



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RAFAELA MACAGNAN

**DETECÇÃO DE *Paracoccidioides brasiliensis* EM SOLO E
DE ANTICORPOS PARA *P. brasiliensis* EM LEITE BOVINO**

Londrina
2018

RAFAELA MACAGNAN

**DETECÇÃO DE *Paracoccidioides brasiliensis* EM SOLO E
DE ANTICORPOS PARA *P. brasiliensis* EM LEITE BOVINO**

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

Orientador: Prof. Dr. Mario Augusto Ono

Londrina
2018

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

Macagnan, Rafaela.

DETECÇÃO DE *Paracoccidioides brasiliensis* EM SOLO E DE ANTICORPOS PARA *P. brasiliensis* EM LEITE BOVINO / Rafaela Macagnan. - Londrina, 2018.
83 f. : il.

Orientador: Mario Augusto Ono.

Tese (Doutorado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2018.

Inclui bibliografia.

1. Amostras ambientais - Tese. 2. Eco-epidemiologia - Tese. 3. Paracoccidioidomicose - Tese. 4. Nested-PCR - Tese. I. Ono, Mario Augusto . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

RAFAELA MACAGNAN

**DETECÇÃO DE *Paracoccidioides brasiliensis* EM SOLO E
DE ANTICORPOS PARA *P. brasiliensis* EM LEITE BOVINO**

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

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Mario Augusto Ono
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Berenice Tomoko Tatibana
Instituto Federal do Paraná - IFPR

Prof. Dra. Daniele Sartori
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Eiko Nakagawa Itano
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Rogério Fernandes de Souza
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 26 de abril de 2018

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo seu amor e infinita graça.

A Universidade, direção, administração e a todos os funcionários, por proporcionam um ambiente agradável, propício para o ensinamento e pelo amparo aos desafios lançados pela pesquisa.

Ao Professor Dr. Mario Augusto Ono minha gratidão e admiração por sua ética e forma de trabalho, além da dedicação, disponibilidade, oportunidade, ensinamentos, paciência, confiança e conselhos para meu amadurecimento profissional.

Aos Professores André Luis Laforga Vanzela e Laurival Antônio Vilas Boas, agradeço pela disponibilidade, ensinamentos, suporte ao trabalho e pelo exemplo de dedicação e preocupação com os alunos.

Às Professoras Dra. Eiko Nakagawa Itano e Maria Angélica Ehara Watanabe Dra. Daniele Sartori pela disponibilidade, auxílio e suporte para o desenvolvimento do trabalho.

A todos os professores do programa de Patologia Experimental, pela paciência, dedicação e ensinamentos, cada um de forma especial contribuiu para a conclusão desse trabalho e conseqüentemente para minha formação profissional.

Aos professores da banca, pela contribuição, ensinamentos e disponibilidade.

Aos colegas de laboratório Tiago Zaninelli, Giovana Carvalho, Tatiane Ferreira Petroni, Larissa Justino, Nicoli Orsi Fogaça, Rafaela Vechi, Nathalia Emmy Ida Mya, Guilherme Allian, Aline Omori, Izabele Kazahaya Borges e aos colegas emprestados, João Paulo Assolini e Alberto Yoichi Sakaguchi, especialmente ao Igor Suguiura pelas diversas formas de contribuição, pelos papos, pelo empréstimo dos ouvidos, muito obrigada por tudo!

A Aline Santos, Profa. Dra. Berenice Tomoko Tatibana, Pedro Piaia, Ademar Piaia, Nemari Colla, Janaina Piaia, Remi Macagnan, Adenilson Zanatta, Nilson de Jesus Carlos, Profa. Dra. Vanerli Beloti, Ronaldo Tamanini, Lucas Benício a aos funcionários da RPPN Monte Sinai, pelas amostras disponibilizadas, pela paciência, ensinamentos, auxílio, sem a ajuda de vocês esta pesquisa não seria realizada.

Aos parceiros de coleta de solo Igor Suguiura, Remi Macagnan, Fernando Cezar, Julia Abati, Renata Macagnan, Marí Macagnan e Aline Santos que nunca me

deixaram na mão enfrentando sem medo (ou com) o árduo desafio e pela troca de tombos e arranhões por muitas risadas. Muito obrigada pelo comprometimento. Vocês foram extraordinários e essenciais!

À Mônica Raquel Sbeghen pela confiança, incentivo, amizade, lealdade e por apostar em mim e contribuir para minha vida profissional, muito obrigada!

A minha família, minha eterna gratidão pelas palavras de apoio e incentivo durante estes longos e rápidos anos. Pelo amparo, amor e carinho, porque sempre estiveram do meu lado, caminhando junto, mesmo que distantes fisicamente, principalmente por acreditar em mim e em meu sonho. Obrigada por não desistirem da chorona quando tudo parecia que não daria certo e sobretudo, por vestirem a camisa deste trabalho e contribuírem para a realização. Remi, Marí e Renata vocês são essenciais, meu eterno amor a vocês.

Ao meu namorado Michel James da Silva Brito, por permitir que eu enxergasse uma outra Rafaela, capaz e forte, por diariamente revigorar o meu melhor, ressaltando que tudo é aprendido, e que independente estaria a meu lado. Te amo!

Ao meu fiel amigo de quatro patas Dione, que alegra todos os meus dias, ao companheirismo, por ouvir minhas teorias e mais sinceros desabafos, foi você quem me aguentou diariamente durante este período, renovando a vontade de conquista. Obrigado por seu amor incondicional.

A meus amigos Brunna França Robles, Flávia Werner, Julia Abati, Nádia Okuyama, Renata Streck, Fernando Cezar Santos, João Vinícius Zucarelli, João Ricardo Pavon, pelo apoio, momentos de descontração, confidências, pelas diversas formas de ajuda, obrigada por colorirem os meus dias, agradeço de coração.

**“Sejam alegres na esperança, pacientes na
tribulação e perseverantes na oração”**

Rm. 12:12

MACAGNAN, RAFAELA. **Detecção de *Paracoccidioides brasiliensis* em solo e de anticorpos para *P. brasiliensis* em leite bovino.** 2014-2018. 83f. Tese de Doutorado (Pós Graduação em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

Os fungos do gênero *Paracoccidioides* ocasionam a paracoccidioidomicose (PCM), principal micose sistêmica da América Latina. A PCM apresenta maior incidência em indivíduos adultos do sexo masculino com atividade relacionada à agricultura. A infecção possivelmente ocorre pela inalação de propágulos fúngicos, todavia não está totalmente esclarecida, devido ao fato do habitat do fungo ainda não estar definido. Este trabalho teve como objetivo, detectar a presença de *P. brasiliensis* em amostras de solo e anticorpos para *P. brasiliensis* em amostras de leite bovino. Foram coletadas 169 amostras de solo, 102 no Paraná e 67 em Santa Catarina. As amostras de solo foram cultivadas em meio sabouraud dextrose e analisadas após PCR, utilizando as regiões ITS e α -tubulina. As amostras de leite bovino (n=136) foram coletadas em pequenas propriedades do estado de Santa Catarina e a detecção de anticorpos para gp43 de *P. brasiliensis* nas amostras de leite foi realizada por ELISA indireto. Não foram obtidos isolados das amostras de solo, entretanto, foi detectado amplificação das regiões ITS em 89% das amostras (93% no estado do Paraná e 82% no estado de Santa Catarina). Utilizando a região α -tubulina foi identificada a presença da espécie críptica PS3 nos dois estados e S1 em Santa Catarina. Referente às características ambientais, 94% das amostras coletadas na presença de água e 93% das coletadas em tocas apresentaram amplificação. Em relação às amostras de leite, 103 (76%) foram consideradas positivas, sugerindo que amostras de leite podem ser utilizadas em estudos soroepidemiológicos de PCM em bovinos. Os resultados permitiram concluir que *P. brasiliensis* tem ampla distribuição geográfica e reforça a presença do fungo nos estados do Paraná e Santa Catarina. As características ambientais dos locais estudados (temperatura, umidade, áreas nativas e perturbadas) estão de acordo com a literatura, com destaque para a presença de água no local de coleta.

Palavras-chave: Amostras ambientais. Eco-epidemiologia. *Nested-PCR*. Paracoccidioidomicose.

MACAGNAN, RAFAELA. **Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil and antibodies for *P. brasiliensis* in bovine milk.** 2014-2018. 83f. Tese de Doutorado (Pós Graduação em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Fungi of the genus *Paracoccidioides* cause Paracoccidioidomycosis (PCM), the main systemic mycosis in Latin America. PCM has a higher incidence in men with agricultural activity. The infection probably occurs through inhalation of fungal propagules, but it is not clear, due to the fact that the fungus habitat has not yet been defined. Therefore, the aim of this study was to detect the presence of *P. brasiliensis* in soil samples and antibodies to *P. brasiliensis* in bovine milk samples. A total of 169 soil samples were collected (102 in Paraná and 67 in Santa Catarina). The soil samples were cultured in Sabouraud dextrose medium and analyzed after PCR using the ITS and α -tubulin regions. Samples of bovine milk (n = 136) were collected in small farms in the state of Santa Catarina and the detection of antibodies to *P. brasiliensis* gp43 in the milk samples was performed by indirect ELISA. No isolates were obtained from the soil samples, however, amplification of the ITS regions was detected in 89% (93% in the state of Paraná and 82% in the state of Santa Catarina). Using the α -tubulin region the presence of the cryptic PS3 species was detected in the two states and S1 in Santa Catarina. Concerning the environmental characteristics, 94% of the samples collected in the presence of water and 93% of the samples collected in burrows presented amplification. Regarding milk samples, 103 (76%) were considered positive, suggesting that milk samples can be used in epidemiological studies of PCM in cattle. The results allowed to conclude that *P. brasiliensis* has a wide geographic distribution and reinforces the presence in the states of Paraná and Santa Catarina. The environmental characteristics of the studied sites (temperature, humidity, native and disturbed areas) are in agreement with the literature, highlighting the presence of water at the collection site.

Keywords: Eco-epidemiology. Environmental samples. NESTED-PCR.
Paracoccidioidomycosis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Endemicidade da PCM	16
-------------------	---------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

arf	Fator adenil de ribosilação
BVDV	Vírus da Diarreia Viral Bovina (<i>Bovine Viral Diarrhea Virus</i>)
H ⁺ Al ⁻	Alumínio trocável
cm	Centímetro
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
ELISA	Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)
g	Gramas
gp	Glicoproteína
h	Horas
ITS	Espaçador Transcrito Interno (<i>Internal Transcribed Spacer</i>)
m	Metros
min	Minuto
mm	Milímetros
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
pb	Pares de base
PCM	Paracoccidioidomicose
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pg	Picograma
pmol	Picomol
p:v	Peso/volume
RPPN	Reserva Particular do Patrimônio Natural
s	Segundos
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
V/cm	Volts/ centímetro
°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromol
µm	micrômetro
%	Por cento

SUMÁRIO

1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
1.1	<i>Paracoccidioides</i>	12
1.2	PARACOCCIDIOIDOMICOSE	13
1.3	ENDEMICIDADE	14
1.4	ECOLOGIA	16
1.5	ECO-EPIDEMIOLOGIA	18
1.6	DETECÇÃO MOLECULAR	23
2	OBJETIVOS	25
2.1	OBJETIVO GERAL	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
2	ARTIGO I	26
	<i>Expansion of the cryptic species of Paracoccidioides brasiliensis description found in environmental samples</i>	27
3	ARTIGO II	47
	<i>Detection of antibodies to Paracoccidioides brasiliensis in bovine milk</i>	48
	CONCLUSÕES	58
	REFERÊNCIAS	59
	ANEXOS	70
	ANEXO A	71

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 *Paracoccidioides* spp.

O gênero *Paracoccidioides* pertence ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Subdivisão Euascomycetes, Classe Plectomycetes, Ordem Onygenales, Família Ajellomycetaceae (UNTEREINER, et al., 2004). A diferença genômica de *P. brasiliensis* foi primeiramente evidenciada por Hahn e colaboradores (2003), após analisarem diferentes isolados por polimorfismo do DNA amplificado ao acaso (RAPD). Em 2006 Matute e colaboradores, por genealogia de multi loci e microssatélites, identificaram que *P. brasiliensis* é composto por três espécies crípticas (S1, PS2 e PS3). Em 2008, Carrero e colaboradores, analisaram diferentes genes e identificaram que o isolado Pb01-*like* apresentava maior variabilidade genética, portanto, não poderia ser classificado em nenhuma das espécies crípticas. Posteriormente, Teixeira e colaboradores (2009), relataram uma nova espécie, denominada atualmente como *P. lutzii*. Em 2012, Theodoro e colaboradores, descreveram mais uma espécie críptica no complexo *P. brasiliensis*, a PS4, após análise de três polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs). Com a mesma abordagem, em 2016, Muñoz e colaboradores, compararam 26 isolados da espécie críptica S1 e propuseram uma divisão em S1a e S1b.

A espécie *P. lutzii* e as espécies crípticas PS3 e PS4 de *P. brasiliensis* são consideradas monofiléticas e S1 e PS2 parafiléticas (MATUTE et al., 2006a; TEIXEIRA, et al., 2009, 2014). Referente à especiação, são classificadas como simpátrica e recombinante S1 e PS2, alopátrica monoclonal PS3 e parapátrica *P. lutzii* (MATUTE et al., 2006a; THEODORO, et al., 2012, TEIXEIRA, et al., 2014). A ocorrência dos achados de PS2 e S1 está restrita à Argentina, Brasil, Peru, Paraguai, Venezuela e Uruguai. Embora a PS3 tenha sido observada inicialmente apenas na Colômbia, Roberto e colaboradores (2016) classificaram alguns isolados obtidos na Venezuela e Brasil como pertencentes a esta espécie críptica. A espécie PS4 está representada por isolados clínicos provenientes da Venezuela e *P. lutzii* no Brasil e Equador (THEODORO et al., 2012; ROBERTO et al., 2016).

Contudo, as espécies crípticas não são aceitas por toda a comunidade científica, Salgado-Salazar e colaboradores (2010) as descreveram como

variantes geográficas de uma única espécie. Em 2017, Turissini e colaboradores após analisarem regiões nucleares, propuseram elevar as espécies crípticas em novas espécies de *P. brasiliensis*, PS2 para *P. americana*, PS3 para *P. restrepiensis* e PS4 para *P. venezuelensis*, além de considerá-las simpátricas, monofiléticas e não clonais. Neste estudo, os autores descrevem que o fluxo gênico é raro, restringindo-se à mitocôndria. Em consonância com a descrição das novas espécies, os autores descrevem diferenças sutis entre número e tamanho das células de levedura entre as espécies.

Em relação às diferenças entre as espécies, foram evidenciadas divergências na virulência, resistência a fármacos e taxas de proliferação (MOLINARI-MADLUN et al., 1999; HAHN et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2009). Teixeira e colaboradores (2009) cultivaram diferentes isolados de *Paracoccidioides* e observaram células gigantes de *P. lutzii* e células alongadas, como pseudo hifas para o isolado Bt84 classificado como PS2. No mesmo estudo, descreveram que o isolado PB 01 (*P. lutzii*) produziu conídios alongados, enquanto os isolados de PS3 e PS2 não produziram conídios nas condições analisadas. Terçarioli e colaboradores (2007), após avaliarem as diferenças entre isolados cultivados em solo, descreveram que um isolado PS2 não apresentou conídios enquanto S1 apresentou produção significativa.

Os fungos do gênero *Paracoccidioides* apresentam dimorfismo térmico, com forma de levedura entre 35 e 37°C e de micélio entre 25 e 30°C. Na fase miceliana, as colônias são irregulares, apresentam poucos micélios aéreos e hifas septadas. A coloração varia entre branco e amarelo, podendo apresentar pigmentação marrom difusa. Em condições desfavoráveis, produzem conídios unicelulares e pedunculados que, a 26°C crescem na forma saprofítica. A fase de levedura de *P. brasiliensis* apresenta dupla membrana, a interna rugosa e externa lisa, tamanho entre 4 e 30µm e quando analisadas em microscópio são birrefringentes. As colônias cerebriformes tem coloração clara (branco a creme) e aspecto seco ou ligeiramente cremoso (BRUMMER et al., 1993; CAMPOS 2011).

1.2 PARACOCCIDIOIDOMICOSE

P. brasiliensis e *P. lutzii* são os agentes etiológicos da paracoccidioidomicose (PCM), doença granulomatosa sistêmica de evolução crônica, que apresenta elevada importância na saúde pública pelo grande potencial incapacitante. Quando não diagnosticada e tratada corretamente, pode levar o paciente a óbito. Como o habitat ainda não está definido, a forma de infecção ainda não foi esclarecida, entretanto, acredita-se que ocorra após exposição a propágulos fúngicos provenientes do solo, durante a exploração de áreas nativas para fins agrícolas, ou decorrentes do preparo do solo (BAGAGLI et al., 2008; BELLÍSSIMO-RODRIGUES et al., 2011, 2013; ARANTES et al., 2013; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). A doença ocorre com maior frequência em agricultores, com predominância entre 30 e 50 anos de idade. Até a puberdade, a doença afeta indivíduos de ambos os sexos, entretanto, em idade adulta acomete principalmente homens. A menor frequência da doença em mulheres ocorre devido à ação do estrógeno, que inibe a transformação da forma miceliana (forma infectante) para forma de levedura (forma patogênica) (PINZAN et al., 2010; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

A PCM pode ser dividida em forma crônica e aguda. Os pacientes com a forma aguda (5 a 25% dos casos) frequentemente são jovens. Esta forma, quando comparada com a crônica, é mais grave, progride rapidamente e é altamente disseminada, podendo atingir linfonodos, medula óssea, baço e fígado. Muitas vezes está relacionada com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida e Tuberculose. A forma crônica da doença apresenta ocorrência entre 74 e 96% dos casos e prevalece em indivíduos adultos do sexo masculino. A progressão é lenta, podendo ser classificada como leve, moderada ou grave. Pode acometer pulmões, tecidos mucocutâneos, sistema nervoso central e glândulas adrenais, além da possibilidade de evolução para fibrose, o que pode interferir de forma permanente no funcionamento do órgão (BRUMMER et al., 1993; CAMPOS, 2011; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

1.3 ENDEMICIDADE

Considerada a principal micose sistêmica da América Latina, a PCM foi descrita como a oitava causa de morte relacionada a doenças de origem infecciosa, com prevalência na América do Sul, principalmente no Brasil que

apresenta 80% dos casos. A notificação no Brasil não é compulsória na maioria dos estados, o que dificulta o estabelecimento da taxa de incidência (COUTINHO et al., 2002; SHIKANAI-YASUDA, 2006, 2017). Em áreas endêmicas, é estimado que ocorra de 1 a 4 novos casos de PCM por 100 mil habitantes por ano (MARTINEZ, 2017) e presume-se a ocorrência de infecção de 10-30 novos casos por 1.000.000 habitantes. A taxa de mortalidade registrada no período de 2002-2004 foi de 1/1.000.000 habitantes/ano e de hospitalização 1/100.000 habitantes/ano entre 1998-2006 (COUTINHO et al., 2002; MARTINEZ, 2017).

Segundo Martinez (2015), o Brasil pode ser dividido em três grandes áreas endêmicas, a primeira compreende o Sul (Paraná até o Norte do Rio Grande do Sul), Sudeste (Estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo e Minas Gerais) e Centro-Oeste (principalmente os estados de Goiás e Mato Grosso do Sul). A segunda e terceira abrange a Amazônia, uma representada pela fronteira (Pará, Maranhão e Tocantins) e a outra pela Amazônia Ocidental e o Estado de Rondônia (Fig. 1).

