



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JACQUELINE BUENO FERREIRA

**SOROEPIDEMIOLOGIA DE PARACOCCIDIOIDOMICOSE EM
CAPRINOS DO MUNICÍPIO DE PITANGA, PARANÁ**

Londrina
2009

JACQUELINE BUENO FERREIRA

**SOROEPIDEMIOLOGIA DE PARACOCCIDIOIDOMICOSE EM
CAPRINOS DO MUNICÍPIO DE PITANGA, PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Mario Augusto Ono.

Londrina
2009

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

F383s Ferreira, Jacqueline Bueno.
Soroepidemiologia de paracoccidioimicose em caprinos do município de
Pitanga, Paraná / Jacqueline Bueno Ferreira. – Londrina, 2009.
36 f. : il.

Orientador: Mário Augusto Ono.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade
Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-
Graduação em Patologia Experimental, 2009.

Inclui bibliografia.

1. Paracoccidioimicose – Teses. 2. Caprino – Doenças – Teses. 3.
Teste imunoenzimático – Teses. I. Ono, Mário Augusto. II. Universidade
Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616.993

JACQUELINE BUENO FERREIRA

**SOROEPIDEMIOLOGIA DE PARACOCCIDIOIDOMICOSE EM
CAPRINOS DO MUNICÍPIO DE PITANGA, PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Mario Augusto Ono
UEL – Londrina - PR

Profa. Dra. Roberta Lemos Freire
UEL – Londrina - PR

Profa. Dra. Maria Angelica Ehara Watanabe
UEL – Londrina - PR

Londrina, ____ de _____ de 2009.

*A Deus,
princípio e fim de todas as coisas.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por ter tido a oportunidade de concluir estes estudos, oportunidade esta que poucos a têm.

Agradeço a meus pais, a meu noivo e a toda minha família pelo apoio nas dificuldades e pela paciência no tempo de convivência que muitas vezes lhes faltou.

Minha gratidão ao Prof. Dr. Mario Augusto Ono pelo conhecimento e orientação a mim direcionados, que foram de fundamental importância para minha formação científica.

A todos os professores e funcionários que me auxiliaram neste trabalho, particularmente os professores Dr. Itamar T. Navarro e Dra. Roberta L. Freire (Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da UEL), Eiko N. Itano, Maria Angélica E. Watanabe e Emerson J. Venâncio (Departamento de Patologia Experimental da UEL) e Dr. Zoilo P. de Camargo (UNIFESP).

Muito obrigada aos colegas de laboratório, em especial Donizete R. Belitardo, Gabriela G. de Oliveira e Priscila R. Yamaoka. Certamente, sem seu auxílio e apoio, este trabalho não poderia ter sido realizado.

Aos 'animaizinhos' dos quais obtivemos os materiais biológicos deste estudo e que mais uma vez colaboraram com a pesquisa científica para melhorar a qualidade de vida do homem.

Meu sincero agradecimento a todos que de forma direta ou indireta ajudaram-me a atingir meus objetivos.

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus.
Muito, nos aproxima.”

Louis Pasteur

FERREIRA, Jacqueline B. **Soroepidemiologia de Paracoccidioomicose em caprinos do Município de Pitanga, Paraná.** 2009. 34 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina.

RESUMO

A paracoccidioomicose (PCM) é uma micose sistêmica endêmica em países da América Latina como Brasil, Venezuela, Colômbia e Argentina, que tem como agente etiológico o fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*. Alguns aspectos da ecoepidemiologia deste fungo ainda precisam ser esclarecidos, mas acredita-se que várias espécies de animais domésticos e silvestres possam infectar-se. Ensaios imunológicos têm sido utilizados para detectar a infecção por *P. brasiliensis* em humanos e em outras espécies de animais. Este estudo teve como objetivo avaliar a infecção por *P. brasiliensis* em caprinos do município de Pitanga, Paraná, através dos métodos de ELISA e imunodifusão radial dupla (IDRD), utilizando como antígenos a gp43 e o exoantígeno, respectivamente. Dois caprinos foram imunizados com células leveduriformes inativadas de *P. brasiliensis* para a avaliação da produção de anticorpos anti-gp43. Os dois animais imunizados produziram anticorpos anti-gp43 detectados por ELISA indireto. Foram analisadas 202 amostras de soros de caprinos obtidas em três propriedades rurais do município de Pitanga, sendo que 26,24% foram positivas pelo método de ELISA e nenhuma amostra reagiu pela IDRD, sugerindo que os animais apresentavam apenas PCM-infecção. Do total de amostras positivas, mais de 80% eram de animais com idade superior a 18 meses, indicando que animais adultos possam estar há mais tempo em contato com o provável *habitat* do fungo e portanto mais sujeitos à infecção. Este é o primeiro estudo que demonstrou a infecção de caprinos por *P. brasiliensis* no Estado do Paraná.

Palavras-chave: Ecoepidemiologia. *Paracoccidioides brasiliensis*. Caprinos. ELISA. Gp43.

FERREIRA, Jacqueline B. **Seroepidemiology of Paracoccidioidomycosis in caprines from Pitanga, Parana State.** 2009. 34 f. Dissertation (Master Degree in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis endemic in Latin America countries such as Brazil, Venezuela, Colombia and Argentina, caused by the thermodimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. The ecoepidemiology of this fungus is still unknown, but it is believed that several species of domestic and wild animals can be infected. Immunological assays have been used to detect the infection by *P. brasiliensis* in humans and in other animal species. The aim of this study was to detect the infection by *P. brasiliensis* in caprines from Pitanga, Parana State, by ELISA and Double Radial Immunodiffusion (IDRD), using as antigens gp43 and exoantigen, respectively. Two caprines were immunized with *P. brasiliensis* killed yeast cells to evaluate anti-gp43 antibody production. Both immunized animals produced anti-gp43 antibodies detected by indirect ELISA. Two hundred two caprine serum samples obtained in three rural properties of Pitanga municipality were assayed, and 26.24% were positive by ELISA and no sample reacted by IDRD, suggesting that the animals just presented PCM-infection. Of the total of positive samples, approximately 80% was from animals with age up 18 months old, indicating that adult animals can be a long time in contact with the probable fungus habitat and, as a result, more susceptible to infection. This is the first study showing the infection of caprines by *P. brasiliensis* in Parana State.

