



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

TATIANE FERREIRA PETRONI

**DETECÇÃO DA CO-INFECÇÃO POR *PARACOCCIDIOIDES*
BRASILIENSIS E *LEISHMANIA SPP* EM CÃES**

TATIANE FERREIRA PETRONI

DETECÇÃO DA CO-INFECÇÃO POR *Paracoccidioides brasiliensis* E *Leishmania spp* EM CÃES

Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Patologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Mario Augusto Ono

Londrina
2016

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

Petroni, Tatiane Ferreira.

DETECÇÃO DA CO-INFECÇÃO POR PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS E
LEISHMANIA SPP EM CÃES / Tatiane Ferreira Petroni. - Londrina, 2016.

74 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, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Paracoccidiodomicose - Tese. 2. Leishmaniose visceral - Tese. 3.
imunodiagnóstico Tese. 4. identificação molecular - Tese. I. Ono, Mario Augusto. II.
Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de
Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

TATIANE FERREIRA PETRONI

**DETECÇÃO DA CO-INFECÇÃO POR *Paracoccidioides brasiliensis* E
Leishmania spp EM CÃES**

Tese apresentada ao Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Patologia Experimental.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dr Mario Augusto Ono
Universidade Estadual de Londrina - UEL

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

Profa. Dra. Ivete Conchon Costa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

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

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

Londrina, 22 de setembro de 2016

Dedico este trabalho aos meus pais, à
minha irmã Thais e ao meu noivo
Marcelo

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela proteção durante as inúmeras viagens realizadas até Londrina, e pelo respaldo em todos os momentos difíceis vivenciados durante o doutorado.

Agradeço aos meus pais, Helio Petroni e Vera Petroni, que sempre incentivaram e apoiaram cada etapa da minha formação acadêmica e profissional. Amo e sou eternamente grata a vocês.

Agradeço à minha irmã Thais e ao seu marido Flavio Baptista, que abriram as portas de suas casas para me receber todas as vezes que vinha a Londrina; e ao meu noivo Marcelo Carandina por compreender minha ausência em vários finais de semana e feriados e por me apoiar e desejar sempre o meu sucesso profissional.

Agradeço ao meu Orientador, Prof. Mario Augusto Ono, pela oportunidade de realizar o Doutorado, e por tolerar e compreender a minha ausência em alguns momentos no Laboratório. Agradeço imensamente todos os conhecimentos transmitidos desde a Iniciação Científica, e principalmente pelo exemplo de profissional.

Agradeço aos componentes da banca, tanto da qualificação quanto da defesa pela disponibilidade em colaborar com este trabalho e pelas sugestões para melhoria do mesmo.

Agradeço aos professores do Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental pelos conhecimentos transmitidos, e aos funcionários e amigos do Departamento de Patologia do Centro de Ciências Biológicas da UEL.

Aos professores Prof Dr André Luís Laforga Vanzela, Profa Dra Eiko Nakagawa Itano e Profa Dra Maria Angélica Ehara Watanabe pelo apoio laboratorial dado em diferentes etapas do desenvolvimento da pesquisa. Ao Instituto Adolfo Lutz de São Paulo e ao CLR IAL Araçatuba, em especial à Dra Girlane Magalhães Sansoni Diretora CLR-Araçatuba e ao Lucas Xavier Bonfietti- Pesquisador Científico CLR-Araçatuba; por disponibilizarem as amostras de soro bem como os dados cadastrais e resultados laboratoriais prévios realizados no Instituto. Graças à qualidade na realização dos ensaios e da rastreabilidade das amostras e resultados, é que foi possível a concretização deste trabalho.

Ao Centro de Controle de Zoonoses de Araçatuba, em especial à Graziela Cândido Diniz Cardoso e Rafael Silva Cipriano pelo apoio na obtenção de amostras biológicas dos cães.

Agradeço aos amigos do laboratório de Imunologia Animal, em especial à Rafaela Macagnan e Aline Myuki Omori pela ajuda em diversas etapas da pesquisa. E às amigas da época do Mestrado, Juliana Tomazi Fritzen e Priscila Cassola, pelos reencontros e conversas a cada vinda.

E o agradecimento a todos aqueles que de alguma forma foram importantes para o desenvolvimento deste trabalho e que não foram nominalmente citados.

*“...e por mil estradas onde andarmos nós, qual
semente nos levará..”*

PETRONI, Tatiane Ferreira. **Detecção da co-infecção por *Paracoccidioides brasiliensis* e *Leishmania spp* em cães.** 2016. 74f. Tese de Doutorado- Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica prevalente na América Latina, causada pelos fungos termodimórficos *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. O habitat desses fungos ainda não está definido e o uso de animais sentinelas poderia contribuir para o esclarecimento do mesmo. Considerando que a PCM e a leishmaniose visceral são endêmicas na região de estudo, este trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência de infecção por *P. brasiliensis* em cães incluídos no Inquérito Epidemiológico para Leishmaniose Visceral Canina (LVC) na região de Araçatuba-SP. Do total de 300 amostras de soro analisadas (66% positivas e 33% negativas para LVC), 22 (7,3%) foram positivas em ensaio de imunodifusão (I.D.) para *P. brasiliensis*, das quais todas eram positivas para LVC (teste rápido e ELISA). Ao analisar as amostras positivas na I.D. (exoantígeno) por *Western blotting* (gp43 recombinante), 19 (84%) das amostras apresentaram positividade. Foi observado uma correlação positiva ($r=0.96$) entre as positivities para LVC e PCM. Estes dados sugerem uma maior suscetibilidade de cães com LVC ao desenvolvimento da PCM. A fim de confirmar a hipótese de co-infecção, um segundo trabalho foi realizado, e de 128 novas amostras de soro canino analisadas, 7 (5,4%) foram positivas na I.D. para PCM, sendo 6 (85%) positivos para ambas infecções (PCM e LVC). Amostras de tecidos, linfonodos e lesões de pele, de um dos cães soropositivos para ambas infecções foram cultivados em ágar Sabouraud com cloranfenicol e analisados por PCR. Uma colônia com características macroscópicas de *P. brasiliensis* foi recuperada a partir da cultura da lesão de pele deste cão, e a análise microscópica apresentou leveduras similares a *P. brasiliensis*. O novo isolado de *P. brasiliensis* foi confirmado por PCR (genes alfa-tubulina, PbitSE/R e p27) e a co-infecção através da PCR para detecção de minicírculos de k-DNA de *Leishmania spp*. Estes dados confirmam a ocorrência de co-infecção por *P. brasiliensis* em cão com LVC.

Palavras-chave: Cães. Identificação molecular. Imunodiagnóstico. Leishmaniose visceral. Paracoccidioidomicose.

PETRONI, Tatiane Ferreira. **Detection of co-infection by *Paracoccidioides brasiliensis* and *Leishmania spp* in dogs.** 2016. 74p. Tese de Doutorado- Programa de Pós Graduação em Patologia Experimental – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis prevalent in Latin America, caused by the thermodimorphic fungi *P. brasiliensis* and *P. lutzii*. The habitat of these fungi is still undefined and the use of sentinels animals could contribute to the understanding of this. Considering that PCM and visceral leishmaniasis are endemic in the region of study, this work had the aim of evaluating the occurrence of *P. brasiliensis* infection in dogs from an Epidemiological Survey for canine visceral leishmaniasis (CVL) in the region of Araçatuba-SP. Of 300 sera samples analyzed (66% positive and 33% negative for CVL), 22 (7,3%) were positive in immunodiffusion assay (I.D.) for *P. brasiliensis*, of which, all were positive for CVL (rapid test and ELISA). When testing positive samples in I.D. (exoantigen) by *Western blotting* (recombinant gp43), 19 (84%) samples showed positivity. It was observed a positive correlation between the positivity ($r= 0.96$) for CVL and PCM. These data suggest an increased susceptibility of dogs with CVL to the development of PCM. In order to confirm the possibility of co-infection, a second study was performed, and of 128 new canine serum samples analyzed, 7 (5.4%) were positive in the I.D. for PCM, being 6 (85%) positive for both infections (PCM and LVC). Tissue samples, lymph nodes and skin lesions, of one of the positive dogs for both infections were cultured in Saboraud agar with chloranfenicol and analyzed by PCR. A colony with macroscopic characteristics of *P. brasiliensis* was recovered from culture of skin lesions from this dog and the microscopic analysis showed yeast cells similar to *P. brasiliensis*. The new isolated of *P. brasiliensis* was confirmed by PCR (alpha-tubulin, PbitSE/R and p27 genes) and the co-infection confirmed by PCR for detection of k-DNA minicircles of *Leishmania spp*. These data confirm the occurrence of co-infection by *P. brasiliensis* in dog with CVL.

Key words: Dogs. Molecular identification. Immunodiagnosis. Visceral leishmaniasis. Paracoccidioidomycosis

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição geográfica do gênero *Paracoccidioides* e *L. loboi*. Atual distribuição das espécies de *Paracoccidioides* S1, PS2, PS3 e *P. lutzii*, e sua espécie-irmã *Lacazia loboi* na América do Sul. Fonte: Modificado de RICHINI-PEREIRA et al., 2009 In: Theodoro et. al., 201212

ARTIGO 1

- Figure 1.** Evaluation by Western blotting (recombinant gp43) of serum samples (n=22) from dogs positive in immunodiffusion (exoantigen). Molecular weight showing bands of 20 and 50KDa.....44

ARTIGO 2

- Figure 1.** Map showing location of Araçatuba municipality in São Paulo State.....49
- Figure 2.** Detection of *Leishmania* spp fragment by PCR. Ladder 100bp(1), Negative control (ultrapure water)(2), Positive control (DNA from *Leishmania amazonensis*)(3), Lymph node(4), Skin lesion(5).53
- Figure 3.** Detection of *P. brasiliensis* fragment by PCR using PbITS-E/R primers. Ladder 100bp (1), Negative control (ultrapure water)(2), Positive control (DNA from *P. brasiliensis*)(3), Lymph node(4), Skin lesion(5).54
- Figure 4.** Morfological aspect of *P. brasiliensis* in cultures of skin lesions. Macroscopic and microscopic aspect of *Paracoccidioides* spp in culture of skin lesions from dog seropositive for PCM and leishmaniasis (40x)54
- Figure 5.** PCR for *P. brasiliensis* from the culture, using primers α -TUB F/R (270bp), PbITSE/R (387bp) and P27 (536bp). Ladder 100bp (1); Negative control (ultrapure water) (2), Positive

control (DNA from Pb/ α -TUB) (3), DNA from culture/ α -TUB (4), Positive control (DNA from Pb/PbITSE/R) (5), DNA from culture/PbITSE/R (6), Positive control (DNA from Pb/P27) (7), DNA from culture/ P27 (8).55

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	PARACOCCIDIOIDOMICOSE	12
1.2	LEISHMANIOSE	23
2	OBJETIVOS	28
2.1	OBJETIVO GERAL	28
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
ARTIGO 1	29
ARTIGO 2	49
3	CONCLUSÃO	66
REFERENCIAS	67

1 INTRODUÇÃO

1.1 PARACOCCIDIOIDOMICOSE

A Paracoccidioidomicose (PCM) foi descoberta em 1908 por Adolpho Lutz, que descreveu os primeiros casos da doença em dois pacientes com lesões nasofaríngeas internados na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (LUTZ, 1908). A doença foi denominada Blastomicose Sul-Americana, moléstia de Lutz-Splendore-Almeida, entre outras (LACAZ, 1994).

Fungos do gênero *Paracoccidioides* são agentes etiológicos da PCM, e apresentam dimorfismo termo-dependente; ou seja, sua morfologia varia conforme a temperatura de crescimento. À 25°C crescem na forma de micélio (forma M), com hifas finas e septadas e clamidoconídios terminais ou intercalados, enquanto que a 37°C, nos tecidos infectados e nas secreções do hospedeiro são encontradas na forma de leveduras arredondadas (forma L). Podem apresentar brotamentos únicos ou múltiplos, que são os blastoconídios dispostos em torno da levedura-mãe, à qual se unem por estreitas pontes celulares. No meio de cultura, a fase micelial apresenta-se como colônia cotonosa, branca, elevada e de crescimento lento; enquanto as leveduras formam colônias de cor creme e aspecto cerebriforme (RESTREPO, 1985; FRANCO, 1994).

Taxonomicamente o fungo encontra-se no Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Pleomycetes, Ordem Onigenales, Família Onygenaceae, Gênero *Paracoccidioides* e Espécie *brasiliensis* (BIALEK et al, 2000; SAN-BLAS et al,

2002), e mais recentemente, incluída a espécie *lutzii* (CARRERO et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2009; DESJARDINS et al., 2011, TEIXEIRA et al., 2014).

Até o ano de 2006 acreditava-se que o gênero *Paracoccidioides* incluía apenas uma espécie, *Paracoccidioides brasiliensis*, como agente etiológico da PCM (MATUTE et al., 2006). Foi somente através da análise por *Multi Locus Sequencing Typing* (MLST) que a variabilidade genética, anteriormente conhecida como polimorfismo intraespecífico e geográfico, revelou a existência de quatro espécies crípticas: S1, PS2 e PS3, a partir do complexo *P. brasiliensis* (MATUTE et al., 2006), e *P. lutzii* (originalmente chamado Pb01-like) (TEIXEIRA et al., 2009).