O Sudeste foi uma das primeiras regiões reconhecidas como endêmica para PCM, provavelmente devido à extensa atividade agrícola, com destaque para a cafeicultura, onde muitos trabalhadores adquiriram a PCM (LACAZ, 1956; MARTINEZ, 2017). Pertencente à mesma área de endemicidade, o estado do Paraná apresenta o maior número de casos de PCM do Sul do Brasil (COUTINHO et al., 2002). No período de 1998-2006 foi registrado neste estado uma taxa de internação de 3,4/ano e uma taxa de mortalidade hospitalar de 7,5/ano (COUTINHO, et al., 2015). Apesar de não haver muitas publicações sobre PCM em Santa Catarina, foram descritos 133 óbitos por PCM entre 1980 e 1995 e, o número de internações relatadas no estado (187) foi maior que no Rio Grande do Sul (87) (COUTINHO et al., 2002; 2015).

A expansão da PCM e mudanças na epidemiologia frente às mudanças sociais, ambientais e a política governamental que promoveu a ocupação e colonização de terras, foram relatadas por Martinez (2017). Os autores correlacionaram o aumento da exploração de áreas com o maior índice de casos de PCM registrados. A área endêmica da PCM está se expandindo a partir do Sul e Sudeste para o Centro-Oeste e Norte do Brasil (Fig. 1). O fenômeno de expansão agrícola junto com a incidência da PCM pode ser

evidenciado nos estados de Tocantins, Pará, Maranhão, Rondônia (MARTINEZ, 2017). Contudo, Fabris e colaboradores (2014), relataram diminuição na forma aguda/subaguda da doença em crianças e adolescentes e atribuem este registro a diminuição do trabalho infantil em plantações e o envelhecimento da população rural, diminuindo a probabilidade de infecção.

Foram registrados casos de PCM em países fora da América Latina, como Estados Unidos, Canadá, Espanha, Japão, África, Alemanha, França, Holanda e Inglaterra. Contudo, todos os pacientes haviam visitado anteriormente um ou mais países da América Latina, endêmicos para a PCM (AJELLO et al., 1985; BUITRAGO et al., 2011).

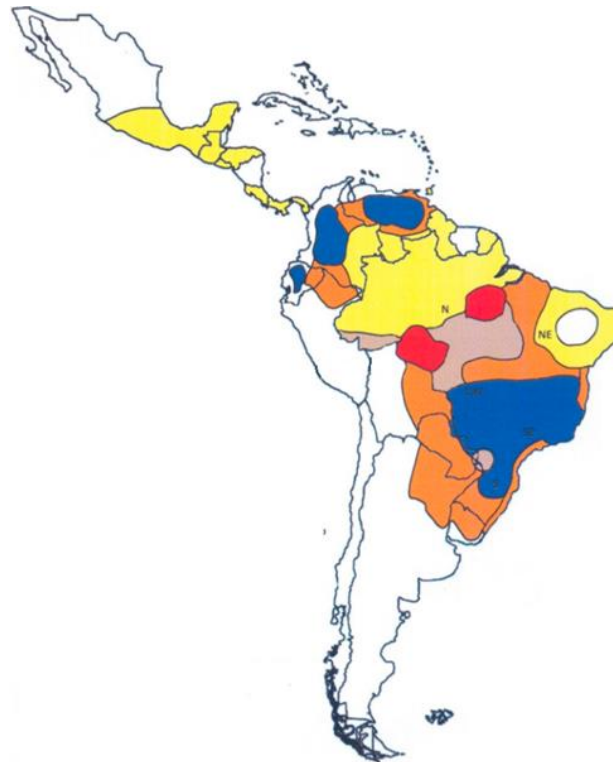


Figura 1 – Endemicidade da PCM. ● Refere-se as primeiras regiões com descrição de alta endemicidade. ● Áreas com alta incidência. ● Áreas com recente aumento de endemicidade. ● Regiões com moderada endemicidade. ● Regiões com baixa endemicidade. ○ Regiões sem registro ou casos raros de PCM.

Fonte: Martinez, 2017.

1.4 ECOLOGIA

O nicho ecológico de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* não está totalmente esclarecido. Acredita-se que o habitat seja o solo, fonte de obtenção de alguns isolados. No entanto, a não reprodutibilidade dos isolamentos, a falta de

clareza sobre as interações com os fatores abióticos e bióticos e da metodologia utilizada, não permitem afirmar que o solo seja o habitat de *Paracoccidioides* spp. (BALABANOV et al., 1964; FRANCO et al., 2000). O primeiro isolado do solo com características macro e microscópicas de *P. brasiliensis* foi obtido por Shome e Batista (1963), em uma fazenda de criação de gado no Recife. Posteriormente, Negroni (1966), isolou *P. brasiliensis* em uma área rural na Argentina. Outros isolados foram obtidos em plantações de café, por Albornoz (1971) na Venezuela e por Silva-Vergara e colaboradores (1998) em Minas Gerais.

A cultura é um ótimo método para obtenção de isolados clínicos, mas, quando aplicada para amostras ambientais, esta apresenta uma série de dificuldades, que podem ser evidenciadas em diferentes trabalhos. Mendelovici e colaboradores (1974), que analisaram quarenta e cinco amostras na Venezuela por cultivo direto e não obtiveram sucesso na tentativa de isolamento. Montenegro e colaboradores (1996) cultivaram oitocentas e oitenta e sete amostras de solo Botucatu - SP e também não conseguiram isolar *Paracoccidioides*.

Existem relatos de muitos fatores que contribuem para a dificuldade na obtenção de isolados de amostras ambientais. *Paracoccidioides* apresenta crescimento lento e grande demanda nutricional (RESTREPO, 1985), assim microrganismos de crescimento rápido presentes no ambiente sobressaem no cultivo *in vitro* (THEODO et al., 2005). Solos arenosos e argilosos foram avaliados *in vitro* por Terçarioli e colaboradores (2007) em relação ao desenvolvimento de *Paracoccidioides* e não foi constatado diferença no crescimento do fungo. Entretanto, ocorreu inibição do crescimento em baixa umidade e em níveis elevados de alumínio trocável ($H^+ Al^-$). Em relação a fatores limitantes para o desenvolvimento no ambiente, Ono e colaboradores (2002), relataram a ação inibitória de inseticidas, herbicidas e fungicidas agrícolas sobre o crescimento *in vitro* de *P. brasiliensis*, sugerindo que a presença desses produtos pode estar dificultando o isolamento do fungo de amostras ambientais. Alterações climáticas podem influenciar diminuindo a esporulação, a baixa concentração fúngica e a profundidade da coleta de amostras de solo também podem interferir no isolamento (THEODORO et al., 2005; ARANTES et al., 2013). Restrepo (1981) demonstrou que a redução de

oxigênio provoca uma taxa acelerada na mortalidade de *P. brasiliensis*, sem sobrevivência após sete dias.

Para obter isolados de *Paracoccidioides* de amostras ambientais, alguns autores utilizam o método de isolamento indireto, ou seja, as amostras são inoculadas em animais e após a eutanásia, o isolamento é realizado a partir de amostras de tecido. No entanto, o isolamento indireto de *P. brasiliensis* não é um método sensível. Como demonstrado no estudo de Silva-Vergara e colaboradores (1998), em que foram analisadas setecentas e sessenta amostras de solo e foi obtido apenas um único isolado de *P. brasiliensis*.

Outra alternativa que pode contribuir para o esclarecimento da ecologia de *Paracoccidioides* spp. consiste na identificação de hospedeiros naturais, pela correlação dos hábitos e habitats de diferentes espécies de animais infectados (ONO et al., 2001; SILVEIRA et al., 2008). Os estudos associam o habitat do fungo a locais úmidos (próximos a lagos, rios), áreas nativas ou com vegetação antrópica, clima temperado ou quente, com verões chuvosos e invernos secos, associado a taxas de precipitação moderada a altitude elevada e solos férteis (FRANCO et al., 2000; RESTREPO et al., 2001; BAGAGLI et al., 2003; MARTINEZ, 2017).

1.5 ECO-EPIDEMIOLOGIA

Para a identificação de hospedeiros naturais, inicialmente foram empregados testes imunológicos utilizando antígeno polissacarídico de *P. brasiliensis* (FAVA-NETTO, 1961; CONTI-DIAS et al., 1972; COSTA et al., 1995). Em seguida foram utilizados antígenos glicoprotéicos (exoantígeno) (BRUMMER et al., 1984; PUCCIA et al., 1986; CAMARGO et al., 1988; MENDES-GIANNINI et al., 1990; BOTTEON et al., 2002; FAGUNDES et al., 2002; PETRONI et al., 2017). Atualmente a soropidemiologia da PCM em diferentes espécies de animais tem sido realizada por meio de ELISA utilizando a gp43 purificada de *P. brasiliensis* (ONO et al., 2001; CORTE et al., 2007; SILVEIRA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2011, 2013; BELITARDO et al., 2014, SBEGHEN et al., 2015). Considerada o principal antígeno para o imunodiagnóstico da PCM, essa glicoproteína de 43 kDa é um antígeno exocelular de *P. brasiliensis* presente nas formas filamentosa e de levedura

sendo secretada durante a infecção (SILVA et al., 2003; PALMEIRO et al., 2005).

A infecção por *P. brasiliensis* foi demonstrada por meio de estudos epidemiológicos em diferentes espécies de animais domésticos e silvestres. Costa e colaboradores (1995), analisaram 96 mamíferos selvagens latino-americanos de um zoológico em São Paulo, 47 animais arbóreos (*Callithrix jacchus* e *Cebus* sp) e 49 terrestres (*Panthera onca*, *Felis pardalis*, *Felis wiedii*, *Felis tigrina*, *Felis geoffroyi* e *Nasua nasua*). Em comparação quanto à reatividade à paracoccidiodina, os animais de hábito terrestre apresentaram positividade maior (82,98%) que os primatas (22,45%), sugerindo o solo como possível nicho ecológico de *P. brasiliensis*. Corte e colaboradores (2007), no Paraná, avaliaram amostras de soro de primatas (25 *Alouatta caraya* e 68 *Cebus* sp) por ELISA utilizando gp43 e detectaram reação em 44,5% das amostras.

Outro estudo foi realizado no Rio Grande do Sul por Albano e colaboradores (2014), no qual 128 amostras de soro de animais silvestres de diferentes espécies foram analisadas e em 20% foi detectada a presença de anticorpos para gp43. Quando comparado os animais em relação ao local de captura, os de áreas rurais apresentaram maior positividade (57%) que os animais de área urbana (42%). E os animais de hábito arborícola apresentaram menor infecção (11%) que os terrestres (50%).

No Paraná, Sbeghen e colaboradores (2015) avaliaram a infecção por *P. brasiliensis* em amostras de 38 pequenos mamíferos silvestres por meio da detecção de anticorpos para gp43 e por biologia molecular (detecção da região ITS - *Internal Transcribed Spacer*). Os animais foram capturados em uma Reserva Particular do Patrimônio Natural de Mauá da Serra, Paraná, e 7,3% das amostras de soro foram positivas e um animal apresentou amplificação após *Nested* PCR. Utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) com a mesma região gênica usada por Sbeghen e colaboradores (2015), Losnak e colaboradores (2018), analisaram amostras de 297 animais silvestres atropelados em Santa Catarina e detectaram a presença de *Paracoccidoides* em oito roedores.

Um importante marcador epidemiológico, que aponta fortemente o solo como o provável habitat de *Paracoccidoides* spp. é o tatu. Estes animais

apresentam intenso contato com o solo, devido à construção de túneis e por habitarem tocas subterrâneas. Outro fator importante que pode contribuir para sua infecção é a temperatura corporal de 30 a 35°C e a imunidade celular relativamente baixa. A infecção já foi descrita em tatus do Brasil e Colômbia, principalmente da espécie *Dasyus novemcinctus*, cuja área de ocorrência se sobrepõe à área geográfica da PCM (PURTILO et al., 1975; NAIFF et al., 1986; BAGAGLI et al., 1998, 2003, 2006; CORREDOR et al., 1999, 2005; SILVA-VERGARA et al., 2001; RESTREPO et al., 2001; PEREIRA et al., 2003; PEREIRA et al., 2008; ARANTES et al., 2013). Restrepo e colaboradores (2001) descreveram que o solo de tocas proporciona um ambiente equilibrado, podendo favorecer o desenvolvimento do fungo, pois o local não é submetido a grandes variações de umidade e temperatura.

A infecção por *P. brasiliensis* foi observada em várias espécies de animais domésticos no estado do Paraná por meio de sorologia utilizando o antígeno gp43. Oliveira e colaboradores (2012), analisaram 262 soros de ovinos e identificaram reação em 37%, Ferreira e colaboradores (2013) avaliaram 202 soros caprinos e relataram positividade de 26,2%, de 106 soros suínos provenientes de animais de vida livre, foi detectado reação em 37,7% das amostras (BELITARDO et al., 2014a) e em 100 soros equinos analisados por Corte e colaboradores (2007), foi observada positividade de 30%. Além da infecção descrita no Paraná, a infecção em equinos por *P. brasiliensis* também foi relatada no Uruguai por Conti-Dias e colaboradores (1972), após observarem reatividade de 23% na reação intradérmica com paracoccidioidina em 195 animais.

Em bovinos a infecção foi descrita utilizando teste intradérmicos com antígeno polissacarídico de *P. brasiliensis*, por Gutierrez e colaboradores (1974), no Uruguai, ao analisarem 293 animais, dos quais 2% apresentaram reatividade e por Costa e Fava-Netto (1978), em São Paulo, que relataram positividade de 44%. Silveira e colaboradores (2008), demonstraram que bovinos inoculados com *P. brasiliensis* produzem anticorpos para gp43 e, após analisarem 400 soros de animais do Mato Grosso do Sul detectaram, reação em 17,5%.

No trabalho realizado por Oliveira e colaboradores (2011), a relação entre o contato com o solo e a infecção de animais por *Paracoccidioides* pôde ser

evidenciada novamente. Neste estudo, foi utilizado o teste de ELISA com gp43 para avaliar amostras de soro de 183 galinhas, sendo 40 de vida livre do estado do Mato Grosso do Sul, e 143 do Paraná (100 galinhas de vida livre e 43 de gaiola). Os animais criados em gaiola e, portanto, com menor contato com o solo, não apresentaram reação para gp43, enquanto que as aves de vida livre do Mato Grosso do Sul e do Paraná, apresentaram 55% e 16% de positividade, respectivamente.

Belitardo e colaboradores (2014b) avaliaram a infecção por *P. brasiliensis* em coelhos de vida livre e de gaiola utilizando a gp43 como antígeno. Os soros de animais de vida livre apresentaram positividade maior (41,6%) em relação aos animais de gaiola (11,1%). A infecção por *P. brasiliensis* também foi observada em gatos por Oliveira e colaboradores (2013), utilizando gp43 como antígeno, e detectaram reação em 48,8% e 2% em animais da área rural e urbana, respectivamente. Estes estudos reforçam que o solo deve ser o habitat de *P. brasiliensis*.

A descrição da PCM-infecção em cães, também proporcionam a correlação do solo como habitat do *Paracoccidioides* spp., pois estes animais tem o hábito de escavar e farejar (ONO et al., 2001, RICCI, 2004; FARIAS et al., 2011). Em estudo soroepidemiológico na região Norte do estado do Paraná, Ono e colaboradores (2001), relataram positividade para gp43 de 14,8% em cães de área urbana, 48,8% da periferia, e 89,5% da área rural. Em Minas Gerais, Fontana e colaboradores (2010), observaram reatividade de 80% em cães de área rural e 53% em cães de área urbana. Em adição, a infecção nestes animais, Petroni e colaboradores (2017), por meio de imunodifusão radial dupla com exoantígeno, relataram positividade de 7,4% após análise de 300 soros de cães provenientes de Araçatuba, Andradina e Birigui no estado de São Paulo.

Em regiões consideradas endêmicas para a PCM humana foram descritos três casos de PCM-doença natural em cães. O primeiro relato ocorreu em uma fêmea da raça Doberman, na cidade de Mogi Guaçu (SP). A doença foi diagnosticada por imunohistoquímica e PCR (RICCI, 2004). Posteriormente, a PCM foi relatada em um animal da mesma raça no Paraná e confirmada por achados clínicos, cultura, PCR, imunohistoquímica e histopatologia (FARIAS et al., 2011). O terceiro caso ocorreu em uma fêmea da raça Labrador em Londrina, Paraná, por meio de exames micológicos, sorológicos e moleculares

(HEADLEY et al., 2017). Além destas descrições, a PCM-doença foi reportada em um gato persa no Chile (Gonzales et al., 2010).

A PCM-doença também foi descrita em animais silvestres com hábito arborícola, como o macaco de cheiro (*Saimiri sciureus*) da Bolívia, por meio de exame histopatológico (JOHNSON, et al., 1997) e em uma preguiça-real (*Choloepus didactylus*) proveniente da Guiana Francesa (TREJO-CHÁVEZ, et al., 2011). Recentemente, *P. brasiliensis* foi detectado por biologia molecular em um golfinho (*Lagenorhynchus obliquidens*) na Costa do Japão (MINAKAWA, et al., 2016) e por Vilela e colaboradores (2016) em 6 golfinhos (*Tursiops truncatus*) na Flórida (USA). Os autores propuseram ser uma nova espécie não cultivável do fungo. Na tentativa de explicar a infecção nestes animais, Vilela e colaboradores (2016), descreveram que este fenômeno pode ser uma expansão do nicho ecológico de *P. brasiliensis*, causado por mudanças climáticas globais, o que pode resultar no aumento no número de espécies afetadas.

Devido à constante migração de pessoas e o grande período de latência, a correlação de casos de PCM em humanos com o habitat de *Paracoccidioides* não é considerada uma boa estratégia para o esclarecimento do nicho ecológico do fungo (BALABANOV et al., 1964; RESTREPO, 1985). No entanto, indivíduos jovens frequentemente apresentam deslocamento restrito aos locais onde nasceram e podem contribuir com dados da ecologia do *Paracoccidioides* (RESTREPO, et al., 2001). Cadavid e Restrepo (1993), na Colômbia, avaliaram por testes intradérmicos com paracoccidioidina, indivíduos que residiam no local de nascimento e relacionaram os casos positivos com a presença de cursos de água. Os resultados obtidos por Pedrosa (1976) e Rios-Gonçales e colaboradores (1998) no Rio de Janeiro, relacionam o habitat com maior altitude, clima frio, presença abundante de cursos de água, chuvas e vegetação.

A correlação entre o aumento da precipitação e a elevação de caso de PCM foi demonstrada na avaliação de registros do estado de São Paulo, em análise de Barrozo e colaboradores (2010) em 1985 e entre 1988 e 1996 por Blota e colaboradores (1999). No primeiro período, os autores relataram o maior número de casos de PCM em virtude do fenômeno El Niño no período de 1982 e 1983 que resultou em aumento da incidência de chuvas, resultando no

armazenamento de água no solo e aumento de umidade do ar que contribui para o desenvolvimento do fungo e, posteriormente, a dispersão de conídios. No segundo período, os autores observaram que Campinas apresentou 48% dos casos analisados. A cidade tem como característica, clima tropical com altos índices de chuva durante 8 meses do ano e economia baseada na agricultura. Arantes e colaboradores (2016), relataram a correlação com períodos chuvosos após a análise de aerossóis do solo, os autores descrevem que o período de chuva auxilia no desenvolvimento fúngico, e uma breve seca contribui para a disseminação dos esporos.

