



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

DONIZETI RODRIGUES BELITARDO

**UTILIZAÇÃO DE COELHOS E SUÍNOS COMO ANIMAIS  
SENTINELA DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

**DONIZETI RODRIGUES BELITARDO**

**UTILIZAÇÃO DE COELHOS E SUÍNOS COMO ANIMAIS  
SENTINELA DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental do Departamento de Ciências Patológicas, da Universidade Estadual de Londrina, para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Mario Augusto Ono.

Londrina  
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

B431u Belitardo, Donizeti Rodrigues.

Utilização de coelhos e suínos como animais sentinela da paracoccidiodomicose / Donizeti Rodrigues Belitardo. – Londrina, 2013.  
59 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, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Paracoccidiodomicose – Teses. 2. Micoses fungóides – Teses. 3. Coelho – Teses. 4. Suíno – Teses. 5. Patologia experimental – Teses. I. Ono, Mario Augusto. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616.993

DONIZETI RODRIGUES BELITARDO

**UTILIZAÇÃO DE COELHOS E SUÍNOS COMO ANIMAIS  
SENTINELA DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental do Departamento de Ciências Patológicas, da Universidade Estadual de Londrina, para obtenção do título de Doutor.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal  
Universidade Federal de Ciências da Saúde de  
Porto Alegre - UFRGS

---

Profa. Dra. Luciane Holsback Silveira Fertonani  
Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

---

Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Maria Angelica Ehara Watanabe  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 06 de junho de 2013.

A Deus, para sua maior glória;

Aos meus pais Gregório (*in memoriam*) e Magdalena, que em sua simplicidade indicaram-me o caminho;

À minha companheira, mulher e amiga Rosinéia, que em sua paciência muito me ajuda e faz bem com  
sua presença;

À minha filha Isabela na sua inocência de criança me inspira e compreende;

Aos meus irmãos e sobrinhos, distantes e presentes, gente forte e persistente;

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Mario Augusto Ono, meu orientador, por sua amizade, sabedoria, incentivo e presteza durante as atividades e discussões que permearam este trabalho.

Ao Corpo Docente do Programa de Pós- graduação em Patologia Experimental, pela amizade e apoio.

Aos Professores e chefes de Divisão do Centro de Ciências da Saúde que permitiram minha ausência para realizar este trabalho: Prof. Dr. Francisco Pereira - chefe imediato; Prof. Dr. Decio Sabatini - Coordenador da Pós graduação em Ciências da Saúde.

Aos colegas de Pós-graduação e de laboratório que muito contribuíram neste trabalho, Gabriela Gonçalves de Oliveira, Mônica Raquel Sbeghen, Isabele Kazahaya Borges, Aline Omori, Aline Amaral, Rafaela, Tatiane, Jeovana e em especial agradecimento a Atilio Sersun Calef, por sua enorme presteza, dedicação e ânimo durante os trabalhos de campo e de laboratório.

Aos funcionários do Departamento de Patologia do HU/UEL por sua amizade, colaboração e dedicação, Arão de Oliveira e Obedes de Oliveira.

Aos funcionários do biotério do HU, Izaltino Farias e José de Oliveira Jesus. E demais funcionários do CCS e do HU, sempre otimistas com este estudo.

Aos produtores rurais dos Distritos de Londrina, Tadeu Herek, Geraldo Nicodemos da Silva, Geraldo Gomes Guerreiro, João Batista da Silva, José Quinteiro, Jose Crespim, que permitiram nossa presença e apoiaram nosso trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*Veni, vidi, vici*

BELITARDO, Donizeti Rodrigues. **Utilização de coelhos e suínos como animais sentinela da paracoccidioidomicose.** 2013. 59f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

## RESUMO

A paracoccidioidomicose, causada pelo fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, é a micose sistêmica humana mais prevalente na América Latina. A paracoccidioidomicose afeta principalmente trabalhadores rurais do sexo masculino, causando lesões granulomatosas em órgãos como pulmão, fígado e baço. A participação de espécies animais na epidemiologia do fungo não está esclarecida. O presente estudo avaliou a infecção de coelhos e porcos domésticos pelo *P. brasiliensis*. Amostras de soro de 170 coelhos e 106 suínos foram analisadas por ELISA e imunodifusão, usando a gp43 e exoantígeno de *P. brasiliensis*, respectivamente. Coelhos mantidos livres mostraram significativa positividade alta de 34.6 a 51.7%, do que animais mantidos presos em gaiolas (11.1%), a positividade total foi de 27.1%. Entre os suínos analisados a positividade variou de 13.0 a 69.7% entre as propriedades, com 37.7% de positividade total. Não foi observada reatividade na imunodifusão para coelhos e suínos. Coelhos sentinela expostos à infecção natural pelo *P. brasiliensis* foram observados por seis meses com uma taxa de soroconversão de 83.3%. De um coelho sentinela foi possível detectar *P. brasiliensis* por histopatologia e PCR. Suínos inicialmente soronegativos à gp43 expostos a infecção natural pelo *P. brasiliensis* após três meses de exposição, todos os animais soro converteram. Não foi possível detectar *P. brasiliensis* em amostras de tecidos (baço, pulmão, fígado e linfonodos) de suínos sentinela submetidos a cultura, histopatologia e PCR. Os resultados deste trabalho sugerem que estas espécies de animais podem ser usadas como sentinelas para a presença do *P. brasiliensis* no ambiente.

**Palavras-chave:** Epidemiologia. Paracoccidioidomicose. Infecção. Micose sistêmica. Coelho. Suíno.

BELITARDO, Donizeti Rodrigues. **Utilization of rabbits and swine as sentinel animal of paracoccidioidomycosis.** 2013. 59p. PhD Thesis. State University of Londrina, Londrina.

## ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis, caused by the thermomorphous fungus *Paracoccidioides brasiliensis*, is the most prevalent human systemic mycosis in Latin America. Paracoccidioidomycosis affects mainly male rural workers, causing granulomatous lesions in organs such as lungs, liver and spleen. The participation of other animal species in the fungus epidemiology is not well understood. The present study evaluated the infection of domestic rabbits and pigs by *Paracoccidioides brasiliensis*. The serum samples of 170 rabbits and 106 pigs were analyzed by ELISA and immunodiffusion test, using *P. brasiliensis* gp43 and exoantigen, respectively. The free range rabbits showed a significantly higher positivity of 34.6 to 51.7% than caged animals (11.1%) and the overall positivity was 27.1%. Among the pigs tested positive ranged from 13.0 to 69.7% between the properties, with 37.7% in the total. No reactivity was observed in the immunodiffusion test for rabbits and pigs. Sentinel rabbits exposed to natural infection with *P. brasiliensis* were followed for six months and a seroconversion rate of 83.3% was observed. Only a rabbit was detected *P. brasiliensis* by histopathological examination and PCR analysis. Pigs seronegative to gp43 were exposed to natural infection by *P. brasiliensis* and all animals seroconverted three months after exposition. *P. brasiliensis* was not detected in tissue samples (spleen, lung, liver and lymph nodes) from sentinel pigs submitted to culture, histopathological examination and PCR analysis. The results of this work suggest that these animal species can be useful sentinels for *P. brasiliensis* presence in the environment.

**Keywords:** Epidemiology. Paracoccidioidomycosis. Infection. Systemic mycosis. Rabbits. Pigs

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1**– Relações filogenéticas da Família Ajellomycetaceae .....17
- Figura 2**– Consenso árvore de máxima verossimilhança obtido a partir da análise de 500 repetições de bootstrap. Parcimônia e probabilidade proporções de bootstrap e probabilidades posterior Bayesiana (em%) são mostrados ao lado dos ramos, em a ordem MP / ML / BP..... 18
- Figura 3**– Distribuição geográfica dos diferentes grupos genéticos do complexo de espécies de *Paracoccidioides brasiliensis*. Espécies PS2: ocorrem no Brasil e na Venezuela; espécies PS3: na Colômbia; especie S1: no Brasil, Argentina, Paraguay,Uruguay, Peru e Venezuela e Pb 01- Like ocorre na região Central do Brasil e no Equador..... 19
- Figura 4**– Map showing the Districts of Warta, Londrina Central, Irerê, and Lerroville in the municipality of Londrina, Parana, Brazil .....38
- Figura 5**– Humoral immune response (IgG) against gp43 evaluated by ELISA in two rabbits experimentally infected with *P. brasiliensis* .....41
- Figura 6**– Humoral immune response (IgG) against gp43 evaluated by ELISA in sentinel caged rabbits (A) and free range rabbits (B) exposed to natural infection with *P. brasiliensis*.....43
- Figura 7**– Spleen from a sentinel free range rabbit with a characteristic *P. brasiliensis* multiple budding yeast cell (arrow) stained with Grocott (100x) .....44
- Figura 8**– Levels of IgG anti-gp43 evaluated by ELISA in serum samples from sentinel pigs exposed to natural infection with *P. brasiliensis* .....54

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Temperatura corporal de algumas espécies animais .....21
- Tabela 2** – Reactivity to *P. brasiliensis* evaluated by ELISA and immunodiffusion test in 170 rabbits from four Districts of Londrina municipality, Paraná State.....42
- Tabela 3** – Reactivity of 106 serum samples from free range pigs to *P. brasiliensis* evaluated by ELISA (gp43) and immunodiffusion (exoantigen) according to sex and farms .....54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Solução 4 normal de Ácido Sulfúrico
<b>AIDS</b>	Acquired Immuno Deficiency Syndrome
<b>Al</b>	Alumínio
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>DNA</b>	<i>Deoxy-ribo-Nucleic Acid</i>
<b>ELISA</b>	Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay
<b>Gp</b>	Glicoproteína
<b>gp43</b>	Glicoproteína de 43 kDa
<b>H</b>	Hidrogênio
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TMB</b>	Peróxido de Hidrogênio 3,3',5,5' Tetrametilbenzidina
<b>HE</b>	Hematoxilina-Eosina
<b>ID</b>	Imunodifusão
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>ITS</b>	Internal Transcribed Spacers
<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>m</b>	Metro
<b><i>Nested PCR</i></b>	Modificação da PCR para reduzir anelamento não específico.
<b>Pb</b>	Paracoccidoides brasiliensis
<b>Pb01</b>	Grupo Pb01 de <i>P. brasiliensis</i> separado por estudo filogenético
<b><i>Pb01-like</i></b>	É o mesmo Pb01 que foi denominado de <i>Paracoccidoides lutzii</i>
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline ou Tampão Fosfato-Salino
<b>PBS-T</b>	PBS com 0.05% Tween 20
<b>PCM</b>	Paracoccidoidomicose
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PS2</b>	Grupo PS2 de <i>P. brasiliensis</i> separado por estudo filogenético
<b>PS3</b>	Grupo PS3 de <i>P. brasiliensis</i> separado por estudo filogenético
<b>S1</b>	Grupo S1 de <i>P. brasiliensis</i> separado por estudo filogenético
<b>S</b>	South (Sul)
<b>TB16B1</b>	Isolado de <i>P. brasiliensis</i> pertencente ao grupo S1
<b>W</b>	West (Oeste)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1	A DOENÇA .....	13
1.2	<i>PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS</i> E INFECÇÃO .....	14
1.3	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL .....	15
1.4	ANÁLISE PCR .....	16
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	26
2.1	GERAL .....	26
2.2	ESPECÍFICOS .....	26
	REFERENCIAS .....	27
<b>3</b>	<b>ARTIGO I - <i>PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS</i> INFECTION IN DOMESTIC RABBITS (<i>ORYCTOLAGUS CUNICULUS</i>)</b> .....	35
3.1	SUMMARY .....	35
3.2	INTRODUCTION .....	35
3.3	MATERIALS AND METHODS .....	37
3.3.1	Area of Study .....	37
3.3.2	Animals .....	37
3.3.3	<i>P. brasiliensis</i> Antigens .....	38
3.3.4	Experimental Infection of Rabbits with <i>P. brasiliensis</i> .....	38
3.3.5	Seroepidemiological Study .....	39
3.3.6	Use of Rabbits as Sentinel Animals .....	39
3.3.7	Indirect ELISA with gp43 as Antigen .....	39
3.3.8	Immunodiffusion Test .....	40
3.3.9	Detection of <i>P. brasiliensis</i> in Sentinel Rabbit Tissue Samples .....	40
3.4	DATA ANALYSIS .....	40
3.5	RESULTS .....	40
3.5.1	Humoral Immune Response of Rabbits Experimentally Infected with <i>P. brasiliensis</i> .....	40

3.5.2	Seroepidemiology of Paracoccidioidomycosis in Rabbits .....	41
3.5.3	Seroconversion of Sentinel Rabbits.....	42
3.5.4	Histopathological Examination and PCR Analysis .....	42
3.5.5	<i>P. brasiliensis</i> Isolation from Rabbit Tissue Samples .....	44
3.6	DISCUSSION.....	44
3.7	CONCLUSION .....	45
3.8	ACKNOWLEDGMENTS.....	45
3.9	CONFLICT OF INTEREST STATEMENT .....	45
	REFERENCES.....	46

<b>4</b>	<b>ARTIGO II - DETECTION OF ANTIBODIES AGAINST PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS IN FREE RANGE DOMESTIC PIGS (<i>SUS SCROFA</i>) .....</b>	<b>49</b>
4.1	SUMMARY.....	49
4.2	INTRODUCTION.....	50
4.3	MATERIALS AND METHODS.....	50
4.3.1	Area of Study .....	50
4.3.2	Animals.....	51
4.3.3	Use of Pigs as Sentinel Animals of Paracoccidioidomycosis .....	51
4.3.4	<i>P. brasiliensis</i> Exoantigen and Gp43.....	51
4.3.5	ELISA with gp43 .....	52
4.3.6	Immunodiffusion Test .....	52
4.3.7	Statistical Analysis .....	52
4.4	RESULTS .....	53
4.4.1	Seroepidemiological Study .....	53
4.4.2	Culture, Histopathological and PCR Analysis of Tissue Samples.....	53
4.4.3	Use of Pigs as Sentinel Animals of Paracoccidioidomycosis .....	53
4.5	DISCUSSION.....	55
4.6	CONCLUSION .....	56
4.7	ACKNOWLEDGMENTS.....	56
	REFERENCES.....	56

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A DOENÇA

A paracoccidiodomicose (PCM) é uma micose sistêmica descrita por Lutz 1908 <sup>[1]</sup>, endêmica na América Latina e considerada uma micose de importação quando diagnosticada em outras partes do mundo. É descrita rara e esporadicamente em animais domésticos e silvestres. A PCM tem grande importância socioeconômica, acomete principalmente trabalhadores rurais do sexo masculino, na faixa etária de 30 a 50 anos <sup>[2,3]</sup>.

