

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Tese

***Paracoccidioides brasiliensis*: utilização de animais
como sentinelas para presença do fungo no Rio
Grande do Sul, Brasil**

Ana Paula Neuschrack Albano

Pelotas, 2012

ANA PAULA NEUSCHRANK ALBANO

***Paracoccidioides brasiliensis*: utilização de animais como sentinelas para
presença do fungo no Rio Grande do Sul, Brasil**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área do conhecimento: Veterinária Preventiva).

Orientador: Prof. Dr. Mário Carlos Araújo Meireles

Co-Orientador: Prof^{fa}. Dr^a. Melissa Orzechowski Xavier

Pelotas, 2012

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

A326p Albano, Ana Paula Neuschrack

Paracoccidioides brasiliensis : utilização de animais como sentinelas para presença do fungo no Rio Grande do Sul, Brasil. / Ana Paula Neuschrack Albano ; orientador Mário Carlos Araújo Meireles; co-orientador Melissa Orzechowski Xavier - Pelotas, 2012.-83f. : il..- Tese (Doutorado) –Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Faculdade de Veterinária . Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2012.

1.Sorologia 2.Soroepidemiologia 3.Paracoccidioidomicose 4.gp43. 5.Proteína G-peroxidase 6.Proteína A-peroxidase I Meireles, Mário Carlos Araújo(orientador) II .Título.

CDD 616.079

Banca examinadora:

Prof. Dr. Gilberto D'Avila Vargas (UFPeI)

Prof. Dr. Luiz Carlos Severo (UFRGS)

Prof^a. Dr^a. Patrícia da Silva Nascente (UFPeI)

Prof^a. Dr^a. Renata Osório de Faria (suplente - UFPeI)

Prof. Dr. Mário Carlos Araújo Meireles (orientador - UFPeI)

Agradecimentos

Aos meus pais, Paulo (*in memorian*) e Ida em especial, por todo amor, apoio, esforço, sacrifícios e bons exemplos sempre dados desde minha infância. Por terem compreendido todos os momentos em que estive ausente e por sempre torcerem para que minha vida fosse repleta de realizações.

Ao Prof. Dr. Mário Carlos Araújo Meireles, pela orientação, confiança, compreensão, amizade, estímulo e por todo apoio dado desde meus primeiros passos na pós-graduação.

A minha co-orientadora Profa. Dr^a Melissa Orzechowski Xavier, que me incentivou a entrar em contato com o mundo da micologia, pelo apoio indispensável no desenvolvimento desta tese, pela atenção e paciência constantes e a quem tenho profundo agradecimento.

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Minello, pela orientação, apoio, amizade desde os tempos da graduação. Agradeço pela confiança e liberdade dadas para a realização dos meus trabalhos e pesquisas durante todos esses anos e por me dar a oportunidade de trabalhar com esses animais incríveis.

As amigas e colegas do Laboratório de Micologia, que fizeram parte do meu aprendizado desde o mestrado por toda amizade, paciência e capacidade para ajudar em todos os momentos difíceis sempre com segurança, sabedoria e por me concederem o privilégio de dividir o mesmo laboratório e com isso ter tido a oportunidade de aprender muito com todas vocês. A laboratorista Tatiana Barbosa de Oliveira pela dedicação e apoio em todos os momentos da realização deste trabalho.

Aos funcionários e colegas do Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre, pela amizade e convivência cordial em especial ao Biólogo Marco Antonio Afonso Coimbra, pelo exemplo de profissional, incentivo e colaboração durante todos esses anos. A Roselaine Xavier, Graciela Schneider e Eliza Garcia pela amizade, carinho com os animais e momentos felizes que dividimos durante este período de aprendizado.

Ao professor Dr. Zoilo Pires de Camargo (UNIFESP) pela atenção e colaboração para que esse trabalho pudesse ser realizado.

A amiga e professora Dr^a. Ana Luisa Schifino Valente, pelos conselhos e ricos ensinamentos que vem desde o início da minha graduação e exemplo de caráter e conduta.

