



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GIOVANA GOMES DE CARVALHO ISHIUCHI

**DETECÇÃO DE INFECÇÃO POR *Paracoccidioides*
brasilensis EM CÃES E ANIMAIS SILVESTRES DA REGIÃO
NORTE DO ESTADO DO PARANÁ**

Londrina - PR
2022

GIOVANA GOMES DE CARVALHO ISHIUCHI

**DETECÇÃO DE INFECÇÃO POR *Paracoccidioides*
brasiliensis EM CÃES E ANIMAIS SILVESTRES DA REGIÃO
NORTE DO ESTADO DO PARANÁ**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Mario Augusto Ono

Londrina - PR
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

C331d Carvalho-Ishiuchi, Giovana Gomes de.
Detecção de infecção por *Paracoccidioides brasiliensis* em cães e animais silvestres da região norte do estado do Paraná / Giovana Gomes de Carvalho-Ishiuchi. - Londrina, 2022.
63 f.

Orientador: Mario Augusto Ono.
Tese (Doutorado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2022.
Inclui bibliografia.

1. Paracoccidioidomicose - Tese. 2. Detecção molecular - Tese. 3. Detecção sorológica - Tese. 4. Marcadores epidemiológicos - Tese. I. Ono, Mario Augusto. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616

GIOVANA GOMES DE CARVALHO ISHIUCHI

**DETECÇÃO DE INFECÇÃO POR *Paracoccidioides brasiliensis* EM
CÃES E ANIMAIS SILVESTRES DA REGIÃO NORTE DO ESTADO
DO PARANÁ**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Mario Augusto Ono
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Eloiza Teles Caldart
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Lilian Cristiane Baeza
Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Prof. Dr. Kelvinson Fernandes Viana
Universidade Federal da Integração Latino-
Americana

Londrina, 20 de junho de 2022.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e todas as formas de agir. Sem fé nada nos sustenta.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental pelo apoio financeiro e concessão de bolsa de estudo.

À Universidade Estadual de Londrina e todos os seus colaboradores que, mesmo frente a adversidades, mantêm-se erguidos para proporcionar um ensino de qualidade.

Ao meu orientador, Professor Dr. Mario Augusto Ono, por ter me acolhido em seu laboratório em 2012 e me guiado e incentivado desde então pelos rumos científico-acadêmicos. Muito obrigada por acreditar em meu potencial e proporcionar amadurecimento pessoal e profissional.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, por todo o conhecimento transmitido com excelência e dedicação.

Aos professores componentes da banca pela disponibilidade e contribuições para a elevação deste trabalho.

A todos os parceiros do Laboratório de Imunologia Animal, pelo auxílio nos experimentos.

A algumas pessoas especiais nesta caminhada, que contribuíram com sua amizade: Raquel Nakama, Karyna Ikeda, Andressa Rorato, Flávia Bender, Tatiana Motta-Tavares e Bianca Dorana.

Ao meu esposo, Lucas R. M. Ishiuchi, pela paciência e companheirismo.

Aos meus pais, Aurora A. G. Carvalho e Victor Hugo de Carvalho pelo apoio e incentivo em todas as suas formas. Graças a vocês cheguei até aqui. Muito obrigada por tudo.

"Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender mais para temer menos."

Marie Curie

ISHIUCHI, Giovana Gomes de Carvalho. **Detecção de infecção por *Paracoccidioides brasiliensis* em cães e animais silvestres da região norte do estado do Paraná.** 2017-2022. 63 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

RESUMO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica de importância médica ocasionada por fungos termo-dimórficos do gênero *Paracoccidioides*. A PCM é endêmica em países da América Latina e o Brasil é o país com o maior número de casos. O estado do Paraná é uma região endêmica para PCM humana. A infecção por *P. brasiliensis* também tem sido descrita em animais domésticos e silvestres. O objetivo deste trabalho foi avaliar a infecção por *P. brasiliensis* em cães e animais silvestres da região Norte do Estado do Paraná. Um total de 627 amostras de soros de cães das regiões norte (n= 186), sul (n= 94), leste (n= 100), oeste (n= 172) e central (n= 75) da área urbana da cidade de Londrina foram avaliados pelos métodos de imunodifusão (ID) e ELISA utilizando exoantígeno e *Western Blot* (WB) com gp43 recombinante (gp43r). Amostras de fígado (n= 65), linfonodos (n= 37), pulmões (n= 78) e baço (n= 28) pertencentes a 87 animais silvestres atropelados em rodovias de cidades da Região Norte do Paraná foram analisadas por *Nested* PCR utilizando os primers panfungais ITS 4/5 na primeira reação e primers específicos Pb ITS E/R na segunda reação. Em relação aos estudo soropidemiológico com cães, 55,5% das amostras foram positivas no ELISA com exoantígeno. A PCM infecção foi confirmada por WB com gp43r em 216 (34,4%) animais. Quatro cães (0,64%) foram positivos no teste de ID, sugerindo PCM doença ativa. No estudo com animais silvestres atropelados, houve amplificação de DNA de *P. brasiliensis* em amostras de fígado e baço de um urubu (*Coragyps atratus*) e uma amostra de pulmão de uma lebre (*Lepus europaeus*). O urubu foi coletado em área rural da cidade de Uraí e a lebre, em zona urbana da cidade de Londrina, ambos em áreas arborizadas ou de plantação e próximo a córregos. Os hábitos destas espécies de animais aumentam sua exposição à infecção por *Paracoccidioides* spp. e suas distribuições geográficas se sobrepõem às áreas endêmicas para PCM humana. Os resultados reforçam a importância do uso de cães e animais silvestres como sentinelas da PCM em áreas urbanas e rurais.

Palavras-chave: Paracoccidioidomicose. Imunodifusão. ELISA. *Nested* PCR. Marcador epidemiológico.

ISHIUCHI, Giovana Gomes de Carvalho. **Detection of infection by *Paracoccidioides brasiliensis* in dogs and wild animals from Northern region of Paraná state**. 2017-2022. 63 f. Thesis (Doctor's Degree in Pathological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis of medical importance caused by thermo-dimorphic fungi of the genus *Paracoccidioides*. PCM is endemic in Latin American countries and Brazil is the country with the highest number of cases. The Paraná State is a PCM endemic area. *P. brasiliensis* infection has been described in domestic and wild animals. The aim of this study was to evaluate the infection by *P. brasiliensis* in dogs and wild animals from the Northern region of Paraná State, Brazil. A total of 627 dog serum samples from the northern (n= 186), southern (n= 94), eastern (n= 100), western (n= 172) and central (n= 75) regions of the urban area of Londrina municipality were analyzed by immunodiffusion (ID) and ELISA using exoantigen and by Western blot (WB) with recombinant gp43 (gp43r). Tissue samples of liver (n= 65), lymph nodes (n= 37), lungs (n= 78) and spleen (n= 28) belonging to 87 road-killed wild animals on highways in cities from Northern Paraná State were analyzed by Nested PCR using panfungal primers ITS 4/5 in the first reaction and specific primers Pb ITS E/R in the second reaction. Regarding the seroepidemiological study with dogs, 55.5% were positive in the ELISA with exoantigen. PCM infection was confirmed by WB with gp43r in 216 (34.4%) animals. Four dogs (0.64%) were positive in the ID test, suggesting active PCM disease. In the study with road-killed wild animals, there was amplification of *P. brasiliensis* DNA in liver and spleen samples from a black vulture (*Coragyps atratus*) and a lung sample from a brown hare (*Lepus europaeus*). The black vulture was collected in a rural area of Uraí municipality and the hare in an urban area of Londrina municipality, both in areas with arborization or the presence of crops and close to water bodies. The habits of these animal species increase their exposure to infection by *Paracoccidioides* spp. and their geographic distributions overlap with areas endemic for human PCM. The results reinforce the importance of dogs and wild animals as sentinels of PCM in urban and rural areas.

Key words: Paracoccidioidomycosis. Immunodiffusion. ELISA. Nested PCR. Epidemiological marker.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Áreas endêmicas para PCM.....	13
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

bp	Pares de base (<i>base pair</i>)
CI	Intervalo de confiança (<i>confidence interval</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados (<i>deoxyribonucleotide triphosphate</i>)
ELISA	Ensaio imunoenzimático (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
ID	Imunodifusão dupla
ITS	Espaçador transcrito interno (<i>internal transcribed spacer</i>)
QGIS	<i>Geographic Information System</i>
gp	Glicoproteína
GPS	Sistema de posicionamento global (<i>global positioning system</i>)
kDa	Quilodalton
min	Minuto
mM	Milimolar
n	Número de indivíduos na amostra
ng	Nanograma
nm	Nanômetros
OR	Razão de chances (<i>odds ratio</i>)
p	p-valor (<i>p-value</i>)
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PBS	Tampão salina-fosfato (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCM	Paracoccidioidomicose
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
r	Recombinante
sec	Segundo
T	Tween
WB	<i>Western Blot</i>
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromol
%	Por cento

SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA	10
1.1	<i>PARACOCCIDIOIDES</i> SPP.....	10
1.2	PARACOCCIDIOIDOMICOSE.....	11
1.3	ÁREAS ENDÊMICAS PARA PCM	12
1.4	ECOLOGIA.....	15
1.5	DETECÇÃO DE INFECÇÃO POR MÉTODOS IMUNOLÓGICOS.....	16
1.6	DETECÇÃO MOLECULAR	18
1.7	PCM EM ANIMAIS.....	18
2	OBJETIVOS	22
2.1	OBJETIVO GERAL.....	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICO	22
3	ARTIGO A – Paracoccidioidomycosis in dogs from an urban area in Northern Paraná, Brazil	23
4	ARTIGO B – First report of <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> infection in brown hare (<i>Lepus europaeus</i>) and black vulture (<i>Coragypus atratus</i>)	35
5	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS	50

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 *PARACOCCIDIOIDES SPP.*

Os agentes etiológicos da paracoccidioidomicose (PCM) são fungos do gênero *Paracoccidioides*, pertencentes à Ordem Onygenales e Família Ajellomycetaceae, como outras espécies de fungos patogênicos para humanos, como *Histoplasma*, *Blastomyces* e *Emmonsia* (UNTEREINER et al., 2004). A partir da análise de aspectos da virulência e da capacidade adaptativa destes fungos, há indícios de que possam ter evoluído em associação com hospedeiros vertebrados, apresentando uma fase saprófita no solo ou em fezes de animais e uma fase parasitária em tecidos do hospedeiro (BAGAGLI et al., 2006).

Paracoccidioides spp. possui como característica notável o dimorfismo térmico, apresentando-se a 25°C na forma micelial, com hifas finas e septadas e com colônias de aspecto cotonoso, que produzem os conídios (forma infectante). No hospedeiro, a 37°C, ocorre a conversão para a forma de levedura (parasitária/patogênica). Nesta forma, as células se tornam arredondadas ou ovais e apresentam brotamentos únicos ou múltiplos, com colônias de aspecto cerebriforme (BRUMMER, CASTANEDA & RESTREPO, 1993).

P. brasiliensis foi a primeira espécie descrita deste gênero (BRUMMER, CASTANEDA & RESTREPO, 1993), e mais recentemente foi descrita a nova espécie, *P. lutzii* (CARRERO et al., 2008, TEIXEIRA et al., 2009, THEODORO et al., 2012). *P. brasiliensis* classicamente constitui um complexo formado por quatro espécies crípticas: S1, PS2, PS3 e PS4. A partir de análises de sequências de loci mitocondriais, Turissini e colaboradores (2017) propuseram a reclassificação taxonômica das espécies crípticas PS2, PS3 e PS4 em espécies próprias: *P. americana*, *P. restrepiensis* e *P. venezuelensis*, respectivamente. A espécie S1 é subdividida em S1a e S1b, sendo encontradas principalmente no Brasil, Argentina e Paraguai. A PS2 ocorre predominantemente no Brasil, embora haja um relato na Venezuela. A espécie PS3 foi descrita inicialmente como restrita à Colômbia, no entanto alguns isolados clínicos do Brasil e da Venezuela foram reclassificados como PS3 em 2016. Enquanto a PS4 tem sido descrita até o momento somente na Venezuela e a espécie *P. lutzii* tem sido detectada

principalmente no Brasil e Equador (MATUTE et al., 2006; THEODORO et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2009, 2014; MUÑOZ et al., 2016; ROBERTO et al., 2016; TEIXEIRA et al., 2020). Foi observado que algumas destas espécies apresentam diferenças em relação à virulência, taxa de crescimento e resistência a fármacos (HAHN et al., 2003; TERÇARIOLI et al., 2007; TEIXEIRA et al., 2009).

1.2 PARACOCCIDIOIDOMICOSE

A PCM é uma micose sistêmica granulomatosa de importância médica que foi descrita pela primeira por Adolpho Lutz em 1908, em São Paulo (LUTZ, 1908). A infecção provavelmente ocorre por meio da inalação de propágulos dispersos no ambiente e é frequentemente assintomática (BUSTAMANTE et al., 1985).

O curso da infecção e a intensidade dos sintomas dependem tanto da virulência do fungo quanto da resposta imune do hospedeiro. O maior fator de risco à infecção está associado ao desempenho de atividades profissionais ligadas ao manejo do solo ou ao contato frequente com áreas rurais de zonas endêmicas, especialmente nas primeiras décadas de vida (WANKE & LONDERO, 1994; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). Tabagismo e alcoolismo também são fatores frequentemente associados ao desenvolvimento da doença. Há ainda relatos do desenvolvimento da PCM em pacientes imunossuprimidos (SILVA-VERGARA et al., 2000; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

A maioria dos indivíduos desenvolvem geralmente uma infecção pulmonar assintomática e a detecção da infecção pode ser realizada pelo teste intradérmico ou por detecção de células fúngicas latentes em necropsias (MONTENEGRO & FRANCO, 1994; SALZER et al., 2018). Estima-se que 10 milhões de pessoas estejam infectadas por *Paracoccidioides* spp. na América Latina, dos quais cerca de 1 a 2% poderão desenvolver a PCM doença (MC EWEN et al., 1995).

As formas clínicas da PCM doença são classificadas como aguda/subaguda/juvenil e crônica/do adulto (FRANCO et al., 1987). A forma aguda representa cerca de 5 a 25% dos casos de PCM e ocorre predominantemente em crianças e adolescentes/jovens adultos de ambos os sexos. Esta forma é

caracterizada por rápida progressão com frequente disseminação, podendo comprometer órgãos como o baço, fígado, linfonodos, pele e ossos (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006, 2017).

A forma crônica, que é a mais frequente, representa 74 a 94% dos casos. Acomete geralmente indivíduos com idade entre 30 e 60 anos, principalmente do sexo masculino. A razão de acometimento homem:mulher da forma crônica é de 22:1. Uma explicação para esta diferença seria a ação do hormônio beta-estradiol, presente em maior concentração nas mulheres e que inibe a conversão da forma de conídio para levedura, além de modular a resposta imune celular (SHANKAR et al., 2011; MARTINEZ, 2015). A manifestação clínica mais frequente é o acometimento pulmonar, que ocorre em 90% dos casos, embora possa haver disseminação para outros tecidos como mucosas, linfonodos, fígado e baço. Também é comum o acometimento mucocutâneo com o desenvolvimento de lesões ulceradas geralmente na face, em especial na região nasal e oral (MENDES, 1994; COSTA et al., 2013; RESTREPO, TOBÓN & CANO et al., 2015; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

A PCM ainda pode deixar sequelas nos pacientes, também chamadas de formas residuais, caracterizadas por alterações na função e estrutura nos tecidos decorrentes da doença e tratamento. São mais frequentes em pulmão, pele e mucosas, além de glândulas adrenais, sistema nervoso central e linfático (VALLE et al., 1995; TOBÓN et al., 2003; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

1.3 ÁREAS ENDÊMICAS PARA PCM HUMANA

A PCM é endêmica na América Latina, apresentando maior prevalência em países da América do Sul. O Brasil é responsável por cerca de 80% dos casos, seguido pela Venezuela, Colômbia, Equador e Argentina (RESTREPO et al., 2008; MARTINEZ, 2017). Nos países da América Central a endemicidade é baixa, e ao sul do México há uma área endêmica entre o Golfo do México e Costa do Pacífico (LÓPEZ-MARTINEZ et al., 2014). Casos esporádicos também foram reportados fora das áreas endêmicas, como nos Estados Unidos, diversos países da Europa, Marrocos e Japão. Estes pacientes relataram que viveram ou visitaram a América Latina algum tempo antes do desenvolvimento da doença (AJELLO &

POLONELLI, 1985; BUITRAGO & CUENCA-ESTRELLA, 2012; WAGNER et al., 2021).

No Brasil, as regiões Sudeste (São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo), Centro-Oeste (Goiás, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso) e Sul (Paraná e Rio Grande do Sul) concentram o maior número de casos reportados. Rondônia e Amazonas são os estados da região Norte com maior número de casos reportados. Com exceção do Maranhão, a região Nordeste apresenta baixa endemicidade, provavelmente devido ao clima semiárido (Figura 1) (MATUTE et al., 2006; MATOS et al., 2012; GOÉS et al., 2014; VIEIRA et al., 2014; MARTINEZ, 2015; TABORDA et al., 2015; SILVA et al., 2016; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

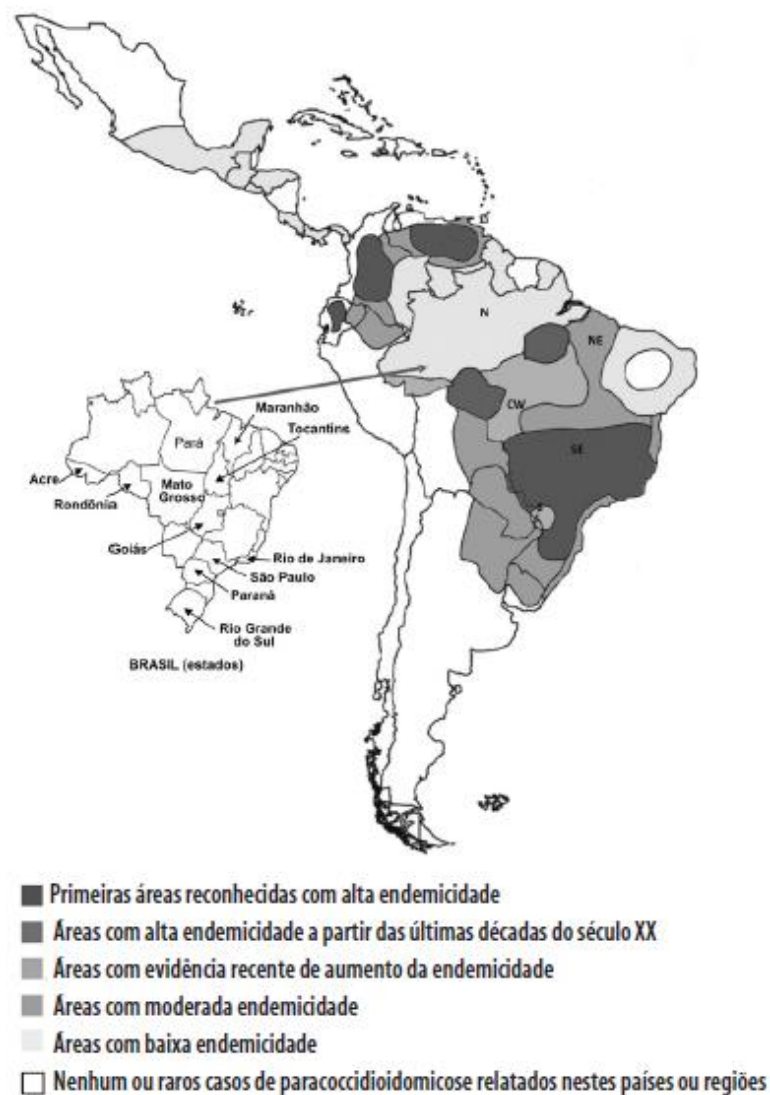


Figura 1 – Áreas endêmicas para PCM. Fonte: MARTINEZ, 2017 modificado por SHIKANAI-YASUDA et al., 2017.