Key-words: Ecoepidemiology. *Paracoccidioides brasiliensis*. Caprines. ELISA. Gp43.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	<i>brain heart infusion</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
gp43	glicoproteína de 43.000 daltons
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDRD	imunodifusão radial dupla
MELISA	<i>magnetic enzyme-linked immunosorbent assay</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBS-L	leite desnatado em PBS
PBS-T	tween 20 em PBS
PCM	paracoccidiodomicose
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
S	<i>South</i>
SCCWOS	<i>soluble components of the cell wall outer surface</i>
W	<i>West</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 PARACOCCIDIOIDOMICOSE	10
1.1.1 Classificação da Doença	11
1.1.2 Métodos para o Diagnóstico da PCM	12
1.1.3 Epidemiologia da PCM em Humanos	13
1.1.4 Epidemiologia da PCM em Animais Domésticos e Silvestres	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 ÁREA DE ESTUDO E AMOSTRAS	19
3.2 CULTURA E INATIVAÇÃO DE P. BRASILIENSIS	19
3.3 IMUNIZAÇÃO DE CAPRINOS	20
3.4 ANTÍGENOS	20
3.4.1 Exoantígeno	20
3.4.2 gp43	21
3.5 IMUNODIFUSÃO RADIAL DUPLA (IDRD)	21
3.6 ELISA INDIRETO	21
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	22
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5 CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS	29

1 INTRODUÇÃO

1.1 PARACOCCIDIOIDOMICOSE

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma infecção sistêmica granulomatosa que tem como agente etiológico o fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* (BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993).

A doença foi descrita primariamente por Adolpho Lutz no ano de 1908 (SOARES *et al.*, 2008); o organismo causador foi caracterizado morfológica e biologicamente por Alfonso Splendore (1912) e Floriano Paulo de Almeida (1930) (LACAZ *et al.*, 2002).

P. brasiliensis pertence à família Onygenaceae (tabela 1), embora recentemente um clado distinto de Onygenaceae *lato sensu* tenha sido proposto como uma nova família (Ajellomycetaceae) (SAN-BLAS; NINO-VEGA, 2008; BAGAGLI *et al.*, 2008; UNTEREINER *et al.*, 2004). Apresenta-se como levedura em culturas a 35-37°C ou em tecidos infectados. Ao microscópio verificam-se células arredondadas, de dupla parede bem refringente, com ou sem gemulação, podendo atingir de 5 a 25 µm no seu maior diâmetro. Quando cultivado a uma temperatura de 25°C, cresce na forma miceliana e apresenta hifas delgadas, hialinas, septadas, multinucleadas e ramificadas (LACAZ *et al.*, 2002).

Tabela 1- Classificação Biológica de *P. Brasiliensis*.

Reino	<i>Fungi</i>
Filo	<i>Ascomycota</i>
Classe	<i>Eurotiomycetes</i>
Ordem	<i>Onygenales</i>
Família	<i>Onygenaceae</i>
Gênero	<i>Paracoccidioides</i>
Espécie	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>

Fonte: NCBI (2009); Bagagli *et al.*(2008).

O contágio por *P. brasiliensis* na natureza provavelmente acontece por meio da inalação de propágulos do fungo. A infecção primária ocorre nos pulmões, com eventual disseminação por via hematogênica e/ou linfática para outros

órgãos e tecidos, como pele, linfonodos, fígado e baço (SILVA *et al.*, 2008a; BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002; ONO *et al.*, 2001). Não há relatos de transmissão inter-humana ou congênita (BENARD, 2008).

1.1.1 Classificação da Doença

A PCM pode ser classificada em PCM-infecção e PCM-doença.

A PCM-infecção ocorre quando a resposta imune é satisfatória, mantendo em equilíbrio a relação parasita-hospedeiro. Este é um estágio assintomático e subclínico, no qual o indivíduo entra em contato com o fungo sem desenvolver sintomas. No entanto, este equilíbrio pode ser rompido, com reativação de focos latentes, evoluindo para PCM-doença, onde surgem as manifestações clínicas (MESQUITA *et al.*, 1997; LACAZ *et al.*, 2002).

A IDR é o teste sorológico mais frequentemente usado no diagnóstico e acompanhamento após o tratamento de pacientes com PCM-doença, apresentando alta especificidade (quase 100%) (NEVES *et al.*, 2003). No entanto falsos-negativos podem ser decorrentes da sensibilidade em torno de 85 a 90% (CAMARGO *et al.*, 1988; DEL NEGRO *et al.*, 1991, 1995). A PCM-infecção apresenta níveis de anticorpos séricos mais baixos do que a PCM-doença, podendo dessa forma apresentar resultados negativos pela IDR.

O uso de ensaios imunoenzimáticos como o ELISA e o Immunoblotting utilizando antígenos purificados podem melhorar significativamente a sensibilidade do diagnóstico da PCM (SILVA *et al.*, 2008b).

A PCM-doença pode ser classificada como aguda ou subaguda (tipo juvenil) ou crônica (tipo adulto) (BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993).

A forma aguda representa cerca de 3 a 5% dos casos de PCM, prevalecendo em crianças e adolescentes. É caracterizada por linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia, lesões cutâneas, dentre outras. A forma crônica da doença corresponde a mais de 90% dos casos, predominando em adultos entre 30 e 60 anos, do sexo masculino, acometendo principalmente os pulmões, a mucosa oral e o trato respiratório superior, além da pele (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).

1.1.2 Métodos para o Diagnóstico da PCM

O diagnóstico da PCM pode ser feito pela demonstração direta do agente etiológico a partir de amostras biológicas, tais como: raspado de mucosa, secreções, escarro, aspirado ganglionar ou biópsias de lesões, ou mesmo pelo diagnóstico indireto, por de técnicas imunológicas para pesquisa de anticorpos ou antígenos circulantes (SVIDZINSKI; MARTINS; CAÇADOR, 1997; TABORDA; CAMARGO, 1994). Métodos moleculares como a PCR têm sido mais recentemente usados e permitem a identificação do fungo de maneira rápida, específica e sensível (SAN-BLAS *et al.*, 2005; SILVA, 2008).

A demonstração de *P. brasiliensis* através do isolamento a partir de amostras biológicas é o padrão ouro para o diagnóstico da PCM. Todavia, nem sempre esta circunstância ideal é possível, além do que o tempo se torna um fator limitante para este tipo de diagnóstico, pois o resultado pode levar até mais de 15 dias, uma vez que o fungo apresenta crescimento lento.

Os testes sorológicos são uma alternativa mais rápida tanto para o diagnóstico como para o controle na fase de tratamento desta micose. Sua utilidade também se mostra em estudos epidemiológicos, tanto em humanos como em outras espécies de animais (ONO *et al.*, 2001; BOTTEON *et al.*, 2002, MALUF *et al.*, 2003; CORTE *et al.*, 2007; SILVEIRA *et al.*, 2008). Os seguintes métodos sorológicos têm sido usados: fixação do complemento, IDRD, contraimuno eletroforese, imunofluorescência, radioimunoensaio, inibição de hemaglutinação passiva, ensaios imunoenzimáticos, como ELISA, MELISA, Dot Blot, Western Blot, e mais recentemente ELISA de inibição (CAMARGO, 2008).