Ao meu cachorro Bono Vox e aos meus demais cães e gatas por todo seu companheirismo, carinho e amor incondicional em todos os momentos.

Agradeço a minha amiga de todas as horas Alice Teixeira Meirelles Leite por todo incentivo, carinho e amizade durante todos esses anos.

A amiga e companheira de trabalho Greici Maia Behling, pelo carinho, apoio, atenção e ajuda na formatação desta tese.

Às amigas Angelita Gomes e Ângela Leitzke Cabana pelo companheirismo, dedicação e auxílio em todos os momentos.

Ao psiquiatra Sérgio Lopes e a psicóloga Jeanini Almeida Lopes pela amizade, colaboração, estímulo constante e disponibilidade nos momentos mais difíceis.

Ao José Antonio, a quem agradeço imensamente pelo apoio sempre prestado e pelo carinho, paciência, cumplicidade e compreensão dedicadas incansavelmente e por me mostrar um novo caminho.

Aos amigos da Clínica Veterinária Dr. Paulo Sampaio: Paulinho, Roberta e Daniel, pela valiosa amizade, disposição, saber compartilhado, carinho e incentivos dados em todos os momentos.

Aos amigos Graciele, Fábio, Lilian e Luciane que me acompanham durante todos estes anos e compreendem minhas ausências e a amiga Antonella Mattei, pela amizade e que mesmo longe me apoiou.

Agradeço a minha amiga Roberta Martins Passos Humberg e toda a equipe do Centro de Reabilitação de Animais Silvestres – CRAS – que mesmo à distância torcem por mim, nunca faltando palavras de apoio.

A equipe do Centro de Recuperação de Animais Marinhos – CRAM, em especial ao meu amigo Rodolfo, pelas oportunidades concedidas, confiança depositada e amizade recebida.

Aos estagiários e bolsistas de iniciação científica do Laboratório de Micologia, pela amizade e convivência em todos esses anos.

Ao Gabriel Baracy Klafke (FURG) pela contribuição no desenvolvimento dos testes de ELISA e IDGA.

Aos Médicos Veterinários Elisandro Oliveira dos Santos, Sérgio Jorge, Gleide Marsicano e Marcela Pearson pela confiança, amizade, atenção e por fornecerem algumas amostras de soros, sem as quais não seria possível a concretização deste projeto.

A todos os animais que fizeram parte deste trabalho em especial, o meu respeito e eterna gratidão e a todos aqueles que de alguma maneira possam ter contribuído com esta tese, vida acadêmica e profissional que foram fundamentais para tornar esse trabalho muito prazeroso, e que, por uma falha de memória, eu não tenha citado.

“Nós seres humanos, estamos na natureza para auxiliar o progresso dos animais, na mesma proporção que os anjos estão para nos auxiliar. Portanto quem chuta ou maltrata um animal é alguém que não aprendeu a amar”

Chico Xavier

Resumo

ALBANO, Ana Paula Neuschrack. ***Paracoccidioides brasiliensis*: utilização de animais como sentinelas para presença do fungo no Rio Grande do Sul, Brasil.** 2012. 80f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma das micoses sistêmicas mais importantes da América Latina com destaque no Brasil. Embora o Rio Grande do Sul seja considerado como área endêmica da doença, existem poucos estudos a respeito da ecologia do *Paracoccidioides brasiliensis* no estado. Neste sentido, o estudo objetivou detectar a infecção por *P. brasiliensis* em animais, utilizando-os como sentinelas da presença do agente na região. Para tal foi realizada sorologia a partir das técnicas de imunodifusão radial dupla em gel de Ágar (IDGA) e ELISA indireto utilizando distintos conjugados para detecção de anticorpos anti-gp43 do *P. brasiliensis* em animais silvestres atendidos pelo Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre da UFPel, e em equinos de distintos haras da região de Bagé. A sorologia foi realizada em 128 animais silvestres, e cerca de 20% destes foram soropositivos no ELISA. A presença de anticorpos anti-gp43 foi detectada em animais oriundos das mesorregiões do sudeste rio-grandense e metropolitana de Porto Alegre. Não foi encontrada diferença significativa de soropositividade considerando gênero, idade, ordem e hábito dos animais ($p>0,05$), no entanto a soropositividade diferiu entre os conjugados utilizados ($p<0,001$). O estudo referente aos equinos incluiu 200 animais provenientes de distintos haras, dos quais 12% apresentavam anticorpos anti-gp43 no teste de ELISA, com taxas variando de 0 a 30% de acordo com o local de origem ($p<0,001$). Tanto no estudo com animais silvestres quanto no estudo com equinos não foi encontrado nenhum animal positivo pela técnica de imunodifusão. Os resultados indicam a presença do fungo *P. brasiliensis* em distintas mesorregiões do Rio Grande do Sul.

