEXOS | 59 |
| ANEXO 1 – Carta de aprovação do comitê de ética em pesquisa | 60 |
| ANEXO 2 – Preparação do meio glicose-extrato de levedura | 61 |
| ANEXO 3 – Termo de compromisso e responsabilidade | 62 |

1- INTRODUÇÃO

Coccidioomicose é micose sistêmica causada pelo fungo dimórfico *Coccidioides* spp., adquirida pela inalação de artroconídios infectantes presentes no solo de áreas endêmicas (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992). Atualmente, com base em análises moleculares, este gênero comporta duas espécies: *Coccidioides immitis* e *C. posadasii* (FISHER *et al.*, 2002), fato que será abordado detalhadamente mais adiante. Nas referências até esta data (2002), será usada a nomenclatura *Coccidioides immitis*. Após esta data, usar-se-á a nomenclatura utilizada no artigo referido.

A micose apresenta-se geralmente como infecção respiratória benigna e de resolução espontânea; mas, uma pequena proporção dos indivíduos infectados pode desenvolver quadros progressivos, potencialmente letais, podendo atingir, além dos pulmões, outros órgãos por disseminação hematogênica (RIPPON, 1988). Tem como sinônima as seguintes denominações: Doença de Posadas-Wernicke, Granulomatose coccidióidica, Granuloma coccidióidico, Febre do Vale, Febre do Vale de São Joaquim, Reumatismo do deserto, Doença do Deserto e Doença da Califórnia (LACAZ *et al.*, 1991; KWON-CHUNG & BENNETT, 1992).

A micose é encontrada em regiões áridas e semi-áridas do continente americano, sendo o Sudoeste dos Estados Unidos e o Norte do México a mais extensa área contígua de grande prevalência (AJELLO, 1971; PAPPAGIANIS, 1988; 1998). Ocorre também endemicamente em algumas áreas da América Central e da América do Sul (MAYORGA & ESPINOZA, 1970; CAMPINS, 1970). A região semi-árida do Nordeste do Brasil só foi identificada como área endêmica de coccidioomicose a partir de 1978, com casos conhecidos em pacientes procedentes dos estados do Piauí, Ceará, Maranhão e Bahia (WANKE *et al.*, 1993; WANKE 1994; SIDRIM *et al.*, 1997, WANKE *et al.*, 1999). A magnitude da coccidioomicose como problema para a saúde pública no Brasil ainda é desconhecida, pois ela não é uma doença de notificação compulsória. Além disso, falta treinamento para os médicos diagnosticarem esta micose. Por conta disso, é bem provável que muitos casos não sejam diagnosticados ou sejam diagnosticados como tuberculose, pneumonias inespecíficas, silicose ou outras doenças (DEUS FILHO, 2009).

1.1 - HISTÓRICO DA COCCIDIOIDOMICOSE NAS AMÉRICAS

1.1.1 - Primeiro caso - Argentina

A doença foi primeiramente descrita em 1892, por Alejandro Posadas, um estudante de medicina argentino. O paciente era o soldado Domingo Ezcurra, oriundo do Chaco, que vinha apresentando há muitos meses lesões cutâneas na face e braços. Domingo Ezcurra apresentou uma forma disseminada crônica da doença e veio a óbito em 1898. Em seguida, foi realizada uma autópsia completa e as peças anatômicas ficaram guardadas até 1948, quando foram recuperadas pelo Professor Dr. Flavio L. Niño (NEGRONI, 1996; NEGRONI, 2008).

No material destas lesões, Posadas e o patologista Robert Wernicke descreveram um parasita desconhecido, similar a protozoários coccídios (DEUS FILHO, 2007).

Estes estudos foram publicados por Posadas na Revista del Círculo Médico Argentino, em 1892 (POSADAS, 1892) e mais tarde em Paris (POSADAS, 1900; NEGRONI, 2008). Simultaneamente, Wernicke publicou o mesmo caso na Alemanha (WERNICKE, 1892; NEGRONI, 2008). O principal relato de Posadas & Wernicke descreve a resposta inflamatória semelhante à tuberculose, as características da forma parasitária do agente da doença, que remetem ao gênero *Coccidia*, e a observação do tipo de esferas com endósporos.

Somente em 1929 foi publicado o segundo caso argentino por Mazza e Parodi, 37 anos depois do primeiro comunicado. Neste segundo caso, a identificação foi confirmada por Floriano de Almeida, em 1932 (NEGRONI, 1996; NEGRONI, 2008). A partir de 1948, Pablo Negroni e colaboradores iniciaram um estudo sistemático para a definição da área endêmica de coccidioidomicose na Argentina. Foram estudadas as formas miceliais do fungo e foi demonstrada também a existência de tipos de esférulas relacionadas ao mecanismo de defesa do hospedeiro (NEGRONI, 2008). Esta equipe realizou um inquérito epidemiológico com coccidioidina no norte da Patagônia – onde havia sido detectado um caso da doença - em que foram estudadas 2.065 crianças de 6 a 16 anos de idade. Deste total, 7,5 a 10% apresentaram reações positivas (NEGRONI, 1949; NEGRONI, 2008). Foram realizados mais dois inquéritos epidemiológicos: o primeiro nas províncias de Tucumán e Santiago del Estero, onde foram estudadas 2.213 crianças, com idades entre 6 e 16 anos, com uma positividade de 19,8% em Rio Hondo e 17,7% em Coronel Borges (NEGRONI, 1952; NEGRONI, 2008); o segundo inquérito epidemiológico foi realizado na Província de Catamarca, Noroeste da Argentina. Foram incluídos neste estudo 1.000 crianças entre 6 a 15 anos, com positividade de 19%. Posteriormente, foi realizado um inquérito epidemiológico com coccidioidina na cidade

de Buenos Aires, fora da área endêmica, verificando-se uma positividade muito baixa (NIÑO, 1950; NEGRONI, 2008).

Em 1977 foi realizado o primeiro isolamento de *Coccidioides* a partir de amostras de solo de área endêmica por Borghi e colaboradores (BORGHI, 1977; NEGRONI, 2008). Nas últimas décadas, Pablo Negroni *et al.* estudaram coccidioidomicose experimental em cobaias, ratos e hamsters (ELÍAS, 1998; FINQUELIEVICH *et al.*, 1988; NEGRONI *et al.*, 1985; NEGRONI, 1996; NEGRONI, 2008), para verificar a eficácia de terapêuticas antifúngicas com cetoconazol, itraconazol e fluconazol; e detectar as alterações da resposta imune produzida por ciclofosfamida e verificar a cinética das provas sorológicas (GIMENO, 1986; NEGRONI *et al.*, 1982; NEGRONI *et al.*, 1985; REMESAR *et al.*, 1992; NEGRONI, 2008).

1.1.2 - Estados Unidos

Em 1896, um imigrante da Ilha dos Açores radicado no Vale do Rio São Joaquim e que trabalhava em uma granja apresentou lesões nodulares no pescoço. Após ser examinado pelos Drs. Emmett Rixford e T. C. Glichrist, estes concluíram tratar-se de uma lesão causada por protozoários. Devido ao estágio avançado da doença, o paciente veio a falecer. Pouco tempo depois outro imigrante dos Açores com um quadro de lesões cutâneas semelhantes também foi diagnosticado através de uma biópsia por Rixford e Glichrist, que identificaram o mesmo parasita do caso anterior e concluíram que a doença era causada por um protozoário, ao qual deram o nome de *Coccidioides immitis*, que significa “parecido com coccídio”, um tipo de protozoário (DERENSINSKI & HECTOR, 1966; NEGRONI, 2008). Outro pesquisador, Dr. Welch, estudando os isolados obtidos destes casos, só encontrou um “mofo” esbranquiçado no crescimento das culturas, prontamente descartadas como fungos filamentosos contaminantes (DERENSINSKI & HECTOR, 1966; NEGRONI, 2008). Por volta do ano de 1900, William Ophüls estudou os isolados esbranquiçados de cultivo obtido das lesões de um terceiro paciente do Vale do São Joaquim, inoculou-os em animais experimentais que desenvolveram a micose, demonstrando assim a natureza fúngica e o dimorfismo dos isolados (OPHÜLS & MOFFITT, 1900). E este mesmo autor propôs que a via de entrada da infecção era pulmonar, e que os endósporos das esférulas teriam um importante papel quimiotático para os leucócitos polimorfonucleares (OPHÜLS, 1906; NEGRONI, 2008). Em 1932 o fungo foi isolado de solo, pela primeira vez, por Stewart & Meyer de uma granja onde haviam morrido quatro pessoas de coccidioidomicose (STEWART & MEYER, 1932; NEGRONI, 2008). Nos anos de 1935 e 1936 foram examinados pela Dra. Myrnie Gifford e pelo Dr. Ernest Dickson 6 casos de coccidioidomicose que revelaram uma

alta hipersensibilidade retardada para um antígeno extraído do fungo (NEGRONI, 2008). Em 28 de agosto de 1929, um estudante de medicina abriu acidentalmente uma placa de Petri que continha um cultivo de *C. immitis* e desenvolveu em poucos dias uma infecção respiratória aguda grave diagnosticada como coccidioidomicose. Seus médicos consideraram o caso praticamente sem possibilidades de cura, mas o estudante recuperou-se sem seqüelas da micose. O Dr. Charles Smith realizou vários estudos epidemiológicos da coccidioidomicose utilizando provas cutâneas com coccidioidina, estudos estes que duraram até a Segunda Guerra Mundial, períodos no qual pode documentar, mediante estudos clínicos e imunológicos, 39.500 infecções por *C. immitis* nos campos de aviação da Califórnia (SMITH *et al*, 1946; SMITH *et al*, 1956; NEGRONI, 2008).

Demosthenes Pappagianis e Hillel Levine continuaram as investigações de Smith utilizando esferulina, um antígeno obtido de esférulas de *Coccidioides*, em inquéritos epidemiológicos nos Estados Unidos e no México. Foram eles também que iniciaram os primeiros ensaios com vacinação preventiva (LEVINE *et al* 1961; LEVINE *et al*, 1973; NEGRONI, 2008). Pappagianis realizou ainda vários estudos epidemiológicos e demonstrou a existência de coccidioidomicose naturalmente adquirida em mamíferos marinhos da costa da Califórnia (FAUQUIER *et al*, 1996; PAPPAGIANIS & ZIMMER, 1990; ZURLO *et al*, 2000; NEGRONI, 2008).

Entre 1956 e 1984 ocorreram vários simpósios sobre a micose nos Estados Unidos, onde foram adquiridos os maiores conhecimentos sobre a enfermidade (STEVENS, 1980; NEGRONI, 2008).

Em 1980 foi publicado, por David Stevens, um livro em que eram atualizadas as descobertas sobre o fungo (STEVENS, 1980; NEGRONI, 2008).

No Condado de Kern, na Califórnia, foi observado o mais alto índice da infecção em amostras populacionais, com 50 a 90 % das provas positivas. A micose também é muito freqüente nos estados do Arizona, inclusive nas maiores cidades como Phoenix e Tucson e no Oeste e Sudoeste do Texas. Mas é menos comum no Novo México, Utah e Nevada (DURRY *et al.*, 1997; MARDO *et al*, 2001; PAPPAGIANIS 1998; NEGRONI, 2008).

Nos anos de 1977, 1991 e 1994 ocorreram três grandes epidemias de coccidioidomicose. A de 1977 foi a maior delas e foi provocada pelo vento. A segunda (1991) foi provocada por uma grande seca seguida de chuva, e a terceira foi provocada por um terremoto no Vale de San Fernando no estado da Califórnia, que ocasionou uma nuvem de poeira rica em esporos (JOHNSON *et al*, 1996; SPIEGEL *et al*, 1996; NEGRONI, 2008).

Entre 1986 e 1987 foi estabelecida a relação entre coccidioomicose e Síndrome da Imuno Deficiência Adquirida (SIDA) e se considerou a coccidioomicose como uma doença definidora de SIDA. Em 41 % dos casos é uma infecção grave (NEGRONI, 2008).

No final dos anos 1990 foram registrados os primeiros casos comprovados de transmissão intrauterina (CHARLTON *et al*, 1999; AMPEL *et al*, 1998; CHILLER *et al*, 2003; WOODS *et al*, 2000; NEGRONI, 2008).

Durante a epidemia ocorrida na Califórnia, foram estudadas mulheres grávidas que contraíram a doença, e concluiu-se que gravidez não é fator de risco para a coccidioomicose como se supunha (CALDWELL *et al*, 2000; NEGRONI, 2008). A doença foi diagnosticada também em turistas que visitaram as áreas endêmicas, mas que apresentaram os sintomas fora delas (CHATURVEDI *et al.*, 2000, DESAI *et al*, 2001, ZURLO *et al*, 2000; NEGRONI, 2008).

1.1.3 – México

Em 1932 foram relatados por Cicero & Perrin os primeiros casos mexicanos. O primeiro caso documentado de coccidioomicose autóctone foi descrita por Madrid em 1946. No ano de 1944 foi realizado nos Estados de Sonora e Baixa Califórnia o primeiro estudo epidemiológico. Estudos realizados por Gluker, Fuentes Villalobos & Gómez del Campo (1950), Slim-Villegas & Aranda Reyes (1953) e Madrid & Contreras (1963) comprovaram a existência de uma área endêmica no norte do México, adjacente à zona endêmica dos Estados Unidos (MAYORGA *et al*, 1970, VELASCO-CASTREJÓN *et al*, 1978; NEGRONI, 2008).

Entre os anos de 1961 e 1965 González-Ochoa realizou um estudo das áreas endêmicas de coccidioomicose no México. Em estudo de mais de 53 comunidades em todo o país, onde foram realizadas mais de 1.000.000 de intradermoreações com coccidioidina, identificaram-se três regiões endêmicas: Zona Norte, na fronteira com os Estados Unidos; Zona do Litoral do Pacífico e a Zona Central.

No México, assim como nos Estados Unidos, foram relatados casos de turistas que haviam visitado o México e relataram sintomas de coccidioomicose quando retornaram aos seus países de origem (ZURLO *et al*, 2000, CAIRNS *et al*, 2000; NEGRONI, 2008).

1.1.4 – Honduras

Castro & Trejos estudaram o primeiro caso de coccidioidomicose em Honduras. Eles realizaram um estudo epidemiológico no Vale de Comayagua e encontraram uma positividade de 15,7% e demonstraram que as características fitogeográficas eram idênticas às das outras áreas endêmicas (MAYORGA & ESPINOZA, 1970; MAYORGA, 1967; NEGRONI, 2008).

1.1.5 – Guatemala

Andrade realizou o primeiro estudo sobre coccidioidomicose, realizando 1.200 intradermoreações na cidade da Guatemala. Ele registrou uma positividade de 0,5%. Ferri e Corrêa, em 1960 demonstraram os primeiros casos em cães e vacas. O primeiro caso humano foi diagnosticado por Pérez & Rosales (MAYORGA, 1967; NEGRONI, 2008).

Entre 1967 e 1970 Mayorga investigou a possibilidade de haver uma área endêmica no Vale de Motágua. Esta suspeita surgiu com a observação do caso de um soldado de 19 anos que havia permanecido 3 semanas nesta região. Durante este estudo, áreas como Zacapa, Teculután, Río Hondo e Gualán mostraram índices de positividade na prova cutânea de coccidioidina de 42%.

1.1.6 – Nicarágua

Mayorga incluiu algumas zonas deste país, mas estes estudos apresentaram uma proporção de provas positivas muito baixas. (MAYORGA & ESPINOZA, 1970; MAYORGA 1967; NEGRONI, 2008).

1.1.7 - El Salvador

No ano de 1959 foi feita por Llerena uma comunicação sobre a existência de três casos autóctones de coccidioidomicose em El Salvador (BORELLI, 1970; NEGRONI, 2008).

