

PARACOCCIDIOIDOMICOSE ENZOÓTICA EM TATUS (*DASYPUS NOVEMCINCTUS*) NO ESTADO DO PARÁ

Roberto D. NAIFF (1), Luiz C. L. FERREIRA (2), Toby V. BARRETT (1), Maricleide F. NAIFF (1)
e Jorge R. ARIAS (1)

R E S U M O

Paracoccidioides brasiliensis foi encontrado, por inoculação de triturado de fígado e baço em hamsters, em 4 de 20 tatus (*Dasyopus novemcinctus*) examinados na região de Tucuruí, Pará. Hamsters inoculados por via intradérmica e peritoneal com o parasito desenvolveram infecções generalizadas e morreram em 1½ a 13 meses. A diagnose do fungo foi confirmada por histopatologia e cultura. Não se observaram sinais macroscópicos de doenças nos tatus. A distribuição geográfica de *D. novemcinctus* abrange a área endêmica de paracoccidioidomicose humana, sugerindo-se que o tatu tenha algum papel na ecologia do fungo.

UNITERMOS: Paracoccidioidomicose — Hamsters — Tatus (*Dasyopus novemcinctus*) — Ecologia.

I N T R O D U Ç Ã O

Embora exista volumosa literatura sobre a paracoccidioidomicose^{8,11,12,13,17} quase nada se conhece da ecologia de *Paracoccidioides brasiliensis* no ambiente silvestre. A reservárea⁴ da doença, ou área geográfica em que o homem adquire a infecção, é restrita às partes menos secas e menos frias da Região Neotropical^{5,8}. No laboratório, o fungo tem sido cultivado em solos previamente esterilizados¹⁴ e em substratos vegetais^{12,16}. O isolamento do fungo de amostras de solo não tem sido demonstrado repetidamente^{8,17} e ainda se desconhece o habitat exato da forma saprófita.

GROSE & TRAMSITT⁹ referem-se ao isolamento de *P. brasiliensis* do conteúdo intestinal de três morcegos frugívoros-*Artibeus lituratus* na Colômbia, porém este achado não foi repetido em outros levantamentos de morcegos colombianos⁷, e experiências com morcegos em cativeiro⁷ sugerem que *A. lituratus* provavelmente não tenha papel na ecologia do fungo.

Outro registro de *P. brasiliensis* foi em um macaco boliviano-*Saimiri sciureus* examinado na América do Norte¹⁰.

A importância de mamíferos silvestres na epidemiologia da doença não foi comprovada, e a fonte de infecção ao homem é desconhecida, o que impede a aplicação de medidas preventivas^{8,17}.

Existem poucas referências ao *P. brasiliensis* na Região Amazônica^{4,6,15}.

Neste trabalho, referimos o isolamento de *P. brasiliensis* de tatus silvestres capturados na área da usina hidrelétrica de Tucuruí, Estado do Pará (Fig. 1).

MATERIAL E MÉTODOS

Descrição da área

Tucuruí se encontra no Rio Tocantins, Estado do Pará, Brasil a aproximadamente

(1) Convênio INPA/ELETRONORTE, subprojeto Doenças Endêmicas. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Caixa Postal 478, 69.000 Manaus, AM, Brasil

(2) Departamento de Patologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade do Amazonas, Manaus