A glicoproteína de 43 kDa (gp43) é o principal antígeno exocelular de *P. brasiliensis*, que reage com a maioria dos soros positivos para PCM, podendo ser usada para o diagnóstico desta doença em testes com maior sensibilidade (ELISA) e em outros menos sensíveis, como a IDRD (CAMARGO; FRANCO, 2000; PUCCIA *et al.*, 1986).

Embora os estudos da patogenia e de métodos para diagnóstico da PCM tenham avançado nas últimas décadas, vários aspectos sobre a eco-epidemiologia de *P. brasiliensis* ainda precisam ser esclarecidos.

1.1.3 Epidemiologia da PCM em Humanos

A PCM é uma das micoses sistêmicas mais importantes da América Latina, sendo prevalente no Brasil, Colômbia, Venezuela e Argentina. No Brasil sua ocorrência é maior nas regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste. Esta micose representa a oitava causa de morte no Brasil considerando as doenças infecciosas e parasitárias predominantemente crônicas; no Paraná corresponde à quinta causa de óbitos por doenças dessa natureza (COUTINHO *et al.*, 2002). No entanto, devido ao fato de que a PCM não é uma doença de notificação obrigatória, é desconhecida sua real prevalência e incidência (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).

Embora alguns aspectos ecológicos do fungo *P. brasiliensis* ainda sejam desconhecidos, existem evidências que apontam o solo como seu *habitat* (ALBORNOZ, 1971; NEGRONI, 1966; TERÇARIOLI *et al.*, 2007; BAGAGLI *et al.*, 2008).

Em 1998, Silva-Vergara *et al.* analisaram várias amostras de solo de plantações de café na cidade de Ibiá, Minas Gerais. Foi possível o isolamento de *P. brasiliensis* a partir de uma das amostras, sugerindo que este fungo possa ter o solo como seu *habitat* e que atividades relacionadas com o manejo do solo contaminado podem representar um fator de risco para a doença.

Os homens são mais afetados pela doença do que mulheres (GREER; RESTREPO, 1977); estudos mostram que a razão de incidência da PCM em adultos é de 10 a 15 homens para uma mulher (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).

Verli *et al.* (2005) estudaram o perfil clínico-epidemiológico de pacientes com PCM atendidos pelo hospital São Lucas em Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Dos 61 pacientes examinados, 70,5% apresentavam faixa etária entre 40 e 59 anos de idade, sendo 95% homens e 73,7% pacientes da região norte do estado do Rio Grande do Sul, área tipicamente agrícola.

A menor incidência de PCM-doença em mulheres está relacionada ao fato de que hormônios femininos, como o estrógeno, bloqueiam a transição da

forma de micélio para a forma de levedura, sendo que a resistência das mulheres parece ser atribuída a este fator hormonal (BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002).

Por ser a PCM doença crônica e progressivamente incapacitante, acometendo o paciente na fase mais produtiva de sua vida, gera conseqüências sócio-econômicas à família, devido à queda do padrão econômico pela falta ao trabalho e despesas com exames e medicamentos, e também ao Estado, como pagamento de benefícios e despesas com assistência ao paciente (MESQUITA *et al.*, 1997).

1.1.4 Epidemiologia da PCM em Animais Domésticos e Silvestres

Os humanos eram considerados os únicos hospedeiros naturalmente infectados por *P. brasiliensis*, entretanto atualmente têm sido encontrados animais silvestres e domésticos portadores da infecção, sendo também possível o isolamento do fungo a partir de alguns desses animais.

Em 1986, Naif *et al.* relataram o primeiro isolamento de *P. brasiliensis* em tatus (*Dasypus novemcinctus*). Neste estudo, foram capturados 20 animais no estado do Pará, dos quais foi possível o isolamento a partir de 4 (20%). Doze anos após, Bagagli e colaboradores isolaram o fungo de 3 (75%) dos 4 tatus capturados na área endêmica de PCM em Botucatu, São Paulo. Estes animais estão em contato frequente com o solo, devido à atividade de escavação à procura de alimento e para a construção de tocas (BAGAGLI *et al.*, 1998). Os vários isolamentos em tatus, também relatados por outros autores no Brasil e na Colômbia (MACÊDO *et al.*, 1999; CORREDOR *et al.*, 1999; SILVA-VERGARA *et al.*, 2000; CORREDOR *et al.*, 2005) confirmam o papel deste animal na ecoepidemiologia do fungo (NEVES *et al.*, 2006).

Há apenas um relato de PCM-doença em um macaco (*Saimiri sciureus*) da Bolívia que apresentava lesões granulomatosas no fígado e no trato gastrointestinal. O exame histopatológico demonstrou a presença de *P. brasiliensis*, porém o fungo não foi isolado (JOHNSON; LANG, 1977). Em 1992, Costa *et al.* realizaram testes intradérmicos com paracoccidioidina em 33 macacos (*Cebus sp.*) do Zoológico de São Paulo, Estado de São Paulo, obtendo uma positividade de

33,33%. Corte *et al.* (2007) realizaram um estudo soroepidemiológico em macacos capturados na Bacia do Rio Paraná, utilizando o ELISA indireto com gp43. Foi encontrada uma positividade de 44,1% para *Cebus* sp. (macaco-prego, $n = 68$) e 60% para a espécie *Alouatta caraya* (bugio, $n = 25$). A alta positividade encontrada neste estudo pode dever-se em parte pelo hábito que o bugio apresenta de comer terra.

Levando em consideração que o solo é o provável *habitat* de *P. brasiliensis*, o costume de farejar e cavar o solo pode expor cães à infecção por este fungo (ONO *et al.*, 2001).

Em 1974, Mós e colaboradores realizaram um estudo epidemiológico da PCM em cães das cidades de São Paulo e de Botucatu, estado de São Paulo. Através da reação de precipitação em tubos e reação de fixação do complemento, foram analisados soros de 145 animais, e a positividade encontrada foi de 74% para cães de São Paulo e 78% para os da cidade de Botucatu.

Ono *et al.* (2001) realizaram um estudo epidemiológico em 305 cães da região norte do Paraná para a detecção de anticorpos anti-gp43 por ELISA, e observaram positividade de 89,5% em animais da área rural, 48,8% em cães da periferia, enquanto cães da área urbana apresentaram positividade de apenas 14,8%, reforçando dessa maneira a hipótese de que o fungo viva como saprófita no solo.

Fagundes *et al.* (2002) encontraram positividade de 26,5% em estudo soroepidemiológico com 275 cães de áreas rurais da região de Botucatu (SP), utilizando ELISA com exoantígeno de *P. brasiliensis*.

Em 2004 foi relatado o primeiro caso de PCM-doença em cão. Estudos histopatológicos, imunohistoquímicos e de biologia molecular (PCR) confirmaram a doença em uma fêmea adulta da raça Doberman que apresentava linfadenomegalia cervical (RICCI *et al.*, 2004). No ano seguinte foi relatado o segundo caso de PCM natural em cão, (FARIAS *et al.*, 2005) também em uma fêmea Doberman, de seis anos de idade, apresentando linfadenite generalizada. O caso foi confirmado por cultura, histopatologia e sequenciamento do DNA.