1.1.8 – Venezuela

Em 1948 foi registrado o primeiro caso humano de coccidioidomicose na Venezuela por Campins, Scharyi e Gluck. Entre 1949 e 1965 demonstrou-se a existência de zonas endêmicas nos Estados de Lara, Falcón e Zulia, com áreas de incidência de até 46% medida pelas provas cutâneas positivas (CAMPINS, 1967; CAMPINS, 1970; NEGRONI, 2008).

1.1.9 - Colômbia

O primeiro caso humano autóctone foi publicado em 1958 (SALES-SALES, 1958), e o segundo em 1965 (ROBLEDO, 1965). Este último realizou um estudo epidemiológico onde foi demonstrada a existência de uma área endêmica na península de Goajira, com baixa prevalência de infecção (ROBLEDO *et al*, 1968; NEGRONI, 2008).

1.1.10 - Equador

Houve uma comunicação de três casos autóctones neste país, mas esta comunicação deixa dúvidas quanto ao diagnóstico (LEÓN 1961; NEGRONI, 2008).

1.1.11 - Bolívia

Foi relatado até o momento somente um caso de coccidioomicose na Bolívia, mas como o paciente havia estado no Chaco paraguaio, é possível que ele tenha adquirido a doença neste país (MACKINNON, 1948).

1.1.12 - Paraguai

No ano de 1950, Gómez realizou um estudo a partir de casos de primoinfecção sintomática na zona do Chaco, no nordeste do país, região habitada por aborígenes e empregados de uma companhia americana de petróleo. Neste estudo ficou comprovado que 43,9% dos indígenas e 50% dos empregados da companhia de petróleo eram reatores para coccidioidina (GÓMEZ, 1950; NEGRONI, 2008).

1.1.13 - Brasil

O primeiro caso foi descrito por GOMES *et al*, (1978) em paciente proveniente de Pirapiranga (BA). Um ano depois, VIANNA *et al*. (1979) descreveram o segundo caso, em paciente oriundo do Piauí, que apresentou pneumopatia que regrediu espontaneamente. Apesar da descrição destes casos, somente em 1998, o nosso país foi incluído como área endêmica da coccidioomicose (PAPPAGIANIS, 1998; NEGRONI, 2008).

No ano de 1994, foi descrita por Wanke a primeira microepidemia de coccidioomicose no estado do Piauí (WANKE, 1994). Pouco tempo depois foi descrito um surto semelhante no Ceará (SIDRIM *et al*, 1997).

A primeira microepidemia do Piauí ocorreu no município de Oeiras, antiga capital do Estado. Após uma caçada à tatus, três indivíduos com idades de 38, 24 e 11 anos respectivamente e oito cães adoeceram simultaneamente pelo fato de haverem inalado poeira contaminada durante a caçada. Dos oito cães, três morreram em poucos dias. Os outros cinco foram tratados com antifúngico e se recuperaram. Os três indivíduos apresentaram febre, fraqueza, mialgia, tosse e dispnéia, sendo internados no hospital de Oeiras e, após alguns dias, o menor de 11 anos apresentou cura espontânea. Os outros dois apresentaram quadro de grave pneumonia em ambos os pulmões, sendo posteriormente transferidos para o Hospital de Doenças Infecto Contagiosas de Teresina (atual IDTNP - Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella), em Teresina, capital do Piauí. Os três pacientes receberam tratamento específico com anfotericina B e em pouco tempo estavam com cura clínica (WANKE *et al*, 1993; 1999).

Desde esta época o número de casos vem aumentando consideravelmente. Até o presente momento, a micose já foi diagnosticada em quatro estados no nosso país: Piauí (100 casos), Ceará (20 casos) Maranhão (6 casos) e Bahia (2 casos) (DEUS FILHO, 2007; DEUS FILHO, 2009; EULÁLIO, 2008), conforme pode ser visto na figura 1.

No Brasil, além dos casos humanos a infecção também já foi diagnosticada em cães e tatus (*Dasypus novencinctus*) e o fungo foi isolado de humanos, dos animais citados e de amostras de solo coletadas em tocas de tatus nos Estados do Piauí (EULÁLIO *et al*, 2000; WANKE *et al*, 1999; DE MACÊDO 2006; WANKE 1994) e Ceará (CORDEIRO *et al*, 2006).

Como a coccididomicose não é uma doença de notificação compulsória, a magnitude desta doença é pouco conhecida. Outro fator que dificulta o conhecimento da real magnitude da coccididomicose é a falta de conhecimento e treinamento adequado dos profissionais de saúde, que a confundem facilmente com uma pneumonia inespecífica.



Figura 1 – Ocorrência endêmica de Coccidioicomicose no Brasil (EULÁLIO, 2008)

1.2 - O AGENTE

Coccidioides spp. é um fungo dimórfico. Em saprofitismo e em cultivos incubados à temperatura ambiente cresce como micélio vegetativo hialino, formando colônias esbranquiçadas de aspecto algodinoso. Em parasitismo, em tecido de animais e em condições especiais de crescimento *in vitro* apresenta-se em forma esferular endoesporulante (HUPPERT *et al.* 1982).

A forma filamentosa é capaz de crescer em grande diversidade de meios, sejam pobres em substratos orgânicos ou meios enriquecidos. O crescimento de *Coccidioides immitis* não é inibido pela adição de cicloheximida e antibacterianos aos meios de cultivo. À temperatura ambiente (cerca de 25°C), em meio de agar Sabouraud-glicose, observa-se rápido e abundante crescimento do fungo ao final do terceiro ou quarto dia de incubação. Há ampla variação na morfologia e nos aspectos microscópicos das colônias (HUPPERT *et al.*, 1967). Em geral, são algodinosas ou aveludadas, mas podem ser pulverulentas, granulosas ou enrugadas, com margens lisas, franjeadas ou lobuladas. O crescimento inicial é branco, mas se torna castanho ou marrom com o envelhecimento da colônia (figura 3). Variantes cinza, rosa, amarela e cor de camurça são freqüentemente observadas (RIPPON, 1988).

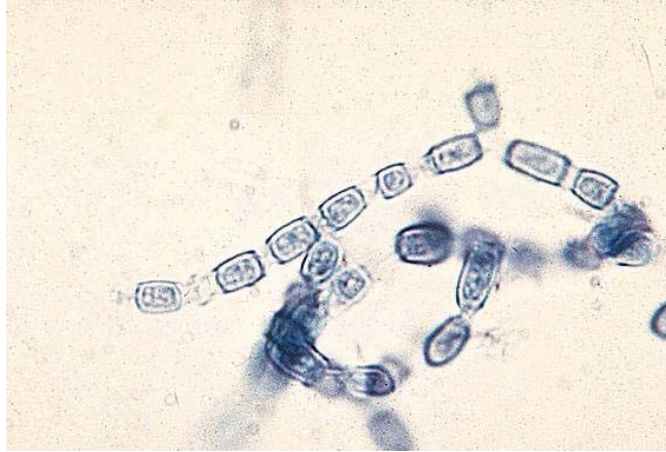
Microscopicamente, nos cultivos à temperatura ambiente, *Coccidioides immitis* apresenta-se com hifas hialinas, septadas e ramificadas, de 2 a 4 µm de diâmetro. Há

produção de um único tipo de conídio, o artroconídio, observado em hifas maduras, que já aparecem ao final do quinto ao décimo dia de cultivo, conforme pode ser visto na figura 2. As hifas produtoras de conídios geralmente surgem em ramificações laterais dos filamentos que nascem em ângulo reto e têm espessura duas vezes maior que a hifa vegetativa. Hifas conidiogênicas dispostas em paralelo ou que surgem formando ângulos agudos nas extremidades da hifa vegetativa são variantes observadas (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992). Alternando com os artroconídios, as hifas mostram espaços interseptais degenerados e vazios de citoplasma (RIPPON, 1988). Quando se destacam das hifas, os artroconídios apresentam paredes espessadas e tendem a abaular-se, assumindo forma em barril. Medem de 2 a 4 μm x 3 a 6 μm e geralmente são multinucleados. Variantes de artroconídios com forma quadrangular e arredondada podem ser observadas (HUPPERT *et al.*, 1967).

Coccidioides spp. produz melanina ou compostos derivados da melanina “*in vitro*” e “*in vivo*” durante o curso da infecção. Contudo, o tipo de melanina e a via metabólica responsável por esta produção não foi determinada. Analisando o genoma de *C. posadasii*, descobre-se que existe um gene com 80% de similaridade com a lacase. A descoberta da produção de compostos de melanina pelo *C. posadasii*, pode explicar a dificuldade do tratamento em indivíduos imunodeprimidos (NOSANCHUK *et al.*, 2007).

A forma parasitária característica é uma esférula, observada em preparações de espécimes clínicos com potassa a 10% ou em cortes histológicos de tecidos corados com hematoxilina e eosina (H&E), ao ácido periódico de Schiff (PAS) ou com impregnação argêntea de Gomori-Grocott, como observada na figura 4. Trata-se de elemento esférico ou redondo, não brotante, de parede espessa, variando de 5 a 60 e até 100 μm de diâmetro, contendo em seu interior numerosos pequenos endósporos globosos e uninucleados, com 2 a 5 μm de diâmetro (RIPPON, 1988; KWON-CHUNG & BENNETT, 1992; WANKE *et al.*, 1996).

Até o momento, não há informação na literatura sobre a fase sexuada de *Coccidioides* spp. Em estudo sobre este assunto Burt *et al.* (1996), utilizando diversas técnicas de biologia molecular como a PCR, seqüenciamento de *ADN* e genética de populações, comprovou que o fungo é recombinante, apesar da ausência de uma fase sexuada conhecida. Todavia, não se sabe se a expressão de sexo é críptica ou ausente.



**Figura 2 – Arthroconídios de *Coccidioides* spp. visualizados em lactofenol azul de algodão.
(WIKIPEDIA, 2011)**



**Figura 3 – Cultivo de *Coccidioides immitis* em Sabouraud agar
demonstrando a forma e cor da colônia
(PIEL LATINOAMERICANA, 2011)**



Figura 4 – Esférula de *Coccidioides* spp. mostrando em seu interior endósporos (MEDICINENET, 2011)

1.2.1 - CICLO VITAL

No solo, os artroconídios são liberados após hidrólise de segmentos estéreis intermediários e podem seguir dois caminhos: germinam e perpetuam o ciclo saprofitário ou são inalados por hospedeiro suscetível e iniciam o ciclo parasitário. Penetrando nos pulmões, os artroconídios tornam-se arredondados e aumentam progressivamente de tamanho, atingindo de 60 a 100 μm de diâmetro (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992). Divisões nucleares sincrônicas seguidas de clivagens citoplasmáticas sucessivas, determinadas por invaginação da membrana celular, dividem o protoplasma do fungo em seções multinucleadas. O processo da formação de planos de clivagem continua até que endósporos uninucleados encerrados em sacos membranosos hialinos preencham toda a esférula (HUPPERT *et al.*, 1982). A ruptura das esférulas libera endósporos nos tecidos, os quais crescem e se transformam em novos elementos maduros, perpetuando o ciclo reprodutivo (KIRKLAND & FIERER, 1996). A figura 5 mostra este ciclo em detalhes.

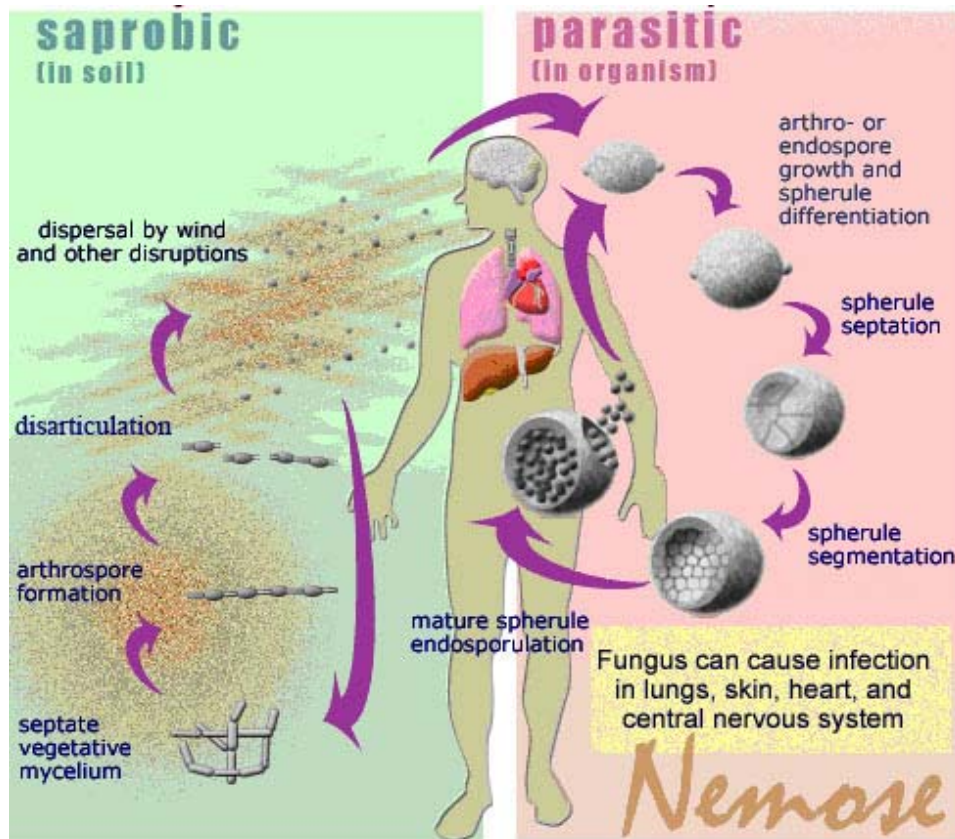


Figura 5 – Ciclo de vida de *Coccidioides* spp. - fases sasprofítica e parasitária (METAPATHOGEN, 2011)

1.2.2 - FATORES ECOLÓGICOS

Coccidioides immitis é primariamente encontrado no solo de regiões áridas e semi-áridas do continente americano (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992; WANKE, 1993; PAPPAGIANIS, 1998), desde a superfície até 30 cm de profundidade (EGEBERG & ELY, 1956). O fungo pode ser isolado de amostras de solo através da técnica de inoculação intraperitoneal de suspensão de solo em solução salina em camundongos (técnica de Stewart & Meyer, 1932 e variantes) e através de técnicas moleculares buscando frações específicas de ADN (GREENE *et al.*, 2000).

No solo, o fungo não é distribuído de forma homogênea, sendo restrito a pequenos focos. Tocas de animais (EGEBERG & ELY, 1956; WANKE, 1993) e sítios arqueológicos (LACY & SWATEK, 1974; HARRISON *et al.*, 1991) têm sido identificados como locais de maior probabilidade para isolamento do fungo. O enterro de carcaças de animais infectados em solos previamente negativos pode contaminar o solo (MADDY & CRECELIUS, 1967).

Textura arenosa e alcalinidade são descritas como características freqüentemente observadas nos solos onde *Coccidioides immitis* está presente (MADDY, 1957; MADDY 1965; LACY & SWATEK, 1974). A salinidade elevada favorece o crescimento do fungo, ao mesmo tempo em que inibe os seus antagonistas (EGEBERG *et al.* 1964; ELCONIN *et al.*, 1964).

A maioria das regiões endêmicas caracteriza-se por baixa pluviosidade anual (125 a 500 mm), verões quentes (temperaturas médias de 26 a 32°C) e invernos amenos (MADDY, 1965). As chuvas, além de escassas, distribuem-se por curto período de tempo, e a estação seca é prolongada. Nos meses mais quentes do ano, a temperatura do solo, da superfície até 1 cm de profundidade, pode ultrapassar 60°C, o que é letal para *C. immitis* (PAPPAGIANIS, 1998). O fungo, entretanto, sobrevive em camadas mais profundas e, ao chegar à estação chuvosa, germina e repovoa as camadas mais superficiais do solo (EGEBERG *et al.* 1964). Após o período de chuvas, quando o solo se torna seco, os artroconídios são aerossolizados pelo vento ou por atividade antrópica. O grande poder de dispersão dos conídios, superior ao esperado para suas dimensões, permite-lhes alcançar centenas de quilômetros à distância (PAPPAGIANIS, 1998).