Fatores antropogênicos como a expansão e modificação nas fronteiras agrícolas e migração humana, além de mudanças climáticas e ambientais estão levando a alterações na epidemiologia da PCM-infecção e PCM-doença (MARTINEZ, 2017). A ocorrência de mudanças climáticas decorrentes do fenômeno *El Niño* em uma região do estado de São Paulo elevou a umidade do solo e do ar, aumentando a incidência de PCM aguda após dois anos (BARROZO et al., 2009). No estado do Rio de Janeiro, cerca de um ano após a construção de uma rodovia, que envolveu desmatamento e remoção massiva de terra, a taxa de incidência de PCM aguda registrada na região foi 5,7 vezes maior que a dos últimos 27 anos (VALLE et al., 2017). Na região nordeste da Argentina, durante e após a construção da usina hidroelétrica de Yacyretá, houve períodos de aumento substancial no número de casos de PCM-infecção e PCM-doença em adultos e crianças, respectivamente (MANGIATERRA et al., 1999; GIUSIANO et al., 2019).

A PCM não é doença de notificação compulsória na maioria dos estados brasileiros, razão pela qual as taxas de incidência e prevalência não são precisas. Em áreas com incidência mais estável, estima-se que haja de 1 a 4 novos casos/100.000 habitantes/ano (BELLISSIMO-RODRIGUES, MACHADO & MARTINEZ, 2011). Em áreas hiperendêmicas essa taxa pode chegar a 9 a 40 casos/100.000 habitantes/ano (VIEIRA et al., 2014; MARTINEZ, 2017). Picos de incidência de PCM podem ocorrer temporariamente em regiões que sofrem grandes mudanças socioambientais (MARTINEZ, 2015).

No Brasil, a PCM é considerada a oitava causa de morte entre as doenças infecciosas e parasitárias, representando um grande problema de saúde pública (COUTINHO et al., 2002; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). A taxa anual de mortalidade por PCM entre 1996 e 2006 variou de 0,9 a 1,0 caso/1.000.000 habitantes, no entanto representou 51,2% das mortes relacionadas a micoses sistêmicas (PRADO et al., 2009). Outros estudos epidemiológicos trazem ainda percentuais de mortalidade entre 6,1 e 7,6% nos estados de Rondônia e Mato Grosso do Sul, respectivamente (PANIAGO et al., 2003; VIEIRA et al., 2014). No Paraná, estado localizado em uma das primeiras áreas de alta endemicidade identificadas no Brasil (MARTINEZ, 2017), a incidência de PCM entre 2007 e 2020 foi de 6,4 casos/100.000 habitantes e coeficiente de mortalidade de 1,17 casos por milhão (SUGUIURA & ONO, 2021).

Além disso, a doença é predominantemente crônica e resulta em sequelas nos pacientes, o que pode diminuir significativamente sua qualidade de vida, além de ser potencialmente incapacitante (MARTINEZ, 2015). Aliado a este fato, a falta de conscientização da comunidade médica sobre a PCM pode levar a uma demora ou a um diagnóstico e tratamento incorretos, podendo culminar em óbito do paciente (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

Considerando que *Paracoccidioides* spp. até o momento tem se mostrado geograficamente restrito à América Latina e a taxa de mortalidade por PCM é baixa quando comparada a outras doenças infecciosas, as agências públicas de saúde têm negligenciado a doença. No 2º Consenso Brasileiro em Paracoccidioidomicose, realizado em 2017, foi recomendada a criação de um sistema de registro nacional de casos e notificação compulsória dos casos de PCM provável e provada (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). Griffiths, Colombo & Denning (2019) ainda afirmam que a doença cumpre os critérios para ser reconhecida oficialmente pela Organização Mundial da Saúde como uma doença tropical negligenciada, podendo trazer maior atenção à PCM. No Brasil em 2020 a PCM foi incluída na Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública no âmbito do Sistema Único de Saúde (BRASIL, 2020a). Ainda neste ano, também foi incluída na Lista de Doenças Relacionadas ao Trabalho (BRASIL, 2020b).

1.4 ECOLOGIA

O habitat e o nicho ecológico de *Paracoccidioides* spp. não estão completamente definidos. Estudos epidemiológicos sugerem que o habitat do fungo seja o solo, onde acredita-se que cresça saprofiticamente, como ocorre com *Histoplasma capsulatum* e *Coccidioides immitis*, patógenos termodimórficos em que a associação com o solo está bem estabelecida (ZEIDBERG et al., 1952; KIRKLAND & FIERRER, 1996). No entanto, os relatos de isolamento de *Paracoccidioides* spp. a partir desta fonte são raros e não apresentaram reprodutibilidade. Por meio de técnicas de cultivo direto ou indireto foram obtidos isolados a partir de amostras de solo no Brasil (SHOME & BATISTA, 1963; SILVA-VERGARA et al., 1998), Argentina (NEGRONI, 1966) e Venezuela (ALBORNOZ, 1971). Outras tentativas de isolamento a partir de amostras de solo foram realizadas, mas sem sucesso (MENDELOVICI et

al., 1974; MONTENEGRO et al., 1996). Técnicas de biologia molecular também têm sido utilizadas para a detecção de *Paracoccidioides* spp. em amostras de solo e aerossol (THEODORO et al., 2005; ARANTES et al., 2013, 2016).

Diversos fatores podem explicar essa dificuldade na obtenção de isolados de amostras de solo. *Paracoccidioides* spp. possui alta demanda nutricional e crescimento lento, desenvolvendo-se melhor em solos ricos em matéria orgânica (RESTREPO, MCEWEN & CASTAÑEDA, 2001). Altos teores de alumínio trocável e baixas concentrações de oxigênio prejudicam ou impedem o seu crescimento (RESTREPO, JIMÉNEZ & BEDOUT, 1981; RESTREPO, 1985; TERÇARIOLI et al., 2007). Além disso, herbicidas, fungicidas e inseticidas agrícolas podem inibir o crescimento de *P. brasiliensis* (ONO et al., 2002). Um exemplo seria a substituição de extensas plantações de café por cana-de-açúcar. No cultivo da cana-de-açúcar são utilizados pesticidas em larga escala, além de ser realizada a queima do plantio, que ocasiona um aumento da temperatura do solo, podendo eliminar diversas espécies de microrganismos no solo, inclusive *Paracoccidioides* spp. (QUEIROZ-TELLES, 2008).

Estudos ecoepidemiológicos sugerem que o desenvolvimento de *Paracoccidioides* spp. na natureza está associado a regiões úmidas, com pluviosidade média a alta, temperaturas amenas e sem grandes variações, próximo a rios e lagos, florestas tropicais e subtropicais nativas e áreas com vegetação natural perturbada (CALLE, et al., 2001; RESTREPO, MC EWEN & CASTAÑEDA, 2001; BAGAGLI et al., 2003; SIMÕES, MARQUES & BAGAGLI, 2004; RESTREPO, GÓMEZ & TOBÓN, 2012).

1.5 DETECÇÃO DA INFECÇÃO POR MÉTODOS IMUNOLÓGICOS

Inicialmente a infecção por *P. brasiliensis* era detectada por meio de reação intradérmica com paracoccidioidina, um antígeno polissacarídico de *P. brasiliensis* (FAVA NETTO, 1961; CONTI-DIAS et al., 1972; COSTA et al., 1995). Posteriormente outras preparações antigênicas passaram a ser utilizadas, como os antígenos glicoproteicos, ou exoantígenos, que apresentam perfis proteicos variados, podendo conter glicoproteínas com massa de 15 a >200 kDa (BRUMMER et al., 1984; MENDES-GIANNINI et al., 1990; FAGUNDES et al., 2002; PETRONI et

al., 2017). Camargo e colaboradores (1988) padronizaram um exoantígeno muito utilizado até hoje por conter alta concentração da glicoproteína de 43 kDa (gp43).

A gp43 é reconhecida pela maioria dos pacientes com PCM por *P. brasiliensis*, e por esse motivo é o principal antígeno utilizado no imunodiagnóstico da PCM (PUCCIA et al., 1986; TRAVASSOS et al., 1995; SOUZA et al., 1997; ONO et al., 2001; CORTE et al., 2007; SBEGHEN et al., 2015). A gp43 é um antígeno exocelular de *P. brasiliensis* presente em ambas as formas do fungo, sendo secretada durante a infecção (SILVA et al., 2003; PALMEIRO et al., 2005). No entanto, a gp43 não pode ser utilizada para o diagnóstico de PCM por *P. lutzii*, uma vez que apresenta apenas 81% de similaridade com a Plp43, um ortólogo de *P. lutzii*. Além disso, a expressão de Plp43 é baixa durante a infecção (LEITÃO et al., 2014).

A gp43 nativa, purificada diretamente de cultura de *P. brasiliensis*, ainda pode apresentar reatividade cruzada com antígenos de outros fungos, como *Histoplasma capsulatum* e *Lacazia loboi*, em testes sorológicos por possuir resíduos de galactofuranose terminais em sua cadeia oligossacarídica (PUCCIA & TRAVASSOS, 1991). Também foi evidenciada uma possível reatividade cruzada entre gp43 e antígenos de *Leishmania* sp. (SUZUKI et al., 1997; SILVEIRA et al., 2006). Uma das formas de evitar a reatividade cruzada seria a produção de gp43 recombinante (gp43r) em *Escherichia coli*, uma vez que proteínas recombinantes expressas em bactérias não são glicosiladas (DINIZ et al., 2002; ASSUNÇÃO, 2012).

Dentre as metodologias mais utilizadas para diagnóstico sorológico da PCM encontram-se a imunodifusão dupla (ID), ensaio imunoenzimático (ELISA) e imunoblot (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). Dentre eles, destacam-se a ID e o ELISA. Por ser de simples execução, possuir baixo custo e alta especificidade, a ID tem sido o método mais utilizado para diagnóstico inicial de casos suspeitos de PCM. O ELISA tem sido muito utilizado tanto no diagnóstico como em estudos epidemiológicos da PCM.

1.6 DETECÇÃO MOLECULAR

Técnicas de biologia molecular têm sido utilizadas na detecção de *Paracoccidioides* spp. em amostras de tecidos, solo e aerossol. A reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variações, como a *Nested* PCR, tem sido amplamente empregadas na detecção de DNA fúngico em tecidos de hospedeiros e em amostras ambientais. As regiões gênicas mais utilizadas são as de espaçadores transcritos internos (ITS) em região de DNA ribossomal, uma vez que são mais conservadas e apresentam várias cópias por genoma, favorecendo sua detecção (THEODORO et al., 2005; ARANTES et al., 2013, 2016; RICHINI-PEREIRA et al., 2008, 2009a, 2009b, 2010; LOSNAK et al., 2018; KLUYBER et al., 2021; SCRAMIGNON-COSTA et al., 2021). *Primers* baseados em outras regiões gênicas também são utilizadas, como ARF e GP43 (BIALEK et al., 2000, MATUTE et al., 2006).

1.7 PCM EM ANIMAIS

A identificação de hospedeiros naturais pode contribuir para a elucidação de aspectos ecoepidemiológicos da PCM, uma vez que o isolamento do fungo a partir de amostras ambientais é difícil (ONO et al., 2001; SILVEIRA et al., 2008). A infecção por *Paracoccidioides* spp., principalmente *P. brasiliensis*, foi detectada em diversas espécies de animais domésticos e silvestres por diferentes metodologias, como a reação intradérmica, exame histopatológico, sorologia, biologia molecular e cultura.

O tatu é considerado um reservatório do fungo, uma vez a infecção por *Paracoccidioides* spp. tem sido extensivamente demonstrada neste animal, principalmente na espécie *Dasypus novemcinctus* (NAIFF et al., 1986; VIDAL et al., 1995; KUTI et al., 1998; MACEDO, LACERA & TRILLES REIS, 1998; BAGAGLI et al., 1998, 2003, 2021; CORREDOR et al., 1999; SILVA-VERGARA et al., 2000; FERNANDES et al., 2004; ARANTES et al., 2013; HRYCYK et al., 2018; KLUYBER et al., 2021). O tatu está em contato frequente com o solo devido aos hábitos de escavar túneis e se abrigar em tocas subterrâneas. Além disso, apresenta temperatura corpórea ideal para o crescimento do fungo, entre 30 e 35°C, e imunidade celular relativamente baixa (BOCCA et al., 2013). O isolamento de *P.*

brasiliensis foi realizado a partir de amostras de tecido deste animal e a presença do fungo foi detectada em amostras de solo coletadas de tocas, reforçando a hipótese de que é o habitat de *Paracoccidoides* spp. (BAGAGLI et al., 1998, 2003; SILVA-VERGARA & MARTINEZ, 1999; SILVA-VERGARA et al., 2000; ARANTES et al., 2013, 2016; HRYCYK et al., 2018).

Os cães também se infectam com frequência em áreas endêmicas para PCM e podem desenvolver a PCM doença. Os hábitos de cavar e farejar o solo provavelmente aumentam o risco de infecção, tornando-o um bom indicador da presença de *Paracoccidoides* spp. no ambiente (MÓS & FAVA-NETTO, 1974; ONO et al., 2001; RICCI et al., 2004; SILVEIRA et al., 2006; CANTEROS et al., 2010; FONTANA et al., 2010; FARIAS et al., 2011; CORTE et al., 2012; TELES et al., 2016; HEADLEY et al., 2017; MENDES et al., 2017; PETRONI et al., 2017). Além de cães, há relatos na literatura de PCM-doença em um macaco de cheiro da Bolívia (JOHNSON & LANG, 1977), um gato persa do Chile (GONZALES et al., 2010), e em uma preguiça-real da Guiana Francesa (TREJO-CHÁVEZ et al., 2011).

A infecção por *Paracoccidoides* foi detectada em diversas espécies de animais, como gatos (OLIVEIRA et al., 2013), coelhos (BELITARDO et al., 2014a), macacos (COSTA et al., 1995; CORTE et al., 2007), equinos (CONTI-DIAZ et al., 1972; COSTA & FAVA-NETTO, 1978; CORTE et al., 2009; ALBANO et al., 2015; MENDES et al., 2017), bovinos (GUTIERREZ et al., 1974; COSTA & FAVA-NETTO, 1978; SILVEIRA et al., 2008), ovelhas (COSTA & FAVA-NETTO, 1978; OLIVEIRA et al., 2012), cabras (FERREIRA et al., 2013), suínos (BELITARDO et al., 2014b), galinhas (OLIVEIRA et al., 2011), pombas (GALVÃO, 2011), inclusive em animais aquáticos como peixes (SUGUIURA et al., 2019) e golfinhos (MINAKAWA et al., 2016; VILELA et al., 2016). Também foi descrita a detecção de *P. brasiliensis* em morcegos e suas fezes (GROSE & TRAMSITT, 1965; PAZ et al., 2018) e em excretas de pinguim (GEZUELE et al., 1989). Outros estudos relataram ainda infecção em várias espécies de animais silvestres (RICHINI-PEREIRA et al., 2008, 2009b, 2010; ALBANO et al., 2014; SBEGHEN et al., 2015; LOSNAK et al., 2018; SCRAMIGNON-COSTA et al., 2021).

No Paraná, estado com o maior número de casos de PCM humana da região sul do Brasil (COUTINHO et al., 2002), a infecção por *P. brasiliensis* foi observada em várias espécies de animais. Corte e colaboradores (2007, 2009)

detectaram 30% de positividade em 100 amostras de soro de equinos e 44,5% em 93 amostras de soros de primatas por ELISA utilizando gp43. Oliveira e colaboradores (2011) analisaram soros de 183 galinhas, sendo 40 de vida livre do estado do Mato Grosso do Sul e 143 do Paraná (100 de vida livre e 43 de gaiola). Os animais criados em gaiola não apresentaram reatividade para gp43, enquanto as galinhas criadas soltas do Mato Grosso do Sul e do Paraná apresentaram percentuais de positividade de 55% e 16%, respectivamente. Galvão (2011), por sua vez, avaliou a infecção por *P. brasiliensis* em 113 amostras de soro de pombas (*Zenaida auriculata*) e observou uma diferença significativa na positividade de pombas capturadas no campus de uma universidade pública (83,7%) e em uma cooperativa agrícola (11,0%).

Oliveira e colaboradores (2012) observaram 37% de positividade para gp43 em 262 amostras de soro de ovinos. Oliveira e colaboradores (2013) ainda detectaram infecção por *P. brasiliensis* em gatos e observaram positividade de 48,8% em animais da área rural e 2,0% em animais da área urbana. Em um estudo com caprinos, de 202 amostras de soro analisadas, 26,2% foram positivas (FERREIRA et al., 2013). De 106 soros de suínos analisados por Belitardo e colaboradores (2014a), 37,7% das amostras se mostraram positivas. Belitardo e colaboradores (2014b) também avaliaram a infecção por *P. brasiliensis* em coelhos de vida livre e de gaiola. Os animais de vida livre apresentaram uma maior positividade (41,6%) em relação aos animais de gaiola (11,1%).

Suguiura e colaboradores (2019) detectaram a presença de anticorpos para gp43 de *P. brasiliensis* em tilápias-do-Nilo. De um total de 204 tilápias analisadas, 11,7% foram positivas. Adicionalmente, analisaram a presença de *P. brasiliensis* por PCR utilizando *primers* para a região ITS em 100 amostras de fígado (n= 33), encéfalo (n=32) e rim (n=35) e uma amostra de cada tecido de diferentes peixes foi positiva. Também no Paraná, Sbeghen e colaboradores detectaram a infecção por *P. brasiliensis* por sorologia e por *Nested* PCR com *primers* para região ITS em amostras de 38 mamíferos silvestres de pequeno porte, obtendo 23,7% de positividade no ELISA e na PCR em amostras de coração e fígado de um roedor da espécie *Oligoryzomys nigripes*.