Palavras-chave: Sorologia. Soroepidemiologia. Paracoccidioidomicose. gp43. Proteína G-peroxidase. Proteína A-peroxidase.

Abstract

ALBANO, Ana Paula Neuschrack. ***Paracoccidioides brasiliensis*: use of animals as sentinels for the presence of the fungus in Rio Grande do Sul, Brazil.** 2012. 80f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The paracoccidioidomycosis (PCM) is one of the most important systemic mycoses in Latin America, especially in Brazil. Although the Rio Grande do Sul is considered endemic area of the disease, there are few studies on the ecology of *Paracoccidioides brasiliensis* in the state. In this sense, the study aimed to detect infection by *P. brasiliensis* in animals using them as sentinels for detection of the agent in the region. Serology was performed by the techniques of double radial immunodiffusion in agar gel (AGID) and ELISA for detection of anti-gp43 of *P. brasiliensis* in wild animals served by Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre UFPel, and horses from different stables in the region of Bagé. Serology was performed in 128 wild animals, and about 20% of these were positive on ELISA. The presence of anti-gp43 was detected in animals from the mesoregion of Southeast Riograndense and Metropolitan of Porto Alegre. There was no significant difference in seropositivity with respect to gender, age, order and habits of animals ($p > 0.05$), however seropositivity differed between the conjugates used ($p < 0.001$). The study regarding horses included 200 animals from different places, which 12% had anti-gp43 antibodies in ELISA, with rates ranging from 0 to 30% according to the place of origin ($p < 0.001$). Neither the wild animals nor equines were positive by immunodiffusion. The results indicate the presence of the fungus *P. brasiliensis* in different mesoregions of Rio Grande do Sul.

Keywords: Serology. Seroepidemiology. Paracoccidioidomycosis. gp43. Protein G-peroxidase. Protein A-peroxidase.

Lista de Figuras

Artigo 1. WILD ANIMALS AS SENTINELS OF *Paracoccidioides brasiliensis* IN THE STATE OF RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL

Figure 1. Number of positive animals to *P. brasiliensis* according to mesoregion.48

Artigo 2. SOROEPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO POR *Paracoccidioides brasiliensis* EM EQUINOS DA MESORREGIÃO SUDOESTE DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

Fig.1. Mapa mostrando o município de Bagé, Rio Grande do Sul, Brasil.....54

Lista de Tabelas

Artigo 1. WILD ANIMALS AS SENTINELS OF *Paracoccidioides brasiliensis* IN THE STATE OF RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL

Table 1 - Mammals from the state of Rio Grande do Sul, Brazil, included in the serological study for the detection of IgG anti-gp43 of *P. brasiliensis*.....40

Table 2 – Number of seropositive wild mammals in ELISA test for the detection of IgG anti-gp43 of *P. brasiliensis*, according with variables analyzed.45

Table 3 – Number of seropositive wild mammals in ELISA test for the detection of IgG anti-gp43 of *P. brasiliensis*, according with conjugate used.....46

Artigo 2. SOROEPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO POR PARACOCCIDIÓIDES BRASILIENSIS EM EQUINOS DA MESORREGIÃO SUDOESTE DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

Tabela 1 - Resultado do teste de ELISA para pesquisa de anticorpos anti-gp43 do *P. brasiliensis* em equinos de acordo com seu local de origem.....54