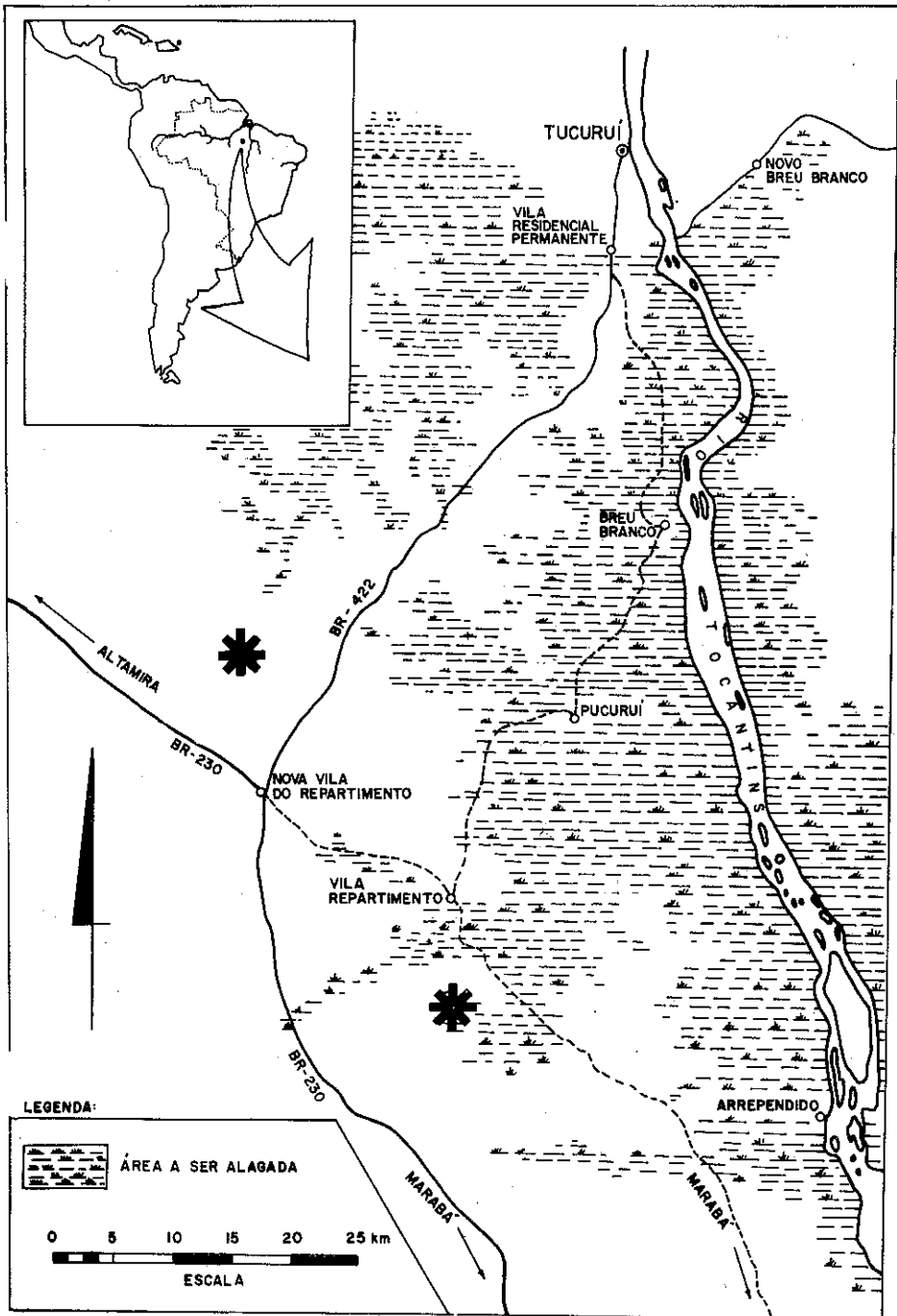


Fig. 1 — Mapa localizando a região de Tucuruí, área de estudo. (Asterísticos indicam localidades de capturas dos tatus).

03°S, 50°W. A cobertura vegetal desta região inclui elementos das províncias florísticas do Maranhão e Pará e consiste em floresta tropical úmida, alta e densa, com extensas áreas de

babaquais. Os tatus infectados foram capturados perto de Repartimento, numa área de floresta alta de terra firme com extensas áreas de vegetação secundária e áreas abertas com ilhas

de floresta. Os solos são ácidos e pobres em nutrientes, representados principalmente por podzólicos vermelho-amarelos e latossolos argilosos. A área de Repartimento consiste em podzólicos vermelho-amarelos de textura média a argilosa, com áreas de alúvios ácidos, pobres em nutrientes, nas baixadas. A temperatura média mensal, em torno de 27°C varia pouco durante o ano. A mínima absoluta raramente cai abaixo de 16°C e a máxima absoluta nunca ultrapassa 38°C. Durante os últimos 8 anos a umidade relativa do ar mínima registrada foi 43%. A precipitação anual, em torno de 2200 mm é distribuída irregularmente durante o ano, sendo os meses mais secos agosto e setembro, quando a influência do anticiclone subtropical do Atlântico está no máximo.

A precipitação total durante o mês mais seco é geralmente menor que 30 mm. O tipo climático é, portanto, úmido, com um grande deficit no período julho a setembro ($B_3 W_2$ de THORNTHWAITE)¹⁸.

A região é atravessada pela Rodovia Transamazônica, e colonos dos Estados do Maranhão e do Nordeste Brasileiro constituem parte substancial da população humana. A maioria dos residentes mantém contato íntimo com a floresta diariamente.

Extensas áreas da região estão sendo desmatadas para agricultura e pecuária.

Material examinado

Cento e cinquenta e dois mamíferos de 21 espécies foram examinados num levantamento dirigido para detectar hospedeiros silvestres de *Leishmania*. As amostras de triturados de baço e fígado em salina isotônica foram inoculados por via intradérmica e intraperitoneal em hamsters (*Mesocricetus auratus*).