Todos estes trabalhos demonstraram que várias espécies de animais domésticos e silvestres se infectam por *P. brasiliensis* e, portanto, podem ser utilizados como marcadores epidemiológicos da PCM.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a infecção por *P. brasiliensis* em cães e animais silvestres da região Norte do Estado do Paraná, Brasil.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Detectar a presença de anticorpos para *P. brasiliensis* em cães da cidade de Londrina, Paraná.

Avaliar a distribuição espacial da infecção por *P. brasiliensis* em cães da cidade de Londrina, Paraná.

Detectar *P. brasiliensis* por *Nested* PCR em amostras de tecido de animais silvestres atropelados em estradas da região Norte do Estado do Paraná.

Avaliar a distribuição espacial da infecção por *P. brasiliensis* em animais silvestres atropelados em estradas da região Norte do Estado do Paraná.

3 ARTIGO A

Paracoccidioidomycosis in dogs from an urban area in Northern Paraná, Brazil

ABSTRACT

Paracoccidioides brasiliensis is the main fungal species causing paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic mycosis endemic in Latin American countries, especially in Brazil. Paraná state (Southern Brazil) is a PCM endemic area. The detection of PCM in different animal species can contribute to elucidate ecological aspects of the fungus and helps mapping risk areas for PCM. This study aimed to evaluate the seroprevalence of PCM infection and disease, spatial distribution, and associated factors in dogs from a city in the northern region of Paraná, Brazil. A total of 627 canine sera samples from the northern (n= 186), southern (n= 94), eastern (n= 100), western (n= 172) and central (n= 75) regions of the urban area of Londrina city were analyzed by immunodiffusion (ID) and ELISA using *P. brasiliensis* B-339 exoantigen as antigen and Western blot (WB) using recombinant gp43 as antigen. Four dogs (0.64%) were positive in the ID test, suggesting active PCM disease. Three of these dogs were females. Infection by fungi was detected in 348 (55.5%) dogs by ELISA and PCM infection was confirmed by WB in 216 (34.4%) animals. Variables as sex, age, place of residence, hunting habit, access to street and access to forest did not have influence in susceptibility to infection by *P. brasiliensis*. These results reinforce the importance of dogs as sentinels of PCM in urban areas.

Key words: *Paracoccidioides brasiliensis*. Serology. ELISA. Immunodifusion. Epidemiological marker.

Introduction

Paracoccidioides brasiliensis is the etiological agent of paracoccidoidomycosis (PCM), a human systemic mycosis endemic in Latin America countries (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). Brazil holds most cases (~80%) and infection probably occur by inhalation of fungal propagules from soil (BUSTAMANTE et al., 1985). The infection by *P. brasiliensis* is often asymptomatic, however PCM disease may manifests as acute or chronic form. The acute form is more severe, but less frequent, affecting mainly young individuals. Chronic form is responsible for up to 96% of the PCM disease cases. It affects mainly man ageing

between 30 to 60 years that lived or were engaged in rural activities throughout life (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

The habitat of *P. brasiliensis* is not yet defined. It is believed to grow saprophytically in the soil although reports of fungal isolation from this source are scarce (FRANCO et al., 2000; MARTINEZ, 2017). Eco-epidemiological data associates *P. brasiliensis* development areas with medium to high rainfall rates, mild temperatures, proximity to rivers and lakes, areas with native and disturbed vegetation (RESTREPO, MCEWEN & CASTAÑEDA, 2001; BAGAGLI et al., 2003; MARTINEZ, 2017).

The identification of domestic and wild animals as natural hosts of *P. brasiliensis* helps mapping risk areas for PCM. Infection has been reported mainly in armadillos (NAIFF et al., 1986; VIDAL et al., 1995; BAGAGLI et al., 1998; FERNANDES et al., 2004; ALBANO et al., 2014), but also in monkeys (CORTE et al., 2007), cattle (SILVEIRA et al., 2008), chickens (OLIVEIRA et al., 2011), sheep (OLIVEIRA et al., 2012), cats (OLIVEIRA et al., 2013), goats, (FERREIRA et al., 2013), pigs (BELITARDO et al., 2014a), rabbits (BELITARDO et al., 2014b), small wild mammals (SBEGHEN et al., 2015) and fish (SUGUIRA et al., 2019) in Brazil.

PCM infection and PCM disease have been reported in dogs. Infection was detected in dogs from São Paulo (MÓS & FAVA-NETTO, 1974), Paraná (ONO et al., 2001), Minas Gerais (FONTANA et al., 2010), Rondônia (CORTE et al., 2012) and Rio Grande do Sul (TELES et al., 2016) states in Brazil and in Argentina (CANTEROS et al., 2010). Occurrence of PCM in dogs with leishmaniasis were also reported in Mato Grosso do Sul and São Paulo states (SILVEIRA et al., 2006; PETRONI et al., 2017).

Cases of natural PCM disease in dogs were reported only in Brazil until now. The first case occurred in São Paulo state, in an adult female Doberman presenting cervical lymphadenomegaly (RICCI et al., 2004). In Paraná state two cases were reported by Farias et al (2011) and Headley et al (2017) in a Doberman and a Labrador, respectively.

Considering the possibility of using dogs as sentinels for the presence of *P. brasiliensis*, the aim of this study was to evaluate the seroprevalence of PCM infection and PCM disease, spatial distribution, and associated factors in dogs from a city of the northern region of Paraná state, Brazil.

Materials and Methods

Study area

Londrina ($23^{\circ}18'36''\text{S}$ and $51^{\circ}09'46''\text{W}$) is located at the northern region of Paraná state, southern Brazil. It is the second largest city of the state, with a population of 506.701 habitants (IBGE, 2010). Londrina is placed at 603 m above sea level and has a humid subtropical climate with rainfall occurring all year long, more intensively in the summer. The average temperature and precipitation are 21°C and 1723 mm, respectively. The biome is composed by Atlantic Forest. Samples were collected from the urban region of Londrina (Figure 1).

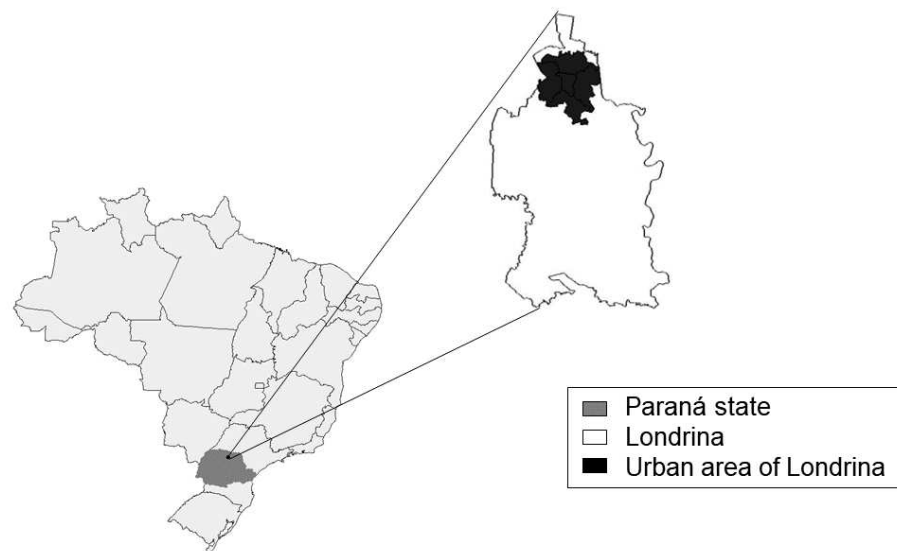


Figure 1 – Localization of the urban region of Londrina in relation to Brazil.

Ethics

The study was approved by the Animal Use Ethics Committee (protocol number 181/2014) of the State University of Londrina.

Blood sampling

Dog blood samples (n=627) were collected from a randomized and representative number of households of the urban area of Londrina. This area was divided in five regions: north (n=186), south (n=94), east (n=100), west (n=172) and central (n=75). Inclusion criteria: dogs aged 6 months or older and the presence of an 18 years or older owner. Exclusion criteria: aggressive dogs, or pregnant dogs. Blood collection occurred from July 2015 to July 2016 and was performed by a veterinarian after voluntarily signed consent by the respective owners. A questionnaire containing closed questions about socio-economic-environmental variables, animal behavior and management was also applied to the dog owners. Serum samples were stored at -20°C until use.

Exoantigen and recombinant gp43 (gp43r) obtention

Exoantigen from *P. brasiliensis* B-339 was produced as previously described by Camargo et al (1988) and gp43r was produced and purified according to Assunção (2012). Protein content of exoantigen and gp43r was quantified by Nanodrop (Thermo-Fisher Scientific, MA, USA).

Immunodiffusion (ID)

Serum samples were initially submitted to ID test using exoantigen, according to Camargo et al (1988). Positive control from a dog with PCM was added to all tests.

Indirect ELISA

A screening was performed by indirect ELISA using *P. brasiliensis* exoantigen. This assay was performed according to Oliveira et al (2011), with some modifications. Polystyrene flat-bottom microtiter plates (Costar Corporation, Corning, NY, USA) were initially coated with *P. brasiliensis* exoantigen (1,0 µg well⁻¹) in carbonate buffer. Serum samples were diluted at 1:100 in PBS 1% skim milk and anti-dog IgG-peroxidase conjugate (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) was used.

The substrate-chromogen solution used was H_2O_2 /tetramethylbenzidine and reaction was stopped with 4N H_2SO_4 . Absorbance was measured at 450 nm.

The positive (dog with PCM) and negative (pool of serum from dogs raised in apartment) controls were added to all assays. Samples were tested in duplicate. Cut off was defined as two-fold the absorbance of negative control.

Western blot (WB)

Serum samples positive in ID or ELISA assays were confirmed by WB test using gp43r. WB was performed according to Petroni et al (2017). Briefly, gp43r was submitted to 10% SDS-PAGE and transferred overnight to a nitrocellulose membrane at 4°C. After blocking with PBS 5% skim milk, membrane was cut into strips and washed with PBS-T. Serum samples diluted at 1:100 in 1% skim milk were added to the strips and incubated for 1 hour. After washing, strips were incubated with anti-dog IgG peroxidase. Reaction was revealed with a substrate solution (H_2O_2 /diaminobenzidine) and stopped with distilled water. A serum from a dog with PCM was added to all tests as positive control.

Statistical analysis

The Excel program was used to tabulate the epidemiological questionnaire variables and serological results. The EpiInfo 7.2.3.1 program and the R environment (R Core Team, 2016) were used for the Fisher Exact hypothesis tests and multiple logistic regression, considering a significance level of 5%.

Spatial distribution

The map of Figure 1 was developed using the software RStudio version 4.0.2 with packages geobr and ggplot2. The map of the urban area of Londrina city (Figure 2) was prepared using Google Earth Pro version 7.3. Satellite images from 2015 were retrieved and positive samples in ID test were identified by pins indicating their respective locations. The delimitation of the five regions (north, south, east, west, and central) was possible from the map import (in .kmz format)

available in the Portal of the City Hall of Londrina (<https://portal.londrina.pr.gov.br/downloads-siglon>).

Results

Overall prevalence of positivity in ID test, ELISA and WB are shown in Table 1. Positive ID test is suggestive of active PCM disease.

Table 1. Positivity and negativity percentages in immunodiffusion (ID), ELISA and western blot (WB) tests in dogs from the urban area of Londrina. Results are expressed as absolute value (n) and percentage (%).

Regions	ID		ELISA		WB	
	Positive n (%)	Negative n (%)	Positive n (%)	Negative n (%)	Positive n (%)	Negative n (%)
N	3 (0.5)	183 (29.2)	141 (22.5)	45 (7.2)	98 (15.6)	40 (6.4)
S	1 (0.2)	93 (14.8)	34 (5.4)	60 (9.6)	21 (3.3)	12 (1.9)
L	0 (0.0)	100 (15.9)	45 (7.2)	55 (8.8)	27 (4.3)	18 (2.9)
O	0 (0.0)	172 (27.4)	109 (17.4)	63 (10.0)	61 (9.7)	48 (7.7)
C	0 (0.0)	75 (12.0)	19 (3.0)	56 (8.9)	9 (1.4)	10 (1.6)
Total	4 (0.6)	623 (99.4)	348 (55.5)	279 (44.5)	216 (34.4)	128 (20.4)

Regions N= north; S= south; E = east; W= west; C= central.

The relation between dog sex, age, and residence region and seropositivity in ELISA was evaluated (Table 2). No statistical association was found between hunting habit, access to street, access to forest and ELISA positivity. Also, no statistical association was found between all variables and WB positivity.

Table 2. Final model of multiple logistic regression analysis of statistically significant variables associated with positivity for anti-*P. brasiliensis* antibodies by the ELISA in dogs from Londrina, Paraná state, Brazil ($P<0.05$).

Variables	Coefficient	Standard Error	P-value (Wald)	Adjusted OR (95% CI)
Sex				
Female				1.00
Male	0.1791	0.5430	0.002	1.72 (1.21-2.44)
Age group				
Puppy				1.00
Adult	0.7547	0.2500	0.003	2.13 (1.30-3.47)
Elderly	1.0108	0.2641	<0.001	2.75 (1,64-4.61)
Residence region				
Central				1.00
East	0.8822	0.3414	0.010	2.42 (1.24-4.72)
North	2.1685	0.3228	<0.001	8.75 (4.65-16.46)
West	1.6009	0.3660	<0.001	4.96 (2.67-9.21)
South	0.4632	0.3502	0.186	1.59 (0.80-3.16)
Intercept	-2.0012	0.3491		

CI= Confidence interval; OR= Odds ratio. Puppies: up to 1-year-old; Adult: 1 year and 1 month to 5 years and 11 months old; Elderly: 6-years-old and above.

Only four (0.6%) of 627 serum samples were positive in the ID test. Three dogs (0.5%) were from the north and one (0.2%) from the south region of the urban area of Londrina (Figure 2).

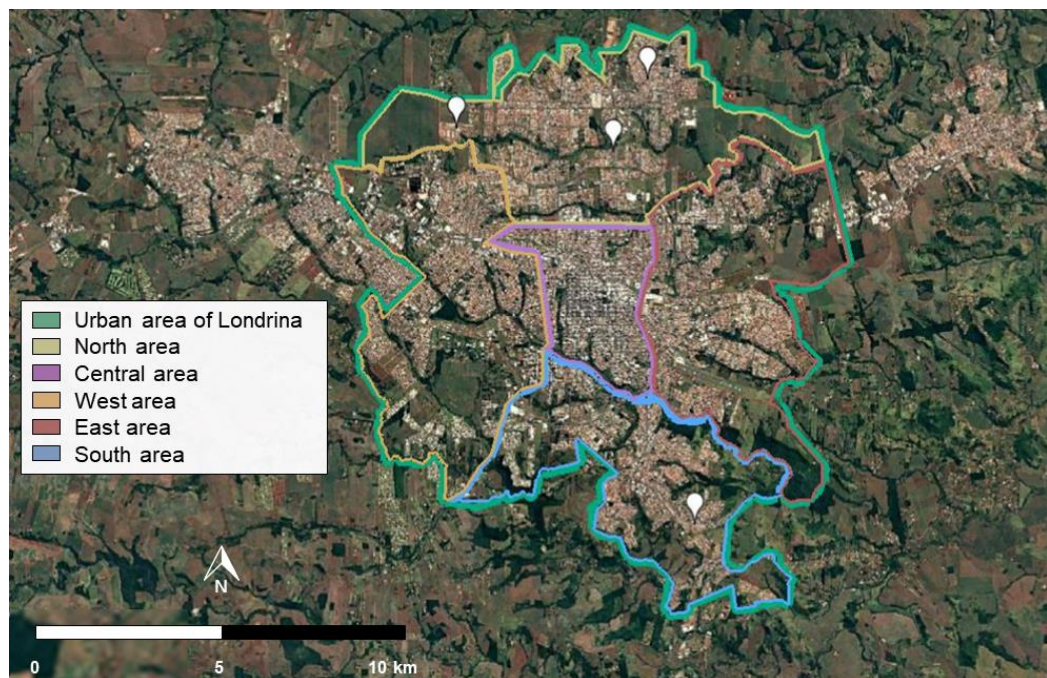


Figure 2. Areas of sample collection (satellite image from 2015). White pins represent the location of dogs positive in the ID test.

Discussion

Results of ELISA showed that male dogs may have more chances of being infected in relation to females. Also, elderly dogs also presented more chances of seropositivity comparing to puppies and dogs from north and west regions had higher chances to be infected. However, no variable had influence on the WB result, suggesting they may not influence PCM infection.

A study with dogs from the northern region of Paraná state was conducted by our group previously. Serum samples from 305 dogs were analyzed by ID with *P. brasiliensis* exoantigen and ELISA with purified gp43 as antigen. Rural dogs had a higher positivity (89.5%) than suburban (48.8%) and urban dogs (14.8%) in ELISA assay, but no positivity was observed in ID test. Also, no significant difference was observed in any of the groups among male and female dogs (ONO et al., 2001), just as the present study. Urban expansion may be one explanation for the higher percentages of dogs suggestive of PCM disease (0.6%) and infection (34.4%) in urban animals observed in the present study. The northern region of Paraná has had a crescent urbanization through the last decades, which involved deforestation and soil disturbance. In special, the north region of the urban area of Londrina had a construction of several new neighborhoods. Considering that the probable habitat of *P. brasiliensis* is the soil, when disturbed, both humans and animals may acquire the infection (BRUMMER, CASTANEDA & RESTREPO, 1993).

Other seroepidemiological studies in different Brazilian states have been reported. In Rondônia state, northern Brazil, Corte et al (2012) analyzed dog serum samples from Monte Negro city by ID test with exoantigen and ELISA with purified gp43. Results showed 54.8% positivity in ELISA test, but there was no statistical difference regarding dog sex. All samples were negative in the ID test. In Minas Gerais state, southwest Brazil, Fontana et al (2010) evaluated the presence of antibodies against *P. brasiliensis* in dogs from Uberaba city by ELISA with purified gp43. Rural dogs showed a higher percentage of positivity (80.5%) compared to urban dogs (53.7%). In Rio Grande do Sul state, south Brazil, Teles et al (2016) realized a study on stray and semi-domiciled dogs from Pelotas and Capão do Leão

cities. Serum samples were tested by ELISA with purified gp43, showing 29.6% of positivity. However, there was no significant difference for sex, age, and breed variables. These studies reinforce that urban dogs are exposed to *P. brasiliensis* infection also in urban areas in endemic regions, although variables such as sex and age may not play a role in susceptibility.