Lista de Abreviaturas e Siglas

ELISA: Ensaio imunoenzimático

FV: Faculdade de Veterinária

FURG: Universidade Federal do Rio Grande

IDGA: Imunodifusão radial dupla em gel de Ágar

IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

NURFS/CETAS: Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre (NURFS) e Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS)

PCM: Paracoccidiodomicose

PCR: Reação em Cadeia da *Polimerase*

UFPeI: Universidade Federal de Pelotas

Sumário

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Definição e Histórico da PCM.....	17
2.2 Agente etiológico	17
2.3 Epidemiologia.....	19
2.4 Patogenia e formas clínicas em humanos.....	19
2.5 PCM em animais	21
2.6 Avaliação do habitat do <i>P. brasiliensis</i> utilizando animais como sentinelas	23
3 OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo geral	28
3.2 Objetivos específicos.....	28
3 ARTIGOS	29
3.1 Artigo 1	29
3.2 Artigo 2.....	49
4 CONCLUSÃO GERAL	56
5 REFERÊNCIAS	57
ANEXOS	64
AUTORIZAÇÃO ICMBIO.....	65
NORMAS DAS REVISTAS.....	69
PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	81

1 INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma das micoses sistêmicas granulomatosas mais importantes da América Latina, sendo cerca de 80% dos casos descritos em humanos no Brasil. A maioria dos casos da doença ocorre em adultos em idade produtiva, o que a torna um problema importante de saúde pública tendo em vista seu alto potencial incapacitante (BRUMMER *et al.*, 1993). Em adição, estudos têm demonstrado que a PCM no Brasil representa a maior taxa de mortalidade entre as micoses endêmicas, com média anual de 1,45 por milhão de habitantes (PRADO *et al.*, 2009; PANIAGO *et al.*, 2003; COUTINHO *et al.*, 2002; MARQUES, 1998). No entanto, a ausência de notificação obrigatória dificulta estabelecer a real prevalência e incidência da doença nos diferentes estados brasileiros (COUTINHO *et al.*, 2002).

Após mais de cem anos da primeira descrição da PCM pouco se sabe sobre a eco-epidemiologia do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, e importantes aspectos biológicos da interação patógeno/hospedeiro. Este fungo termodimórfico habita o solo, especialmente de áreas rurais, no entanto, seu nicho ecológico ainda não está totalmente definido. Vários fatores contribuem para essa limitação, como a dificuldade do isolamento do fungo do meio ambiente e o período de latência prolongado que a doença pode apresentar (BAGAGLI *et al.*, 2003; RESTREPO *et al.*, 2000; BAGAGLI *et al.*, 1998).

Regiões consideradas reserváreas do *P. brasiliensis* correspondem a locais de alta pluviosidade (1300 – 2000 mm), temperatura amena (10 – 25 °C), com proximidade a rios e/ou encostas de morros (LONDERO *et al.*, 1972). Apesar de existir a descrição destas características ambientais propícias ao desenvolvimento do fungo, pesquisas utilizando animais como sentinelas têm demonstrado que a infecção pelo *P. brasiliensis* parece ser mais comum do que postulado (CORTE *et al.*, 2009; FORTES *et al.*, 2009; RICHINI-PEREIRA *et al.*, 2008; CORTE *et al.*, 2007; NEVES *et al.*, 2006; ONO *et al.*, 2001; BAGAGLI *et al.*, 1998; COSTA *et al.*, 1995).

Considerando a presença do *P. brasiliensis* no Uruguai (CONTI-DIAZ *et al.*, 1972), país com características fisiográficas semelhantes ao Rio Grande do Sul, e

tendo em vista que o estado é uma área considerada endêmica para PCM, porém com poucos dados a respeito da ecologia do agente, tornam-se necessários os estudos sobre esta infecção fúngica em animais residentes em distintas mesorregiões do estado os quais servirão de sentinela para detecção do agente na região.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Definição e Histórico da PCM

A PCM é uma micose sistêmica, de natureza granulomatosa e evolução crônica, que acomete primariamente o trato respiratório e geralmente apresenta sintomatologia mucocutânea importante associada (MARQUES, 2003).