Amostras de tecido de animais recebidos mortos foram triturados em salina contendo 5000 unidades de penicilina com 5,0 mg de estreptomicina por ml e incubados durante 2 a 4 horas à temperatura de 4°C, antes de serem inoculados. Tecidos de animais sacrificados no laboratório foram preparados sem o uso de antibiótico, segundo metodologia já publicada¹.

Os hamsters foram mantidos sob observação diária, e examinados até apresentarem le-

sões cutâneas, quando morriam ou depois de um período de 9 a 13 meses, nos casos que não havia sinal evidente de doença.

Entre os animais examinados estavam 20 tatus — *Dasybus novemcinctus* L.

Isolamento de fungos

Amostras de vísceras daqueles hamsters que apresentavam infecções com parasitos leveduriformes, detectados ao exame microscópico de esfregaços frescos de tecidos, foram semeados em meio de cultura, e incubados a 22-26°C. Os meios empregados foram Sabouraud Dextrose Agar BBL (Becton Dickinson & Co. Cockeysville, U.S.A.), pH 5,6 ± 0,2; e Mycosel Agar BBL, contendo ciclohexamida e cloranfenicol, pH 6,9 ± 0,2.

Amostras de culturas produzindo crescimento de fungos foram examinadas microscopicamente em glicerol, com iluminação de contraste de fase. Tecidos dos animais infectados e dos hospedeiros originais foram fixados em formol-salina 10% tamponada e cortes histológicos foram corados pelas técnicas de Hematoxilina-Eosina e Grocott.

Inoculação de culturas em animais

Culturas dos isolamentos com registro IM-1718 e IM-1726 foram inoculados por via intradérmica, intraperitoneal e testicular em hamsters, camundongos e cobaias (*Cavia porcellus*). Posteriormente, observou-se que a cultura de IM-1718 utilizada estava contaminada com um fungo saprófito semelhante ao gênero *Maso-niella* Smith (= *Scopulariopsis*).

RESULTADOS

Prevalência de *P. brasiliensis* nos animais silvestres

Paracoccidioides brasiliensis foi isolado de hamsters inoculados com material de vísceras de quatro dos 152 animais silvestres examinados, dentro de 13 meses a partir da data de inoculação. Todos os hospedeiros originais eram da mesma espécie, *Dasybus novemcinctus* indicando prevalência de 20% (4 em 20) nessa população de tatus. Os dados básicos dos isolamentos são resumidos na Tabela I.

TABELA I

Isolamento de Paracoccidiodioses do *Dasybus novemcinctus* Capturados na região de Tucuruí, Pará, Julho 1983

Registro	Sexo do tatu	Infecção detectada no hamster (meses após inoculação)	Lesão
IM-1706	Masculino	11	Visceral
		13	Visceral
IM-1718	Feminino	9	Visceral + Cutânea (*)
IM-1726	Feminino	7	Visceral
IM-1737	Feminino	4	Visceral + Cutânea (*)

(*) As lesões cutâneas se encontravam no local da inoculação intradermal

Histopatologia

Os tatus não apresentavam lesões macroscópicas evidenciáveis. Encontrou-se lesão ao exame histopatológico do fígado e baço de um dos tatus, caracterizando-se por reação inflamatória discreta nos espaços porta não granulomatosa, constituída predominantemente por macrófagos, linfócitos e plasmócitos, em meio a estruturas parasitárias esféricas medindo 20-30 μm com membrana refringente de duplo contorno, sem evidências de gemulação (Fig. 2).

Os hamsters inoculados com material visceral dos hospedeiros silvestres mostraram riqueza de estruturas esféricas de até 30 μm de diâmetro quando examinados por microscopia do material fresco das vísceras ou lesões cutâneas, 4 a 13 meses depois da inoculação.