A PCM é descrita em humanos nas formas aguda e crônica <sup>[4]</sup>. A doença aguda (tipo juvenil) corresponde a 5-10% dos casos, sem distribuição por gênero, de evolução rápida, com presença de linfadenomegalia, manifestações digestivas, hepatoesplenomegalia, envolvimento osteoarticular e lesões cutâneas. A doença crônica (tipo adulto) responde por 90% dos casos e ocorre entre adultos de 30-60 anos, com predominância do sexo masculino, de progressão lenta, silenciosa, com diagnóstico tardio. Manifestações pulmonares estão presentes em 90% dos pacientes, envolvendo geralmente mais de um órgão, sendo os pulmões, mucosas e pele os sítios mais acometidos. São frequentes os quadros de tosse com expectoração, lesões vegetantes em lábios e mucosa orofaríngea, fraqueza e linfonomegalia <sup>[3, 5]</sup>. A mortalidade relacionada à PCM de 1985 a 2005 foi de 1950 óbitos sendo 1164 (59,7%) por PCM como causa básica e 786 (40,3%) como causa associada. O maior número de óbitos ocorreu entre lavradores adultos com tendência de aumento nos meses de inverno <sup>[6]</sup>. A PCM pode estar associada a outras doenças como AIDS e câncer e em menor frequência a outro tipo de doença infecciosa e/ou metabólica <sup>[4, 6]</sup>. Deve ser diferenciada de tuberculose e outras micoses (histoplasmose, criptococose e candidíase) em sua forma pulmonar. No *International Colloquium on Paracoccidiodomycosis* realizado em Medellín, Colômbia, 1986, a PCM foi classificada em PCM-infecção e PCM-doença. A PCM-infecção ocorre entre pessoas que são reagentes aos antígenos do fungo em teste sorológico ou intradérmico, porém sem desenvolvimento da doença, sendo um indicativo que fizeram contato com o agente e desenvolveram uma resposta imune

humoral e celular competente. A PCM-doença é descrita em sua forma clínica, com resposta imune detectável porém incompetente [7].

## 1.2 *PARACOCIDIROIDES BRASILIENSIS* E INFECÇÃO

*Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) é um fungo termodimórfico [8,9], que cresce de forma distinta em temperaturas diferentes. Cresce como levedura a temperatura de 35°C *in vitro* ou no tecido de hospedeiro causando doença. Cresce como hifa a temperatura ambiente de 4-25°C produzindo formas infectantes [2]. Este fungo apresenta fenótipos variados no crescimento micelial das colônias, produção de conídeos, transição micélio-levedura, microscopia do levedo (brotamentos, tamanho e formato das células), virulência e tolerância térmica e variações nas manifestações clínicas, indicam que a doença pode ser causada por cepas do fungo com diferentes características [10-12].

A infecção ocorre pela inalação de propágulos fúngicos, seguido da regulação térmica que influencia a transição para a forma de levedo na fase parasitária [13] em hospedeiros susceptíveis, causando um foco primário infeccioso nos pulmões [3,14], com posterior disseminação linfática e/ou hematogena para diversos órgãos e tecidos como demonstrado experimentalmente em modelo animal [14].

Os eventos subsequentes à chegada do fungo nos pulmões dependem de variáveis, (I) intrínsecas ao fungo, como virulência; (II) meio ambiente no qual vive o hospedeiro, o que condiciona a frequência da exposição e volume de inóculo; (III) específicas ao hospedeiro, associadas à sua capacidade genética inata de resposta aos agentes infecciosos e, (IV) ao possível papel hormonal, presença de receptores para estrógenos na parede do fungo capazes de bloquear a transformação de micélio à fase leveduriforme infectante [15].

A interação agente-hospedeiro pode resultar em: 1) eliminação do agente, 2) complexo pulmonar primário com estabilização e permanência de foco quiescente com fungos viáveis, 3) complexo pulmonar primário com fase transitória de disseminação linfática e/ou hematogênica e estabelecimento de foco pulmonar e metastático quiescentes com fungos viáveis e 4) evolução para doença progressiva aguda [3, 4].

A grande maioria dos indivíduos que vivem em áreas endêmicas não desenvolve a doença.

### 1.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico padrão da PCM envolve a detecção de elementos fúngicos do Pb em exame a fresco de escarro ou outro espécime clínico (raspado de lesão, aspirado de linfonodos) e/ou fragmento de biópsia de órgãos supostamente acometidos submetidos ao exame microscópico direto ou em técnicas como Hematoxilina-Eosina (HE) e Grocott. A demonstração do fungo nos tecidos por microscopia, ou por identificação molecular (PCR) é considerado diagnóstico definitivo <sup>[16]</sup>.

A avaliação imunológica, se possível, deverá ser realizada em todas as variedades clínicas as quais poderão trazer informações acerca do prognóstico e da atividade da doença, pois ambos os tipos agudo e crônico apresentam recidivas após o tratamento <sup>[4]</sup>. Uma correlação positiva entre estado clínico e títulos sorológicos do paciente foi observada, ocorrendo diminuição dos títulos com a melhora do quadro <sup>[5]</sup>. Títulos de IgG estão relacionados à gravidade do quadro observado, sendo a IgG anti-gp43, considerada o melhor marcador para definição da forma clínica aguda ou crônica <sup>[16]</sup>. Pacientes diagnosticados positivo por biópsia da lesão, tiveram diagnóstico negativos na imunodifusão (ID). A baixa reatividade sorológica obtida pode ser devida à baixa imunidade encontrada nesses pacientes, e/ou a uma possível má qualidade do material utilizado para o teste diagnóstico <sup>[5]</sup>. A presença de imunoglobulinas assimétricas no paciente com pcm seria outra possibilidade do teste sorológico negativo, consequência da não precipitação destas <sup>[17]</sup>.

Durante os últimos anos, o teste de imunodifusão (ID) tem sido o teste de escolha para o diagnóstico inicial de pacientes com suspeita de PCM. O teste de ID tem elevada especificidade e sua sensibilidade pode variar de 65 a 100%, dependendo do tipo de antígeno utilizado <sup>[18]</sup>. Recursos adicionais para o sorodiagnóstico são encontrados apenas em centros de referência e/ou de pesquisa. O ensaio imunoenzimático (enzyme linked immuno-sorbent assay – ELISA) representa um método alternativo para o sorodiagnóstico da PCM, mais rápido e

mais apropriado para exame de grande número de amostras. É técnica mais sensível, porém sua especificidade é menor do que a da imunodifusão, exigindo cuidadosa padronização e interpretação dos resultados positivos [4]. Diferentes classes de imunoglobulinas podem ser determinadas pelo ELISA permitindo assim uma avaliação mais precisa da resposta imune humoral. Estes ensaios dão resultados confiáveis e reprodutíveis sendo extremamente sensíveis [18].

Os métodos imunológicos de diagnóstico como imunodifusão, ELISA e Western Blot são dependentes de antígenos específicos que variam na qualidade dependendo da fase morfológica, meio de cultura, tempo de inoculação e da técnica utilizada [19].

Glicoproteínas (gp) do fungo de 16 a 220 kDa foram identificadas como possíveis antígenos porém a gp de 43kDa (gp43) é o antígeno de eleição uma vez que é reconhecido pela maioria dos soros de pacientes com PCM [18]. A gp43 é o principal antígeno do fungo e também considerado um fator de virulência supostamente proteolítica para colágeno, elastina e caseína [20], com confirmada propriedade de adesão a laminina [21].

Quando são realizados testes com soro e antígeno padrão de mesma região há boa sensibilidade, quando cruzados soro e antígeno entre regiões, a sensibilidade é reduzida comparada ao antígeno padrão da área [22]. Este fato pode ser explicado frente à diminuição ou não produção a gp43 por alguns genótipos do patógeno [23].

#### 1.4 ANÁLISE PCR

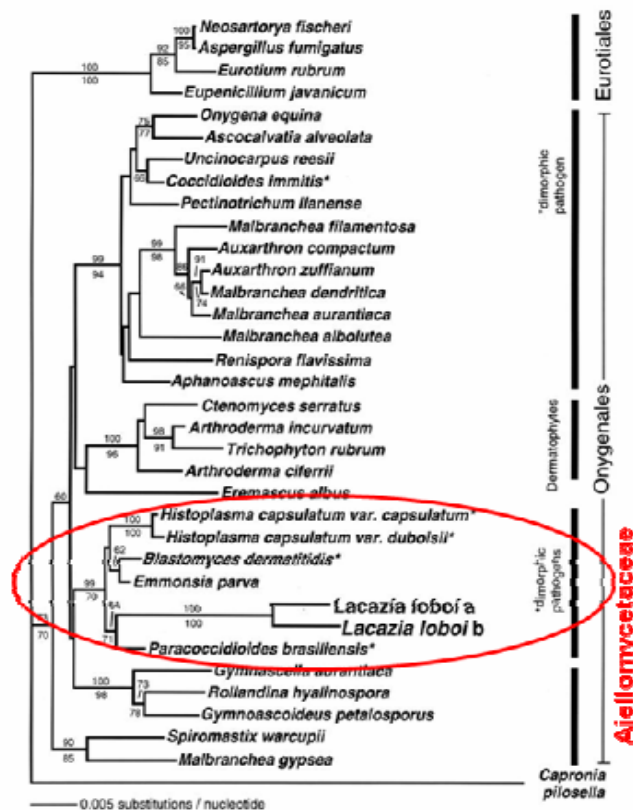
A análise molecular é uma ferramenta de grande importância no estudo de frequência, área de ocorrência e epidemiologia deste agente, uma vez que a cada ano, estas técnicas vão sendo aprimoradas e tornam-se cada vez mais sensíveis e específicas. A amplificação do DNA para diagnóstico apresenta vantagens como rapidez, sensibilidade e risco reduzido quando comparado a outras técnicas [24]. A PCR (*Polymerase Chain Reaction*) amplifica regiões alvo do DNA (codificada para glicoproteína, ITS-5.8S, 28S) pelo anelamento de iniciadores espécie-específicos [24-27]. O material amplificado na PCR (amplicon) pode ser também sequenciado para comparação e identificação das espécies. Para a identificação do Pb, a técnica mais indicada é a *Nested PCR* onde numa primeira

reação são definidas e amplificadas regiões menos específicas, comuns a praticamente todos os fungos e de maior tamanho e, em uma segunda reação, procede-se a amplificação de uma região menor, interna a primeira reação de amplificação, específica da espécie de interesse [26, 27]. A partir deste método foram identificados a presença de DNA do Pb em amostras de solo e de tecido animal [26-28].

Por *Nested PCR*, Arantes e cols. [29] coletaram de partículas suspensas no ar, na entrada de tocas de tatu conseguiram demonstrar a presença de estruturas fungicas em cinco das seis amostras.

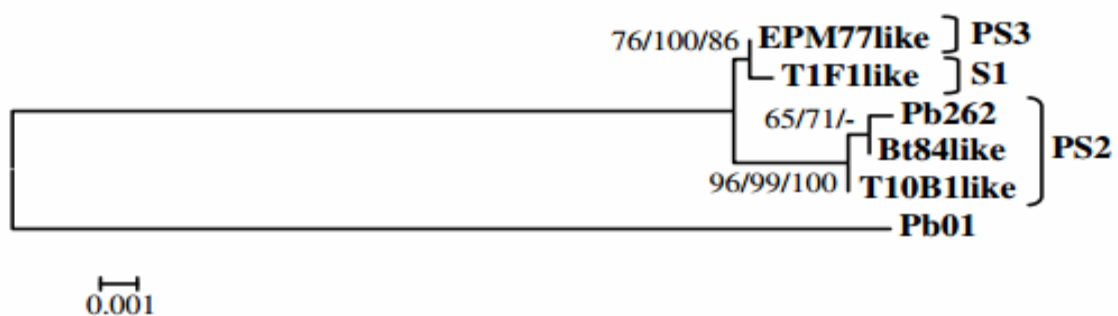
Com os avanços de técnicas moleculares, Pb foi realocado na família Onygenaceae (Onygenales Ordem, Ascomycota), no mesmo grupo de fungos como *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum* e *Lacazia loboi*. Recentemente, um novo clado na ordem Onygenales foi proposto como uma nova família denominada de Ajellomycetaceae (Figura 1) que constitui um grupo monofilético incluindo os gêneros anamorfos *Blastomyces*, *Emmonsia*, *Histoplasma*, *Lacazia* e *Paracoccidioides* [30-33].

**Figura 1** - Relações filogenéticas da Família Ajellomycetaceae [32].



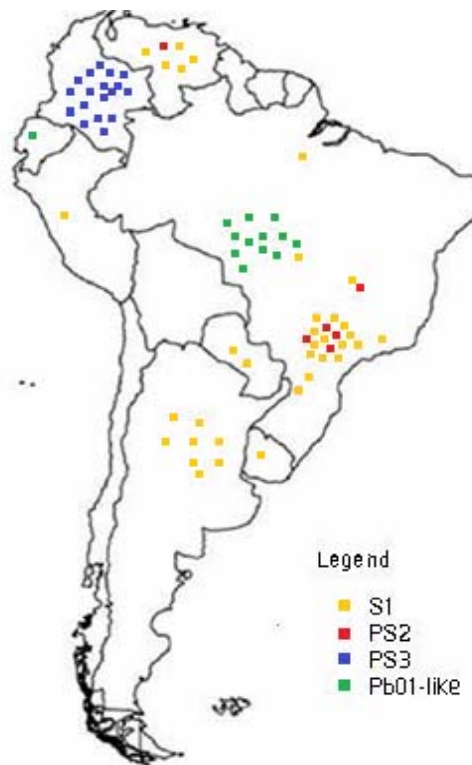
Novos conceitos relacionados à espécie são propostos em estudo filogenético, no qual foi constatado um complexo de espécies crípticas em *Pb*, que possuem divergências morfológicas imperceptíveis por identificação micológica clássica, mas que geneticamente apresentam divergências e estão reprodutivamente isoladas [34,35] demonstrando a existência de um grupo parafilético, denominado S1, e dois monofiléticos PS2 e PS3. Carrero e cols. [36] observaram que o isolado *Pb01* proveniente da Região Centro-oeste brasileira, não se agrupava com nenhuma das espécies crípticas descritas por Matute e cols. [34]. Utilizando então um maior número de isolados da Região Centro-oeste brasileira e um do Equador, Teixeira e cols. [37] determinaram que estes novos isolados não pertenciam ao grupo das espécies S1, PS2 e PS3, mas que constituíam uma nova espécie, denominada inicialmente como *Pb01-like* (Figura 2). Esta espécie é a mais divergente e atualmente descrita como uma nova espécie de Paracoccidioides, denominada de *P. lutzii*, em homenagem ao médico Adolfo Lutz.

**Figura 2** - Consenso árvore de máxima verossimilhança obtido a partir da análise de 500 repetições de bootstrap. Parcimônia e probabilidade proporções de bootstrap e probabilidades posterior Bayesiana (em%) são mostrados ao lado dos ramos, em a ordem MP / ML / BP [38].