De acordo com Theodoro et al. (2012), a espécie S1 (inclui os isolados Pb18 e B339), é a espécie mais amplamente distribuída, ocorrendo no Brasil, Argentina, Paraguai, Uruguai, Peru e Venezuela; PS2 ocorre na Venezuela e Brasil, em simpatria com S1, enquanto PS3 é restrito à Colômbia. *P. lutzii*, a espécie mais recentemente descoberta, é mais divergente e ocorre predominantemente, embora não exclusivamente, na região centro-oeste do Brasil (TEIXEIRA et al., 2009). (Figura 1)

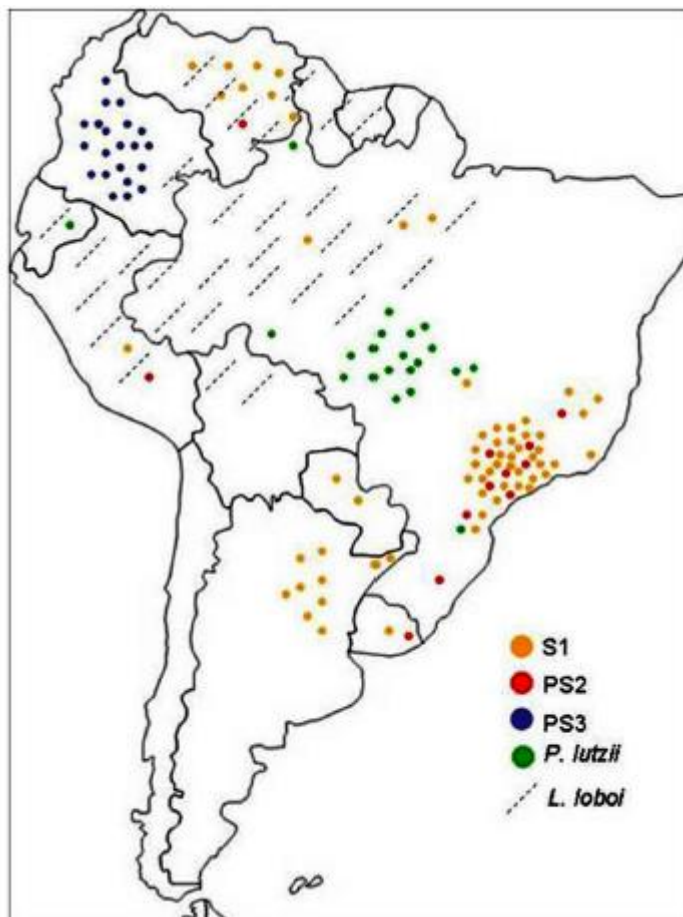


Figura 1. Distribuição geográfica do gênero *Paracoccidioides* e *L. loboi*. Atual distribuição das espécies de *Paracoccidioides* S1, PS2, PS3 e *P. lutzii*, e sua espécie-irmã *Lacazia loboi* na América do Sul. Fonte: Modificado de RICHINI-PEREIRA et al., 2009 In: Theodoro et. al., 2012

A maioria dos casos de PCM são reportados no Brasil, na Colômbia, na Venezuela e na Argentina (BLOTTA, 1999; RAMOS-E-SILVA, 2008) sendo considerada a mais importante micose sistêmica endêmica na América do Sul. Casos importados foram observados em países fora da América Latina, todos representados por indivíduos infectados que haviam morado anteriormente em áreas endêmicas (VAN DAMME et al, 2006; MAYAYO et al, 2007; BOUSQUET et al, 2007; WALKER et al, 2008).

Embora a real prevalência da PCM não possa ser calculada, devido ao fato de não ser doença de notificação compulsória, estima-se que a taxa anual de incidência na população brasileira seja de 1-3 por 100.000 habitantes e a taxa de mortalidade, de 0,14 por 100.000 habitantes (COUTINHO et al, 2002). Há uma estimativa de que cerca de 10 milhões de pessoas podem estar infectadas com *P. brasiliensis* e que 2% destas podem vir a desenvolver a doença (McEWEN, 1995).

No Brasil a PCM é encontrada em todas as regiões do território nacional: Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Norte, sendo que casos esporádicos da doença têm sido relatados no Nordeste. No Estado de São Paulo a PCM tem sido relatada principalmente na região central (MARQUES et al, 1983). Dados obtidos por reação intradérmica com paracoccidioidina sugerem que a prevalência de infecção por *P. brasiliensis* em áreas endêmicas é de 50 a 75% da população adulta (FAVA-NETTO, 1998). No Brasil, no período de 1980 a 1995, foram registrados 3.181 casos de óbitos por PCM, resultando em uma taxa média anual de 1,45/milhões de habitantes, havendo registro de óbitos pela doença em um quarto dos municípios brasileiros (COUTINHO et al., 2002).

Acredita-se que o fator de risco para aquisição da infecção são as profissões ou atividades relacionadas ao manejo do solo contaminado com o fungo, como por exemplo, atividades agrícolas, terraplenagem, preparo de solo, práticas de jardinagens, transporte de produtos vegetais, entre outros. Em todas as casuísticas, foi observado que a grande maioria dos pacientes exerceu atividade agrícola nas duas primeiras décadas de vida, tendo adquirido

a infecção provavelmente nesta época, embora as manifestações clínicas tenham surgido muitos anos depois. A maioria destes pacientes, quando procuram atenção médica, já não reside mais em área endêmica, tendo migrado para centros urbanos onde exercem outras atividades, não ligadas ao trato do solo (SHIKANAI-YASSUDA et al., 2006).

O cenário epidemiológico pode estar mudando devido às novas práticas agrícolas. O aumento significativo das plantações de cana-de-açúcar na região sudeste do Brasil pode resultar em uma redução na incidência da PCM. O cultivo da cana-de-açúcar está normalmente associado a uma grande utilização de pesticidas e à queima do plantio. A queima pode elevar significativamente a temperatura do solo e muitos fungicidas agrícolas são derivados azólicos. A combinação destas práticas agrícolas pode afetar vários microrganismos do solo, incluindo *P. brasiliensis* (QUEIROZ-TELLES, 2008).

A infecção provavelmente é adquirida pelos seres humanos através da inalação de propágulos do fungo que, no parênquima pulmonar, transformam-se em leveduras que podem permanecer confinadas localmente, causando uma infecção crônica, ou disseminar para outros órgãos. Os pulmões, fígado, linfonodos, baço, rim, adrenais, mucosas e pele são os órgãos mais frequentemente afetados (FRANCO e MONTENEGRO, 1982).

Diversas classificações das formas clínicas da PCM foram publicadas desde a descrição da doença. Todas elas baseavam-se em diferentes critérios tais como topografia das lesões, gravidade da doença, resultados de reações sorológicas e história natural, entre outros. De acordo com o *International Colloquium on Paracoccidioidomycosis* realizado em fevereiro de 1986 em

Medellín, Colômbia, que correlaciona dados clínicos à história natural da doença, adaptado por Shikanai-Yasuda e colaboradores em 2006, a classificação das formas clínicas da PCM são: a) PCM infecção; b) PCM doença; b.1) PCM aguda ou tipo juvenil; b.2) PCM crônica ou tipo adulto, podendo ser unifocal ou multifocal; e c) PCM residual ou sequelar.

A PCM-infecção ocorre em indivíduos de ambos os sexos, aparentemente saudáveis, que residem ou residiram em zona endêmica e que apresentam reação intradérmica positiva para antígeno de *P. brasiliensis*, porém não há desenvolvimento da doença (FRANCO, 1986).

A PCM-doença afeta principalmente trabalhadores rurais do sexo masculino, com idade média de 40 anos. A doença progride lentamente e o período de incubação pode durar meses ou anos. A forma aguda ou juvenil é caracterizada por um período curto de incubação (semanas a meses) e por envolvimento do sistema reticuloendotelial (LONDERO e MELO, 1983). A PCM tem sido observada em pacientes de todas as faixas etárias a partir dos três anos de vida e com acentuada predominância entre 30 e 50 anos de idade. Até a puberdade, a incidência da doença é idêntica para ambos os sexos (WANKE E LONDERO, 1994). Contudo, na idade adulta, mais de 80% dos pacientes são do sexo masculino. Este fato é explicado pela proteção conferida pelos estrógenos, que inibem a transformação de micélio e conídios em leveduras (SALAZAR et al., 1988).

A PCM crônica do adulto é a forma de apresentação mais frequente, ocorre predominantemente no sexo masculino e caracteriza-se por uma evolução de vários meses onde predominam a adinamia, emagrecimento,

lesões tegumentares e às vezes linfadenopatia. A presença de febre é irregular e em geral pouco intensa. Seu surgimento pode ser decorrente de co-infecções bacterianas como *Mycobacterium tuberculosis*. O pulmão é o órgão mais frequentemente acometido, cerca de 80 a 90% dos casos (SHIKANAI-YASUDA, 2006); sua manifestação clínica é insidiosa, compreendendo tosse seca, posteriormente produtiva, e dispneia aos esforços. Em muitos casos, é paradoxal a pobreza do quadro clínico respiratório quando comparado à exuberância das lesões pulmonares documentadas por imagens radiológicas de tórax. Por outro lado, em alguns pacientes a teleradiografia de tórax pode não detectar lesões pequenas ou de pouca densidade, enquanto que com a tomografia torácica de alta resolução, uma variedade de imagens têm sido reveladas (LOPES TOLEDO et al, 2011)

As lesões da mucosa oral, faringe e laringe são muito comuns e com frequência são as maiores causas de consulta ao dentista. Resultam de disseminação hematogênica do fungo a partir de um foco primário pulmonar e geralmente correlacionam-se com maior gravidade do processo infeccioso. Apresentam aspecto polimórfico e frequentemente são distribuídas em face e em torno de orifícios naturais do corpo, como boca, nariz e ânus. Na boca, nota-se a presença de ulcerações de aspecto moriforme, geralmente acompanhada de sialorreia, sangramento, abaulamento dentário e dor. Lesões de palato mole e faringe causam odinofagia que levam a emagrecimento e à piora do estado geral do paciente. O acometimento da laringe e cordas vocais ocasiona diversos graus de disfonia, ou mesmo afonia (QUEIROZ-TELLES, 2009).

Os linfonodos, glândulas supra-renais, intestinos e SNC também são frequentemente envolvidos na infecção sistêmica. O sistema ósteo-articular, fígado, baço, próstata e órgãos genitais, tireoide, globo ocular, aorta, pericárdio entre outros são acometidos com menor frequência. As sequelas mais limitantes desta micose incluem quadros de insuficiência pulmonar crônica, doença de Addison e linfangiectasia com má-absorção intestinal. O polimorfismo da apresentação clínica da PCM permite que esta doença seja incluída no diagnóstico diferencial de várias condições clínicas, de causa infecciosa ou não. As manifestações cutâneas da PCM podem ser confundidas com formas linfocutâneas e verruciformes da esporotricose; com lesões de cromoblastomicose, lobomicose (Doença de Jorge Lobo), hanseníase, treponematoses ou com neoplasias de pele. Na forma juvenil, os principais diagnósticos diferenciais são Doença linfoproliferativa, histoplasmose, calazar, tuberculose e outras micobacterioses (QUEIROZ-TELLES, 2009).

Entre as doenças respiratórias, a diferenciação deve ser feita com a tuberculose, histoplasmose, coccidioidomicose e sarcoidose. Enquanto que as lesões mucosas devem ser diferenciadas das lesões mucosas da histoplasmose, de lesões neoplásicas, e da leishmaniose tegumentar (QUEIROZ-TELLES, 2009).

O diagnóstico rápido e preciso desta micose é importante para possibilitar o início de terapia específica e para evitar tanto o aumento do dano ao pulmão quanto à disseminação do fungo para outros órgãos e o desenvolvimento de fibrose. Vários métodos têm sido utilizados para o diagnóstico da PCM; entre eles os microbiológicos, imunológicos, histopatológicos e moleculares.

O exame microscópico direto em amostra clínica caracteriza-se pela presença do agente etiológico, *Paracoccidioides spp*, a partir de exame a fresco, biópsia ou pelo isolamento e identificação do fungo por meio do cultivo de material clínico. As células apresentam aspecto leveduriforme esférico birrefringente, com 10 a 30 µm de diâmetro, de parede grossa e com múltiplos brotamentos, unidos por hastes estreitas às células-mãe. Na amostra clínica, podem também ser encontradas as formas de micélio que são formadas por hifas finas e septadas, clamidósporos terminais ou intercalados (NASCIMENTO, 2005). Entretanto, muito embora o diagnóstico microbiológico possa ser considerado o padrão ouro para confirmação da hipótese diagnóstica, devido às dificuldades na obtenção de materiais clínicos, os métodos imunológicos baseados na detecção de anticorpos específicos tem sido utilizados, e incluem os ensaios de fixação do complemento, imunodifusão e ELISA (CORREA, 2006).

Os ensaios sorológicos têm sido amplamente utilizados no diagnóstico e no seguimento do paciente (TELES & MARTINS, 2011). A quantificação de anticorpos fornece dados para a avaliação da terapia antifúngica e para o prognóstico dos casos.

As técnicas sorológicas sofreram avanços consideráveis nas últimas décadas, como resultado do desenvolvimento de esquemas de detecção inovadores, identificação de antígenos relevantes de *P. brasiliensis* (SILVA et al, 2004) e ampliação do uso da tecnologia do anticorpo monoclonal para aplicação em imunoenaios (GÓMEZ et al, 1997).

Um inconveniente comum na sorologia da PCM é a potencial reatividade cruzada de anticorpos anti- *P. brasiliensis* com antígenos de outros fungos,

principalmente *Histoplasma capsulatum* (BIALEK et al, 2000), devido à frequente utilização de preparados brutos de microrganismos inteiros, contendo antígenos indefinidos com elevada variabilidade.

O primeiro antígeno utilizado no imunodiagnóstico da PCM foi o polissacarídeo extraído de *P. brasiliensis*, padronizado por Fava Netto (1961). Diferentes preparações de antígenos variam grandemente na qualidade, e dependem da linhagem do fungo, da fase morfológica, meio de cultura, tempo de inoculação e técnica desenvolvida (RESTREPO, 1985). Posteriormente, foi introduzido o exoantígeno, que contém antígenos glicoproteicos reconhecidos pelos soros de pacientes com PCM (BRUMMER et al., 1984; PUCCIA et al., 1986; CAMARGO et al., 1988; MENDES-GIANNINI et al., 1990).

A glicoproteína de 43 kDa (gp43) é um componente da superfície celular, liberada pelo fungo em sua fase exponencial de crescimento, com atividade de proteinase em meio ácido. Pode ser processada e secretada através do retículo endoplasmático, e tem sido amplamente utilizada no imunodiagnóstico da PCM (PUCCIA et al., 1986; TRAVASSOS et al., 1995).

Embora grandes avanços tenham sido obtidos em vários aspectos da PCM, a eco-epidemiologia do *P. brasiliensis* ainda não está bem esclarecida. Acredita-se que o habitat do *P. brasiliensis* seja o solo, entretanto, desde o primeiro relato de PCM por Lutz (1908), há poucos isolados a partir dessa fonte. Foram obtidos isolados de amostra de solo da Argentina (NEGRONI, 1966), Venezuela (ALBORNOZ, 1971), e Brasil (SHOME & BATISTA, 1963 e SILVA-VERGARA, 1998), porém novas tentativas de isolamento não foram bem-sucedidas.