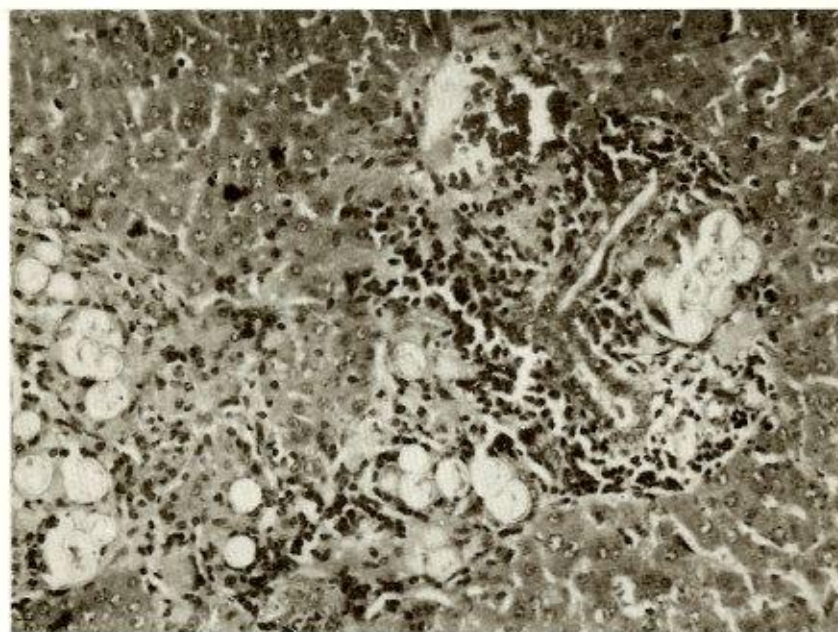


Fig. 2 — Corte histológico de fígado de *Dasybus novemcinctus*, espaço porta com reação inflamatória macrófágica discreta de permeio (H.E., 200 X)

Hamsters inoculados com material rico em parasitos, obtido de hamsters infectados, evoluam para o êxito letal 1½ — 5 meses após o inóculo, sendo que as fêmeas morriam mais precocemente. A morte dos animais era precedida de caquexia e adinamia. Na fase terminal havia hepatoesplenomegalia, linfadenomegalia, ascite com exsudato esbranquiçado viscoso. O fígado, baço, mesentério visceral e parietal exibiam nódulos esbranquiçados variando de 1 a 3 mm de diâmetro, na superfície e no parênquima do órgão, a par de aderências múltiplas entre as vísceras abdominais. O pulmão

exibia pontilhado hemorrágico difuso na pleura e no parênquima.

Nos inóculos realizados no focinho e na pata (Fig. 3) observava-se lesão nodular sem ulceração, hiperemiada, com rarefação dos fâneros.

Ao exame microscópico, reação granulomatosa foi encontrada no fígado, pulmão, baço e pele, constituída por macrófagos, linfócitos, células epitelióides, plasmócitos, raras células gigantes de permeio e uma riqueza de estruturas parasitárias (Fig. 4), com membrana refringente



Fig. 3 — Lesão nodular sem ulceração na pata de hamster, de inóculo com cultura de IM-1718

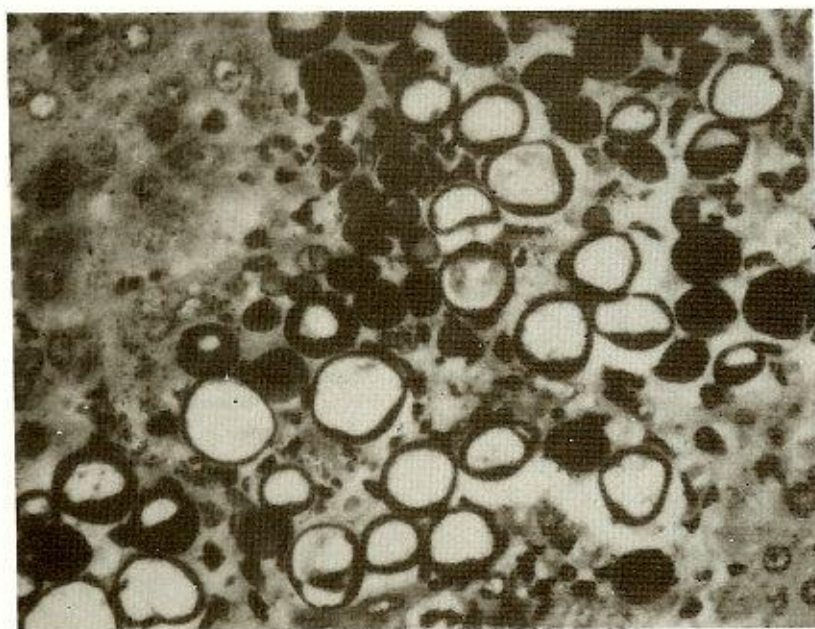


Fig. 4 — Corte histológico de fígado de hamster ricamente parasitado (Grocott, 400 X)

te corável pela impregnação da prata metanamina, medindo de 15 a 30 μ m, que se dividiam por gemulação simples ou múltipla (Fig. 5), sem evidências de exsudação neutrofilica.