A exposição à poeira é fator crítico determinante do risco de infecção. A maior parte dos casos de coccidioidomicose ocorre no final do verão e no outono (período seco), quando é máxima a desarticulação das hifas produtoras de conídios e dispersão dos artroconídios. Na grande área endêmica dos EUA o número de casos na estação seca é maior após período de forte pluviosidade, já que a umidade mais elevada do solo favorece o aumento da salinidade e o crescimento das hifas. No inverno e na primavera, o solo molhado pelas chuvas reduz a formação de aerossóis, e o número de casos de coccidioidomicose se reduz, caracterizando claramente uma situação de sazonalidade bem definida (SMITH *et al.*, 1946).

Grandes irrupções do solo determinadas por fortes ventos e tempestades de areia (PAPPAGIANIS & EINSTEIN, 1978; WILLIAMS *et al.*, 1979) e terremotos (FLYNN *et al.*, 1979; CDC, 1994) têm sido associados a surtos epidêmicos da micose, inclusive com aparecimento de casos a grande distância, em áreas não endêmicas.

1.2.3 - RESERVATÓRIOS ANIMAIS

Coccidioides immitis e *C. posadasii* apresentam ampla variedade de hospedeiros. Além do homem, infecção natural pelo fungo foi registrada em numerosos animais domésticos e em grande diversidade de animais silvestres. Ampla variação de resposta à

infecção é vista entre as diversas espécies de animais. Bovinos, caprinos e suínos parecem ter grande resistência ao fungo e a infecção, em geral, limita-se aos linfonodos brônquicos e mediastinais. Cavalos domésticos, macacos e outros primatas costumam ter doença grave e disseminada. Os cães, por sua vez, apresentam, à semelhança do homem, grande variabilidade de resposta, incluindo desde infecções assintomáticas até formas com acentuada disseminação (KAPLAN, 1973; PAPPAGIANIS, 1998). No Brasil, a micose já foi identificada em cães e tatus no Estado do Piauí, conforme figura 6 (WANKE *et al.*, 1999; EULÁLIO *et al.*, 2000).



Figura 6 – Tatu *Dasypus novemcinctus* (Prefeitura Municipal de Toledo, 2011)

1.2.4 - MODO DE TRANSMISSÃO

O homem e outros animais adquirem a coccidioomicose através da inalação de artroconídios presentes no solo. Raramente, infecções são adquiridas por inoculação traumática de artroconídios através da pele (WILSON *et al.*, 1953). Experimentalmente, inoculação por via subcutânea ou intraperitoneal de conídios é menos eficiente do que por via respiratória para produzir doença e óbito em animais de laboratório. Raros casos de coccidioomicose por transmissão transplacentária foram documentados (KWON-CHUNG & BENNET, 1992). Não há registro de transmissão inter-humana e nem de animais para o homem (PAPPAGIANIS, 1998).

1.2.5 – TAXONOMIA

As espécies de *Coccidioides* pertencem à Ordem Onygenales. Nesta ordem estão representados a maior parte dos fungos patogênicos para o homem. Estão incluídos nesta ordem os agentes de infecção cutânea da família Arthrodermatiaceae (*Trichophyton* e *Microsporum*) e agentes de micoses sistêmicas da família Onygenaceae (*Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Blastomyces dermatitidis*) (EULÁLIO, 2008). Estudos moleculares, bioquímicos e imunológicos demonstraram que *Coccidioides immitis* tem uma relação filogenética muito próxima com um teleomorfo do gênero *Malbranchea* denominado *Uncinocarpus reesi*, que também pertence à ordem Onygenales (PAN *et al.*, 1994).

A classificação proposta por Fisher *et al.* (2002) é:

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Subfilo: Pezizomycotina

Classe: Eurotilmycetes

Ordem: Onygenales

Família: Onygenaceae

Gênero: *Coccidioides*

Espécies: *C. immitis* e *C. posadasii*

1.2.6 – IDENTIFICAÇÃO CLÁSSICA

Coccidioides são fungos dimórficos, mas a reversão da fase filamentosa para a forma em esférula não é reproduzida em meios comuns de laboratório. Para consegui-lo, há necessidade de inocular porções do micélio em animais de laboratório, reproduzindo o microambiente parasitário, para que a esférula se forme. Este é o método clássico, descrito como critério taxonômico para sua identificação. Outro procedimento adotado é a inoculação de esférulas em meios à base de ágar para produção de tubos germinativos múltiplos, os quais dão origem a hifas septadas e ramificadas, formadoras de artroconídios (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992). No entanto, vários fungos pertencentes ao gênero *Malbranchea* spp. são encontrados como sapróbios em solos e como contaminantes em materiais clínicos, apresentando forma filamentosa com artroconídios que podem apresentar disposição intercalar, indistinguíveis da fase filamentosa de *Coccidioides* spp. Por outro lado, alguns isolados não apresentam conversão à forma parasitária *in vitro* ou expressam formas redondas

não características em tecidos e espécimes clínicos gerando dificuldade de identificação de isolados suspeitos.

Outro sistema utilizado é o cultivo da fase filamentosa em meios especiais, com atmosfera de 5 a 10% de CO₂ e temperatura de 34 a 40°C (CONVERSE & REED, 1956; SUN *et al.*, 1976). Este sistema, além de complexo e caro, nem sempre permite a reprodução da forma em esférula, tendo rendimento limitado, implicando no manejo direto do fungo, com risco para o manipulador.

Método alternativo é a detecção de um antígeno específico para as duas espécies (Cs-Ag), presente no filtrado de cultivos de sete a dez dias de crescimento do inóculo, denominado teste do exoantígeno. É feito com anti-soro utilizando método padrão de imunodifusão dupla e permite a confirmação rápida do agente, em dois a três dias. O teste é altamente específico. O antígeno secretado é um produto termo-estável, com peso molecular em torno de 19kDa (PAN & COLE, 1995). *Kits* comerciais são produzidos somente nos Estados Unidos.

1.2.7 – IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

Atualmente estão sendo desenvolvidas técnicas moleculares para conseguir um rápido e preciso diagnóstico da micose e a identificação de isolados filamentosos suspeitos pela sua morfologia microscópica compatível. Assim, técnicas de hibridização com sondas específicas têm sido investigadas com o objetivo de substituir os procedimentos de imunodiagnóstico clássico em laboratórios clínicos. *Kits* comerciais com alta sensibilidade e especificidade utilizando sondas para detecção de seqüências de ARN ribossomal para a identificação de agentes de micoses sistêmicas são produzidos nos Estados Unidos. No entanto, estes métodos têm apresentado uma fração de resultados falso-negativos e também resultados errôneos na identificação de fungos, como por exemplo, *Paracoccidioides brasiliensis* cruzando com *Blastomyces dermatitidis* (PADHYE *et al.*, 1994; SANDIN *et al.*, 1993).

Em 1994, Zimmerman *et al.*, utilizando técnica de RFLP, demonstraram a existência de dois grupos: *Coccidioides immitis* I e II.

PAN & COLE (1995) caracterizaram um antígeno (Ag-CS) de 19 kDa de *Coccidioides immitis* e testaram seqüências de *primers* baseadas no gene *CSA*. Utilizando uma técnica simples e convencional de PCR, testaram 12 isolados clínicos, previamente identificados através das técnicas clássicas, e propuseram um método potencialmente útil para a identificação rápida e segura de cultivos suspeitos (PAN & COLE, 1995).

No ano de 1997, BURT *et al.*, identificaram recombinação em *C. immitis*.

Em 2004, JOHNSON *et al.* descreveram uma técnica de PCR para identificação de *Coccidioides immitis* no soro de pacientes utilizando um *kit* de extração comercial.

Em 2006, UMEYAMA *et al.*, descreveram um método onde é possível distinguir as duas espécies de *Coccidioides* (*immitis* e *posadasii*) através da detecção de banda específica gerada em PCR. Ainda em 2006, BEZERRA *et al.* analisaram 20 isolados da Coleção de Cultura do Departamento de Micologia do Instituto Oswaldo Cruz, preservadas por um período de 50 a 75 anos e demonstraram 100% de positividade na identificação do fungo através da detecção do antígeno CSA por PCR.

TINTELNOT *et al.*, (2007) estudaram a região ITS de 14 isolados de *C. posadasii* e 8 de *C. immitis*, e 20 isolados clínicos depositados em dois Centros de Referência como *C. immitis*. Neste trabalho foram encontradas diferenças consistentes entre as regiões ITS das duas espécies, possibilitando a diferenciação por este marcador. Alternativamente, foi sugerida técnica de RFLP de toda a região ITS com enzimas de restrição para a diferenciação entre as duas espécies.

No ano de 2010, foi descrito um método de “Real Time PCR” para identificação e diferenciação de *Coccidioides immitis* e *C. posadasii* (SHEFF *et al.*, 2010)

Recentemente *Coccidioides posadasii* foi detectado diretamente de amostras de solo (DE MACEDO, 2006), com 100% de positividade, através de técnica de *nested*-PCR.

1.2.8 - NOVOS ESTUDOS TAXONÔMICOS

Historicamente *Coccidioides immitis* tem sido considerado como espécie única, agente etiológico da coccidioidomicose, presente em diferentes regiões geográficas. No entanto, em 1997 surgiu uma proposta de re-classificar a espécie em dois tipos geográficos: “*Coccidioides immitis* (CA)” ocorrendo na Califórnia, principalmente no Vale do São Joaquim e “*Coccidioides immitis* (non-CA)” ocorrendo fora da Califórnia, seja na América do Norte, América Central e na América do Sul, com base na análise de cinco genes: actino sintetase, dioxigenase orotidine, descarboxilase, serino proteinase e quitinase (KOUFOPANOU *et al.* 1997). Em 2002 *Coccidioides immitis* (non-CA) foi descrito como uma nova espécie, baseada em análises filogenéticas usando polimorfismo único (simples), seqüências gênicas e microssatélites, sendo denominada *C. posadasii* (FISHER *et al.* 2002). Assim, os isolados de *Coccidioides immitis* obtidos em áreas fora da Califórnia devem ser

denominados *C. posadasii*, incluindo todos os isolados da América do Sul e do Brasil. A figura 7 mostra muito bem isso.

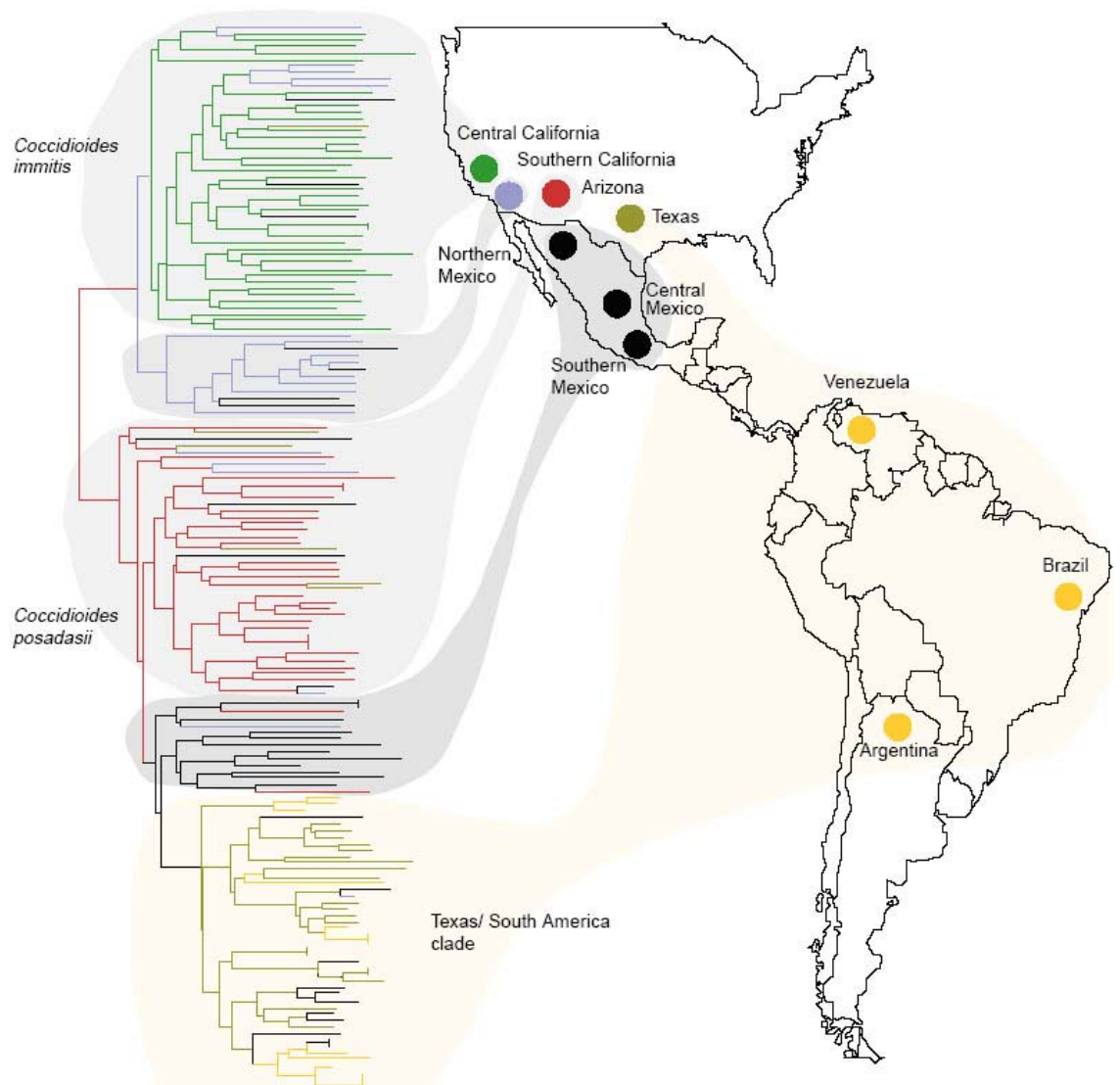


Figura 7 – Distribuição das espécies de *Coccidioides immitis* e *C. posadasii* nas Américas (TAYLOR & FISHER, 2003)

Até o momento não se observou nenhuma diferença fenotípica entre as duas espécies de *Coccidioides*. Algumas colônias de *C. immitis* crescem mais rápido em meios contendo mais sal. (FISHER *et al* 2002). Também foi relatado que, em testes de susceptibilidade aos antifúngicos contra anfotericina B, fluconazol, itraconazol, voriconazol, cetoconazol, caspofungina e terbinafina não há diferença significativa na concentração inibitória mínima entre *C. immitis* e *C. posadasii* (TINTELOT *et al*, 2007). Por estes motivos alguns pesquisadores consideram os isolados de fora da Califórnia (*non-CA*) como sendo uma variedade (*Coccidioides immitis* var. *posadasii*) (DICAUDO, 2006; COX & MAGEE, 2004).

1.2.9 – O GENE CSA

O gene *CSA* é o gene que codifica um antígeno de uma proteína com uma atividade de serino-proteinase termo-estável de 19-kDa. Este gene se localiza no cromossomo I de *C. immitis* (PAN & COLE, 1995). A serino proteinase possui uma atividade ótima em pH 6,0 e entre 37 a 40° C (COLE *et al*, 1989). O antígeno é secretado pelas fases saprofítica e parasitária do fungo e é específico de *Coccidioides*, e é utilizado no teste do exoantígeno, teste que é utilizado como confirmação de diagnóstico por ser mais específico do que a imunoprecipitação (PAN & COLE, 1995).

Em 2008 LOPES *et al*. descreveram uma peptidase extracelular de 25kDa secretada pelo micélio sob condições definidas de crescimento de *C. immitis*, que degrada queratina.