Também foi reportado um caso de isolamento de *P. brasiliensis* a partir de ração canina, provavelmente contaminada com solo, em Uberlândia, Minas Gerais (FERREIRA *et al.*, 1990).

Grose e Tamsitt (1965) analisaram material fecal de 243 morcegos (*Artibeus lituratus*) coletados na zona tropical da Colômbia, e isolaram *P. brasiliensis* a partir de três amostras. Em 1977, Greer e Bolaños estudaram o papel de morcegos na ecologia deste fungo. Resultados de cultura de estômago, intestinos e reto de animais inoculados por via oral com *P. brasiliensis* mostraram que as células fúngicas não conseguem sobreviver mais do que oito horas no trato digestivo de *A. lituratus*, indicando que provavelmente este animal não tenha um papel importante na disseminação do fungo na natureza.

Silva-Vergara *et al.* (2001) tentaram isolar *P. brasiliensis* de gambás (*Didelphis albiventris*, $n = 20$) capturados na região do Triângulo Mineiro, Minas Gerais. Foram feitas tentativas de isolamento a partir de culturas de amostras de pulmão, fígado e baço, e também através da inoculação de amostras homogeneizadas em camundongos, porém não foram negativas.

Em 1989, Gezuele isolou um fungo com características de *P. brasiliensis* em fezes de um pinguim (*Pygoscelis adeliae*) da Antártida. Esse isolado foi posteriormente caracterizado por Garcia *et al.* (1993) por meio de métodos micológicos e imunológicos. O significado desse isolamento permanece incerto, pois é pouco provável que o fungo possa sobreviver nas condições ambientais que este continente apresenta.

A infecção pelo fungo *P. brasiliensis* tem sido avaliada através de testes intradérmicos e sorológicos em humanos (BOTTEON *et al.*, 2002, MALUF *et al.*, 2003; VERLI, *et al.*, 2005; FERREIRA, 2008) e em outras diferentes espécies animais como em cavalos (CONTI-DIAZ *et al.*, 1972; CORTE, 2006), bovinos (GUTIERREZ *et al.*, 1974; SILVEIRA *et al.*, 2008) e cães (ONO *et al.*, 2001). No entanto, até então não existem estudos sobre a infecção por *P. brasiliensis* em caprinos no Paraná.

Considerando que *Capra hircus* mantém contato direto com o solo, mesmo quando criado no sistema semi-intensivo, em que os animais saem do abrigo para o pasto pela manhã e retornam à tarde (SILVA, 1999), e que o solo seja o provável *habitat* de *P. brasiliensis*, o objetivo deste trabalho foi avaliar a infecção por *P. brasiliensis* em caprinos de três propriedades da região central do Paraná, que é um estado endêmico para PCM humana.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a infecção por *P. brasiliensis* em caprinos do município de Pitanga, Paraná.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a produção de anticorpos em caprinos imunizados com *P. brasiliensis* por ELISA e reação de precipitação.

Analisar a infecção de caprinos por *P. brasiliensis* por meio dos ensaios sorológicos de ELISA e reação de precipitação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ÁREA DE ESTUDO E AMOSTRAS

O município de Pitanga, Paraná, possui 1.663,75 km² de extensão territorial e está situado na região Centro-Sul paranaense, entre a latitude 24° 45' 26" S e a longitude 51° 45' 41" W, possui clima subtropical úmido mesotérmico, com temperatura média de 21°C, verões frescos, invernos com ocorrências de geadas severas e frequentes, não apresentando estação seca (IBGE, 2009).

O rebanho caprino de Pitanga é estimado em 2.322 cabeças, distribuídas em 122 estabelecimentos rurais (IBGE, 2009). As 202 amostras de soros de caprinos foram obtidas em três destas propriedades nos anos de 2003 e 2004, sendo que os animais dessas propriedades eram destinados à produção leiteira. As amostras de soro foram estocadas em tubos plásticos de 1,5 ml a uma temperatura de -18°C até a realização dos testes sorológicos (REIS *et al.*, 2007).

As amostras foram agrupadas para a análise em três faixas etárias, conforme mostra a tabela 2.

Tabela 2 - Distribuição das amostras de soro de caprinos de acordo com a faixa etária. As amostras foram obtidas em três propriedades rurais da cidade de Pitanga, Paraná, nos anos de 2003 e 2004.

Faixa etária	Propriedade 1		Propriedade 2		Propriedade 3		Total	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
0 – 6 meses	8	(16,0)	27	(26,2)	3	(6,0)	38	(18,8)
6 – 18 meses	10	(20,0)	41	(39,8)	3	(6,0)	54	(26,7)
> 18 meses	32	(64,0)	35	(34,0)	43	(88,0)	110	(54,5)
Total	50	(100,0)	103	(100,0)	49	(100,0)	202	(100,0)

3.2 CULTURA E INATIVAÇÃO DE *P. BRASILIENSIS*

Para a cultura de *P. brasiliensis* foi utilizado o isolado LDR1, obtido a partir de escarro de paciente com PCM crônica (ONO *et al.*, 2002). O fungo foi

mantido em Ágar Sabouraud Dextrose (BD Difco™) enriquecido com BHI a 37°C. As leveduras foram coletadas, homogeneizadas em PBS estéril e inativadas pela adição de timerosal 0,02% por 18 horas a 4°C. A concentração foi determinada através de contagem em câmara de Neubauer e ajustada para 2×10^6 células/ml para a imunização dos animais.

3.3 IMUNIZAÇÃO DE CAPRINOS

Dois animais (um macho e uma fêmea) com idade de 2 anos, pesando cerca de 30 Kg, foram inoculados por via subcutânea na região próxima ao linfonodo subescapular direito, com 1 ml de suspensão de *P. brasiliensis* LDR 1 (1×10^6 células leveduriformes inativadas) em Adjuvante Incompleto de Freund (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). Os animais receberam 4 doses com 7 dias de intervalo. Amostras de sangue foram coletadas através de punção da veia jugular, nos dias 0, 7, 14, 21, 28, 35. Após a retração do coágulo, as amostras foram centrifugadas e os soros foram armazenados a -18°C até serem utilizados para os ensaios sorológicos.

3.4 ANTÍGENOS

3.4.1 Exoantígeno

O isolado de *P. brasiliensis* B-339 foi cultivado por 3-4 dias a 35°C, em tubos de ágar Sabouraud, transferido para meio de neopeptona e novamente incubado. Após três dias, esse pré-inóculo foi transferido para um frasco contendo o mesmo meio e incubado por sete dias. A cultura foi inativada com timerosal 0,02% por 18 horas, seguido de filtração. O filtrado bruto foi concentrado a vácuo, dialisado por 48 horas em água destilada, e liofilizado (CAMARGO *et al.*, 1988).