Cultura

Quando amostras de tecido ricas em parasitos foram semeadas em tubos com meio My-

cosel e incubados a 22-26°C, o crescimento macroscópico do fungo era extremamente lento ou ausente. Em Sabouraud-dextrose, as colônias do fungo se desenvolviam em três semanas após a semeadura de material de tecido de hamster, a princípio sob forma filamentosa, mas logo depois adquirindo aspecto cerebriforme (Fig. 6). A cor, branca no início, passava depois a creme ou branco-acinzentada. O crescimento era len-

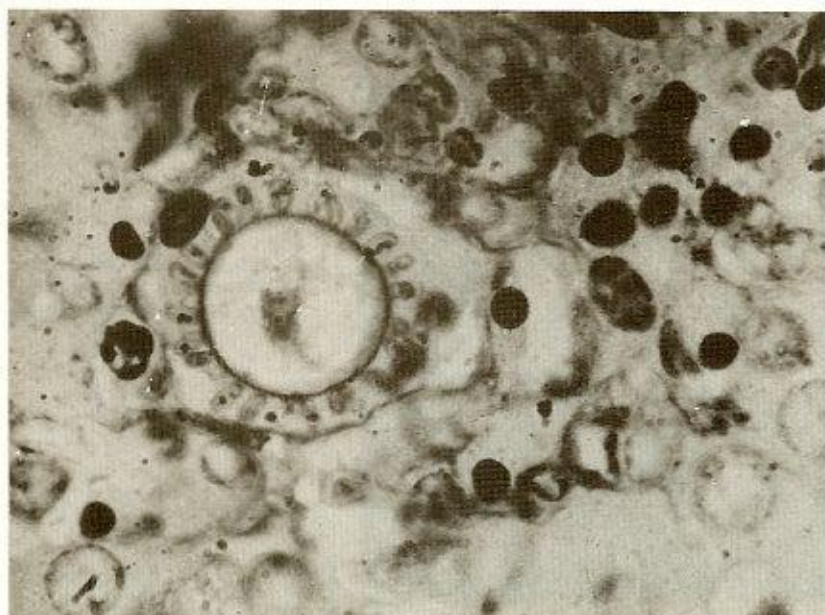


Fig. 5 — Esporulação múltipla em fígado de hamster (Crocott, 700 X)

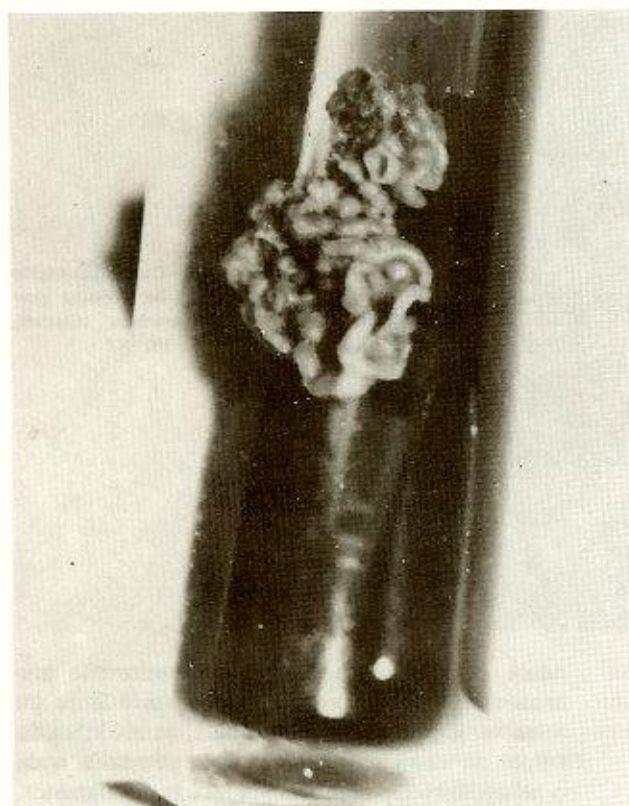


Fig. 6 — Cultura cerebriforme de IM-1718 em meio Sabouraud

to, atingindo as colônias cerca de 1,5 cm de diâmetro apenas em dois meses. Ao exame microscópico das culturas (Fig. 7) notou-se hi-

fas finas ($< 1 \mu\text{m}$ de diâmetro) e mais largas (até $3 \mu\text{m}$), de ramificação irregular, e figuras pseudomiceliais; clamidosporos intercalares e