A ocorrência destas espécies é restrita às áreas geográficas [33], sendo a S1 a de maior distribuição ocorrendo na Argentina, Brasil, Peru, Paraguai, Uruguai e Venezuela, a PS2 ocorre no Brasil e na Venezuela, a PS3 ocorre somente na Colômbia e o *P. lutzii* ocorre na Região Central do Brasil e no Equador (Figura 3). O mais recente isolado de *Pb* (TB16B1) de *Dasytus novemcinctus* após estudo filogenético, foi classificado como pertencente ao grupo S1 de espécies crípticas [29].

**Figura 3** - Distribuição geográfica dos diferentes grupos genéticos do complexo de espécies de *Paracoccidioides brasiliensis*. Espécies PS2: ocorrem no Brasil e na Venezuela; espécies PS3: na Colômbia; espécie S1: no Brasil, Argentina, Paraguai, Uruguai, Peru e Venezuela e Pb 01-Like ocorre na região Central do Brasil e no Equador <sup>[33]</sup>.



#### a. ISOLAMENTOS

O fungo Pb é de difícil isolamento a partir de amostras ambientais, o que torna o seu nicho ecológico desconhecido. Montenegro em 1996 <sup>[39]</sup> conseguiu apenas cinco isolamentos de termodimórfico de 887 amostras dos mais variados locais, indo de formigueiro a madeira em decomposição e isolou 581 espécies de *Aspergillus*. Outras 760 amostras de solo foram exaustivamente analisadas por Silva-Vergara <sup>[40]</sup> resultando em apenas um isolamento. O método de isolamento por semeadura direta em meio de cultura destes materiais resultara em intenso e rápido crescimento de fungos saprófitos, inviabilizando o isolamento do Pb que tem crescimento lento <sup>[41]</sup>.

O primeiro isolamento a partir de amostras ambientais foi realizado por Batista <sup>[42]</sup> em Recife-PE, Brasil a partir de amostras de solo de fazenda de gado,

porém sem confirmação e caracterização do isolado. Negroni <sup>[43]</sup> isolou Pb a partir de 12 amostras, por cultivo direto e indireto, de uma área rural, este isolado também não foi caracterizado micologicamente e não teve sua virulência testada em animais, não está disponível para estudos. Outros dois isolados foram obtidos por Albornoz <sup>[44]</sup> na Venezuela que estão depositados no banco de dados American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA (strains ATCC 24015, 24016, 24017).

Dentre os diversos métodos existentes, o método indireto (inoculação em animal) é capaz de eliminar fungos não patogênicos sendo o mais eficiente <sup>[3,41]</sup>. Arantes e cols. <sup>[29]</sup> usaram um método direto por extinção, no qual as amostras são diluídas em grandes volume são distribuídas em micro placas de cultivo celular de modo que um menor numero de esporos seja depositado no meio de cultura seletivo para formar uma colônia única <sup>[45]</sup>. Mesmo usando esta técnica, não houve sucesso no isolamento a partir de amostras de solo e de aerossóis onde já havia detectado a presença do Pb por meio de PCR.

Os tipos e texturas dos solos foram também estudados por Terçarioli e cols. <sup>[27]</sup> os quais concluíram que Pb tem bom crescimento, tanto em solos com texturas argilosa e/ou arenosa, em condições de grande umidade e pouco crescimento em condições de baixa umidade e é incapaz de crescer em alguns solos com elevados teores de alumínio trocável (H+ Al-). Ono e cols. <sup>[46]</sup> analisaram o efeito de agrotóxicos, fungicidas, herbicidas e inseticidas, em meios de cultura e solos experimentalmente infectados com Pb e sugeriram que tais produtos usados em larga escala em diversas culturas podem interferir nos isolamentos a partir de amostras de solo.

#### b. HOSPEDEIRO ANIMAL

A participação animal na história natural desta micose iniciou-se com os trabalhos de Pereira e Vianna em 1911 <sup>[47]</sup> quando inocularam pus de um paciente em várias espécies de animais (cão, gato, rato, coelho), observando em cães, sinais clínicos da PCM e óbito após 21 dias. A inoculação em animais é uma opção no método de diagnóstico, hamsters, camundongos, ratos e cobaias, foram usados nos isolamentos de amostras ambientais de solo e vísceras de tatu.

A técnica mais sensível para o isolamento do *P. brasiliensis* foi a inoculação de fragmentos de vísceras, homogeneizados e tratados com antibióticos diversos, na cavidade peritoneal e intratesticular de hamsters [3].

O hospedeiro animal oferece ao fungo a temperatura apropriada e constante para sobrevivência e reprodução. Um experimento realizado por Yarzabal [48] demonstrou que a temperatura ambiente tem significativa influência na doença experimental, que há diferenças térmicas em diferentes tecidos em um mesmo animal que leva a uma demora na distribuição das lesões. *Pb* prospera a 32°C, e cessa completamente o crescimento a 39°C. Estas observações explicariam as variações clínicas da PCM, com base nas diferentes temperaturas dos tecidos de um mesmo indivíduo, que podem favorecer ou não o desenvolvimento do fungo [48]. A temperatura mínima limitante para o crescimento do fungo encontra-se na mesma faixa de temperatura corpórea da maioria dos animais de 38,5 a 39,5°C (Tabela 1), e pode ser o primeiro fator que contribui para o limitado número de casos envolvendo *Pb* em hospedeiro animal .

**Tabela 1** - Temperatura corporal de algumas espécies animais

<b>Animal</b>	<b>Gênero espécie</b>	<b>Temp. °C</b>	<b>Referência</b>
Tatu galinha	<i>Dasypus novemcinctus</i>	30-36	[52]
Pinguim	<i>Pygoscelis adeliae</i>	39,5	[53]
Morcego frutívoro	<i>Artibeus literatus</i>	37,5	[54]
Bicho preguiça	<i>Choloepus didactylus</i>	24-33	[55]
Cachorro	<i>Canis familiaris</i>	38,5	[56]
Boi	<i>Bos taurus</i>	38,5	[56]
Cavalo	<i>Equus caballus</i>	38,5	[56]
Ovelha	<i>Ovis aires</i>	39,5	[56]
Gato	<i>Felis catus</i>	38,5	[56]
Rato	<i>Ratus norvegicus</i>	37,5	[56]
Coelho	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	39,5	[56]

Camundongo	<i>Mus musculus</i>	37,5	[56]
Cobaia	<i>Cavia porcelus</i>	39,5	[56]
Hamster	<i>Mesocricetus auratus</i>	39,0	[56]
Galinha	<i>Gallus domesticus</i>	39,5	[56]
Porco	<i>Sus scrofa</i>	39,0	[56]
Macaco	<i>Cebus spp.</i>	39,0	[56]

Animais com temperatura corpórea inferiores, como *D. novemcinctus* (33- 36°C), tiveram maior frequência na identificação da doença, e nos isolamentos [49]. Há também aspectos relacionados à fisiologia do *D. novemcinctus*, não observado em outras espécies de tatus e em animais com mesmo tipo de vida subterrânea, que indicam capacidade de sobreviver a altas taxas de CO<sub>2</sub>, com aumento da frequência respiratória e consequente hipotermia. Esses mecanismos de adaptação ao ambiente subterrâneo colocam o tatu em contato íntimo com o solo das tocas e com sua atmosfera de forma condicionada [50]. Outra espécie animal, o bicho preguiça (*Choloepus didactylus*) apresenta temperatura semelhante (24- 33°C) e desenvolve a doença em sua forma clínica fatal [51].

A maioria dos animais troca calor principalmente pelas vias aéreas, a principal via de infecção [28]. Os pulmões têm ambiente ideal para o crescimento, mesmo em animais em que a temperatura corpórea encontrada está na faixa limitante para o crescimento do fungo, este resiste por mecanismos adaptativos estabelecendo a infecção [57]. Conti-Diaz [58] postulou que animais domésticos, como bovinos, equinos e ovinos, assim como tatus poderiam se infectar durante sua alimentação em locais próximos às matas pela inalação de propágulos.

Em inquéritos soroepidemiológicos, muitos animais, como cães [59-62], equinos [63], bovinos [64] ovinos [65], aves [66] e caprinos [67] demonstraram que estas espécies sofrem a infecção naturalmente em seu ambiente.

O primeiro relato do isolamento do Pb em animal naturalmente infectado foi realizado por Grose e Tamsitt<sup>[68]</sup> que isolaram o Pb do trato intestinal de morcegos (*Artibeus literatus*) na Colômbia. O papel desta espécie de morcego na ecoepidemiologia do Pb foi questionada por outros autores que demonstraram a morte rápida do Pb em material fecal, e não conseguiram o isolamento a partir de morcegos<sup>[69]</sup>. A forma micelial do Pb encontrada no trato intestinal do morcego, sugeriu a ingestão do fungo a partir de superfície vegetal (fruto)<sup>[68]</sup>. Pb possui as principais atividades enzimáticas necessárias para a hidrólise de material vegetal<sup>[70]</sup> com preferência a material insolúvel, o que contribui com a hipótese que Pb cresce em substratos, hidrolisando carboidrato vegetal. Esta versatilidade é requerida desde que existe grande diversidade de substrato animal, vegetal e fontes fúngicas na natureza.

O isolamento de maior impacto no estudo da PCM ocorreu de forma acidental quando Naiff e cols.<sup>[71]</sup>, ao pesquisar hospedeiros para *Leishmania* no Estado do Pará, isolaram pela primeira vez Pb em tatus (*Dasybus novemcinctus*) e observaram reação inflamatória em meio à estruturas parasitárias microscópicas em órgãos como fígado e baço. Desde então, outros autores conseguiram também isolar o fungo desta espécie em outras áreas observando também a forma granulomatosa da doença nestes animais<sup>[72-77]</sup>. Recentemente Arantes e cols.<sup>[29]</sup> isolaram o fungo de um *D. novemcinctus* a partir de fragmentos de tecidos. O isolado de tatu *Cabassous centralis*, em Caldas – Colômbia indica que outras espécies de tatus, além do *D. novemcinctus*, também podem ter uma relação com o patógeno<sup>[78]</sup>. Há na literatura autores que consideram o tatu como hospedeiro acidental assim como o ser humano<sup>[79]</sup>. A definição para reservatório animal *seria um organismo vivo capaz de abrigar um agente etiológico sem manifestação da doença, e exibir a capacidade da transmissão para outros hospedeiros de forma direta ou indireta*. Até o momento, este não é o caso do *D. novemcinctus* e Pb, estes animais e o humano podem ser considerados como sentinelas para o fungo<sup>[58]</sup>.

Recentes estudos obtiveram identificação molecular positiva da presença do fungo em amostras de solo próxima a toca de tatus e em aerossóis coletados na entrada das tocas<sup>[29]</sup>, o que aponta este animal como reservatório natural do Pb. A presença de fase parasitária associada a hospedeiros vertebrados associada a uma fase saprofítica ambiental em solos, faz parte da ecologia dos membros da família Ajellomycetaceae a qual pertence o Pb<sup>[80]</sup>.

A possibilidade da infecção ocorrer em ambiente diferente do solo proposta por Grose e Tramsit <sup>[68]</sup> ao relatar a infecção pelo Pb em morcegos frutívoros é reforçada com os relatos da infecção entre outros animais de hábitos não terrestres. Um bicho preguiça *Choloepus didactylus* <sup>[51]</sup>, e um macaco (*Saimiri sciureus*) <sup>[81]</sup> tiveram diagnóstico positivo do Pb como causa da morte. Macacos (*Cebus sp.* e *Allouatta Caraya*) apresentaram 44,1% e 60%, respectivamente de soropositividade no teste de ELISA e 2.9 % dos *A. caraya* no teste de imunodifusão, sugerindo que a PCM natural possa estar ocorrendo nestas espécies que vivem em áreas endêmicas <sup>[82]</sup>.

Os animais domésticos próximos ao humano, como o cão e o gato, também são descritos como hospedeiros do fungo naturalmente infectados que desenvolveu a doença em sua forma clínica. O primeiro relato aconteceu em um cão com quadro de linfadenomegalia cervical causada pelo fungo <sup>[83]</sup> e lesões granulomatosas características com múltiplos fungos. Outro cão com linfadenomegalia popliteal e hepatoesplenomegalia apresentou lesões características, porém sem anormalidades observadas ao exame radiográfico <sup>[84]</sup>. Ambos diagnósticos confirmados foram por imunohistoquímica e amplificação do DNA.

A infecção pelo Pb em um gato relatada no Chile, com quadro encefálico e renal crônico, e recidivas ao tratamento <sup>[85]</sup>. Os relatos da PCM animal foram, em sua maioria, casos da doença aguda (sem alteração radiográfica, linfadenomegalia, disseminação sistêmica). Apenas no caso do gato a doença pode ser considerada crônica, pois foi tratada e investigada por anos antes do óbito do animal.

O animal sentinela é definido como o animal que é usado num método de investigação, onde o mesmo é exposto ou observado em um ambiente, para coleta de informações de forma regular e sistemática para análise e identificação de riscos à saúde de outros animais ou do homem. Pode ser observado em seu habitat natural (método observacional) ou colocado em um ambiente (método experimental ou *in situ*) no qual há suspeita da contaminação <sup>[86]</sup>. Animais têm sido usados como sentinela na apresentação de agentes etiológicos de doença infecciosa e contaminantes ambientais no ar, solo, água e alimento. Podem sofrer a doença como resultado da exposição e fornecem informações com antecedência dos riscos envolvidos. Os mais utilizados são cães e gatos <sup>[87]</sup> devido à proximidade

do convívio, porém outras espécies como coelho, gerbil, hamster e aves em cativeiro também podem ser usadas. Uma atenção especial tem sido dada aos animais sentinelas de riscos biológicos relacionados a doenças infecciosas emergentes ou relacionadas ao bioterrorismo <sup>[88]</sup>. Smith e cols. <sup>[89]</sup> considerou o cão como sentinela para a prevalência da doença de Lyme no Reino Unido. Outras espécies como suínos, patos e equinos foram observados como sentinelas para a encefalite Japonesa, submetidos à sorologia (ELISA) que revelou a presença de anticorpos contra o vírus da encefalite japonesa, vírus do Oeste do Nilo circulantes entre suínos no Nepal <sup>[90]</sup>. Aragão e cols. <sup>[91]</sup>, utilizaram cães e gatos como sentinelas na soroprevalência da *Yersinia pestis* no Estado do Ceará e roedores como animais indicadores. A principal indicação deste tipo de pesquisa consiste na detecção de anticorpos contra o agente em estudo, uma vez que muitas das doenças são assintomáticas nos animais <sup>[92]</sup>.

A utilização de animais sentinela pode contribuir para a melhor compreensão da ecologia do fungo *P. brasiliensis*, bem como para o esclarecimento do seu habitat.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Avaliar a utilização de coelhos e suínos como animais sentinelas da paracoccidiodomicose.