A dificuldade de isolamento do *P. brasiliensis* a partir do solo levou vários pesquisadores à procura de novos mecanismos para auxiliar na busca do habitat desse fungo. Uma das abordagens possíveis seria a utilização de animais sentinela.

Os animais domésticos e silvestres podem ser utilizados como marcadores epidemiológicos da PCM e contribuir para a elucidação do habitat de *Paracoccidioides spp.* A infecção pelo *P. brasiliensis* tem sido demonstrado em animais selvagens e domésticos, como cães (ONO et al, 2001; RICCI, et al 2004; FARIAS et al, 2011), cavalos (CONTI-DIAZ et al, 1972, CORTE et al, 2007), bovinos (GUTIERREZ et al, 1974; SILVEIRA et al, 2008), ovinos e caprinos (COSTA et al. 1978; OLIVEIRA et al, 2011), galinhas (OLIVEIRA et al, 2011), coelhos (BELITARDO et al., 2014a), suínos (BELITARDO et al., 2014b), macacos, (JOHNSON, et al 1977; COSTA et al, 1995; CORTE et al, 2007), tatus (NAIFF, 1986; BAGAGLI, 1998; SILVA - VERGARA, 2000), morcegos (GROSE, 1965) e roedores silvestres (SBEGHEN et al., 2015).

A alta reatividade, em estudos soroepidemiológicos, de cães a antígenos de *P. brasiliensis* (MÓS & FAVA NETTO, 1974; ONO et al., 2001 e SILVEIRA et al., 2006) reforça a hipótese de que o solo é o habitat do fungo, uma vez que o cão, pelo hábito de cavar e farejar o solo, estaria mais susceptível à inalação de propágulos fúngicos, o que faria dos cães bons indicadores da presença do fungo no ambiente. Conti Diaz (2007), entretanto, afirma que *P. brasiliensis* ocorreria normalmente na natureza em ambientes de água doce, tais como rios, córregos, com vegetação nativa, protegida por uma ou mais espécies de animais aquáticos heterotérmicos, tais como anfíbios, moluscos, peixes e

artrópodes, integrando com alta eficiência uma biota específica (RUFFIÉ, 1982). Tais animais proveriam o parasita com nutrientes, umidade, competição biológica limitada, justificando assim a dificuldade de obtê-lo a partir do solo. O autor afirma também que animais domésticos como bovinos, cavalos e ovelhas, bem como tatus seriam infectados durante suas atividades de forrageamento em locais próximos a matas ciliares através da inalação de propágulos.

1.2 LEISHMANIOSE

Parasitas do gênero *Leishmania*, protozoários tripanossomatídeos, são transmitidos pela picada de mosquito flebótomo e podem manifestar clinicamente três formas da doença: cutânea, mucocutânea e visceral, dependendo da espécie do parasita (HARHAY et al., 2011). A leishmaniose visceral (LV) é causada pela *Leishmania (L.) infantum chagasi* e é uma zoonose, sendo o cão o principal reservatório doméstico, com casos humanos ocorrendo ocasionalmente (HARHAY et al., 2011; KASZAK et al., 2015).

A leishmaniose visceral é endêmica em 62 países, com um total de 200 milhões de pessoas com o risco de adquirir a doença, e mais de 90% dos casos concentrados em seis países: Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal, Sudão e Etiópia (BERN et al. 2000; WHO, 2010).

No Brasil foram registrados no período de 2003 a 2009, mais de 34 mil casos de leishmaniose visceral. Em 2009 a maioria dos casos foi registrada na região Nordeste (47,5%), seguido pela Norte (19,2%), Sudeste (17,4%), Centro Oeste (7,4%) e Sul (0,2%). Dados recentes mostram que a maioria dos infectados é do sexo masculino (63,9%) e crianças menores de 10 anos,

apresentando índice de 48,9% (BRASIL, 2011a). Até a década de 80, a maioria dos casos concentrava-se em áreas rurais dos municípios. Esse perfil mudou e vários casos são notificados nas áreas urbanas (CAMARGO-NEVES, 2004, CVE, 2011).

Novos casos são registrados em áreas consideradas livre da doença e com destaque para regiões urbanas. Já foram registrados casos autóctones em grandes centros urbanos como São Luís, Teresina, Fortaleza, Natal, Belo Horizonte, Palmas, Campo Grande, Araçatuba e Corumbá (LINDOSO & GOTO, 2007; BRASIL, 2006).

No Estado de São Paulo, a doença era conhecida apenas por meio de casos importados de outros estados brasileiros. No entanto, em 1998 foram detectados cães portadores de LVA, no município de Araçatuba localizado na região oeste do Estado de São Paulo. Este episódio desencadeou uma investigação epidemiológica que levou a identificação de *L. (L.) infantum chagasi*, como agente causal, confirmando assim a transmissão autóctone de LVA em cães da área urbana de Araçatuba e outros municípios da região. O primeiro caso humano de LVA autóctone da região foi detectado em 1999 (CAMARGO-NEVES & KATZ, 1999; CAMARGO-NEVES et al., 2001; 2002). A doença atualmente constitui-se em um sério problema de saúde pública, pois está em franca expansão no Estado de São Paulo.

A leishmaniose visceral americana é uma zoonose urbana tendo o cão como um dos principais reservatórios no ambiente doméstico (DEANE & DEANE, 1962). O diagnóstico da leishmaniose visceral em cães vem se apresentando como um problema para os serviços de saúde pública. O problema é devido a principalmente três fatores: variedade de sinais clínicos

semelhantes às observadas em outras doenças infecciosas, alterações histopatológicas inespecíficas e inexistência de um teste diagnóstico 100% específico e sensível.

Trypanosoma caninum por exemplo, foi recentemente diagnosticado no Brasil em um cão co-infectado com *Leishmania brasiliensis*, no município do Rio de Janeiro (MADEIRA et al., 2009; BARROS et al., 2012). Até o momento todos isolados foram obtidos de culturas de amostras de pele de cães saudáveis (BARROS et al., 2012), e embora certos aspectos epidemiológicos ainda sejam desconhecidos, a presença de *T. canino* em regiões onde LVC é endêmica, tem se apresentado como possível fator de confusão no controle da leishmaniose (ALVES et al., 2012).

No entanto, o diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral canina é semelhante ao realizado na doença humana, podendo ser baseado no exame parasitológico ou sorológico (BRASIL, 2006).

O diagnóstico parasitológico canino é o método de certeza (padrão ouro) e se baseia na demonstração do parasito obtido de material biológico (punções hepáticas, linfonodos, esplênica, medula óssea e biópsia ou escarificação de pele), entretanto, em muitos casos não são encontrados parasitos, apesar de sua existência (BRASIL, 2006).

Com relação aos testes sorológicos, a partir da Nota Técnica Conjunta N° 01/2011 CGDT/GLAB/DEVIT/SVS/MS, 29/12/2011, que trata dos “Esclarecimentos sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina”, após capacitação, adequação e cadastro junto ao Núcleo de Informação do Instituto Adolfo Lutz (IAL) Central, os municípios do estado de

São Paulo passaram a receber os Kits para triagem da LVC, utilizando o Teste Rápido DPP® (Dual Path Platform) - TR leishmaniose visceral canina BioManguinhos/FIOCRUZ, baseado na imunocromatografia, e o ELISA (EIE® BioManguinhos/FIOCRUZ) definido como teste confirmatório (BRASIL, 2011b).

O teste rápido imunocromatográfico, utilizado como teste de triagem, apresenta vantagens e facilidades, tais como: rapidez, simplicidade, praticidade, realização a partir de uma amostra de sangue total, soro ou plasma; além de não exigir equipamentos laboratoriais específicos e especialização tecnológica. O ELISA, por sua vez, permite a realização simultânea de várias amostras e pode ser automatizado, além de eliminar a subjetividade na leitura (BRASIL, 2011b).

Em medicina veterinária, o clínico normalmente se confronta com casos sugestivos de leishmaniose, porém, muitas vezes, os testes diagnósticos apresentam resultados contraditórios (FRANCINO et al., 2006). O programa de controle da leishmaniose adotado no Brasil baseia-se em três principais estratégias: diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, inquéritos sorológicos com eutanásia dos cães positivos e vigilância entomológica. As medidas adotadas relacionam-se com a classificação das áreas com e sem transmissão vetorial (BRASIL, 2006). Tais estratégias de controle não têm sido capazes de reduzir a incidência dos casos humanos (COSTA & VIEIRA, 2001).

No Brasil, a prática da eutanásia canina é recomendada a todos os animais sororreagentes e/ou parasitológico positivo, conforme prevê o manual de Vigilância Epidemiológica, distribuído pelo MS (BRASIL, 2013).

No entanto, a partir de 2016, por meio da Nota Técnica Conjunta nº 001/2016 MAPA/MS, assinada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento e pelo Ministério da Saúde foi autorizado o registro do produto MILTEFORAN, sob número SP 000175-9.000003, de propriedade da empresa VIRBAC SAÚDE ANIMAL, indicado para o tratamento da leishmaniose visceral de cães.

Considerando que o cão pode se infectar tanto com *P. brasiliensis* como com *Leishmania spp*, este estudo teve como objetivo avaliar a infecção por *P. brasiliensis* em cães de uma região endêmica para leishmaniose visceral.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a co-infecção por *P. brasiliensis* e *Leishmania spp* em cães.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar a infecção por *P. brasiliensis* por meio de métodos sorológicos em cães soropositivos e soronegativos para leishmaniose visceral canina na região de Araçatuba-SP.
- Detectar *P. brasiliensis* em amostras de tecido de cães soropositivos para PCM e leishmaniose por meio de PCR.
- Isolar *P. brasiliensis* de amostras de tecido de cães soropositivos para PCM e leishmaniose.

ARTIGO 1

Serological evidence of infection by *Paracoccidioides brasiliensis* in dogs with leishmaniasis

Serological evidence of infection by *Paracoccidioides brasiliensis* in dogs with leishmaniasis

Tatiane Ferreira Petroni^{1,2}, Lucas Xavier Bonfietti², Tiago Henrique Zaninelli¹,
Eiko Nakagawa Itano¹, Mario Augusto Ono¹

1. Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, Londrina, Paraná, 86057-970, Brazil.
2. Instituto Adolfo Lutz- CLR Araçatuba, Araçatuba-SP, 16015-030, Brazil

Corresponding author: Mario Augusto Ono, Phone: (+55) 43- 3371-4982

e-mail: marioono@uel.br

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis prevalent in Latin American countries, caused by the dimorphic fungi *Paracoccidioides brasiliensis* and *P. lutzii*. The habitat of these fungi in nature remains undefined, although it is believed that infection occurs by inhalation of infective propagules present in soil. Sentinels animals, such as dogs, can be valuable epidemiological markers of paracoccidioidomycosis. Taking into account that paracoccidioidomycosis and visceral leishmaniasis may occur in the same area, the objective of this study was to evaluate the occurrence of *P. brasiliensis* infection in dogs positive for canine visceral leishmaniasis. Serum samples of dogs positive (n=199) and negative (n=101) for leishmaniasis, were analyzed by immunodiffusion test using exoantigen of *P. brasiliensis* and 22 samples (7.3%) were positive. The serum samples positive in immunodiffusion test were also analyzed by Western blotting using recombinant *P. brasiliensis* gp43 and 86% of samples were positive. A high positive correlation ($r=0.96$) between positivity for leishmaniasis and paracoccidioidomycosis was observed. These data suggest an association between leishmaniasis and paracoccidioidomycosis in dogs.

Key words: Paracoccidioidomycosis, *Leishmania*, canine

INTRODUCTION

Paracoccidioidomycosis [PCM) is a deep systemic mycosis caused by human fungal pathogens of the *Paracoccidioides* genus that includes *P. brasiliensis* (cryptic species S1, PS2 and PS3) and *P. lutzii* [1]. The disease is geographically restricted to subtropical areas of Latin America with a high prevalence in rural populations from Brazil, Colombia, Venezuela, and Argentina [2,3].

PCM can be classified as PCM infection (infected individuals living in PCM endemic areas without symptoms of disease) and PCM disease (patients with clinical symptoms) [4]. The clinical manifestations depend on the virulence of the infecting strain of *P. brasiliensis*, the degree and type of immune response triggered, affected tissues, and intrinsic characteristics of the host [5,6].

The habitat of *Paracoccidioides* sp. in nature remains still undefined, therefore the use of animal sentinels could contribute for the detection of these fungi in the environment. Infection by *P. brasiliensis* has been reported in dogs [7-10], horses in Uruguay and in Brazil [11,12] cows in Colombia and Brazil [13,14], sheep [15], goats and chickens [16,17], monkeys [18–20], armadillos [21–23], rabbits, pigs and small wild rodents in Brazil [24–26].

In a study of experimental paracoccidioidomycosis, two out four puppies inoculated with *P. brasiliensis* yeast cells by intravenous route, died one week post inoculation, showing lesions and several yeast cells in lung, spleen and liver, although no lesions were observed in lungs, spleen and liver from the two animals that survived [27].

The first cases of natural PCM in dogs were reported by Ricci et al. [28], Farias et al. [29] and Headley et al. [30] in Brazil. Ricci et al. [28] reported the first case of canine PCM in a female adult Doberman with cervical lymphadenomegaly and the diagnosis was confirmed by immunohistochemistry and Nested-PCR. Farias et al. [29] reported the second case in a female six-year-old Doberman with hepatosplenomegaly, lymphadenomegaly and progressive weight loss. The third description of clinical PCM in dogs, was reported in a 5-year-old female Labrador dog that had enlargement of most superficial lymph nodes and dermatitis associated with *P. brasiliensis* [30].

Silveira et al. [9], evaluated serum samples from dogs positive and negative for leishmaniasis in Mato Grosso do Sul State, Central Western Brazil, and observed a higher reactivity to *P. brasiliensis* antigens in samples positive for leishmaniasis than in negative ones, suggesting co-infection by *P. brasiliensis* and *Leishmania* or cross-reactivity.