A relação da perturbação da vegetação e do solo com casos de infecção por *Paracoccidioides* pode ser evidenciada em populações indígenas, onde os casos de PCM eram considerados raros, mas com as alterações das práticas agrícolas, como a implementação da cultura de café, o número de casos registrados da doença nestas populações aumentaram (VALLE et al., 1991; COIMBRA et al., 1994; THALHARI et al., 1998). Loth e colaboradores (2011) correlacionaram alterações ambientais com o aumento de casos de PCM na microrregião da barragem de Itaipu, estado do Paraná, onde 102 casos de PCM foram registrados no período de 18 meses entre 2008 a 2009. Mangiaterra e colaboradores (1999), após estudo intradérmico com paracoccidioidina em 455 indivíduos relataram o surgimento de casos da doença (11,4%) durante a construção da usina hidrelétrica de Yacyretá na Argentina. Bagagli e colaboradores (2003) compararam locais de origem de tatus com detecção de *P. brasilienses* e os animais positivos foram encontrados com maior frequência em locais com presença de mata ciliar, reflorestamento de eucalipto e pinus e perto de fontes de água. Arantes e colaboradores (2016) coletaram amostras de aerossóis e solo e correlacionaram a detecção de *Paracoccidioides* com áreas desmatadas e florestas ribeirinhas e com presença de atividade agrícola.

1.6 DETECÇÃO MOLECULAR EM AMOSTRAS AMBIENTAIS

Outra metodologia que vem sendo empregada nos estudos eco-epidemiológicos é a técnica de PCR. A utilização de métodos moleculares na análise de amostras ambientais vem ganhando espaço por apresentar alta sensibilidade e possibilitar a identificação de organismos incultiváveis, além de

permitir a classificação, mapeamento de áreas de risco e relação com dados de isolados já descritos (THEODORO, 2005; BAGAGLI, 2010, 2011). Inicialmente, estudos realizados *in vitro* com amostras de solo artificialmente contaminadas com *P. brasiliensis*, demonstraram sensibilidade (aproximadamente 90 células de *P. brasiliensis*) e especificidade da PCR (DIEZ et al., 1999; THEODORO, 2005).

A técnica de PCR vem sendo empregada para detecção de *Paracoccidioides* em amostras ambientais (TEODORO et al., 2005, ARANTES et al., 2013, 2016). Theodoro e colaboradores (2005), descreveram boa eficiência após analisar 4 amostras de solo de toca de tatu e observar positividade em 3. Os autores ressaltaram a importância da utilização das regiões ITS, por serem conservadas e por apresentarem mais de cem cópias por genoma, favorecendo a detecção das sequências alvos. A diferença na sensibilidade das técnicas de cultivo e detecção molecular pode ser evidenciada no trabalho de Arantes e colaboradores (2013) em Botucatu (SP). Neste trabalho, quatro amostras ambientais foram analisadas por isolamento direto e seis pela metodologia de extinção sem obtenção de isolados. Diferentemente, após *Nested* PCR (regiões ITS) 34% de 27 aerossóis de solo apresentaram amplificação. Ainda foi possível evidenciar que todas as amostras cultivadas em ágar e cinco das analisadas pela técnica de extinção foram positivas na PCR.

Arantes e colaboradores (2016) por meio da amplificação e hibridização *in situ* das regiões ITS identificaram variantes genéticas em amostras ambientais não relatadas em isolados clínicos, sugerindo que *Paracoccidioides* apresenta maior variabilidade. Neste trabalho, foram coletadas 16 amostras de aerossóis e 36 amostras de solo de tocas de tatu em áreas endêmicas e não endêmicas para PCM nas regiões Sudeste Centro-Oeste e Norte do Brasil. Os autores descreveram detecção em 67,5% das amostras de solo, 81% de aerossóis e 83% por hibridização.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Detectar a presença de *Paracoccidioides* spp. em amostras de solo e anticorpos para *P. brasiliensis* em amostras de leite de bovinos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter isolados de *Paracoccidioides* spp. pelo método de isolamento direto de amostras de solo de Loanda, Londrina, Mauá da Serra no Paraná e de Água Doce, Joaçaba em Santa Catarina.
- Detectar pela técnica de PCR a presença de *P. brasiliensis* em amostras de solo de Loanda, Londrina, Mauá da Serra no Paraná e de Água Doce, Joaçaba em Santa Catarina.
- Identificar as espécies crípticas de *P. brasiliensis* nas amostras de solo analisadas de Loanda, Londrina, Mauá da Serra no Paraná e de Água Doce, Joaçaba em Santa Catarina.
- Avaliar a utilização de amostras de leite para detecção de infecção por *P. brasiliensis* em bovinos.
- Detectar a presença de anticorpos para gp43 de *P. brasiliensis* por ELISA indireto em amostras de leite bovino nas cidades de Água Doce e Treze Tílias – Santa Catarina.
- Descrever as características dos locais de coleta de amostras positivas de solo e de leite.

3 ARTIGO I PARA PUBLICAÇÃO (MYCOSES)

O presente manuscrito está formatado segundo as normas do periódico Mycoses. Os resultados obtidos estão descritos no artigo intitulado “*Expansion of the cryptic species of Paracoccidioides brasiliensis description found in environmental samples*”.

Expansion of the cryptic species of *Paracoccidioides brasiliensis* description found in environmental samples

Abstract

Paracoccidioides brasiliensis and *P. lutzii* are the etiological agents of Paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic mycosis endemic in Latin American countries. It is believed the fungal infection occurs due to inhalation of fungal propagules from soil, however the true habitat of the fungus is not yet defined. The isolation of the agent from environmental samples is extremely difficult, therefore techniques such as PCR are being widely used to identify and classify the *Paracoccidioides* species from these locals. The aim of this study was to detect *P. brasiliensis* in soil samples from the states of Paraná and Santa Catarina in Brazil and identify its occurrence in different environmental locations. The soil samples (n=169) were collected from Paraná (n=102) and from Santa Catarina (n=67). The samples were cultured in sabouraud dextrose agar and also analyzed through PCR prior amplification of the ITS and α -tubulin regions. No growth of colonies similar to *P. brasiliensis* was observed, however amplicons of ITS region (specific for *P. brasiliensis*) were detected in 89% of samples (93% from Paraná and 82% from Santa Catarina). Amplicons of α -tubulin showed the presence of cryptic species PS3 in both states and S1 in Santa Catarina. According to the location from where the samples were collected, 94% of the positive samples were collected in the presence of water and 93% in burrows. The results indicate *P. brasiliensis* is widely distributed and water and burrows are related to its presence in the environment.

Keywords: Identification, Nested-PCR, Paracoccidioidomycosis, Soil

Introduction

The differentiation of the *Paracoccidioides* genus was recognized recently due to molecular markers and *P. brasiliensis* was considered a complex composed by five cryptic species, S1a, S1b, PS2, PS3 and PS4 [1-4]. Turissini and collaborators in 2017 [5] proposed classifying the cryptic species into new species, *P. brasiliensis* to S1, *P. amaericana* to PS2, *P. restrepiensis* to PS3 and *P. venezuelensis* to PS4.

P. brasiliensis and *P. lutzii* are the agents of Paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic mycosis endemic in Latin American countries [2,6]. It is a granulomatous disease that has a slow progression with prevalence in south, southeast and middle-west regions of Brazil [6-9].

Despite being described by Adolph Lutz in 1908, the source of infection is not completely understood because the fungus habitat is not yet defined [10-12]. It is believed that fungus occurs in soil because some isolates were obtained from this source [13-16]. The first *P. brasiliensis* isolate was obtained by Shome and Batista from soil of a livestock farm in Recife, Brazil [13]. Negroni isolated the fungus from a rural area in Argentina [14] and other *P. brasiliensis* isolates were obtained in coffee crops by Albornoz [15] in Venezuela and by Silva-Vergara and collaborators [16] in Minas Gerais, Brazil.

Many factors contribute to the difficulty to isolate *P. brasiliensis* from environmental samples [17-22], such as the fungus slow growth and high nutritional demands and the competition with fast growth microorganisms in culture [17,18]. In vitro tests have described the inhibitory action of pesticides as limiting factors for environmental development of *P. brasiliensis*, suggesting that presence of these products may be hindering the isolation of the fungus from environmental samples [20]. Fungal isolation also can be influenced by climate changes that may decrease sporulation and its concentration in the environment [21,22]. The depth of sample collection also can affect the attempts of isolation, as described by Restrepo [23] who demonstrated the reduction of oxygen causes an accelerated mortality of *P. brasiliensis*.

In order to contribute to the elucidation of the ecology and mapping of *Paracoccidioides* presence its indirect detection is performed by the

identification of natural hosts [24-31] and, recently, through Polymerase Chain Reaction (PCR) [19, 21, 22, 32]. In addition, the use of molecular methods in the analysis of environmental samples has been gaining ground due to the high sensitivity and capacity of identification of organisms [19, 21, 32]. Studies were performed in endemic and non-endemic regions using the ITS regions (Internal Transcribed Spacer) describing the presence of the cryptic species of *P. brasiliensis* S1, PS2 and *P. lutzii* [21, 22]. With this methodology, it was detected high prevalence in different areas but also it was possible to identify genetic variants not reported in clinical isolates, thus suggesting greater variability in the environment [22]. Therefore, the objective of this study was to detect *P. brasiliensis* in soil samples from the states of Paraná and Santa Catarina in Brazil and identify its occurrence in different environmental locations.

Material and methods

Study area and collection of soil samples

Soil samples were collected in three municipalities in the state of Paraná and two in the state of Santa Catarina (Fig. 1). Soil samples from Paraná were collected during 2016 in Loanda (n=52), Mauá da Serra (n=10) and in Paiquerê, District of Londrina (n=40). In Santa Catarina the samples were collected in 2017 in Joaçaba (n=36) and in Água Doce (n=31). All samples were taken up to 8cm deep with a spatula and the material was stored in sterile flasks, between the collection of each sample the spatula was decontaminate with 70% ethanol in order to avoid cross contamination.

All the collection sites have humid subtropical mesothermal climate and belong to Atlantic forest ecosystem complex. The municipalities of Londrina, Mauá da Serra, Água Doce and Joaçaba are inserted in the Mixed Ombrophilous Forest, and the municipalities of Londrina, Mauá da Serra and Loanda in Seasonal Semideciduous Forest [33-35].

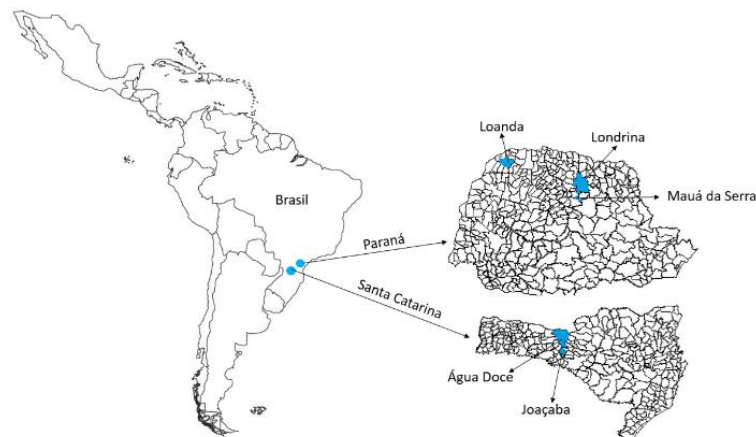


Figure 1 - Map of Latin America with the states of Paraná and Santa Catarina highlighted. In blue are the municipalities where the samples were collected.

Attempt of *Paracoccidioides* spp. Isolation

The soil samples were diluted 1:10 (w:v) in 0.9% saline solution with chloramphenicol (50µg/mL) and shaken for 5 min/100rpm followed by 1min at rest, 100µL of the supernatant were poured onto Sabouraud agar dextrose medium with chloramphenicol (50µg/mL) in duplicate and incubated at 36°C for 30 days.

DNA extraction of Soil Samples

DNA extraction was performed according to Volossiuk et al ^[36], with some modifications: before weighing the samples (0.25g) they were dried at room temperature for 18h and 2mL of 1% skim milk solution and 1mL of phenol (1 H₂O:9 phenol + 2% EDTA, v:v:w) were used. The supernatant was obtained (phenol step) and added RNase 20mg/mL 1:100 (v:v) (Thermo Fisher, Scientific, Waltham, MA, USA) and then incubated at 38°C/30min, followed by the addition of 500µL of 1 isoamyl alcohol:24 Chloroform:25 Phenol v:v:v, stirring and centrifugation. Precipitation was performed in alcohol PA - 20°C/overnight. Subsequently, 2 washes were performed with 70% alcohol. The pellet was eluted in 50µL ultrapure water. Quantification was done using Nanodrop™ (Thermo Fisher, Scientific, Waltham, MA, USA), and the samples were diluted to 25ng/µL using ultrapure water.

PCR / Nested PCR reactions

For the amplification in the Nested PCR, primers of the ITS (Internal Transcribed Spacer) regions were used, arranged between the 18S and 28S gene regions. The primers ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') and ITS 5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') ^[37] were used for the first reaction, with thermal cycle conditions of 95°C/5min, followed by 35 cycles at 95°C/30s, 60°C/30s, 72°C/45s, and the last step at 72°C/10min. Using the product of the first amplification, Nested PCR was performed using specific primers for *Paracoccidioides* Pb-ITS-E (5'-GAGCTTGAGGTCTGAGACC-3') ^[19] and Pb-

ITS-T (5'-GTATCCCTACCTGATCCGAG-3')^[21] this region present fragment of 450bp and the thermal cycle conditions described by Arantes et al.^[21]. The Nested PCR, was also employed with the primers specific to *P. brasiliensis* Pb-ITS-E and Pb-ITS-R (5'-AAGGGTGTCTCGATCGAGAGAG-3')^[19], which present fragment of 387bp. This reaction was performed with similar cycles to the first reaction (ITS-4 and ITS-5), changing only the annealing temperature to 62°C/30s. Conditions for PCR with the primers α -TubF (5'-CTGGGAGGTATGATAACACTGC-3') and α -TubR (5'-CGTCGGGCTATTTCAGATTTAAG-3')^[38] were performed at 94°C/10min, followed by 35 cycles at 94°C/30s, 60°C/30s, 72°C/30s, and the last step at 72°C/5min, this primers have an amplification region of 263bp.

For the reaction with the ITS regions, 12.5 μ L of GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, WY, USA), 8 μ L of RNase-free water, 2.5 μ L of DNA (25ng/ μ L), 1 μ L of each primer (forward and reverse) at a concentration of 10 μ M, totaling a volume of 25 μ L were used. For the reaction of the α -tubulin region, 10 μ L TopTaq® Master Mix (Qiagen, Hilden, Germany), 5.5 μ L RNase-free water, 2.5 μ L DNA (25 μ g/ μ L), 1 μ L each primer at 10 μ M concentration, 5 μ L of 10XCoralLoad Concentrate, totaling a volume of 25 μ L. As a positive control, DNA extracted from the isolate B-339 of *P. brasiliensis* was used in 10ng/ μ L concentration and as negative control the reaction was performed without addition of DNA. After amplification the products using the Pb-ITS-R/E and α -TubR/F primers were analyzed by electrophoresis in a 13% polyacrylamide gel stained with silver.

DNA Sequencing

For the sequencing (α - tubulin region), representatives of positive samples from each collection area were selected. These samples were collected at sites with different environmental characteristics and distant from each other. Totaling 29 samples from Loanda, 6 from Londrina, 4 from Mauá da Serra, 5 from Água Doce and 10 from Joaçaba. The samples were purified with 7,5M ammonium acetate. The sequencing reaction was performed using the kit BigDye™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) with 1 μ L of the 10ng/ μ L sample and 1 μ L of each primer at 10pmol. Sequencing was performed on the 3500xL automatic sequencer (Applied Biosystem). The quality of the sequencing was tested by Phred/Phrap/Consed software. The sequences obtained were analyzed and the contigs were assembled through the BioEdit program ^[39] and compared to the database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov) using as a BLAST nucleotide tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Phylogenetic analysis

For a phylogenetic analysis, were used 8 sequences of *P. brasiliensis* (S1, PS2, PS3, PS4), 3 of *P. lutzii*, 4 sequences of the family of *Paracoccidioides* (Ajellomycetaceae), as out-group of *Candida albicans*, all available in database NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), in addition to 20 sequences which are the subject of this study. The sequences were aligned using Mega 7 software and the phylogenetic tree was automatically constructed by the Jukes-Cantor model,

with Bootstrap method and Maximum likelihood as statistical method. The percentage of similarity of the branches of each cluster was supported through replicates of 1000 Bootstrap.

Results

Attempt of *Paracoccidioides* spp. isolation

No isolate with microscopic characteristics of *Paracoccidioides* spp. was obtained from 167 soil samples.

Detection at *P. brasiliensis* in soil samples

The soil sample was considered positive for *Paracoccidioides* when a band of 450pb, related to the ITS amplification region, was obtained using the Pb-ITS-E/T primers (Figure 2). Of the samples collected in the state of Paraná, 93% were considered positive and 82% of those collected in Santa Catarina (Table 1).

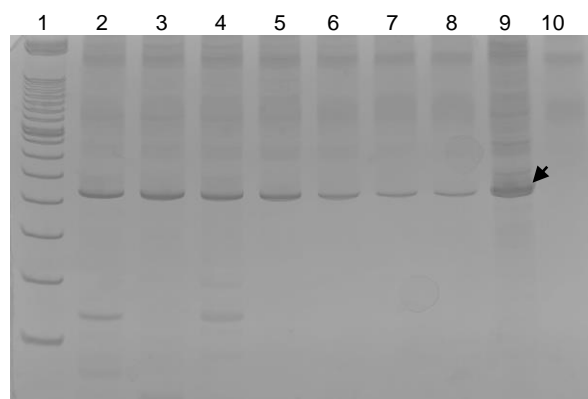


Fig 2 - Representative electrophoresis gel showing the PCR amplicon of the soil samples using the primers Pb-ITS-T/E. 1) 100pb molecular weight marker 2-8) Soil samples. 9) Positive control, isolated B-339. 10) Negative control, no DNA template. The arrow indicates a region of amplification of 450bp.

Table 1 – Detection of *P. brasiliensis* by Nested PCR in soil samples from the states of Paraná and Santa Catarina (with Pb-ITS-T/E primers).

Location	Number of samples	Number of positive samples	% positive samples
Loanda	52	50	96
Londrina	40	38	95
Mauá da Serra	10	7	70
Paraná	102	95	93
Água Doce	31	23	74
Joaçaba	36	32	89
Santa Catarina	67	55	82
TOTAL	169	150	89

Regarding the collection sites, the samples were classified according to the presence of water, large amount of organic matter, root of trees or from animals burrows. The same sample was included in two groups, when it matched both characteristics. In general, the positive samples were found in places with presence of water and in burrow, however we cannot affirm that this variant is significant due to the inequality of the number of samples between the groups. However, it can be observed that the positivity is high for the four parameters (presence of water, organic, root of trees and burrow) in the five areas studied (Table 2).

Table 2 – Percent detection of *P. brasiliensis* by Nested PCR in soil samples collected from different sites in the states of Paraná and Santa Catarina.