### 2.2 ESPECÍFICOS

Avaliar resposta imune após a infecção por *P. brasiliensis* em coelhos e suínos por ELISA e imunodifusão.

Avaliar a infecção por *P. brasiliensis* em coelhos e suínos através de análise histopatológica.

Avaliar a infecção por *P. brasiliensis* em coelhos e suínos por *Nested* PCR.

Avaliar a infecção por *P. brasiliensis* em coelhos e suínos por isolamento do fungo.

## REFERENCIAS

1. Lutz A. Uma mycose pseudo-coccidica localizada na boca e observada no Brasil: contribuição ao conhecimento da hypho-blastomycoses americanas. *Bras Med.* 1908, 22: 141-144.
2. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: na up-date. *Clin Microbiol Em* 1993; 6(2): 89–117.
3. Marques SA. Paracoccidioidomycosis: Epidemiological, Clinical and Treatment up-date. *An Bras Dermatol* 2003; 78(2): 135-150..
4. Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho Fde Q, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. [Guidelines in paracoccidioidomycosis] *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39(3):297-310.
5. Anastacio VM, Passeto MPA, Gógora DVN, Soares MMCN Almeida MTG. Paracoccidioidomycosis : Correlation between clinical and laboratorial findings in São José do Rio Preto region. *Arq Ciênc Saúde* 2007; 14(3):181-5.
6. Santo AH. Tendência da mortalidade relacionada à paracoccidioidomicose, Estado de São Paulo, Brasil, 1985 a 2005: estudo usando causas múltiplas de morte. *Em Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health* 2008; 23(5): 313-324.
7. Bártholo RM, Florião RA, Oliveira L de A, Moraes MGP. Um caso fácil: um diagnóstico rápido. *Bol Pneumol Sanit* 2000; 8(2):27-37.
8. Splendore, A. Blastomycoses Americanas. *Rev Bras Med* 1910; 24:153-7.
9. Almeida, FP. Estudos comparativos do granuloma coccidióico nos Estados Unidos e no Brasil. Novo gênero para o parasito brasileiro. *Em Fac Med Univ São Paulo.* 1930; 5: 125-41.
10. Macoris EM, Sugizaki MF, Peraçoli MT, Bosco SM, Hebelers-Barbosa F, Simões LB, Theodoro RC, Trinca LA, Bagagli E. Virulence attenuation and phenotypic variation of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates obtained from armadillos and patients. *Mem Ins tOswaldo Cruz.* 2006; 101(3):331-4.
11. Costa PF, Fernandes GF, Santos PO, Amaral CC, Camargo ZP. Characteristics of Environmental *Paracoccidioides brasiliensis* Isolates. *Mycopathologia.* 2010; 169(3):37–46.
12. Borba CM, Vinhas EA, Lopes-Bezerra LM, Lucena-Silva N. Morphological, biochemical and molecular approaches for comparing typical and atypical *Paracoccidioides brasiliensis* strains. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2005; 88(3-4): 257–66.
13. San-Blas G, Niño-Vega G, Iturriaga T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol.* 2002; 40(3):225–42.

14. Mackinnon JA. Pathogenesis of South American Blastomycosis. *Trans of the Roy Soci of Trop Med and Hyg.* 1959; 53:487-494.
15. Marques SA. Paracoccidioidomycosis and sporotrichosis associated with immunosuppression. *Med Cutan Iber Lat Am* 2009; 37(4):159-170.
16. Blotta MH, Camargo ZP. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol.* 1993; 31(3):671-6.
17. Itano EN. Problems with asymmetric antibodies in paracoccidioidomycosis diagnosis. *Proceedings of the VII Encontro Internacional sobre paracoccidioidomycose* 1999; 42.
18. Camargo Z P. Serology of paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia.* 2008; 165(4):289–302.
19. Restrepo, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis* a puzzle still unsolved. *Sabouraudia: J Med Vet Mycol* 1985; 23:323-34.
20. Mendes-Giannini, MJS, Monteiro da silva JL, Fatinma da Silva J, Donofrio FC, Miranda ET, Andreotti PF, Soares CP. Antibody response to 43Kda glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* as a marker for the evaluation of patients under treatment. *Am J Trop Med & Hyg.* 1990; 43(2): 200-6.
21. Vicentini AP, Gesztesi J, Franco MF, de Souza W, de Moraes JZ, Travassos LR, Lopes JD. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to Laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infect Immun* 1994; 62:1465-9.
22. Batista Jr, Camargo ZP, Fernandes GF, Vicentini AP, Fontes CJF, Hahn RC. Is the geographical origin of a *Paracoccidioides brasiliensis* isolate important for antigen production for regional diagnosis of paracoccidioidomycosis? *Mycoses.* 2010; 53, 176-80.
23. Takayama A, Itano EN, Sano A, Ono MA, Kamei K. An atypical *Paracoccidioides brasiliensis* clinical isolate based on multiple gene analysis. *Med Mycol.* 2010; 48: 64-72.
24. Bialek R, Ibricevic A, Aepinus C, Najvar LK, Fothergill AW, Knobloc J Graybill JR. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue samples by a Nested PCR Assay. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(8):2940–42.
25. Motoyama AB, Venancio EJ, Brandão GO, Petrofeza-Silva S, Pereira IS, Soares CMA, Felipe MS. Molecular identification of *Paracoccidioides brasiliensis* by PCR amplification of ribosomal DNA. *Journ Clin Microbiol.* 2000; 38(8): 3106-9.
26. Theodoro RC, Candeias GJM, Araujo JP, Bosco SMG, Macoris SAG, Padula-Junior LO, Franco M, Bagagli E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. *Med Mycol.* 2005; 43(8): 725-9.

27. Terçarioli GR, Bagagli E, Reis GM, Reis GM, Theodoro RC, Bosco SMG, Macoris SAG, Richini-Pereira VB. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* In soil: growth ability, conidia production and molecular detection. BMC Microbiology (on line). 2007; 7:92.
28. Richini-Pereira VB, Bosco S de M, Griese J, Theodoro RC, Macoris SA, da Silva RJ, Barrozo L, Tavares PM, Zancopé-Oliveira RM, Bagagli E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. Med Mycol. 2008; 46(1):35-40.
29. Arantes TD, Theodoro RC, Macoris SAG, Bagagli E. Detection of *Paracoccidioides sp.* In environmental aerosol samples. Dissertação – UNESP-Botucatu 2012 (on line, acessado 20.02.2013): [www2.ibb.unesp.br/posgrad/teses/bga\\_me\\_2012\\_thales\\_arantes.pdf](http://www2.ibb.unesp.br/posgrad/teses/bga_me_2012_thales_arantes.pdf).
30. Bagagli E, Theodoro RC, Bosco SMG, McEwen JG. *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. Mycopathologia 2008; 165:197–207.
31. Puccia R, McEwen JG, Cisalpino PS. Diversity in *Paracoccidioides brasiliensis*. The *PbGp43* gene as a genetic marker. Mycopathologia 2008; 165:275-87.
32. Richini-Pereira VB. Ecologia Molecular de fungos patogênicos Onygenales em animais silvestres do interior do Estado de São Paulo. Tese-UNESP-Botucatu 2012 (on line): [epo://www2.ibb.unesp.br/posgrad/teses/bga\\_do\\_2009\\_virginia\\_pereira.pdf](http://epo://www2.ibb.unesp.br/posgrad/teses/bga_do_2009_virginia_pereira.pdf). acessado 21.06.2011.
33. Richini-Pereira VB, Bosco SMG, Theodoro RC, Macoris SAG, Bagagli E. Molecular approaches for eco-epidemiological studies of *Paracoccidioides brasiliensis*. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 104(4): 363-643.
34. Matute RD, McEwen JG, Puccia R, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, Rausher JT, Restrepo A, Morais F, Niño-Veiga G, Taylor JW. Cryptic speciation and recombination in the fungus *P. brasiliensis* as revealed by gene genealogies. Mol Biol Evol. 2006; 23(1): 65-73.
35. Marini MM, Zanforlin T, Santos PC, Barros RRM, Guerra ACP, Pucci R, Felipe MSS, Brígido M, Soares CMA, Ruiz JC, Silveira JF, Cisalpini EM. Identification and characterization of Tc1/mariner-like DNA transposons in genomes of the pathogenic fungi of the *Paracoccidioides* species complex. BMC Genomics 2010; 11:130.
36. Carrero LL, Niño-Vega G, Teixeira MM, Carvalho MJA, Soares CMA, Pereira M, Jesuino RSA, MacEwen JG, Mendoza L, Taylor JW, Felipe MS, San-Blas G. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. Fungal Genet Biol 2008; 45: 605-612.
37. Teixeira MM, Theodoro RC, Carvalho MJA, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, Mendoza L, Bagagli E, San-Blas G, Felipe MS. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. Mol Phyl and Evol 2009; 52:273-83.

38. Theodoro RC, Bagagli E, Oliveira C. Phylogenetic analysis of PRP8 intein in *Paracoccidioides brasiliensis* species complex. *Fungal genetics and Biol* 2008; 45:1284-1291.
39. Montenegro MR, Myiaji M, Franco M, Nishimura K, Coelho KI, Horie Y, Mendes RP, Sano A, Fukushima K, Fecchio D. Isolation of fungi from nature in the region of Botucatu, State of São Paulo, Brazil, an endemic area of paracoccidioidomycosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996; 91(6): 665–670.
40. Silva-Vergara ML. Contribuição ao estudo epidemiológico da paracoccidioidomicose: estudo em área de cultura de café. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1997; 30(1): 83-86.
41. Franco M, Bagagli E, Scapolio S, da Silva Lacaz C. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. *Med Mycol*. 2000; 38(3):185-91.
42. Batista AC, Shome SK, Santos FM. Pathogenicity of *Paracoccidioides brasiliensis* isolated from soil. *Inst Micol*. 1962; 372:1–27.
43. Negroni P. Aislamento *Paracoccidioides brasiliensis* em muestra de tierra Chaco Argentino. *Bol Acad Nac Med*. 1967; 45: 513–516.
44. Albornoz MB. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. *Sabouraudia* 1971; 9: 248–253.
45. Collado J, Platas G, Paulus B, Bills GF. High-throughput culturing of fungi from plant litter by a dilution-to-extinction technique. *FEMS Microbiol Ecol*. 2007; 60:521-33.
46. Ono MA, Itano EN, Mizuno EH, Camargo Z. P. Inhibition of *Paracoccidioides brasiliensis* by pesticides: Is this a partial explanation for the difficulty in isolating this fungus from the soil? *Medical Mycology*. 2002; 40: 493-499.
47. Pereira M, Vianna G. A propósito de um caso de blastomicose (Pyohemia blastomycotica). *Arq Bras Med*. 1911; 1:63-83.
48. Yarzabal LA. Pathogenesis of paracoccidioidomycosis in man, in *Paracoccidioidomycosis: Proceedings of the first Pan American Symposium*. 1971; 261-270.
49. Richini-Pereira VB, Bosco SMG, Theodoro RC, Barrozo L, Pedrini SCB, Rosa PS, Bagagli E. Importance of xenarthrans in eco-epidemiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *BMC research notes*. 2009; 2: 228.
50. Kay, F.R. Ventilatory and metabolic responses of an armadillo (*Dasypus novemcinctus*) to elevated carbon dioxide concentrations. *American Midland Naturalist*. 1979;102: 178-181. Acesso: <http://www.jstor.org/stable/10.2307/2425081>
51. Trejo-Chavez A, Ramírez-Romero R, Ancer-Rodríguez J, Nevárez-Garza AM, Rodríguez-Tovar LE. Disseminated Paracoccidioidomycosis in a Southern Two-Toed sloth (*Choloepus didactylus*). *J Comp Pathol* 2011; 144(2-3):231-4.

52. Animal Diversity Web University of Michigan MUSEUM OF ZOOLOGY (on line) [animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/Dasyopus\\_novemcinctus/](http://animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/Dasyopus_novemcinctus/)
53. Ropert-coudert Y, Baudat J, Kurita M, Bost CA, Kato A, Maho Le Y, Naito Y. Validation of oesophagus temperature recording for detection of prey ingestion on captive Adeliae penguins (*Pygoscelis adeliae*). *Marine Biology* 2000; 137: 1105-1110.
54. AnAge The Animal Ageing and Longevity Data base. Acesso (20.01.2013): [http://genomics.senescence.info/species/entry.php?species=Artibeus\\_literatus](http://genomics.senescence.info/species/entry.php?species=Artibeus_literatus)
55. Bristol Zoo Gardens. Acesso (20.01.2013): [www.bristolzoo.org.uk/two-toed-slot](http://www.bristolzoo.org.uk/two-toed-slot).
56. CCAC Canadian Council on Animal Care: guide to the care and use of experimental animals v1, 1984.
57. Camargo ZP, Franco MF. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev Iberoam Micol* 2000; 17(2): 41-48.
58. Conti Díaz IA. Point of view: On the unknown ecological niche of *Paracoccidioides brasiliensis*. Our hypothesis of 1989: Present status and perspectives. *Rev Inst Med Trop* 2007; 49:131-134.
59. Mós EM, Fava Netto C, Saliba AM, Brito T. Contribuição ao estudo da paracoccidioidomicose. II. Infecção experimental do cão. *Em Inst Med Trop São Paulo* 1974; 16: 232-237.
60. Ono MA, Bracarense AP, Morais HS, Trapp SM, Belitardo DR, Camargo ZP. Canine paracoccidioidomycosis: a seroepidemiologic study. *Med Mycol* 2001; 39(3):277-82.
61. Fontana FF, dos Santos CT, Esteves FM, Rocha A, Fernandes GF, do Amaral CC, Domingues MA, De Camargo ZP, Silva-Vergara ML. Seroepidemiological survey of paracoccidioidomycosis infection among urban and rural dogs from Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Mycopathologia*. 2010; 169(3):159-65.
62. Silveira LH, Domingos IH, Kouchi K, Itano EM, Silva EA, Landgraf VO, Werneck SM, Camargo ZP, Ono MA. Serological detection of antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* in dogs with leishmaniasis. *Mycopathologia*. 2006; 62(5):325-9.
63. Corte AC, Itano EM, Freire RL, Camargo ZP, Ono MA. Detection of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in horses from northern Region of Paraná State. *Semina: Ciências Agrárias*. 2009; 30(2): 441-446.
64. Silveira LH, Paes RC, Medeiros EV, Itano EM, Camargo ZP, Ono MA. Occurrence of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in dairy cattle from Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mycopathologia*. 2008; 165(6):367-71.