Parasites of the *Leishmania* genus are trypanosomatid protozoa transmitted by the bite of the phlebotomine sand fly and can manifest in three clinical forms (cutaneous, mucocutaneous, visceral) depending on the parasite species. Visceral leishmaniasis, also known as kala-azar is caused by *Leishmania (L.) infantum chagasi* and is a zoonotic disease with dogs as the main domestic reservoir and occasional human infections. In Brazil and other countries with zoonotic visceral leishmaniasis, dogs are the main reservoir [31].

Taking into account that dogs are susceptible to development of paracoccidioidomycosis and leishmaniasis, we selected a highly endemic area for visceral leishmaniasis in Brazil [32]. The objective of this study was to evaluate the co-infection of dogs by *P. brasiliensis* and *Leishmania* sp.

Materials and Methods

Study Area

The Administrative Region of Araçatuba is one of sixteen administrative regions of São Paulo State, Southeast Brazil and is composed by 43 municipalities, showing in 2010 a population of 735.401.

The serum samples were collected in the municipalities of Andradina, Araçatuba and Birigui. The climate is Tropical with dry winter, and rainy period in the summer, average temperature of 22.2°C, and annual average of precipitation of 1200 mm.

Serum samples

The serum samples were collected in the Zoonosis Control Centers (CCZs) of each municipality and sent to the Regional Adolfo Lutz Institute (IAL) located in Araçatuba for analyzes by rapid test (TR-DPP) and ELISA (EIE®) for canine visceral leishmaniasis. All the assays were performed according to manufacturers instructions (Bio-Manguinhos, FIOCRUZ). Positive and negative samples for leishmaniasis (n=300) were randomly selected from the municipalities of Andradina, Araçatuba and Birigui (Table 1). This study was approved by the Animal Ethics Committee of Adolfo Lutz Institute.

Immunodiffusion Test

The serum samples were analyzed by immunodiffusion test using *P. brasiliensis* exoantigen as reagent, as described previously [33]. Serum samples were added at peripheral orifices, a routine use positive control and

exoantigen at the central orifice. All samples positive in Immunofusion were analyzed by Western blotting using recombinant gp43 as antigen.

Western blotting analysis

Recombinant Gp43 (g43 Δ NT) was obtained as described by Assunção [34]. Briefly, recombinant protein was expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) upon induction with 0,5 mM IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside-Invitrogen Life Technologies) during 4 hours. Histidine-tagged recombinant protein was purified with a nickel chelating resin (Qiagen). Recombinant Gp43 was electrophoresed on a 10% polyacrylamide gel containing SDS and transferred to nitrocellulose membranes. The dogs serum samples positive for PCM in I.D. were analyzed by Western blotting with recombinant gp43. The serum samples were previously adsorbed with *E. coli* BL21(DE3) *overnight* and incubated with membrane strips for 1 h. After washing the strips were incubated with anti-dog immunoglobulin G-peroxidase conjugate. The reaction was revealed with H₂O₂/diaminobenzidine and stopped with distilled water.

Statistical analysis

Statistical tests were carried out at a 5% significance level ($p < 0.05$, CI 95%) and three comparative analyses were performed using Pearson's χ^2 test Fisher's exact test and Odds Ratio (<https://graphpad.com/quickcalcs/pValue2/>; https://www.medcalc.org/calc/odds_ratio.php; and BioEstat5.3).

Results

In Table 1, it is possible to verify the amount of positive and negative samples for leishmaniasis tested by municipality and its respective reactivity to exoantigen of *P. brasiliensis* through immunodiffusion. A high positive correlation ($r=0.96$) between positivity for leishmaniasis and paracoccidioidomycosis was observed, suggesting an association between these infections.

The serum samples of dogs positive and negative for leishmaniasis showed a positivity of 7.3% to *P. brasiliensis* exoantigen and all samples positive for *P. brasiliensis* were also positive for *Leishmania* sp., and no reactivity for *P. brasiliensis* was observed in the samples negative for *Leishmania* sp. (Table 2).

The serum samples positive for *Leishmania* sp. showed a significant higher reactivity to *P. brasiliensis* antigens than negative ones, suggesting that dogs with leishmaniasis are more susceptible to infection by *P. brasiliensis* (Odds Ratio = 25.73).

Taking into account that the exoantigen used in immunodiffusion test is a crude antigen, and therefore could show cross-reactivity with other antigens, the samples positive for exoantigen were analyzed by Western blotting with recombinant non-glycosylated gp43 produced in *E. coli* (Figure 1) for minimizing cross-reactivity. It was observed that 86% of samples positive in immunodiffusion test were also positive in Western blotting with recombinant gp43.

No difference was observed in relation to sex, suggesting that male and female dogs are equally exposed to *P. brasiliensis* infection. Dogs positive in

the immunodiffusion test probably have developed PCM disease taking into account that in human PCM only patients with clinical symptoms are reactants in this test [33].

Discussion

Our group also have evaluated the infection by *P. brasiliensis* in dogs seropositive and seronegative for leishmaniasis in Campo Grande, Mato Grosso do Sul State, Central Western Brazil. A total of 836 serum samples, positive (n=449) and negative (n=387) to leishmaniasis were analyzed by immunodiffusion test, and a positivity of 7.3% was observed, that coincidentally is the same positivity observed in the present study.

Until now, despite the high rates of infection by *P. brasiliensis* reported in seroepidemiological studies [7–10,35] there are only three cases of natural disease reported in dogs [28–30] coincidentally all female dogs, in contrast with human paracoccidioidomycosis, in which males are more susceptible than females.

In human paracoccidioidomycosis, disease is more frequent in male than female because estrogens inhibit *P. brasiliensis* mycelium to yeast transformation [36]. In dogs, the estrous cycle is different from other animal species [37]. The estrous cycle in dogs can be divided into four phases: anestrus, proestrus, estrus and diestrus. Anestrus phase is a period of total sexual inactivity, which lasts about 125 days and is characterized by an involution of uterus and low levels of estrogen and progesterone, with an increased level of estrogen only in the final phase of this period. This could

allow infection and therefore explain the fact that male and female dogs are equally susceptible to development of paracoccidioidomycosis disease.

The results of the present study suggest that dogs with leishmaniasis are more susceptible to infection by *P. brasiliensis*.

Cordeiro et al. [38] detected antibodies against *Histoplasma capsulatum* in dogs seropositive for leishmaniasis. The authors analyzed 224 serum samples from dogs in northeastern Brazil and antibodies against *H. capsulatum* were detected in four serum samples (1.78%), three of which were also positive for leishmaniasis. Krawczak et al. [39] evaluated the occurrence of co-infection or cross-reaction in the serological tests used for detection of antibodies against *Leishmania* sp., *Babesia canis vogeli* and *Ehrlichia canis* in urban dogs from the State of Minas Gerais, Brazil, and demonstrated co-infection with *Ehrlichia* or *Babesia* and *Leishmania*, although no cross-reactivity had been observed in the serological tests.

Taking into account that cross-reactivity between *P. brasiliensis* and *L. loboi* [40], as well as *P. brasiliensis* and *H. capsulatum* antigens may occur [41], and that these fungi share the same endemic area in Brazil, it was not possible to discard the possibility of occurrence of cross-reaction. According to Wheat et al [41], galactomannan and glucan are the major cause of cross-reactions. In the present study we used a recombinant non-glycosylated gp43 produced in *E. coli* to minimize this problem.

Dogs with symptomatic visceral leishmaniasis show a Th2 profile of cytokine secretion [42] and resistant animals show development of specific cellular immunity, with production of IL-2, TNF, and IFN- γ [43]. Susceptible dogs, however, show high levels of antibodies and absence of cellular response

[44]. Taking into account that susceptibility for paracoccidioidomycosis development is also associated with a Th2 response [45], probably dogs with leishmaniasis would be more susceptible to PCM infection.

These results suggest that infection of dogs by *P. brasiliensis* occur frequently in the region of study and that dogs with visceral leishmaniasis are more susceptible to development of paracoccidioidomycosis.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank CNPq for the productivity fellowship granted to M.A. Ono and E.N. Itano.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Theodoro RC, Teixeira M de M, Felipe MSS, Paduan K dos S, Ribolla PM, San-Blas G, et al. Genus *Paracoccidioides*: Species recognition and biogeographic aspects. PLoS One 2012;7(5):e37694.
2. 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.
3. Teixeira MDM, Theodoro RC, Oliveira FFM De, Machado GC, Hahn RC, Bagagli E, et al. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. Med Mycol 2014; 52:19-28.
4. Franco M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. J Med Vet Mycol 1987;25(1):5–18.
5. Benard G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. Mycopathologia 2008; 165:209–21.
6. Mendes-Giannini MJS, Monteiro Da Silva JL, De Fátima Da Silva J, Donofrio FC, Miranda ET, Andreotti PF, et al. Interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* with host cells: Recent advances. Mycopathologia 2008; 165:237-248.
7. Mos E, Fava Netto C. Contribuição ao estudo da paracoccidioidomicose - I. Possível papel dos cães. Estudo sorológico e anátomo-patológico. Rev Inst Med Trop São Paulo 1974;16:154–9.
8. Ono MA, Bracarense AP, Morais HS, Trapp SM, Belitardo DR, Camargo ZP. Canine paracoccidioidomycosis: a seroepidemiologic study. Med Mycol 2001;39(3):277-82.

9. Silveira LH, Domingos IH, Kouchi K, Itano EN, Silva EA, Landgraf VO, et al. Serological detection of antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* in dogs with leishmaniasis. *Mycopathologia* 2006;162(5):325–9.
10. Teles AJ, Klafke GB, Cabana ÂL, Albano APN, Xavier MO, Meireles MCA. Serological Investigation into *Paracoccidioides brasiliensis* Infection in Dogs from Southern Rio Grande do Sul, Brazil. *Mycopathologia* 2016;181(3–4):323–8.
11. Conti-Diaz IA, Alvarez BJ, Gezuele E, Gonzalez Marini H, Duarte J, Falcón J. Intradermal reaction survey with paracoccidioidin and histoplasmin in horses. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1972;14:372–6.
12. Corte AC, Itano E., Freire RL, Camargo ZP, Ono MA. Detection of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in horses from northern Region of Paraná State. *Semina Ciências Agrárias* 2009;30:441–6.
13. Gutierrez AH, Ceballos GC, Ferrer HIP. Encuesta sobre tuberculosis, histoplasmosis y paracoccidioidomycosis en ganado lechero del valle del Aburra. *Antioq Med* 1974;24:339–58.
14. Silveira LH, Paes RCS, Medeiros E V., 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.
15. Oliveira GG, Navarro IT, Freire RL, Belitardo DR, Silveira LH, Camargo ZP, et al. Serological survey of paracoccidioidomycosis in sheep. *Mycopathologia*. 2012;173(1):63–8.
16. da Costa EO, Fava-Netto C. Contribution to the epidemiology of paracoccidioidomycosis and histoplasmosis in the state of São Paulo,

- Brazil. Paracoccidioidin and histoplasmin intradermic tests in domestic animals. *Sabouraudia*. 1978;16(2):93–101.
17. Oliveira GG, Silveira LH, Itano EN, Soares RM, Freire RL, Watanabe MAE, et al. Serological Evidence of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in chickens from Parana and Mato Grosso do Sul States, Brazil. *Mycopathologia*. 2011;171(3):197–202.
 18. Costa EO, Diniz LSM, Netto CF, Arruda C, Dagli MLZ. Delayed hypersensitivity test with paracoccidioidin in captive Latin American wild mammals. *J Med Vet Mycol*. 1995;33:39–42.
 19. Corte AC, Svoboda WK, Navarro IT, Freire RL, Malanski LS, Shiozawa MM, et al. Paracoccidioidomycosis in wild monkeys from Parana State, Brazil. *Mycopathologia*. 2007;164(5):225–8.
 20. Johnson WD, Lang CM. Paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis) in a squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Vet Pathol*. 1977;14(4):368–71.
 21. Naiff RD, Ferreira LC, Barrett T V., Naiff MF, Arias JR. Paracoccidioidomicose enzo??tica em tatus (*Dasypus novemcinctus*) no estado do Para. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1986;28(1):19–27.
 22. Bagagli E, Sano A, Coelho KI, Alquati S, Miyaji M, De Camargo ZP, et al. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus noveminctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;58(4):505–12.
 23. Silva-Vergara M, Martinez R, Camargo Z, Malta M, Maffei C, Chadu J. 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.
24. Belitardo DR, Calefi AS, Sbeghen MR, de Oliveira GG, Watanabe MAE, de Camargo ZP, et al. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Mycoses.* 2014;57(4):222–7.
 25. Belitardo DR, Calefi AS, Borges IK, de Oliveira GG, Sbeghen MR, Itano EN, et al. Detection of Antibodies Against *Paracoccidioides brasiliensis* in Free-Range Domestic Pigs (*Sus scrofa*). *Mycopathologia.* 2014;177(1–2):91–5.
 26. Sbeghen MR, Zanata TB, Macagnan R, de Abreu KC, da Cunha WL, Watanabe MAE, et al. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in small wild mammals. *Mycopathologia* 2015; 180(5-6): 435-40.
 27. Ono M A., Kishima MO, Itano EN, Bracarense A. PFRL, Camargo ZP. Experimental paracoccidioidomycosis in dogs. *Med Mycol* 2003; 41(3):265-8.
 28. Ricci G, Mota FT, Wakamatsu a, Serafim RC, Borra RC, Franco M. Canine paracoccidioidomycosis. *Med Mycol.* 2004;42(4):379–83.
 29. de Farias MR, Zeni Condas LA, Ribeiro MG, de Gimenes Bosco SM, Muro MD, Werner J, et al. Paracoccidioidomycosis in a Dog: Case Report of Generalized Lymphadenomegaly. Vol. 172, *Mycopathologia.* 2011. p. 147–52.
 30. Headley S, Pretto-Giordano L, Santis G Di, Gomes L, Macagnan R, Nóbrega D da, et al. *Paracoccidioides brasiliensis*-associated dermatitis and lymphadenitis in a dog. *Mycopathologia.* 2016; [Epub ahead of print].
 31. Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Costa CHN. Urban parasitology: Visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends in Parasitology* 2011; 27 (9): 403-

- 9.
32. BRASIL. Manual de Vigilância e Controle da leishmaniose visceral. 2006;
33. Camargo ZP, Unterkircher C, Campoy SP, Travassos LR. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. J Clin Microbiol 1988; 26:2147-2151.
34. Assunção TR. Desenvolvimento de método para diagnóstico da paracoccidioidomicose humana utilizando antígeno recombinante de *Paracoccidioides brasiliensis*. 2012. Dissertação. 60f. Londrina.
35. Fontana FF, dos Santos CTB, Esteves FM, Rocha A, Fernandes GF, do Amaral CC, et al. Seroepidemiological survey of paracoccidioidomycosis infection among urban and rural dogs from Uberaba, Minas Gerais, Brazil. Mycopathologia. 2010;169(3):159–65.
36. Aristizabal BH, Clemons K V., Stevens DA, Restrepo A. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: In vivo inhibition in females. Infect Immun. 1998;66(11):5587–91.
37. OLIVEIRA ECS, MARQUES Jr AP. Endocrinologia reprodutiva e controle da fertilidade da cadela. Rev Bras Reprod Anim,. 2006;30:11–8.
38. Cordeiro RA, Coelho CG V, Brilhante RSN, Sidrim JJC, Castelo-Branco DSCM, Moura FBP, et al. Serological evidence of *Histoplasma capsulatum* infection among dogs with leishmaniasis in Brazil. Acta Trop. 2011;119(2–3):203–5.
39. Krawczak F da S, Reis IA, da Silveira JA, Avelar DM, Marcelino AP, Werneck GL, et al. Leishmania, Babesia and Ehrlichia in urban pet dogs: Co-infection or cross-reaction in serological methods? Rev Soc Bras Med Trop. 2015;48(1):64–8.