Despite the several studies reporting PCM infection in dogs, there are only three reports of natural PCM disease in this species (RICCI et al., 2004; FARIAS et al., 2011; HEADLEY et al., 2017), coincidentally all females. One of these reports occurred in the Northern Paraná region, in a 5-year-old female Labrador (HEADLEY et al., 2017). In the present study, 3 out of the 4 dogs suggestive of PCM disease were females. These results suggest that although male dogs have a higher risk of infection by fungi, female dogs have a higher risk of developing disease.

Conclusion

The high percentage of positivity in WB reinforces that PCM infection occurs frequently in dogs making this species a sensitive indicator of risk areas for human infection by *Paracoccidioides* spp..

References

ALBANO, A. P.; KLAFKE, G. B.; BRANDOLT, T. M.; DA HORA, V. P.; MINELLO, L. F.; JORGE, S.; SANTOS, E. O.; BEHLING, G. M.; CAMARGO, Z. P.; XAVIER, M. O.; MEIRELES, M. C. A. Wild animals as sentinels of *Paracoccidioides brasiliensis* in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Mycopathologia**, v. 177, n. 3-4, p. 207-215, 2014.

ASSUNÇÃO, T.R.S. Desenvolvimento de método para diagnóstico da paracoccidioidomicose humana utilizando antígeno recombinante de *Paracoccidioides brasiliensis*. 2012. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

BAGAGLI, E.; FRANCO, M.; BOSCO, S. M.; HEBELER-BARBOSA, F.; TRINCA, L. A.; MONTENEGRO, M. R. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. **Med Mycol**, v. 41, n. 3, p. 217-223, 2003.

BAGAGLI, E.; SANO, A.; COELHO, K. I.; ALQUATI, S.; MIYAJI, M.; CAMARGO Z. P.; GOMES, G. M.; FRANCO, M., MONTENEGRO, M. R. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an

endemic area of paracoccidioidomycosis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 58, n. 4, p. 505-512, 1998.

BELITARDO, D. R.; CALEFI, A. S.; BORGES, I. K.; DE OLIVEIRA, G. G.; SBEGHEN, M. R.; ITANO, E. N.; CAMARGO, Z. P.; ONO, M. A. Detection of Antibodies Against *Paracoccidioides brasiliensis* in Free-Range Domestic Pigs (*Sus scrofa*). **Mycopathologia**, v. 177, n. 1-2 p. 91-95, 2014a.

BELITARDO, D. R.; CALEFI, A. S.; SBEGHEN, M. R.; DE OLIVEIRA, G. G.; WATANABE, M. A. E.; DE CAMARGO, Z. P.; ONO, M. A. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Mycoses**, v. 57, n. 4, p. 222-227, 2014b.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clinical Microbiology Rev**, v. 6, p. 89–117, 1993.

BUSTAMANTE, B.; MC EWEN, J. G.; TABARES, A. M.; ARANGO, M.; RESTREPO, A. Characteristics of the conidia produced by the mycelial form of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Sabouraudia**, v. 23, p. 407-414, 1985.

CAMARGO, Z. P.; UNTERKIRCHER, C. S.; CAMPOY, S. P.; TRAVASSOS, L. R. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. **J Clin Microbiol**, v. 26, p. 2147-2151, 1988.

CANTEROS, C. E.; MADARIAGA, M. J.; LEE, W.; RIVAS, M. C.; DAVEL, G.; IACHINI, R. Endemic fungal pathogens in a rural setting of Argentina: Seroepidemiological study in dogs. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 27, p. 14-19, 2010.

CORTE, A. C.; GENNARI, S. M.; LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; ITANO, E. M.; FREIRE, R. L.; CAMARGO, Z. P.; ONO, M. A. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in dogs from Western Brazilian Amazon. **Pesq Vet Bras**, v. 32, n. 7, p. 649-652, 2012.

CORTE, A. C.; SVOBODA, W. K.; NAVARRO, I. T.; FREIRE, R. L.; MALANSKI, L. S.; SHIOZAWA, M. M.; LUDWIG, G.; AGUIAR, L. M.; PASSOS, F. C.; MARON, A.; CAMARGO, Z. P.; ITANO, E. N.; ONO, M. A. Paracoccidioidomycosis in wild monkeys from Parana State, Brazil. **Mycopathologia**, v. 164, n. 5, p. 225–228, 2007.

FARIAS, M. R.; CONDAS, L. A.; RIBEIRO, M. G.; BOSCO, S. M.; MURO, M. D.; WERNER, J.; THEODORO, R. C.; BAGAGLI, E.; MARQUES, S. A.; FRANCO, M. Paracoccidioidomycosis in a dog: case report of generalized lymphadenomegaly. **Mycopathologia**, v. 172, n. 2, p. 147-152, 2011.

FERNANDES, G. F.; DEPS, P.; TOMIMORI-YAMASHITA, J.; CAMARGO, Z. P. IgM and IgG antibody response to *Paracoccidioides brasiliensis* in naturally infected wild armadillos (*Dasypus novemcinctus*). **Med Mycol**, v. 42, n. 4, p. 363-368, 2004.

FERREIRA, J. B.; NAVARRO, I. T.; FREIRE, R. L.; OLIVEIRA, G. G.; OMORI, A. M.; BELITARDO, D. R.; ITANO, E. N.; CAMARGO, Z. P.; ONO, M. A. Evaluation of

Paracoccidioides brasiliensis Infection in Dairy Goats. **Mycopathologia**, v. 176, n. 1–2, p. 95–99, 2013.

FONTANA, F. F.; SANTOS, C. T. B.; ESTEVENS, F. M.; ROCHA, A.; FERNANDES, G. F.; AMARAL, C. C.; DOMINGUES, M. A.; CAMARGO, Z. P.; SILVA-VERGARA, M. L. Seroepidemiological survey of paracoccidioidomycosis Infection among urban and rural dogs from Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Mycopathologia**, v. 169, p. 159-165, 2010.

FRANCO, M.; BAGAGLI, E.; SCAPOLIO, S.; DA SILVA LACAZ, C. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. **Med Mycol**, v. 38, p. 185-191, 2000.

HEADLEY, S. A.; PRETTO-GIORDANO, L. G.; DI SANTIS, G. W.; GOMES, L. A.; MACAGNAN, R.; DA NÓBREGA, D. F.; LEITE, K. M.; DE ALCÂNTARA, B. K.; ITANO, E. N.; ALFIERI, A. A.; ONO, M. A. *Paracoccidioides brasiliensis*-associated dermatitis and lymphadenitis in a dog. **Mycopathologia**, v. 182, n. 3-4, p. 425-434, 2017.

IBGE, 2010: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística: Censo demográfico 2010. Available at: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pr/londrina/panorama> (accessed on February 15 2022).

MARTINEZ, R. New trends in paracoccidioidomycosis epidemiology. **J Fungi**, v. 3, n. 1, p. 1, 2017.

MÓS, E. N. & FAVA-NETTO, C. Contribuição ao estudo da paracoccidioidomicose. I - Possível papel dos cães: Estudo sorológico e anatomo-patológico. **Revta Inst Med Trop**, v. 16, p. 154-159, 1974.

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

OLIVEIRA, G. G.; BELITARDO, D. R.; BALARIN, M. R. S.; FREIRE, R. L.; CAMARGO, Z. P.; ONO, M. A. Serological Survey of Paracoccidioidomycosis in Cats. **Mycopathologia**, v. 176, n. 3, p. 299-302, 2013.

OLIVEIRA, G. G.; NAVARRO, I. T.; FREIRE, R. L.; BELITARDO, D. R.; SILVEIRA, L. H.; CAMARGO, Z. P.; ITANO, E. N.; ONO, M. A. Serological survey of Paracoccidioidomycosis in sheep. **Mycopathologia**, v. 173, n. 1, p. 63-68, 2012.

OLIVEIRA, G. G.; SILVEIRA, L. H.; ITANO, E. N.; SOARES, R. M.; FREIRE, R. L.; WATANABE, M. A. E.; CAMARGO, Z. P.; ONO, M. A. Serological evidence of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in chickens from Paraná and Mato Grosso do Sul states, Brazil. **Mycopathologia**, v. 171, p. 197–202, 2011.

ONO, M. A.; BRACARENSE, A. P. F. R. L.; MORAIS, H. A.; TRAPP, S. M.; BELITARDO, D. R.; CAMARGO, Z. P. Canine paracoccidioidomycosis: A seroepidemiologic study. **Medical Mycology**, v. 39, p. 277-282, 2001.

PETRONI, T. F.; BONFIETTI, L. X.; ZANINELLI, T. H.; ITANO, E. N.; ONO, M. A. Serological Evidence of Infection by *Paracoccidioides brasiliensis* in Dogs with Leishmaniasis. **Mycopathologia**, v. 182, n. 9-10, p. 947-952, 2017.

RESTREPO, A.; MCEWEN J. G.; CASTAÑEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Medical Mycology**. Colômbia. v. 39, n. 3, p. 233-241, 2001.

RICCI, G.; MOTA, F. T.; WAKAMATSU, A.; SERAFIM, R. C.; BORRA, R. C.; FRANCO, M. Canine paracoccidioidomycosis. **Med Mycol**, v. 42, n. 4, p. 379-383, 2004.

SBEGHEN, M. R.; ZANATA, T. B.; MACAGNAN, R.; DE ABREU, K. C.; DA CUNHA, W. L.; WATANABE, M. A.; CAMARGO, Z. P.; ONO, M. A. *Paracoccidioides brasiliensis* Infection in Small Wild Mammals. **Mycopathologia**, v. 180, n. 5-6, p. 435-440, 2015.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; MENDES, R. P.; COLOMBO A. L.; QUEIROZ-TELLES, F.; KONO, A. S. G.; PANIAGO, A. M. M.; NATHAN, A.; VALLE, A. C. F.; BAGAGLI, E.; BENARD, G.; FERREIRA, M. S.; TEIXEIRA, M. M.; SILVA-VERGARA, M. L.; PEREIRA, R. M.; CAVALCANTE, R. S.; HAHN, R.; DURLACHER, R. R.; KHOURY, Z.; CAMARGO, Z. P.; MORETTI, M. L.; MARTINEZ, R. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 715-740, 2017.

SILVEIRA, L. H.; DOMINGOS, I. H.; KOUCHI, K.; ITANO, E. N.; SILVA, E. A.; LANDGRAF, V. O.; WERNEC, S. M.; CAMARGO, Z. P.; ONO, M. A. Serological detection of antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* in dogs with leishmaniasis. **Mycopathologia**, v. 162, n. 5, p. 325-329, 2006.

SILVEIRA, L. H.; PAES, R. C.; MEDEIROS, E. V.; ITANO, E. N.; CAMARGO, Z. P.; ONO, M. A. Occurrence of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in dairy cattle from Mato Grosso do Sul, Brazil. **Mycopathologia**, v. 165, p. 367–371, 2008.

SUGUIURA, I. M. S.; MACAGNAN, R.; OMORI, A. M.; BUCK, E. L.; SCARPASSA, J. A.; PRETTO-GIORDANO, L. G.; VILAS-BOAS, L. A.; CAMARGO, Z. P.; ITANO, E. N.; ONO, M. A. First report of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in fish. **Med Mycol**, v. 58, n. 6, p. 737-743, 2019.

TELES, A. J.; KLAFKE, G. B.; CABANA, Â. L.; ALBANO, A. P.; XAVIER, M. O.; MEIRELES, M. C. Serological Investigation into *Paracoccidioides brasiliensis* Infection in Dogs from Southern Rio Grande do Sul, Brazil. **Mycopathologia**, v. 181, n. 3-4, p. 323-328, 2016.

VIDAL, M. S.; DE MELO, N. T.; GARCIA, N. M.; DEL NEGRO, G. M.; DE ASSIS, C. M.; HEINS-VACCARI, E. M.; NAIFF, R. D.; MENDES, R. P.; LACAZ, C. S. *Paracoccidioides brasiliensis*: A mycologic and immunochemical study of a sample isolated from an armadillo (*Dasipus novencinctus*). **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 37, n. 1, p. 43-49, 1995.

4 ARTIGO B

First report of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in brown hare (*Lepus europaeus*) and black vulture (*Coragyps atratus*)

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a human systemic mycosis caused by thermally dimorphic fungi of *Paracoccidioides* genus, mainly *P. brasiliensis* species. PCM has been reported also in several species of domestic and wild animals. Monitoring diseases in wild animals can contribute to the elucidation of transmission forms of infectious diseases, their ecological impact and mapping risk areas for humans. Molecular methods have been successfully employed for detection of several pathogens in road-killed animals. The aim of this study was to detect *P. brasiliensis* infection by PCR in organs of road-killed wild animals retrieved on highways from cities in the northern region of Paraná state, Southern Brazil. Tissue samples (liver, lymph nodes, lungs, and spleen) from 87 animals belonging to 34 species were collected and submitted to DNA extraction. Nested PCR was performed with the panfungal primers ITS 4/5 in the first round and specific primers for *P. brasiliensis* Pb ITS E/R in the second round. *P. brasiliensis* DNA was amplified from liver and spleen samples of one black vulture (*Coragyps atratus*) and one lung sample of a brown hare (*Lepus europaeus*), reinforcing that infection by this pathogen occurs in several wild animals' species. This is the first report of *P. brasiliensis* detection in black vulture and brown hare.

Key words: Paracoccidioidomycosis. Nested PCR. Eco-epidemiology. Wild fauna. Epidemiological marker.

Introduction

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a human systemic mycosis of major health importance in Latin America, caused by thermally dimorphic fungi of *Paracoccidioides* genus. *P. brasiliensis* complex comprises the cryptic species S1, subdivided in S1a and S1b; PS2 (*P. americana*); PS3 (*P. restrepiensis*) and PS4 (*P. venezuelensis*). It was observed that one isolate did not align with *P. brasiliensis* cluster in phylogenetic analyses, being identified as the new species *P. lutzii* (MATUTE et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2009; THEODORO et al., 2012; MUÑOZ et al., 2016; TURISSINI et al., 2017).

The infection probably occurs by inhalation of airborne propagules of the mycelial phase of the fungus. PCM is highly related to activities involving soil disturbance and the development of the disease will depend on fungal virulence and host immune response. PCM disease presents clinically as acute/subacute or chronic form. Cases of acute PCM are less common (5 a 25%) but more severe. Despite having a long latency period, chronic PCM represents 74 a 94% of the cases, affecting mainly male rural workers (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

The habitat and ecological niche of *Paracoccidioides* spp. is not yet defined. Only a few studies were able to successfully isolate the fungus from soil samples in a cattle farm in Pernambuco state (SHOME & BATISTA, 1963) and in a coffee plantation in Minas Gerais state (SILVA-VERGARA et al., 1998), in Brazil; in a rural area in Argentina (NEGRONI, 1966) and Venezuela (ALBORNOZ, 1971). Epidemiological studies have shown that *P. brasiliensis* is associated with some environmental characteristics such as mild temperatures, medium to high rainfall, proximity to water bodies and areas with native and disturbed vegetation (RESTREPO, MCEWEN & CASTAÑEDA, 2001; BAGAGLI et al., 2003; MARTINEZ, 2017).

Anthropogenic factors such as expansion and modifications in agricultural frontiers and human migration, as well as climate and environmental changes are altering PCM epidemiology (MARTINEZ, 2017). Urban expansion also affects wild fauna because construction of highways often involves massive deforestation, causing ecological disturbances. The increasing of car flow may interfere with natural migration of wild animal species and raise cases of road-killed animals (FORMAN & ALEXANDER, 1998).

Monitoring diseases in wild animals can be useful for elucidating transmission forms of infectious diseases and their ecological impact (FRÖLICH et al., 2002). Also, studies with road-killed animals are in line with current discussions on bioethics, which prioritize alternative methods for the use of animals in research, without the need of euthanasia (RICHINI-PEREIRA et al., 2010). Wild fauna can be a great source of information because they are considered excellent indicators of environmental quality, as they demonstrate, through the agents they harbor, the imbalances of the environment to which they are exposed (THOMPSON, KUTZ & SMITH, 2009).

P. brasiliensis infection was detected in wild animals such as armadillos (NAIFF et al., 1986; VIDAL et al., 1995; KUTI et al., 1998; MACEDO, LACERA & TRILLES REIS, 1998; BAGAGLI et al., 1998, 2003, 2021; CORREDOR et al., 1999; SILVA-VERGARA et al., 2000; FERNANDES et al., 2004; HRYCYK et al., 2018; KLUYBER et al., 2021), monkeys (JOHNSON & LANG, 1977; COSTA et al., 1995; CORTE et al., 2007), bats (GROSE & TRAMSITT, 1965; PAZ et al., 2018), small rodents (SBEGHEN et al., 2015). This pathogen has also been detected in road-killed armadillos, guinea pig, porcupines, raccoons, and anteaters in São Paulo state (RICHINI-PEREIRA et al., 2008, 2009, 2010), russet and small rodents from Santa Catarina state (LOSNAK et al., 2018), lowland paca from Rio de Janeiro state, armadillos and crab-eating foxes from Rio de Janeiro and Minas Gerais states (SCRAMIGNON-COSTA et al., 2021) in Brazil.

Depending on the conservative state of the carcasses and the size of animal, molecular detection can be one of the best options when investigating the presence of a pathogen. Methods such as polymerase chain reaction (PCR) have high specificity and sensitivity (PERSING et al., 1993).

The present study aimed to detect infection by *P. brasiliensis* in road-killed wild animals from the northern region of Paraná state, Brazil, a PCM endemic area.

Materials and Methods

Study area and georeferencing

Animal collection was carried out on highways from municipalities in the Northern region of Paraná state, Brazil. The climate of this region is mainly humid subtropical, and the biome is composed by Atlantic Forest.

The place of each animal collection was mapped using the global positioning system (GPS) with the mobile app My GPS Coordinators with an accuracy of 3 meters. The coordinate reference system used was EPSG:31981 and spatial analysis of the occurrence was performed with QGIS (Geographic Information System), version 2.14.1.

Ethics

The study was approved by the Ethics Committee on Animal Use of the State University of Londrina (30/2017) and by the System of Authorization and Information on Biodiversity, number 55384-1, 2016.

Animal collection

Road-killed animals (n= 87) were collected from November 2016 to October 2018. Only carcasses with fresh condition of conservation (less than 24 hours from death), without evisceration and with absence of fly larvae were collected. Carcasses were transported in bags for biological material and kept at -4°C until necropsy, that was performed between 3 to 12 hours after animal collection. The species were identified, and organs fragments (liver, lungs, spleen, and a pool of popliteal and/or submandibular and/or prescapular and/or inguinal lymph nodes) were collected for molecular analysis. Animals collected in this study included mammals (n=66, 75.9%), birds (n=17, 19.5%) and reptiles (n=4, 4.6%) from 34 different species (Table 1). Samples were previously used in Caldart et al. (2021) study.