3.4.2 Gp43

A glicoproteína de 43 kDa foi purificada a partir do exoantígeno de *P. brasiliensis*, cepa B-339, por cromatografia de afinidade (PUCCIA *et al.*, 1991). A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford, utilizando BSA como padrão (BRADFORD, 1976).

3.5 IMUNODIFUSÃO RADIAL DUPLA (IDRD)

A IDRD foi executada como descrito por Camargo *et al.* (1988) usando o exoantígeno de *P. brasiliensis* como reagente, com algumas modificações. Brevemente, foi preparada uma lâmina de vidro com uma camada de 3 ml de ágar 1% previamente recoberta com uma fina camada de ágar 0,1%. Depois da geleificação, amostras puras de soro (25 μ l) foram adicionadas aos orifícios periféricos e o exoantígeno (70 μ g/ml - 25 μ l) ao orifício central. Após 24 horas, as lâminas foram mantidas em uma placa de Petri contendo salina durante 24 horas, e então desidratadas e coradas com *Comassie Brilliant Blue*. Todas as amostras foram analisadas em duplicata. O surgimento da linha de precipitação indica o resultado positivo.

3.6 ELISA INDIRETO

A detecção de anticorpos anti-gp43 nos soros foi realizada por ELISA indireto. Microplacas de poliestireno contendo 96 cavidades (Corning Costar Corporation, Corning, NY, USA) foram sensibilizadas com 100 μ l de gp43 (250 ng/poço) em 0,1 mol/l de tampão carbonato/bicarbonato, pH 9,6, a 4°C por 18 horas. As placas foram lavadas por três vezes com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T) e bloqueadas com 150 μ l de leite desnatado (Molico® Nestlé, Brasil) a 5%

em PBS (PBS-L) por uma hora a 25°C. Após a lavagem das microplacas com PBS-T, as amostras de soro diluídas 1:100 em PBS-M 1% foram adicionadas aos poços e incubadas como referido anteriormente. As microplacas foram lavadas como previamente descrito e 100 µl/poço de conjugado anti-IgG caprina-peroxidase (Sigma) diluído 1:32000 em PBS-L 1% foi adicionado, seguido de incubação. Após lavagens com PBS-T, 100 µl de substrato cromógeno (H₂O₂/tetrametilbenzidina) foi adicionado por 15 minutos e incubado a 25°C. A reação foi bloqueada pela adição de 50 µl de H₂SO₄ 4N e a absorbância foi determinada a 450 nm em leitora de microplacas. Todas as amostras foram analisadas em duplicata. Os soros dos animais imunizados com *P. brasiliensis* e um *pool* de soros de cabras com 6 meses de idade foram usados como controles positivo e negativo, respectivamente. As amostras de soro testadas que apresentaram absorbância duas vezes maior do que o controle negativo foram consideradas positivas.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a tabulação dos dados e confecção dos gráficos utilizou-se o *software* Microsoft Office Excel. Os resultados obtidos foram analisados pelo teste de qui-quadrado com o auxílio do pacote estatístico Epi6 (Epiinfo 6,04b CDC, Atlanta, USA), sendo adotado o nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dois caprinos (um macho e uma fêmea) foram imunizados com *P. brasiliensis* LDR1 e a resposta imune humoral foi avaliada pelos métodos de ELISA e IDR. Ambos os caprinos imunizados produziram anticorpos IgG anti-gp43, do dia 14 ao dia 35, que foram detectados por ELISA (figura 1). Não foi possível detectar a presença de anticorpos pela IDR.

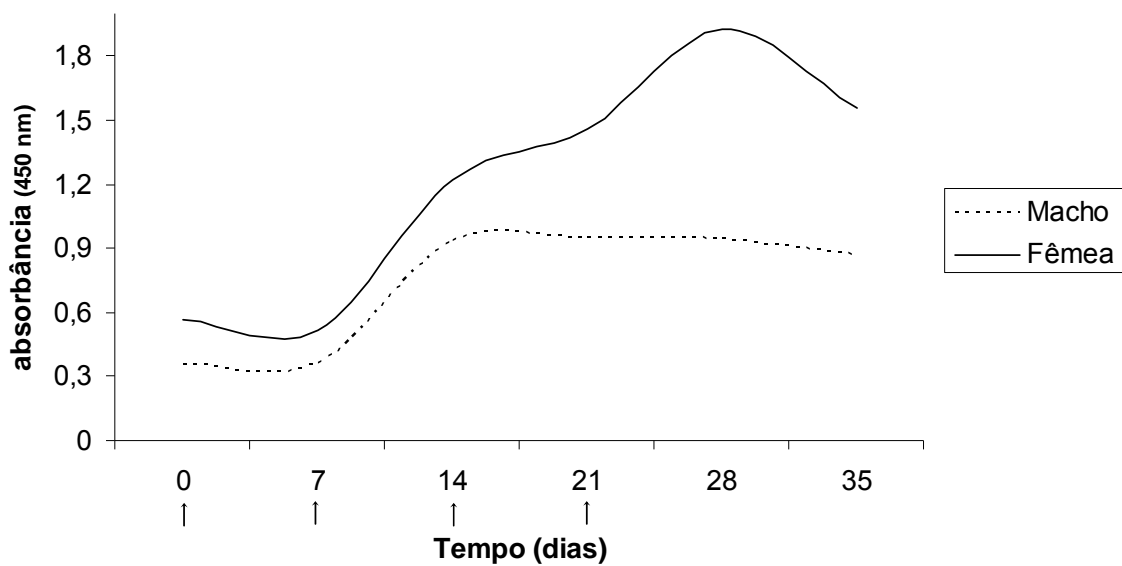


Figura 1 - Resposta imune humoral de caprinos a *P. brasiliensis*. Animais imunizados com 4 doses de *P. brasiliensis* leveduriforme inativado (1×10^6 células/ml em Adjuvante Incompleto de Freund) foram avaliados por ELISA utilizando a gp43. ↑ = inoculações.

Os animais imunizados com *P. brasiliensis* desenvolveram uma resposta imune humoral contra gp43, um dos principais antígenos utilizados no diagnóstico da PCM e em estudos epidemiológicos da doença (MENDES-GIANNINI *et al.*, 1989; PUCCIA *et al.*, 1991; BLOTTA *et al.*, 1999; ONO *et al.*, 2001; ALMEIDA *et al.*, 2002; MARQUES DA SILVA *et al.*, 2003; FORNAJEIRO *et al.*, 2005; SADAHIRO *et al.*, 2007).

Embora em animais naturalmente infectados a resposta imune humoral provavelmente seja menor, o resultado observado neste trabalho sugere

que este antígeno possa ser utilizado na soropidemiologia da PCM em caprinos, como observado em outros estudos do nosso grupo que foram realizados em cães (ONO *et al.*, 2001), bovinos (SILVEIRA *et al.*, 2008), macacos (CORTE *et al.*, 2007) e equinos (CORTE, 2006).