40. Camargo ZP, Baruzzi RG, Maeda SM, Floriano MC. Antigenic relationship between *Loboa lobo* and *Paracoccidioides brasiliensis* as shown by serological methods. *Med Mycol* [Internet]. 1998;36(6):413–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10206752>
41. Wheat J, French ML V, Kamel S, Tewari RP. Evaluation of cross-reactions in *Histoplasma capsulatum* serologic tests. *J Clin Microbiol*. 1986;23(3):493–9.
42. Lage RS, Oliveira GC, Busek SU, Guerra LL, Giunchetti RC, Corr??a-Oliveira R, et al. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol*. 2007;115(1–2):135–45.
43. Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, Real G Del, Ruitenber J. Cellular and Humoral Immune Responses in Dogs Experimentally and Naturally Infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun*. 1994;229–35.
44. SILVA FS. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. *Rev Trópica- Ciências Agrárias e Biológicas*. 2007.
45. Fortes MRP, Miot HA, Kurokawa CS, Marques MEA, Marques SA. Immunology of paracoccidioidomycosis. *Anais Brasileiros de Dermatologia* 2011; 86(3):516-25.
46. Borges-Walmsley MI, Chen D, Shu X, Walmsley AR. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. Vol. 10, *Trends in Microbiology*. 2002. p. 80–7.
47. Mendes-Giannini MJS, Monteiro Da Silva JL, De Fátima Da Silva J, Donofrio FC, Miranda ET, Andreotti PF, et al. Interactions of

- Paracoccidioides brasiliensis with host cells: Recent advances. Vol. 165, Mycopathologia. 2008. p. 237–48.
48. Ferreira JB, Navarro IT, Freire RL, Oliveira GG, Omori AM, Belitardo DR, et al. Evaluation of Paracoccidioides brasiliensis Infection in Dairy Goats. Mycopathologia. 2013;176(1–2):95–9.
 49. 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.
 50. Kaszak I, Planellas M, Dworecka-Kaszak B. Canine leishmaniosis – an emerging disease. Ann Parasitol. 2015;61(2):69–76.
 51. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989. p. 626.
 52. Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of Leishmania. Exp Parasitol. 1990;71(3):267–75.
 53. Nunes CM, Dias AK, Gottardi FP, De Paula HB, De Azevedo MA, De Lima VM, et al. [Polymerase chain reaction evaluation for canine visceral leishmaniasis diagnosis in dog blood samples]. Rev Bras Parasitol Vet [Internet]. 2007;16(1):5–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17588315>
 54. Passos VMA, Fernandes O, Lacerda PAF, Volpini AC, Gontijo CMF, Degraive W, et al. Leishmania (Viannia) braziliensis is the predominant species infecting patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Southeast Brazil. Acta Trop. 1999;72(3):251–8.

55. Kasuga T, White TJ, Taylor JW. Letter to the Editor Estimation of Nucleotide Substitution Rates in Eurotiomycete Fungi. *Mol Biol Evol.* 2002;19(12):2318–24.
56. Theodoro RC, Candeias JMG, Araújo JP, Bosco SDMG, Macoris SADG, Junior LOP, et al. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. *Med Mycol* [Internet]. 2005;43(8):725–9. Available from: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/13693780500129418>
57. Mcewen JG. PCR WITH *Paracoccidioides brasiliensis* SPECIFIC PRIMERS: POTENTIAL USE IN ECOLOGICAL STUDIES. *Rev Inst Med trop S Paulo.* 41(6):351–7.
58. Maia C, Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. Vol. 158, *Veterinary Parasitology.* 2008. p. 274–87.
59. Carrillo E, Moreno J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. Vol. 128, *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 2009. p. 67–70.
60. Saridomichelakis MN. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniasis: Epidemiologic and diagnostic implications. *Vet Dermatol.* 2009;20(5–6):471–89.
61. Fortes MRP, Miot HA, Kurokawa CS, Marques MEA, Marques SA. *Paracoccidioidomycosis* immunology. *An Bras Dermatol* [Internet]. 2011;18(3):516–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21738969>
62. Restrepo A, Mcewen JG, Castan E, Eday Ä. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol.* 2001;39:233–41.

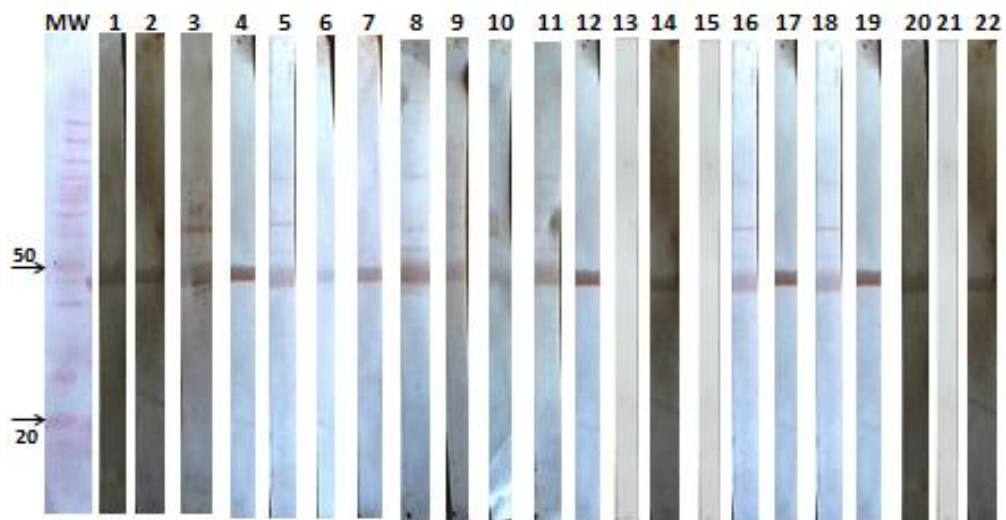


Figure 1. Evaluation by Western blotting (recombinant gp43) of serum samples (n=22) from dogs positive in immunodiffusion (exoantigen). Molecular weight showing bands of 20 and 50KDa.

ARTIGO 2

Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in a dog with visceral leishmaniasis

Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in a dog with visceral leishmaniasis

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis prevalent in Latin America, including Brazil. The etiological agents of PCM are the thermodimorphic fungi *Paracoccidioides brasiliensis* and *P. lutzii*. The infection is probably acquired by inhalation of infective propagules present in the environment. The habitat of *Paracoccidioides spp* in nature, however, remains still undefined. Sentinel animals such as dogs could be useful indicators of *Paracoccidioides spp* presence in endemic areas. Previous studies of our group showed high rates of infection by *P. brasiliensis* in dogs seropositive for leishmaniasis. The aim of this study was to detect *Paracoccidioides spp* through culture and molecular assays in dogs seropositive for leishmaniasis and PCM. The serum samples from dogs positive and negative for leishmaniasis (n=128) were analyzed by immunodiffusion test and 7 (5.4%) were positive for PCM, and most of these samples (n=6) were also positive for leishmaniasis. Tissue samples (lymph nodes and skin lesions) from one dog seropositive for leishmaniasis and PCM were cultured in Agar Sabouraud with chloranfenicol and analyzed by PCR for leishmaniasis and PCM, using primers 13A/B to detect *Leishmania spp* and α -TUB, PbITS-E/R and P27 primers for *P. brasiliensis*. It was possible to detect a fragment of 120bp using primers 13A/B to detect *Leishmania spp*, confirming the seropositivity obtained by immunological assays. About PCM, it was possible to detect a 387bp-product in tissues only through the use of PbITS-E/R primers. A colony with macroscopic

characteristics of *P. brasiliensis* was recovered from the culture of skin lesion and the microscopic analysis showed yeast cells similar to *P. brasiliensis*. The new isolated of *P. brasiliensis* was confirmed by PCR using α -TUB, PbitSE/R and P27 primers, and subsequently confirmed by sequencing, showing identity of 99% with *P. brasiliensis*. This is the first report of *P. brasiliensis* detection in a dog with leishmaniasis.

Key words: Paracoccidioidomycosis. Visceral leishmaniasis. dogs

INTRODUCTION

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a deep systemic mycosis caused by fungi of the *Paracoccidioides* genus, *P. brasiliensis* and *P. lutzii* (1). The disease is geographically restricted to subtropical areas of Latin America, with a high prevalence in agricultural worker from Brazil, Colombia, Venezuela, and Argentina (2).

PCM can be classified as PCM infection (infected individuals living in PCM endemic areas without symptoms of disease) and PCM disease (patients with clinical symptoms) (3). There are two main clinical forms of PCM disease: the acute or sub-acute form (juvenile type) and the chronic form (adult type) (4). The clinical manifestations depend on the virulence of the infecting strain of *P. brasiliensis*, the degree and type of immune response triggered, infected tissues, and intrinsic characteristics of the host (5,6)

Infection by *P. brasiliensis* has also been reported in domestic and wild animals such as dogs (7–9), horses (10,11), cows (12,13), sheep, goats,

chickens, rabbits, pigs (14–18), monkeys (19), armadillos and small wild rodents (20,21).

Dogs, due to the habit of digging and sniffing the soil, probable habitat of *Paracoccidioides spp.*, may be good epidemiological markers of PCM. The susceptibility of dogs to PCM development has been shown by experimental infection (22) and by the reports of natural PCM in three dogs from Brazil (23,24). Ricci et al. (23) reported the first case of natural PCM in a dog. The animal, an adult female Doberman, developed cervical lymphadenomegaly and the diagnosis was confirmed by immunohistochemistry and Nested-PCR to gp43 gene region. Farias et al (24) reported the second case of PCM in another female six-year-old Doberman that presented hepatosplenomegaly and lymphadenomegaly with progressive weight loss. Diagnosis in this case was made by culture, immunohistochemistry and histopathology. The third description of clinical PCM in dogs, was reported in a 5-year-old female Labrador dog that had enlargement of most superficial lymph nodes and dermatitis associated with *P. brasiliensis* (25).

Silveira et al. (9) evaluated the presence of antibodies against *P. brasiliensis* in dogs seropositive and seronegative for leishmaniasis in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. A total of 836 serum samples, positive (n=449) and negative (n=387) to leishmaniasis were analyzed by immunodiffusion test, and a positivity of 7.3% was observed. A higher reactivity to *P. brasiliensis* antigens in samples positive for leishmaniasis than in negative ones, suggested co-infection by *P. brasiliensis* and *Leishmania* or cross-reactivity.

Leishmaniasis is a parasitic disease caused by protozoans of the genus *Leishmania*, transmitted by the bite of the phlebotomine sand fly. The disease can manifest in the forms cutaneous, mucocutaneous and visceral, depending on the parasite species and host immune response. Visceral leishmaniasis (VL) is caused by *Leishmania (L.) infantum chagasi* and is a zoonotic disease, being domestic dogs the main reservoir hosts, with occasional infection of humans (26,27).

Taking into account that dogs are susceptible to infection by *P. brasiliensis* and *Leishmania* sp.; and that previous studies of our group showed a high rate of infection by *P. brasiliensis* in dogs seropositive for leishmaniasis, the objective of this study was to detect *P. brasiliensis* in dogs seropositive for leishmaniasis and paracoccidioidomycosis.

MATERIALS AND METHODS

Study area

Aracatuba is a municipality of São Paulo state, located at 21°12'32" S and 50°25'58" W, with an altitude of 390 m. The population is about 191.662 inhabitants, it is the seat of the ninth administrative region of São Paulo, being the second largest city of the west of São Paulo state (Figure 1). The climate is Aw, with tropical climate, dry winter and rainy period in the summer, average temperature of 22,2°C, and annual average of precipitation of 1200 mm (<http://pt.climate-data.org/>)

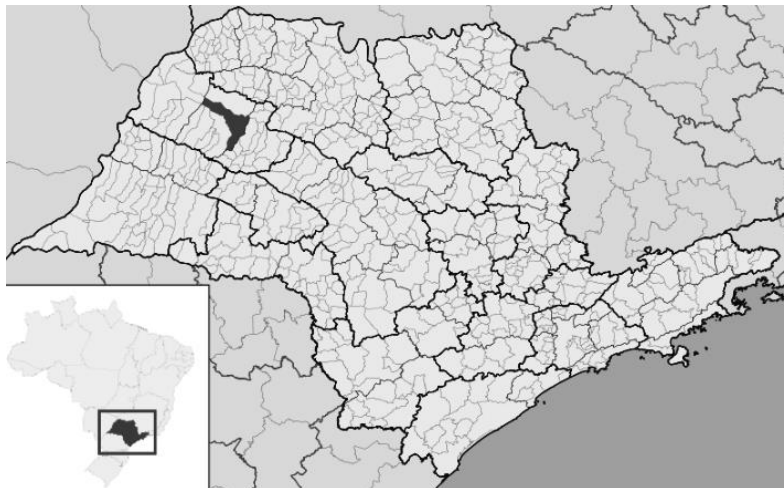


Figure 1. Map showing location of Araçatuba municipality in São Paulo State.