Table 1. Scientific and popular name, number and percentage of animals collected.

Animal type	Scientific name	Popular name	Number of animals (%)
	<i>Athene cunicularia</i>	Burrowing Owl	2 (2.3)
	<i>Caracara plancus</i>	Southern Caracara	1 (1.1)
	<i>Colaptes melanochloros</i>	Green-barred Woodpecker	1 (1.1)
	<i>Columbia livia</i>	Domestic Pigeon	1 (1.1)
	<i>Columbina minuta</i>	Plain-breasted Ground-dove	1 (1.1)
	<i>Coragyps atratus</i>	Black Vulture	2 (2.3)
	<i>Crypturellus tataupa</i>	Tataupa Tinamou	1 (1.1)
Birds	<i>Guira guira</i>	Guira Cuckoo	1 (1.1)
	<i>Megascops choliba</i>	Tropical Screech Owl	1 (1.1)
	<i>Patagioenas picazuro</i>	Picazuro Pigeon	1 (1.1)
	<i>Pitangus sulphuratus</i>	Great Kiskadee	1 (1.1)
	<i>Rhynchotus rufescens</i>	Red-winged Tinamou	1 (1.1)
	<i>Selenidera maculirostris</i>	Spot-billed Toucanet	1 (1.1)
	<i>Thraupis sayaca</i>	Sayaca Tanager	1 (1.1)
	<i>Vanellus chilensis</i>	Southern Lapwing	1 (1.1)

	<i>Cavia aperea</i>	Brazilian Guinea Pig	3 (3.4)
	<i>Cerdocyon thous</i>	Crab-eating Fox	5 (5.7)
	<i>Coendou spinosus</i>	Hairy Dwarf Porcupine	2 (2.3)
	<i>Dasypus novemcinctus</i>	Nine-banded Armadillo	4 (4.6)
	<i>Didelphis albiventris</i>	White-eared Possum	25 (28.7)
	<i>Galactis cuja</i>	Lesser Grison	1 (1.1)
	<i>Hidrochoerus hidrocaeris</i>	Capybara	2 (2.3)
	<i>Leopardus guttulus</i>	Southern Tiger Cat	4 (4.6)
Mammals	<i>Leopardus pardalis</i>	Ocelot	1 (1.1)
	<i>Leopardus wiedii</i>	Margay	1 (1.1)
	<i>Lepus europaeus</i>	Brown Hare	1 (1.1)
	<i>Mazama gouazoubira</i>	Gray Brocket Deer	1 (1.1)
	<i>Nasua nasua</i>	South American Coati	5 (5.7)
	<i>Procyon cancrivorus</i>	Crab-eating Raccoon	1 (1.1)
	<i>Puma concolor</i>	Puma	2 (2.3)
	<i>Sapajus apella</i>	Margarita Island Capuchin	4 (4.6)
	<i>Tamandua tetradactyla</i>	Southern Tamandua	4 (4.6)
Reptiles	<i>Salvator merianae</i>	South-American Tegu Lizard	3 (3.4)
	<i>Trachemys scripta</i>	Pond Slider	1 (1.1)

DNA extraction

DNA was extracted from 208 samples: liver (n= 65), lymph nodes (n= 37), lungs (n= 78) and spleen (n= 28) using the Pure Link Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) following manufacturer's instructions. Extracted DNA was quantified in Nanodrop (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and concentration adjusted to 30 ng/ μ L. Samples were stored at -20°C until use.

Nested PCR

In Nested PCR were used primers targeting internal transcribed spacers (ITS) regions from ribosomal DNA. In the first round the pan-fungal outer primers ITS 4 (5'-TCC TCC GCT TAT TEA TAT GC-3') and ITS 5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') were used at the annealing temperature of 60°C, producing a 634 bp fragment (WHITE et al., 1990). In the second round the set of internal primers Pb ITS-E (5'-GAG CTT TGA CGT CTG AGA CC-3') and Pb ITS-R (5'-AAG GGT GTC GAT CGA GAG AG-3') was used to detect *P. brasiliensis*.

Annealing temperature was 62°C, producing a fragment of 387 bp (THEODORO et al., 2005).

PCR conditions in thermal cycler were: initial denaturation step for 10 min, followed by 35 cycles of: 94°C for 30 sec, annealing for 30 sec and 72°C for 45 sec; followed by a final extension at 72°C for 10 min. Reaction mix contained 15 µL of ultrapure water, 2.5 µL of 10X buffer, 1.0 µL of each primer at 10 ng/µL, 0.75 µL of 50 mM magnesium chloride, 2.0 µL of 1.25 µM dNTP mix, 0.25 µL of Taq polymerase (Invitrogen™ by Life Technologies, São Paulo, Brazil) and 2.5 µL of template DNA, in a final volume of 25 µL. Ultrapure water was used as negative control. DNA extracted from *P. brasiliensis* B-339 was used as a positive control.

Amplicons were submitted to 2% agarose gel electrophoresis and visualized in the Safe Imager™ Blue-Light Transilluminator after staining by SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific, CA, USA). The size of the fragments was estimated based on comparison with a 100 bp ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Results and Discussion

Most animals in this study were retrieved from Londrina municipality (Figure 1). The most frequently found animal species were white-eared opossum (n= 25), followed by crab-eating fox (n= 5) and South American coati (n= 5).

It was not possible to recover all four organs from all animals to perform DNA extraction for reasons such as animal size, especially spleen and lymph nodes of small birds and mammals, and conservation state of the carcass. Some organs could not be collected due to complete rupture or advanced degree of autolysis, the last occurring mainly in carcasses with intestinal rupture or animals run over on hot and humid days.

Other studies detected *P. brasiliensis* DNA in road-killed wild fauna by Nested PCR with primers ITS 4/5 and Pb ITS E/R (RICHINI-PEREIRA et al., 2008, 2009, 2010; LOSNAK et al., 2018; SCRAMIGNON-COSTA et al., 2021). In the present study, liver and spleen samples of one black vulture (*C. atratus*, 1.1%) and a lung sample of a brown hare (*L. europaeus*, 1.1%) were positive by Nested PCR

(Figure 1). Infection of these species by *P. brasiliensis* has not yet been reported in the literature.

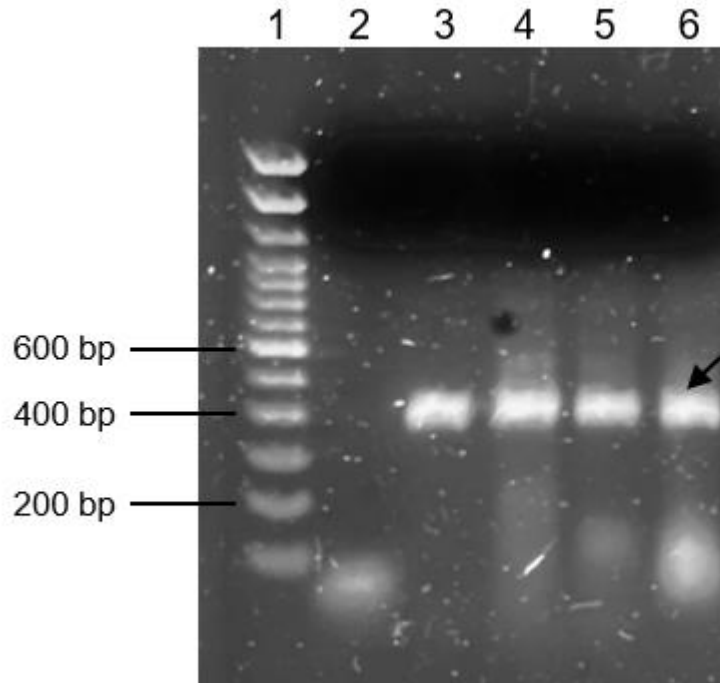


Figure 1. Positive samples after PCR with primers Pb ITS E/R in agarose gel electrophoresis with staining. 1= 100 pb molecular weight marker; 2= Negative control; 3= Positive control (*P. brasiliensis* B-339); 4= Brown hare lung; 5= Black vulture liver; 6= Black vulture spleen. The arrow indicates the region of amplification of 387 bp.

The black vulture was collected from a rural area of Uraí municipality, near an agricultural site and with some rural worker's houses. The hare was gathered from an urban area of Londrina municipality, in a place with some houses, building constructions sites with soil exposure and next to a valley bottom. Both animals were adult males recovered in places with disturbed vegetation and near a water course (Figure 2). The characteristics of these collection sites are in accordance with epidemiological data on *P. brasiliensis* occurrence.

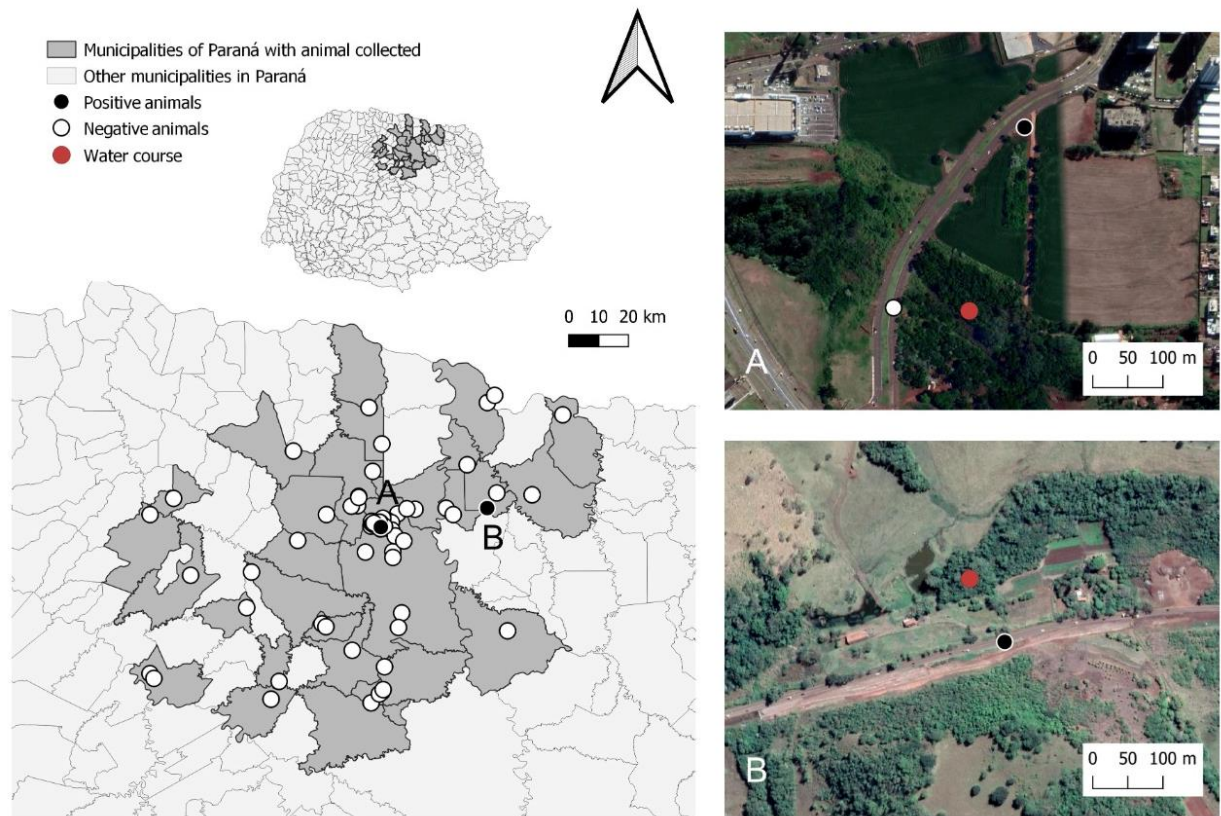


Figure 2. Distribution of road-killed wild animals and collection sites of animals positive for *P. brasiliensis* in this study. A = Hare (*L. europaeus*) in Londrina municipality and B = Black vulture (*C. atratus*) in Uraí municipality.

Other studies attempted to detect *P. brasiliensis* DNA in animals from the Leporidae family, without success (RICHINI-PEREIRA et al., 2010; LOSNAK et al., 2018). *L. europaeus* is an exotic, generalist herbivore, nocturnal mammal species. This species has a high ecological plasticity and is found in both native vegetation and areas with pastures and agricultural areas common in Southern and Southeastern Brazil (AURICCHIO & OLMOS, 1999). *L. europaeus* is attracted to the edges of highways, increasing its risk of roadkill (ROEDENBECK & VOSER, 2008). The hare positive in Nested-PCR was found on the street of an urban area of Londrina municipality next to building construction sites, in a wooded area with some native vegetation and near a lake. This environmental characteristic is in accordance with *P. brasiliensis* epidemiological studies (RESTREPO, MCEWEN & CASTAÑEDA, 2001; BAGAGLI et al., 2003; MARTINEZ, 2017). Our group previously carried out a seroepidemiological study of paracoccidiodomycosis in caged and free-range rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), a species close to *L. europaeus*. The overall positivity observed by ELISA was 27.0% and free-range animals showed a significantly higher

positivity (34.6 – 51.7%) than the caged ones (11.1%), reinforcing that the frequent contact with soil increases the risk of infection (BELITARDO et al., 2014).

The other animal species positive for *P. brasiliensis* in the present study, *C. atratus*, is a bird commonly named as black vulture or black-headed vulture, found in North and South America in several types of habitats and is well adapted to the fragmentation of the landscape caused by human activity (KIRK & MOSSMAN, 1998). Due to the important sanitizing role that they play in the ecosystem, feeding mainly on animal carcasses in different states of decomposition, vultures may be exposed to different types of infectious agents (FERGUSON-LEES & CHRISTIE, 2001; SICK, 1997).

Although birds have a higher body temperature than mammals (PRINZINGER, PREBMAR & SCHLEUCHER, 1991) the infection of pigeons and chickens by *P. brasiliensis* have been reported. Galvão (2011) analyzed serum samples of 113 pigeons (*Zenaida auriculata*) from Londrina municipality, Paraná state, with ELISA using *P. brasiliensis* specific antigen, gp43. Pigeons from the campus of a public university presented a higher positivity (83.7%) than animals from an agricultural cooperative (11.0%). Using similar methodology, Oliveira et al (2011) detected 16% of positivity in free-ranged chickens (*Gallus domesticus*) from Paraná state.

The characteristics and habits of these animals increase their exposure to contaminated soil and their habitat are in accordance with areas where *P. brasiliensis* may occur. Despite not presenting a zoonotic behavior, PCM fits in the One Health concept and concern, because this disease affects both humans and animals and the incidence is changing due to human and environmental factors. This connection between people, animals, and the environment is the major pillar of the One Health (WHO, 2017).

Conclusion

This is the first report of *P. brasiliensis* DNA detection in black vulture (*C. atratus*) and brown hare (*L. europaeus*). Detection of *P. brasiliensis* in road-killed wild animals have a great potential for use in eco-epidemiological surveillance of PCM, thus helping map risk areas for humans as well as understanding eco-epidemiological aspects of the disease.

References

- ALBORNOZ, M. B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. **Sabouraudia**, v. 9, p. 248-253, 1971.
- AURICCHIO, P. & OLMOS, F. Northward Range Extension for the European Hare, *Lepus europaeus* Pallas, 1778 (Lagomorpha Leporidae) in Brazil. **Publicações Avulsas do Instituto Pau Brasil**, v. 2, 1999.
- BAGAGLI, E.; FRANCO, M.; BOSCO, S. M.; HEBELER-BARBOSA, F.; TRINCA, L. A.; MONTENEGRO, M. R. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. **Med Mycol**, v. 41, n. 3, p. 217-223, 2003.
- BAGAGLI, E.; MATUTE, D. R.; GARCES, H. G.; TENÓRIO, B. G.; GARCES, A. G.; ALVES, L. G. B.; YAMAUCHI, D. H.; HRYCYK, M. F.; BARKER, B. M.; TEIXEIRA, M. M. *Paracoccidioides brasiliensis* Isolated from Nine-Banded Armadillos (*Dasypus novemcinctus*) Reveal Population Structure and Admixture in the Amazon Basin. **J Fungi (Basel)**, v. 7, n. 1, p. 54, 2021.
- BAGAGLI, E.; SANO, A.; COELHO, K. I.; ALQUATI, S.; MIYAJI, M.; CAMARGO Z. P.; GOMES, G. M.; FRANCO, M., MONTENEGRO, M. R. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 58, n. 4, p. 505-512, 1998.
- BELITARDO, D. R.; CALEFI, A. S.; SBEGHEN, M. R.; DE OLIVEIRA, G. G.; WATANABE, M. A. E.; DE CAMARGO, Z. P.; ONO, M. A. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Mycoses**, v. 57, n. 4, p. 222-227, 2014.
- CALDART, E. T.; PINTO-FERREIRA, F.; MATOS, A. M. R. N.; PASCOAL, A. T. P.; BERTÃO-SANTOS, A.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; NAVARRO, I. T. Evaluation of an active and early surveillance methodology for visceral leishmaniasis by molecular detection in road-killed wild fauna. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 30, n. 2, e027920, 2021.
- CORREDOR, G. G.; CASTA-O, J. H.; PERALTA, L. A.; D'EZ, S.; ARANGO, M.; McEWEN, J.; RESTREPO, A. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. **Revista Iberoamericana de Micología**, Barcelona, v. 16, p. 216-220, 1999.
- CORTE, A. C.; SVOBODA, W. K.; NAVARRO, I. T.; FREIRE, R. L.; MALANSKI, L. S.; SHIOZAWA, M. M.; LUDWIG, G.; AGUIAR, L. M.; PASSOS, F. C.; MARON, A.; CAMARGO, Z. P.; ITANO, E. N.; ONO, M. A. Paracoccidioidomycosis in wild monkeys from Parana State, Brazil. **Mycopathologia**, v. 164, n. 5, p. 225–228, 2007.

COSTA, E. O.; DINIZ, L. S.; FAVA NETTO, C.; ARRUDA, C.; DAGLI, M. L. Delayed hypersensitivity test with paracoccidioidin in captive Latin American wild mammals. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 33, p. 39-42, 1995.

FERGUSON-LEES, J.; CHRISTIE, D. A. **Raptors of the world**. Boston: Houghton Mifflin Company, 2001, 320p.

FERNANDES, G. F.; DEPS, P.; TOMIMORI-YAMASHITA, J.; CAMARGO, Z. P. IgM and IgG antibody response to *Paracoccidioides brasiliensis* in naturally infected wild armadillos (*Dasypus novemcinctus*). **Med Mycol**, v. 42, n. 4, p. 363-368, 2004.

FORMAN, R. T. T. & ALEXANDER, L. E. Roads and their major ecological effects. **Annu Rev Ecol Evol Syst**, v. 29, n. 1, p. 207-231, 1998.