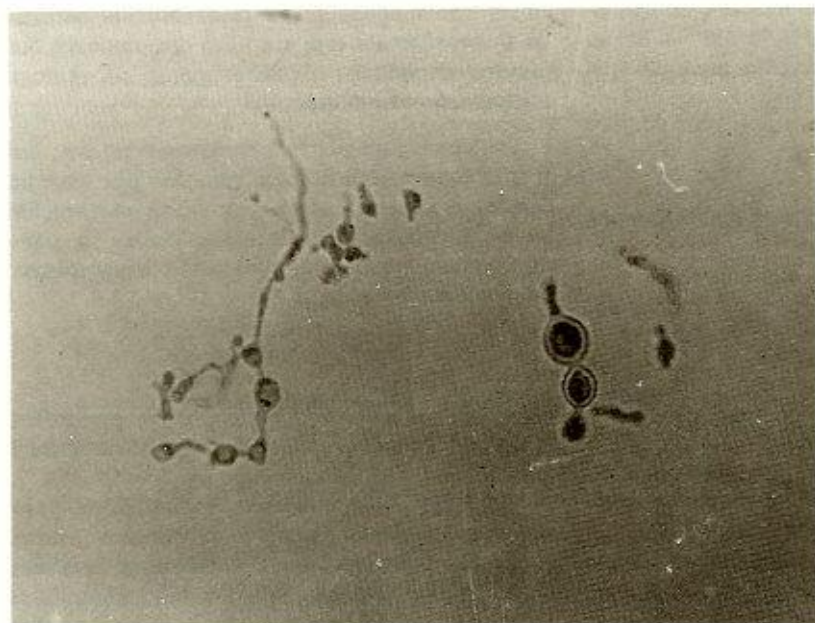


Fig. 7 — Aspecto microscópico da cultura mostrada na Fig. 6, corado com lactofenol de Amann (540 X)

terminais, com até 20 μ m de diâmetro, as maiores com membrana de duplo contorno e células leveduriformes com gemulação simples e, as vezes, múltipla.

Inoculação de culturas em animais

Dois hamsters fêmeas inoculados por via intradérmica nas patas com uma cultura de IM-1726 apresentavam-se moribundos após um período de 5 meses. Tinham lesões no local do inóculo e todos os órgãos estavam parasitados. Outros hamsters machos e fêmeas, e camundongos machos, inoculados com o mesmo material por via intraperitoneal, encontravam-se aparentemente saudáveis.

Dois hamsters fêmeas inoculados por via intradérmica com uma cultura (contaminada) de IM-1718 apresentavam-se moribundos com 132 e 175 dias, com todos os órgãos parasitados. Outros hamsters machos e fêmeas, e camundongos, inoculados por via intraperitoneal com o mesmo material, não apresentavam nenhum sinal evidente de doença. O fungo foi reisolado em cultura a partir dos tecidos destes dois hamsters.

Dois cobaios inoculados por via testicular com o mesmo material apresentavam exsudato com figuras leveduriformes após 5 a 10 dias, desaparecendo após 3 semanas. Sacrificados

após 5 meses, os cobaios não apresentavam nenhuma alteração macroscópica não se evidenciando parasitos em nenhum dos órgãos.

Inoculação em camundongos

Camundongos sacrificados com 1 a 4 meses após de inoculação intraperitoneal com 0,1 ml de material rico em parasitos obtido de visceras de um hamster infectado com a amostra IM-1706 encontravam-se aparentemente normais, não sendo constatada a presença de parasitos ao exame de esfregaço de tecidos. O único camundongo examinado após 6 meses de inoculação com o mesmo material apresentou nódulos peritonias ricos em parasitos.

Criopreservação e material de referência

Tecidos de hamsters parasitados com cada uma das amostras encontram-se conservados no Departamento de Patologia Tropical do INPA, por criopreservação em nitrogênio líquido. Como controle da viabilidade do material preservado, uma amostra do IM-1737 foi retirada do nitrogênio depois de 225 dias de conservação e inoculada em hamsters. Todos os hamsters inoculados desenvolveram infecções generalizadas com as características acima descritas.

As quatro amostras (IM-1706, IM-1718, IM-1726, IM-1737) foram enviadas para estudo, ao

Dr. Mário A. P. Moraes, Universidade de Brasília FS/MDC — Cx. P. 15-3051, 70.910 — Brasília, DF, a quem deve ser dirigido qualquer pedido do material infeccioso.

DISCUSSAO

A morfologia destes fungos, especialmente das formas em "roda de leme" nos animais infectados, e a patogenicidade em hamsters, não permite outra diagnose senão a de *Paracoccidioides brasiliensis* (Splendore) Almeida, 1930. A presença de *P. brasiliensis* em 20% dos *D. novemcinctus* examinados sugere que este animal possa exercer um papel no ciclo natural do parasito.