1.2.10 – NORMAS DE BIOSSEGURANÇA

Coccidioides spp. são fungos altamente infectantes, considerados de classe de risco 3. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Por conta disso, para se processar espécimes clínicos e tecidos animais, é satisfatório que o laboratório possua Nível de Biossegurança 2 (NB-2), que inclui: laboratório com acesso controlado, com símbolo internacional de risco biológico na entrada do mesmo, autoclave próximo à área de trabalho, uso de Equipamentos de Proteção Individual (EPI's) que são: luvas, avental descartável e máscara. Para o manuseio de culturas filamentosas suspeitas, no processamento de solo ou de outros materiais ambientais suspeitos, é exigido NB-3, que difere basicamente da NB-2 pela obrigatoriedade da Câmara de Fluxo Laminar com filtro tipo HEPA (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).

No caso de exposição acidental em laboratório, várias medidas devem ser tomadas, entre elas: evacuação do laboratório com retirada dos EPI's de dentro do local afetado pela exposição acidental; fechamento de portas e janelas; limpeza de todo o local (incluindo portas, paredes e chão) com derivado de formaldeído ou fenóis (STEVENS, 2009).

1.2.11 – COCCIDIOIDES spp. COMO AGENTE DE BIOTERRORISMO

Coccidioides spp. está na “Lista Final de Agentes Seleccionados” do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos. Esta lista restringe o uso, transporte, importação e exportação do fungo (CDC, 2009). Por sua alta infectividade, *Coccidioides* é considerado passível de ser utilizado como arma biológica (EULÁLIO, 2008). A sua inclusão como potencial agente de bioterrorismo impede que se tenham maiores avanços na pesquisa

deste fungo, dificultando o entendimento da sua biologia e epidemiologia (COX & MAGEE, 2004).

1.3 – A MICOSE

1.3.1 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

As espécies de *Coccidioides* e a coccidioidomicose se distribuem em áreas áridas e semiáridas do continente americano situadas entre os paralelos 40°N e 40°S, principalmente no sudoeste dos Estados Unidos e no norte do México. Também foi diagnosticada entre as coordenadas 40°S e 65°W, no sul da Argentina (PAPPAGIANIS, 1988). A definição das áreas endêmicas de coccidioidomicose se baseou na identificação de casos humanos e animais e na demonstração de reatividade aos testes cutâneos com coccidioidina (PAPPAGIANIS, 1988).

KWON-CHUNG & BENNETT (1992) descreveram áreas endêmicas em nove países: Estados Unidos e México na América do Norte; Honduras e Guatemala na América Central; e Colômbia, Venezuela, Bolívia, Paraguai e Argentina, na América do Sul. Nesse compêndio foram ignorados os primeiros casos humanos descritos na Nicarágua, em 1979, e no Brasil, em 1978 e 1979 (RIOS OLIVARES, 1979; GOMES *et al.*, 1978; VIANNA *et al.*, 1979).

A coccidioidomicose foi diagnosticada recentemente na região semiárida do nordeste do Brasil nos Estados do Piauí (100 casos); Ceará (20 casos); Maranhão (6 casos) e Bahia (2 casos) (DEUS FILHO, 2009), última área endêmica reconhecida no continente americano (WANKE *et al.*, 1993; SIDRIM *et al.*, 1997; WANKE *et al.*, 1999).

1.3.2 - INCIDÊNCIA E PREVALÊNCIA

A coccidioidomicose não é doença de notificação compulsória e, por isso, suas reais prevalência e incidência não podem ser estabelecidas com precisão.

A maioria dos casos de coccidioidomicose é assintomática. Um teste cutâneo positivo à coccidioidina (esferulina) fornece evidência indireta de que o indivíduo foi infectado pelo fungo no passado. A frequência de conversão ao teste cutâneo é de aproximadamente 3% ao ano em áreas de alta endemicidade (GALGIANI, 1993).

1.3.2.1 – No mundo

Nos Estados Unidos, maior área endêmica do mundo, são estimados 150.000 novos casos de infecção anualmente, e destes, mais ou menos 50.000 ficarão doentes (GALGIANI *et al*, 2005).

Em algumas regiões norte americanas, 60 a 90% dos indivíduos são reagentes aos testes cutâneos. Estima-se que 10 a 30% de pessoas procedentes de áreas não endêmicas tornam-se reatores positivos durante o primeiro ano de residência em uma região fortemente endêmica (KAPLAN, 1973).

1.3.2.2 – Na América Latina

Ao contrário do que se conhece nos Estados Unidos, os dados de prevalência da coccidioidomicose na América Latina são muito incompletos (EULÁLIO, 2008).

No México, as taxas de prevalência de testes cutâneos variam entre 5% a até mais de 50% (GONZALEZ, 1967). Na Guatemala e em Honduras os índices de reatividade foram de 26% e 16%, respectivamente (EULÁLIO, 2008).

Na Venezuela, os testes cutâneos indicaram prevalências de 46% e 23,9% nos Estados estudados, na Argentina demonstraram índices de reatividade entre 17,5% e 19,8% e no Paraguai revelaram 44% de indivíduos infectados em um grupo de 82 indígenas e menos que 2% em residentes na cidade de Assunção (EULÁLIO, 2008).

Como mostrado na figura 8, existem várias áreas na América Latina que são consideradas áreas onde não se tem certeza da ocorrência da micose.



Figura 8 – Distribuição da Coccidioidomicose na América Latina.
(COLOMBO *et al*, 2011)

1.3.2.3 – No Brasil

A partir da década de 1940, foram realizados inquéritos intradérmicos nas regiões Norte, Sul e Sudeste, que indicaram a inexistência da infecção por *Coccidioides*.

Em 1960, LACAZ sinalizou que os inquéritos intradérmicos deveriam ser realizados no Nordeste, pois o clima e a vegetação desta região se assemelham às das áreas endêmicas dos Estados Unidos (EULÁLIO, 2008).

No Nordeste brasileiro, inquéritos realizados no interior do Ceará (DIÓGENES *et al.*, 1995) e do Piauí (WANKE, 1996) mostraram reações positivas em, respectivamente, 26,4% e 10% dos indivíduos testados.

Estima-se que novos casos possam ser diagnosticados nos outros Estados do Nordeste brasileiro, uma vez que eles possuem clima e vegetação muito parecidos (DEUS FILHO, 2009).

O grande número de casos da doença no Piauí pode ser resultado de estudos de colaboração entre a Universidade Federal do Piauí e o Laboratório de Micologia do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas. Por conta disso, o número de casos dobrou de agosto de 2003 a julho de 2006 (DEUS FILHO, 2009).

Comparada com outras micoses, como por exemplo a paracoccidioidomicose, nota-se que uma grande diferença entre as áreas endêmicas destas duas micoses é o clima: em regiões com baixa umidade como a Caatinga, prevalece *Coccidioides posadasii* (DEUS FILHO, 2009); ao contrário, *Paracoccidioides brasiliensis* prevalece em todas as regiões de clima úmido (WANKE *et al*, 2005).

Os casos de coccidioidomicose descritos no Brasil possuem uma sazonalidade, sendo mais frequentes no início da temporada de chuvas e nos meses mais quentes, como setembro (16.7%), outubro (10,0%) e novembro (20.0%). Janeiro foi o mês de maior incidência da doença no estado do Piauí, coincidindo com o início da estação das chuvas (DEUS FILHO, 2009).

1.3.3 – PATOGENIA

A coccidioidomicose apresenta-se basicamente sob três formas clínicas principais: pulmonar primária, pulmonar progressiva e disseminada (WANKE *et al*, 2005).

1.3.3.1 – Coccidioidomicose pulmonar primária

Dez a 15 dias após exposição ao fungo, o paciente pode desenvolver esta forma da doença que é a mais freqüente das três formas clínicas. A intensidade dos sintomas vai depender da carga infectante e do estado imunológico do hospedeiro. Estima-se que cerca de 40% dos indivíduos com infecção primária manifestem sintomas de doença como febre, sudorese noturna, tosse e/ou dor torácica, simulando uma gripe, que pode evoluir como uma infecção respiratória inespecífica, com tosse produtiva ou sem expectoração. Na fase de regressão destas manifestações podem ocorrer reações alérgicas, destacando-se o eritema nodoso e o eritema multiforme. Na radiografia de tórax, os pulmões podem apresentar-se normais, com espessamento hilar, extensos infiltrados alveolares com ou sem linfadenomegalias hilares e, ocasionalmente, derrame pleural. Cerca de 5% dos pacientes com esta forma evoluem com lesões pulmonares residuais assintomáticas (muitas vezes nódulos calcificados). Outros 5% dos pacientes evoluem com formação de cavidades de paredes finas, solitárias e justapostas, que podem regredir espontaneamente em cerca de dois anos, podendo

ser assintomáticas. Raramente estas cavidades podem ser colonizadas por outros fungos, especialmente *Aspergillus*, formando bola fúngica. Os demais 60% dos indivíduos infectados evoluem para cura espontânea sem manifestações clínicas ou radiológicas. Em pacientes imunocomprometidos ou diabéticos, a forma pulmonar aguda não regride evoluindo para uma pneumonia aguda com cavitações pulmonares (WANKE *et al*, 2005).

1.3.3.2 – Coccidioidomicose pulmonar progressiva

É de evolução crônica, a partir de primo-infecção cujos sintomas não regridem após dois meses. Pode apresentar-se com lesões nodulares ou cavitárias, doença pulmonar fibrocavitária e disseminação miliar pulmonar, com manifestações clínicas e radiológicas inespecíficas. Constitui importante diagnóstico diferencial com a tuberculose pulmonar (WANKE *et al*, 2005).

1.3.3.3 – Coccidioidomicose disseminada

Somente 0,2% dos pacientes com a forma pulmonar primária evoluem para disseminação. Esta forma clínica evolui de maneira aguda, atingindo vários órgãos ou sistemas, podendo ser fatal quando não diagnosticada e tratada a tempo.

A disseminação extrapulmonar pode ocorrer em períodos de remissão e recrudescência, independente do tratamento.

As lesões de disseminação mais freqüentes localizam-se no SNC, pele, ossos, articulações e aparelho genitourinário. Podem ocorrer também lesões de face, onde um mesmo paciente pode apresentar lesões variadas (WANKE *et al*, 2005).

1.4 – DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

1.4.1 – EXAME DIRETO

Como rotina, a microscopia deve ser realizada de todo e qualquer material clínico suspeito (escarro, fluido cérebro espinhal, exudato de pele, abscesso de pus, lavado bronco-alveolar, aspirado de lesão de osso, aspirado de lesão, urina, aspirado de linfonodo, aspirado de medula, etc.). Os preparados são realizados com solução de hidróxido de potássio a 10 % para demonstrar os elementos parasitários típicos ou característicos, as esférulas. Mas o diagnóstico definitivo só é dado com a visualização de esférulas com endósporos. Este é o critério patognomônico para identificação (DEUS FILHO, 2007).

1.4.2 – CULTIVO

Microscopicamente, nos cultivos à temperatura ambiente, *Coccidioides* spp. apresenta-se com hifas hialinas, septadas e ramificadas, de 2 a 4 µm de diâmetro, com produção de artroconídio. Alternando com os artroconídios, são encontrados espaços vazios de citoplasma (RIPPON, 1988). Quando se destacam das hifas, os artroconídios assumem forma em barril, medindo de 2 a 4 µm x 3 a 6 µm. (HUPPERT *et al.*, 1967).

Nesta fase, o fungo possui um alto risco de contaminação, portanto, a cultura deve ser manipulada em Cabines de Segurança Classe II B2, somente se não houver outro meio disponível para identificação do fungo. O Fungo cresce em todos os meios de rotina de micologia e o crescimento se dá em torno de 1 semana (DEUS FILHO, 2007).

1.4.3 – HISTOPATOLOGIA

O fungo pode ser identificado em material de biópsia de qualquer lesão, principalmente de pele, pulmão, osso e cérebro e de material obtido de necropsia (DEUS FILHO, 2008).

Para uma correta identificação, deve-se visualizar as esférulas com ou sem endóporos.

1.4.4 – IMUNOLOGIA

Precipitação em tubo, fixação de complemento e imunodifusão dupla em gel de agar, são as técnicas principais para a detecção de anticorpos. Na precipitação em tubo há a evidenciação de anticorpos do tipo IgM que surgem nas formas agudas primárias, com 75% de reações positivas. A técnica de fixação de complemento detecta anticorpos mais tardios, como a IgG. A imunodifusão dupla (ID) em gel de agarose também detecta IgG e é um dos testes mais utilizados como rotina diagnóstica. Há disponível um kit comercial para ID, cuja sensibilidade varia de 70 a 90% (WANKE *et al.*, 2005).

1.4.5 – INOCULAÇÃO ANIMAL

Por ter um alto custo e ser uma técnica que demora mais de um mês para a obtenção de resultados, essa técnica não é utilizada como rotina, somente em casos especiais (DEUS FILHO, 2008).

Nesta técnica também devem ser visualizadas as esférulas no tecido do animal.

1.4.6 – INTRADERMORREAÇÃO OU TESTE CUTÂNEO

É bastante sensível e específica, utilizada para identificação de indivíduos que tiveram contato prévio com o agente etiológico. Um teste positivo não indica que a doença esteja em curso caso seja encontrado um resultado positivo (DEUS FILHO, 2008).

1.5 – TRATAMENTO

Coccidioides spp. responde bem ao tratamento com derivados azólicos, equinocandinas e anfotericina B (GONZÁLEZ *et al*, 2001). Foi observado também, que a resposta clínica pode diferir bastante da susceptibilidade *in vitro* (GONZÁLEZ *et al*, 2001). A maioria dos pacientes com coccidioomicose que evolui com cura espontânea não necessita de tratamento específico (RIPPON, 1988). Os indivíduos que desenvolvem a doença devem ser acompanhados por um ou dois anos para se evitar doença pulmonar progressiva ou extrapulmonar (EULÁLIO, 2008).

Indivíduos com algum fator de imunossupressão podem apresentar uma evolução mais grave da doença, necessitando de terapia antifúngica (EULÁLIO, 2008).

1.6 – DESENVOLVIMENTO DE VACINAS

Nos Estados Unidos, são registrados, por ano 100.000 novos casos da doença, sendo 45.000 só na Califórnia (DEUS FILHO 2009). Por isso, há a procura incessante por uma vacina que possa ser disponibilizada para a população das áreas endêmicas e para aquelas pessoas que visitam as áreas endêmicas e que manifestam os sintomas nos seus Estados e países de origem (CHATURVEDI *et al*, 2000).

Muito se tem estudado para que se encontrem vacinas para a coccidioomicose. Vários estudos têm sido conduzidos: utilização de células viáveis do fungo, células do fungo não viáveis, antígenos derivados da célula do fungo. Nesta última categoria, tem sido estudado exaustivamente o antígeno 2/PRA (Ag2/PRA) que é extraído da parede celular do micélio filamentoso de *Coccidioides* e que demonstrou hipersensibilidade em camundongos imunizados com *Coccidioides*. Este antígeno está sendo estudado por vários laboratórios, mas até o momento ele só foi capaz de proteger camundongos de coccidioomicose pulmonar. O pensamento corrente é que a vacina para coccidioomicose será um composto multivalente de várias proteínas imunodominantes (COX & MAGEE, 2004).

1.7 - FATORES DE RISCO

Não há diferenças de sexo, raça ou idade na suscetibilidade à infecção primária por espécies de *Coccidioides*. Entretanto, estão definidos fatores de risco para a ocorrência da forma disseminada da doença, como raça negra e filipina, sexo masculino, extremos de idade, gravidez e pós-parto imediato e condições associadas à imunodepressão (AIDS, quimioterapia, uso de corticosteróides, neoplasias e receptores de transplantes de órgãos). Grupo sanguíneo tipo "B" e antígeno de histocompatibilidade HLA9 são outros fatores descritos como de risco para disseminação. Mulheres apresentam eritema nodoso em frequência 5 vezes maior que a observada em homens, mas não há diferença no período pré-adolescência (KWON-CHUNG & BENNETT, 1992; DICAUDO 2006).