Adolfo Lutz, em 1908, foi o primeiro a descrever a PCM ao relatar a presença de fungos dimórficos distintos do *Coccidioides immitis*, em lesões bucais de dois pacientes. Devido às semelhanças morfológicas com micoses anteriormente descritas na Argentina e nos Estados Unidos, incluiu sua descrição em um grupo por ele denominado de hifoblasticoses americanas (MOREIRA, 2008).

Em 1912, Alfonso Splendore descreveu novos casos de PCM e através do estudo da morfologia do fungo encontrado, classificou o agente etiológico da paracoccidioidomicose como pertencente ao gênero *Zymonema*, propondo a denominação de *Zymonema brasiliensis* (LACAZ, 2002).

A classificação definitiva do agente da PCM foi realizada por Floriano Paulo de Almeida, em 1930, que confirmou o achado de Lutz, demonstrando as diferenças entre o granuloma coccidióico nos Estados Unidos e no Brasil, além de criar o gênero *Paracoccidioides*, revalidando a espécie *brasiliensis* criada por Splendore (MOREIRA, 2008; LACAZ, 2002).

Desta forma, a paracoccidioidomicose também é denominada como doença de Lutz, blastomicose sul-americana, blastomicose brasileira, moléstia de Lutz-Splendore-Almeida e micose de Lutz. O termo paracoccidioidomicose foi instituído em 1971, sendo até hoje a nomenclatura oficial desta micose (LACAZ, 2002; MOREIRA, 2008).

O primeiro relato da doença em animais foi no ano de 1977 por JOHNSON & LANG em uma fêmea adulta de mico-de-cheiro (*Saimiri sciureus*) na Bolívia (JOHNSON & LANG, 1977).

2.2 Agente etiológico

O agente etiológico da PCM é o fungo termodimórfico atualmente denominado *Paracoccidioides brasiliensis*, e taxonomicamente pertencente ao Reino

Fungi, Filo Ascomycota, Classe Plectomycetes, Ordem Onygenales, Família Onygenaceae, Gênero *Paracoccidioides*, Espécie *P. brasiliensis* (SAN BLAS *et al.*, 2002; HERR *et al.*, 2001; BIALEK *et al.*, 2000; PETERSON & SIGLER, 1998; TAYLOR, 1995). Estudos moleculares têm demonstrado que *P. brasiliensis* pode ser agrupado em três espécies filogenéticas distintas o qual inclui *P. lutzii* (PS2), encontrado no Brasil e na Venezuela e outras duas espécies, até o momento denominadas PS3, encontrada na Colômbia e S1 já descrita no Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela (MATUTE *et al.*, 2006).

P. brasiliensis é um fungo dimórfico que na temperatura de 37°C cresce na forma de levedura caracterizada macroscopicamente por colônias cremosas e rugosas, constituídas de blastoconídios medindo de 5 a 25 µm de diâmetro, com parede dupla e múltiplos brotamentos (BRUMMER *et al.*, 1993). Em temperatura ambiente este fungo macroscopicamente apresenta colônias brancas ou amarronzadas, miceliar, formada por hifas septadas e finas, que dão origem ao curto micélio aéreo o qual forma estruturas conidiogênicas originando os microconídios, propágulos fúngicos infectantes; artroconídios ou clamidoconídios intercalares podem também ser visualizados (BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002; BRUMMER *et al.*, 1993).