FRÖLICH, K.; THIEDE, S.; KOZIKOWSKI, T.; JAKOB, W. A review of mutual transmission of important infectious diseases between livestock and wildlife in Europe. In: GIBBS, E. P.; BOKMA, B. H. editors. **The domestic animal/wildlife interface issues for disease control, conservation, sustainable food production, and emerging diseases**. New York: New York Academy of Sciences; 2002. v. 969, p. 4-13.

GALVÃO, M.B. **Deteção de anticorpos para *Paracoccidioides brasiliensis* em pombas silvestres (*Zenaida auriculata*)**. 2011. 40 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação) - Universidade Estadual de Londrina.

GROSE, E.; TAMSITT, J.R. *Paracoccidioides brasiliensis* recovers from intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia. **Sabouraudia**, v.4, p. 124-125, 1965.

HRYCYK, M. F.; GARCIA GARCÉS, H.; BOSCO, S. M. G.; DE OLIVEIRA, S. L.; MARQUES, S. A.; BAGAGLI, E. Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*, *P. lutzii* and related species: infection in armadillos, soil occurrence and mycological aspects. **Med Mycol**, v. 56, n. 8, p. 950-962, 2018.

JOHNSON, W. D.; LANG, G. M. Paracoccidioidomycosis (South American Blastomycosis) in a Squirrel Monkey (*Saimiri sciureus*). **Veterinary Pathology**, v. 14, p. 368-371, 1977.

KIRK, D. A., & MOSSMAN, M. J. Turkey vulture (*Cathartes aura*). In: POOLE, A. & GILL, F. editors. **The birds of North America**. The Academy of Natural Sciences, Philadelphia, Pennsylvania, USA, and The American Ornithologists Union, Washington, D.C., USA, 1998.

KLUYBER, D.; DESBIEZ, A. L. J.; ATTIAS, N.; MASSOCATO, G. F.; GENNARI, S. M.; SOARES, H. S.; BAGAGLI, E.; BOSCO, S. M. G.; GARCÉS, H. G.; FERREIRA, J. D. S.; FONTES, A. N. B.; SUFFYS, P. N.; MEIRELES, L. R.; JANSEN, A. M.; LUNA, E. J. A.; ROQUE, A. L. R. Zoonotic parasites infecting free-living armadillos from Brazil. **Transbound Emerg Dis**, v. 68, n. 3, p. 1639-1651, 2021.

KUTI, H. Role of the armadillo *Dasyus novemcinctus* in the epidemiology of paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 144, p. 131-133, 1998.

LOSNAK, D. O.; ROCHA, F. R.; ALMEIDA, B. S.; BATISTA, K. Z. S.; ALTHOFF, S. L.; HAUPT, J.; RUIZ, L. S.; ANVERSA, L.; LUCHEIS, S. B.; PAIZ, L. M.; DONALISIO, M. R.; RICHINI-PEREIRA, V. B. Molecular detection of fungi of public health importance in wild animals from Southern Brazil. **Mycoses**, v. 61, n. 7, p. 455-463, 2018.

MACEDO, R.; LACERA, M.; TRILLES REIS, R. Infecção natural de tatus por *Paracoccidioides brasiliensis* em Serra da Mesa, Goiás: Estudo preliminar. **Anais do II Congresso Brasileiro de Micologia**. Rio de Janeiro. Abstract 182, 1998.

MARTINEZ, R. New trends in paracoccidioidomycosis epidemiology. **J Fungi**, v. 3, n. 1, p. 1, 2017.

MATUTE, D. R.; MC EWEN, J. G.; PUCCIA, R.; MONTES, B. A.; SAN-BLAS, G.; BAGAGLI, E.; RAUSCHER, J. T.; RESTREPO, A.; MORAIS, F.; NIÑO-VEGA, G.; TAYLOR, J. W. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Mol Biol Evol**, v.23, p.65-73, 2006.

MUÑOZ, J. F.; FARRER, R. A.; DESJARDINS, C. A.; GALLO, J. E.; SYKES, S.; SAKTHIKUMAR, S.; MISAS, E.; WHISTON, E. A.; BAGAGLI, E.; SOARES, C. M.; TEIXEIRA, M. M.; TAYLOR, J. W.; CLAY, O. K.; MCEWEN, J. G.; CUOMO, C. A. Genome diversity, recombination, and virulence across the major lineages of *Paracoccidioides*. **mSphere**, v. 1, n. 5, 2016.

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

NEGRONI, P. El *Paracoccidioides brasiliensis* vive saprofiticamente en el suelo argentino. **Prensa Med Argent**, v. 53, p. 2831-2, 1966.

OLIVEIRA, G. G.; SILVEIRA, L. H.; ITANO, E. N.; SOARES, R. M.; FREIRE, R. L.; WATANABE, M. A. E.; CAMARGO, Z. P.; ONO, M. A. Serological evidence of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in chickens from Paraná and Mato Grosso do Sul states, Brazil. **Mycopathologia**, v. 171, p. 197–202, 2011.

PAZ, G. S.; ADORNO, B. M. V.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; BOSCO, S. M. G.; LANGONI, H. Infection by *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus* spp. and *Paracoccidioides brasiliensis* in bats collected in urban areas. **Transbound Emerg Dis**, v. 65, n. 6, p. 1797-1805, 2018.

PERSING, D. H.; SMITH, T. F.; TENOVER, F. C.; WHITE, T. J. Fungal pathogens. In: PERSING, D. H.; SMITH, T. F.; TENOVER, F. C.; WHITE, T. J. editors. **Diagnostic molecular microbiology: principles and applications**. Washington: American Society for Microbiology; 1993. p. 423-37.

PRINZINGER, R.; PREBMAR, A.; SCHLEUCHER, E. Body temperature in birds. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, v. 99, p. 499–506.

RESTREPO, A.; MCEWEN J. G.; CASTAÑEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Medical Mycology**. Colômbia. v. 39, n. 3, p. 233-241, 2001.

RICHINI-PEREIRA, V. B.; BOSCO, S. M. G.; THEODORO, R. C.; BARROZO, L.; BAGAGLI, E. Road-killed wild animals: a preservation problem useful for eco-epidemiological studies of pathogens. **J Venom Anim Toxins incl Trop Dis**, v. 16, n. 4, p. 607-613, 2010.

RICHINI-PEREIRA, V. B.; BOSCO, S. M.; GRIESE, J.; THEODORO, R. C.; MACORIS, S. A.; DA SILVA, R. J.; BARROZO, L.; TAVARES, P. M.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; BAGAGLI, E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. **Med Mycol**, v. 46, n. 1, p. 35/40, 2008.

RICHINI-PEREIRA, V. B.; BOSCO, S. M.; THEODORO, R. C.; BARROZO, L.; PEDRINI, S. C.; ROSA, P. S.; BAGAGLI, E. Importance of xenarthrans in the eco-epidemiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **BMC Res Notes**, v. 2, p. 228, 2009.

ROEDENBECK, I. A. & VOSER, P. Effects of roads on spatial distribution, abundance and mortality of brown hare (*Lepus europaeus*) in Switzerland. **European Journal of Wildlife Research**, v. 54, p. 425-437, 2008.

SBEGHEN, M. R.; ZANATA, T. B.; MACAGNAN, R.; DE ABREU, K. C.; DA CUNHA, W. L.; WATANABE, M. A.; CAMARGO, Z. P.; ONO, M. A. *Paracoccidioides brasiliensis* Infection in Small Wild Mammals. **Mycopathologia**, v. 180, n. 5-6, p. 435-440, 2015.

SCRAMIGNON-COSTA, B. S.; ALMEIDA-SILVA, F.; WANKE, B.; WEKSLER, M.; MORATELLI, R.; VALLE, A. C. F.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; ALMEIDA-PAES, R.; BUENO, C.; MACEDO, P. M. Molecular eco-epidemiology of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed mammals reveals *Cerdocyon thous* and *Cuniculus paca* as new hosts harboring this fungal pathogen. **Plos One**, v. 16, n. 8, e0256668, 2021.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; MENDES, R. P.; COLOMBO A. L.; QUEIROZ-TELLES, F.; KONO, A. S. G.; PANIAGO, A. M. M.; NATHAN, A.; VALLE, A. C. F.; BAGAGLI, E.; BENARD, G.; FERREIRA, M. S.; TEIXEIRA, M. M.; SILVA-VERGARA, M. L.; PEREIRA, R. M.; CAVALCANTE, R. S.; HAHN, R.; DURLACHER, R. R.; KHOURY, Z.; CAMARGO, Z. P.; MORETTI, M. L.; MARTINEZ, R. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 715-740, 2017.

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

SICK, H. **Ornitologia brasileira**, uma introdução. Rio de Janeiro: Editora Nova Fronteira, 1997.

SILVA-VERGARA, M. L.; MARTINEZ, R.; CAMARGO, Z. P.; MALTA, M. H. B.; MAFFEI, C. M. L.; CHADU, J. B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. **Medical Mycology**, v. 38, n. 3, p. 193-9, 2000.

SILVA-VERGARA, M. L.; MARTÍNEZ, R.; CHADU, A.; MADEIRA, M.; FREITAS-SILVA, G.; LEITE MAFFEI, C. M. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá, state of Minas Gerais, Brazil. **Medical Mycology**, v. 36, p. 37-42, 1998.

SUGUIURA, I. M. S.; MACAGNAN, R.; OMORI, A. M.; BUCK, E. L.; SCARPASSA, J. A.; PRETTO-GIORDANO, L. G.; VILAS-BOAS, L. A.; CAMARGO, Z. P.; ITANO, E. N.; ONO, M. A. First report of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in fish. **Med Mycol**, v. 58, n. 6, p. 737-743, 2019.

TEIXEIRA, M. M.; THEODORO, R. C.; DE CARVALHO, M. J.; FERNANDES, L.; PAES, H. C.; HAHN, R. C.; MENDOZA, L.; BAGAGLI, E.; SAN-BLAS, G.; FELIPE, M. S. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Mol Phylog Evol**, v. 52, n. 2, p. 273-83, 2009.

THEODORO, R. C.; CANDEIAS, J. M.; ARAÚJO, J. P.; BOSCO, S. M.; MACORIS, S. A.; PADULA, L. O.; FRANCO, M.; BAGAGLI, E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. **Medical Mycology**, v. 43, n. 8, p. 725-729, 2005.

THEODORO, R. C.; TEIXEIRA, M. M.; FELIPE, M. S. S.; PADUAN, K. S.; RIBOLLA, P. M.; SAN-BLAS, G.; BAGAGLI, E. Genus *Paracoccidioides*: Species Recognition and Biogeographical Aspects. **Plos One**. São Paulo. v. 7, n. 5, p. 1-15, 2012.

TOMPSOM, R. C. A.; KUTZ, S. J.; SMITH, A. Parasite zoonoses and wildlife: emerging issues. **Int J Environ Res Public Health**, v. 6, p. 678-693, 2009.

TURISSINI, D. A.; GOMEZ, O. M.; TEIXEIRA, M. M.; MCEWEN, J. G.; MATUTE, D. R. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*, **Fungal Genetics and Biology**, v. 106, p. 9-25, 2017.

VIDAL, M. S.; DE MELO, N. T.; GARCIA, N. M.; DEL NEGRO, G. M.; DE ASSIS, C. M.; HEINS-VACCARI, E. M.; NAIFF, R. D.; MENDES, R. P.; LACAZ, C. S. *Paracoccidioides brasiliensis*: A mycologic and immunochemical study of a sample isolated from an armadillo (*Dasypus novemcinctus*). **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 37, n. 1, p. 43-49, 1995.

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

WHO - World Health Organization. 2017. Available from: <https://www.who.int/features/qa/one-health/en/>.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram detectados cães positivos para PCM infecção e sugestivos de PCM doença ativa em área urbana da cidade de Londrina (PR), demonstrando a presença de *P. brasiliensis* nesta região.

A infecção por *P. brasiliensis* também foi detectada em amostras de de fígado e baço de um urubu (*C. atratus*) e de pulmão de uma lebre (*L. europaeus*). Este é o primeiro estudo a detectar *P. brasiliensis* nestas espécies de animais.

A detecção de *P. brasiliensis* em animais domésticos e silvestres pode auxiliar na elucidação de aspectos eco-epidemiológicos da PCM, bem como mapear áreas de risco para humanos.

REFERÊNCIAS

- AJELLO, L. & POLONELLI, L. Imported paracoccidioidomycosis: A public health problem in non-endemic areas. **Eur J Epidemiol**, v. 1, p. 160-165, 1985.
- ALBANO, A. P.; KLAFKE, G. B.; BRANDOLT, T. M.; DA HORA, V. P.; MINELLO, L. F.; JORGE, S.; SANTOS, E. O.; BEHLING, G. M.; CAMARGO, Z. P.; XAVIER, M. O.; MEIRELES, M. C. A. Wild animals as sentinels of *Paracoccidioides brasiliensis* in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Mycopathologia**, v. 177, n. 3-4, p. 207-215, 2014.
- ALBANO, A. P.; KLAFKE, G. B.; BRANDOLT, T. M.; DA HORA, V. P.; NOGUEIRA, C. E.; XAVIER, M. O.; MEIRELES, M. C. A. Seroepidemiology of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in horses from Rio Grande do Sul, Brazil. **Braz J Microbiol**, v. 46, n. 2, p. 513-517, 2015.
- ALBORNOZ, M. B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. **Sabouraudia**, v. 9, p. 248-253, 1971.
- ARANTES, T. D.; THEODORO, R. C.; DA GRAÇA MACORIS, S. A.; BAGAGLI, E. Detection of *Paracoccidioides* spp. in environmental aerosol samples. **Med Mycol**, v. 51, n. 1, p. 83-92, 2013.
- ARANTES, T. D.; THEODORO, R. C.; TEIXEIRA, M. M.; BOSCO, S. M.; BAGAGLI, E. Environmental Mapping of *Paracoccidioides* spp. in Brazil Reveals New Clues into Genetic Diversity, Biogeography and Wild Host Association. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, 2016.
- ASSUNÇÃO, T.R.S. **Desenvolvimento de método para diagnóstico da paracoccidioidomicose humana utilizando antígeno recombinante de *Paracoccidioides brasiliensis***. 2012. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.
- BAGAGLI, E.; BOSCO, S. M. G.; THEODORO, R. C.; FRANCO, M. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. **Infect Genet Evol**, v. 6, p. 344–351, 2006.
- BAGAGLI, E.; FRANCO, M.; BOSCO, S. M.; HEBELER-BARBOSA, F.; TRINCA, L. A.; MONTENEGRO, M. R. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. **Med Mycol**, v. 41, n. 3, p. 217-223, 2003.
- BAGAGLI, E.; MATUTE, D. R.; GARCES, H. G.; TENÓRIO, B. G.; GARCES, A. G.; ALVES, L. G. B.; YAMAUCHI, D. H.; HRYCYK, M. F.; BARKER, B. M.; TEIXEIRA, M. M. *Paracoccidioides brasiliensis* Isolated from Nine-Banded Armadillos (*Dasypus novemcinctus*) Reveal Population Structure and Admixture in the Amazon Basin. **J Fungi (Basel)**, v. 7, n. 1, p. 54, 2021.

- BAGAGLI, E.; SANO, A.; COELHO, K. I.; ALQUATI, S.; MIYAJI, M.; CAMARGO Z. P.; GOMES, G. M.; FRANCO, M.; MONTENEGRO, M. R. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus noveminctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 58, n. 4, p. 505-512, 1998.
- BARROZO, L.V.; MENDES, R.P.; MARQUES, S.A.; BENARD, G.; SIQUEIRA SILVA, M.E.; BAGAGLI, E. Climate and acute/subacute paracoccidioidomycosis in a hyperendemic area in Brazil. **Int J Epidemiol**, v. 38, p. 1642–1649, 2009.
- BELITARDO, D. R.; CALEFI, A. S.; BORGES, I. K.; DE OLIVEIRA, G. G.; SBEGHEN, M. R.; ITANO, E. N.; CAMARGO, Z. P.; ONO, M. A. Detection of Antibodies Against *Paracoccidioides brasiliensis* in Free-Range Domestic Pigs (*Sus scrofa*). **Mycopathologia**, v. 177, n. 1-2 p. 91-95, 2014a.
- BELITARDO, D. R.; CALEFI, A. S.; SBEGHEN, M. R.; DE OLIVEIRA, G. G.; WATANABE, M. A. E.; DE CAMARGO, Z. P.; ONO, M. A. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Mycoses**, v. 57, n. 4, p. 222-227, 2014b.
- BELLÍSSIMO-RODRIGUES, F.; MACHADO, A. A.; MARTINEZ, R. Paracoccidioidomycosis Epidemiological Features of a 1,000-Cases Series from a Hyperendemic Area on the Southeast of Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 3, p. 546-550, 2011.
- BIALEK, R.; IBRICEVIC, A.; FOTHERGILL, A.; BEGEROW, D. Small subunit ribosomal DNA sequence shows *Paracoccidioides brasiliensis* closely related to *Blastomyces dermatitidis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 3190–3193, 2000.
- BOCCA, A. L.; AMARAL, A. C.; TEIXEIRA, M. M.; SATO, P. K.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; SOARES FELIPE, M. S. Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. **Future Microbiology**, v. 8, p. 1177–1191, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.309, de 28 de Agosto de 2020b. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, 01 set 2020. Seção 1, p. 40. Available from: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-n-2.309-de-28-de-agosto-de-2020-275240601>.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 264, de 17 de Fevereiro de 2020a. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, 19 fev 2020. Seção 1, p. 97. Available from: <http://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-n-264-de-17-de-fevereiro-de-2020-244043656>.
- BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clinical Microbiology Rev**, v. 6, p. 89–117, 1993.
- BRUMMER, E.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A.; AZZI, R.; GOMEZ, A.; HOYOS, G.; MCEWEN, J.; CANO, L.; DEBÉDOUT, C. Murine model of

paracoccidioidomycosis. Production of fatal acute pulmonary or chronic pulmonary and disseminated disease: immunological and pathological observations. **J Exp Path.**, v. 1, p. 241, 1984.

BUITRAGO, M.J.; CUENCA-ESTRELLA, M. Current epidemiology and laboratory diagnosis of endemic mycosis in Spain. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 30, p. 407–413, 2012.

BUSTAMANTE, B.; MC EWEN, J. G.; TABARES, A. M.; ARANGO, M.; RESTREPO, A. Characteristics of the conidia produced by the mycelial form of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Sabouraudia**, v. 23, p. 407-414, 1985.