Exposição ocupacional ao agente etiológico está definida para indivíduos que trabalham em íntimo contato com o solo. Lavradores, militares, trabalhadores na construção de estradas e de transporte terrestre, arqueólogos, antropólogos, paleontólogos e zoologistas são considerados profissionais com maior risco de exposição (PAPPAGIANIS, 1988). Algumas epidemias já foram relatadas entre arqueólogos, paleontólogos e estudantes trabalhando em escavações de sítios arqueológicos (WERNER *et al.*, 1972; LOOBFUROW *et al.*, 1969; SCHMIDT & HAWARD, 1968). No nordeste semi-árido brasileiro, caçada a tatus se constitui, sem dúvida, um fator de risco para a aquisição de coccidioidomicose; até 2000 quatro microepidemias já haviam sido identificadas resultantes dessa atividade (WANKE *et al.*, 1993; SIDRIM *et al.*, 1997; WANKE *et al.*, 1999; WANKE *et al.*, 2000; EULÁLIO *et al.*, 2000). Apesar de existir risco aumentado associado a ocupações relacionadas ao trato do solo, a grande maioria dos casos de coccidioidomicose é identificada em pessoas que não são expostas ocupacionalmente, em razão da fácil aerossolização dos artroconídios (PAPPAGIANIS, 1998). Estes casos de quadros clínicos com a micose bem definida são então diagnosticados tanto nas áreas endêmicas quanto fora delas.

Conídios de *Coccidioides* spp. são facilmente aerossolizáveis a partir de placas contendo meio de cultura com colônias do fungo e acidentes de laboratório, às vezes fatais, têm sido registrados (SULKIN & PIKE, 1951; KRUSE, 1962; PIKE, 1979).

2. JUSTIFICATIVA

Coccidioides spp. é fungo dimórfico cuja reversão da fase filamentososa saprofítica para a forma parasitária em esférula não é obtida pelos métodos e meios de cultivo convencionais de laboratório, pois o dimorfismo não depende só da temperatura de incubação, mas de muitos outros fatores. Então recorre-se, entre outros, à inoculação de animais de laboratório, à produção de tubos germinativos múltiplos inoculando esférulas em meio à base de água, ao crescimento do fungo em meios com baixa tensão de CO₂, que são métodos caros, de complexa execução, demorados e de risco de infecção acidental para o pessoal do laboratório.

Em análises de solo, várias espécies de fungos do gênero *Malbranchea* podem apresentar-se com micélio indistinguível de *Coccidioides*. spp. formando artroconídios em forma intercalar. Em materiais clínicos o achado de esférulas repletas de endósporos confirma o gênero, mas a identificação dos cultivos obtidos a partir destes espécimes é impossível, pois os isolados apresentam-se como fungos filamentosos produzindo artroconídios não característicos, independente da temperatura de incubação, variando de 25 a 40°C. Por outro lado, mesmo quando cultivados em meio e condições especiais *in vitro*, alguns isolados de *Coccidioides* spp. não convertem à forma parasitária ou expressam formas redondas não características em tecidos e espécimes clínicos, gerando dificuldade de identificação de isolados suspeitos.

Até o momento não se tem conhecimento de diferenças fenotípicas entre as duas espécies. Por conta disso, consideramos ser importante o uso de técnicas moleculares para a diferenciação das espécies.

Por ser um fungo de risco Biológico 3 e as dificuldades de obter-se um correto diagnóstico micológico deste fungo, nos motivou a testar e implantar metodologia molecular que facilite a identificação de isolados suspeitos, ao mesmo tempo que reduza os riscos de acidente em laboratório. Outro ponto importante deste estudo é que estudos sobre a variabilidade molecular possibilitarão melhor entendimento da diversidade deste fungo no Brasil.

Este estudo também é importante porque não existem muitos isolados no Brasil e na América do Sul. A grande parte dos estudos acerca deste fungo se concentra nos Estados Unidos, a maior área endêmica conhecida.

3. ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética do IPEC-Fiocruz sob o nº 0021.0.009.000-10 em 17 de maio de 2010 (ANEXO 1).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivos gerais

1. Testar e implantar no Laboratório de Micologia do IPEC / FIOCRUZ técnica molecular para a identificação de isolados suspeitos de *Coccidioides* spp.

2. Confirmar e analisar a variabilidade, por métodos moleculares, de isolados de *Coccidioides* spp. estocadas em duas Coleções de Cultura.

4.2. Objetivos específicos

1. Confirmar, por meio de marcador molecular específico, o gênero dos isolados;

2. Analisar a variabilidade molecular de isolados brasileiros de *Coccidioides* spp. através da técnica de seqüenciamento.

5. MÉTODOS

Isolados de *Coccidioides* sp. mantidos em duas Coleções de Culturas da Fundação Oswaldo Cruz foram recuperados para realização de autenticação molecular com a amplificação do gene CSA utilizando primers específicos para *C. immitis* e *C. posadasii*. Posteriormente, o mesmo fragmento foi seqüenciado para estudo de variabilidade.

5.1. Isolados de *Coccidioides* spp.

5.1.1 - Isolados utilizados

Conforme descrição na tabela 1, foram utilizados 65 isolados de *Coccidioides* spp. identificados anteriormente pela observação das esférulas em tecidos animais: 58 provenientes do estado do Piauí, Brasil, e estocados a partir da década de 1990 na Coleção de Cultura do Laboratório de Micologia (LM) do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC), Fiocruz; e sete isolados estocados desde a década de 1950 na Coleção de Cultura do Departamento de Micologia do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, dos quais seis provenientes dos Estados Unidos e um da Argentina (BEZERRA *et al*, 2006). Dos 58 isolados do LM-IPEC, 47 eram de origem clínica, 8 de origem ambiental (amostras de solo) e três de animais (tatus *Dasypus novemcinctus*).

Como controles, foram utilizados sete isolados de fungos filogeneticamente próximos a *Coccidioides* spp: (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Tricophyton mentagrophytes* e *Tricophyton rubrum*; e cinco isolados de agentes de micoses sistêmicas (*Blastomyces dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Sporothrix schenckii*).

Tabela 1 – Isolados de *Coccidioides* spp. estudados na autenticação molecular

| Amostra | Identificação | Origem | Local da amostra |
|----------------|----------------------|----------------|-------------------------|
| 1 | 3B1 | Ambiental | Piauí, Brasil |
| 2 | 6776 | Clínica | Piauí, Brasil |
| 3 | Amostra 3 | Ambiental | Piauí, Brasil |
| 4 | Amostra 4 | Ambiental | Piauí, Brasil |
| 5 | BP | Ambiental | Piauí, Brasil |
| 6 | LE-1 | Ambiental | Piauí, Brasil |
| 7 | LE-2 | Ambiental | Piauí, Brasil |
| 8 | Salvador | Clínica | Piauí, Brasil |
| 9 | IAC | Clínica | Piauí, Brasil |
| 10 | MJS | Clínica | Piauí, Brasil |
| 11 | Caridade 19 | Ambiental | Piauí, Brasil |
| 12 | FKLM | Clínica | Piauí, Brasil |
| 13 | HLM | Clínica | Piauí, Brasil |
| 14 | AJC | Clínica | Piauí, Brasil |
| 15 | ESM | Clínica | Piauí, Brasil |
| 16 | 2761 | Sem informação | Estados Unidos |
| 17 | IG | Clínica | Piauí, Brasil |
| 18 | RPM | Clínica | Piauí, Brasil |
| 19 | AFS | Clínica | Piauí, Brasil |
| 20 | AAS | Clínica | Piauí, Brasil |
| 21 | ES | Clínica | Piauí, Brasil |
| 22 | RGD | Clínica | Piauí, Brasil |
| 23 | FD | Clínica | Piauí, Brasil |
| 24 | FLAD | Clínica | Piauí, Brasil |
| 25 | RFM | Clínica | Piauí, Brasil |
| 26 | 1294 | Sem informação | Estados Unidos |
| 27 | 2171 | Sem informação | Argentina |
| 28 | 2762 | Sem informação | Estados Unidos |
| 29 | 2763 | Sem informação | Estados Unidos |
| 30 | 2764 | Sem informação | Estados Unidos |
| 31 | 2765 | Sem informação | Estados Unidos |
| 32 | Tatu 1 | Animal | Piauí, Brasil |
| 33 | Tatu 2 | Animal | Piauí, Brasil |
| 34 | Tatu 3 | Animal | Piauí, Brasil |
| 35 | JES | Clínica | Piauí, Brasil |
| 36 | MBS | Clínica | Piauí, Brasil |
| 37 | FFR | Clínica | Piauí, Brasil |
| 38 | JCC | Clínica | Piauí, Brasil |
| 39 | GPO | Clínica | Piauí, Brasil |
| 40 | AMC | Clínica | Piauí, Brasil |
| 41 | CGM | Clínica | Piauí, Brasil |
| 42 | VRM | Clínica | Piauí, Brasil |
| 43 | RDL | Clínica | Piauí, Brasil |
| 44 | ARS | Clínica | Piauí, Brasil |

| Amostra | Identificação | Origem | Local da amostra |
|----------------|----------------------|---------------|-------------------------|
| 45 | ADSS | Clínica | Piauí, Brasil |
| 46 | RHFM | Clínica | Piauí, Brasil |
| 47 | RGB | Clínica | Piauí, Brasil |
| 48 | MOC | Clínica | Piauí, Brasil |
| 49 | BCC | Clínica | Piauí, Brasil |
| 50 | LRC | Clínica | Piauí, Brasil |
| 51 | JMS | Clínica | Piauí, Brasil |
| 52 | LPA | Clínica | Piauí, Brasil |
| 53 | DSB | Clínica | Piauí, Brasil |
| 54 | CAC | Clínica | Piauí, Brasil |
| 55 | AR | Clínica | Piauí, Brasil |
| 56 | RNR | Clínica | Piauí, Brasil |
| 57 | DBC | Clínica | Piauí, Brasil |
| 58 | ASL | Clínica | Piauí, Brasil |
| 59 | JNS | Clínica | Piauí, Brasil |
| 60 | FCM | Clínica | Piauí, Brasil |
| 61 | AGS | Clínica | Piauí, Brasil |
| 62 | RRS | Clínica | Piauí, Brasil |
| 63 | RVC | Clínica | Piauí, Brasil |
| 64 | GSN | Clínica | Piauí, Brasil |
| 65 | Caridade 18 | Ambiental | Piauí, Brasil |

5.2. Autenticação molecular do gênero dos isolados (*Coccidioides*)

5.2.1. Crescimento e liofilização

Os isolados fúngicos foram cultivados para obtenção de massa fúngica, em meio líquido, (ANEXO 2), (COLE *et al.*, 1989) em agitador (modelo SM-30, Edmund Bühler, Alemanha) a 120 rpm a 30°C por nove dias. Em seguida, o cultivo foi submetido a vapor fluente para inativação do fungo e maior segurança na manipulação. A massa micelial foi separada do sobrenadante por filtração a vácuo e liofilizada, e 10 mg da colônia fúngica foi macerada com nitrogênio líquido e seguida da extração de ADN.

A mesma metodologia foi utilizada para o crescimento dos fungos filogeneticamente próximos e agentes de micoses sistêmicas usadas neste estudo.

5.2.2. Extração de ADN

- 10 mg da colônia fúngica foram misturados a 400 µl de tampão de lise composto de:
- 50 mM Tris (SIGMA-ALDRICH Inc., Saint Louis, USA);
- 100 mM NaCl (SIGMA-ALDRICH Inc., Saint Louis, USA);
- 5 mM EDTA (SIGMA-ALDRICH Inc., Saint Louis, USA);
- 1% SDS (SIGMA-ALDRICH Inc., Saint Louis, USA).

Incubou-se a 80°C por 10 min. Dez microlitros contendo 10 mg/ml de Proteinase K (GIBCOBRL®, Gaithersburg, Maryland, USA) foram adicionados, seguido de resfriamento a 40°C e incubação por 2-3 horas. Incubou-se novamente a 80°C por 10 min. Foram então adicionados 400 µl de fenol-clorofórmio 25:24:1 (SIGMA-ALDRICH Inc., Saint Louis, USA); e agitado no vórtex. O material foi centrifugado a 10.000g por 15 min. à temperatura ambiente. Foram removidos 350 µl da fase aquosa contendo o ADN para outro tubo. Adicionou-se 10 µl de acetato de sódio 3M (SIGMA-ALDRICH Inc., Saint Louis, USA); na fase aquosa, seguido de 0,54 volumes de isopropanol (SIGMA-ALDRICH Inc., Saint Louis, USA). Centrifugou-se a 10.000 g por 15 min. - temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com etanol 70% (SIGMA-ALDRICH Inc., Saint Louis, USA). Os tubos foram invertidos por 1 min., secos com papel-toalha e colocados a 50° por 15 min. ou até secarem. O pellet foi suspenso em 100µl de água destilada e 5µl desta suspensão foi submetida a gel de agarose a 1,3% em tampão TBE para se confirmar a qualidade do DNA (BURT *et al.*, 1995). O gel foi corado com brometo de etídeo e fotografado sob luz UV.

A mesma metodologia foi utilizada para o crescimento dos fungos filogeneticamente próximos e agentes de micoses sistêmicas usadas neste estudo.

5.2.3. Identificação molecular com *primer* específico do gene CSA (PAN & COLE, 1995)

A amplificação do gene *CSA* foi realizada com 25 ng de ADN genômico total extraído, suspenso em uma mistura de 5µl de tampão de PCR (Invitrogen Ltda., São Paulo, São Paulo, Brasil), 5µl de dNTP, 3µl de Cloreto de magnésio a 50mM (Invitrogen Ltda., São Paulo, São Paulo, Brasil), 33µl de água MilliQ, 2,5 U da enzima Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen Ltda., São Paulo, São Paulo, Brasil), 5 pmol de cada primer: Ci 1 – 5' AAG TTC TCA CTC CTC AGC GCT ATC G 3' e Ci 2 – 5' ACA TTA AGG TTC CTC CCC TTC AAC C 3' (Invitrogen Ltda., São Paulo, São Paulo, Brasil), que amplificam uma sequência alvo de 519pb.

Foi utilizado também um controle negativo da reação que continha todos os reagentes descritos acima, menos o ADN.

A programação da amplificação foi a seguinte:

- 1 ciclo de 94°C por 4 min;
- 30 ciclos de:
 - 94°C – 1 min.;

- 58°C – 1 min.;
- 74°C – 1 min.;
- 74° C – 10 min.

As reações de PCR foram realizadas no Termociclador Modelo iCycler, marca Biorad (Hercules, Califórnia, Estados Unidos)

O produto da amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,3% em tampão TBE, corado com brometo de etídeo e fotografado sob luz ultravioleta com máquina digital Sony Cyber Shot DSC 1050.

A mesma metodologia foi utilizada para a identificação dos fungos filogeneticamente próximos e agentes de micoses sistêmicas usadas neste estudo.

5.3. Seqüenciamento dos isolados

Dos 65 isolados incluídos no estudo, foram seqüenciados 57. Destes, 52 eram provenientes do estado do Piauí, Brasil e foram estocados a partir da década de 1990 na Coleção de Cultura do Laboratório de Micologia (LM) do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC), Fiocruz, 4 isolados provenientes dos Estados Unidos e 1 isolado da Argentina, estocados desde a década de 1950 na Coleção de Cultura do Departamento de Micologia do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ (BEZERRA *et al*, 2006). Dos 52 isolados do LM-IPEC, 43 eram de origem clínica, 7 de origem ambiental e 2 de origem animal. Oito isolados não foram analisados porque não se obteve um bom ADN e durante a purificação, eles foram perdidos. Estes dados estão na tabela 2.

Após a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) com o primer específico (gene *CSA*), o amplificado foi purificado utilizando o kit de purificação NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Düren, Düren, Alemanha) conforme instruções do fabricante e posteriormente seqüenciado. O seqüenciamento foi realizado na Plataforma de Seqüenciamento de ADN PDTIS/FIOCRUZ, no Seqüenciador Automático de ADN modelo ABI Prism 3730 da Applied Biosystems (Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos).