65. Oliveira GG, Navarro IT, Freire RL, Belitardo DR, Silveira LH, Camargo ZP, Itano EM, Ono MA. Serological survey of *Paracoccidioidomycosis* in sheep. *Mycopathologia*. 2012; 173(1):63-8.
66. Oliveira GG, Silveira LH, Itano EM, Soares RM, Freire RL, Watanabe MA, Camargo ZP, Ono MA. Serological evidence of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in chickens from Paraná and Mato Grosso do Sul States, Brazil. *Mycopathologia*. 2011; 171(3):197-202.
67. Ferreira JB, Navarro IT, Freire RL, Oliveira GG, Omori AM, BelitardoDR, Itano EM, Camargo ZP, Ono MA. Evaluation of *Paracoccidioides brasiliensis* Infection in Dairy Goats. *Mycopathologia*. 2013; in press
68. Grose E, Tamsitt JR. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia, S.A. *Sabouraudia*, 1965; 4(2): 124-5.
69. Neves SL, Petroni TF, Fedatto PF, Ono MA. Paracoccidiomycosis in wild and domestic animals. *Semina: Ciências Agrárias*. 2006; 27(3): 481-488.
70. Benoliel, B, Arraes FBM, Reis VCB, Siqueira SJL, Parachin NS, Torres, FAG. Hydrolytic enzymes in *Paracoccidioides brasiliensis* – ecological aspects. *Genetics and Molecular Research*. 2005; 4(2):450-61.
71. Naiff RD, Ferreira LC, Barrett TV, Naiff MF, Arias JR. Enzootic paracoccidioidomycosis in armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in the State of Pará. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1986; 28(1):19-27.
72. Bagagli E, Sano A, Coelho KI, Alquati S, Miyaji M, Camargo ZP, Gomes GM, Franco M, Montenegro MR. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an area of paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 58(4): 505–12.
73. Bagagli E, Franco M, Bosco Sde M, Hebelier-Barbosa F, Trinca LA, Montenegro MR. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. *Med Mycol* 2003; 41(3): 217-23.
74. Corredor GG, Castaño JH, Peralta LA, Díez S, Arango M, McEwen J, Restrepo A. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. *Rev Iberoam Micol*. 1999; 16(4):216-20.
75. Macedo RCL. Infecção natural de tatus por *Paracoccidioides brasiliensis* na Serra da Mesa, Goiás: Estudo preliminar. CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 2, 1999, Rio de Janeiro. Anais... Rio de Janeiro, 1999; 192.
76. Restrepo A, McEwen JG, Castañeda E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol*. 2001; 39(3): 233-41
77. Silva-vergara ML, Martinez R, Camargo ZP, Malta MH, Maffei CM, Chadu JB. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus*

- novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. *Med Mycol.* 2000; 38(3):193-9.
78. Corredor GG, Peralta LA, Castaño JH, Zuluaga JS, Henao B, Arango M, Tabares AM, Matute DR, McEwen JG, Restrepo A. The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. *Med Mycol* 2005; 43(3): 275-80.
  79. Palmeiro M, Cherubini K, Yurgel LS. Paracoccidioidomycosis – Literature Review. *Scientia Medica, PUCRS* 2005; 15(4): 274-278.
  80. Untereiner WA; Scott JA; Naveau FA; Sigler L; Bachewich J, Angus A. The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales. *Mycologia* 2004; 96: 812-21
  81. Johnson WD, Lang CM. Paracoccidioidomycosis (South American Blastomycosis) in a Squirrel Monkey (*Saimiri sciureus*). *Vet Pathol* 1977; 14: 368-71.
  82. Corte AC, Svoboda WK, Navarro IT, Freire RL, Malanski LS, Shiozawa MM, Ludwig G, Aguiar LM, Passos FC, Maron A, Camargo ZP, Itano EN, Ono MA. Paracoccidioidomycosis in wild monkeys from Paraná State, Brazil. *Mycopathologia* 2007; 164(5):225-8.
  83. Ricci G, Mota FT, Wakamatsu A, Serafim RC, Borra RC, Franco M. Canine paracoccidioidomycosis. *Med Mycol.* 2004; 42(4): 379-83.
  84. Farias MR, Condas LA, Ribeiro MG, Bosco S de M, Muro MD, Werner J, Theodoro RC, Bagagli E, Marques EM, Franco M. Paracoccidioidomycosis in a dog: case report of generalized lymphadenomegaly. *Mycopathologia.* 2011; 172(2):147-52.
  85. Gonzalez JF, Montiel NA, Maass RL. Case Report: First report on the diagnosis and treatment of encephalic and urinary paracoccidioidomycosis in a cat. *J Feline Med Surg.* 2010; 12(8) 659-62.
  86. National Research Council, Committee on Animals as Monitors of Environmental Hazards, Board on Environmental Studies and Toxicology, Commission on Life Sciences. *Animals as Sentinels of Environmental Health Hazards. Cap 2. Concepts and Definitions.* National Academy Press 1991; p33. (on line : <http://www.nap.edu/catalog/1351.html> acessado em 21.11.2012)
  87. Backer LC, Grindem CB, Corbett WT, Cullins L, Hunter JL. Pet dogs as sentinels for environmental contamination. *Science of the Total Environment.* 2001; 274 (1-3): 161-169.
  88. López-Alonso M. Pets as Sentinel of Human Exposure. *Encyclopedia of Environmental Health* 2011 454–461. (online) acesso em 25.11.2012. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444522726005936>
  89. Smith FD, Ballantyne R, Morgan ER, Wall R. Estimating Lyme disease risk using pet dogs as sentinels. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2012; 35(2): 163-7.

90. Pant GR, Lunt RA, Rootes CL, Daniels PW. Serological evidence for encephalitis and West Nile viruses in domestic animals of Nepal. *Comp Immunol Microbiol and Infect Dis* 2006; 29(2-3): 166-75.
91. Aragão AI, Seoane AC, Leal TC, Leal NC, Almeida AM. Surveillance of plague in the State of Ceará: 1990-1999. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002; 35(2):143-8.
92. Brinherhoff RJ, Collinge SK, Bai Y, Ray C. Are Carnivores Universally Good Sentinels of Plague? *Vector Borne and Zoonotic Dis* 2009; 9(5): 491-497.

### 3 ARTIGO I

#### **PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS INFECTION IN DOMESTIC RABBITS (ORYCTOLAGUS CUNICULUS)**

Donizeti Rodrigues Belitardo<sup>a</sup>, Atilio Sersun Calefi<sup>a</sup>, Mônica Raquel Sbeghen<sup>a</sup>,  
Gabriela Gonçalves de Oliveira<sup>a</sup>, Maria Angelica Ehara Watanabe<sup>a</sup>, Zoilo Pires de  
Camargo<sup>b</sup>, Mario Augusto Ono<sup>a\*</sup>

#### 3.1 SUMMARY

The objective of the present study was to evaluate the infection of domestic rabbits by *Paracoccidioides brasiliensis*. Initially two rabbits were experimentally infected with *P. brasiliensis* and the humoral immune response was evaluated by ELISA using gp43 as antigen. The two animals showed IgG response against gp43 although no signs of disease were observed. The seroepidemiological study was carried out in 170 rabbits (free range n= 81 and caged n= 89) living in an endemic area for human paracoccidioidomycosis and a positivity of 27% was observed in the ELISA. The free range rabbits showed a significantly higher positivity (34.6 to 51.7%) than caged animals (11.1%). Sentinel rabbits exposed to natural infection with *P. brasiliensis* were followed for six month and a seroconversion rate of 83.3% was observed. This is the first report of paracoccidioidomycosis in rabbits and suggest that this species can be useful sentinel for *P. brasiliensis* presence in the environment.

**Key words:** Epidemiology. Paracoccidioidomycosis. Infection. Systemic mycosis. Rabbit.

#### 3.2 INTRODUCTION

Although paracoccidioidomycosis (PCM) is the most prevalent systemic human mycosis in the Latin America <sup>[1]</sup>, the ecological niche of the etiologic agent, the thermodimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* remains unknown <sup>[2]</sup>. The fungus grows in yeast form at 37°C *in vitro* or in the host tissues, and in mycelial format 25°C <sup>[3]</sup>. The infection is probably acquired through by inhaling

---

<sup>a</sup> Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

<sup>b</sup> Disciplina de Biologia Celular, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>a\*</sup> Corresponding author: M.A. Ono. Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas. 86057-970. Campus Universitário, Londrina – Paraná. Fax: 55 43 3371 4267. e-mail: [marioono@uel.br](mailto:marioono@uel.br)

airborne fungus propagules, present in the environment, causing a primary focus in the lungs<sup>[4-6]</sup>.

The disease is diagnosed by detection or isolation of the agent in tissues and secretions and by immunological techniques<sup>[7]</sup>. The serological tests based often on the gp43 antigen are used to diagnose and follow-up patients<sup>[8]</sup>.

The infection of domestic and wild animals by *P. brasiliensis* occurs frequently as reported in several epidemiological studies with dogs<sup>[9-12]</sup>, horses<sup>[13]</sup>, cattle<sup>[14]</sup>, sheep<sup>[15]</sup>, chickens<sup>[16]</sup>, goats<sup>[17]</sup> coati-mundi, felines, monkeys<sup>[18,19]</sup> and armadillos<sup>[20]</sup>, although natural disease was reported only in two dogs<sup>[21, 22]</sup>, a cat<sup>[23]</sup> and a Southern two-toed sloth<sup>[24]</sup>.

The first study of experimental paracoccidioidomycosis in domestic animals was reported by Pereira and Vianna<sup>[25]</sup>. The authors inoculated different animal species such as dogs, cats, goats, rabbits, rats, marmosets and pigeons, with pus from a patient that died of paracoccidioidomycosis, except the pigeons, developed the disease. The susceptibility of dogs to PCM was also reported in a study of experimental infection of puppies with *P. brasiliensis*<sup>[26]</sup>.

The fungus was isolated several times only from armadillos in Brazil<sup>[27-29]</sup> and Colombia<sup>[30]</sup> and sporadically from bats and dogs<sup>[22,31]</sup>. The studies in endemic areas suggest that the fungus lives in soil as a saprobe and this is the primary source of infection for humans and other animal species<sup>[32]</sup>.

Domestic and wild animals may be used as sentinels to investigate the circulation of a specific pathogen in an area to evaluate environmental health hazards. Recently, dogs were used to estimate Lyme disease risk in the United Kingdom<sup>[33]</sup>. Serological tests were used to evaluate plague bacteria in rodents, dogs and cats in Brazil<sup>[34]</sup> and dogs were used as sentinel of toxoplasmosis to monitor public health actions for the control of this zoonosis<sup>[35]</sup>.

The objective of the present study was to evaluate the natural infection of domestic rabbits by *P. brasiliensis* in an endemic area for paracoccidioidomycosis.

### 3.3 MATERIALS AND METHODS

#### 3.3.1 Area of Study

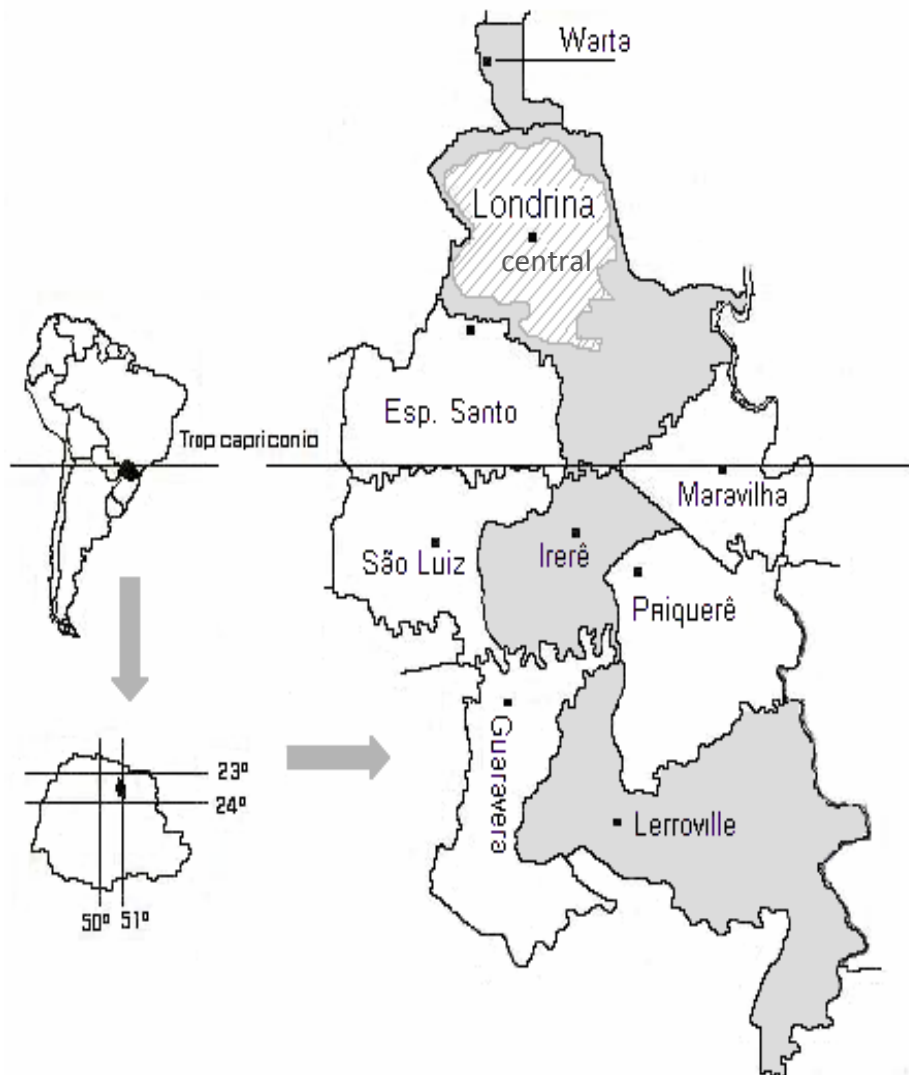
Londrina municipality, Northern Parana State, Southern Brazil is located between Latitudes 23°08'47" and 23°55'46" South and between longitudes 50°52'23" and 51°19'11". The highest point of the municipality has an altitude of 820 to 844 m. The average temperature of the warmest month is usually higher than 25.5 ° C and the coldest month, less than 16.4°C. Londrina, located on a ridge, has hot summers and mild winters; with rates of relative humidity around 76% in summer and 72% in winter, and the average relative humidity of the year situated around 69%. The average annual rainfall is 1566 mm, and in January, July and December, the rainiest months and in June, August and September the driest months.

The seroepidemiologic study was carried out in four Districts of Londrina municipality (Figure 4). Districts of Irerê (latitude 23° 30'01" S, longitude 51°07'02" W, altitude 566 m), Central District (latitude 23° 20'56 S, longitude, 51 ° 4' 36" W altitude 543 m), Districts of Lerroville (latitude 23° 41 '03" S, longitude, 51° 05'24" altitude 810 m), Districts of Warta (latitude 23° 11'50" S, longitude 51° 12'04" W, altitude 621 m).

#### 3.3.2 Animals

One hundred seventy rabbits (81 free range and 89 caged) were used from the four districts.