D. novemcinctus é a espécie mais cosmopolita do gênero, sendo presente desde o sudeste da América do Norte até o Uruguai e Argentina no oeste da Cordilheira dos Andes. É encontrado numa variedade de ambientes fitogeográficos, incluindo floresta tropical úmida, chaco e caatinga²¹. É ausente nas regiões mais secas ou frias, como os desertos mexicanos, a Patagônia e no Chile. Nestas regiões tampouco há evidência de paracoccidioidomicose autóctone humana^{8,12}. BORELLI⁵ sugeriu, entre outras especulações^{3,4,5} um habitat subterrâneo com temperatura em torno de 20°C para *P. brasiliensis*. *D. novemcinctus* habita tocas com até 4,6 metros de comprimento²¹ dentro dos quais deve-se encontrar um microclima bem mais estável do que na superfície. Em algumas destas tocas, *D. novemcinctus* constrói ninhos amplos de material vegetal. Estes ninhos são renovados periodicamente e o material descartado pode ser encontrado na superfície perto da entrada do buraco. Talvez uma pesquisa micológica deste material revelaria, finalmente, a forma saprófita de *P. brasiliensis* em a natureza. Se o hospedeiro se infecta na procura de alimentação, a fonte de infecção seria mais difícil de ser identificada. *D. novemcinctus* é onívoro, com uma dieta de mírdos ou "moles" que exigem pouca força de mastigação. Cupins e formigas são predominantes no conteúdo estomacal dos exemplares examinados na América do Sul^{2,21}.

A descoberta do habitat de *Histoplasma capsulatum* e *Coccidioides immitis* permitiu a aplicação de medidas práticas de profilaxia contra as infecções humanas^{19,20}. Entretanto, a fal-

ta de informações sobre reservatórios naturais de *P. brasiliensis* tem sido um dos maiores obstáculos impedindo o conhecimento da ecologia da paracoccidioidomicose¹⁷.

O vínculo entre *P. brasiliensis* no seu ambiente natural e o homem atingido por essa importante doença, ainda não está esclarecido, sendo indicadas, investigações sobre o papel que o tatu possa eventualmente desempenhar na ecologia do fungo.

SUMMARY

Enzootic paracoccidioidomycosis in armadillos (*Dasybus novemcinctus*) in Pará State, Brazil.

In spite of an extensive literature on paracoccidioidomycosis, hardly anything is known about the ecology of *Paracoccidioides brasiliensis* in nature. During 1983, 152 wild animals of 21 species were examined in a survey designed to detect sylvatic hosts of *Leishmania* near Tucuruí, a region of tropical rainforest with acid soils, in the State of Pará, northern Brazil. Hamsters inoculated with saline suspensions of liver and spleen from 4 out of 20 *Dasybus novemcinctus* developed generalized systemic infections after 4 to 13 months, with abundant spherical parasitic structures up to 30 µm in diameter, visible in unstained tissue smears. Inoculation of this material into fresh hamsters produced lethal infections in within 1½ to 5 months, with gross pathological changes in the viscera and abundant parasites characteristic of *P. brasiliensis* in stained histological sections. Material from infected tissue grew slowly in Sabouraud Dextrose Agar, forming light-coloured cerebriform colonies approximately 1,5 cm in diameter after 2 months at 22-26°C. Culture material was inoculated intradermally, intraperitoneally and intratesticularly into hamsters, laboratory mice and guinea pigs. Generalized infections were detected after approximately 5 months in female hamsters that had been inoculated intradermally. The fungus was re-isolated in culture from the infected hamsters. Parasites were detected in histological sections of the liver and spleen of the original armadillos, but no gross signs of disease were noted in these animals.

D. novemcinctus is widely distributed in the Neotropical Region but is absent from certain

regions, such as Chile and Patagonia, where paracoccidioidomycosis is unknown. The fossorial habits of this armadillo may be relevant in the light of previous suggestions that the saprophytic phase of *P. brasiliensis* inhabits a subterranean environment. It is suggested that *D. novemcinctus* may play a part in the ecology of *P. brasiliensis* in nature.

AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa recebeu apoio financeiro e logístico do subprojeto Doenças Endêmicas (Leishmaniose e Doença de Chagas) do Convênio ELETRONORTE/INPA de 30.01.80. Agradecemos ao Dr. Mario A.P. Moraes pelas sugestões e comentários sobre o manuscrito original. Aos pesquisadores Guido Ranzani, Juan Revilla e Roberto Fisch pelos dados edáficos, fitogeográficos e climáticos. A Professora Geny B. de Castro da Fundação Universidade do Amazonas pelo assessoramento micológico. Ao Artêmio Coelho da Silva pela Fig. 1 e ao Dr. Joaquim Adis pela Fig. 6.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARIAS, J. R.; NAIFF, R. D.; MILES, M. A. & SOUZA, A. A. — The opossum, *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: Didelphidae) as a reservoir host of *Leishmania braziliensis guyanensis* in the Amazon basin of Brazil. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 75: 537-541, 1981.
2. BARRETO, M.; BARRETO, P. & D'ALESSANDRO, A. — Stomach contents of Colombian armadillos and their infection with *Trypanosoma cruzi*. *J. Mammalogy* (in press).
3. BORELLI, D. — Hipótesis sobre ecología de *Paracoccidioides brasiliensis*. *Derm. venez.* 3: 130-132, 1961/1962.
4. BORELLI, D. — Concepto de reservárea. La reducida reservárea de la paracoccidioidosis. *Derm. venez.* 4: 71-77, 1964.
5. BORELLI, D. — Algunos aspectos de la paracoccidioidosis. *Derm. venez.* 10: 1190-1201 1974.
6. CASTRILLÓN, A. L.; CARVALHO, R. F.; BORBOREMA, C. A. & FECHER, S. A. — Paracoccidioidomicose na Amazônia. (Registro de um caso). *Acta Amazonica* 2: 55-58, 1972.
7. GREER, D. L. & BOLANOS, B. — Role of bats in the ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: the survival of *Paracoccidioides brasiliensis* in the intestinal tract of the frugivorous bat, *Artibeus lituratus*. *Sabouraudia* 15: 273-282, 1977.

8. GREER, D. L. & RESTREPO, M. A. — La epidemiología de la paracoccidioidomycosis. *Bol. Ofic. sanit. panamer.* 82: 428-445, 1977.
9. GROSE, E. & TRAMSIIT, J. R. — *Paracoccidioides brasiliensis* from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia S.A. *Sabouraudia* 4: 124-125, 1965.
10. JOHNSON, W. D. & LANG, C. M. — Paracoccidioidomycosis (South American Blastomycosis) in a squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Vet. Path.* 14: 368-371, 1977.
11. LACAZ, C. da S. — South American Blastomycosis. *An. Fac. Med. Univ. S. Paulo* 29: 120, 1955/1956.
12. LACAZ, C. da S.; PORTO, E. & MARTINS, J. E. C. — *Micologia Médica*. 7.ª Ed. São Paulo, Sarvier, 1984, 189-216.
13. LACAZ, C. da S. & ROSA, M. C. B. — Bibliografia sobre Paracoccidioidomicose (Doença de Lutz) 1908-1978 e Doença de Jorge Lobo (Blastomycose Queloidiforme) 1931-1978. São Paulo, 1979.
14. MEDINA, H. & BODZIAK, C. — Contribuição ao conhecimento do ciclo extra-parasitário do paracoccidioides *brasiliensis*. (Almeida, 1931). (Nota prévia). *Rev. méd. Paraná* 18: 145-148, 1949.
15. MORAES, M. A. P. & FERREIRA, J. L. S. — Micoses superficiais e profundas na Amazônia. In: Atas do Simpósio sobre a Biota Amazônica Vol. 6 (Patologia). Conselho Nacional de Pesquisas. H. LENT Ed. Rio de Janeiro, 189-202. 1967.
16. PEREIRA FILHO, M. J. — Sobre o saprofitismo do agente da blastomycose sul-americana (Nota prévia). *An. bras. Derm. Sif.* 24: 299-300, 1949.
17. RESTREPO, M. A.; GREER, D. L. & VASCONCELLOS, M. — Paracoccidioidomycosis — A Review. *Rev. med. vet. Mycol.* 8: 97-123, 1973.
18. THORNTHWAITE, C. W. — An approach toward a rational classification of climate. *Geographical. Rev.* 38: 55-94, 1948.
19. WEEKS, R. J. & TOSH, F. D. — Control of epidemic foci of *Histoplasma capsulatum*. In: AJELLO, L. et al. (Eds.). *Histoplasmosis. Proceedings of the second national conference*. Springfield, Charles C. Thomas, 1971, 184-189.
20. WEISBURD, G. — Profilaxia de las micosis profundas. *Rev. Argent. Micol.* 5: 32-34, 1962.
21. WETZEL, R. M. — Systematics, Distribution, Ecology and Conservation of South American Edentates. In: MARES, M. A. & GENOWAYS, H. H. *Mammalian Biology in South America. Special Publ. Ser.*, Vol. 6, Pymatuning Laboratory of Ecology, University of Pittsburgh, 345-375, 1982.

Recebido para publicação em 18/3/1985.