Serum samples

Serum samples of dogs from Araçatuba municipality were forwarded by Zoonosis Control Center (CCZ) of Araçatuba to the Regional Adolfo Lutz Institute (IAL) located in the same city. It was performed DPP[®] rapid test and ELISA (EIE[®]) for canine visceral leishmaniasis (CVL). All the assays were performed according manufacture's instructions (BioManguinhos- FIOCRUZ). Positive (n=66) and negative (n=62) samples for leishmaniasis were chosen of random way for the research of PCM.

Immunodiffusion test

The serum samples were analyzed by immunodiffusion test using *P. brasiliensis* exoantigen as reagent, as described previously by CAMARGO et al. (28). Serum samples were added at peripheral orifices and the exoantigen at the central orifice. A serum sample from a human patient with PCM was used as positive control.

All positive samples in immunodiffusion that were also positive for leishmaniasis, had tissue samples (lymph nodes and skin lesions) collected after euthanasia to be cultured in Agar Sabourad with chloranfenicol and analyzed by PCR.

Culture of tissue samples

Fragments of lymph nodes and skin lesions from one dog were cultured in Agar Sabourad Dextrose with chloranfenicol (50µg/ml) and incubated at 37°C.

DNA extraction

DNA extractions from lymph nodes and skin lesions were performed using the phenol–chloroform-isoamyl alcohol method (29). DNA was precipitated with 2.5x volume of cold ethyl alcohol P.A. and sediment washed with cold alcohol 70%. DNA was eluted with ultrapure water and samples were quantified using the NanoDrop™ Lite (Thermo Scientific, CA, USA), with concentrations adjusted to 500ng/µl for those samples with highest concentrations. This concentration was based on study of Colombo (30) in which DNA from canine lymph nodes were extracted and concentration adjusted for 250 ng/µl, and 5 µl of template DNA utilized in conventional PCR (final concentration: 1250 ng).

PCR analysis

For all PCR analysis were used 8.0 µl of ultrapure water, 12.5 µl GoTaq 2x (Promega, USA), 1 µl Forward primer and 1 µl Reverse primer at 10ng/µl each one; and 2.5 µl of template DNA (final concentration: 1250ng). All the PCR reactions were run on a BioCycler Thermal Cycler (BIOSYSTEMS, Barcelona, Spain) and the amplicons visualized by electrophoresis on 10% polyacrylamide gel followed by silver staining. The fragment sizes were estimated based on comparisons with a 100-bp ladder (Invitrogen, Waltham, MA USA).

PCR for *Leishmania spp* detection

The detection of *Leishmania spp* was performed by the use of primers 13A (5'-GTG GAG GGG CGT TCT -3') and 13B (5'-ATT TTA CAC CAA CCC CCA GTT- 3'), as described for Rodgers, Popper and Wirth (31), and Nunes et al. (32). These primers are similar to primers 150/152 (33), a molecular marker that identify *Leishmania spp* genus and amplify a 120bp-product from k-DNA minicircles, with annealing temperature of 55°C. DNA obtained from *Leishmania (Leishmania) amazonensis (LLa)* were used as positive control.

PCR for *P. brasiliensis* detection

In order to detect *P. brasiliensis*, it was carried out PCR reactions using the following primers sets: α-Tub gene, α-TubF (5' -CTG GGA GGT ATG ATA ACA CTG C-3') and α-TubR (5'-CGT CGG GCT ATT CAG ATT TAA G-3') (34) with a 270bp-product and the annealing temperature of 60°C; ITS region, PbITS-E (5' GAGCTTTGACGTCTGAGACC 3') and Pb ITS-R (5' AAGGGTGTTCGATCGAGAGAG 3') (35) with a 387bp-product with annealing

temperature of 62°C; And p27 gene, LO (5' CTCTTGGCTTTGGTTGAAG 3') and UP (5' CTGTTGTTTCCGTCCTTGCG 3') (36) with a 536bp-product and annealing temperature of 60°C. DNA obtained from *P. brasiliensis* were used as positive control.

Sequencing of *P. brasiliensis*

Amplicons obtained with α -Tub primers were purified by ammonium acetate and the sequencing reactions were carried out by Big Dye® Terminator Sequencing Kits. The sequences were compared to the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Quality Controls

It was included one negative control (ultrapure water DNA-free) per five amplified specimens to exclude any carryover contamination during the PCR process. These negative controls contained all necessary components for PCR, except DNA template.

RESULTS AND DISCUSSION

A total of 128 serum samples were analyzed by immunodiffusion test for PCM, of which 62 were negative (48.5%) and 66 positive (51.5%) for leishmaniasis. A total of 7 samples (5.4%) were positive for PCM, being 6 previously positive for leishmaniasis.

Lymph nodes and skin lesions samples from a 4-year-old male mongrel dog, seropositive for leishmaniasis and PCM were obtained, and submitted to

culture and PCR. Figures 2 and 3 confirm the infection of this dog by *Leishmania* sp. and *P. brasiliensis* respectively.

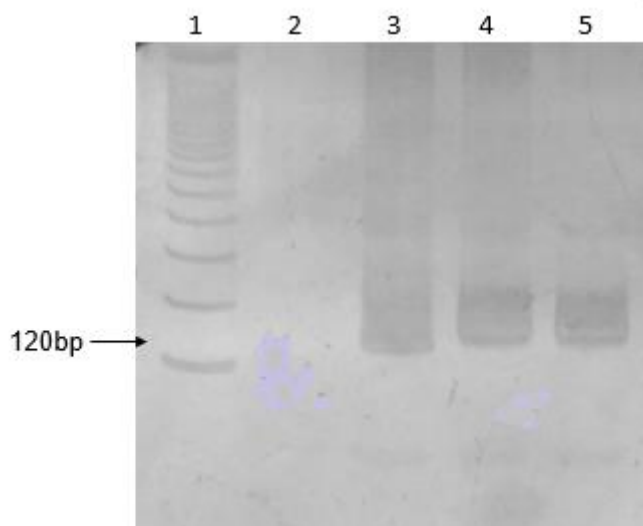


Figure 2. Detection of *Leishmania* spp fragment by PCR. Ladder 100bp(1), Negative control (ultrapure water)(2), Positive control (DNA from *Leishmania amazonensis*)(3), Lymph node(4), Skin lesion(5).

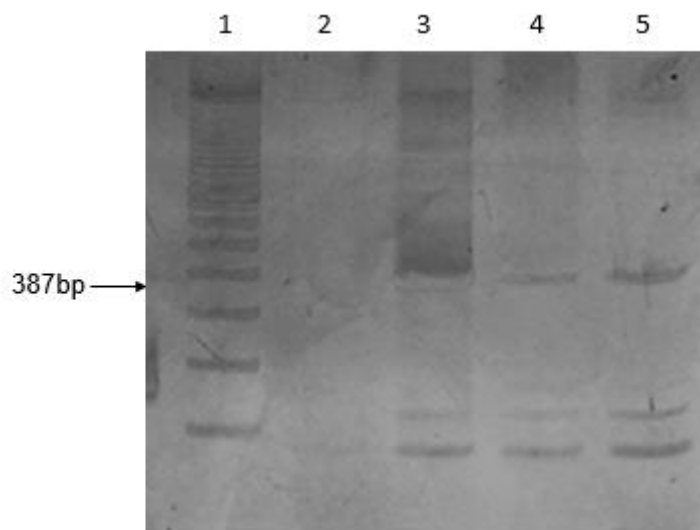


Figure 3. Detection of *P. brasiliensis* fragment by PCR using PbITS-E/R primers. Ladder 100bp (1), Negative control (ultrapure water)(2), Positive control (DNA from *P. brasiliensis*)(3), Lymph node(4), Skin lesion(5).

The culture of skin lesions samples showed a colony with macroscopic and microscopic characteristics of *P. brasiliensis* yeast cells (Figure 4).

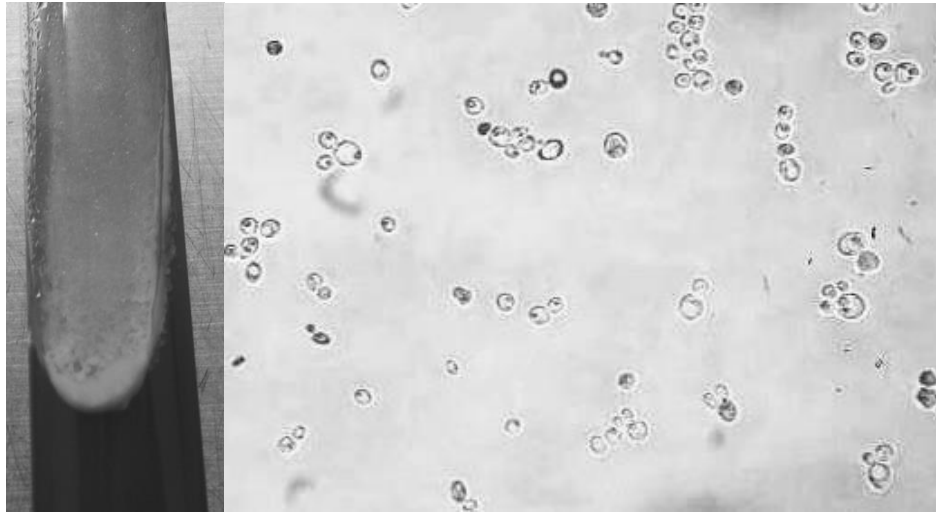


Figure 4. Morfological aspect of *P. brasiliensis* in cultures of skin lesions. Macroscopic and microscopic aspect of *Paracoccidioides spp* in culture of skin lesions from dog seropositive for PCM and leishmaniasis (40x)

PCR analysis of the DNA from yeast colony with primers for *P. brasiliensis* α -TUB, PbitSE/R and P27 showed positive results for all primers tested (Figure 5). The molecular identities of amplicon were confirmed by direct double strand sequencing which showed identity of 99% with *P. brasiliensis* DNA sequences deposited at Gen Bank (DQ003789.1 Accession).

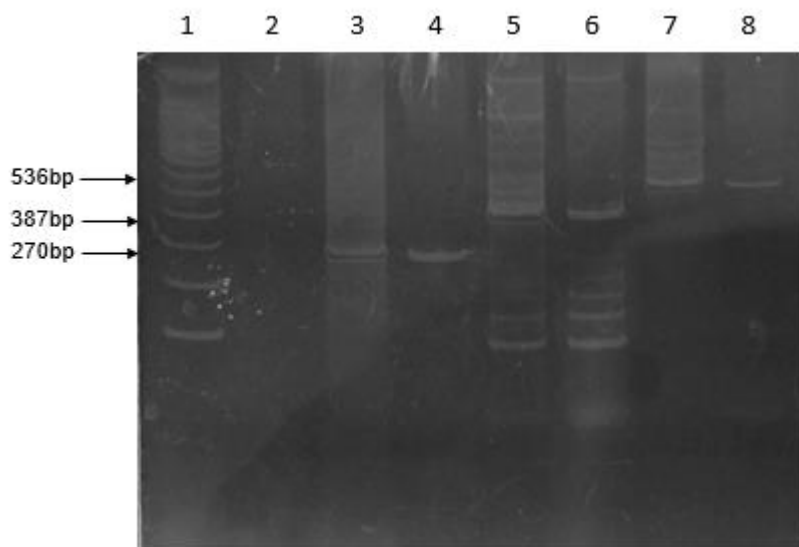


Figure 5. PCR for *P. brasiliensis* from the culture, using primers α -TUB F/R (270bp), PbITSE/R (387bp) and P27 (536bp). Ladder 100bp (1); Negative control (ultrapure water) (2), Positive control (DNA from Pb/ α -TUB) (3), DNA from culture/ α -TUB (4), Positive control (DNA from Pb/PbITSE/R) (5), DNA from culture/PbITSE/R (6), Positive control (DNA from Pb/P27) (7), DNA from culture/ P27 (8).

The results of this study confirm the hypothesis of co-infection by *P. brasiliensis* and *Leishmania spp.* in dogs, suggested previously by our group (9).

Serological evidence of co-infection of dogs by *Histoplasma capsulatum* and *Leishmania sp.* was reported in a study performed by Cordeiro et al. (37) in northeastern Brazil. The authors analyzed by immunodiffusion a total of 224 serum samples and antibodies against *H. capsulatum* were detected in four samples (1.78%), three of which were also positive for leishmaniasis.

Krawczak et al. (38) evaluated the occurrence of co-infection or cross-reaction in the serological techniques used for detecting antibodies against *Leishmania spp.*, *Babesia canis vogeli* and *Ehrlichia canis* in urban dogs from Southeast Brazil. The authors demonstrated co-infection with *Ehrlichia* or

Babesia and *Leishmania* in dogs, and no cross-reactivity was observed in the serological tests evaluated.

Clinical appearance and evolution of leishmaniasis is a consequence of complex interactions between the parasite and the genetic and immunological background of the host. It is widely accepted that in susceptible animals the progression of infection to active disease is characterized by a marked humoral response, a cellular immune depression against the parasite. On the other hand, resistant dogs lack clinical signs, develop low levels of anti-*Leishmania* antibodies and parasite load, and develop a strong cellular immune response and a positive skin test to leishmanial antigens (39–41).

Dogs susceptible to visceral leishmaniasis show a Th-2 immunological profile (42) and dogs resistant show low levels of antibodies and development of specific cellular-immunity, with production of IL-2, TNF, and IFN- γ (43). Taking into account that a similar pattern of susceptibility/resistance is observed in paracoccidioidomycosis (44), probably, dogs with leishmaniasis would be more susceptible to PCM disease.

The dog positive to *P. brasiliensis* in this study, resided in a house located at a peripheral region of Araçatuba municipality, located at east side, near a native forest. The ecological characteristics of this area are similar to those reported in epidemiological studies of paracoccidioidomycosis in humans (45).

The results of this study reinforces that dogs are good sentinels for detection of *P. brasiliensis* in environment. To the best of our knowledge, this is the first report describing the detection of *P. brasiliensis* in a dog with leishmaniasis.