**Figure 4** - Map showing the Districts of Warta, Londrina Central, Irerê, and Lerroville in the municipality of Londrina, Parana, Brazil.



### 3.3.3 *P. brasiliensis* Antigens

The exoantigen was obtained from culture of *P. brasiliensis* as described by Camargo et al. [36] and gp43 was purified by immunoaffinity chromatography as described by Puccia and Travassos [37].

### 3.3.4 Experimental Infection of Rabbits with *P. brasiliensis*

Two male white new zeland rabbits with 2.0kg body weight maintained in individual cages with water and commercial feed *ad libitum* were inoculated in the ear marginal vein with *P. brasiliensis* B-339 strain ( $1 \times 10^6$  yeast cells

in 100 µl sterile saline). These rabbits were observed weekly and blood samples were collected for eight weeks.

### 3.3.5 Seroepidemiological Study

Blood samples for the seroepidemiological study were collected from the marginal ear vein of domestic free range (n=81) and caged rabbits (n=89) in the rural areas of the municipality of Londrina (Warta, Londrina Central district, Irerê, Lerroville). The samples were stored at -20°C until analysis.

### 3.3.6 Use of Rabbits as Sentinel Animals

Twelve rabbits seronegatives in the seroepidemiologic study, (6 free-range and 6 caged) were monitored (antibody against gp43) monthly in its habitat. Group I consisted of six free-range crossbred rabbits, one male and five females (Irerê District). Group II consisted of six male crossbred rabbits, housed in individual cages without direct contact with the soil(Warta District). All animals were fed *ad libitum* with crops and commercial feed. At the end of six months they were slaughtered and tissue samples of lung, liver, spleen and lymphonodes were collected for histopathological examination and PCR analysis.

### 3.3.7 Indirect ELISA with gp43 as Antigen

The serum samples collected were analyzed by indirect ELISA using gp43 as antigen. Polystyrene microtiter plates (Costar Corporation, Corning, NY, USA) were coated with gp43 (250 ng/well). After washing with PBS-T (PBS with 0.05% Tween20) the wells were blocked with 5% skim milk in PBS for 1 hour. After washing with PBS-T, serum samples diluted 1:100 in PBS 1% skim milk were incubated for 1 hour. The plates were washed with PBS-T and anti-rabbit IgG-peroxidase conjugate (Sigma, St Louis, MO, USA) was added followed by incubation for 1 hour. After washing with PBS-T, 100 µl chromogen/substrate solution (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TMB) was added. The reaction was stopped with 4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the

absorbance at 450 nm was analyzed in a Microplate Reader (Bio Rad, Hercules, CA, USA). All samples were analyzed twice. Positive and negative controls were a serum sample from a rabbit immunized with *P. brasiliensis* and a pool of sera from young rabbits, respectively. Serum samples with two-fold or more the absorbance of the negative control were considered positive.

### 3.3.8 Immunodiffusion Test

The immunodiffusion test was performed as described previously by Camargo et al. <sup>[36]</sup> using *P. brasiliensis* exoantigen as reagent.

### 3.3.9 Detection of *P. brasiliensis* in Sentinel Rabbit Tissue Samples

The tissue samples of all the sentinel animals (lung, spleen, liver and lymph nodes) were divided into three portions. One portion was cultured in Mycosel and Sabouraud Dextrose Agar and incubated at 35°C for eight weeks and the other two portions were submitted to histopathological examination (hematoxylin-eosin and Grocott stain) and Nested PCR analysis according to Richini-Pereira et al. <sup>[38]</sup>.

## 3.4 DATA ANALYSIS

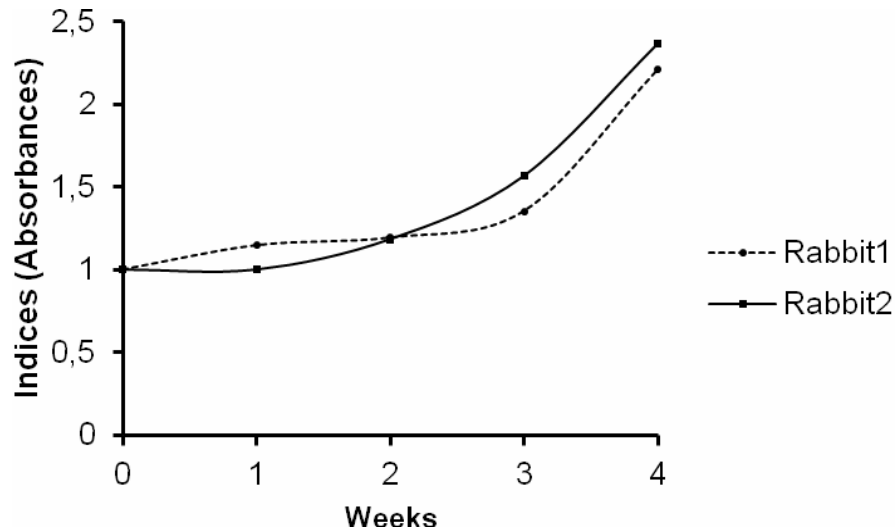
The statistical analysis was performed with the program, BioStat 2009 Professional Package Analyst Soft and data were analyzed by the Pearson chi-square test and Tukey test. The values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

## 3.5 RESULTS

### 3.5.1 Humoral Immune Response of Rabbits Experimentally Infected with *P. brasiliensis*

The two rabbits experimentally infected with *P. brasiliensis* produced IgG antibodies to gp43 (Figure. 5) although no signs of disease were observed in these animals and no lesions were detected in the lungs, liver and spleen.

**Figure 5** - Humoral immune response (IgG) against gp43 evaluated by ELISA in two rabbits experimentally infected with *P. brasiliensis*. (indices were obtained by dividing the observed absorbances by the initial absorbance for each rabbit.)



### 3.5.2 Seroepidemiology of Paracoccidioidomycosis in Rabbits

This study showed that natural infection with *P. brasiliensis* in the rabbits occurred in the four regions studied. The ELISA using gp43 as antigen showed an overall positivity rate of 27.1% (n=170) and no significant difference between genders was observed (Table 2). A significantly higher positivity in ELISA was observed in free range (34.6 to 51.7) than in caged animals (11.1%) (Table 2). No reactivity was observed in the immunodiffusion test .

**Table 2** - Reactivity to *P. brasiliensis* gp43 antigen evaluated by indirect ELISA in 170 serum samples of rabbits from four Districts of Londrina municipality, Paraná State.

Regions	ELISA		Total n (%)
	Positive n (%)	Negative n (%)	
<b>Free-range</b>			
Lerroville	9 (34.6)	17 (65.4)	26 (100)
Londrina	13 (38.2)	21 (61.7)	34 (100)
Irerê	15 (51.7)	14 (48.3)	29 (100)
<b>Caged</b>			
Warta	9 (11.1)*	72 (88.9)	81 (100)
<b>Total</b>	<b>46 (27.1)</b>	<b>124 (72.9)</b>	<b>170 (100)</b>

\*p value 0,0002

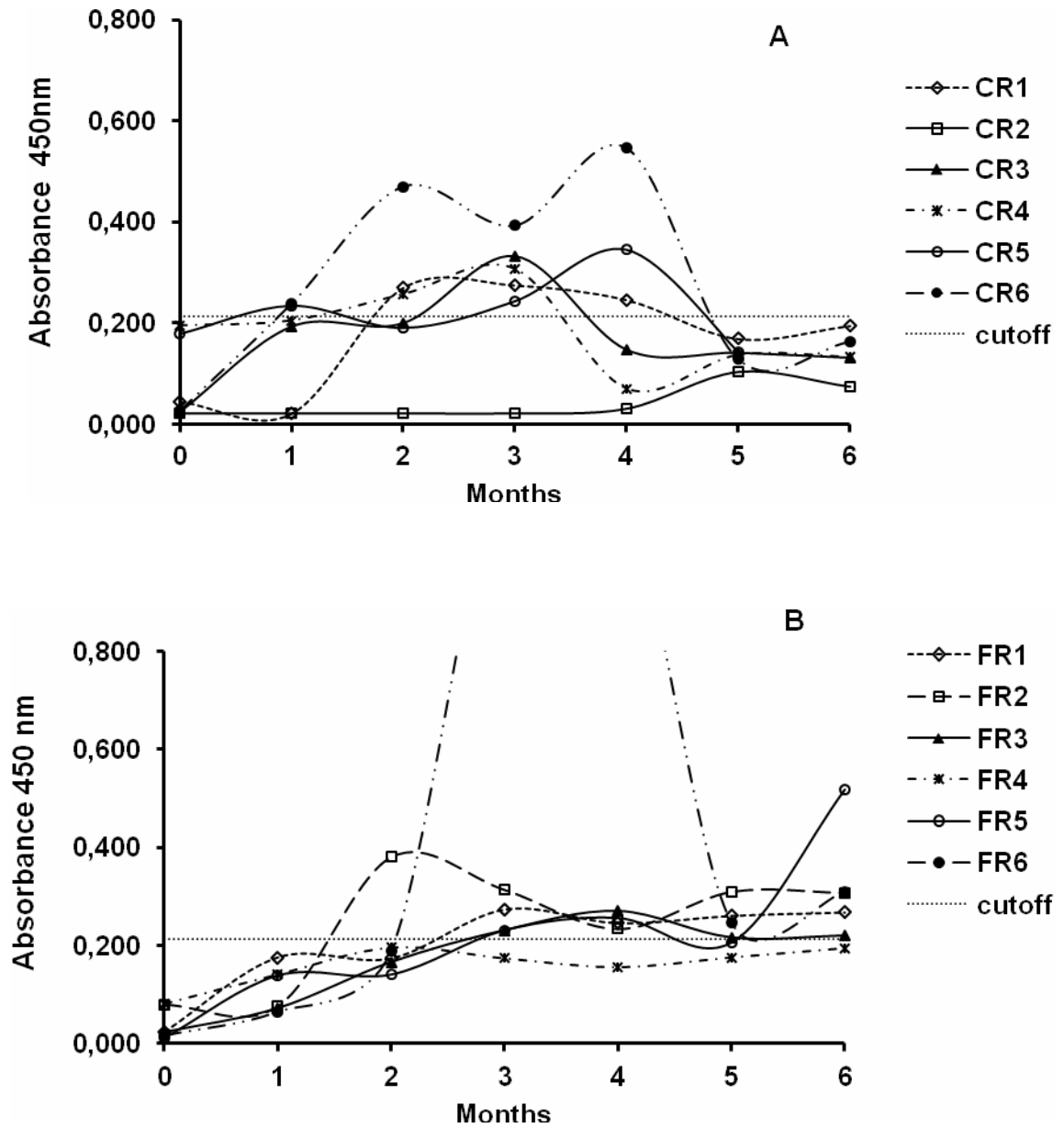
### 3.5.3 Seroconversion of Sentinel Rabbits

A seroconversion total rate of 83.3% was observed in caged animals and free-living rabbits followed for six months to natural infection with *P. brasiliensis* (Figure. 6).

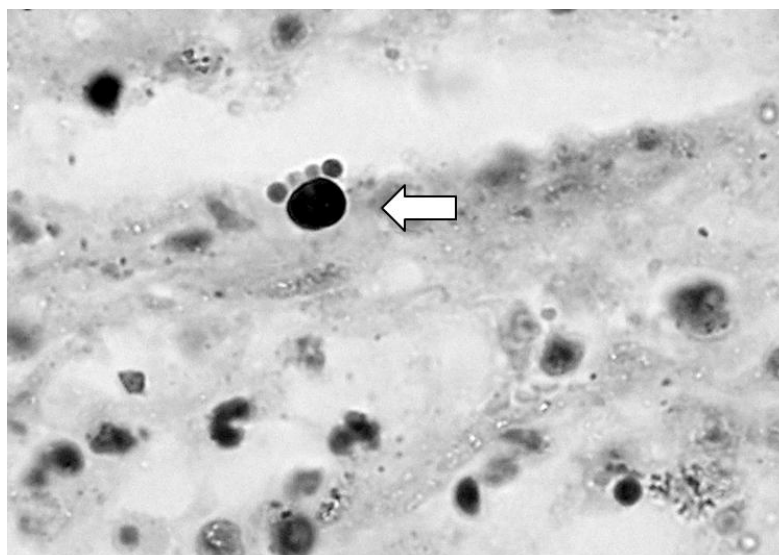
### 3.5.4 Histopathological Examination and PCR Analysis

One spleen sample from a sentinel free range rabbit showed characteristic multiple budding *P. brasiliensis* yeast cell in histopathological examination (Figure 7) and the same sample was positive in the Nested PCR.

**Figure 6** - Humoral immune response (IgG) against gp43 evaluated by ELISA in sentinel caged rabbits (A) and free range rabbits (B) exposed to natural infection with *P. brasiliensis*.



**Figure 7** - Spleen from a sentinel free range rabbit with a characteristic *P. brasiliensis* multiple budding yeast cell (arrow) stained with Grocott (100x).



#### 3.5.5 *P. brasiliensis* Isolation from Rabbit Tissue Samples

It was not possible to isolate *P. brasiliensis* from tissue samples (lungs, liver and spleen) of the all sentinel rabbits (n=12).

### 3.6 DISCUSSION

The rabbits experimentally infected with *P. brasiliensis* produced antibodies against gp43, suggesting that this antigen can be useful for epidemiological studies of paracoccidioidomycosis in this species. Other domestic animals such as dogs, cows, sheep, chickens, and goats [9, 13-16] also showed humoral immune response against gp43 antigen after immunization with *P. brasiliensis* cells.

In the seroepidemiological study the free range rabbits showed a higher positivity to *P. brasiliensis* than caged animals reinforcing that contact with soil is an important risk factor for infection as reported in a study of paracoccidioidomycosis in sheep, chickens and goats [15-17].

The rabbits used as sentinels for paracoccidioidomycosis showed that infection occurs frequently in endemic areas and reinforces that domestic animals can be useful epidemiological markers. The sentinel rabbits were infected by

*P. brasiliensis* in a short period of time, suggesting that contact with the fungus occurs frequently in the environment. The infection by *P. brasiliensis* was confirmed in one sentinel rabbit by histopathological examination and PCR analysis. The failure in isolate *P. brasiliensis* from experimentally infected rabbits and seropositive sentinel rabbits suggests that the animals presented only paracoccidioidomycosis infection and probably are resistant to disease development. On the other hand, the detection of *P. brasiliensis* in the spleen from a sentinel rabbit confirms the infection and it cannot be ruled out that disease would occur in a longer observation time.

It was reported that experimental infection of dogs with *P. brasiliensis* showed that adult animals were resistant and puppies were susceptible to paracoccidioidomycosis development [26, 39]. In a study of experimental infection of rabbits with *P. brasiliensis*, Pereira and Vianna [25] reported that the animals developed paracoccidioidomycosis. This disagreement is probably due to differences in virulence of *P. brasiliensis* isolates, and genetic background of animals.