Estudos acerca do nicho ecológico do *P. brasiliensis* ainda são inconclusivos, sendo a rastreabilidade do fungo no ambiente bastante difícil em função do período prolongado da doença que dificulta associar a fonte de infecção, ausência de surtos e a pouca repetibilidade nas tentativas de isolamento do fungo do ambiente (BAGAGLI *et al.*, 2008). Ono *et al.* (2002) salientam que pesticidas inibem o desenvolvimento fúngico e sugerem que o uso destes produtos na agricultura pode interferir no isolamento do fungo do solo. Entretanto, até o presente momento, acredita-se que seja um fungo sapróbio no solo (SILVA-VERGARA, 1998), encontrado sob condições adequadas de clima, temperatura e umidade (TERÇARIOLI *et al.*, 2007), sendo que regiões de clima úmido, com temperaturas entre 17 e 27°C, altitude média, solo ácido, vegetação abundante e alto índice pluviométrico parecem ser ideais para o seu desenvolvimento (RESTREPO *et al.*, 2001).

2.3 Epidemiologia

A PCM configura uma das micoses sistêmicas endêmicas mais importantes da América Latina, com distribuição geográfica limitada entre México e Argentina. Destaque especial é dado ao Brasil, país com o maior número de casos documentados, correspondendo a cerca de 80%, principalmente nos estados de São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul (VERLI *et al.*, 2005; PANIAGO *et al.*, 2003; BISINELLI *et al.*, 2001; BRUMMER *et al.*, 1993). No entanto, a ausência de notificação obrigatória representa um dos fatores que dificulta estabelecer a sua real prevalência e incidência nos diferentes estados brasileiros.

Entre os anos de 1980 a 1995, foram registrados 3181 óbitos por PCM no Brasil, representando em uma média anual de 198,81 mortes e uma taxa de mortalidade de 1,45/milhão de habitantes (PANIAGO *et al.*, 2003; COUTINHO *et al.*, 2002; MARQUES, 1998).

Estudos sobre a PCM no Rio Grande do Sul são escassos, no entanto, somente na cidade de Porto Alegre, 757 casos em humanos foram diagnosticados em um único hospital, durante o período de 1996 a agosto de 2002, representando uma média de 126 casos / ano (SILVA *et al.*, 2003). No extremo sul do estado embora escassos relatos descrevem a presença da doença desde 1963 (DUARTE *et al.*, 1999; KLOETZEL *et al.*, 1963), estudo recente retrospectivo demonstrou 123 casos de PCM diagnosticados na cidade de Pelotas em um período de 43 anos, representando uma média de 2,9 casos / ano, porém salientando o aumento do número de casos nas últimas décadas (SOUZA, 2011).

2.4 Patogenia e formas clínicas em humanos

Inicialmente a PCM foi considerada uma micose mucocutâneo, pois frequentemente essas lesões eram o único sintoma clínico o que sugeriu a teoria patogênica traumática, onde o agente era introduzido na pele, mucosas oral ou anal pelo trauma com fragmentos vegetais empregados na higiene (LONDERO & FISCHMAN, 1967; LACAZ, 2002; CONTI-DIAZ, 2008), porém Mackinnon em 1959 obtém PCM generalizada em camundongos infectados por via aerógena, confirmando a hipótese de que a infecção mucocutânea seria secundária a pulmonar (MACKINNON, 1959).

A infecção ocorre por inalação dos conídios do fungo *P. brasiliensis* encontrados no ambiente, os quais alcançam o epitélio alveolar pulmonar se diferenciando na forma leveduriforme. Ocorre então o foco primário da lesão com a multiplicação do agente e a resposta inespecífica do hospedeiro. Em seguida há drenagem para linfonodos regionais e formação do complexo primário pulmonar semelhante ao da tuberculose. Dependendo da virulência da cepa fúngica e da imunidade do hospedeiro a doença pode ser: assintomática, com ou sem microrganismo viável encapsulado na lesão inicial; aguda/subaguda, com disseminação linfohematogênica e frequente acometimento do trato digestório e tecido cutâneo; ou crônica levando a manifestações clínicas pulmonares e lesões mucocutâneas após meses ou anos, podendo evoluir para óbito, caso não seja tratada corretamente (VERLI *et al.*, 2005; LONDERO & SEVERO, 1981; SEVERO *et al.*, 1979 a; SEVERO *et al.*, 1979 b).