REFERENCES

1. Theodoro RC, Teixeira M de M, Felipe MSS, Paduan K dos S, Ribolla PM, San-Blas G, et al. Genus *Paracoccidioides*: Species recognition and biogeographic aspects. *PLoS One*. 2012;7(5).
2. San-Blas G, Niño-Vega G, Iturriaga T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol* [Internet]. 2002;40(3):225–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12146752>
3. Franco M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol* [Internet]. 1987;25(1):5–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3553526>
4. Borges-Walmsley MI, Chen D, Shu X, Walmsley AR. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. Vol. 10, *Trends in Microbiology*. 2002. p. 80–7.
5. Benard G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. Vol. 165, *Mycopathologia*. 2008. p. 209–21.
6. Mendes-Giannini MJS, Monteiro Da Silva JL, De Fátima Da Silva J, Donofrio FC, Miranda ET, Andreotti PF, et al. Interactions of *Paracoccidioides brasiliensis* with host cells: Recent advances. Vol. 165, *Mycopathologia*. 2008. p. 237–48.
7. Mos E, Fava Netto C. Contribuição ao estudo da paracoccidioidomicose - I. Possível papel dos cães. Estudo sorológico e anátomo-patológico. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1974;16:154–9.
8. Ono MA, Bracarense AP, Morais HS, Trapp SM, Belitardo DR, Camargo ZP. Canine paracoccidioidomycosis: a seroepidemiologic study. *Med Mycol* [Internet]. 2001;39(3):277–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=m&form=6&dopt=r&uid=11446531%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11446531>
9. Silveira LH, Domingos IH, Kouchi K, Itano EN, Silva EA, Landgraf VO, et al. Serological detection of antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* in dogs with leishmaniasis. *Mycopathologia*. 2006;162(5):325–9.
10. Conti-Diaz IA, Alvarez BJ, Gezuele E, Gonzalez Marini H, Duarte J, Falcón J. Intradermal reaction survey with paracoccidioidin and histoplasmin in horses. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1972;14:372–6.
11. Corte AC, Itano E., Freire RL, Camargo ZP, Ono MA. Detection of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in horses from northern

- Region of Paraná State. *Semina Ciências Agrárias* 2009;30:441–6.
12. Gutierrez AH, Ceballos GC, Ferrer HIP. Encuesta sobre tuberculosis, histoplasmosis y paracoccidioidomycosis en ganado lechero del valle del Aburra. *Antioq Med* 1974;24:339–58..
 13. Silveira LH, Paes RCS, Medeiros E V., 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.
 14. Oliveira GG, Navarro IT, Freire RL, Belitardo DR, Silveira LH, Camargo ZP, et al. Serological Survey of Paracoccidioidomycosis in Sheep. *Mycopathologia*. 2012;173(1):63–8.
 15. Oliveira GG, Silveira LH, Itano EN, Soares RM, Freire RL, Watanabe MAE, et al. Serological Evidence of *Paracoccidioides brasiliensis* Infection in Chickens from Parana and Mato Grosso do Sul States, Brazil. *Mycopathologia*. 2011;171(3):197–202.
 16. Belitardo DR, Calefi AS, Sbeghen MR, de Oliveira GG, Watanabe MAE, de Camargo ZP, et al. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Mycoses*. 2014;57(4):222–7.
 17. Belitardo DR, Calefi AS, Borges IK, de Oliveira GG, Sbeghen MR, Itano EN, et al. Detection of Antibodies Against *Paracoccidioides brasiliensis* in Free-Range Domestic Pigs (*Sus scrofa*). *Mycopathologia*. 2014;177(1–2):91–5.
 18. Ferreira JB, Navarro IT, Freire RL, Oliveira GG, Omori AM, Belitardo DR, et al. Evaluation of *Paracoccidioides brasiliensis* Infection in Dairy Goats. *Mycopathologia*. 2013;176(1–2):95–9.
 19. Corte AC, Svoboda WK, Navarro IT, Freire RL, Malanski LS, Shiozawa MM, et al. Paracoccidioidomycosis in wild monkeys from Parana State, Brazil. *Mycopathologia*. 2007;164(5):225–8.
 20. Sbeghen MR, Zanata TB, Macagnan R, de Abreu KC, da Cunha WL, Watanabe MAE, et al. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in small wild mammals. *Mycopathologia* 2015; 180(5-6): 435-40.
 21. 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.
 22. Ono M A., Kishima MO, Itano EN, Bracarense A. PFRL, Camargo ZP. Experimental paracoccidioidomycosis in dogs. *Med Mycol* 2003; 41(3):265-8.
 23. Ricci G, Mota FT, Wakamatsu a, Serafim RC, Borra RC, Franco M. Canine paracoccidioidomycosis. *Med Mycol*. 2004;42(4):379–83.
 24. de Farias MR, Zeni Condas LA, Ribeiro MG, de Gimenes Bosco SM,

- Muro MD, Werner J, et al. Paracoccidioidomycosis in a Dog: Case Report of Generalized Lymphadenomegaly. Vol. 172, Mycopathologia. 2011. p. 147–52.
25. Headley S, Pretto-Giordano L, Santis G Di, Gomes L, Macagnan R, Nóbrega D da, et al. Paracoccidioides brasiliensis-associated dermatitis and lymphadenitis in a dog. Mycopathologia. 2016;[Epub ahead print].
 26. Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Costa CHN. Urban parasitology: Visceral leishmaniasis in Brazil. Trends in Parasitology 2011; 27 (9): 403-9.
 27. Kaszak I, Planellas M, Dworecka-Kaszak B. Canine leishmaniosis – an emerging disease. Ann Parasitol. 2015;61(2):69–76.
 28. Camargo ZP, Unterkircher C, Campoy SP, Travassos LR. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. J Clin Microbiol 1988; 26:2147-2151.
 29. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989. p. 626.
 30. Colombo FA. Detecção de RNA de Leishmania (Leishmania) infantum chagasi em pulgas e carrapatos coletados de cães naturalmente infectados e padronização de uma PCR em tempo real para diagnóstico e diferenciação de espécies de Leishmania. 2012.
 31. Rodgers MR, Popper SJ, Wirth DF. Amplification of kinetoplast DNA as a tool in the detection and diagnosis of Leishmania. Exp Parasitol. 1990;71(3):267–75.
 32. Nunes CM, Dias AK, Gottardi FP, De Paula HB, De Azevedo MA, De Lima VM, et al. [Polymerase chain reaction evaluation for canine visceral leishmaniasis diagnosis in dog blood samples]. Rev Bras Parasitol Vet [Internet]. 2007;16(1):5–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17588315>
 33. Passos VMA, Fernandes O, Lacerda PAF, Volpini AC, Gontijo CMF, Degrave W, et al. Leishmania (Viannia) braziliensis is the predominant species infecting patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Minas Gerais, Southeast Brazil. Acta Trop. 1999;72(3):251–8.
 34. Kasuga T, White TJ, Taylor JW. Letter to the Editor Estimation of Nucleotide Substitution Rates in Eurotiomycete Fungi. Mol Biol Evol. 2002;19(12):2318–24.
 35. Theodoro RC, Candeias JMG, Araújo JP, Bosco SDMG, Macoris SADG, Junior LOP, et al. Molecular detection of Paracoccidioides brasiliensis in soil. Med Mycol [Internet]. 2005;43(8):725–9. Available from: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/13693780500129418>
 36. Mcewen JG. PCR WITH Paracoccidioides brasiliensis SPECIFIC PRIMERS: POTENTIAL USE IN ECOLOGICAL STUDIES. Rev Inst Med

- trop S Paulo. 41(6):351–7.
37. Cordeiro RA, Coelho CG V, Brilhante RSN, Sidrim JJC, Castelo-Branco DSCM, Moura FBP, et al. Serological evidence of *Histoplasma capsulatum* infection among dogs with leishmaniasis in Brazil. *Acta Trop.* 2011;119(2–3):203–5.
 38. Krawczak F da S, Reis IA, da Silveira JA, Avelar DM, Marcelino AP, Werneck GL, et al. Leishmania, Babesia and Ehrlichia in urban pet dogs: Co-infection or cross-reaction in serological methods? *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015;48(1):64–8.
 39. Maia C, Campino L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. Vol. 158, *Veterinary Parasitology.* 2008. p. 274–87.
 40. Carrillo E, Moreno J. Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis. Vol. 128, *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 2009. p. 67–70.
 41. Saridomichelakis MN. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: Epidemiologic and diagnostic implications. *Vet Dermatol.* 2009;20(5–6):471–89.
 42. Lage RS, Oliveira GC, Busek SU, Guerra LL, Giunchetti RC, Corrêa-Oliveira R, et al. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2007;115(1–2):135–45.
 43. Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, Real G Del, Ruitenberg J. Cellular and Humoral Immune Responses in Dogs Experimentally and Naturally Infected with *Leishmania infantum*. *Infect Immun.* 1994;229–35.
 44. Fortes MRP, Miot HA, Kurokawa CS, Marques MEA, Marques SA. Paracoccidioidomycosis immunology. *An Bras Dermatol* [Internet]. 2011;18(3):516–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21738969>
 45. Restrepo A, Mcewen JG, Castan E, Eday Ä. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol.* 2001;39:233–41.

3. CONCLUSÃO

Estes dados confirmam a hipótese do cão ser um bom indicador da presença do fungo no ambiente e é o primeiro relato de co-infecção por *Leishmania spp* e *Paracoccidioides brasiliensis* em cães.

REFERENCIAS

- ALBORNOZ, M.B. **Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela.** *Sabouraudia*, v. 9, p. 248-253, 1971.
- ALVES, A.S., MOUTA-CONFORT, E., FIGUEIREDO, F.B., OLIVEIRA, R.V.C., SCHUBACH, A.O., MADEIRA, M.F. **Evaluation of serological cross-reactivity between canine visceral leishmaniasis and natural infection by *Trypanosoma caninum*.** *Res. Vet. Sci.* 93, 1329–1333, 2012.
- BAGAGLI, E. **Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an area of paracoccidioidomycosis.** *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 58, p. 505-512, 1998.
- BARROS, J.H.S., ALMEIDA, A.B.P.F., FIGUEIREDO, F.B., SOUSA, V.R.F., FAGUNDES, A., PINTO, A.G.S., BAPTISTA, C., MADEIRA, M.F. **Occurrence of *Trypanosoma caninum* in areas overlapping with leishmaniasis in Brazil: what is the real impact of canine leishmaniasis control?** *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 106, 419–423, 2012.
- BELITARDO, D.R.; CALEFI, A.S.; SBEGHEN, M.R. et al. ***Paracoccidioides brasiliensis* infection in domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*).** *Mycoses*. 2014a, Apr;57(4):222-7.
- BELITARDO, D.R.; CALEFI, A.S.; BORGES, I.K. et al. **Detection of antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* in free-range domestic pigs (*Sus scrofa*).** *Mycopathologia*. 2014b Feb;177(1-2):91-5.
- BERN, C; JOSHI, AB; JHA, SN; LAL DAS, M; HIGHTOWER, GD; THAKUR, GD; BISTA, MB. **Factors associated with visceral leishmaniasis in Nepal: bed- net use is strongly protective.** *Am J Trop Med Hyg.* 63: 184-188, 2000.
- BIALEK R, IBRICEVIC A, AEPINUS C, NAJVAR LK, FOTHERGILL AW, KNOBLOCH J, GRAYBILL JR. **Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue samples by a nested PCR assay.** *J Clin Microbiol.* 38(8):2940-2, 2000.
- BLOTTA, M.H.; MAMONI, R.L.; OLIVEIRA, S.J. et al.: **Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region.** *Am J Trop Med Hyg*, 61:390–394, 1999.
- BOUSQUET, A.; DUSSART, C.; DROUILLARD, I. et al. **Imported mycosis: a review of paracoccidioidomycosis [in French].** *Med Mal Infect*, 37(Suppl 3):S210–S214, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância e controle da leishmaniose visceral.** Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 120 p. 2006.

_____. Ministério da Saúde do Brasil - Portal da saúde. 2011a Disponível em:
http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=

_____. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Nota Técnica Conjunta nº 1, de 2011: Esclarecimentos sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC)**. Brasília: Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis/Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública; 2011b.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. 1 ed. 5ª reimpr. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 120p, 2013.

_____. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento e Ministério da Saúde. **Nota Técnica Conjunta nº 1, de 2016: Autorização do registro do produto MILTEFORAN da empresa VIRBAC SAÚDE ANIMAL para tratamento de leishmaniose visceral canina**. Brasília, 2016.

BRUMMER, E.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A.; AZZI, R.; GOMEZ, A.; HOYOS, G.; McEWEN, J.; CANO, L.; DeBEDOUT, C. **Murine model of paracoccidioidomycosis. Production of fatal acute pulmonary or chronic pulmonary and disseminated disease: immunological and pathological observations**. *J. Exp. Path.*, 1, p. 241, 1984.

CAMARGO, Z.P.; UNTERKIRCHER, C.S.; CAMPOY, S.P.; TRAVASSOS, L.R. **Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests**. *J. Clin. Microbiol.*, v. 26, p. 2147-51, 1988.

CAMARGO-NEVES, VLF & KATZ, G. **Leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo**. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 32 (Supl.II): 63-64, 1999.

CAMARGO-NEVES, VLF. **A leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo**. BEPA Boletim Epidemiológico Paulista, 6. 2004. Disponível em: <http://www.sucen.sp.gov.br> ou <http://www.cve.saude.sp.gov.br>

CAMARGO-NEVES, VLF; KATZ, G; RODAS, LAC; POLETTO, DW; LAGES, LC; SPINOLA, RMF; CRUZ, OG. **Use of spatial analysis tools in the epidemiological surveillance of American visceral leishmaniasis, Araçatuba, São Paulo, Brazil, 1998 – 1999**. *Cad. Saúde Pública, R. Janeiro.*; 17: 1263- 1267, 2001.

CAMARGO-NEVES, VLF; RODAS, LAC; POLETTO, DW; GOMES, AC. **Feeding habit of *Lutzomyia longipalpis* in Araçatuba county, State São Paulo, Brasil**. *Entom. Vector.* 2002.

CARRERO, L.L.; NIÑO-VEJA, G.; TEIXEIRA, M.M.; CARVALHO, M.J.; SOARES, C.M.; PEREIRA, M. et al. **New *Paracoccidioides brasiliensis***

isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen.

Fungal Genet Biol. 45:605-12, 2008.