As amostras de soro de caprinos do município de Pitanga foram analisadas pelos métodos de ELISA e IDR. Das 202 amostras avaliadas, 53 (26,24%) foram positivas pelo método de ELISA (figura 2). Nenhuma amostra apresentou reatividade no método de IDR, sugerindo que os animais apresentam apenas PCM-infecção.

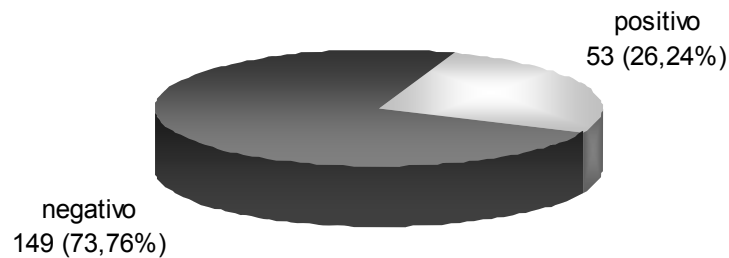


Figura 2 - Avaliação da infecção de caprinos por *P. brasiliensis*. Amostras testadas por ELISA utilizando a gp43 (n = 202).

Silveira *et al.* (2008) também utilizaram ELISA para avaliar a infecção por *P. brasiliensis* em bovinos leiteiros do Mato Grosso do Sul, sendo observado 17,5% de positividade. A IDR também foi utilizada neste trabalho para avaliar a resposta imune humoral de animais imunizados com *P. brasiliensis* B-339, sendo possível observar reação positiva a partir do dia 14 após a imunização.

Costa *et al.* (1978) realizaram testes intradérmicos com a paracoccidiodina para avaliar a infecção por *P. brasiliensis* em bovinos, ovinos e equinos e observaram 44,8%, 42,8% e 77% de positividade, respectivamente. Estes valores mais altos encontrados podem dever-se ao fato de que Costa *et al.* avaliaram a hipersensibilidade tardia ao antígeno polissacarídico de *P. brasiliensis*, enquanto no presente estudo e no trabalho de Silveira *et al.* (2008) foram realizados

testes sorológicos utilizado a gp43, um antígeno purificado, portanto com menor probabilidade de reatividades cruzadas.

No estudo epidemiológico em cães da região norte do Paraná, Ono *et al.* (2001) também utilizaram o método de ELISA para verificar a presença de anticorpos anti-gp43 nos soros dos animais. A positividade encontrada foi maior do que a observada neste estudo com caprinos, 89,5% e 48,8% em cães da área rural e da periferia, respectivamente, sugerindo que cães, devido ao seu hábito de farejar e cavar o solo, possam estar mais expostos à infecção por *P. brasiliensis* do que caprinos. Outra possibilidade é que a região de Pitanga, devido a diferenças climáticas e de solo, seja menos propícia ao desenvolvimento do fungo.

O resultado negativo na IDRDR pode ser explicado pelo fato de que a avidéz da ligação antígeno-anticorpo depende do tempo de infecção e da classe de anticorpos produzidos (FERREIRA *et al.*, 1996). Anticorpos com baixa avidéz são produzidos na fase aguda da infecção, ao passo que os com alta avidéz são produzidos tardiamente. Neves *et al.* (2003) analisaram o padrão de anticorpos dos soros de pacientes com PCM confirmada e com resultado negativo na IDRDR, com relação aos isotipos e à avidéz. Observaram que a perda de reatividade na IDRDR de soros de pacientes com PCM comprovada pode estar relacionada à produção de baixos títulos de IgG2 apresentando baixa avidéz.

A comparação da positividade entre as diferentes faixas etárias demonstrou uma diferença significativa com relação à idade ($p = 0,0001$). Do total de amostras positivas, mais de 80% (44 amostras) eram de animais com idade superior a 18 meses, enquanto animais com idade até 6 meses corresponderam a apenas 1,9% do total de amostras positivas (tabela 3). A prevalência de positividade para PCM-infecção entre adultos também foi constatada em cães (SILVEIRA *et al.*, 2006) e bovinos (SILVEIRA *et al.*, 2008).

Tabela 3 - Análise da relação entre idade e positividade para Paracoccidiodomicose. As amostras de soros de caprinos da cidade de Pitanga, Paraná, foram testadas por ELISA e foi feita a análise da reatividade para gp43 de acordo com as faixas etárias dos animais. p determinado por Qui-quadrado.

Faixa etária	Reagente/Total (%)	p
0 – 6 meses	1 / 38 (2,63)	0,0001
6 – 18 meses	8 / 54 (14,81)	
> 18 meses	44 / 110 (40,00)	
Total	53 / 202 (26,24)	

Quando a positividade foi confrontada entre as amostras das três diferentes propriedades, pôde-se observar que a propriedade 2 apresentou, proporcionalmente ao número de animais da propriedade, menor porcentagem de soropositivos entre os animais, enquanto as propriedades 1 e 3 tiveram números próximos de 40% (tabela 4). Este resultado possivelmente está associado ao fato de que nas propriedades 1 e 3 há um maior número proporcional de animais adultos em relação à propriedade 2. Partindo do pressuposto de que o solo seja o possível *habitat* de *P. brasiliensis*, quanto maior a idade, maior o tempo de contato com o solo e maior a probabilidade destes animais infectarem-se.

Tabela 4 - Comparação da positividade x negatividade entre as amostras das três propriedades rurais. A reatividade das amostras de soros de caprinos da cidade de Pitanga, Paraná, foi analisada em cada propriedade. p determinado por Qui-quadrado.

Propriedade	Reagente/Total (%)	p
1	19 / 50 (38,00)	0,0001
2	14 / 103 (13,59)	
3	20 / 49 (40,81)	
Total	53 / 202 (26,24)	

Estudos epidemiológicos com diferentes espécies de animais, apresentando *habitats* e hábitos diferentes, podem constituir uma valiosa ferramenta para revelar o *habitat* de *P. brasiliensis*.

Este foi o primeiro estudo realizado sobre a infecção de caprinos por *P. brasiliensis*, e ainda outros estão sendo realizados em nosso laboratório com outras espécies animais, como galinhas, suínos e ovinos.

5 CONCLUSÃO

Através deste estudo conclui-se que caprinos podem infectar-se por *P. brasiliensis* e que a gp43 pode ser utilizada em testes imunológicos como o ELISA para estudos soropidemiológicos em caprinos. A negatividade observada em todas as amostras testadas por IDRDR indica que este teste pode não ser o mais indicado para avaliar a PCM-infecção nestes animais. Verificou-se também que animais adultos estão há mais tempo em contato com o provável *habitat* do fungo e portanto mais propensos a apresentarem infecção por *P. brasiliensis*.