A forma aguda é mais grave e rara, acomete principalmente crianças e adolescentes de ambos os sexos, possui rápida evolução, principalmente em áreas de colonização mais recentes submetidas a desmatamento e áreas hiperendêmicas. Os sítios orgânicos mais frequentemente atingidos são linfonodos superficiais (mais de 90% dos casos, podendo supurar e fistulizar), fígado, baço, pele, ossos, articulações. Geralmente, surgem massas abdominais decorrentes da fusão de linfonodos mesentéricos, podendo levar a quadros diversos, como de oclusão intestinal (BRUMMER *et al.*, 1993; FRANCO *et al.*, 1987; SEVERO *et al.*, 1979 b).

A forma crônica ocorre frequentemente em trabalhadores rurais do sexo masculino, com acentuada predominância entre 30 e 50 anos de idade (WANKE & LONDERO, 1994). Esta forma crônica pode se apresentar de forma lenta e localizada, com acometimento predominantemente de pulmões e tecidos mucocutâneos, até casos mais graves e disseminados, onde a gravidade dos sinais depende da competência da imunidade celular do indivíduo. As manifestações mais comuns são sinais e sintomas respiratórios, tosse produtiva com expectoração mucopurulenta. Nesses casos, muitas vezes estão associados sinais e sintomas extrapulmonares marcantes, como lesões mucocutâneas, disfagia, rouquidão, emagrecimento importante, ou até mesmo síndrome de Addison (RAMOS-e-SILVA & SARAIVA, 2008; ALMEIDA *et al.*, 2003; BRUMMER *et al.*, 1993; FRANCO *et al.*, 1987).

Outras formas são esporádicas e podem ter apresentação clínica extremamente pleomórfica, com lesões variadas, isoladas ou múltiplas. O paciente pode apresentar manifestações resultantes da fibrose cicatricial posterior ao tratamento ocasionando sequelas, tais como estenose de traquéia, síndrome disabsortiva, insuficiência de supra-renal, entre outras (conhecida como forma residual). Merecem atenção as taxas crescentes de comprometimento do sistema nervoso central, que, por vezes, leva à acometimento das funções vitais (PEDROSO *et al.*, 2009). Artigo recente descreve oito casos de neuroparacoccidiodomicose no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, de outubro de 1976 a agosto de 2008, sendo observado que todos os pacientes apresentaram a forma parenquimatosa da doença, diferenças em relação à procedência e história familiar positivo de paracoccidiodomicose (PEDROSO *et al.*, 2012).

2.5 PCM em animais

Assim como os seres humanos, os animais também podem se infectar pelo *P. brasiliensis* e desenvolver a doença. Casos de paracoccidiodomicose em vários animais de diferentes origens e habitats como um mico-de-cheiro (*Saimiri sciureus*), tatu-galinha (*Dasypus novemcinctus*), preguiça-real (*Choloepus didactylus*), cão-doméstico (*Canis familiaris*) e gato-doméstico (*Felis catus*) já foram descritos na literatura (FARIAS *et al.* 2011; TREJO-CHAVEZ *et al.*, 2011; GONZALEZ *et al.*, 2010; ONO *et al.*, 2003; BAGAGLI, 1998; NAIFF, 1986; JOHNSON & LANG, 1977).

Em 1977 autores relataram um caso de paracoccidiodomicose em uma fêmea adulta de mico-de-cheiro (*Saimiri sciureus*) na Bolívia. O animal foi recebido em dezembro de 1974 para quarentena e em agosto de 1975 foi encontrado apático e com sangramento anal, sendo encaminhado para eutanásia devido à anemia profunda e baixa condição corporal. Na necropsia foi observada macroscopicamente ulcera gástrica e lesão granulomatosa no fígado que ao exame histopatológico demonstrou a presença de *P. brasiliensis* (JOHNSON & LANG, 1977).

O primeiro isolamento do *P. brasiliensis* em cultivo micológico de fragmento esplênico de um tatu-do-rabo-de-porco (*Cabassous centralis*) foi descrito em 2005 (CORREDOR *et al.*, 2005), em um animal macho capturado em uma fazenda produtora de café no município de Palestina, Colômbia. O diagnóstico foi realizado por isolamento fúngico cujas colônias com características semelhantes ao do

Paracoccidioides brasiliensis, foram identificadas após confirmação do dimorfismo do isolado e por estudos moleculares.