CONTI-DIAZ, I.A.; ALVAREZ, B.J.; GEZUELE, E.; GONZALEZ MARINI, H.; DUARTE, J.; FALCON., J. **Intradermal reaction survey with paracoccidioidin and histoplasmin in horses.** *Rev. Inst Med Trop São Paulo.*; v. 14: p. 372-6, 1972.

CONTI DÍAZ, I.A. **On the unknown ecological niche of *Paracoccidioides brasiliensis*. Our hypothesis of 1989: Present status and perspectives.** *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.* 49(2):131-134, March-April, 2007.

CORREA, M.M.; BEDOYA, A.M.; GUERRERO, M.P.; MENDEZ, J.; RESTREPO, A.; McEWEN, J.G. **Diagnosis of paracoccidioidomycosis by a dot blot assay using a recombinant *Paracoccidioides brasiliensis* p27 protein.** *Mycoses.* 50: 41–47, 2006.

CORTE, A.C.; SVOBODA, W.K.; NAVARRO, I.T. et al.: **Paracoccidioidomycosis in wild monkeys from Parana State, Brazil.** *Mycopathologia*, 164:225–228, 2007.

COSTA, C. H. N.; VIEIRA, J. B. F. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 34, p. 223-228, 2001.

COSTA, E., FAVA NETO, C. **Paracoccidioidina and histoplasmina intradermic tests in domestic animals.** *Sabouradia*, 16:103-111, 1978.

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

COUTINHO, Z.F.; SILVA, D.; LAZERA, M.; PETRI, V.; OLIVEIRA, R.M.O.; SABORZA, P.C. e WANKE, B. **Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980–1995).** *Cad Saúde Pública*, 18: 1441–54, 2002.

CVE –SP - Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo, 2011. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/lvah_auto9904.htm.

DEANE, LM. & DEANE, MP. **Visceral leishmaniasis in Brazil: distribution and transmission.** *Rev. Inst. Med. Trop.* 4: 198-212, 1962.

DESJARDINS, C.A.; CHAMPION, M.D.; HOLDER, J.W.; MUSZEWSKA, A.; GOLDBERG, J.; BAILÃO, A.M. et al. **Comparative genomic analysis of human fungal pathogens causing paracoccidioidomycosis.** *PLOS Genet.* 2011.

FARIAS, M.R.; CONDAS, L.A.; RIBEIRO, M.G.; BOSCO, S.M.; MURO, M.D.; WERNER, J.; THEODORO, R.C.; BAGAGLI, E.; MARQUES, S.A.; FRANCO,

M. **Paracoccidioidomycosis in a dog: case report of generalized lymphadenomegaly.** *Mycopathologia*, 172:147–52, 2011.

FAVA NETTO, C. **Contribuição para o estudo imunológico de blastomicose de Lutz.** *Rev. Inst. Adolpho Lutz (São Paulo)*, v. 21, p. 99-194, 1961.

FAVA, S DI; NETTO, C.F. **Epidemiologic surveys of histoplasmin and paracoccidioidin sensitivity in Brazil.** *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 40:155–164, 1998.

FRANCINO, O. et al. **Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis.** *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 137, p. 214-221, 2006.

FRANCO M. **Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis.** *J Med Vet Mycol.* 25: 5–18, 1986.

FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO-MORENO,A.; DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomycosis.** Boca Raton: CRC Press, 409p. 1994.

FRANCO, M.; MONTENEGRO, M.R.G. **Anatomia patológica.** In *Paracoccidioidomycose: Blastomicose Sul-americana.* Editado por G. del Negro, C. da S. Lacaz, A. M. Fiorillo. São Paulo, Sarvier, 97-117, 1982.

GÓMEZ, B.L.; FIGUEROA, J.L.; HAMILTON, A.J.; ORTIZ, B.; ROBLEDO, M.A.; HAY, R.J.; RESTREPO, A. J. *Clin. Microbiol.* 35 (1997) 3278. In: TELES, F.R.R. & MARTINS, M.L. **Laboratory diagnosis of paracoccidioidomycosis and new insights for the future of fungal diagnosis.** *Review. Talanta* 85, 2011.

GROSE, E. e TAMSITT, J. R. **Paracoccidioides brasiliensis recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colômbia.** *Sabouraudia*, v. 4, p. 124-10 5, 1965.

GUTIERREZ, A.H.; CEBALLOS, G.; FERRER, H.I.; RANGEL, O. **Encuesta sobre tuberculosis, histoplasmosis y paracoccidioidomycosis en ganado lechero del Valle del Aburra.** *Antioquia Medica*, v. 24, p. 339-358, 1974.

HARHAY,M.O.; OLLIARO, P.L.; COSTA, D.L.; COSTA, C.H.N. **Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil.** *Trends in Parasitology.* Vol.27, n.9, 2011.

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

KASZAK, I.; PLANELLAS, M.; DWORECKA-KASZAK, B. **Canine leishmaniosis – an emerging disease.** *Annals of Parasitology*, 61(2), 69–76, 2015.

- LACAZ, C. **Historical evolution of the knowledge on paracoccidioidomycosis and its etiologic agent, *Paracoccidioides brasiliensis***. In: Franco, M., Lacaz, C., Restrepo, A., Del Negro, G. (Eds.), *Paracoccidioidomycosis*. CRC Press, Boca Ratón. 1-11, 1994.
- LINDOSO, JAL & GOTO, H. 2007. **Leishmaniose visceral: situação atual e perspectivas futuras**. Bol. Epidemiol. Paul., 26, 7-11. [Boletim on line]. Disponível em <http://www.cve.saude.sp.gov.br>.
- LONDERO, A.T. e MELLO, I.S. **Paracoccidioidomycosis in childhood. A critical review**. Mycopathologia. 82: 49-55, 1983.
- LOPES TOLEDO, G.; MARZOLA, C.; LOPES TOLEDO FILHO, J.; MAURÍCIO CAPELARI, M.; **Blastomicose sul americana - apresentação de caso clínico tratado com associação de inidazóis sistêmico e tópico**. Rev Port Estomatol Med Dent Cir Maxilofac.;52:83-8, 2011.
- LUTZ, A. **Uma micose pseudo-coccidica localizada na boca e observada no Brasil: Contribuição ao conhecimento das hypho-blastomycoses americanas**. Bras. Med. 22: 141-144, 1908.
- MADEIRA, M.F., SOUSA, M.A., BARROS, J.H., FIGUEIREDO, F.B., FAGUNDES, A., SCHUBACH, A., DE PAULA, C.C., FAISSAL, B.N.S., FONSECA, T.S., THOMA, H.K., MARZOCHI, M.C.A. **Trypanosoma caninum n. sp. (Protozoa: Kinetoplastida) isolated from intact skin of a domestic dog (Canis familiaris) captured in Rio de Janeiro, Brazil**. Parasitology 136, 411–423, 2009.
- MARQUES SA, FRANCO MF, MENDES RP, SILVA NC, BACCILI C, CURCELLI ED, ET AL. **Epidemiologic aspects of paracoccidioidomycosis in the endemic area of Botucatu (São Paulo - Brazil)**. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1983;25(2):87-92. In: http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa51_paracocci.htm
- MATUTE DR, MCEWEN JG, PUCCIA R et al. **Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies**. Mol Biol Evol. 23: 65–73, 2006.
- MAYAYO, E.; LOPEZ-ARACIL V.; FERNANDEZ-TORRES, B. et al.: **Report of an imported cutaneous disseminated case of paracoccidioidomycosis**. Rev Iberoam Micol, 24:44–46, 2007.
- McEWEN, J.G.; GARCIA, A.M.; ORTIZ, B.L.; BOTERO, S. e RESTREPO, A. **In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis***. Arch. Med. Res. 26: 305-306, 1995.
- MENDES-GIANNINI, M. J. S.; BUENO, J. P.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; STOLF, A. M.; MASUDA, A.; AMATO NETO, V.; FERREIRA, A. W. **Antibody response to 43KDa glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* as a**

marker for the evaluation of patients under treatment. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 43, n. 2, p. 200-6, 1990.

MÓS, E. N.; FAVA NETTO, C. **Contribuição ao estudo da paracoccidioidomicose. I. Possível papel epidemiológico dos cães. Estudo sorológico e anatomo-patológico.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, v. 16, n. 3, p. 154-159, 1974.

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

NASCIMENTO, E. **Isolamento e caracterização de microssatélites no fungo patogênico humano *Paracoccidioides brasiliensis*.** Dissertação de Mestrado, 2005.

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

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

OLIVEIRA, GABRIELA G.; NAVARRO, ITALMAR T.; FREIRE, ROBERTA L.; BELITARDO, DONIZETI R.; SILVEIRA, LUCIANE H.; CAMARGO, ZOILO P.; ITANO, EIKO N.; ONO, MARIO A. **Serological survey os *Paracoccidioidomycosis* in sheep.** *Mycopathologia*, 2011.

ONO, M.A.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; MORAIS, H.A.; TRAPP, S.M.; BELITARDO, D.R.; CAMARGO, Z.P. **Canine paracoccidioidomycosis: A seroepidemiologic study.** *Med. Mycol.*, v. 39, p. 277-82, 2001.

PUCCIA, R.; SCHENKMAN, S.; GORIN, P.A.J.; TRAVASSOS, L.R. **Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen.** *Infect. Immunol.*, v. 53, p. 199-206, 1986.

QUEIROZ-TELLES F: **Influence of alternating coffee and sugar cane agriculture in the incidence of paracoccidioidomycosis in Brazil.** *Biomedica*, 28(Suppl 1):129, 2008.

QUEIROZ-TELLES, F. **Paracoccidioidomicose**, 2009. In: <http://odontounimar.blogspot.com.br/2009/10/microbiologia.html>, acesso em 14/09/2015

RAMOS-E-SILVA, M; SARAIVA L.E. **Paracoccidioidomycosis.** *Dermatol Clin*, 26:257–269, 2008.

RESTREPO, A. **The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis* a puzzle still unsolved.** *Sabouraudia*, v. 23, p. 323-34, 1985.

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

RICHINI-PEREIRA, V.B.; BOSCO, S.M.G.; THEODORO, R.C.; MACORIS, S.A.G.; BAGAGLI, E. **Molecular approaches for eco-epidemiological studies of *Paracoccidioides brasiliensis***. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 636–643, 2009.

RUFFIÉ, J. - *Traité du vivant*. Paris, Fayard, 1982.

SALAZAR, M.E.; RESTREPO, A.; STEVENS, D.A. **Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis***. *Infect Immun.* Mar;56(3):711-3, 1988.

SAN-BLAS G, NINO-VEGA G, ITURRIAGA T. ***Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics**. *Med Mycol.* 2002;40(3):225-42. In: http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa51_paracocci.htm

SBEGHEN, M.R.; ZANATA, T.B.; MACAGNAN, R. et al. ***Paracoccidioides brasiliensis* Infection in Small Wild Mammals**. *Mycopathologia.* Dec;180(5-6):435-40, 2015.

SHIKANAI-YASUDA, M.A.; TELLES FILHO, F. de Q.; MENDES, R.P.; COLOMBO, A.L. e MORETTI, M.L. **Guidelines in paracoccidioidomycosis**. *Rev Soc Bras Med Trop.* 39(3): 297-310, 2006.

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

SILVA, S.H.M.; GROSSO, D.M.; LOPES, J.D. ; COLOMBO, A.L.; BLOTTA, M.H. ; QUEIROZ- TELLES, F.; CAMARGO, Z.P. *J. Clin. Microbiol.* 42 (2004) 4480. In: TELES, F.R.R. & MARTINS, M.L. **Laboratory diagnosis of paracoccidioidomycosis and new insights for the future of fungal diagnosis**. *Review. Talanta* 85, 2011.

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

SILVA-VERGARA, M.L., MARTINEZ, R.; CAMARGO, Z.P.; MALTA, M.H.; MAFFEI, C. M.; CHADU, J.B. **Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil**. *Med Mycol.*, v. 38, p:193-199, 2000.

SILVEIRA, L.H.; DOMINGOS, I.H.; KOUCHI, K.; ITANO, E.N.; SILVA, E.A.; LANDGRAF, V.O.; WERNECK, S.M.; CAMARGO, Z.P.; ONO, M.A.

Serological detection of antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* in dogs with leishmaniasis. *Mycopathologia*, 162: 325–329, 2006.

SILVEIRA, L.H.; PAES, R.C.; MEDEIROS, E.V. et al.: **Occurrence of Antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in dairy cattle from Mato Grosso do Sul, Brazil.** *Mycopathologia*, 165:367–371, 2008.

TEIXEIRA, M.M.; THEODORO, R.C.; DE CARVALHO, M.J.; FERNANDES, L.; PAES, H.C.; HAHN, R.C. et al. **Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus.** *Mol Phylogenet Evol.* 52:273-83, 2009.

TEIXEIRA, M.M.; THEODORO, R.C.; OLIVEIRA, F.F.; MACHADO, G.C.; HAHN, R.C.; BAGAGLI, E. et al. ***Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications.** *Med Mycol.* 52:19-28, 2014.

TELES, F.R.R. & MARTINS, M.L. **Laboratory diagnosis of paracoccidioidomycosis and new insights for the future of fungal diagnosis.** *Review. Talanta* 85, 2011.

THEODORO, C.; TEIXEIRA, M.D.M.; FELIPE, M.S.S.; PADUAN, K.D.S.; RIBOLLA, P.M.; SAN-BLAS, G.; BAGAGLI, E. **Genus: species recognition and biogeographic aspects.** *PLoS One.* 2012.

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

VAN DAMME, PA; BIERENBROODSPOT, F; TELGTT, DS, et al.: **A case of imported paracoccidioidomycosis: an awkward infection in The Netherlands.** *Med Mycol*, 44:13–18, 2006.

WALKER, S.L.; PEMBROKE, A.C.; LUCAS, S.B.; VEGA-LOPEZ, F. **Paracoccidioidomycosis presenting in the UK.** *Br J Dermatol*, 158:624–626, 2008.

WANKE, B. e LONDERO, A. **Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection.** In: Franco, M., Lacaz, C.S., Restrepo-Moreno, A., Del Negro, G. eds. *Paracoccidioidomycosis.* Boca Raton, Florida, CRC Press, 109-120, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis: worldwide epidemiological and drug access update.** 2010.