### 3.7 CONCLUSION

This study reports for the first time infection of rabbits by *P. brasiliensis* and the use of this animal species as sentinels for paracoccidioidomycosis.

### 3.8 ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the CNPq, CAPES and the Araucaria Foundation for financial support and the CNPq for the productivity fellowship granted to MA Ono, MAE Watanabe and ZP Camargo.

### 3.9 CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflict of interest.

## REFERENCES

1. Camargo ZP. Serology of paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*. 2008; 165(4): 289-302
2. Restrepo A, McEwen JG, Castañeda E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol*. 2001; 39(3): 233-41.
3. Brummer E, Castañeda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev*. 1993; 6(2): 89-117.
4. McEwen JG, Bedoya V, Patiño MM, Salazar ME, Restrepo A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. *J Med Vet Mycol*. 1987; 5:165-75.
5. Franco M, Peracoli MT, Soares A, Montenegro R, Mendes RP, Meira DA. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr Top Med Mycol*. 1993; 5:115-49.
6. Camargo ZP, Franco MF. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev Iberoam Micol*. 2000, 17(2): 41-48.
7. Marques SA. Paracoccidioidomycosis: Epidemiological, Clinical and Treatment update. *An Bras Dermatol*. 2003, 78(2):135-150.
8. Blotta MH, Camargo ZP. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol*. 1993; 31(3):671-6.
9. Ono MA, Bracarense AP, Morais HS, Trapp SM, Belitardo DR, Camargo ZP. Canine paracoccidioidomycosis: a seroepidemiologic study. *Med Mycol*. 2001;39(3):277-82.
10. Silveira LH, Domingos IH, Kouchi K, Itano EM, Silva EA, Landgraf VO, Werneck SM, Camargo ZP, Ono MA. Serological detection of antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* in dogs with leishmaniasis. *Mycopathologia*. 2006; 62 (5):325-9.
11. Fontana FF, dos Santos CT, Esteves FM, Rocha A, Fernandes GF, do Amaral CC, Domingues MA, De Camargo ZP, Silva-Vergara ML. Seroepidemiological survey of paracoccidioidomycosis infection among urban and rural dogs from Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Mycopathologia*. 2010;169(3):159-65.
12. Corte AC, Gennari SM, Labruna MB, Camargo LMA, Itano EM, Freire RL, Camargo ZP, Ono MA. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in dogs from Western Brazilian Amazon. *Pesq Vet Bras*. 2012; 32(7):649-652.
13. Corte AC, Itano EM, Freire RL, Camargo ZP, Ono MA. Detection of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in horses from northern Region of Paraná State. *Semina: Ciências Agrárias*. 2009; 30(2): 441-446.

14. Silveira LH, Paes RC, Medeiros EV, Itano EM, Camargo ZP, Ono MA. Occurrence of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in dairy cattle from Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mycopathologia*. 2008; 165(6):367-71.
15. Oliveira GG, Navarro IT, Freire RL, Belitardo DR, Silveira LH, Camargo ZP, Itano EM, Ono MA. Serological survey of Paracoccidioidomycosis in sheep. *Mycopathologia*. 2012; 173(1):63-8.
16. Oliveira GG, Silveira LH, Itano EM, Soares RM, Freire RL, Watanabe MA, Camargo ZP, Ono MA. Serological evidence of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in chickens from Paraná and MatoGrosso do Sul States, Brazil. *Mycopathologia*. 2011; 171(3): 197-202.
17. Ferreira JB, Navarro IT, Freire RL, Oliveira GG, Omori AM, BelitardoDR, Itano EM, Camargo ZP, Ono MA. Evaluation of *Paracoccidioides brasiliensis* Infection in Dairy Goats. *Mycopathologia*. 2013; in press.
18. Costa EO, Diniz LS, Netto CF, Arruda C, Dagli ML. Delayed hypersensitivity test with paracoccidioidin in captive Latin American wild mammals. *J Med Vet Mycol*. 1995; 33(1):39-42.
19. Corte AC, Svoboda WK, Navarro IT, Freire RL, Malanski LS, Shiozawa MM, Ludwig G, Aguiar LM, Passos FC, Maron A, Camargo ZP, Itano EN, Ono MA. Paracoccidioidomycosis in wild monkeys from Paraná State, Brazil. *Mycopathologia*. 2007; 164(5):225-8.
20. Fernandes GF, Deps P, Tomimori-Yamashita J, Camargo ZP. IgM and IgG antibody response to *Paracoccidioides brasiliensis* in naturally infected wild armadillos (*Dasypus novemcinctus*). *Med Mycol*. 2004; 42(4): 363-8.
21. Ricci G, Mota FT, Wakamatsu A, Serafim RC, Borra RC, Franco M. Canine paracoccidioidomycosis. *Med Mycol*. 2004; 42(4): 379-83.
22. Farias MR, Condas LA, Ribeiro MG, Bosco S de M, Muro MD, Werner J, Theodoro RC, Bagagli E, Marques EM, Franco M. Paracoccidioidomycosis in a dog: case report of generalized lymphadenomegaly. *Mycopathologia*. 2011; 172(2): 147-52.
23. Gonzalez JF, Montiel NA, Maass RL. Case Report: First report on the diagnosis and treatment of encephalic and urinary paracoccidioidomycosis in a cat. *J Feline Med Surg*. 2010; 12(8) 659-62.
24. Trejo-Chávez A, Ramírez-Romero R, Ancer-Rodríguez J, Nevárez-Garza AM, Rodríguez-Tovar LE. Disseminated paracoccidioidomycosis in a Southern two-toed sloth (*Choloepus didactylus*). *J Comp Pathol*. 2011;144(2-3):231-4.
25. Pereira M, Vianna G. A propósito de um caso de blastomicose (*Pyohemia blastomycotica*). *Arq Bras Med*. 1911; 1:63-83.
26. Ono MA, Kishima MO, Itano EM, Bracarense AP, Camargo ZP. Experimental paracoccidioidomycosis in dogs. *Med Mycol*. 2003; 41(3): 265-8.

27. Naiff RD, Ferreira LC, Barrett TV, Naiff MF, Arias JR. Enzootic paracoccidioidomycosis in armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in the State of Pará. *Em Inst Med Trop Em Paulo*. 1986; 28(1):19-27.
28. Bagagli E, Sano A, Coelho KI, Alquati S, Miyaji M, de Camargo ZP, Gomes GM, Franco M, Montenegro MR. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg*. 1998; 58(4): 505-12.
29. Silva-Vergara ML, Martinez R, Camargo ZP, Malta MH, Maffei CM, Chadu JB. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. *Med Mycol*. 2000; 38(3):193-9.
30. Corredor GG, Castaño JH, Peralta LA, Díez S, Arango M, McEwen J, Restrepo A. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. *Rev Iberoam Micol*. 1999; 16(4):216-20.
32. Franco M, Bagagli E, Scapolio S, da Silva Lacaz C. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. *Med Mycol*. 2000; 38(3):185-91.
33. Smith FD, Ballantyne R, Morgan ER, Wall R. Estimating Lyme disease risk using pet dogs as sentinels. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2012; 35(2): 163-7.
34. Aragao AI, Seoane AC, Leal TC, Leal NC, Almeida AM. Surveillance of plague in the State of Ceará: 1990-1999. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002; 35(2):143-8.
35. Ullmann LS, Guimarães FF, Fornazari F, Tomé RO, Camossi LG, Greca H, Silva RC, Menozzi BD, Langoni H. Continued vigilance actions, dogs role as sentinel animal to toxoplasmosis. *Em Bras Parasitol Vet*. 2008, 17: 345-347.
36. Camargo ZP, Unterkircher C, Campoy SP, Travassos LR. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. *J Clin Microbiol*. 1988; 26(10):2147-51
37. Puccia R, Travassos LR. The 43-kDa glycoprotein from the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* and its deglycosylated form: excretion and susceptibility to proteolysis. *Arch Biochem Biophys*. 1991; 289(2):298-302.
38. Richini-Pereira VB, Bosco S de M, Griese J, Theodoro RC, Macoris SA, daSilva RJ, Barrozo L, Tavares PM, Zancopé-Oliveira RM, Bagagli E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. *Med Mycol*. 2008;46(1):35-40.
39. Eisele RC, Juliani LC, Belitardo DR, Itano EM, Estevão D, Bracarense AP, Camargo ZP, Ono MA. Immune response in dogs experimentally infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol*. 2004; 42(6):549-53.

## 4 ARTIGO II

### DETECTION OF ANTIBODIES AGAINST *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS* IN FREE RANGE DOMESTIC PIGS (*SUS SCROFA*)

Donizeti Rodrigues Belitardo<sup>a</sup>, Atilio Sersun Calefi<sup>a</sup>, Isabele Kazahaya Borges<sup>a</sup>,  
Gabriela Gonçalves de Oliveira<sup>a</sup>, Mônica Raquel Sbeghen<sup>a</sup>, Eiko Nakagawa Itano<sup>a</sup>,  
Zoilo Pires de Camargo<sup>b</sup>, Mario Augusto Ono<sup>a\*</sup>

#### 4.1 SUMMARY

Paracoccidioidomycosis, caused by the thermodimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*, is the most prevalent human systemic mycosis in Latin America. Paracoccidioidomycosis affects mainly male rural workers, causing granulomatous lesions in organs such as lungs, liver and spleen. The participation of other animal species in the fungus epidemiology is not well understood. The objective of this study was to evaluate the infection of free range domestic pigs by *P. brasiliensis*. The serum samples of 106 pigs were analyzed by ELISA and immunodiffusion test using gp43 and exoantigen respectively. The overall positivity to gp43 in ELISA was 37.7%, although no reactivity was observed in the immunodiffusion test as well as *P. brasiliensis* was not detected in tissue samples (spleen, lung, liver and lymph nodes) from slaughtered animals submitted to culture, histopathological examination and PCR analysis. Five pigs seronegative to gp43 were exposed to natural infection by *P. brasiliensis* and all animals seroconverted three months after exposition. The results suggest that free range pigs are frequently infected with *P. brasiliensis* but are resistant to disease development. This is the first report of paracoccidioidomycosis in pigs.

**key words:** *Paracoccidioides brasiliensis*. Swine. Epidemiology. Susceptibility. Diagnosis.

---

<sup>a</sup> Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

<sup>b</sup> Disciplina de Biologia Celular, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>a\*</sup> Corresponding author: M.A. Ono. Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas. 86057-970. Campus Universitário, Londrina – Paraná. Fax: 55 43 3371 4267. e-mail: [marioono@uel.br](mailto:marioono@uel.br)

## 4.2 INTRODUCTION

Paracoccidioidomycosis is a systemic mycosis described for the first time in 1908 in Brazil <sup>[1]</sup>. The disease is endemic in most Latin American countries and affects mainly rural workers.

The etiologic agent is the thermodimorphic fungus, *Paracoccidioides brasiliensis* <sup>[2]</sup> and the infection occurs by inhalation of fungus propagules and lungs are primarily affected followed by dissemination to other tissues such as liver, spleen, lymph nodes and skin <sup>[3,4]</sup>. Paracoccidioidomycosis can be classified as paracoccidioidomycosis-infection, that occurs in asymptomatic individuals with positive reaction to *P. brasiliensis* antigens or paracoccidioidomycosis-disease, when lesions occurs in one or more organs <sup>[4, 5]</sup>.

Despite the advances in the biology and diagnosis of paracoccidioidomycosis the fungus habitat remains unknown. The isolation of *P. brasiliensis* from soil samples and armadillos that live in close contact with soil suggests that the fungus lives as a saprobe in soil such as other pathogenic fungi <sup>[6-14]</sup>.

Infection by *P. brasiliensis* have been reported in epidemiological studies with domestic and wild animals such as dogs <sup>[15-19]</sup>, cat <sup>[20]</sup>, cattle <sup>[21]</sup>, horses <sup>[22]</sup>, chickens <sup>[23]</sup>, sheep <sup>[24]</sup>, goats <sup>[26]</sup>, monkey <sup>[27]</sup> and sloth <sup>[29]</sup>. Reproducible isolations of the fungus were obtained until now only from armadillos in Brazil and Colombia, reinforcing that close contact with soil is an important risk factor for infection <sup>[7-14]</sup>.

Taking into account that free range pigs live in close contact with soil. The objective of this study was to evaluate their infection by *P. brasiliensis* in an endemic area for human paracoccidioidomycosis.

## 4.3 MATERIALS AND METHODS

### 4.3.1 Area of Study

The study was carried out in farms located in the municipalities of Londrina (latitude 23° 51' 10" S, longitude 51° 14' 35" W, altitude 551 m) and Cambé (latitude 23° 16' 33" S, longitude 51° 16' 42", altitude 650 m), Northern Paraná State.

The average temperature of the warmest month is usually higher than 25.5 °C and the coldest month, less than 16.4°C and the average relative humidity of the year is 69%. The average annual rainfall is 1566 mm, and January, July and December are the rainiest months and June, August and September are the driest months.

#### 4.3.2 Animals

The blood samples were collected from 106 free range pigs (55 males and 51 females, 2-6 months of age, crossbred) from five farms in municipalities of Londrina and Cambé. After slaughtering, tissue samples were collected (liver, spleen, lymph nodes and lungs) and divided into three portions. One portion was cultured in Mycosel and Sabouraud Dextrose Agar and incubated at 35°C for eight weeks and the other two portions were submitted to histopathological examination (hematoxylin-eosin and Grocott staining) and Nested PCR analysis as previously described by Richini-Pereira et al. <sup>[25]</sup>.

#### 4.3.3 Use of Pigs as Sentinel Animals of Paracoccidioidomycosis

Five pigs (1 male, 4 females, crossbred), fed *ad libitum* with corn and seronegative were followed for four months to evaluate seroconversion in the ELISA using gp43 as antigen. At the end of four months the animals were slaughtered and tissue samples of lung, liver, spleen and lymph nodes were collected for histopathological examination and PCR analysis.

#### 4.3.4 *P. brasiliensis* Exoantigen and Gp43

The exoantigen was obtained from culture of *P. brasiliensis*B-339 as previously described <sup>[30]</sup> and gp43 antigen was purified from exoantigen by affinity chromatography as described by Puccia and Travassos <sup>[31]</sup>. The concentration of protein was determined by Bradford method <sup>[32]</sup>.

#### 4.3.5 ELISA with gp43

The serum samples were analyzed by indirect ELISA using gp43 as antigen. Microtiter plates of polystyrene (Costar Corporation, Corning, NY, USA) were coated with 100  $\mu$ l gp43 (250 ng/well) and after washing with PBS-T (PBS with 0.05% Tween20) the wells were blocked with 5% skim milk in PBS for 1 hour. After washing with PBS-T, pig serum samples diluted 1:100 in PBS 1% skin milk were incubated for 1 hour. The plates were washed with PBS-T, and anti-pig IgG-peroxidase conjugate (Sigma, St Louis, MO, USA) was added followed by incubation for 1 hour. After washing with PBS-T chromogen/substrate solution ( $H_2O_2$ /TMB) was added. The reaction was stopped with 4 N  $H_2SO_4$  and the absorbance at 450 nm was analyzed in a Microplate Reader (Bio Rad, Hercules, CA, USA). All samples were analyzed twice. Positive and negative controls were a serum sample from a pig immunized with *P. brasiliensis* and a pool of sera from young pigs, respectively. Serum samples with two-fold or more the absorbance of the negative control were considered positive.