Location	Burrow (%)	Water (%)	Organic Matter (%)	Root (%)
Loanda	97	100	92	100
Londrina	100	100	94	100
Mauá da Serra	100	100	75	33
Água Doce	75	100	40	0
Joaçaba	93	85	85	100
TOTAL	93	94	82	85

Identification of the sequences obtained

The Pb-ITS-R/E primers were used to identify *P. brasiliensis* in soil samples with positive detection for *Paracoccidioides*. Among the 150 samples detected using the Pb-ITS-T/E primers, 129 remained positive after amplification using the Pb-ITS-R/E primers (Figure 3).

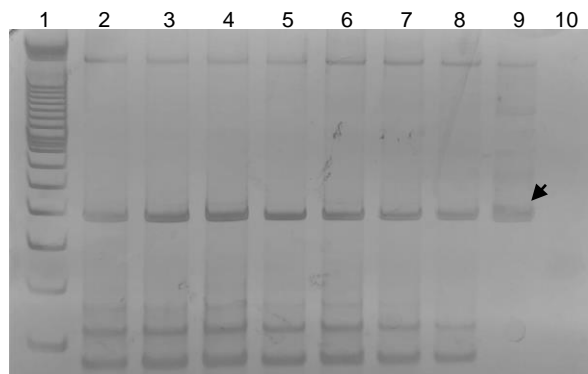


Fig 3 - Representative electrophoresis gel showing the PCR amplicon of the soil samples using the primers Pb-ITS-E/R. 1) 100pb molecular weight marker 2-8) Soil samples. 9) Positive control, isolated B-339. 10) Negative control, no DNA template. The arrow indicates a region of amplification of 387bp.

The α -tubulin region was used to identify the genus *Paracoccidioides* including the cryptic species of *P. brasiliensis*. All samples amplified through the Pb-ITS-E/T regions remained positive for α -tubulin (Figure 4). All sequences obtained by amplification of the α -TubF/R primers from Loanda-PR, Mauá da Serra, Londrina, Água Doce and 9 from Joaçaba, presented 100% similarity with the isolated EMP54 (access KT251022.1) and strain C1 (access DQ003815.1). And 1 sequence of Joaçaba that showed 100% similarity with isolate EMP29 (access KT251020.1).

Due to the number of sequences of *P. brasiliensis*, the soil model in this study, a phylogenetic tree was constructed with 20 representative sequences. All sequences from Loanda, Londrina, Mauá da Serra, Água Doce and 4 from

Joaçaba were grouped as PS3 in the phylogenetic tree. A sequence obtained in Joaçaba was grouped as S1 (Figure 4). The clusters of the phylogenetic tree are supported by high bootstrap values, which contribute to the identification of the cryptic PS3 and S1 species of *P. brasiliensis* (Figure 5).

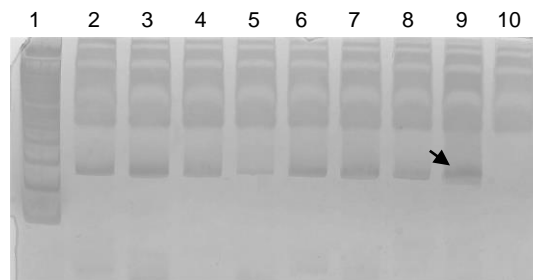


Fig 4 - Representative electrophoresis gel showing the PCR amplicon of soil samples using the primers α -TubR/F. 1) 100bp molecular weight marker. 2-8) Soil samples. 9) Positive control, isolate B-339. 10) Negative control, no DNA template. The arrow indicates amplification region of 263bp.

Discussion

Although several *Paracoccidioides* spp. isolates have been obtained by direct culture of clinical samples, this method presents difficulties when applied to environmental samples. In this study it was not possible to isolate *Paracoccidioides* from soil samples. Mendelovici et al ^[40] analyzed 45 soil samples in Venezuela by direct cultivation and no isolate of *P. brasiliensis* was obtained. Attempts of *P. brasiliensis* isolation in 887 soil samples from an endemic area of Paracoccidioidomycosis in Brazil were also unsuccessful ^[41]. This difficulty was also described by Arantes et al., that observed a great positivity in soil samples by PCR but was unsuccessful in isolating *Paracoccidioides* ^[21].

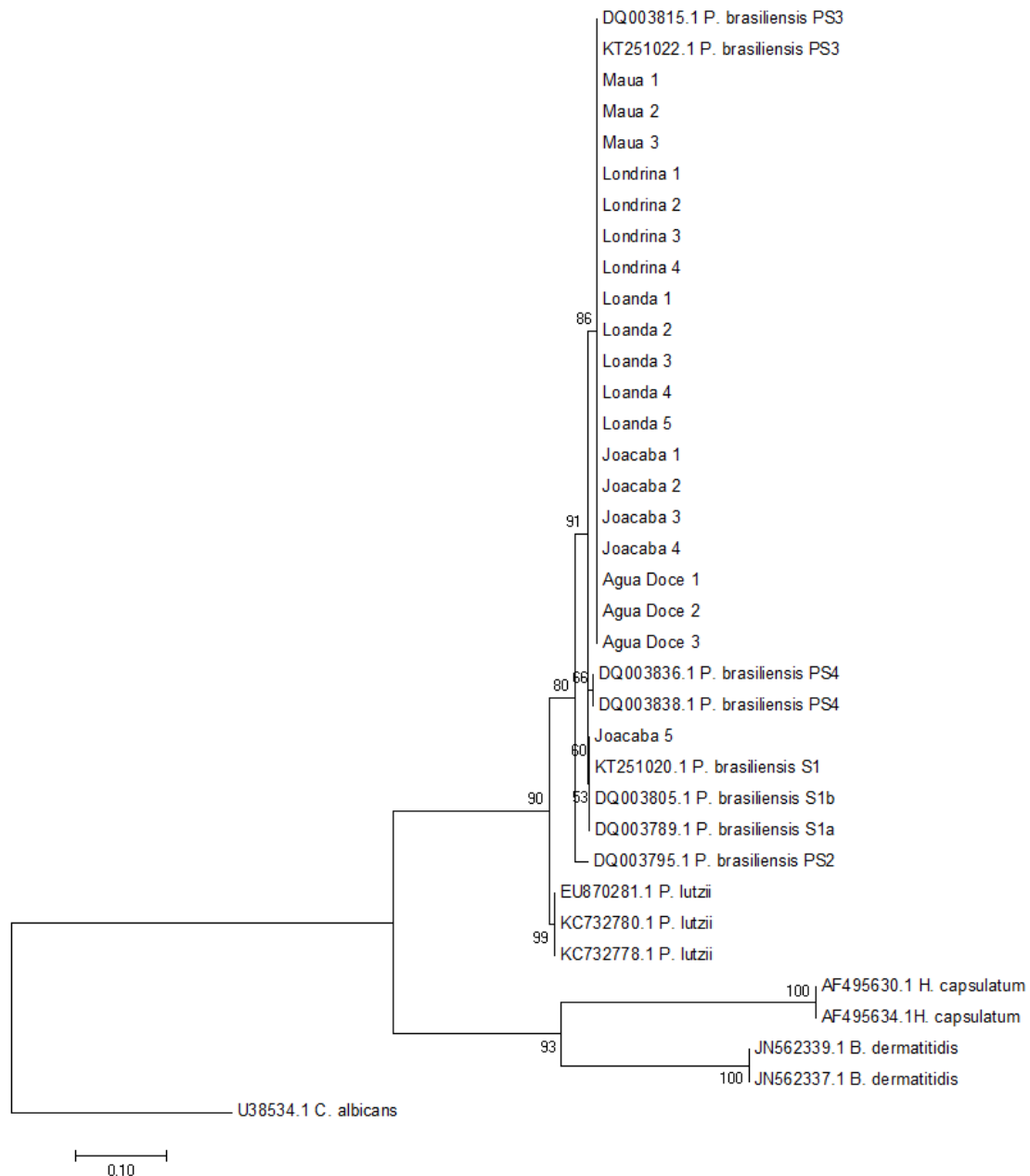


Fig. 5 - Phylogenetic tree based on the α -tubulin region. The sequences obtained in the NCBI database have access numbers at the beginning. The collected samples are identified by the city of origin. The values obtained from one thousand bootstrap replicates are displayed next to the branches. The Maximum Likelihood tree was automatically constructed was inferred in the MEGA 7 software using the Jukes-Cantor nucleotide substitution model.

The ITS regions occur in multiple copies in fungal genome, favoring the detection of target sequences [19]. High levels of positivity were detected (93% and 82% respectively), in soil samples from Paraná and in Santa Catarina,

especially when compared to the detection in environmental samples of 34% in the state of São Paulo [21], and similar to those found in the states of Goiás and Rondônia [22].

Seroepidemiological studies were carried out in several species of animals in the state of Paraná, and infection by *P. brasiliensis* and in all the animals studied was detected in all species [24-31]. In Londrina (northern Paraná), 95% of soil samples were positive by PCR. In this region, it was detected infection by *P. brasiliensis* in sheep [27], goats [29], horses [42], rabbits [30], cats [28], swine [31], and dogs [43]. Recently, PCM disease was diagnosed in a dog from the Northern Paraná State [46]. In Mauá da Serra, 70% of the analyzed samples were considered positive by Nested PCR. In this same area, Sbeghen et al. [24] observed seropositivity to *P. brasiliensis* in small wild mammals and detected *P. brasiliensis* in an animal by molecular analysis using the same gene region analyzed in the present study. At the collection site in the municipality of Loanda, 96% of the samples were positive. Loanda is near to the state of Mato Grosso do Sul, state that was observed positivity against *P. brasiliensis* gp43 in dairy cattle [47].

Regarding the state of Santa Catarina, it was observed a PCR positivity of 74% soil samples in the municipality of Água Doce and 89% in Joaçaba. Losnak et al. [48], collected road killed wild animals in Santa Catarina and detected *P. brasiliensis* in rodents using the Pb-ITSR/E primers. The molecular detection of *P. brasiliensis* in environmental samples in the state and the description of infection in wild animals are an alert to the public health of Santa Catarina because indicates the occurrence of the fungus in a region with an economy based on agriculture [49].

Paraná presents the highest number of PCM cases in humans among the southern states [6,8]. From 1998 to 2006, 280 cases of the disease were reported in Paraná and 187 in Santa Catarina [8]. The low number of PCM cases, when compared to the high percentage (89%) of positive soil samples detected by Nested PCR, could be explained by the hypothesis that *Paracoccidioides* is widely distributed in the environment, however, with low virulence or due to low sporulation [2,18] as suggested in the study of Arantes et al.[22]. In vitro studies in Soil Extract Agar medium showed the difference of sporulation among the cryptic species of *P. brasiliensis*, S1 showed high production of conidia [2,18], while PS4 showed low production [18] and PS3 and PS4 [2] showed no production.

The habitat of *Paracoccidioides* is correlated to moist, temperate or hot climates, with rainy summers and dry winters, associated with moderate precipitation rates, native or disturbed vegetation areas, fertile soils, and high altitudes [7, 11, 22,50-56]. Many of these characteristics are found in the areas where the soil samples were collected. The relationship of vegetation and soil disturbance with cases of PCM infection was described in indigenous populations after the implementation of the coffee crops [57-58], and in environmental impacts caused by the construction of dams [59,61]. *P. brasiliensis* was more frequently isolated from armadillos in sites with presence of riparian forest, eucalyptus and pine reforestation and near water sources[51]. In the present study, the samples were collected in preserved areas near to anthropic vegetation, such as soybean cultivation in Londrina and Mauá da Serra, corn in Água Doce, pinus and eucalyptus in Loanda and Joaçaba, as well as beef and dairy cattle farms in Loanda, Água Doce and Londrina. Moreover, the samples

that were classified by the presence of large amounts of organic matter (leaves, decomposing trunks) showed 82% positivity and in the presence of root of trees 85%.

Soil in animal burrows provides a balanced environment, which may favor the development of the fungus, since the site is not under large variations of abiotic factors ^[50]. These burrows were found at all study sites and samples were taken near the entrance and further down, however, no significant difference was observed. Detection of *P. brasiliensis* at these sites was 93%. The molecular detection of *Paracoccidioides* in soil samples was also reported by Theodoro et al. ^[19] and Arantes et al. ^[21,22].

Of the samples collected in the presence of water, 94% were positive, however the difference was not significant, probably due to the unequal number of samples among the groups. In Loanda there were no rivers in the collection area, the few sites found such as swamp and puddles, were positive after Nested PCR. These data reinforce that water is associated with the presence of *Paracoccidioides* in the environment. However, further studies should be carried out to understand the role of water in fungal development, participation of its biological cycle and host infection. The growth of the fungus in distilled water has already been described by Bedout ^[62] and infection in dolphins by yeasts with molecular similarity with *P. brasiliensis* has been reported in Japan ^[63] and the United States ^[64]. To explain infection in these animals, that this phenomenon is caused by global climatic changes, causing the expansion of the ecological niche of *P. brasiliensis* ^[64].

The sequences obtained from soil samples of Loanda, Mauá da Serra, Londrina, Água Doce, and 4 of Joaçaba were grouped in the PS3 cluster, these

sequences showed 100% similarity with the EMP54 isolate. EMP54 was isolated from soil in Caracas, Venezuela and belongs to the cryptic species PS3 [65]. Many authors have described the PS3 group as restricted to Colombia [1-3], however, Roberto et al. [65] described the occurrence of the cryptic PS3 species in Venezuela and Brazil and highlighted the importance of the analysis of more isolates to explore the distribution of the species. This is the first report of PS3 cryptic species detection in environmental samples from Brazil. The sequence 5-Joaçaba was identified as S1, this sample was collected in a river in the border of the study area. The cryptic species S1 has a description in the South of Brazil after identification of the isolate EMP93, from a patient [65]. This data is not surprising given the extensive sympatric between the species of *Paracoccidioides*, described after analysis of nuclear regions, which describes PS3 and PS4 as sister species and sister species S1 of the PS3/PS4 group [5].

The results of the amplification of the soil samples obtained in Paraná and Santa Catarina state highlight the wide geographic distribution of *P. brasiliensis*, the presence of cryptic species S1 and PS3 in Santa Catarina, PS3 in Paraná and the close relationship of fungus with water and burrows.

References

1. Matute DR, McEwen JG, Puccia R, et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Molecular Biology and Evolution*. 2006; 23:65-73.
2. Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MC, et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2009; 52:273-283.
3. Theodoro RC, Teixeira M de M, Felipe MSS, et al. Genus *Paracoccidioides*: Species Recognition and Biogeographical Aspects. *Plos One*. 2012; 7:1-15.
4. Muñoz JF, Farrer RA, Desjardins CA, et al. Genome Diversity, Recombination, and Virulence across the Major Lineages of *Paracoccidioides*. *Ecological and Evolutionary Science*. 2016; 1:213-216.

5. Turissini DA, Gomes OM, Teixeira MM, et al. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. *Fungal Genetics and Biology*. 2017; 106:9-25.
6. Coutinho ZF, da Silva D, Lazéra M, et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cadernos de Saúde Pública*. 2002. 18:1441-1454.
7. Brummer E, Casteneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clinical Microbiology Reviews*. 1993. 6:89-117.
8. Coutinho ZF, Wanke B, Travassos C, et al. Hospital morbidity due to paracoccidioidomycosis in Brazil (1998-2006). *Tropical Medicine and International Health*. 2015; 20:673-680.
9. Martinez R. Epidemiology of paracoccidioidomycosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2015; 57: 11-20.
10. Balabanov K, Balabanoff VA, Angelov N. Blastomycose sud-americaine chez un laboureur bulgare renevu depuis 30 ans de Brasil. *Mycopathologia*. 1964; 224:265-70.
11. Franco M, Bagagli E, Scapolio A, et al. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. *Medical Mycology*. 2000; 38:185-191.
12. Marques SA. Paracoccidioidomycosis: a century from the first case report. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2008, 83:271-273.
13. Shome SK, Batista AC. Occurrence of *Paracoccidioides brasiliensis* In the soil of Recife (Brazil). *Revista da Faculdade de Medicina da Universidade do Ceará*. 1963; 3:90 – 94.
14. Negroni P. El *Paracoccidioides brasiliensis* vive saprofiticamente em El suelo Argentino. *Prensa Medica Argentina*. 1966; 53:2831-2832.
15. Albornoz MB. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. *Sabouraudia*. 1971; 9:248-253.
16. Silva-Vergara ML, Martinez R, Chadu A, et al. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá, State of Minas Gerais. *Medical Mycology*. 1998; 36:37-42.
17. Restrepo A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*. 1985; 23:323-334.
18. Terçarioli GR, Bagagli E, Reis GM, et al. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. *BMC Microbiology*. 2007; 7:1-8.
19. Theodoro RC, Candeias JMG, Araújo Jr JP, et al. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. *Medical Mycology*. 2005; 43:725–729.
20. Ono MA, Itano EN, Mizuno LT, et al. Inhibition of *Paracoccidioides brasiliensis* by pesticides: Is this a partial explanation for the difficulty in isolating this fungus from the soil? *Medical Mycology*. 2002; 40:493-499.
21. Arantes TD, Theodoro RC, da Graça-Macoris SA, et al. Detection of *Paracoccidioides* spp. in environmental aerosol samples. *Medical Mycology*. 2013; 51:83-92.
22. Arantes TD, Theodoro RC, Teixeira M de M, et al. Environmental mapping of *Paracoccidioides* spp. in Brazil reveals new clues into genetic diversity, biogeography and wild host association. *Plos One Neglected Tropical Diseases*. 2016;10:1-18.
23. Restrepo A, Jiménez BE, de Bedout C. Survival of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells under microaerophilic conditions. *Sabouraudia*. 1981; 19: 301-305.

24. Sbeghen MR, Zanata TB, Macagnan R, et al. *Paracoccidioides brasiliensis* Infection in Small Wild Mammals. *Mycopathologia*. 2015; 180:435-440.
25. Silveira LH, Paes RCS, Medeiros EV, et al. Occurrence of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in rom Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mycopathologia*. 2008; 165:367-371.
26. Oliveira GG, Silveira LH, Itano EN, et al. Serological evidence of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in chickens from Paraná and Mato Grosso do Sul states, Brazil. *Mycopathologia*. 2011; 171:197-202.
27. Oliveira GG, Navarro IT, Freire RL, et al. Serological survey of Paracoccidioidomycosis in sheep. *Mycopathologia*. 2012; 173:63-68.
28. Oliveira GG, Belitardo DR, Balarin MRS, et al. Serological Survey of Paracoccidioidomycosis in Cats. *Mycopathologia*. 2013; 176:299-302.
29. Ferreira JB, Navarro IT, Freire RL, et al. Evaluation of *Paracoccidioides brasiliensis* Infection in Dairy Goats. *Mycopathologia*. 2013; 176: 95-99.
30. Belitardo DR, Calefi AS, Sbeghen MR, et al. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Mycoses*. 2014; 57:222-227.
31. Belitardo DR, Calefi AS, Borges IK, et al. Detection of antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* in free-range domestic pigs (*Sus scrofa*). *Mycopathologia*. 2014; 177:91-95.
32. Diez S, Garcia EA, Pino EA, et al. PCR whit *Paracoccidioides brasiliensis* specific primers: potential use in ecological studies. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 1999; 41:351-357.
33. Pandolfo C, Braga HJ, Silva JR, e tal. Atlas climatológico digital do Estado de Santa Catarina. EPAGRI. 2002;1-13.
34. Campanili M, Schaffer WB. Mata Atlântica; manual de adequação ambiental. MMA/SBF. 2010; 1-96.
35. Caviglione JH, Kiihl LRB, Caramori PH, et al. Cartas climáticas básicas do Estado do Paraná. IAPAR. 2002.
36. Volossiuk T, Jane-Robb E, Nazar RN. Direct DNA extraction for PCR-mediated assays of soil organisms. *Applied and Environmental Microbiology*. 1995; 61:3972-3976.
37. White TJ, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press. 1990; 315 – 322.
38. Kasuga T, Taylor JW, White TJ. Phylogenetic Relationships of Varieties and Geographical Groups of the Human Pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* Darling. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999; 37:653-663.
39. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium*. 1999; 41:95-98.
40. Mendelovici M de, Salfelder K, Mendelovici E, et al. Intento de aislamiento del *Paracoccidioides brasiliensis* del suelo. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*. 1974; 52:45- 53.
41. Montenegro MR, Miyaji M, Franco M, et al. Isolation of fungi from nature in the region of Botucatu, SP, Brazil, an endemic area of paracoccidioidomycosis. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*. 1996; 91:665–670.