Tabela 2 – Isolados de *Coccidioides* spp. sequenciados

| Amostra | Identificação | Origem | Local da amostra |
|----------------|----------------------|----------------|-------------------------|
| 1 | 3B1 | Ambiental | Piauí, Brasil |
| 2 | 6776 | Clínica | Piauí, Brasil |
| 3 | Amostra 3 | Ambiental | Piauí, Brasil |
| 5 | BP | Ambiental | Piauí, Brasil |
| 6 | LE-1 | Ambiental | Piauí, Brasil |
| 7 | LE-2 | Ambiental | Piauí, Brasil |
| 8 | Salvador | Clínica | Piauí, Brasil |
| 9 | IAC | Clínica | Piauí, Brasil |
| 10 | MJS | Clínica | Piauí, Brasil |
| 11 | Caridade 19 | Ambiental | Piauí, Brasil |
| 12 | FKLM | Clínica | Piauí, Brasil |
| 13 | HLM | Clínica | Piauí, Brasil |
| 14 | AJC | Clínica | Piauí, Brasil |
| 15 | ESM | Clínica | Piauí, Brasil |
| 16 | 2761 | Sem informação | Estados Unidos |
| 17 | IG | Clínica | Piauí, Brasil |
| 18 | RPM | Clínica | Piauí, Brasil |
| 20 | AAS | Clínica | Piauí, Brasil |
| 21 | ES | Clínica | Piauí, Brasil |
| 22 | RGD | Clínica | Piauí, Brasil |
| 23 | FD | Clínica | Piauí, Brasil |
| 24 | FLAD | Clínica | Piauí, Brasil |
| 26 | 1294 | Sem informação | Estados Unidos |
| 27 | 2171 | Sem informação | Argentina |
| 29 | 2763 | Sem informação | Estados Unidos |
| 30 | 2764 | Sem informação | Estados Unidos |
| 32 | Tatu 1 e T1 | Animal | Piauí, Brasil |
| 34 | Tatu 3 e T3 | Animal | Piauí, Brasil |
| 35 | JES | Clínica | Piauí, Brasil |
| 36 | MBS | Clínica | Piauí, Brasil |
| 37 | FFR | Clínica | Piauí, Brasil |
| 38 | JCC | Clínica | Piauí, Brasil |
| 39 | GPO | Clínica | Piauí, Brasil |
| 40 | AMC | Clínica | Piauí, Brasil |
| 41 | CGM | Clínica | Piauí, Brasil |
| 42 | VRM | Clínica | Piauí, Brasil |
| 43 | RDL | Clínica | Piauí, Brasil |
| 44 | ARS | Clínica | Piauí, Brasil |
| 46 | RHFM | Clínica | Piauí, Brasil |
| 47 | RGB | Clínica | Piauí, Brasil |
| 48 | MOC | Clínica | Piauí, Brasil |
| 49 | BCC | Clínica | Piauí, Brasil |
| 50 | LRC | Clínica | Piauí, Brasil |
| 51 | JMS | Clínica | Piauí, Brasil |

| Amostra | Identificação | Origem | Local da amostra |
|----------------|----------------------|---------------|-------------------------|
| 52 | LPA | Clínica | Piauí, Brasil |
| 53 | DSB | Clínica | Piauí, Brasil |
| 54 | CAC | Clínica | Piauí, Brasil |
| 55 | AR | Clínica | Piauí, Brasil |
| 56 | RNR | Clínica | Piauí, Brasil |
| 57 | DBC | Clínica | Piauí, Brasil |
| 58 | ASL | Clínica | Piauí, Brasil |
| 59 | JNS | Clínica | Piauí, Brasil |
| 60 | FCM | Clínica | Piauí, Brasil |
| 61 | AGS | Clínica | Piauí, Brasil |
| 63 | RVC | Clínica | Piauí, Brasil |
| 64 | GSN | Clínica | Piauí, Brasil |
| 65 | Caridade 18 | Ambiental | Piauí, Brasil |

5.4. Análise da variabilidade genética

As sequências foram editadas com o software Sequencer versão 4.10. O alinhamento e posterior análise da variabilidade foi realizada com o software Mega 4 versão 4028 e BioEdit versão 7.0.8.0. Foi feita uma busca de sequências do gene *CSA* de *Coccidioides* spp. na página do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e as duas sequências encontradas (uma de *C. immitis* e uma de *C. posadasii*) foram incluídas no alinhamento para comparação.

A reconstrução filogenética da sequência parcial do gene *CSA* foi realizada utilizando o método estatístico Neighbor-Joining com o software Mega 4 versão 4028.

6. RESULTADOS

6.1 - Autenticação molecular do gênero dos isolados (*Coccidioides*)

Dos 65 isolados avaliados, todos apresentaram a banda de 519 pb, confirmando o gênero dos isolados (figura 9).



Figura 9 – Amplificação de ADN de *Coccidioides* spp., em gel de agarose a 1,3% corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta, demonstrando o produto de 519 pb de alguns isolados estudados

Os 12 isolados utilizados como controle (fungos filogeneticamente próximos e agentes de micose sistêmicas) não demonstraram a banda de 519 pb (figura 10).

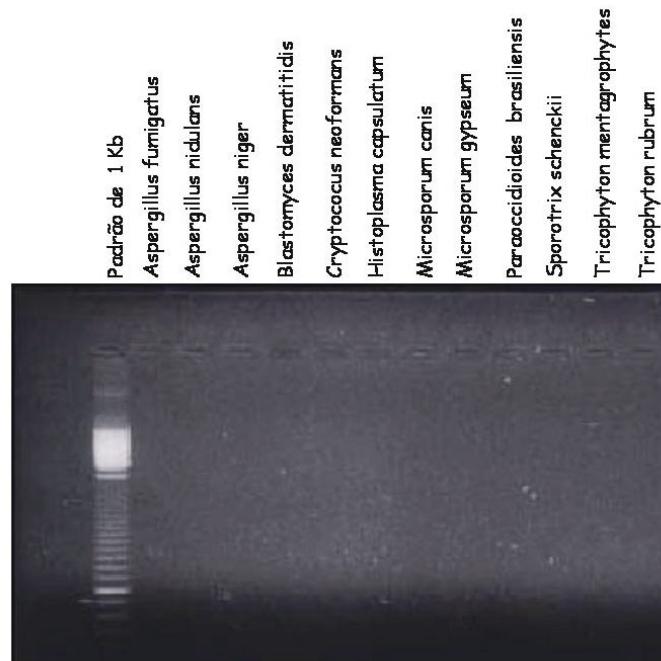


Figura 10 – Gel de agarose a 1,3% corado com brometo de etídeo e visualizado sob luz ultravioleta, com o resultado da amplificação do ADN dos isolados controle utilizados no estudo

6.2 - Análise da variabilidade genética

Dos 57 isolados estudados, 56 demonstraram ter 100% de similaridade com a sequência padrão de *C. posadasii*, conforme pode ser visualizado na figura 11.

Somente um isolado, proveniente dos Estados Unidos (2761) demonstrou ter a mesma sequência do isolados padrão de *C. immitis*.

O gene em estudo demonstrou grande homogeneidade genética entre os diferentes isolados estudados, sendo as sequências idênticas dentro da mesma espécie.

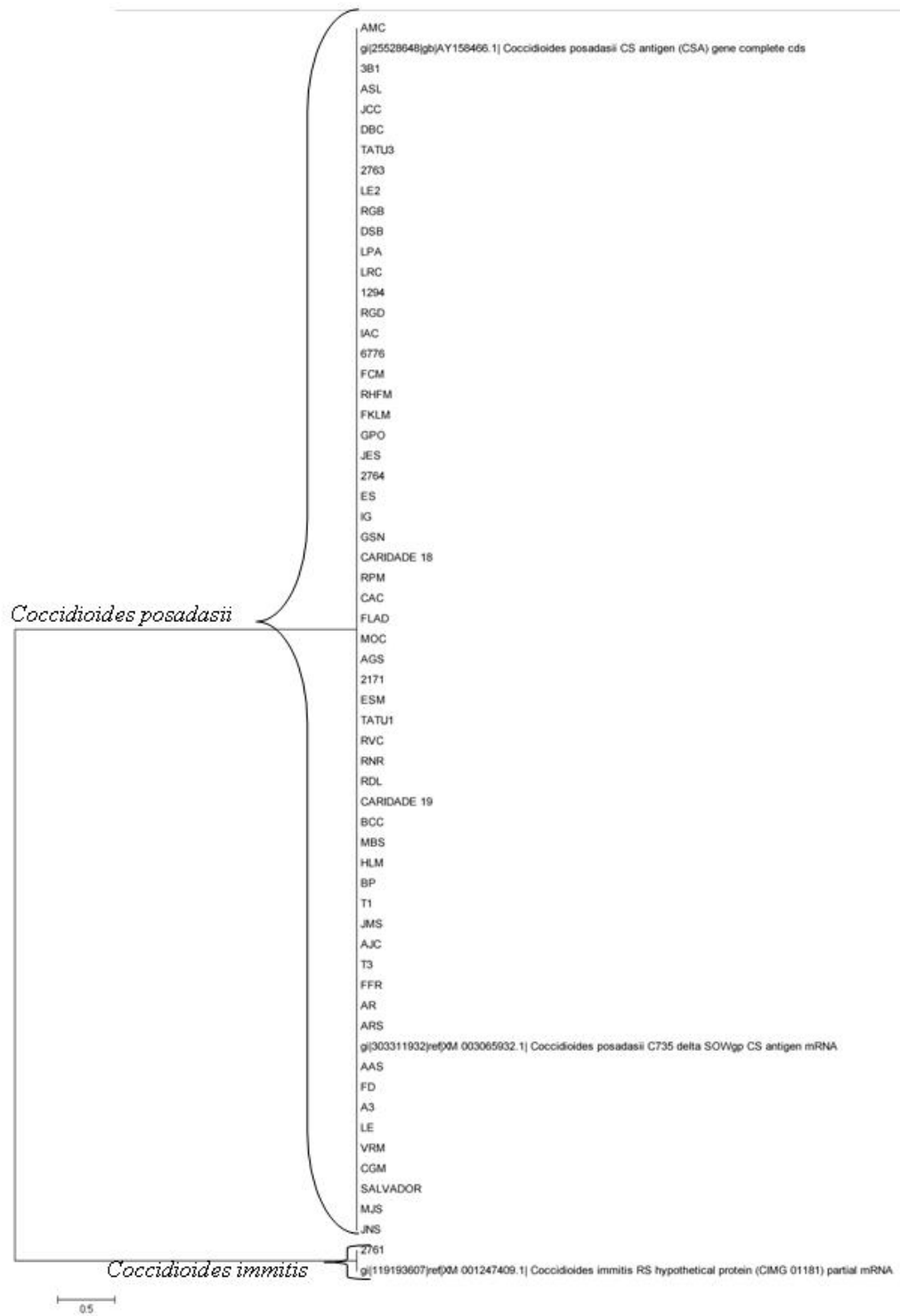


Figura 11 – Árvore filogenética obtida através do método Neighbor-Joining.

7. DISCUSSÃO

7.1 - Autenticação molecular do gênero *Coccidioides* spp.

Identificação molecular de *Coccidioides* spp. se torna importante por ser um fungo de risco Biológico 3, reduzindo os riscos de acidente em laboratório, além de superar as dificuldades muitas vezes encontradas na obtenção de um correto diagnóstico micológico. CORDEIRO *et al* (2006) e De Macedo (2011) desenvolveram técnica para a identificação molecular de *Coccidioides* sp. de amostras clínicas e de solo, respectivamente, utilizando nested-PCR, que é uma técnica sensível porém com alto risco de contaminação na manipulação. No presente trabalho foi utilizada técnica mais simples e segura com relação à contaminação. A técnica de PCR para a detecção do ADN de *Coccidioides* spp. usando um par de *primers* derivado da sequência do gene *CSA*, foi descrita por Pan & Cole em 1995. No referido trabalho, os autores demonstraram uma banda específica de 519 pb em 12 isolados clínicos com 100% de positividade. No presente trabalho, utilizamos 47 isolados de origem clínica, 8 de origem ambiental, 3 de animais e 7 isolados do Departamento de Micologia do Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz, com 100% de positividade, corroborando com o referido trabalho.

A técnica também foi 100% sensível, pois dos 12 isolados “não *Coccidioides*” (agentes de micoses sistêmicas e fungos filogeneticamente próximos) nenhum deles apresentou a banda específica do gene *CSA*.

7.2 - Análise da variabilidade genética

No ano de 2002, foi descrito por FISHER *et al*, uma nova espécie de *Coccidioides*, denominada *C. posadasii*. Esta nova espécie, segundo os autores, compreende os isolados de fora da Califórnia, incluindo todos os isolados da América do Sul e do Brasil. Podemos ponderar que esta conclusão está baseada em um número muito pequeno de isolados de fora da Califórnia, que dificilmente comprovaria esta distribuição geográfica de *C. immitis*. Os estudos sobre biologia e epidemiologia de *Coccidioides* spp. são limitados em parte porque o fungo é considerado como potencial agente de bioterrorismo, impedindo que se tenham maiores avanços na pesquisa deste fungo (COX & MAGEE, 2004). No presente trabalho, não foi possível comparar isolados brasileiros com aqueles utilizados em trabalhos

como o de FISHER *et al*, (2002), onde ele descreve a nova espécie. A sequência utilizada como padrão para *C. immitis* na construção da árvore foi obtida no Gene Bank, onde existem poucos dados de sequenciamento do gene *CSA*, limitando a análise comparativa das sequências. Outro fator que contribui para a limitação de estudos moleculares é o fato de que, nos Estados Unidos, *Coccidioides* spp. está na “Lista Final de Agentes Seleccionados” do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos, que restringe o uso, transporte, importação e exportação do fungo (CDC, 2009). Dos isolados analisados neste estudo, todos, demonstraram 100% de identidade com a sequência padrão de *C. posadasii*, apenas um, proveniente dos Estados Unidos, demonstrou 100% de identidade na sequência do gene *CSA* com a sequência padrão de *C. immitis* utilizada, enquanto que todos os isolados brasileiros e 4 isolados dos Estados Unidos apresentaram sequências similares ou idênticas a *C. posadasii* e diferentes de *C. immitis*. Em um dos poucos trabalhos de variabilidade genética de *Coccidioides* spp., Sano *et al* (2006), estudando os genes *DO*, *SP* e *URE*, observou grande homologia (99%) intraespecífica. Tais resultados corroboram os resultados observados no presente trabalho com o gene *csa*, o que pode indicar baixa taxa de recombinação dentro da mesma espécie. Os achados deste estudo reafirmaram a estabilidade deste gene, pois o isolado dos Estados Unidos foi idêntico à sequência de *C. immitis* do “genebank”. Além disso, não foi detectada variação intraespecífica nos isolados similares à *C. posadasii*. Com relação ao *C. immitis* são necessários estudos com maior número de isolados.

8. CONCLUSÕES

- A técnica de PCR proposta por Pan & Cole (1995) utilizando o gene CSA para a identificação molecular de 65 isolados de *Coccidioides* spp. de Coleções de Cultura mostrou ser 100 % sensível e 100% específica e demonstrou amplificação de um produto de 519 pb em todos os 65 isolados estudados.
- Esta técnica mostrou-se reprodutível e sensível quando utilizada com ADN genômico de *Coccidioides* spp., sugerindo que seja utilizada na rotina laboratorial para identificação de cultivos suspeitos.
- Esta técnica elimina a necessidade da inoculação em animais e reduz os custos e o tempo necessário para identificação, além de aumentar a segurança do manipulador.
- O sequenciamento do gene CSA sugere que os isolados de *C. posadasii*, do presente estudo, fazem parte de uma população predominantemente clonal por possuírem uma alta similaridade entre eles. Este resultado reforça a idéia de que o gene CSA é conservado.
- Para um melhor estudo populacional de *C. posadasii* no Brasil, outros genes devem ser incluídos.
- O isolado 2761, procedente dos Estados Unidos se alinhou com o padrão *C. immitis*, sendo necessários estudos posteriores com maior número de isolados desta espécie para verificar se este alinhamento ocorreu ao acaso ou se há alguma correlação com a espécie.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ajello L. Coccidioidomycosis and histoplasmosis: a review of its epidemiology and geographical distribution. *Mycopathol.* 1971; 45: 221-230.