CALDART, E. T.; PINTO-FERREIRA, F.; MATOS, A. M. R. N.; PASCOAL, A. T. P.; BERTÃO-SANTOS, A.; MITSUKA-BREGANÓ, R.; NAVARRO, I. T. Evaluation of an active and early surveillance methodology for visceral leishmaniasis by molecular detection in road-killed wild fauna. **Rev Bras Parasitol Vet**, v. 30, n. 2, e027920, 2021.

CALLE, D.; ROSERO, S.; OROZCO, L. C.; CAMARGO, D.; CASTAÑEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis in Colombia: an ecological study. **Epidemiol Infect**, v. 126, n. 2, p. 309–315, 2001.

CAMARGO, Z. P.; UNTERKIRCHER, C. S.; CAMPOY, S. P.; TRAVASSOS, L. R. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. **J Clin Microbiol**, v. 26, p. 2147-2151, 1988.

CANTEROS, C. E.; MADARIAGA, M. J.; LEE, W.; RIVAS, M. C.; DAVEL, G.; IACHINI, R. Endemic fungal pathogens in a rural setting of Argentina: Seroepidemiological study in dogs. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 27, p. 14-19, 2010.

CARRERO, L. L.; NIÑO-VEGA, G.; TEIXEIRA, M. M.; CARVALHO, M. J.; SOARES, C. M.; PEREIRA, M.; JESUINO, R. S.; MCEWEN, J. G.; MENDOZA, L.; TAYLOR, J. W.; FELIPE, M. S.; SAN-BLAS, G. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. **Fungal Genet Biol**, v.45, n. 5, p.605-12, 2008.

CONTI-DIAZ; I. A.; ALVAREZ, B. J.; GEZUELE, E.; GONZALEZ MARINI, H.; DUARTE, J.; FALCÓN, J. Intradermal reaction survey with paracoccidioidin and histoplasmin in horses. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 16, n. 6, p. 372-376, 1972.

CORREDOR, G. G.; CASTA-O, J. H.; PERALTA, L. A.; D'EZ, S.; ARANGO, M.; McEWEN, J.; RESTREPO, A. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. **Revista Iberoamericana de Micología**, Barcelona, v. 16, p. 216-220, 1999.

CORTE, A. C.; GENNARI, S. M.; LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; ITANO, E. M.; FREIRE, R. L.; CAMARGO, Z. P.; ONO, M. A. *Paracoccidioides brasiliensis*

infection in dogs from Western Brazilian Amazon. **Pesq Vet Bras**, v. 32, n. 7, p. 649-652, 2012.

CORTE, A. C.; ITANO, E. N.; FREIRE, R. L.; CAMARGO, Z. P.; ONO, M. A. Detection of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in horses from northern Region of Paraná State. **Semina Ciências Agrárias**, v. 30, p. 441-446, 2009.

CORTE, A. C.; SVOBODA, W. K.; NAVARRO, I. T.; FREIRE, R. L.; MALANSKI, L. S.; SHIOZAWA, M. M.; LUDWIG, G.; AGUIAR, L. M.; PASSOS, F. C.; MARON, A.; CAMARGO, Z. P.; ITANO, E. N.; ONO, M. A. Paracoccidioidomycosis in wild monkeys from Parana State, Brazil. **Mycopathologia**, v. 164, n. 5, p. 225–228, 2007.

COSTA, A. N.; BENARD, G.; ALBUQUERQUE, A. L.; FUJITA, C. L.; MAGRI, A. S.; SALGE, J. M.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, C. R. R. The lung in paracoccidioidomycosis: new insights into old problems. **Clinics**, v. 68, n. 4, p. 441-448, 2013.

COSTA, E. O.; DINIZ, L. S.; NETTO, C. F.; ARRUDA, C.; DAGLI, M. L. Delayed hypersensitivity test with paracoccidioidin in captive Latin American wild mammals. **J Med Vet Mycol**, v. 33, n. 1, p. 39-42, 1995.

COSTA, E., FAVA NETTO, C. Contribution to the epidemiology of paracoccidioidomycosis and histoplasmosis in the State of São Paulo, Brazil: Paracoccidioidin and histoplasmin intradermic tests in domestic animals. *Sabouraudia*. **Sabouradia**, v. 16, p. 103-111, 1978.

COUTINHO, Z. F.; SILVA, D.; LAZÉRA, M.; PETRI, V.; OLIVEIRA, R. M. O.; SABORZA, P. C.; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Caderno Saúde Pública Rio de Janeiro**, p. 1441-1454, 2002.

DINIZ, S. N.; CARVALHO, K. C.; CISALPINO, P. S.; SILVEIRA, J. F.; TRAVASSOS, L.R.; PUCCIA, R. Expression in bacteria of the gene encoding the gp43 antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*: Immunological reactivity of the recombinant fusion proteins. **Clin and Diag Lab Immunol**, v. 9, p. 1200–1204, 2002.

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

FARIAS, M. R.; CONDAS, L. A.; RIBEIRO, M. G.; BOSCO, S. M.; MURO, M. D.; WERNER, J.; THEODORO, R. C.; BAGAGLI, E.; MARQUES, S. A.; FRANCO, M. Paracoccidioidomycosis in a dog: case report of generalized lymphadenomegaly. **Mycopathologia**, v. 172, n. 2, p. 147-152, 2011.

FAVA-NETTO, C. Contribuição para o estudo epidemiológico de blastomicose de Lutz. **Revista do Instituto Adolpho Lutz**, v. 21, p. 99-194, 1961.

- FERNANDES, G. F.; DEPS, P.; TOMIMORI-YAMASHITA, J.; CAMARGO, Z. P. IgM and IgG antibody response to *Paracoccidioides brasiliensis* in naturally infected wild armadillos (*Dasyus novemcinctus*). **Med Mycol**, v. 42, n. 4, p. 363-368, 2004.
- FERREIRA, J. B.; NAVARRO, I. T.; FREIRE, R. L.; OLIVEIRA, G. G.; OMORI, A. M.; BELITARDO, D. R.; ITANO, E. N.; CAMARGO, Z. P.; ONO, M. A. Evaluation of *Paracoccidioides brasiliensis* Infection in Dairy Goats. **Mycopathologia**, v. 176, n. 1–2, p. 95–99, 2013.
- FONTANA, F. F.; SANTOS, C. T. B.; ESTEVENS, F. M.; ROCHA, A.; FERNANDES, G. F.; AMARAL, C. C.; DOMINGUES, M. A.; CAMARGO, Z. P.; SILVA-VERGARA, M. L. Seroepidemiological survey of paracoccidioidomycosis Infection among urban and rural dogs from Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Mycopathologia**, v. 169, p. 159-165, 2010.
- FRANCO, M.; MONTENEGRO, M. R.; MENDES, R. P.; MARQUES, S. A.; DILLON, N. L.; MOTA, N. G. S. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 20, n. 2, p. 129-32, 1987.
- GALVÃO, M.B. **Detecção de anticorpos para *Paracoccidioides brasiliensis* em pombas silvestres (*Zenaida auriculata*)**. 2011. 40 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação) - Universidade Estadual de Londrina.
- GEZUELE, E. Aislamiento de *Paracoccidioides* sp. de heces de pinguino de la Antartida. Caracas, Venezuela. G. San-Blas (Ed.), Proceedings IV Encuentro Internacional sobre Paracoccidioidomycosis, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Caracas, Venezuela (1989), pp. 10-14.
- GIUSIANO, G.; AGUIRRE, C.; VRATNICA, C.; ROJAS, F.; CORALLO, T.; CATTANA, M. E.; FERNÁNDEZ, M.; MUSSIN, J.; DE LOS ANGELES SOSA, M. Emergence of acute/subacute infant-juvenile paracoccidioidomycosis in Northeast Argentina: Effect of climatic and anthropogenic changes? **Med Mycol**, v. 57, n. 1, p. 30-37, 2019.
- GOÉS, T.; BAILÃO, E. F. L. C.; CORREA, C. R.; BOZZI, A.; SANTOS, L. I.; GOMES, D.; SOARES, C. M.; GOES, A. M. New Developments of RNAi in *Paracoccidioides brasiliensis*: Prospects for High-Throughput, Genome-Wide, Functional Genomics. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, e3173, 2014.
- GONZALES, J. F.; MONTIEL, N. A.; MAASS, R. L. First report on the diagnosis and treatment of encephalic and urinary paracoccidioidomycosis in a cat. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 12, n. 8, p. 659-662, 2010.
- GRIFFITHS, J.; LOPES COLOMBO, A.; DENNING, D. W. The case for paracoccidioidomycosis to be accepted as a neglected tropical (fungal) disease. **PLOS Negl Trop Dis**, v. 13, n. 5, e0007195, 2019.

GROSE, E.; TAMSITT, J.R. *Paracoccidioides brasiliensis* recovers from intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia. **Sabouraudia**, v.4, p. 124-125, 1965.

GUTIERREZ, A. H.; CEBALLOS, G. C.; FERRER, H. I. P. Encuesta sobre tuberculosis, histoplasmosis y paracoccidioidomicosis en ganado lechero del Valle del Aburra. **Antioq Med**, v. 24, p. 339-358, 1974.

HAHN, R.C.; MACEDO, A. M.; FONTES, C. J.; BATISTA, R. D.; SANTOS, N. L.; HAMDAN, J. S. Randomly amplified polymorphic DNA as a valuable tool for epidemiological studies of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 7, p. 2849-2854, 2003.

HEADLEY, S. A.; PRETTO-GIORDANO, L. G.; DI SANTIS, G. W.; GOMES, L. A.; MACAGNAN, R.; DA NÓBREGA, D. F.; LEITE, K. M.; DE ALCÂNTARA, B. K.; ITANO, E. N.; ALFIERI, A. A.; ONO, M. A. *Paracoccidioides brasiliensis*-associated dermatitis and lymphadenitis in a dog. **Mycopathologia**, v. 182, n. 3-4, p. 425-434, 2017.

HRYCYK, M. F.; GARCIA GARCÉS, H.; BOSCO, S. M. G.; DE OLIVEIRA, S. L.; MARQUES, S. A.; BAGAGLI, E. Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*, *P. lutzii* and related species: infection in armadillos, soil occurrence and mycological aspects. **Med Mycol**, v. 56, n. 8, p. 950-962, 2018.

JOHNSON, W. D.; LANG, G. M. Paracoccidioidomycosis (South American Blastomycosis) in a Squirrel Monkey (*Saimiri sciureus*). **Veterinary Pathology**, v. 14, p. 368-371, 1977.

KIRKLAND, T. N.; FERRER, J. Coccidioidomycosis: a reemerging infectious disease. **Emerg Infect Dis**, v. 2, p. 192-199, 1996.

KLUYBER, D.; DESBIEZ, A. L. J.; ATTIAS, N.; MASSOCATO, G. F.; GENNARI, S. M.; SOARES, H. S.; BAGAGLI, E.; BOSCO, S. M. G.; GARCÉS, H. G.; FERREIRA, J. D. S.; FONTES, A. N. B.; SUFFYS, P. N.; MEIRELES, L. R.; JANSEN, A. M.; LUNA, E. J. A.; ROQUE, A. L. R. Zoonotic parasites infecting free-living armadillos from Brazil. **Transbound Emerg Dis**, v. 68, n. 3, p. 1639-1651, 2021.

KUTI, H. Role of the armadillo *Dasypus novemcinctus* in the epidemiology of paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 144, p. 131-133, 1998.

LEITÃO, N. P.; VALLEJO, M. C.; CONCEIÇÃO, P. M.; CAMARGO, Z. P.; HAHN, R.; PUCCIA, R. *Paracoccidioides lutzii* Plp43 Is an Active Glucanase with Partial Antigenic Identity with *P. brasiliensis* gp43. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 8, p. e3111, 2014.

LÓPEZ-MARTÍNEZ, R.; HERNANDEZ-HERNANDEZ, F.; MENDEZ-TOIAR, L.J.; MANZANO-GAYOSSO, P.; BONILFAZ, A.; ARENAS, R.; PADILLA-DESGARENNES MDEL, C.; ESTRADA, R.; CHÁVEZ, G. Paracoccidioidomycosis in Mexico: Clinical and epidemiological data from 93 new cases (1972–2012). **Mycoses**, v. 57, p. 525–530, 2014.

LOSNAK, D. O.; ROCHA, F. R.; ALMEIDA, B. S.; BATISTA, K. Z. S.; ALTHOFF, S. L.; HAUPT, J.; RUIZ, L. S.; ANVERSA, L.; LUCHEIS, S. B.; PAIZ, L. M.; DONALISIO, M. R.; RICHINI-PEREIRA, V. B. Molecular detection of fungi of public health importance in wild animals from Southern Brazil. **Mycoses**, v. 61, n. 7, p. 455-463, 2018.

LUTZ, A. Uma micose pseudo-coccidica localizada na boca e observada no Brasil: Contribuição ao conhecimento das hypho-blastomycoses americanas. **Bras Med**, v. 22, p. 141-144, 1908.

MACEDO, R.; LACERA, M.; TRILLES REIS, R. Infecção natural de tatus por *Paracoccidioides brasiliensis* em Serra da Mesa, Goiás: Estudo preliminar. **Anais do II Congresso Brasileiro de Micologia**. Rio de Janeiro. Abstract 182, 1998.

MANGIATERRA, M. L.; GIUSIANO, G. E.; ALONSO, J. M.; GORODNER, J. O. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in a subtropical region with important environmental changes. **Bulletin de la Societe Pathologie Exotique**, v. 92, p. 173-176, 1999.

MARTINEZ, R. Epidemiology of paracoccidioidomycosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.57, p. 11-20, 2015.

MARTINEZ, R. New trends in paracoccidioidomycosis epidemiology. **J Fungi**, v. 3, n. 1, p. 1, 2017.

MATOS, W. B.; DOS SANTOS, G. M. C.; SILVA, V. E. B.; ROSÁRIO GONÇALVES, E. G.; SILVA, A. R. Paracoccidioidomycosis in the state of Maranhão, Brazil: Geographic and clinical aspects. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 45, p. 385–389, 2012.

MATUTE, D. R.; MC EWEN, J. G.; PUCCIA, R.; MONTES, B. A.; SAN-BLAS, G.; BAGAGLI, E.; RAUSCHER, J. T.; RESTREPO, A.; MORAIS, F.; NIÑO-VEGA, G.; TAYLOR, J. W. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Mol Biol Evol**, v.23, p.65-73, 2006.

MC EWEN, J. G.; GARCIA, A. M.; ORTIZ, B. L.; BOTERO, S.; RESTREPO, A. In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Arch Med Res**, v. 26, p. 305-306, 1995.

MENDELOVICI, K.; SALFELDER, K.; MENDELOVICI, E.; ROMAN, A. R. Intento de aislamiento del *Paracoccidioides brasiliensis* del suelo. **Mycopathologia et Mycologia Applicata**, v.52, n.1, p. 45-53, 1974.

MENDES, J. F.; KLAFKE, G. B.; ALBANO, A. P. N.; CABANA, A. L.; TELES, A. J.; CAMARGO, Z. P.; XAVIER, M. O.; MEIRELES, M. C. A. Paracoccidioidomycosis infection in domestic and wild mammals by *Paracoccidioides lutzii*. **Mycoses**, v. 60, n. 6, p. 402-406, 2017.

- MENDES, R. P. The gamut of clinical manifestations. In: FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G. editors. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC Press; 1994. p. 233-58.
- MENDES-GIANNINI, M. J. S.; BUENO, J. P.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; STOLF, A. M.; MASUDA, A.; AMATO NETO, V.; FERREIRA, A. W. Antibody response to 43KDa glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* as a marker for the evaluation of patients under treatment. **Am J Trop Med Hyg**, v. 43, n. 2, p. 200-206, 1990.
- MINAKAWA, T.; UEDA, K.; TANAKA, M.; TANAKA, N.; KUWAMURA, M.; IZAWA, T.; KONNO, T.; YAMATE, J.; ITANO, E. N.; SANO, A.; WADA, S. Detection of Multiple Budding Yeast Cells and a Partial Sequence of 43-kDa Glycoprotein Coding Gene of *Paracoccidioides brasiliensis* from a Case of Lacaziosis in a Female Pacific White-Sided Dolphin (*Lagenorhynchus obliquidens*). **Mycopathologia**, v. 181, n. 7-8, p. 523-529, 2016.
- MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. Pathology. In: FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G. editors. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 131-50.
- MONTENEGRO, M. R.; MIYAJI, M.; FRANCO, M.; NISHIMURA, K.; COELHO, K. I.; HORIE, Y.; MENDES, R. P.; SANO, A.; FUKUSHIMA, K.; FECCHIO, D. Isolation of fungi from nature in the region of Botucatu, SP, Brazil, an endemic area of paracoccidioidomycosis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 91, n.6 p. 665–670, 1996.
- MÓS, E. N. & FAVA-NETTO, C. Contribuição ao estudo da paracoccidioidomicose. I - Possível papel dos cães: Estudo sorológico e anatomo-patológico. **Revta Inst Med Trop**, v. 16, p. 154-159, 1974.
- MUÑOZ, J. F.; FARRER, R. A.; DESJARDINS, C. A.; GALLO, J. E.; SYKES, S.; SAKTHIKUMAR, S.; MISAS, E.; WHISTON, E. A.; BAGAGLI, E.; SOARES, C. M.; TEIXEIRA, M. M.; TAYLOR, J. W.; CLAY, O. K.; MCEWEN, J. G.; CUOMO, C. A. Genome diversity, recombination, and virulence across the major lineages of *Paracoccidioides*. **mSphere**, v. 1, n. 5, 2016.
- NAIFF, R. D.; FERREIRA, L. C.; BARRETT, T. V.; NAIFF, M. F.; ARIAS, J. R. Paracoccidioidomicose enzoótica em tatus (*Dasypus novemcinctus*) no estado do Pará. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 28, n. 1, p. 19-27, 1986.
- NEGRONI, P. El *Paracoccidioides brasiliensis* vive saprofiticamente en el suelo argentino. **Prensa Med Argent**, v. 53, p. 2831-2, 1966.
- OLIVEIRA, G. G.; BELITARDO, D. R.; BALARIN, M. R. S.; FREIRE, R. L.; CAMARGO, Z. P.; ONO, M. A. Serological Survey of Paracoccidioidomycosis in Cats. **Mycopathologia**, v. 176, n. 3, p. 299-302, 2013.
- OLIVEIRA, G. G.; NAVARRO, I. T.; FREIRE, R. L.; BELITARDO, D. R.; SILVEIRA, L. H.; CAMARGO, Z. P.; ITANO, E. N.; ONO, M. A. Serological survey of Paracoccidioidomycosis in sheep. **Mycopathologia**, v. 173, n. 1, p. 63-68, 2012.