42. Corte AC, Itano EN, Freire RL, et al. Detecção de anticorpos para *Paracoccidioides brasiliensis* em cavalos da região norte do Estado do Paraná. Ciências Agrárias. 2009; 30:441-446.
43. Ono MA, Bracarense AP, Morais HS, et al. Canine paracoccidioidomycosis: A seroepidemiologic study. Medical Mycology. 2001; 39:277-282.
44. Ricci G, Motta FC, Wakamatsu A, et al. Canine paracoccidioidomycosis. Medical Mycology. 2004; 42:379-383.
45. Farias MR, Condas LA, Ribeiro MG, et al. Paracoccidioidomycosis in a dog: case report of generalized lymphadenomegaly. Micopathologia. 2011; 172:147-152.
46. Headley SA, Pretto-Giordano LG, Di Santis GW, et al. *Paracoccidioides brasiliensis*-associated dermatitis and lymphadenitis in a dog. Mycopathologia. 2017; 182:425-434.
47. Silveira LH, Paes RCS, Medeiros EV, et al. Occurrence of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in rom Mato Grosso do Sul, Brazil. Mycopathologia. 2008; 165:367-371.
48. Losnak DO, Rocha FR, Almeida BS, et al. Molecular detection of fungi of public health importance in wild animals from Southern Brazil. Mycoses. 2018; 6:455-463.
49. Sebrae – Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas de Santa Catarina. Santa Catarina Em números – Macrorregião Meio Oeste. 2013; 1-142.
50. Restrepo A, McEwen JG, Castañeda E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? Medical Mycology. 2001; 39:233-241.
51. Bagagli E, Franco M, Bosco SMG, et al. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. Medical Mycology. 2003; 4:217-223.
52. Martinez R. New Trends in Paracoccidioidomycosis Epidemiology. Journal of Fungi. 2017; 3:1-13.
53. Cadavid D, Restrepo A. Factors associated with *Paracoccidioides brasiliensis* infection among permanent residents of three endemic areas in Colombia. Epidemiology Infection. 1993; 111:121-133.
54. Rios-Gonçales AJ, Londero AT, Terra GM. F. Paracoccidioidomycosis in children in the state of Rio de Janeiro (Brazil). Geographic distribution and the study of a "reservarea". Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 1998; 40:11-13.
55. Barrozo LV, Benard G, Silva MG, et al. First description of a cluster of acute/subacute Paracoccidioidomycosis cases and its association with a climatic anomaly. Neglected Tropical Diseases. 2010; 4:643.
56. Blota MH, Mamoni RL, Oliveira SJ, et al. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1999; 61:390-394.
57. Valle ACFD, Coimbra CEA, Bornay Llinares FJ, et al. Paracoccidioidomicose entre o grupo indígena Suruí de Rondônia, Amazônia (Brasil). Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 1991; 33:407-411.

58. Coimbra CEA Jr, Wanke B, Santos RV, et al. Paracoccidioidin and histoplasmin sensitivity in the Tupí-Mondé Amerindian populations from Brazilian Amazonia. *Annals Tropical Medicine Parasitology*. 1994; 88:197-207.
59. Thalhari S, Cunha M da GS, Schettini APM, et al. Deep Mycoses in Amazon Region. *International Journal of Dermatology*. 1988; 27:481-484.
60. Loth EA, de Castro SV, da Silva JR, et al. Occurrence of 102 cases of paracoccidioidomycosis in 18 months in the Itaipu Lake region, Western Paraná. *Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2011; 44: 636-637.
61. Mangiaterra ML, Giusiano GE, Alonso JM, et al. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in a subtropical region with important environmental changes. *Bulletin de la Societe Pathologie Exotique*. 1999; 92:173-176.
62. Bedout C, Cano LE, Tabares AM, et al. Water as a substrate for the development of *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. *Mycopathologia*. 1986; 96:123-130.
63. Minakawa T, Ueda K, Tanaka M, et al. 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*. 2016; 181:523-529.
64. Vilela R, Bossart GD, Leger JAS, et al. Cutaneous Granulomas in Dolphins Caused by Novel Uncultivated *Paracoccidioides brasiliensis*. *Emerging Infectious Diseases Journal*. 2016; 22:2063-2069.
65. Roberto TN, Rodrigues AM, Hahn RC, et al. Identifying *Paracoccidioides* phylogenetic species by PCR-RFLP of the alpha-tubulin gene. *Medical Mycology*. 2016; 54:240 –247.

4 ARTIGO II PARA PUBLICAÇÃO (MYCOSES)

O presente manuscrito está formatado segundo as normas do periódico Mycoses. Os resultados obtidos estão descritos no manuscrito intitulado "*Detection of antibodies to Paracoccidioides brasiliensis in bovine milk*".

Detection of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in bovine milk

Abstract

Paracoccidioides brasiliensis and *Paracoccidioides lutzii* cause Paracoccidioidomycosis (PCM), an endemic systemic mycosis in Latin America. Brazil is the country with the highest number of registered cases, being mainly reported, in the South, Southeast and Midwest Regions, predominantly in rural male workers. *P. brasiliensis* infection has been reported in domestic and wild animals mainly by serological methods. Milk is an interesting alternative diagnostic specimen for detection of antibodies. Therefore, the objective of this study was to evaluate *P. brasiliensis* infection in cattle by analysis of bovine milk samples by indirect ELISA using gp43 as antigen. The milk samples (n=136) were collected in farms from Santa Catarina State and 76% positivity was observed. The result obtained indicates the presence of *P. brasiliensis* in the area of study and that milk samples can be useful for detection of the infection in cattle.

Keywords: ELISA, Epidemiology, Paracoccidioidomycosis

Introduction

Paracoccidioides brasiliensis and *P. lutzii* are the etiological agents of Paracoccidioidomycosis (PCM) ^[1,2], that is considered the eighth cause of death due to infectious diseases in Brazil. Brazil is the country with the highest number of PCM reported cases, mainly in the South, Southeast and Midwest regions ^[3]. The disease affects mainly rural workers with a higher incidence between 30 and 50 years of age ^[4,5].

Some isolates of *P. brasiliensis* were obtained from soil samples, the possible fungus habitat ^[6-9]. However, this was not confirmed due to the lack of reproducibility, and clear evidence on interactions with abiotic and biotic factors

[10-11]. Isolation of the fungus from environmental samples has several limiting factors, making it difficult to study the ecology of *Paracoccidioides* [12-15].

The detection of *P. brasiliensis* infection in different animal species may contribute to discovery of the fungus habitat. The infection by *P. brasiliensis* has been reported in several domestic and wild animals [16-21]. Studies carried out by Silveira et al. [22], observed that bovines immunized with *P. brasiliensis* inactivated cells developed a humoral immune response against gp43, the main antigen used in the diagnosis of PCM and that serum samples from dairy cattle showed positivity to gp43.

Dairy herds when kept on pasture are usually rotated to new foraging areas in a rotational grazing system and it allows them to move frequently all over the property, increasing the probability of contact with *P. brasiliensis*. Milk is an interesting alternative diagnostic specimen for detection of antibodies, therefore, the objective of this study was to detect antibodies to *P. brasiliensis* in milk samples from cattle in small properties of Santa Catarina, Southern Brazil.

Material and Methods

Study area

The Midwestern macro-region of the State of Santa Catarina, southern Brazil, has a humid mesothermal climate with the average temperature of 16°C and belong to Atlantic forest ecosystem complex [23-25]. Agriculture and animal husbandry are the main regional activities, majority represented by small-scale farmers [26]. The municipality of Água Doce has an altitude of 847-1,316m

(latitude: 26° 59'5, longitude: 51°33'2) and 1313 km² which borders. The municipality of Treze Tílias has an 796m (latitude: 27° 00'0, and longitude 51°24'2) and territory of 185.21km² (Figure 1).



Figure 1. Location of the municipalities where the milk samples were collected.

Milk samples

The milk samples (1mL of per animal) were collected manually (n=136) from holstein cows in three properties of Água Doce (n=104) and one farm of Treze Tílias (n=32). Samples of milk and serum from six animals from the School Farm of the State University of Londrina were collected for the ELISA indirect assay with gp43 and the serum sample were compared with negative bovine serum controls for gp43 kept in the laboratory [22]. Milk samples from cows of the School Farm seronegative to *P. brasiliensis* were used as negative control. This study was developed after receiving authorization from the Animal Ethics Committee of the State University of Londrina (No. 25313.2017.20).

P. brasiliensis Gp43

P. brasiliensis, isolate B-339, was cultured at 36°C on Sabouraud dextrose agar. The exoantigen was produced according to Camargo et al. [27], and quantified protein by NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and Gp43 was purified from *P. brasiliensis* exoantigen by immunoaffinity chromatography, as described by Puccia and Travassos [28].

Indirect ELISA with gp43

In brief, 96-well polystyrene flat-bottom microtiter plates were coated with purified gp43. The milk samples were diluted 1:10 (v:v) in PBS and anti-bovine IgG conjugate (Sigma, St Louis, MO, USA) was used as secondary antibody. H₂O₂/tetramethylbenzidine was used as substrate/cromogen solution and the reaction was stopped with 4N H₂SO₄. The absorbance was measure at 450nm and the samples with two-fold or more the absorbance of the negative control were considered positive.

Statistical analysis

In relation to the difference of the positivity of the samples between the properties was used the statistical analysis through Qui-square test using GraphPad Prism® 6.0 program. To verify if there was a difference of absorbance of the positive samples between the properties, one-way ANOVA

was used with post-test of Tukey. The difference was considered significant when P value was less than 0.05.

Results

Of the 136 milk samples analyzed, 103 were considered positive (76%), with absorbance between 0.1 and 0.5 (Figure 2), corresponding to 80% positivity in the samples of Água Doce and 62% of Treze Tílias. Percentage by property is showed in Table 1.

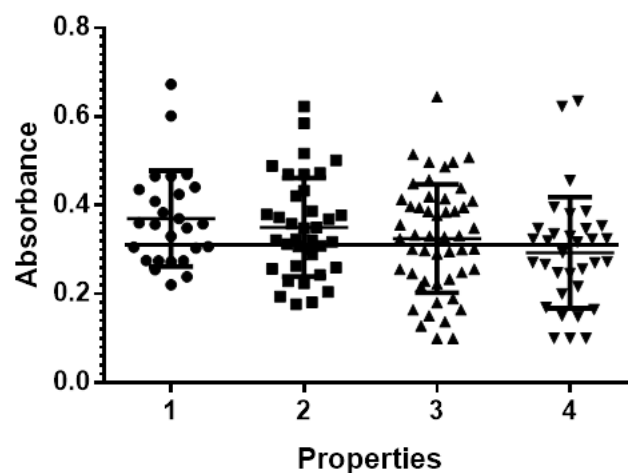


Figure 2. Distribution of the absorption of milk drinks by properties. 1,2,3) Água Doce properties. 4) Treze Tílias property. The line indicates the cut-off value.

Table 1. Positivity of milk samples, from different rural properties, against *P. brasiliensis* gp43 evaluated by indirect ELISA.

County	Property	Number of samples	Positivity to Gp43	
			(n)	(%)
Água Doce	I	25	22	88
	II	36	29	80
	III	43	32	74
Treze Tílias	IV	32	20	62
Total	5	136	103	76

Discussion

The infection of cattle by *P. brasiliensis* was previously reported in Brazil and Uruguay by means of skin test with paracoccidioidin and serological methods [29,30]. Milk is an interesting alternative diagnostic specimen for detection of antibodies, because is non-invasive and easy to perform. The Elisa assay was applied in bovine milk samples to detect specific antibodies to *Toxoplasma gondii* [31], for the Bovine Leukemia Virus [32], as well as the detection of serum in the detection of antibodies specific for Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV) [33].

The percentage of positivity (76%) to *P. brasiliensis* Gp43 observed in the present study was high when compared to other studies with cattle in paracoccidioidomycosis endemic areas [22,29,30]. Costa and Fava-Netto reported 44.8% positivity in cattle from São Paulo State, Brazil [29] and Gutierrez et al. observed positivity of 2.3% in dairy cattle from Colombia [30], using skin test with *P. brasiliensis* crude polysaccharide antigen. Silveira et al. analyzed 400 serum samples from cattle in the state of Mato Grosso do Sul and observed 17.5% positivity in ELISA with purified gp43 [22].

Epidemiological studies suggest that the habitat of *Paracoccidioides* is related to mild temperatures, humidity, presence of water, high altitudes and native forests [11,18,34,35], characteristics found in the Midwest macro-region of Santa Catarina [23-25]. Beside these climatic specifications, we emphasize the animals in the four analyzed properties had free access to the bodies of water. There was no significant difference in positivity between the properties, possibly due to the small distance between them (between 5 and 20km), therefore they

have the same climatic and environmental characteristics [23-25]. In addition, the management and feeding systems are similar.

The reported cases of human PCM are classically related to rural workers [36,37]. Agriculture is the main economic activity of Midwest macro-region in state of Santa Catarina, mainly composed by small scale farmers [26]. In a survey conducted by between 1998 and 2006, the state of Santa Catarina registered 187 hospitalizations by PCM; more than the bordering state, Rio Grande do Sul registered 87. In relation to mortality, 133 deaths by PCM were reported in the state of Santa Catarina between 1980 and 1995 [38].

Although the southern region of Brazil is considered an endemic region for PCM [3], further studies are necessary to map the risk regions. Losnak et al. [39] surveyed road-killed wild animals in the state of Santa Catarina, and detected *P. brasiliensis* in rodents, confirming the presence of the pathogen in the state.

The results of the present study indicate the presence of *P. brasiliensis* in the studied area and that milk samples can be useful for detection of the PCM infection in cattle.

Acknowledgments: The authors thank CNPq, CAPES and Araucária Foundation, for financial support and Ademar Piaia, Adenilson Zanatta, Nemari Colla, for the samples of milk.

References

1. Carrero LL, Niño-Veja G, Teixeira MM, et al. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. *Fungal Genetics and Biology*. 2008; 45:605-612.

2. Teixeira MM, Theodoro, RC, de Carvalho MC, et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2009; 52:273-283.
3. Coutinho ZF, da Silva D, Lazéra M, et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cadernos de Saúde Pública*. 2002; 18:1441-1454.
4. Valle ACF, Wanke B, Fernandes NC, et al. Tratamento da paracoccidioidomicose: estudo retrospectivo de 500 casos. Análise clínica, laboratorial e epidemiológica. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 1992; 67:251-254.
5. Shikanai-Yasuda MA, Mendes RP, Colombo AL, et al. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2017; 50:715-740.
6. Shome SK, Batista AC. Occurrence of *Paracoccidioides brasiliensis* In the soil of Recife (Brazil). *Revista da Faculdade de Medicina da Universidade do Ceará*. 1963; 3:90 – 94.
7. Negroni P. El *Paracoccidioides brasiliensis* vive saprofiticamente em El suelo Argentino. *Prensa Medica Argentina*. 1966; 53:2831-2832.
8. Albornoz MB. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. *Sabouraudia*. 1971; 9:248-253.
9. Silva-Vergara ML, Martinez R, Chadu A, et al. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá, State of Minas Gerais. *Medical Mycology*. 1998; 36:37-42.
10. Balabanov K, Balabanoff VA, Angelov N. Blastomycose sud-americaine chez um laboureur bulgare renevu depuis 30 ans de Brasil. *Mycopathologia*. 1964; 24:265-70.
11. Franco M, Bagagli E, Scapolio A, et al. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. *Medical Mycology*. 2000; .38:185-191.
12. Mendelovici M, Salfelder K, Mendelovici E, et al. Intento de aislamiento del *Paracoccidioides brasiliensis* del suelo. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*. 1974; 52:45- 53.
13. Montenegro MR, Miyaji M, Franco M, et al. Isolation of fungi from nature in the region of Botucatu, SP, Brazil, an endemic area of paracoccidioidomycosis. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*. 1996; 91:665–670.
14. Arantes TD, Theodoro RC, da Graça MAS, et al. Detection of *Paracoccidioides* spp. in environmental aerosol samples. *Medical Mycology*. 2013; 51:83-92.
15. Theodoro RC, Candeias JMG, Araújo Jr JP, et al. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. *Medical Mycology*. 2005; 43:725 – 729.
16. Costa EO, Diniz LS, Netto CF, et al. Delayed hypersensitivity test with paracoccidioidin in captive Latin American wild mammals. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*. 1995; 33:39-42.
17. Albano AP, Klafke GB, Brandolt TM. Wild animals as sentinels of *Paracoccidioides brasiliensis* in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mycopathologia*. 2014; 4:207-215.
18. Bagagli E, Franco M, Bosco SMG, et al. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. *Medical Mycology*. 2003; 4:217-223.

19. Belitardo DR, Calefl AS, Sbehen MR, et al. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Mycoses*. 2014; 57:222-227.
20. Oliveira GG, Belitardo DR, Balarin MRS, et al. Serological Survey of Paracoccidioidomycosis in Cats. *Mycopathologia*. 2013; 176:299-302.
21. Ono MA, Bracarense AP, Morais HS, et al. Canine paracoccidioidomycosis: A seroepidemiologic study. *Medical Mycology*. 2001; 39:277-282.
22. Silveira LH, Paes RCS, Medeiros EV, et al. Occurrence of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in dairy cattle from Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mycopathologia*. 2008; 165:367-371.
23. Pandolfo C, Braga HJ, Silva JR, et al. Atlas climatológico digital do Estado de Santa Catarina. EPAGRI. 2002;1-13.
24. Campanili M, Schaffer WB. Mata Atlântica: manual de adequação ambiental. MMA/SBF. 2010; 1-96.
25. Caviglione JH, Kiihl LRB, Caramori PH, et al. Cartas climáticas básicas do Estado do Paraná. IAPAR. 2002.
26. Sebrae – Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas de Santa Catarina. Santa Catarina Em números – Macrorregião Meio Oeste. 2013; 1-142.
27. Camargo ZP, Unterkircher C, Campoy SP, et al.. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion test. *Journal of Clinical Microbiology*. 1988; 26:2147-2151.
28. Puccia R, Travassos LR. 43-kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis and Jorge Lobo's diseases. *Journal Clinical Microbiology*. 1991; 29:2610-2615.
29. Costa EO, 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*. 1978; 16:93-101.
30. Gutierrez AH, Ceballos GC, Ferrer HIP, et al. Encuesta sobre tuberculosis, histoplasmosis y paracoccidioidomycosis en ganado lechero Del Valle Del Aburra. *Antiquina Medica*. 1974; 24:339-358.
31. Dehkordi FS, Borujeni MR, Rahimi E. Detection of *Toxoplasma gondii* in raw caprine, ovine, buffalo, bovine and camel milk using cell cultivation, cat bioassay, capture ELISA, and PCR methods in Iran. *Foodborne Pathogens and Diseases*. 2013; 10:120-125.
32. Nguyen VK, Maes RF. Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent assay for detection of antibodies to Bovine Leukemia Virus in serum and milk. *American for Society for Microbiology*. 1993; 31:979-981.
33. Kramps JA, Maanen C, Wetering G, et al. A simple, rapid and reliable enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) specific antibodies in cattle sérum plasma and bulk milk. *Veterinary Microbiology*. 1999; 64:135-144.
34. Resterpo, A.; McEwen J. G.; Castanã E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Medical Mycology*. 2001; 39:233-241.
35. Terçarioli GR, Bagagli E, Reis GM, et al. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. *BMC Microbiology*. 2007; 7:1-8.