Ampel NM, Mosley DG, England B, Vertz PD, Komatsu K, Hajjeh RA. Coccidioidomycosis in Arizona: increase in incidence from 1990 to 1995. *Clin Infect Dis* 1998; 27:1528-1530.

Bezerra CCF, de Lima RF, Lazera MS, Wanke B, Borba CM. Viability and molecular authentication of *Coccidioides immitis* strains from Culture Collection of the Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2006; 39(3):241-244.

Bialek R, Kern J, Hermann T, Tijerina R, Ceceñas L, Reischl U, González GM. PCR assays for identification of *Coccidioides posadasii* based on the nucleotide sequence of the antigen 2/praline-rich antigen. *J. Clin Microbiol.* 2004; 42:778-783.

Borelli D. Prevalence of systemic mycoses in Latin America. *Proceedings of the International Symposium on the Mycoses Washington D.C., PAHO* 1970; 205: 28-38.

Borghi AL, Rossi de Bennetti M, Corallini de Bracalenti BJ. *Coccidioides immitis*: su aislamiento de muestras de suelo de las provincias de San Luis y Mendoza. *Sabouraudia* 1977; 15: 51-7

Burt A, Carter DA, Koenig GL, White TJ, Taylor JW. A safe method to extract DNA from *Coccidioides immitis*. *Fungal Genet. Newsl* 1995; 42: 23.

Burt A, Carter DA, Koenig GL, White TJ, Taylor JW. Molecular markers reveal cryptic sex in the human pathogen *Coccidioides immitis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93(2): 770-773.

Burt A, Dechairo BM, Koenig GL, Carter DA, White TJ, Taylor JW. Molecular markers reveal differentiation among isolates of *Coccidioides immitis* from California, Arizona and Texas. *Mol. Ecol.* 1997; 6(8):781-6.

Cairns L, Blythe D, Kao A, Pappagianis D, Kaufman L, Kobayashi J, et al. Outbreak of coccidioidomycosis in Washington state residents returning from Mexico. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 61-4

Caldwell JW, Arsurá EL, Kilgore WB, García AL, Reddy V, Johnson RH. Coccidioidomycosis in pregnancy during an epidemic in California. *Obstet Gynecol* 2000; 95: 236-9.

Campins H. Coccidioidomycosis in Venezuela. In: Ajello L, editor. The second symposium on coccidioidomycosis. Tucson, The University of Arizona Press, 1967, p. 279-85.

Campins H. Coccidioidomycosis in South America: a review of its epidemiology and geographic distribution. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 1970; 40:25-34.

CDC. Coccidioidomycosis following the Northridge earthquake California. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 1994. 43:194-195.

CDC. Coccidioidomycosis in workers at an archeologic site. Dinosaur National Monument, Utah. *MMWR* 2001; 50: 1005-8.

CDC. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories - 5th Edition. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Centers for Disease Control and Prevention. National Institutes of Health. Publication No. 21-1112. Revised December 2009.

Charlton V, Ramsdell K, Schering S. Intrauterine transmission of coccidioidomycosis. *Pediatric Infect Dis J* 1999; 18: 561-3.

Chaturvedi V, Ramani R, Gromadzki S, Rodeghier B, Chang H, Morse DL. Coccidioidomycosis in New York State. *Emerging Infectious Diseases* 2000; 6(1):25-29.

Chiller TM, Galgiani JN, Stevens DA. Coccidioidomycosis. *Infect Dis Clin North Am* 2003; 17: 41-57.

Cole GT, Zhu S, Pan S, Yuan L, Kruse D, Sun SH. Isolation of an antigens with proteolytic activity from *Coccidioides immitis*. *Infect Immun*. 1989; 57:1624-1634.

Colombo AL, Tobón A, Restrepo A, Queiroz-Telles F, Nucci M. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. *Med Mycol*. 2011; 49: 785–798.

Converse JL, Reed RE. Experimental epidemiology of coccidioidomycosis. *Bac. Rev.* 1956; 30:784-792.

Cordeiro RA, Brilhante RS, Rocha MF, Fechine MA, Camara LM, Camargo ZP, Sidrim JJ. Phenotypic characterization and ecological features of *Coccidioides* spp. From northwest Brazil. *Med Mycol*. 2006; 44(7):631-9.

Cox RA, Magee DM. Coccidioidomycosis: Host Response and Vaccine Development. *Clin Microb Rev*, 2004; 17(4): 804–839.

De Macêdo RCL. Isolamento e identificação de *Coccidioides immitis* de amostras de solo relacionadas a surtos de coccidioidomicose. 111f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz). Rio de Janeiro, (RJ) 2006.

De Macêdo RC, Rosado AS, da Mota FF, Cavalcante MA, Eulálio KD, Filho AD, Martins LM, Lazéra MS, Wanke B. Molecular identification of *Coccidioides* spp. in soil samples from Brazil. *BMC Microbiol*. 2011 May 16;11:108.

Derensinski S, Hector R. The history of coccidioidomycosis. I. The early history of the disease in North America. II. Biographies of four coccidioidomycologists. En: Einstein H, Catanzaro A, editors. *Coccidioidomycosis*. Proceedings of the 5th International

Conference on Coccidioidomycosis. Centennial Conference. National Foundation for Infectious Diseases. Washington D.C., 1966, p. 48-74.

Desai SA, Minai OA, Gordon SM, O'Neil B, Wiedemann HP, Arroliga AC. Coccidioidomycosis in non-endemic areas: a case series. *Respir Med* 2001; 95: 305-9.

Deus Filho, A. Manifestações respiratórias das micoses. Estudo em população com pneumopatia no estado do Piauí. 126f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical). Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz). Rio de Janeiro (RJ) 2007.

Deus Filho A. Coccidioidomycosis. *J Bras Pneumol.* 2009; 35(9):920-930.

Dicaudo DJ. Coccidioidomycosis: a review and update. *J Am Acad Dermatol.* 2006; 55(6):929-942

Diógenes MJN, Jamacuru WF, Silva MAB, Carvalho FF. Inquérito epidemiológico com esferulina em Jaguaribara, Ceará, Brasil, 1993. *Ann. Bras. Dermatol.* 1995; 70:525-529.

Durry E, Pappagianis D, Werner B, Hutwagner L, Sun RK, Maurer M, McNeil MM, Pinner RW. Coccidioidomycosis in Tulare County, California, 1991: reemergence of an endemic disease. *J Med Vet Mycol* 1997; 35: 321-6.

Egeberg R, Elconun AE, Egeberg MC. Effect of salinity and temperature of *Coccidioides immitis* and three antagonistic soil saprophytes. *J Bacteriol.* 1964; 88:473-476.

Egeberg R, Ely AF. *Coccidioides immitis* in the soil of the Southern San Joaquin Valley. *Am. J. Med. Sci.* 1956; 231:151-154.

Elconin AF, Egeberg RO, Egeberg MC. Significance of soil salinity on the ecology of *Coccidioides immitis*. *J Bacteriol.* 1964; 87(3):500-503.

Elías Costa MRI. Obtención de un nuevo antígeno Del *Coccidioides immitis* y su desarrollo en un modelo experimental de enfermedad en ratas Wistar. Tesis de Doctorado. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad de Buenos Aires, 1998.

Eulálio KD, de Macedo RCL, Cavalcanti MAS, Martins LMS, Lazéra MS, Wanke B. *Coccidioides immitis* isolated from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in the state of Piauí, northeast Brasil. *Mycopathology*. 2000; 149:57-61.

Eulálio, KD. Eco-epidemiologia e manifestações clínicas da coccidioidomicose nos Estados do Piauí e Maranhão. 250f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical). Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz). Rio de Janeiro, (RJ) 2008.

Fauquier D, Gulland FM, Trupkiewicz JG, Spraker TR, Lowenstein LJ. Coccidioidomycosis in free-living Californian sea lions (*Zalophus californians*) in Central California. *J Wildl Dis* 1996; 32: 707-10.

Finquelievich JL, Negroni R, Arechavala A. Treatment with itraconazole of experimental coccidioidomycosis in the Wistar rats. *Mycoses* 1988; 31: 80-6.

Fisher MC, Koenig GL, White TJ, Taylor JW. Molecular and phenotypic description of *Coccidioides posadasii* sp. nov., previously recognized as the non-California population of *Coccidioides spp.* *Mycologia*. 2002; 94(1) 73–84.

Flynn NM, Hoepflich PD, Kawachi MM, Lee KK, Lawrence RM, Goldstein E, et al. An unusual outbreak of windborne coccidioidomycosis. *N Engl J Med*. 1979; 301(7):358-61.

Galgiani JN. Coccidioidomycosis. *West J. Med*. 1993; 159:153-171.

Galgiani JN, Ampel NM, Blair JE, Catanzaro A, Johnson RH, Stevens DA. Coccidioidomycosis. *Clin Infect Dis*. 2005;41:1217–23.

Gimeno SR. Puesta a punto de la técnica de ELISA em coccidioidomicosis. *Rev Argent Micol* 1986; 9: 25-7.,

Glusker D, Fuentes Villalobos P, Gomez del Campo C. Occurrence of intradermal reaction to coccidioidin, brucellin, histoplasmin, haplosporangin and tuberculin in relation to chest X-rays in Mexican draftees. *Bol Oficina Sanit Panam*. 1950; 29(7):715-22.

Gomes OM, Serrano RP, Pradel HO, Barros Moraes NL, Varella AL, Fiorelli AI, et al. Coccidioidomycose pulmonar. Primeiro caso nacional. Rev. Assoc. Med. Bras. 1978; 24:167-168.

Gómez RF. Investigaciones sobre la epidemia de coccidioidomycosis en la zona central del Chaco paraguayo. An Fac Med Montev 1950; 35: 639-52.

González Ochoa A. Coccidioidomycosis in México. En: Ajello L editor. Coccidioidomycosis. Proceedings of the 2nd Coccidioidomycosis Symposium. Phoenix, Arizona, 1967, p. 293-6.

González Ochoa A, & Velasco-Castrejón O. Inoculación primaria cutánea accidental de coccidioidomycosis, a partir de un caso clínico. Rev Invest Salud Pública (México) 1976; 36: 227-33.

González GM, Tijerina R, Najvar LK, Bocanegra R, Luther M, Rinaldi MG, et al. Correlation between Antifungal Susceptibilities of *Coccidioides immitis* in vitro and antifungal treatment with Caspofungin in a mouse model. Antimicrob. Agents Chemother. 2001; 45:1854–1859.

Greene DR, Koenig G, Fisher MC, Taylor JW. Soil isolation and molecular identification of *Coccidioides immitis*. Mycologia. 2000; 92(3):406-410.

Harrison WR, Merbs CF, Leathers CR. Evidence of coccidioidomycosis in the skeleton of an ancient Arizona Indian. J. Infect. Dis. 1991; 164:436-437.

Huppert M, Sun SH, Bailey JW. Natural variability in *Coccidioides immitis*. In: Ajello L. Coccidioidomycosis. Tucson: University of Arizona Press. 1967.

Huppert M, Sun SH & Harrison JL. Morphogenesis throughout saprobic and parasitic cycles of *Coccidioides immitis*. Mycopathologia. 1982; 78:107-122.

Johnson JRH, Caldwell JW, Welch T, Einstein H. The great coccidioidomycosis epidemic: clinical features. En: Einstein H, Catanzaro A, editors. Coccidioidomycosis.

Proceedings of the 5th International Conference on Coccidioidomycosis. National Foundation for Infectious Diseases. Washington, D.C. 1996, p. 77-87.

Johnson SM, Simmons KA, Pappagianis D. Amplification of coccidioidal DNA in clinical specimens by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42:1982–1985

Kaplan W. Epidemiology of the principal systemic mycoses of man and lower animals and the ecology of the agents. *J. Am. Med. Assoc.* 1973; 163:1043-1047.

Kirkland TN & Fierer J. Coccidioidomycosis: a reemerging infectious disease. *Emerg. Inf. Dis.* 1996; 2:1-13.

Koufopanou V, Burt A., Taylor JW. Concordance of gene genealogies reveals reproductive isolation in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997; 94(10):5478-5482.

Kruse RH, Potencial aerogenic laboratory hazards of *Coccidioides immitis*. *Am. J. Clin. Pathol.* 1962; 37:150-158.

Kwon-Chung KJ & Bennett JE. Coccidioidomycosis. In: *Medical Mycology*. Philadelphia: Lea & Febiger; 1992

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC. Coccidioidomicose. In: Lacaz CS & Porto E. *Micologia Médica: Fungos, actinomicetos e algas de interesse médico*. 8ª ed. São Paulo: Sarvier Editora; 1991.

Lacy GH & Swatek FE. Soil ecology of *Coccidioides immitis* at amerindian middens in California. *Appl. Microbiol.* 1974; 27:379-388.

León L. La coccidioidomicosis. Nueva y grave enfermedad para la República de Ecuador. Editorial Universitaria. Quito, 1961.

Levine HB, Cobb JM, Smith CE. Immunogenicity of spherule-endospore vaccine of *Coccidioides immitis* for mice. *J Immunol* 1961; 87: 218-27.

Levine HB, González-Ochoa A, Ten Eyck DR. Thermal sensitivity to *Coccidioides immitis* a comparison of response elicited in man by spherulin and coccidioidin. *Am Rev Respir Dis* 1973; 107: 379-86.

Lopes BGB, Santos ALS, Bezerra CCF, Wanke B, Lazéra MS, Nishikawa MM, et al. A 25-kDa Serine Peptidase with Keratinolytic Activity Secreted by *Coccidioides immitis*. *Mycopathologia* 2008; 166(1):35-40.

Loobfourou J, Pappagianis D, Cooper T. Endemic coccidioidomycosis in northern California: an outbreak in the Capay Valley of Yolo County. *Calif. Med.* 1969; 111:5-9.

Mackinnon JE. El granuloma coccidióidico en América Del Sud. *Anales del Instituto de Higiene de Montevideo*, 1948; 2: 74-84.

Maddy KT. Ecological factors of the geographic distribution *Coccidioides immitis*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1957; 130:475-476.

Maddy KT. Observations of *Coccidioides immitis* found growing naturally in soil. *Ariz. Med.* 1965; 22:281-288.

Maddy KT & Crecelius HG. Establishment of *Coccidioides immitis* in negative soils following burial of infected animals and animals tissues. In: Ajello L. *Coccidioidomycosis*. Tucson: The University of Arizona Press; 1967.

Madrid GS, Contreras J. Coccidioidomycosis in the state of Sonora. *Neumol Cir Torax.* 1963; 24:395-400.

Mardo D, Christensen R, Nelson N, Hutt S, Hyun R, Shaffer J, et al. Coccidioidomycosis in workers at an archeologic site. Dinosaur National Monument, Utah. *MMWR* 2001; 50: 1005-8.

Mayorga R. Coccidioidomycosis in Central America. En: Ajello L, editor, *Coccidioidomycosis*. Proceedings of 2nd Coccidioidomycosis Symposium. Phoenix, Arizona. 1967; p. 287-91.

Mayorga RP & Spinoza H. Coccidioidomycosis in Mexico and Center America. Mycopathol. Mycol. Appl. 1970. 40:13-23.

MedicineNet. [homepage na internet] [acesso em 30 nov 2011]. Disponível em http://www.medicinenet.com/valley_fever/article.htm.

Metapathogen. [homepage na internet] [acesso em 30 nov 2011]. Disponível em <http://www.metapathogen.com/coccidioides/>

Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, Centro Nacional de Epidemiologia, Coordenação Geral dos Laboratórios de Saúde Pública. Biossegurança em Laboratórios Biomédicos e de Microbiologia. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2000.

Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento do Complexo Industrial e Inovação em Saúde, Comissão de Biossegurança em Saúde Classificação de risco de agentes biológicos. 2. ed. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.