- OLIVEIRA, G. G.; SILVEIRA, L. H.; ITANO, E. N.; SOARES, R. M.; FREIRE, R. L.; WATANABE, M. A. E.; CAMARGO, Z. P.; ONO, M. A. Serological evidence of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in chickens from Paraná and Mato Grosso do Sul states, Brazil. **Mycopathologia**, v. 171, p. 197–202, 2011.
- ONO, M. A.; BRACARENSE, A. P. F. R. L.; MORAIS, H. A.; TRAPP, S. M.; BELITARDO, D. R.; CAMARGO, Z. P. Canine paracoccidioidomycosis: A seroepidemiologic study. **Medical Mycology**, v. 39, p. 277-282, 2001.
- ONO, M. A.; ITANO, E. N.; MIZUNO, E. H.; CAMARGO, Z. P. Inhibition of *Paracoccidioides brasiliensis* by pesticides: Is this a partial explanation for the difficulty in isolating this fungus from the soil? **Medical Mycology**, v. 40, p. 493–499, 2002.
- PALMEIRO, M.; CHERUBINI, K.; YURGEL, L. S. Paracoccidioidomycose – revisão da literatura. **Scientia Medica**, v. 15, n. 4, p. 274-278, 2005.
- PANIAGO, A. M. M.; AGUIAR, J. I. A.; AGUIAR, E. S.; DA CUNHA, R. V.; PEREIRA, G. R.; LONDERO, A. T.; WANKE, B. Paracoccidioidomycose: Estudo clínico e epidemiológico de 422 casos observados no Estado de Mato Grosso do Sul. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 36, p. 455–459, 2003.
- PAZ, G. S.; ADORNO, B. M. V.; RICHINI-PEREIRA, V. B.; BOSCO, S. M. G.; LANGONI, H. Infection by *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus* spp. and *Paracoccidioides brasiliensis* in bats collected in urban areas. **Transbound Emerg Dis**, v. 65, n. 6, p. 1797-1805, 2018.
- PETRONI, T. F.; BONFIETTI, L. X.; ZANINELLI, T. H.; ITANO, E. N.; ONO, M. A. Serological Evidence of Infection by *Paracoccidioides brasiliensis* in Dogs with Leishmaniasis. **Mycopathologia**, v. 182, n. 9-10, p. 947-952, 2017.
- PRADO, M.; SILVA, M. B.; LAURENTI, R.; TRAVASSOS, L. R.; TABORDA, C. P. Mortality due to systemic mycosis as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: Review from 1996 to 2006. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 513–521, 2009.
- PUCCIA, R.; SCHENKMAN, S.; GORIN, P. A.; TRAVASSOS, L. R. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. **Infection and Immunology**, v. 53, n. 1, p. 199-206, 1986.
- PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L. R. 43kDa glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, or Jorge Lobo's disease. **J of Clin Microbiol**, v. 29, p. 1610-1615, 1991.
- QUEIROZ-TELLES F. Influence of alternating coffee and sugar cane agriculture in the incidence of paracoccidioidomycosis in Brazil. **Biomedica**, v. 28, supl. 1, p. 129, 2008.

- RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Journal of Medical Veterinary Mycology**, v. 23, p. 323-334, 1985.
- RESTREPO, A.; BENARD, G.; DE CASTRO, C.; AGUDELO, C.; TOBÓN, A. Pulmonary Paracoccidioidomycosis. **Semin. Respir. Crit. Care Med**, v. 29, p. 182-197, 2008.
- RESTREPO, A.; GÓMEZ, B. L.; TOBÓN, A. Paracoccidioidomycosis: Latin America's own fungal disorder. **Curr Fungal Infect Rep**, v. 6, p. 303–311, 2012.
- RESTREPO, A.; JIMÉNEZ, B. E.; BEDOUT C. Survival of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells under microaerophilic conditions. **Sabouraudia**, v.19, n. 4, p. 301-305, 1981.
- RESTREPO, A.; MCEWEN J. G.; CASTAÑEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Medical Mycology**. Colômbia. v. 39, n. 3, p. 233-241, 2001.
- RESTREPO, A.; TOBON, A.; CANO, L. *Paracoccidioides brasiliensis*. In Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. BENNETT, J.E.; DOLIN, R.; BLASER, M.J. (eds), 8 edição. **Elsevier**: Philadelphia, PA; p. 2995–3002, 2015.
- RICCI, G.; MOTA, F. T.; WAKAMATSU, A.; SERAFIM, R. C.; BORRA, R. C.; FRANCO, M. Canine paracoccidioidomycosis. **Med Mycol**, v. 42, n. 4, p. 379-383, 2004.
- RICHINI-PEREIRA, V. B.; BOSCO, S. M. G.; THEODORO, R. C.; BARROZO, L.; BAGAGLI, E. Road-killed wild animals: a preservation problem useful for eco-epidemiological studies of pathogens. **J Venom Anim Toxins incl Trop Dis**, v. 16, n. 4, p. 607-613, 2010.
- RICHINI-PEREIRA, V. B.; BOSCO, S. M. G.; THEODORO, R. C.; MACORIS, S. A. G.; BAGAGLI, E. Molecular approaches for eco-epidemiological studies of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 636–643, 2009a.
- RICHINI-PEREIRA, V. B.; BOSCO, S. M.; GRIESE, J.; THEODORO, R. C.; MACORIS, S. A.; DA SILVA, R. J.; BARROZO, L.; TAVARES, P. M.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; BAGAGLI, E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. **Med Mycol**, v. 46, n. 1, p. 35-40, 2008.
- RICHINI-PEREIRA, V. B.; BOSCO, S. M.; THEODORO, R. C.; BARROZO, L.; PEDRINI, S. C.; ROSA, P. S.; BAGAGLI, E. Importance of xenarthrans in the eco-epidemiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **BMC Res Notes**, v. 2, p. 228, 2009b.
- ROBERTO, T. N.; RODRIGUES, A. M.; HAHN, R. C.; CAMARGO, Z. P. Identifying *Paracoccidioides* phylogenetic species by PCR-RFLP of the alpha-tubulin gene. **Medical Mycology**, v. 54, p. 240-247, 2016.

- SALZER, H. J. F.; BURCHARD, G.; CORNELLY, O. A. A.; LANGE, C.; ROLLING, T.; SCHMIEDEL, S.; LIBMAN, M.; CAPONE, D.; LE, T.; DACOLMO, M.P.; HEYCKENDORF, J. Diagnosis and Management of Systemic Endemic Mycoses Causing Pulmonary Disease. **Respiration**, v. 96, p. 283-301, 2018.
- SBEGHEN, M. R.; ZANATA, T. B.; MACAGNAN, R.; DE ABREU, K. C.; DA CUNHA, W. L.; WATANABE, M. A.; CAMARGO, Z. P.; ONO, M. A. *Paracoccidioides brasiliensis* Infection in Small Wild Mammals. **Mycopathologia**, v. 180, n. 5-6, p. 435-440, 2015.
- SCRAMIGNON-COSTA, B. S.; ALMEIDA-SILVA, F.; WANKE, B.; WEKSLER, M.; MORATELLI, R.; VALLE, A. C. F.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; ALMEIDA-PAES, R.; BUENO, C.; MACEDO, P. M. Molecular eco-epidemiology of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed mammals reveals *Cerdocyon thous* and *Cuniculus paca* as new hosts harboring this fungal pathogen. **Plos One**, v. 16, n. 8, e0256668, 2021.
- SHANKAR, J.; RESTREPO, A.; CLEMONS, K. V.; STEVENS, D. A. Hormones and the resistance of women to paracoccidioidomycosis. **Clin Microbiol Rev**, v. 24, p. 296–313, 2011.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A.; MENDES, R. P.; COLOMBO A. L.; QUEIROZ-TELLES, F.; KONO, A. S. G.; PANIAGO, A. M. M.; NATHAN, A.; VALLE, A. C. F.; BAGAGLI, E.; BENARD, G.; FERREIRA, M. S.; TEIXEIRA, M. M.; SILVA-VERGARA, M. L.; PEREIRA, R. M.; CAVALCANTE, R. S.; HAHN, R.; DURLACHER, R. R.; KHOURY, Z.; CAMARGO, Z. P.; MORETTI, M. L.; MARTINEZ, R. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 5, p. 715-740, 2017.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A.; TELLES FILHO, F. Q.; MENDES, R. P.; COLOMBO, A. L.; MORETTI, M. L. Guideliness in paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 297–310, 2006.
- SHOME, S. K.; BATISTA, A. C. Occurrence of *Paracoccidioides brasiliensis* in the soil of Recife (Brazil). **Rev Fac Med Uni Ceara**, v. 3, p. 90–94, 1963.
- SILVA, J. F.; OLIVEIRA, H. C.; MARCOS, C. M.; ASSATO, P. A.; FUSCO-ALMEIDA, A. M.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. Advances and challenges in paracoccidioidomycosis serology caused by *Paracoccidioides* species complex: an update. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 84, n. 1, p. 8794, 2016.
- SILVA, S. H. M; COLOMBO, A. L.; BLOTTA, M. H.; LOPES, J. D.; QUEIROZ-TELLES, F.; CAMARGO, Z. P. Detection of circulating gp43 antigen in serum, cerebrospinal fluid and bronchoalveolar lavage fluid of patients with paracoccidioidomycosis. **J of Clin Microbiol**, v. 41, n. 8, p. 3675-3680, 2003.
- SILVA-VERGARA, M. L.; MARTINEZ, R. Role of the armadillo *Dasypus novemcinctus* in the epidemiology of paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 144, p. 131-133, 1999.

SILVA-VERGARA, M. L.; MARTINEZ, R.; CAMARGO, Z. P.; MALTA, M. H. B.; MAFFEI, C. M. L.; CHADU, J. B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. **Medical Mycology**, v. 38, n. 3, p. 193-9, 2000.

SILVA-VERGARA, M. L.; MARTÍNEZ, R.; CHADU, A.; MADEIRA, M.; FREITAS-SILVA, G.; LEITE MAFFEI, C. M. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá, state of Minas Gerais, Brazil. **Medical Mycology**, v. 36, p. 37-42, 1998.

SILVEIRA, L. H.; DOMINGOS, I. H.; KOUCHI, K.; ITANO, E. N.; SILVA, E. A.; LANDGRAF, V. O.; WERNECK, S. M.; CAMARGO, Z. P.; ONO, M. A. Serological detection of antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* in dogs with leishmaniasis. **Mycopathologia**, v. 162, p. 325-329, 2006.

SILVEIRA, L. H.; PAES, R. C.; MEDEIROS, E. V.; ITANO, E. N.; CAMARGO, Z. P.; ONO, M. A. Occurrence of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in dairy cattle from Mato Grosso do Sul, Brazil. **Mycopathologia**, v. 165, p. 367–371, 2008.

SIMÕES, L. B., MARQUES, S. A.; BAGAGLI, E. Distribution of paracoccidioidomycosis: Determination of ecologic correlates through spatial analyses. **Medical Mycology**, v. 42, n. 6, p. 517–523, 2004.

SOUZA, M. C.; GESZTESI, J. L.; SOUZA, A. R.; MORAES, J. Z.; LOPES, J. D. e CAMARGO, Z. P. Differences in reactivity of paracoccidioidomycosis sera with gp43 isoforms. **J of Med and Vet Mycology**. v. 35, p. 13-18, 1997.

SUGUIURA, I. M. S.; MACAGNAN, R.; OMORI, A. M.; BUCK, E. L.; SCARPASSA, J. A.; PRETTO-GIORDANO, L. G.; VILAS-BOAS, L. A.; CAMARGO, Z. P.; ITANO, E. N.; ONO, M. A. First report of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in fish. **Med Mycol**, v. 58, n. 6, p. 737-743, 2019.

SUGUIURA, I. M. S.; ONO, M. A. Compulsory notification of paracoccidioidomycosis: A 14-year retrospective study of the disease in the state of Paraná, Brazil. **Mycoses**, v. 65, p. 354–361, 2021.

SUZUKI, E.; TOLEDO, M. S.; TAKAHASHI, H. K.; STRAUS, A. H. A monoclonal antibody directed to terminal residue of beta-galactofuranose of a glycolipid antigen isolated from *Paracoccidioides brasiliensis*: cross-reactivity with *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi*. **Glycobiology**, v. 7, n. 4, p. 463-468, 1997.

TABORDA, C. P.; URÁN, M. E.; NOSANCHUK, J. D.; TRAVASSOS, L. R. Paracoccidioidomycosis: challenges in the development of a vaccine against an endemic mycosis in the Americas. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 57, suppl. 19, p. 21-24, 2015.

TEIXEIRA, M. M.; CATTANA, M. E.; MATUTE, D. R.; MUÑOZ, J. F.; ARECHAVALA, A.; ISBELL, K.; SCHIPPER, R.; SANTISO, G.; TRACOGNA, F.; SOSA, M. L. Á.; CECH, N.; ALVARADO, P.; BARRETO, L.; CHACÓN, Y.; ORTELLADO, J.; LIMA, C. M.; CHANG, M. R.; NIÑO-VEGA, G.; YASUDA, M. A. S.; FELIPE, M. S. S.;

NEGRONI, R.; CUOMO, C. A.; BARKER, B.; GIUSIANO, G. Genomic diversity of the human pathogen *Paracoccidioides* across the South American continent. **Fungal Genet Biol**, v. 140, 103395, 2020.

TEIXEIRA, M. M.; THEODORO, R. C.; DE CARVALHO, M. J.; FERNANDES, L.; PAES, H. C.; HAHN, R. C.; MENDOZA, L.; BAGAGLI, E.; SAN-BLAS, G.; FELIPE, M. S. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Mol Phylog Evol**, v. 52, n. 2, p. 273-83, 2009.

TEIXEIRA, M. M.; THEODORO, R. C.; NINO-VEGA, G.; BAGAGLI, E.; FELIPE, M. S. S. *Paracoccidioides* Species Complex: Ecology, Phylogeny, Sexual Reproduction, and Virulence. **Plos Pathogens**, v. 10, n.10, p. 1-4, 2014.

TELES, A. J.; KLAFKE, G. B.; CABANA, Â. L.; ALBANO, A. P.; XAVIER, M. O.; MEIRELES, M. C. Serological Investigation into *Paracoccidioides brasiliensis* Infection in Dogs from Southern Rio Grande do Sul, Brazil. **Mycopathologia**, v. 181, n. 3-4, p. 323-328, 2016.

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

THEODORO, R. C.; CANDEIAS, J. M.; ARAÚJO, J. P.; BOSCO, S. M.; MACORIS, S. A.; PADULA, L. O.; FRANCO, M.; BAGAGLI, E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. **Medical Mycology**, v. 43, n. 8, p. 725-729, 2005.

THEODORO, R. C.; TEIXEIRA, M. M.; FELIPE, M. S. S.; PADUAN, K. S.; RIBOLLA, P. M.; SAN-BLAS, G.; BAGAGLI, E. Genus *Paracoccidioides*: Species Recognition and Biogeographical Aspects. **Plos One**. São Paulo. v. 7, n. 5, p. 1-15, 2012.

TOBÓN, A. M.; AGUDELO, C. A.; OSORIO, M. L.; ALVAREZ, D. L.; ARANGO, M.; CANO, L. E.; RESTREPO, A. Residual pulmonary abnormalities in adult patients with chronic paracoccidioidomycosis: prolonged follow-up after itraconazole therapy. **Clin Infect Dis**, v. 37, n. 7, p. 898-904, 2003.

TRAVASSOS, L. R.; PUCCIA, R.; CISALPINO, P.; TABORDA, C.; RODRIGUES, E. G.; RODRIGUES, M.; SILVEIRA, J. F. e ALMEIDA, I. C. Biochemistry and molecular biology of the main diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Arch Med Res**, v. 26, p. 297-304, 1995.

TREJÓ-CHAVES, A. Disseminated paracoccidioidomycosis in a Southern two-toed sloth (*Choloepus didactylus*). **Journal of Comparative Pathology**, v. 144, n. 2-3, p. 231-234, 2011.

TURISSINI, D. A.; GOMEZ, O. M.; TEIXEIRA, M. M.; MCEWEN, J. G.; MATUTE, D. R. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*, **Fungal Genetics and Biology**, v. 106, p. 9-25, 2017.

- UNTEREINER, W. A.; SCOTT, J. A.; NAVEAU, F. A.; SIGLER, L.; BACHEWISH, J.; et al. The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associate Onygenales. **Mycology**, v. 96, n. 4, p. 812–821, 2004.
- VALLE, A. C. F.; APRIGLIANO FILHO, F.; MOREIRA, J. S.; WANKE, B. Clinical and endoscopic findings in the mucosae of the upper respiratory and digestive tracts in post-treatment follow-up of paracoccidioidomycosis patients. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 37, n. 5, p. 407-413, 1995.
- VALLE, A. C. F.; MARQUES DE MACEDO, P.; ALMEIDA-PAES, R.; ROMÃO, A. R.; LAZÉRA, M. D. S.; WANKE B. Paracoccidioidomycosis after Highway Construction, Rio de Janeiro, Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 23, n. 11, p. 1917-1919, 2017.
- VIDAL, M. S.; DE MELO, N. T.; GARCIA, N. M.; DEL NEGRO, G. M.; DE ASSIS, C. M.; HEINS-VACCARI, E. M.; NAIFF, R. D.; MENDES, R. P.; LACAZ, C. S. *Paracoccidioides brasiliensis*: A mycologic and immunochemical study of a sample isolated from an armadillo (*Dasipus novencinctus*). **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 37, n. 1, p. 43-49, 1995.
- VIEIRA, G. D.; ALVES, T. C.; LIMA, S. M. D.; SOUZA, C. M. Paracoccidioidomycosis in a western Brazilian Amazon State: Clinical-epidemiologic profile and spatial distribution of the disease. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 47, p. 63–68, 2014.
- VILELA, R.; BOSSART, G. D.; ST LEGER, J. A.; DALTON, L. M.; REIF, J. S.; SCHAEFER, A. M.; MCCARTHY, P. J.; FAIR, P. A.; MENDOZA, L. Cutaneous Granulomas in Dolphins Caused by Novel Uncultivated *Paracoccidioides brasiliensis*. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v. 22, n. 12, p. 2063-2069, 2016.
- WAGNER, G.; MOERTL, D.; GLECHNER, A.; MAYR, V.; KLERINGS, I.; ZACHARIAH, C.; VAN DEN NEST, M.; GARTLEHNER, G.; WILLINGER, B. Paracoccidioidomycosis Diagnosed in Europe - A Systematic Literature Review. **J Fungi (Basel)**, v. 7, n. 2, p. 157, 2021.
- WANKE, B. & LONDERO, A. T. Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. In: FRANCO, M.; LACAZ, C. S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G. editors. **Paracoccidioidomycosis**. Boca Ratón: CRC Press, p. 109-120, 1994.
- ZEIDBERG, L. D.; AJELLO, L.; DILLON, A.; RUNYON, L. C. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil. **American Journal of Public Health**, v. 42, p. 930-935, 1952.