#### 4.3.6 Immunodiffusion Test

The immunodiffusion test was performed according to Camargo et al.<sup>[33]</sup> using *P. brasiliensis* exoantigen as reagent.

#### 4.3.7 Statistical Analysis

The statistical analysis was performed with the program, BioStat 2009 Professional Package Analyst Soft. Data were analyzed by the Pearson chi-square test and Tukey test. The values of  $P < 0.05$  were considered statistically significant.

## 4.4 RESULTS

### 4.4.1 Seroepidemiological Study

The analysis of serum samples from 106 free range pigs by ELISA using gp43 as antigen showed a positivity of 37.7% and no significant difference was observed between males (30.2%) and females (32.0%). No reactivity was observed in the immunodiffusion test (Table 3). The reactivity of pigs to *P. brasiliensis* from one of the farms (69.6%) was significantly higher than the two other farms (13 and 28%) (Table 3).

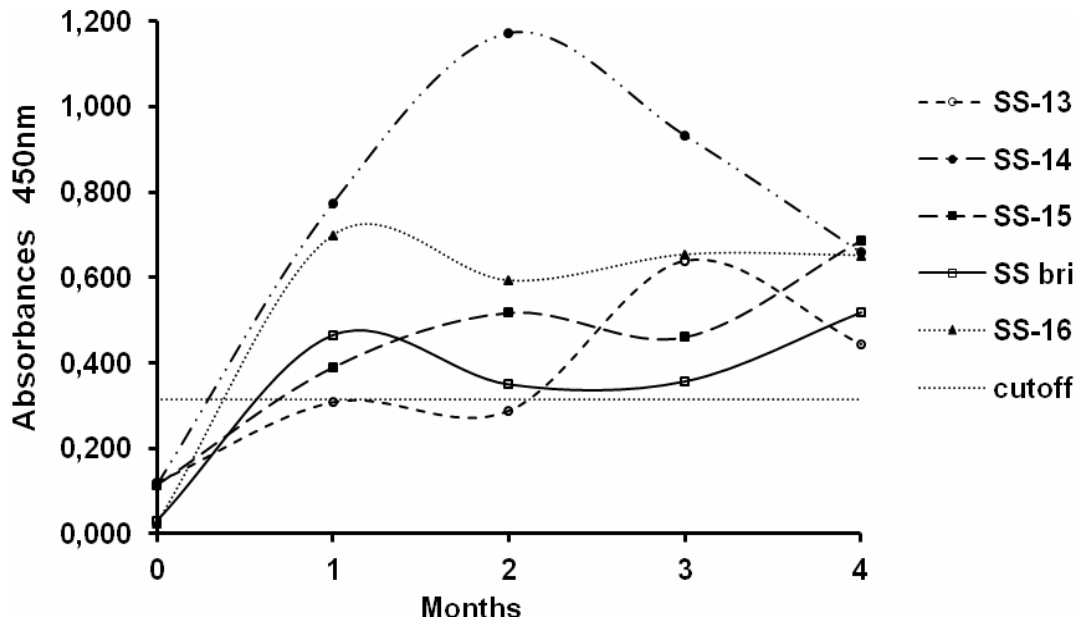
### 4.4.2 Culture, Histopathological and PCR Analysis of Tissue Samples

The fungus *P. brasiliensis* was not detected in samples of spleen, lungs, liver, lymphonodes from slaughtered pigs (n=40) by culture, histopathological and PCR analysis.

### 4.4.3 Use of Pigs as Sentinel Animals of Paracoccidioidomycosis

A seroconversion of 80% was observed in pigs in the first month after exposition to natural infection with *P. brasiliensis* and all animals were positive to gp43 in the third month (Figure 8).

**Figure 8** - Levels of IgG anti-gp43 evaluated by ELISA in serum samples from sentinel pigs exposed to natural infection with *P. brasiliensis*.



**Table 3** - Reactivity of 106 serum samples from free range pigs to *P. brasiliensis* evaluated by ELISA (gp43) and immunodiffusion (exoantigen) according to sex and farms.

Sex	ELISA	
	Positive n (%)	Negative n (%)
Male	23 (21.7)	32 (30.2)
Female	17 (16.0)	34 (32.0)
<b>Farms</b>		
A (Londrina)	23 (69.7)*	10 (30.3)
B (Cambé)	14 (28.0)	36(72.0)
C (Irerê District)	3 (13.0)	20 (87.0)
<b>Total</b>	<b>40 (37.7)</b>	<b>66 (62.3)</b>

\*P= 0,001

#### 4.5 DISCUSSION

The ELISA with gp43, due to high sensitivity, has been used in the immunodiagnostic of paracoccidioidomycosis in humans [33] and also in seroepidemiological studies to evaluate *P. brasiliensis* infection in domestic [21-24] and wild animals [27].

Despite of the high frequency of infection by *P. brasiliensis* in domestic and wild animals, the development of disease was reported only in armadillos [7], two dogs in Brazil [15, 16], a cat in Chile [20] and a Southern two-toed sloth in Mexico [29].

In this study the free range pigs showed an overall positivity of 37.7% to *P. brasiliensis* infection and one of the farms showed a significantly higher frequency of positivity (69.7%). A high frequency of infection (89.5%) was also observed by our group in the dogs from the same region, probably due to their habits of sniffing and digging the soil [19]. The lower positivity observed in pigs may be associated also with the age of animals (2-6 months) taking into account that age was considered a risk factor for *P. brasiliensis* infection in dogs and cattle [18,21]. Dogs under 1-year-old and cattle under 2-year-old showed a significantly lower positivity than older animals [18,21].

The free range pigs exposed to natural infection with *P. brasiliensis* showed a seroconversion of 80 and 100% in the first and fourth month, respectively, although without detection of the fungus by histopathological and PCR analysis in tissue samples. These results indicate that despite of the high frequency of infection, the free range pigs are resistant to development of disease. A seroconversion rate of 83.3% was observed in free range rabbits exposed six months to natural infection with *P. brasiliensis* and one animal was positive in histopathology and PCR [37].

The failure in detection of *P. brasiliensis* in tissues from free range pigs suggest that, after infection, the fungus is cleared from tissues by the animals' immune response. Although in this study the animals apparently showed only infection, it is not possible to rule out the development of disease if the animals were followed for a longer period of time.

This is the first study reporting paracoccidioidomycosis in pigs.

## 5.6 CONCLUSION

Sentinel animals may be useful as indicators of hot spots for *P. brasiliensis* presence in the environment and consequently contributing for clarifying the fungus habitat.

The veterinarians from paracoccidioidomycosis endemic areas must be alert for the possibility of development of this mycosis in production animals.

## 5.7 ACKNOWLEDGMENTS

CNPq and Araucária Foundation for financial support and the CNPq to productivity fellowship granted to Z.P. Camargo and M.A. Ono and the farmers Jose Quinteiro, Geraldo Gomes Guerreiro, José Crespín, João Baptista da Silva and Geraldo Nicodemos da Silva who participated in the study,

## REFERENCES

1. Lutz A. Uma mycose pseudo-coccidica localizada na boca e observada no Brazil: contribuição ao conhecimento da hypho-blastomycoses americanas. *Bras Med* 1908; 22: 141-144.
2. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: na up-date. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6(2): 89–117.
3. Camargo ZP, Franco MF. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev Iberoam Micol* 2000;17(2): 41-48.
4. Marques SA, Paracoccidioidomycosis: Epidemiological, Clinical and Treatment up-date. *An Bras Dermatol* 2003; 78(2): 135-150.
5. Blotta MH, Camargo ZP. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis. *J of Clin Microbiol* 1993; 31(3): 671-6.
6. Franco M, Bagagli E, Scapolio S, Da Silva Lacaz C. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. *Med Mycol* 2000; 38(3): 185-91.
7. Bagagli E, Sano A, Coelho KI, Alquati S, Miyaji M, Camargo ZP, Gomes GM, Franco M, Montenegro MR. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an area of paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 58(4): 505–12.

8. Bagagli E, Franco M, Bosco Sde M, Hebelers-Barbosa F, Trinca LA, Montenegro MR. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. *Med Mycol* 2003; 41(3): 217-23.
9. Naiff RD, Ferreira LC, Barrett TV, Naiff MF, Arias JR. Enzootic paracoccidioidomycosis in armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in the State of Pará. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1986; 28(1):19-27.
10. Corredor GG, Castaño JH, Peralta LA, Díez S, Arango M, McEwen J, Restrepo A. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. *Rev Iberoam Micol*. 1999;16(4):216-20.
11. Restrepo A, McEwen JG, Castañeda E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol*. 2001; 39(3):233-41.
12. Silva-Vergara ML, Martinez R, Camargo ZP, Malta MH, Maffei CM, Chadu JB. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. *Med Mycol*. 2000; 38(3):193-9.
13. Corredor GG, Peralta LA, Castaño JH, Zuluaga JS, Henao B, Arango M, Tabares AM, Matute DR, McEwen JG, Restrepo A. The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. *Med Mycol* 2005; 43(3): 275-80.
14. Terçarioli GR, Bagagli E, Reis GM, Reis GM, Theodoro RC, Bosco Sde M, Macoris SA, Richini-Pereira VB. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. *BMC Microbiol* 2007, 7: 92.
15. Ricci G, Mota FT, Wakatmasu A, Serafim RC, Borra RC, Franco M. Canine paracoccidioidomycosis. *Med Mycol* 2004, 42(4): 379–83.
16. De Farias MR, Condas LA, Ribeiro MG, Bosco Sde M, Muro MD, Werner J, Theodoro RC, Bagagli E, Marques SA, Franco M. Paracoccidioidomycosis in a dog: case report of generalized lymphadenomegaly. *Mycopathologia*. 2011;172(2):147-52.
17. Fontana FF, dos Santos CT, Esteves FM, Rocha A, Fernandes GF, do Amaral CC, Domingues MA, De Camargo ZP, Silva-Vergara ML. Seroepidemiological survey of paracoccidioidomycosis infection among urban and rural dogs from Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Mycopathologia*. 2010;169(3):159-65.
18. Silveira LH, Domingos IH, Kouchi K, Itano EN, Silva EA, Landgraf VO, Werneck SM, Camargo ZP, Ono MA. Serological detection of antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* in dogs with leishmaniasis. *Mycopathologia* 2006, 162(5): 325–9.
19. Ono MA, Bracarense AP, Morais HS, Trapp SM, Belitardo DR, Camargo ZP. Canine paracoccidioidomycosis: a seroepidemiologic study. *Med Mycol* 2001;39(3):277-82.

20. Gonzalez JF, Montiel NA, Maass RL. Case report First report on the diagnosis and treatment of encephalic and urinary paracoccidioidomycosis in a cat. *J Feline Med Surg* 2010; 144(8) 659-62.
21. Silveira LH, Paes RC, Medeiros EV, Itano EN, Camargo ZP, Ono MA. Occurrence of Antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in dairy cattle from Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mycopathologia* 2008; 165(6):367-71.
22. Corte AC, Itano EN, Freire RL, Camargo ZP, Ono MA. Detection of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in horses from northern Region of Paraná State. *Semina: Ciências Agrárias*. 2009, 30(2): 441-6.
23. Oliveira GG, Silveira LH, Itano EN, Soares RM, Freire RL, Watanabe MA, Camargo, ZP, Ono MA. Serological evidence of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in chickens from Parana and Mato Grosso do Sul States, Brazil. *Mycopathologia* 2011; 171(3): 197-202.
24. Oliveira GG, Navarro IT, Freira RL, Belitardo DR, Silveira LH, Camargo ZP, Itano EN, Ono MA. Serological survey of paracoccidioidomycosis in sheep. *Mycopathologia* 2012, 173: 63–8.
25. Richini-Pereira VB, Bosco Sde M, Griese J, Theodoro RC, Macoris SA, da Silva RJ, Barrozo L, Tavares PM, Zancopé-Oliveira RM, Bagagli E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. *Med Mycol*. 2008; 46(1):35-40.
26. Ferreira JB, Navarro IT, Freire RL, Oliveira GG, Omori AM, Belitardo DR, Itano EN, Camargo ZP, Ono MA. Evaluation of *Paracoccidioides brasiliensis* Infection in Dairy Goats. *Mycopathologia* 2013; [Epub ahead of print]
27. Corte AC, Svoboda WK, Navarro IT, Freire RL, Malanski LS, Shiozawa MM, Ludwig G, Aguiar LM, Passos FC, Maron A, Camargo ZP, Itano EN, Ono MA. Paracoccidioidomycosis in wild monkeys from Paraná State, Brazil. *Mycopathologia* 2007; 164(5):225-8.
28. Grose E, Tamsitt JR. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia, S.A. *Sabouraudia*, 1965;4(2): 124-5.
29. Trejo-Chávez A. Ramírez-Romero R, Ancer-Rodríguez J, Nevárez-Garza AM Rodríguez-Tovar LE. Disseminated Paracoccidioidomycosis in a Southern Two-Toed sloth (*Choloepus didactylus*). *J Comp Pathol* 2011; 144(2-3):231-4.
30. De Camargo ZP, Unterkircher C, Campoy SP and Travassos. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* Exoantigens for Immunodiffusion Tests. *J of Clin Microbiol*. 1988; 26 (10):2147-51.
31. Puccia R. Travassos LR. The 43kDa glycoprotein from the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* and its deglycosylated form: excretion and susceptibility to proteolysis. *Arch Biochem Biophys* 1991; 289(2): 298-302.

32. Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72: 248-54.
33. De Camargo ZP. Serology of paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia.* 2008; 165(4): 289–302.
34. Corte AC, Gennari SM, Labruna MB, Camargo LMA, Itano EN, Freire RL, Camargo ZP, Ono MA. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in dogs from Western Brazilian Amazon. *Pesq. Vet. Bras.* 2012, 32(7): 649-52.
35. Eisele RC, Juliani LC, Belitardo DR, Itano EN, Estevão D, Bracarense AP, Camargo ZP, Ono MA. Immune response in dogs experimentally infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol*2004; 42(6):549-53.
36. Ono MA, Kishima MO, Itano EN, Bracarense AP, Camargo ZP. Experimental paracoccidioidomycosis in dogs. *Med Mycol* 2003; 41(3):265-8.
37. Belitardo DR. Use of rabbits and pigs as sentinel animals for paracoccidioidomycosis. PhD Thesis, State University of Londrina, 2013.