Negróni P, Vovoli D, Bonfiglioli H. Estudios sobre El *Coccidioides immitis* VII: Reacciones inmunoalérgicas em la infección experimental del cobayo. Rev Inst Bacteriológico “Dr. Carlos G. Malbrán” 1949; 14: 273-86.

Negróni R. The History of Coccidioidomycosis in Latin America. En: Einstein H, Catanzaro A. Coccidioidomycosis. Proceedings of the 5th. International Conference on Coccidioidomycosis. Centennial Conference, National Foundation for Infectious Diseases. Washington D.C. 1996, p. 37-46.

Negróni R. Evolución los conocimientos sobre aspectos clínico-epidemiológicos de la Coccidioidomycosis en las Américas. Revista Argentina de Microbiología. 2008. 40:246-256.

Negróni P, Briz de Negróni C, Daglio CAN, Vivancos G, Bonatti A. Estudios sobre el *Coccidioides immitis* XII: Cuarta contribución al estudio de la endemia en la Argentina. Ver Argent Dermatosisifil 1952; 30: 269-79.

Negrón R, Elías Costa MR de. Estudio de un antígeno citoplasmático de la fase micelial de *Coccidioides immitis*. Rev Argent Micol 1982; 5: 5-8.

Negrón R, Elías Costa MR de. Cinética de las reacciones serológicas con coccidioidina en las infecciones experimentales del cobayo. Rev Argent Micol 1985; 8: 12-5.

Niño FL, Ferrada Urzúa L. Contribución al estudio de La endemia de coccidioidomicosis en la República Argentina. Prensa Méd Argent 1950; 37: 2920-8.

Nosanchuk JD, Yu JJ, Hung CY, Casadevall A, Cole GT. *Coccidioides posadasii* produces melanin *in vitro* and during infection. Fungal Genetics and Biology 2007; 44:517-520.

Ophüls W. Further observations on the pathogenic mould formerly described as a protozoan (*Coccidioides immitis*, *Coccidioides pyogenes*). J Exp Med 1906; 6: 443-86.

Ophüls W, Moffit HC. A new pathogenic mould formerly described as a protozoan (*Coccidioides pyogenes*): preliminary report. Philadelphia Med J 1900; 5: 1471- 2.

Padhye AA, Smith G, Standard PG, Mclaughlin D & Kaufman L. Comparative evaluation of chemiluminescent DNA probe assays and exoantigen tests for rapid identification of *Blastomyces dermatitidis* and *Coccidioides immitis*. J Clin Microbiol 1994; 32(4): 867–870.

Pan S. & Cole GT. Molecular and biochemical characterization of *Coccidioides immitis*-specific antigen. Infect Immun 1995; 63(10): 3994-4002.

Pan S, Sigler L, Cole GT. Evidence for a phylogenetic connection between *Coccidioides immitis* and *Uncinocarpus reesii* (Onygenaceae). Microbiology 1994;140:1481-1494.

Pappagianis D. Epidemiology of coccidioidomycosis. In: McGinnis. Current Topics of Medical Mycology. New York: Springer-Verlag; 1988.

Pappagianis D. *Coccidioides immitis*. In: L. Ajello and R. Hay (eds). Medical Mycology Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 9th ed.; 1998.

Pappagianis D, Zimmer BL. Serology of coccidioidomycosis. *Clin Microbiol Rev* 1990; 3: 247-68.

Piel Latinoamericana. [homepage na internet] [acesso em 30 nov 2011]. Disponível em <http://piel-l.org/libreria/item/943>.

Pike RM. Laboratory associated infections: incidence, fatalities, causes and prevention. *Ann. Rev. Microbiol.* 1979; 33:41-66.

Posadas A. Un nuevo caso de micosis fungoide con psorospermias. *Círculo Médico Argentino.* 1892; 52: 1-11.

Posadas A. Psorospermose infectante généralizé. *Rev Clin (París)* 1900; 21: 277-82.

Prefeitura Municipal de Toledo. [homepage na internet] [acesso em 30 nov 2011]. Disponível em <http://www.toledo.pr.gov.br/?q=portal/meio-ambiente/animais>

Remesar MC, Blejer JL, Negroni R, Nejamkis MR. Experimental coccidioidomycosis in immunosuppressed rat. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1992; 34: 303-7.

Rios Olivares ED. Primer caso humano de Coccidioidomycosis em Nicarágua. *Rev. Lat. Am. Microbiol.* 1979; 21:215-218.

Rippon JW. Coccidioidomycosis. In: *Medical Mycology. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes.* 3rd. ed., Philadelphia: W. B. Saunders Co.; 1988.

Robledo MVA. Coccidioidomycosis. *Antioquia Med* 1965; 15: 361-2.

Robledo MVA, Restrepo AM, Ospina S, Gutiérrez ZF. Encuesta epidemiológica sobre coccidioidomycosis de algunas zonas áridas de Colombia. *Antioquia Med.* 1968; 18: 503-22.

Sales-Sales C. Coccidioidomycosis. A propósito de un caso presentado entre nosotros. *Rev Asoc Med Quirur Atlântico.* 1958; 2: 289-94.

Sandim, RL; Hall, GS; Longworth, DL & Washington AJ. Unpredictability of commercially available exoantigen culture confirmation tests in confirming the identity of five *Blastomyces dermatitidis* isolates. *Am. J. Clin. Pathol.* 1993; 99:542-545.

Slim Villegas VJ, Aranda Reyes B. Coccidiosis and histoplasmosis in Valle de Mexicali, Mexico. *Bol Oficina Sanit Panam.* 1953;34(2):137-42.

Schmidt RT & Haward DH. Possibility of *Coccidioides spp.* infection of museum personel. *Publ. Health. Rep.* 1968; 83(10):882-890.

Sheff KW, York ER, Driebe EM, Barker BM, Rounsley SD, Walddell VG, Beckstrom-Sternberg SM, Beckstrom-Sternberg JS, Keim PS, Engelthaler DM. Development of a rapid, cost-effective TaqMan Real-Time PCR Assay for identification and differentiation of *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii*. *Med Mycol.* 2010; 48:466-469.

Sidrim JJC, Silva LCI, Nunes JNA, Rocha MFG & Paixão GC Le nord-est Brésilien, région d'endemie de Coccidioidomycose? A propos d'une micro-épidémie *J. Mycol. Méd.* 1997; 7:37-39.

Smith CE, Beard RR. Effect of season and dust control on coccidioidomycosis. *J. Am. Med. Assoc.* 1946; 132(14):833-838.

Smith CE, Beard RR, Whiting EG, Rosemberg HG. Varieties of coccidioidal infection in relation to the epidemiology and control of the disease. *Amer J Publ Health* 1946; 36: 1394-402

Smith CE, Saito MT, Simmons SA. Pattern of 39,500 serologic tests in coccidioidomycosis. *JAMA* 1956; 160: 546-52.

Spiegel RA, Jibson RW, Harp EL, Marshall GA, Stein RS, Hajjeh RA, *et al.* Environmental aspects of the Ventura County Coccidioidomycosis. Epidemic following the Northridge Earthquake. In: Einstein H, Catanzaro A, editors. *Coccidioidomycosis. Proceedings of the 5th International Conference on Coccidioidomycosis.* National Foundation for Infectious Diseases. Washington D.C. 1996, p. 108-15.

Sano A, Miyaji M, Kamei K, Mikami Y, Nishimura K. Reexamination of *Coccidioides* spp. reserved in the Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Chiba University, based on a multiple gene analysis. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*. 2006;47(2):113-7.

Stevens DA. *Coccidioidomycosis*. New York, Plenum Press, 1980.

Stevens DA, Clemons KV, Levine HB, Pappagianis D, Baron EJ, Hamilton JR, Deresinski SC, Johnson N. Expert Opinion: What to do when there is *Coccidioides* exposure in a laboratory. *Clin Infect Dis* 2009; 49: 919-923.

Stewart RA, Meyer KF. Isolation of *Coccidioides immitis* from soil. *Proc Exp Biol* 1932; 29: 937-8.

Sulkin SE & Pike RM. Survey of laboratory acquired infections. *Am. J. Pub. Health*. 1951; 41:769-781.

Sun H, Huppert M, Wkovic KR. Rapid in vitro conversion and identification of *Coccidioides immitis*. *J. Clin. Microbiol.* 1976; 3:186-190.

Taylor JW and Fisher MC. Fungal multilocus sequence typing — it's not just for bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 2003, 6:351–356.

Tintelnot K, Hoog GS DE, Antweiler E, Losert H, Seibold M, Brandt MA, Gerrits Van Den Ende AHG, Fisher MC. Taxonomic and diagnostic markers for identification of *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii*. *Med Mycol.* 2007; 45:385-393.

Umeyama T., Sano A, Kamei K, Niimi M, Nishimura K, Uehara Y. Novel Approach to Designing Primers for Identification and Distinction of the Human Pathogenic Fungi *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii* by PCR Amplification. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(5):1859-1862.

Velasco-Castrejón O, Tay Zavala J. Coccidioidomycosis. En: Velasco-Castrejón, Tay Zavala J, editors. Introducción a La Micología Médica. México. Francisco Méndez Cervantes, 1978; p. 157-72.

Vianna H, Passos HV, Sant'ana AV. Coccidioidomycose: Relato do primeiro caso ocorrido em nativo do Brasil. Rev. Inst. Med. Trop. 1979; 21:51-55.

Wanke B, Lazera MS, Monteiro PC, Correia Lima F, Leal MJS, Ferreira Filho PL, Kaufman L & Pinner RW. Coccidioidomycosis in northeastern Brazil: adding a new area to the map of endemic coccidioidomycosis. In: Proc. Thirty-seventh Annual Coccidioidomycosis Study Group Meeting, Arizona, 1993.

Wanke B. Coccidioidomycose. Rev. Soc. Bras. Med Trop. 1994; 27(Suppl. 4):375-378.

Wanke B, Monteiro PCF, Lazera MS, Capone D, Bethlem E, Rego AP. Micoses pulmonares. In: Pneumologia. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu; 1996.

Wanke B, Lazera MS, Monteiro PCF, Lima FC, Leal MJS, Ferreira Filho PL, et al. Investigation of an outbreak of endemic coccidioidomycosis in Brazil's Northeastern State of Piauí with a review of distribution of *Coccidioides immitis* in three other Brazilian states. Mycopathologia 1999; 148: 57-67.

Wanke B, Eulálio KD, Salmito MA, Cruz JRM, LAZERA MS. Coccidioidomycosis among armadillo hunters in Northeastern Brasil: a new outbreak in the state of Piauí. Annals of 4° ISHAM World Congress, Buenos Aires, 8-12 maio 2000. Abstract 414, p.130, Abstract Book.

Wanke B, Do Valle ACF, Zancopé-Oliveira RM, Costa RLB. Paraccoccidioidomycose. In: José Rodrigues Coura (editor) Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2005.

Werner SB, Pappagianis D, Heindl I, Mickel A. An epidemic of coccidioidomycosis among archeology students in northern California. N. Engl. J. Med. 1972; 286:507-512.

Wernicke R. Uber einen protozoenbefund bi mycosis fungoides. Zentralbe Bacteriol. 1892; 12: 859-61.

Wikipedia.[homepage na internet] [acesso em 30 nov 2011]. Disponível em http://en.wikipedia.org/wiki/File:Arthroconidia_of_Coccidioides_immitis_39G0040_lores.jpg

Williams TL, Sable DL, Mendez P. & Smith LT. Symptomatic coccidioidomycosis following a severe natural storm. Chest 1979; 76:566-570.

Wilson JM, Smith CE, Plunkett OA. Primary cutaneous coccidioidomycosis. The criteria for diagnosis for a report of a case. Calif. Med. 1953; 79(3):233-239.

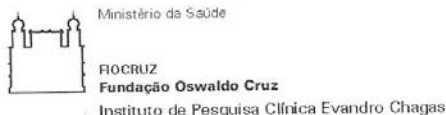
Woods CW, Mc Rill C, Plikaytis BD, Rosenstein NE, Mosley D, Boyd D, England B, Perkins BA, Ampel NM, Hajjeh RA. Coccidioidomycosis in humans immunodeficiency virus-infected persons in Arizona, 1994- 1997: incidence, risk factors and prevention. J Infect Dis 2000; 181: 1428-32.

Zimmerman CR, Snedker CJ, Pappagianis D. Characterization of *Coccidioides immitis* isolates by restriction fragment length polymorphisms. J Clin Microbiol. 1994; 32:3040-3042.

Zurlo J, Crook T, Green W, Adams J, Freer C, Ratner J, M'Ikanatha N, Rankin J, Stetson L, Yeager S, Pappagianis D. Coccidioidomycosis in travelers returning from Mexico. Pennsylvania. MMWR 2000; 49: 1004-6.

ANEXOS

ANEXO 1 – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO – 029/2010

Protocolo 0021.0.009.000-10

1. Identificação:

Título do Projeto: "Identificação e tipagem molecular de cepas clínicas e ambientais de *Coccidioides* spp. do Estado do Piauí, Brasil".

Pesquisadora Responsável: Bodo Wanke.

Mestranda: Claudia de Carvalho Falci Bezerra.

Instituição Responsável: Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/FIOCRUZ.

Data de Apresentação ao CEP: 05/04/2010.

2. Sumário:

Visa a identificar e analisar a variabilidade, por métodos moleculares, de cepas de *Coccidioides* spp. estocados no IPEC/FIOCRUZ. Tem como objetivos específicos: 1) confirmar, por meio de marcador molecular específico, o gênero das cepas; 2) avaliar a variabilidade molecular de cepas brasileiras de *Coccidioides* spp., através da utilização do *primer* universal M13. Serão estudadas 65 cepas de *Coccidioides* spp. de origem clínica e ambiental provenientes do estado do Piauí. Estas cepas estão preservadas na Coleção de Cultura do Laboratório de Micologia do IPEC/Fiocruz.

3. Observações Gerais: (Atendendo à Resolução CNS 196/96).

Projeto com delineamento adequado. Em substituição ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi elaborado um Termo de Compromisso, onde o pesquisador responsável compromete-se a manter a confidencialidade assim como a privacidade dos participantes do projeto em qualquer publicação resultante deste estudo. Será financiado pelo CNPq e FAPERJ.


4. Diligências:

Não houve.

5. Parecer: APROVADO.

Data da Reunião: 17 de maio de 2010.

Assinatura do Coordenador:


Dr.^a Lélia Camillo-Coura
Coordenadora do Comitê
de Ética em Pesquisa
IPEC / FIOCRUZ

ANEXO 2 – PREPARAÇÃO DO MEIO GLICOSE-EXTRATO DE LEVEDURA

Para 1 litro de meio

Glicose – 10 gramas

Extrato de levedura – 5 gramas

Água destilada – 100° mL.

Dissolver os componentes do meio em água destilada.

Levar ao autoclave por 15 minutos a 121°C .

ANEXO 3 – TERMO DE COMPROMISSO E RESPONSABILIDADE

Eu, **CLAUDIA DE CARVALHO FALCI BEZERRA**, do Laboratório de Micologia do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC), participante do projeto de pesquisa intitulado “**AUTENTICAÇÃO E TIPAGEM MOLECULAR DE ISOLADOS CLÍNICOS E AMBIENTAIS DE *Coccidioides* spp. DO ESTADO DO PIAUÍ, BRASIL**”, comprometo-me a manter a confidencialidade assim como a privacidade dos participantes do projeto.

A identidade dos participantes, assim como os resultados obtidos com este projeto, serão mantidos em um banco de dados sob a responsabilidade do coordenador do projeto Dr. Bodo Wanke.

Os resultados obtidos com esta pesquisa serão divulgados em comunicações científicas mantendo o anonimato dos participantes e o material utilizado não será empregado em outras pesquisas, a não ser quando aprovada por um CEP (Comitê de Ética em Pesquisa).

Rio de Janeiro, 14 de dezembro de 2011.

CLAUDIA DE CARVALHO FALCI BEZERRA