REFERÊNCIAS

- ALBORNOZ, M. B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. **Sabouraudia**, v.9, p.248-53. 1971.
- ALMEIDA, S. M. *et al.* Anti-gp43 antibodies in the cerebrospinal fluid of patients with central nervous system involvement by paracoccidioidomycosis. **Am J Clin Pathol**, v.118, n.6, p.864-8, dec. 2002.
- BAGAGLI, E. *et al.* Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus noveminctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. **Am J Trop Med Hyg**, v.58, n.4, p.505-12, apr. 1998.
- BAGAGLI, E. *et al.* *Paracoccidioides brasiliensis*: phylogenetic and ecological aspects. **Mycopathologia**, v.165, n.4-5, p.197-207, apr-may. 2008.
- BENARD, G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v.165, n.4-5, p.209-21, apr-may. 2008.
- BLOTTA, M. H. *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**, v.61, n.3, p.390-4, sep. 1999.
- BORGES-WALMSLEY, M. I. *et al.* The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends Microbiol**, v.10, n.2, p.80-7, feb. 2002.
- BOTTEON, F. A. *et al.* *Paracoccidioides brasiliensis*-reactive antibodies in Brazilian blood donors. **Med Mycol**, v.40, n.4, p.387-91, aug. 2002.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v.72, p.248-54, may 7. 1976.
- BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clin Microbiol Rev**, v.6, n.2, p.89-117, apr. 1993.
- CAMARGO, Z. P. *et al.* Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. **J Clin Microbiol**, v.26, n.10, p.2147-51, oct. 1988.
- CAMARGO, Z. P.; FRANCO, M. F. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Rev Iberoam Micol**, v.17, n.2, p.41-8, jun. 2000.
- CAMARGO, Z. P. Serology of paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v.165, n.4-5, p.289-302, apr-may. 2008.
- CONTI-DIAZ, I. A. *et al.* Intradermal reaction survey with paracoccidioidin and histoplasmin in horses. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v.14, n.6, p.372-6, nov-dec. 1972.

- CORREDOR, G. G. *et al.* Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasybus novemcinctus*, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. **Rev Iberoam Micol**, v.16, n.4, p.216-20, dec. 1999.
- CORREDOR, G. G. *et al.* The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. **Med Mycol**, v.43, n.3, p.275-80, may. 2005.
- CORTE, A. C. *Paracoccidioidomicose-infecção em macacos de vida livre e cavalos do estado do Paraná*. 2006. 67 p. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- CORTE, A. C. *et al.* Paracoccidioidomycosis in wild monkeys from Parana State, Brazil. **Mycopathologia**, v.164, n.5, p.225-8, nov. 2007.
- COSTA, E. O. *et al.* Delayed hypersensitivity test with paracoccidioidin in captive Latin American wild mammals. **J Med Vet Mycol**, v.33, n.1, p.39-42, jan-feb. 1995.
- COUTINHO, Z. F. *et al.* Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). Caderno de Saúde Pública do Rio de Janeiro, p.1441-1454. 2002.
- DEL NEGRO, G. M. B. *et al.* The sensitivity, specificity and efficiency values of some serological tests used in the diagnosis of paracoccidioidomycosis. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v.33, p.277–280. 1991.
- DEL NEGRO, G. M. B. *et al.* Lack of reactivity of paracoccidioidomycosis sera in the double immunodiffusion test with the gp43 antigen: report of two cases. **J Med Vet Mycol**, v.33, p.113–116. 2005.
- FAGUNDES, R. Q. *et al.* Serological detection of Paracoccidioidomycosis in dogs from the endemic area of Botucatu-SP, Brazil. **Annu Rev Microbiol**, v.22, n.4, p.45-48. 2002.
- FARIAS, M. R. *et al.* Canine Paracoccidioidomycosis: case report of generalized lymphadenitis. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v.47, s.14, 2005.
- FERREIRA, M. S. *et al.* Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from a dogfood probably contaminated with soil in Uberlandia, Brazil. **J Med Vet Mycol**, v.28, n.3, p.253-6. 1990.
- FERREIRA, M. U. *et al.* The isotype composition and avidity of naturally acquired anti-*Plasmodium falciparum* antibodies: differential patterns in clinically immune Africans and Amazonian patients. **Am J Trop Med Hyg**, v.55, n.3, p.315-323, sep. 1996.
- FERREIRA, A. P. *et al.* Human serum antibody reactivity towards *Paracoccidioides brasiliensis* antigens treated with sodium metaperiodate. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.41, n.4, p.325-9, jul-aug. 2008.

- FORNAJEIRO, N. *et al.* Paracoccidioidomycosis epidemiological survey using gp43, in two cities of northwestern region of Parana, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.38, n.2, p.191-3, mar-apr. 2005.
- GANIKO, L. *et al.* Paracoccin, an N-acetyl-glucosamine-binding lectin of *Paracoccidioides brasiliensis*, is involved in fungal growth. **Microbes Infect**, v.9, n.6, p.695-703, may. 2007.
- GARCIA, N. M. *et al.* *Paracoccidioides brasiliensis*, a new sample isolated from feces of a penguin (*Pygoscelis adeliae*). **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v.35, n.3, p.227-35, may-jun. 1993.
- GEZUELE, E. Aislamiento de *P. brasiliensis* de heces de pinguino de la Antartida. In: ENCUESTRO INTERNACIONAL SOBRE PARACOCCIDIOIDOMICOSIS, 1989, 4., Caracas, Venezuela. **Anais...** Caracas, Venezuela: Intituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), 1989. Abstract B-2.
- GREER, D. L.; BOLANOS, B. Role of bats in the ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: the survival of *Paracoccidioides brasiliensis* in the intestinal tract of frugivorous bat, *Artibeus lituratus*. **Sabouraudia**, v.15, n.3, p.273-82, nov. 1977.
- GREER, D. L.; RESTREPO, A. M. La epidemiologia de la paracoccidioidomicosis. **Boletin de la Oficina Sanitaria Panamericana**. p.428-445, may. 1977.
- GROSE, E.; TAMSITT, J. R. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia, S.A. **Sabouraudia**, v.4, n.2, p.124-5, jun. 1965.
- GUTIERREZ, A. H. *et al.* Encuesta sobre tuberculosis, histoplasmosis y paracoccidioidomicosis en ganado lechero del Valle del Aburra. **Antioquia Medica**, Medellin, Colombia, v.24, p.339-358, 1974.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Cidades @. Censo Agropecuário 2006**: Resultados preliminares. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>>. Acesso em: 21 maio 2009.
- JOHNSON, W. D.; LANG, G. M. Paracoccidioidomycosis (South American Blastomycosis) in a Squirrel Monkey (*Saimiri sciureus*). **Vet Pathol**, v.14, n.4, p.368-371, jul. 1977.
- LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. Paracoccidioidomicose. In: _____. **Tratado de micologia médica Lacaz**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. p. 639-729.
- MACÊDO, R. C. L. *et al.* Infecção natural de tatus por *Paracoccidioides brasiliensis* em Serra da Mesa, Minaçu, Goiás: estudo preliminar. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 2., 1998, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: II Congresso Brasileiro de Micologia, 1998. p. 182-182.
- MALUF, M. L. *et al.* Prevalence of paracoccidioidomycosis infection determined by serologic test in donors' blood in the Northwest of Parana, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.36, n.1, p.11-6, jan-feb. 2003.