36. Bellíssimo-Rodrigues F, Bollela VR, da Fonseca BA, et al. Endemic paracoccidioidomycosis: Relationship between clinical presentation and patients' demographic features. *Medical Mycology*. 2013; 51:313-318.
37. Lacaz CS. South American blastomycosis. *An. Fac. Med. Univ. São Paulo*. 1956; 29:120.
38. Coutinho ZF, Wanke B, Travassos C, et al. Hospital morbidity due to paracoccidioidomycosis in Brazil (1998-2006). *Tropical Medicine and International Health*. 2015; 20:673-680.
39. Losnak DO, Rocha FR, Almeida BS, et al. Molecular detection of fungi of public health importance in wild animals from Southern Brazil. *Mycoses*. 2018; 6:455-463.

CONCLUSÕES

O isolamento de *P. brasiliensis* de amostras ambientais é difícil, fato evidenciado neste trabalho, pois, após o cultivo de 169 amostras de solo não foram obtidos isolados, provavelmente devido a inibição pelos demais microrganismos. No entanto, *P. brasiliensis* foi detectado após PCR em 89% das amostras de solo analisadas, neste sentido, fica evidente que técnicas moleculares podem auxiliar no esclarecimento ecológico. Utilizando a região α -tubulina foi identificado a presença da espécie críptica PS3 no Paraná e em Santa Catarina, resultado que contribui com achados anteriores da presença do grupo PS3 no Brasil. Em contribuição, a detecção de anticorpos em leite bovino em Santa Catarina reforça a presença de *P. brasiliensis* no estado e comprova que a técnica pode ser utilizada para levantamento ecoepidemiológico. Os resultados permitiram concluir que *P. brasiliensis* tem ampla distribuição geográfica e que as características ambientais dos locais estudados (temperatura, umidade, áreas nativas e perturbadas) estão de acordo com a literatura. Correlacionando os locais de coleta, fica evidente que no meio ambiente a presença de água está estritamente relacionada com a presença de *Paracoccidoides*. Outro fator evidenciado foi a positividade em solo de tocas de tatu, que como descrito, pode contribuir para a proteção no desenvolvimento de *Paracoccidoides* sob alterações climáticas.

REFERÊNCIAS

- ALBORNOZ, M. B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. **Sabouraudia**, [S. l.], v. 9, n.3, p. 248-253, jun. 1971.
- ARANTES, T. D.; et al. Detection of *Paracoccidioides* spp. in environmental aerosol samples. **Medical Mycology**, [S. l.], v. 51, n. 1, p. 83-92, jan 2013.
- ARANTES, T. D.; et al. Environmental mapping of *Paracoccidioides* spp. in Brazil reveals new clues into genetic diversity, biogeography and wild host association. **Plos One Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v.10, n.4, p. 1-18, abr. 2016.
- AJELLO, L.; POLONELLI, L. Imported paracoccidioidomycosis: A public health problem in non-endemic areas. **European Journal of Epidemiology**, [S. l.], v. 1, n. 3, p. 160–165, set. 1985.
- ALBANO, A. P.; et al. Wild animals as sentinels of *Paracoccidioides brasiliensis* in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Mycopathologia**, [S. l.], n. 3-4, v. 177, p. 207-2015, abr. 2014.
- BAGAGLI, E.; et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasyus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [S. l.], v. 58, n. 4, p.:505-512, abr. 1998.
- BAGAGLI, E.; et al. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasyus novemcinctus*): an ecological study. **Medical Mycology**, [S. l.], v.4, n. 3, p. 217-223, jun. 2003.
- BAGAGLI, E.; et al. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. **Infection Genetics and Evolution**, [S. l.], v.6, n. 5, p. 344-351, set. 2006.
- BAGAGLI, E; et al. *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. **Mycopathologia**, [S. l.], v.165, n. 4-5, p. 197-207, abr. 2008.
- BAGAGLI, E.; MARQUES, S. A. Micologia médica molecular: Impacto na epidemiologia e ecologia dos fungos. In: ZAIT, C. et al. **Compêndio de Micologia Médica**. 2 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2010. p.123-137.
- BAGAGLI, E.; et al. *Paracoccidioides*. In: LIU, D. **Molecular detection of human fungal pathogens**. Sydney. CRC Press, p.311-322. 2011,

BALABANOV, K.; BALABANOFF, V. A.; ANGELOV, N. Blastomycose sud-americaine chez un laboureur bulgare renevu depuis 30 ans de Brasil. **Mycopathologia**, Nápoles, v. 24, n. 3, p. 265-270, nov. 1964.

BARROZO L. V.; et al. First description of a cluster of acute/subacute Paracoccidioidomycosis cases and its association with a climatic anomaly. **Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 4, n. 3, p. 643, mar. 2010.

BEDOUT, C.; et al. Water as a substrate for the development of *Paracoccidioides brasiliensis* mycelial form. **Mycopathologia**, Netherlands, v. 96, n. 2, p. 123-130, 1986.

BELITARDO, D.R.; et al. Detection of antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* in free-range domestic pigs (*Sus scrofa*). **Mycopathologia**, [S. I.], v.177, n.1-2, p. 91-95, fev. 2014.

BELITARDO, D. R.; et al. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **Mycoses**, [S.I.], v. 57, n. 4, p. 222-227, abr. 2014.

BELLÍSSIMO-RODRIGUES, F.; et al. 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**, Cleveland, v. 85, n. 3, p. 546-550, 2011.

BELLÍSSIMO-RODRIGUES, F.; et al. Endemic paracoccidioidomycosis: Relationship between clinical presentation and patients' demographic features. **Medical Mycology**, [S. I.], v. 51, n. 3, p. 313-318, abr. 2013.

BLOTA, M. H.; et al. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Cleveland, v. 61, n. 3, p. 390-394, set. 1999.

BOTTEON, F. A.; et al. *Paracoccidioides brasiliensis*-reactive antibodies in Brazilian blood donors. **Medical Mycology**, Oxford, v. 40, n. 4, p. 387-391, 2002

BRUMMER, E.; et al. Murine model of paracoccidioidomycosis. Production of fatal acute pulmonary or chronic pulmonary and disseminated disease: immunological and pathological observations. **Journal of Experimental Pathology**, Oxford, v.1, n. 3, p.241-255, 1984.

BRUMMER, E.; CASTENEDA, E.; RESTERPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clinical Microbiology Reviews**, [S. I.], v. 6, n. 2, p. 89-117, abr.1993.

BUITRAGO, M. J.; CUENCA-ESTRELLA M. Current epidemiology and laboratory diagnosis of endemic mycosis in Spain. **Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica**, Espanha, v. 30, n. 7, p. 407-413, nov. 2011.

CADAVID, D.; RESTREPO, A. Factors associated with *Paracoccidioides brasiliensis* infection among permanent residents of three endemic areas in Colombia. **Epidemiology Infection**, São Paulo, v. 111, n. 1, p 121-133, ago. 1993.

CAMARGO, Z.P.; et al.; Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion test. **Journal of Clinical Microbiology**, [S.I.], n.26, v. 10, p. 2147-2151, out. 1988.

CAMPANILI, M.; SCHAFFER, W. B. Mata Atlântica; manual de adequação ambiental. MMA/SBF, p. 1-96; 2010.

CAMPOS, M. V. S. **Estudo de pacientes com paracoccidioidomicose e a co-infecção paracoccidioidomicose HIV/AIDS, assistidos no Hospital Universitário de Brasília entre 1984 e 2005**. 2011. f.136. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas). Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília.

CARRERO, L. L., et al. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. **Fungal Genetics and Biology**, [S. I.], v.45, n. 5, p.605-612, fev. 2008.

CAVIGLIONE, J.H.; et al. Cartas climáticas básicas do Estado do Paraná. IAPAR 2002.

COIMBRA, C. E. A. Jr; et al. Paracoccidioidin and histoplasmin sensitivity in the Tupí-Mondé Amerindian populations from Brazilian Amazonia. **Annals Tropical Medicine Parasitology**, [S.I.], v. 88, n. 2, p. 197-207, jan. 1994.

CONTI-DIAS, I. A.; et al. Intradermal reaction survey with paracoccidioidin and histoplasmin in horses. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.14, n. 6, p. 372-376, 1972.

CORREDOR, G. G.; et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. **Revista Iberoamericana de Micologia**, [S. I.], São Paulo, n. 16, p. 216-220, dez. 1999.

CORREDOR, G. G.; et al. The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis* molecular identification of the isolate. **Medical Mycology**, [S. I.], v.43, n. 3, p. 275-280, maio. 2005.

CORTE A. C.; et al. Paracoccidioidomycosis in wild monkeys from Paraná State, Brazil. **Mycopathologia**, [S.I.], n.164, v.5, p. 225-228, nov. 2007.

CORTE, A. C.; et al. Detecção de anticorpos para *Paracoccidioides brasiliensis* em cavalos da região norte do Estado do Paraná. **Ciências Agrárias**, Londrina, v.30, n. 2, p.441-446, nov. 2009.

COSTA E. O.; 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**, [S.I.], v. 16, n.2, p. 93-102, 1978.

COSTA, E. O.; et al. Delayed hypersensitivity test with paracoccidioidin in captive Latin American wild mammals. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, [S. I.], v. 33, n.1, p. 39-42, 1995.

COUTINHO, Z.F.; et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 18, n 5, p. 1441-1454, 2002.

COUTINHO Z. F.; et al. Hospital morbidity due to paracoccidioidomycosis in Brazil (1998-2006). **Tropical Medicine and International Health**, [S.I.], v. 20, n. 5, p. 673-680, mai. 2015.

DEHKORDI, F. S.; et al. Detection of *Toxoplasma gondii* in raw caprine, ovine, buffalo, bovine and camel milk using cell cultivation, cat bioassay, capture ELISA, and PCR methods in Iran. **Foodborne Pathogens and Diseases** [S.I.], n. 10, v. 2, p. 120-125, fev. 2013.

DIEZ, S., et al. PCR whit *Paracoccidioides brasiliensis* specific primers: potential use in ecological studies. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.41, n. 6, p. 351-357, dez. 1999.

FABRIS, L. R. et al. Decreasing prevalence of the acute/subacute clinical form of paracoccidioidomycosis in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 56, n. 2, p. 121-125, abr. 2014.

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.

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

FARIAS, M. R.; et al. Paracoccidioidomycosis in a dog: case report of generalized lymphadenomegaly. **Mycopathologia**, [S. I.], v. 172, n 2, p. 147-152, mar. 2011.

FERREIRA, J. B.; et al. Evaluation of *Paracoccidioides brasiliensis* Infection in Dairy Goats, **Mycopathologia**, [S.I.], v. 176, n. 1- 2, p. 95-99, ago. 2013.

FONTANA, F. F.; et al. Seroepidemiological survey of paracoccidioidomycosis infection among urban and rural dogs from Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Mycopathologia**, [S. I.], v. 169, n. 3, p. 159-165, mar. 2010.

FRANCO, M.; et al. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. **Medical Mycology**, [S. I.], n.38, v. 3, p.185-191. Jun. 2000.

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**, [S.I.], v.12, n.8, p. 659-662, ago. 2010.

GUTIERREZ, A. H.; et al. Encuesta sobre tuberculosis, histoplasmosis y paracoccidioidomycosis en ganado lechero Del Valle Del Aburra. **Antiquina Medica**, [S.I.], v. 24, p. 339-358, 1974.

HAHN, R.C.; et al. Randomly amplified polymorphic DNA as a valuable tool for epidemiological studies of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, n. 7, p. 2849-2854, jul. 2003.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium**, [S. I.], n. 41, p. 95-98, 1999.

HEADLEY, S. A.; et al. *Paracoccidioides brasiliensis*-associated dermatitis and lymphadenitis in a dog. **Mycopathologia**, [S.I.], v. 182, n. 3-4, p. 425-434, abr. 2017.

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

KASUGA, T.; TAYLOR, J. W.; WHITE, T. J. Phylogenetic Relationships of Varieties and Geographical Groups of the Human Pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* Darling. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 3, p. 653-663, mar. 1999.

KRAMPS, J. A.; et al. A simple, rapid and reliable enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine virus diarrhoea virus (BVDV) specific antibodies in cattle serum plasma and bulk milk. **Veterinary Microbiology** [S.l.], v. 64, n.2-3, p. 135-144, jan. 1999.

LACAZ, C.S. South American blastomycosis. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**. São Paulo, v. 39, p. 120, 1956.

LOSNAK, D. O.; et al. Molecular detection of fungi of public health importance in wild animals from Southern Brazil. **Mycoses**, [S.l.], v. 6, p. 455-463, mar. 2018.

LOTH, E. A.; et al. Occurrence of 102 cases of paracoccidioidomycosis in 18 months in the Itaipu Lake region, Western Paraná. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 44, n. 5, p. 636-637, out. 2011.

MANGIATERRA, M. L.; et al. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in a subtropical region with important environmental changes. **Bulletin de la Societe Pathologie Exotique**. [S.l.], v. 92, n. 3, p. 173-176, jul. 1999.

MARQUES, S. A. Paracoccidioidomycosis: a century from the first case report. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 83, n. 3, p. 271-273, jun. 2008.

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

MARTINEZ, R. New Trends in Paracoccidioidomycosis Epidemiology. **Journal of Fungi**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 1-13, 2017

MATUTE, D. R.; et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Molecular Biology and Evolution**, [S. l.], v.23. n. 1. p.65-73, jan. 2006.

MATUTE, D. R., et al. Microsatellite Analysis of Three Phylogenetic Species of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Jouranl of Clinical Microbiology**, Washington, v. 44, n. 6, p. 2153-2157, jun, 2006.

MENDELOVICI, K.; et al. Intento de aislamiento del *Paracoccidioides brasiliensis* del suelo. **Mycopathologia et Mycologia Applicata**, [S. l.], v.52 n.1, p. 45-53, 1974.

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; et al. Antibody response to the 43KDa glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* as a marker for the evaluation of

patients under treatment. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Mclean, v.43, n.2, p.200-206, 1990.

MINAKAWA, T.; et al. 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**, [S. l.], v. 181, n. 7-8, p. 523-529, ago. 2016.

MOLINARI-MADLUN, E. E. W. I.; FELIPE, M. S. S.; SOARES, C. M.A. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates can be correlated to groups defined by random amplified polymorphic dna analysis. **Medical Mycology**, [S.l.], v.37, n.4, p. 269-276, jan. 1999.

MONTENEGRO, M. R.; et al. Isolation of fungi from nature in the region of Botucatu, SP, Brazil, an endemic area of paracoccidioidomycosis. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 91, n.6 p. 665–670, dez. 1996.

MUÑOZ, J. F.; et al. Genome Diversity, Recombination, and Virulence across the Major Lineages of *Paracoccidioides*. **Ecological and Evolutionary Science**, [S.l.], v. 1, n.5, p. 213-216, set. 2016.

NAIFF, R. D.; et al. Paracoccidioidomicose enzootica em tatus (*Dasypus novemcinctus*) no Estado do Pará. **Revista do Instituto Médico Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 28, n.1, p.19–27, fev. 1986.

NCBI. Nucleotide. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/?term=>. Acesso: 25 abr. 2016.

NCBI. Nucleotide Blast. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. Acesso: 25 abr. 2016.

NEGRONI, P. El *Paracoccidioides brasiliensis* vive saprofiticamente em El suelo Argentino. **Prensa Medica Argentina**, [S. l.], v. 53, n. 39, p. 2831-2832, jul. 1966.

NGUYEN, V. K. MAES, R. F. Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent assay for detection of antibodies to Bovine Leukemia Virus in serum and milk. **American for Society for Microbiology**, [S.l.], v. 31, n. 4, p. 979-981, abr.1993.

OLIVEIRA, G. G.; et al. Serological evidence of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in chickens from Paraná and Mato Grosso do Sul states, Brazil. **Mycopathologia**, [S. l.], v. 171, n. 3, p 197-202, mar. 2011.

OLIVEIRA, G. G.; et al. Serological survey of Paracoccidioidomycosis in sheep. **Mycopathologia**, [S. l.], v. 173, p. 63-68, jan. 2012.

OLIVEIRA, G. G.; et al. Serological Survey of Paracoccidioidomycosis in Cats. **Mycopathologia**, [S. l.], v. 176, n. 3-4, p. 299-302, out. 2013.

ONO, M. A.; et al. Canine paracoccidioidomycosis: A seroepidemiologic study. **Medical Mycology**, [S. l.], v. 39, n. 3, p. 277-282, set. 2001.

ONO, M. A.; et al. Inhibition of *Paracoccidioides brasiliensis* by pesticides: Is this a partial explanation for the difficulty in isolating this fungus from the soil? **Medical Mycology**, [S. l.], v.40, n. 5, p. 493-499, jan. 2002.

PALMEIRO, M.; CHERUBINI, K.; YURGEL, L. S. Paracoccidioidomicose – revisão da literatura. **Scientia Medica**, Rio Grande do Sul, v. 15, n. 4, p. 274-278, 2005.

PANDOLFO, C.; et al. Atlas climatológico digital do Estado de Santa Catarina. EPAGRI, p. 1-13, 2002.

PEDROSA, P. N. **Paracoccidioidomicose. Inquérito intradérmico com paracoccidioidin em zona rural do Estado do Rio de Janeiro**. 1976. Dissertação - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

PEREIRA Jr, H. R.; JORGE, W.; BAGAGLI, E.; Por que tatu?. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 199, p. 70- 73, nov. 2003.

PETRONI, T. F.; et al. Serological Evidence of Infection by *Paracoccidioides brasiliensis* in Dogs with Leishmaniasis. **Mycopathologia**, [S. l.], v. 182, n. 9-10, p. 947-952, out. 2017.

PINZAN, C. F.; et al. Immunological basis for the gender differences in murine *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Plos One**, [S. l.], v. 5, n. 5, mai. 2010.

PUCCIA, R.; et al. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. **Infection and Immunology**, v. 53, n. 1, p. 199-206, jul. 1986.

PURTILO, D. T.; et al. The immune system of the nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus* Linn). **The Anatomical Record**, [S. l.], v.181, n. 4, p. 725-734, abr. 1975.

RESTREPO, A.; JIMÉNEZ, B. E.; BEDOUT C. Survival of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells under microaerophilic conditions. **Sabouraudia**, [S. l.], v.19, n. 4, p. 301-305, nov. 1981.

RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, [S. l.], v.23. n.5, p. 323-334, out. 1985

RESTERPO, A.; McEWEN J. G.; CASTAÑEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Medical Mycology**, [S. l.], v. 39, n. 3, p. 233-241, jun. 2001.

RICCI, G.; et al. Canine paracoccidioidomycosis. **Medical Mycology**, [S. l.], v.42, n. 4, p. 379-383, ago. 2004.

RICHINI-PEREIRA, B. V.; et al. Detecção de *Paracoccidioides brasiliensis* em tatus (*Dasyurus novemcinctus*) provenientes de uma reserva de Cerrado do Instituto Lauro de Souza (Bauru, SP). **Boletim Epidemiológico Paulista**, São Paulo, v. 5, n. 56, P. 4-8, ago. 2008.

RIOS-GONÇALES, A. J. LONDERO, A.T.; TERRA, G. M. F. Paracoccidioidomycosis in children in the state of Rio de Janeiro (Brazil). Geographic distribution and the study of a "reservarea". **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.40, n. 1, p. 11-13, fev. 1998.

ROBERTO, T. N., et al. Identifying *Paracoccidioides* phylogenetic species by PCR-RFLP of the alpha-tubulin gene. **Medical Mycology**, [S. l.], v.54, n. 3, p. 1 - 8, mar. 2016.

SALGADO-SALAZAR, C.; et al. The human fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* (Onygenales: Ajellomycetaceae) is a complex of two species: phylogenetic evidence from five mitochondrial markers. **Cladistic**, [S. l.], v. 26, p. 613-624, jan. 2010.

SBEGHEN, M. R., et al. *Paracoccidioides brasiliensis* Infection in Small Wild Mammals. **Mycophatologia**, [S. l.], v. 180, n. 5-6, p. 435-440, dez. 2015.

SEBRAE – Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas de Santa Catarina. Santa Catarina Em números – Macrorregião Meio Oeste. p. 1-142, 2013.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. Consenso em paracoccidioidomicose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S. l.], v. 39, n. 3, p. 297-310, jun. 2006.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; et al. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 50, n. 5, p. 715-740, out. 2017.

SHOME, S. K.; BATISTA, A. C. Occurrence of *Paracoccidioides brasiliensis* In the soil of Recife (Brazil). **Revista da Faculdade de Medicina da Universidade do Ceará**, Fortaleza, v. 3, p. 90 – 94, 1963.

SILVA, S. H. M; et al. Detection of circulating gp43 antigen in serum, cerebrospinal fluid and bronchoalveolar lavage fluid of patients with paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington v. 41, n. 8, p. 3675-3680, ago. 2003.

SILVA-VERGARA, M. L.; et al. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá, State of Minas Gerais. **Medical Mycology**, [S. l.], v. 36, n.1, p. 37-42, fev. 1998.

SILVA-VERGARA, M. L. et al. The marsupial *Didelphis albiventris* is an improbable host of *Paracoccidioides brasiliensis* in endemic area of paracoccidioidomycosis in Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, p. 771-772, ago. 2001.

SILVEIRA, L. H.; et al. Occurrence of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in rom Mato Grosso do Sul, Brazil. **Mycopathologia**, [S. l.], v. 165, n.6, p.367-371, jun. 2008.

TEIXEIRA, M. M.; et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, [S. l.], v. 52, n. 2, p. 273-283, ago. 2009.

TEIXEIRA, M. M.; et al. *Paracoccidioides* Species Complex: Ecology, Phylogeny, Sexual Reproduction, and Virulence. **Plos Pathogens**, [S. l.], v. 10, n.10, p. 1-4, out. 2014.

TERÇARIOLI, G. R. et al. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. **BMC Microbiology**, [S. l.], v. 7, n. 92, p. 1-8, out. 2007.

THALHARI, S., et al. Deep Mycoses in Amazon Region. **International Journal of Dermatology**, [S. l.], v. 27, n. 7, 481-484, set. 1988.

THEODORO, R.C. et al. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. **Medical Mycology**, [S. l.], v. 43, n.8, p 725 – 729, dez. 2005.

THEODORO, R. C.; et al. Genus *Paracoccidioides*: Species Recognition and Biogeographical Aspects. **Plos One**, [S. l.], v. 7, n. 5, p. 1-15, maio. 2012.

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

TURISSINI, D. A.; et al. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. **Fungal Genetics and Biology**, [S.l.], v. 106, p. 9-25, mai. 2017.

UNTEREINER, W. A.; et al. The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales. **Mycologia**, [S. l.], v. 94, n. 4, p. 812-821, ago. 2004.

VALLE, A. C. F.; et al. Paracoccidioidomicose entre o grupo indígena Suruí de Rondônia, Amazônia (Brasil). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 33, n. 5, p. 407–411, out.1991

VILELA, R.; et al. Cutaneous Granulomas in Dolphins Caused by Novel Uncultivated *Paracoccidioides brasiliensis*. **Emerging Infectious Diseases Journal**, Atlanta, v. 22, n. 12, p. 2063-2069, dez. 2016.

VOLOSSIOUK, T.; ROBB, E. J.; NAZAR, R. N. Direct DNA extraction for PCR-mediated assays of soil organisms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 11, p. 3972-3976, nov. 1995.

WHITE T. J.; et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. **Academic Press**, p. 315 – 322, 1990.

ANEXOS

ANEXO A

ANALISES DAS SEQUÊNCIAS POSITIVAS APÓS PCR COM AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO α -TUBULINA.

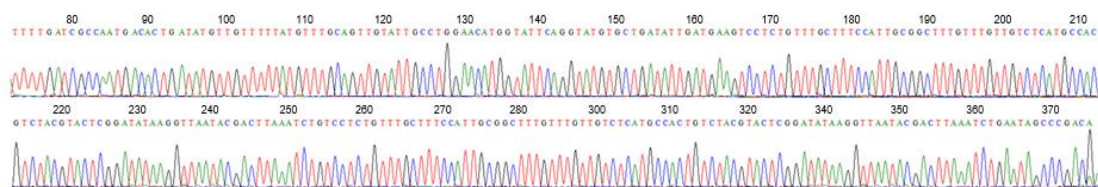


Figura 1 - Cromatograma de sequência obtida de uma amostra de solo com os *primers* α -TubF/R.

```

1.....| .....| .....| .....| .....| .....60
1  AGTCGTATTA ACCTTATATC CGAG-TACGT AGACAGTGGC ATGAGACAAC AAACAAAGCC
2  AGTCGTATTA ACCTTATATC CGAG-TACGT AGACAGTGGC ATGAGACAAC AAACAAAGCC
3  AGTCGTATTA ACCTTATATC CGAG-TACGT AGACAGTGGC ATGAGACAAC AAACAAAGCC
4  AGTCGTATTA ACCTTATATC CGAG-TACGT AGACAGTGGC ATGAGACAAC AAACAAAGCC
5  AGTCGTATTA ACCTTATATC CGAG-TACGT AGACAGTGGC ATGAGACAAC AAACAAAGCC
6  AGTCGTATTA ACCTTATATC CGAG-TACGT AGACAGTGGC ATGAGACAAC AAACAAAGCC
7  AGTCGTATTA ACCTTATATC CGAG-TACGT AGACAGTGGC ATGAGACAAC AAACAAAGCC
8  AGTCGTATTA ACCTTATATC CGAG-TACGT AGACAGTGGC ATGAGACAAC AAACAAAGCC
9  AGTCGTATTA ACCTTATATC CGAG-TACGT AGACAGTGGC ATGAGACAAC AAACAAAGCC
10 AGTCGTATTA ACCTTATATC CGAG-TACGT AGACAGTGGC ATGAGACAAC AAACAAAGCC
11 AGTCGTATTA ACCTTATATC CGAG-TACGT AGACAGTGGC ATGAGACAAC AAAAAGCC
12 AGTCGTATTA ACCTTATATC CCAGGTACGT AGACAGTGGC ATGAGACAAC AAACAAAGCT

61.....| .....| .....| .....| .....| .....120
1  GCAATGGAAA GCAAACAGAG GACTTCA-TC AATATCAGCA CATACTGAA TACCATGTTT
2  GCAATGGAAA GCAAACAGAG GACTTCA-TC AATATCAGCA CATACTGAA TACCATGTTT
3  GCAATGGAAA GCAAACAGAG GACTTCA-TC AATATCAGCA CATACTGAA TACCATGTTT
4  GCAATGGAAA GCAAACAGAG GACTTCA-TC AATATCAGCA CATACTGAA TACCATGTTT
5  GCAATGGAAA GCAAACAGAG GACTTCA-TC AATATCAGCA CATACTGAA TACCATGTTT
6  GCAATGGAAA GCAAACAGAG GACTTGA-TC AATATCAGCA CATACTGAA TACCATGTTT
7  GCAATGGAAA GCAAACAGAG GACTTCA-TC AATATCAGCA CATACTGAA TACCATGTTT
8  GCAATGGAAA GCAAACAGAG GACTTGA-TC AATATCAGCA CATACTGAA TACCATGTTT
9  GCAATGGAAA GCAAACAGAG GACTTGA-TC AATATCAGCA CATACTGAA TACCATGTTT
10 GCAATGGAAA GCAAACAGAG GACTTGA-TC AATATCAGCA CATACTGAA TACCATGTTT
11 GCAACGGAAA GCAAACAGAG GACTTGA-TC AATATCAGCA CATACTGAA TACCATGTTT
12 GCAAGGAAA  GCAAACAGAG GACTTGACTC AATATCAGCA CATACTGAA TACCATGTTT

121.....| .....| .....| .....| .....| .....180
1  CAGGCAATAC AACTGCAAAC AT-AAAAAC AACATATCAG TGTATTGGC GATCAAAAT
2  CAGGCAATAC AACTGCAAAC AT-AAAAAC AACATATCAG TGTATTGGC GATCAAAAT
3  CAGGCAATAC AACTGCAAAC AT-AAAAAC AACATATCAG TGTATTGGC GATCAAAAT
4  CAGGCAATAC AACTGCAAAC AT-AAAAAC AACATATCAG TGTATTGGC GATCAAAAT
5  CAGGCAATAC AACTGCAAAC AT-AAAAAC AACATATCAG TGTATTGGC GATCAAAAT
6  CAGGCAATAC AACTGCAAAC AT-AAAAAC AACATATCAG TGTATTGGC GATCAAAAT
7  CAGGCAATAC AACTGCAAAC AT-AAAAAC AACATATCAG TGTATTGGC GATCAAAAT
8  CAGGCAATAC AACTGCAAAC AT-AAAAAC AACATATCAG TGTATTGGC GATCAAAAT
9  CAGGCAATAC AACTGCAAAC AT-AAAAAC AACATATCAG TGTATTGGC GATCAAAAT
10 CAGGCAATAC AACTGCAAAC AT-AAAAAC AACATATCAG TGTATTGGC GATCAAAAT
11 CAGGCAATAC AACTGTAAC  AT-AAAAAC AACATATCAG TGTATTGGC GATCAAAAT
12 CAGGCAATAC AACTGTAAC  ATAAAAAA AACATATCAG TATTATTGGC GATCAAAAT

181.....| .....199
1  TGCCAGTGTA ATTGGAAGT
2  TGCCAGTGTA ATTGGAAGT
3  TGCCAGTGTA ATTGGAAGT
4  TGCCAGTGTA ATTGGAAGT
5  TGCCAGTGTA ATTGGAAGT
6  TGCCAGTGTA ATTGGAAGT
7  TGCCAGTGTA ATTGGAAGT
8  TGCCAGTGTA ATTGGAAGT
9  TGCCAGTGTA ATTGGAAGT
10 TGCCAGTGTA ATTGGAAGT
11 TGCCGTGTA  ATTGGAAGT
12 TGCCGTGTA  ATTGGAAGT

```

Fig 2- Comparação das sequências obtidas do solo com as depositadas no NCBI. 1) Solo Loanda, 2) Solo Mauá da Serra, 3) Solo Londrina, 4) Solo Água Doce, 5) Solo Joaçaba 1, 6) Solo Joaçaba 5, 7) DQ003815.1 *P. brasiliensis* PS3, 8) KT251020.1 *P. brasiliensis* S1, 9) DQ003789.1 *P. brasiliensis* S1a, 10) DQ003805.1 *P. brasiliensis* S1b, 11) DQ003795.1 *P. brasiliensis* PS2, 12) KC732780.1 *P. lutzii*. No alinhamento, os traços azuis indicam *gaps*; os nucleotídeos em vermelho, verde e roxo *mistakes*.

As sequências foram comparadas no banco de dados do NCBI, as de Loanda apresentaram 100% de similaridade para o isolado EMP54, acesso KT251022.1. As amostras de Mauá da Serra, Londrina, Água Doce e as sequências 1, 2,3,4 de Joaçaba são 100% similares a C1 acesso DQ003815.1. A sequência 5 de Joaçaba foi 100% similar ao isolado BI, acesso DQ003789.1. Todos são isolados de de *P. brasiliensis*. Em cinza está destacado a região dos primers α -TubF/R

```
>Sequência solo 1 Mauá da Serra
1.....|.....|.....|.....|.....50
GTCGGGCTATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAG
ACAGTGGCATGAGACAACAAACAAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGA
CTTCATCAATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAAC
TGCAAACATAAAAAACAACATATCAGTGTCAATTGGCGATCAAAATTTGCCA
GTGTAATTGGAAGTTCTGAAGAAGGACATAAGATATATAGGCAGTGTTAT
CATACTCCAG
.....|.262
```

```
> Sequência solo 2 Mauá da Serra
1.....|.....|.....|.....|.....50
GTCGGGCTATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAG
ACAGTGGCATGAGACAACAAACAAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGA
CTTCATCAATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAAC
TGCAAACATAAAAAACAACATATCAGTGTCAATTGGCGATCAAAATTTGCCA
GTGTAATTGGAAGTTCTGAAGAAGGACATAAGATATATAGGCAGTGTTAT
CATACTCCAG
.....|.262
```

```
>Sequência solo 3 Mauá da Serra
1.....|.....|.....|.....|.....50
GTCGGGCTATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAG
ACAGTGGCATGAGACAACAAACAAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGA
CTTCATCAATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAAC
TGCAAACATAAAAAACAACATATCAGTGTCAATTGGCGATCAAAATTTGCCA
GTGTAATTGGAAGTTCTGAAGAAGGACATAAGATATATAGGCAGTGTTAT
CATACTCCAG
.....|.262
```

```
>Sequência solo 1 Londrina
1.....|.....|.....|.....|.....50
GTCGGGCTATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAG
ACAGTGGCATGAGACAACAAACAAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGA
CTTCATCAATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAAC
TGCAAACATAAAAAACAACATATCAGTGTCAATTGGCGATCAAAATTTGCCA
GTGTAATTGGAAGTTCTGAAGAAGGACATAAGATATATAGGCAGTGTTAT
CATACTCCAG
.....|.262
```

>Sequência solo 3 Londrina
 1.....|.....|.....|.....|.....50
 GTCGGGCTATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAG
 ACAGTGGCATGAGACAACAAACAAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGA
 CTTTCATCAATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAAC
 TGCAAACATAAAAAACAACATATCAGTGTCAATTGGCGATCAAATTTGCCA
 GTGTAATTGGAAGTTCTGAAGAAGGACATAAGATATATAGGCAGTGTTAT
 CATACTCCAGA
|.262

>Sequência solo 4 Londrina
 1.....|.....|.....|.....|.....50
 GTCGGGCTATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAG
 ACAGTGGCATGAGACAACAAACAAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGA
 CTTTCATCAATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAAC
 TGCAAACATAAAAAACAACATATCAGTGTCAATTGGCGATCAAATTTGCCA
 GTGTAATTGGAAGTTCTGAAGAAGGACATAAGATATATAGGCAGTGTTAT
 CATACTCCAGA
|.262

>Sequência solo 5 Londrina
 1.....|.....|.....|.....|.....50
 GTCGGGCTATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAG
 ACAGTGGCATGAGACAACAAACAAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGA
 CTTTCATCAATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAAC
 TGCAAACATAAAAAACAACATATCAGTGTCAATTGGCGATCAAATTTGCCA
 GTGTAATTGGAAGTTCTGAAGAAGGACATAAGATATATAGGCAGTGTTAT
 CATACTCCAGA
|.262

>Sequência solo 1 Água Doce
 1.....|.....|.....|.....|.....50
 GTCGGGCTATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAG
 ACAGTGGCATGAGACAACAAACAAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGA
 CTTTCATCAATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAAC
 TGCAAACATAAAAAACAACATATCAGTGTCAATTGGCGATCAAATTTGCCA
 GTGTAATTGGAAGTTCTGAAGAAGGACATAAGATATATAGGCAGTGTTAT
 CATACTCCAGA
|.262

>Sequência solo 2 Água Doce
 1.....|.....|.....|.....|.....50
 GTCGGGCTATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAG
 ACAGTGGCATGAGACAACAAACAAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGA
 CTTTCATCAATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAAC
 TGCAAACATAAAAAACAACATATCAGTGTCAATTGGCGATCAAATTTGCCA
 GTGTAATTGGAAGTTCTGAAGAAGGACATAAGATATATAGGCAGTGTTAT
 CATACTCCAGA
|.262

>Sequência solo 3 Água Doce
 1.....|.....|.....|.....|.....50
 GTCGGGCTATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAG
 ACAGTGGCATGAGACAACAAACAAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGA
 CTTTCATCAATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAAC
 TGCAAACATAAAAAACAACATATCAGTGTCAATTGGCGATCAAATTTGCCA
 GTGTAATTGGAAGTTCTGAAGAAGGACATAAGATATATAGGCAGTGTTAT
 CATACTCCAGA
|.262

>Sequência solo 1 Joaçaba
 1.....|.....|.....|.....|.....50
 GTCGGGCTATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAG
 ACAGTGGCATGAGACAACAAACAAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGA
 CTTTCATCAATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAAC
 TGCAAACATAAAAAACAACATATCAGTGTCAATTGGCGATCAAATTTGCCA
 GTGTAATTGGAAGTTCTGAAGAAGGACATAAGATATATAGGCAGTGTTAT
 CATACTCCAGA
|.262

>Sequência solo 2 Joaçaba
 1.....|.....|.....|.....|.....50
 GTCGGGCTATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAG
 ACAGTGGCATGAGACAACAAACAAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGA
 CTTTCATCAATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAAC
 TGCAAACATAAAAAACAACATATCAGTGTCAATTGGCGATCAAATTTGCCA
 GTGTAATTGGAAGTTCTGAAGAAGGACATAAGATATATAGGCAGTGTTAT
 CATACTCCAGA
|.262

>Sequência solo 3 Joaçaba
 1.....|.....|.....|.....|.....50
 GTCGGGCTATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAG
 ACAGTGGCATGAGACAACAAACAAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGA
 CTTTCATCAATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAAC
 TGCAAACATAAAAAACAACATATCAGTGTCAATTGGCGATCAAATTTGCCA
 GTGTAATTGGAAGTTCTGAAGAAGGACATAAGATATATAGGCAGTGTTAT
 CATACTCCAGA
|.262

>Sequência solo 4 Joaçaba
 1.....|.....|.....|.....|.....50
 GTCGGGCTATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAG
 ACAGTGGCATGAGACAACAAACAAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGA
 CTTTCATCAATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAAC
 TGCAAACATAAAAAACAACATATCAGTGTCAATTGGCGATCAAATTTGCCA
 GTGTAATTGGAAGTTCTGAAGAAGGACATAAGATATATAGGCAGTGTTAT
 CATACTCCAGA
|.262