MARQUES DA SILVA, S. H. *et al.* Detection of circulating gp43 antigen in serum, cerebrospinal fluid, and bronchoalveolar lavage fluid of patients with paracoccidioidomycosis. **J Clin Microbiol**, v.41, n.8, p.3675-80, aug. 2003.

MENDES-GIANNINI, M. J. *et al.* Detection of the 43,000-molecular-weight glycoprotein in sera of patients with paracoccidioidomycosis. **J Clin Microbiol**, v.27, n.12, p.2842-5, dec. 1989.

MESQUITA, F. C. L. *et al.* Paracoccidioidomicose. In: LEÃO, R. N. Q. (Coord.) **Doenças infecciosas e parasitárias: enfoque amazônico**. Belém: CEJUP, 1997. cap. 51, p. 767-781.

MÓS, E. N. *et al.* Contribution to the study of paracoccidioidomycosis. II. Experimental infection of dogs. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v.16, n.4, p.232-7, jul-aug. 1974.

NAIFF, R. D. *et al.* Enzootic paracoccidioidomycosis in armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in the State of Para. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v.28, n.1, p.19-27, jan-feb. 1986.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI). Taxonomy Browser. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser>> Acesso em: 17 maio 2009.

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

NEVES, A. R. *et al.* Negative immunodiffusion test results obtained with sera of paracoccidioidomycosis patients may be related to low-avidity immunoglobulin G2 antibodies directed against carbohydrate epitopes. **Clin Diagn Lab Immunol**, v.10, n.5, p.802-7, sep. 2003.

NEVES, S. L. *et al.* Paracoccidioidomicose em animais silvestres e domésticos. **Semina Ciências Agrárias**, v.27, n.3, p.481-488, jul-set. 2006.

ONO, M. A. *et al.* Canine paracoccidioidomycosis: a seroepidemiologic study. **Med Mycol**, v.39, n.3, p.277-82, jun. 2001.

ONO, M. A. *et al.* Inhibition of *Paracoccidioides brasiliensis* by pesticides: is this a partial explanation for the difficulty in isolating this fungus from the soil? **Med Mycol**, v.40, n.5, p.493-9, oct. 2002.

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

PUCCIA, R. *et al.* Purification of the 43 kDa glycoprotein from exocellular components excreted by *Paracoccidioides brasiliensis* in liquid culture (TOM medium). **J Med Vet Mycol**, v.29, n.1, p.57-60. 1991.

REIS, C. R. *et al.* Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in caprines from Pitanga City, Paraná State, Brazil. **Braz J Vet Res Anim Sci**, v.44, n.5, p.358-363. 2007.

RICCI, G. *et al.* Canine paracoccidioidomycosis. **Med Mycol**, v.42, n.4, p.379-83, aug. 2004.

SADAHIRO, A. *et al.* Kinetics of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and IL-4 production by mononuclear cells stimulated with gp43 peptides, in patients cured of paracoccidioidomycosis. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.40, n.2, p.156-62, mar-apr. 2007.

SAN-BLAS, G. *et al.* Primers for clinical detection of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Clin Microbiol**, v.43, n.8, p.4255-7, aug. 2005.

SAN-BLAS, G.; NINO-VEGA, G. *Paracoccidioides brasiliensis*: chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy. **Mycopathologia**, v.165, n.4-5, p.183-95, apr-may. 2008.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. *et al.* Guidelines in paracoccidioidomycosis. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.39, n.3, p.297-310, may-jun. 2006.

SILVA, D. F. V. R. **Detecção molecular de Paracoccidioides brasiliensis por PCR em biópsias de lesão bucal de paracoccidioidomicose**. 2008. 88 p. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

SILVA, M. G. C. M. Criação de cabras. **Boletim de Extensão**, Lavras: Editora UFLA, 1999. n. 19. Disponível em: <<http://www.editora.ufla.br/BolExtensao.htm>>. Acesso em: 16 fev. 2009.

SILVA, S. S. *et al.* Insights into the pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis* from transcriptome analysis--advances and perspectives. **Mycopathologia**, v.165, n.4-5, p.249-58, apr-may. 2008a.

SILVA, D. F. *et al.* Use of immunoblotting assay improves the sensitivity of Paracoccidioidomycosis diagnosis. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis**, v.14, n.2, p.313-321, may. 2008b.

SILVA-VERGARA, M. L. *et al.* Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá, State of Minas Gerais, Brazil. **Med Mycol**, v.36, n.1, p.37-42, feb. 1998.

SILVA-VERGARA, M. L. *et al.* Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. **Med Mycol**, v.38, n.3, p.193-9, jun. 2000.

SILVA-VERGARA, M. L. *et al.* The marsupial *Didelphis albiventris* is an improbable host of *Paracoccidioides brasiliensis* in an endemic area of paracoccidioidomycosis in Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.96, n.6, p.771-2, aug. 2001.

SILVEIRA, L. H. *et al.* Serological detection of antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* in dogs with leishmaniasis. **Mycopathologia**, v.162, n.5, p.325-9, nov. 2006.

- SILVEIRA, L. H. *et al.* Occurrence of Antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in dairy cattle from Mato Grosso do Sul, Brazil. **Mycopathologia**, v.165, n.6, p.367-71, jun. 2008.
- SOARES, C. M. A. *et al.* A centennial: discovery of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycopathologia**, v.165, n.4-5, p.179-81, apr-may. 2008.
- SVIDZINSKI, T. I. E.; MARTINS, A. C. M.; CAÇADOR, N. P. Um caso clínico de Paracoccidioidomicose: importância da biópsia em seu diagnóstico. **Revista UNIMAR**, v.19, n.2, p.611-624, 1997.
- TABORDA, C. P.; CAMARGO, Z. P. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by dot immunobinding assay for antibody detection using the purified and specific antigen gp43. **J Clin Microbiol**, v.32, n.2, p.554-6, feb. 1994.
- TERCARIOLI, G. R. *et al.* Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. **BMC Microbiol**, v.7, p.92. 2007.
- UNTEREINER, W. A. *et al.* The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales. **Mycologia**, v.96, n.4, p.812-821. 2004.
- VERLI, F. D. *et al.* Clinical-epidemiologic profile of paracoccidioidomycosis at the Stomatology Department of Sao Lucas Hospital, Pontificia Universidade Catolica of Rio Grande do Sul. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.38, n.3, p.234-7, may-jun. 2005.