>Sequência solo 6 Joaçaba
 1.....|.....|.....|.....|.....50
 GTCGGGCTATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAG
 ACAGTGGCATGAGACAACAAACAAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGA
 CTTTCATCAATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAAC
 TGCAAACATAAAAAACAACATATCAGTGTCAATTGGCGATCAAATTTGCCA
 GTGTAATTGGAAGTTCTGAAGAAGGACATAAGATATATAGGCAGTGTTAT
 CATACTCCAG
|.262

>Sequência solo 7 Joaçaba
 1.....|.....|.....|.....|.....50
 GTCGGGCTATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAG
 ACAGTGGCATGAGACAACAAACAAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGA
 CTTTCATCAATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAAC
 TGCAAACATAAAAAACAACATATCAGTGTCAATTGGCGATCAAATTTGCCA
 GTGTAATTGGAAGTTCTGAAGAAGGACATAAGATATATAGGCAGTGTTAT
 CATACTCCAG
|.262

>Sequência solo 8 Joaçaba
 1.....|.....|.....|.....|.....50
 GTCGGGCTATTTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAG
 ACAGTGGCATGAGACAACAAACAAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGA
 CTTTCATCAATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAAC
 TGCAAACATAAAAAACAACATATCAGTGTTCATTGGCGATCAAATTTGCCA
 GTGTAATTGGAAGTTCTGAAGAAGGACATAAGATATATAGGCAGTGTAT
 CATACTCCAG
|.262

Tabela 1 - Descrição dos alinhamentos significativos para sequências de Mauá da Serra, Londrina, Água Doce e Joaçaba

Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
484	484	99%	4e-133	100%	AY013314.1
484	484	99%	4e-133	100%	DQ003815.1

vg

>Sequência solo 2 Londrina
 1.....|.....|.....|.....|.....50
 TGGCATGAGACAACAAACAAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGACTTC
 ATCAATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAACCTGCA
 AACATAAAAAACAACATATCAGTGTTCATTGGCGATCAAATTTGCCAGTGT
 AATTGGAAGTTCTGAAGAAGGACATAAGATATATAGGCAGTGTATCATA
 CCTCCAG
208

Tabela 1 - Descrição dos alinhamentos significativos para sequências de Londrina

Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
385	385	99%	3e-103	100%	AY013314.1
385	385	99%	3e-103	100%	DQ003815.1

>Sequência solo 5 Joaçaba
 1.....|.....|.....|.....|.....50
 GTCGGGCTATTTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAG
 ACAGTGGCATGAGACAACAAACAAAGCCGCAATGGAAAGTAAACAGAGGA
 CTTGATCAATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAAC
 TGCAAACATAAAAAACAACATATCAGTGTTCATTGGCGATCAAATTTGCCA
 GTGTAATTGGAAGTTCTGAAGAAGGACATAAGATATATAGGCAGTGTAT
 CATACTCCAG
|.262

Tabela 1 - Descrição dos alinhamentos significativos para sequências de Mauá da Serra, Londrina, Água Doce e Joaçaba

Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
484	484	99%	4e-133	100%	DQ003789.1
479	479	99%	2e-131	99%	DQ003836.1

>Sequência solo 1 Loanda
 1.....|.....|.....|.....|.....50
 TATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAGACAGTGG
 CATGAGACAACAAACAAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGACTTCATC
 AATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAACCTGCAAAC
 ATAAAAACAACATATCAGTGTTCATTGGCGATCAAATTTGCCAGTGTAAAT
 TGGAAGTTCTGAA
|.213

>Sequência solo 3 Loanda

```
1.....|.....|.....|.....|.....50
TATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAGACAGTGGC
ATGAGACAACAAACAAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGACTTCATCAA
TATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAAC TGCAAACATA
AAAACAACATATCAGTGTTCATTGGCGATCAAAATTTGCCAGTGTAAATTGGA
AGTTCTGAA
.....209
```

>Sequência solo 7 Loanda

```
1.....|.....|.....|.....|.....50
TATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAGACAGTGG
CATGAGACAACAAACAAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGACTTCATC
AATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAAC TGCAAAC
ATAAAAACAACATATCAGTGTTCATTGGCGATCAAAATTTGCCAGTGTAAAT
TGGAAGTTCTGAA
.....|..213
```

>Sequência solo 10 Loanda

```
1.....|.....|.....|.....|.....50
TATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAGACAGTGG
CATGAGACAACAAACAAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGACTTCATC
AATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAAC TGCAAAC
ATAAAAACAACATATCAGTGTTCATTGGCGATCAAAATTTGCCAGTGTAAAT
TGGAAGTTCTGAA
.....|..213
```

>Sequência solo 11 Loanda

```
1.....|.....|.....|.....|.....50
TATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAGACAGTGG
CATGAGACAACAAACAAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGACTTCATC
AATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAAC TGCAAAC
ATAAAAACAACATATCAGTGTTCATTGGCGATCAAAATTTGCCAGTGTAAAT
TGGAAGTTCTGAA
.....|..213
```

>Sequência solo 12 Loanda

```
1.....|.....|.....|.....|.....50
TATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAGACAGTGG
CATGAGACAACAAACAAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGACTTCATC
AATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAAC TGCAAAC
ATAAAAACAACATATCAGTGTTCATTGGCGATCAAAATTTGCCAGTGTAAAT
TGGAAGTTCTGAA
.....|..213
```

>Sequência solo 13 Loanda

```
1.....|.....|.....|.....|.....50
TATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAGACAGTGG
CATGAGACAACAAACAAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGACTTCATC
AATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAAC TGCAAAC
ATAAAAACAACATATCAGTGTTCATTGGCGATCAAAATTTGCCAGTGTAAAT
TGGAAGTTCTGAA
.....|..213
```

>Sequência solo 15 Loanda
1.....|.....|.....|.....|.....50
TATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAGACAGTGG
CATGAGACAACAACAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGACTTCATC
AATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAACGCAAAC
ATAAAAAACAACATATCAGTGTTCATTGGCGATCAAAAATTTGCCAGTGTAAAT
TGGAAGTTCTGAA
.....|..213

>Sequência solo 17 Loanda
1.....|.....|.....|.....|.....50
TATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAGACAGTGG
CATGAGACAACAACAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGACTTCATC
AATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAACGCAAAC
ATAAAAAACAACATATCAGTGTTCATTGGCGATCAAAAATTTGCCAGTGTAAAT
TGGAAGTTCTGAA
.....|..213

>Sequência solo 19 Loanda
1.....|.....|.....|.....|.....50
TATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAGACAGTGG
CATGAGACAACAACAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGACTTCATC
AATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAACGCAAAC
ATAAAAAACAACATATCAGTGTTCATTGGCGATCAAAAATTTGCCAGTGTAAAT
TGGAAGTTCTGAA
.....|..213

>Sequência solo 20 Loanda
1.....|.....|.....|.....|.....50
TATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAGACAGTGG
CATGAGACAACAACAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGACTTCATC
AATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAACGCAAAC
ATAAAAAACAACATATCAGTGTTCATTGGCGATCAAAAATTTGCCAGTGTAAAT
TGGAAGTTCTGAA
.....|..213

>Sequência solo 22 Loanda
1.....|.....|.....|.....|.....50
TATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAGACAGTGG
CATGAGACAACAACAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGACTTCATC
AATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAACGCAAAC
ATAAAAAACAACATATCAGTGTTCATTGGCGATCAAAAATTTGCCAGTGTAAAT
TGGAAGTTCTGAA
.....|..213

>Sequência solo 23 Loanda
1.....|.....|.....|.....|.....50
TATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAGACAGTGG
CATGAGACAACAACAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGACTTCATC
AATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAACGCAAAC
ATAAAAAACAACATATCAGTGTTCATTGGCGATCAAAAATTTGCCAGTGTAAAT
TGGAAGTTCTGAA
.....|..213

>Sequência solo 24 Loanda
 1.....|.....|.....|.....|.....50
 TATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAGACAGTGG
 CATGAGACAACAACAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGACTTCATC
 AATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAACCTGCAAAC
 ATAAAAACAACATATCAGTGTTCATTGGCGATCAAAATTTGCCAGTGTAAAT
 TGGAAGTTCTGAA
|..213

>Sequência solo 25 Loanda
 1.....|.....|.....|.....|.....50
 TATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAGACAGTGG
 CATGAGACAACAACAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGACTTCATC
 AATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAACCTGCAAAC
 ATAAAAACAACATATCAGTGTTCATTGGCGATCAAAATTTGCCAGTGTAAAT
 TGGAAGTTCTGAA
|..213

Tabela 1 - Descrição dos alinhamentos significativos para sequências de Loanda

<i>Max score</i>	<i>Total score</i>	<i>Query cover</i>	<i>E value</i>	<i>Ident</i>	<i>Accession</i>
394	394	100%	6e-106	100%	AY013314.1
394	394	100%	6e-106	100%	DQ003815.1
385	385	97%	3e-106	100%	KT251022.1

>Sequência solo 2 Loanda
 1.....|.....|.....|.....|.....50
 TCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAGACAGTGGCAT
 GAGACAACAACAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGACTTCATCAAT
 ATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAACCTGCAAACATA
 AAAACAACATATCAGTGTTCATTGGCGATCAAAATTTGCCAGTGTAAATGG
 AAGTTCTGAA
210

>Sequência solo 5 Loanda
 1.....|.....|.....|.....|.....50
 TCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAGACAGTGGCAT
 GAGACAACAACAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGACTTCATCAAT
 ATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAACCTGCAAACATA
 AAAACAACATATCAGTGTTCATTGGCGATCAAAATTTGCCAGTGTAAATGG
 AAGTTCTGAA
210

Tabela 1 - Descrição dos alinhamentos significativos para sequências de Loanda

<i>Max score</i>	<i>Total score</i>	<i>Query cover</i>	<i>E value</i>	<i>Ident</i>	<i>Accession</i>
388	388	100%	6e-106	100%	AY013314.1
388	388	100%	6e-106	100%	DQ003815.1
385	385	99%	3e-106	100%	KT251022.1

>Sequência solo 4 Loanda
 1.....|.....|.....|.....|.....50
 TATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAGACAGTGG
 CATGAGACAACAACAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGACTTCATC
 AATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAACCTGCAAAC
 ATAAAAACAACATATCAGTGTTCATTGGCGATCAAAATTTGCCAGTGTAAAT
 TGGAAGT
207

>Sequência solo 6 Loanda
 1.....|.....|.....|.....|.....50
 TATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAGACAGTGG
 CATGAGACAACAACAAAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGACTTCATC
 AATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAACCTGCAAAC
 ATAAAAACAACATATCAGTGTTCATTGGCGATCAAAAATTTGCCAGTGTAAAT
 TGGAAGT
207

>Sequência solo 14 Loanda
 1.....|.....|.....|.....|.....50
 TATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAGACAGTGG
 CATGAGACAACAACAAAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGACTTCATC
 AATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAACCTGCAAAC
 ATAAAAACAACATATCAGTGTTCATTGGCGATCAAAAATTTGCCAGTGTAAAT
 TGGAAGT
206

>Sequência solo 16 Loanda
 1.....|.....|.....|.....|.....50
 TATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAGACAGTGG
 CATGAGACAACAACAAAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGACTTCATC
 AATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAACCTGCAAAC
 ATAAAAACAACATATCAGTGTTCATTGGCGATCAAAAATTTGCCAGTGTAAAT
 TGGAAGT
206

>Sequência solo 21 Loanda
 1.....|.....|.....|.....|.....50
 TATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAGACAGTGG
 CATGAGACAACAACAAAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGACTTCATC
 AATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAACCTGCAAAC
 ATAAAAACAACATATCAGTGTTCATTGGCGATCAAAAATTTGCCAGTGTAAAT
 TGGAAGT
207

Tabela 1 - Descrição dos alinhamentos significativos para sequências de Loanda

<i>Max score</i>	<i>Total score</i>	<i>Query cover</i>	<i>E value</i>	<i>Ident</i>	<i>Accession</i>
383	388	100%	1e-102	100%	AY013314.1
383	388	100%	1e-102	100%	DQ003815.1
374	385	97%	7e-100	100%	KT251022.1

>Sequência solo 8 Loanda
 1.....|.....|.....|.....|.....50
 CGAGTACGTAGACAGTGGCATGAGACAACAACAAAAGCCGCAATGGAAAG
 CAAACAGAGGACTTCATCAATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCA
 GGCAATACAACCTGCAAACATAAAAAACAACATATCAGTGTTCATTGGCGATC
 AAAATTTGCCAGTGTAAATTTGGAAAGT
|.....|....174

Tabela 1 - Descrição dos alinhamentos significativos para sequências de Loanda

<i>Max score</i>	<i>Total score</i>	<i>Query cover</i>	<i>E value</i>	<i>Ident</i>	<i>Accession</i>
324	324	100%	6e-85	100%	AY013314.1
324	324	100%	6e-85	100%	DQ003815.1
324	324	100%	6e-85	100%	KT251022.1

```
>Sequência solo 18 Loanda
1.....|.....|.....|.....|.....50
ATCCGAGTACGTAGACAGTGGCATGAGACAACAAACAAAGCCGCAATGGA
AAGCAAACAGAGGACTTCATCAATATCAGCACATACCTGAATACCATGTT
CCAGGCAATACAACCTGCAAAACATAAAAAACAACATATCAGTGTTCATTGGCG
ATCAAAATTTGCCAGTGTAAATTGGAAGTTCTGAA
.....|.....|.....|...184
```

Tabela 1 - Descrição dos alinhamentos significativos para sequências de Loanda

<i>Max score</i>	<i>Total score</i>	<i>Query cover</i>	<i>E value</i>	<i>Ident</i>	<i>Accession</i>
340	340	100%	6e-90	100%	AY013314.1
340	340	100%	6e-90	100%	DQ003815.1
340	340	100%	6e-90	100%	KT251022.1

```
>Sequência solo 26 Loanda
1.....|.....|.....|.....|.....50
GTCGGGCTATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAG
ACAGTGGCATGAGACAACAAACAAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGA
CTTCATCAATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAAC
TGCAAACATAAAAAACAACATATCAGTGTTCATTGGCGATCAAAATTTGCCA
GTGTAATTGGAAGTTCTGAAGAAGGACATAAGATATATAGGCAGTGTTAT
CATACCTCCCAG
.....|.262
```

```
>Sequência solo 27 Loanda
1.....|.....|.....|.....|.....50
GTCGGGCTATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAG
ACAGTGGCATGAGACAACAAACAAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGA
CTTCATCAATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAAC
TGCAAACATAAAAAACAACATATCAGTGTTCATTGGCGATCAAAATTTGCCA
GTGTAATTGGAAGTTCTGAAGAAGGACATAAGATATATAGGCAGTGTTAT
CATACCTCCCAG
.....|.262
```

```
>Sequência solo 28 Loanda
1.....|.....|.....|.....|.....50
GTCGGGCTATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAG
ACAGTGGCATGAGACAACAAACAAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGA
CTTCATCAATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAAC
TGCAAACATAAAAAACAACATATCAGTGTTCATTGGCGATCAAAATTTGCCA
GTGTAATTGGAAGTTCTGAAGAAGGACATAAGATATATAGGCAGTGTTAT
CATACCTCCCAG
.....|.262
.....|.264
```

```
>Sequência solo 29 Loanda
1.....|.....|.....|.....|.....50
GTCGGGCTATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAG
ACAGTGGCATGAGACAACAAACAAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGA
CTTCATCAATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAAC
TGCAAACATAAAAAACAACATATCAGTGTTCATTGGCGATCAAAATTTGCCA
GTGTAATTGGAAGTTCTGAAGAAGGACATAAGATATATAGGCAGTGTTAT
CATACCTCCCAG
.....|.262
```

>Sequência solo 6 Londrina

```
1.....|.....|.....|.....|.....50
GTCGGGCTATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAG
ACAGTGGCATGAGACAACAAACAAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGA
CTTCATCAATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAAC
TGCAAACATAAAAAACAACATATCAGTGTCAATTGGCGATCAAATTTGCCA
GTGTAATTGGAAGTTCTGAAGAAGGACATAAGATATATAGGCAGTGTTAT
CATACTCCAG
.....|.262
```

>Sequência solo 4 Mauá da Serra

```
1.....|.....|.....|.....|.....50
GTCGGGCTATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAG
ACAGTGGCATGAGACAACAAACAAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGA
CTTCATCAATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAAC
TGCAAACATAAAAAACAACATATCAGTGTCAATTGGCGATCAAATTTGCCA
GTGTAATTGGAAGTTCTGAAGAAGGACATAAGATATATAGGCAGTGTTAT
CATACTCCAG
.....|.262
```

>Sequência solo 4 Água Doce

```
1.....|.....|.....|.....|.....50
GTCGGGCTATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAG
ACAGTGGCATGAGACAACAAACAAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGA
CTTCATCAATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAAC
TGCAAACATAAAAAACAACATATCAGTGTCAATTGGCGATCAAATTTGCCA
GTGTAATTGGAAGTTCTGAAGAAGGACATAAGATATATAGGCAGTGTTAT
CATACTCCAG
.....|.262
```

>Sequência solo 5 Água Doce

```
1.....|.....|.....|.....|.....50
GTCGGGCTATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAG
ACAGTGGCATGAGACAACAAACAAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGA
CTTCATCAATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAAC
TGCAAACATAAAAAACAACATATCAGTGTCAATTGGCGATCAAATTTGCCA
GTGTAATTGGAAGTTCTGAAGAAGGACATAAGATATATAGGCAGTGTTAT
CATACTCCAG
.....|.262
```

>Sequência solo 9 Joaçaba

```
1.....|.....|.....|.....|.....50
GTCGGGCTATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAG
ACAGTGGCATGAGACAACAAACAAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGA
CTTCATCAATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAAC
TGCAAACATAAAAAACAACATATCAGTGTCAATTGGCGATCAAATTTGCCA
GTGTAATTGGAAGTTCTGAAGAAGGACATAAGATATATAGGCAGTGTTAT
CATACTCCAG
.....|.262
```

>Sequência solo 10 Joaçaba

```
1.....|.....|.....|.....|.....50
GTCGGGCTATTCAGATTTAAGTCGTATTAACCTTATATCCGAGTACGTAG
ACAGTGGCATGAGACAACAAACAAAGCCGCAATGGAAAGCAAACAGAGGA
CTTCATCAATATCAGCACATACCTGAATACCATGTTCCAGGCAATACAAC
TGCAAACATAAAAAACAACATATCAGTGTCAATTGGCGATCAAATTTGCCA
GTGTAATTGGAAGTTCTGAAGAAGGACATAAGATATATAGGCAGTGTTAT
CATACTCCAG
.....|.262
```

Tabela 1 - Descrição dos alinhamentos significativos para sequências de Loanda

<i>Max score</i>	<i>Total score</i>	<i>Query cover</i>	<i>E value</i>	<i>Ident</i>	<i>Accession</i>
388	388	99%	3e-104	100%	AY013314.1
388	388	99%	3e-104	100%	DQ003815.1
383	383	98%	1e-102	100%	KT251022.1