Mais recentemente, uma preguiça-real ou preguiça-de-dois-dedos (*Choloepus didactylus*) de cinco anos de idade, importada da Guiana Francesa para o México, um mês após a sua chegada tornou-se progressivamente letárgica, anoréxica e desidratada indo a óbito. Na necropsia, foram observadas numerosas lesões granulomatosas no fígado, baço, pulmões e rins, nas quais verificou-se a presença de grandes células leveduriformes com múltiplos brotamentos compatíveis com *P. brasiliensis* ao exame histopatológico (TREJO-CHAVEZ *et al.*, 2011).

Em animais domésticos, há um relato de caso sugerindo PCM em um gato persa macho, com oito meses de idade descrito por Gonzalez *et al.* (2010), mas sem comprovação. De acordo com o autor foram detectadas estruturas fúngicas de parasitismo compatíveis com *P. brasiliensis* em líquido cefalorraquidiano e na urina do animal. Os autores relataram que inicialmente o animal apresentava febre persistente, anorexia, fraqueza, nistagmo, tremores e neutropenia não responsiva a antibioticoterapia e que após o diagnóstico foi tratado com antifúngicos, porém desenvolveu uma síndrome urêmica progressiva e foi eutanasiado, não sendo a necropsia autorizada pelo proprietário.

O primeiro relato de paracoccidioidomicose em cães ocorreu em 2004 por Ricci *et al.* (2004), em uma fêmea da raça Doberman proveniente do município de Mogi Guaçu, São Paulo, região considerada endêmica do fungo. O animal apresentava aumento dos linfonodos cervicais que na histopatologia revelou células leveduriformes com características de *P. brasiliensis*, sem comprometimento de outros órgãos. O animal foi tratado com cetoconazol até a total regressão dos linfonodos, mas após 18 meses os mesmos sinais clínicos foram observados e optou-se pela eutanásia. O diagnóstico confirmatório foi realizado através de imunohistoquímica usando anticorpo anti-gp43 e por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) usando primers específicos.

Farias *et al.* em 2005 relataram o segundo caso de PCM em outro cão fêmea da raça Doberman, com seis anos de idade, que apresentava linfadenomegalia generalizada, hepato e esplenomegalia com emagrecimento progressivo havia cerca de duas semanas. O cão participava de exposições, nasceu na Argentina onde permaneceu até completar dois anos, após veio para o Brasil e passou por vários estados até estabelecer residência permanente na cidade de

Curitiba, Paraná. O diagnóstico foi realizado através de cultura fúngica, imunohistoquímica e histopatologia do linfonodo poplíteo. A cura clínica foi obtida após dois anos de tratamento com itraconazol.

2.6 Avaliação do habitat do *P. brasiliensis* utilizando animais como sentinelas

A investigação do *P. brasiliensis* em animais silvestres e domésticos vem representando uma excelente estratégia para estudos sobre a ecologia do agente, pois a doença nos animais e o papel que estão desempenhando como carreadores ou reservatórios do fungo ainda não estão bem esclarecidos. Estudos utilizando animais como sentinelas da presença do fungo têm demonstrado que o agente possui uma distribuição mais ampla do que postulado embora seja descrita sua localização basicamente no meio rural (RICHINI-PEREIRA *et al.*, 2008; BOUSQUET *et al.*, 2007).

Para este fim, estudos têm utilizado ensaios sorológicos como imunodifusão radial dupla em gel de Ágar (IDGA), ensaio imunoenzimático (ELISA), Western Blot e o emprego do PCR, com antígenos e primers específicos para o fungo, além de cultivo micológico para isolamento fúngico em diversas espécies silvestres e domésticas. A detecção da exposição dos animais ao *P. brasiliensis* utilizando antígenos específicos (paracoccidioidina) por testes intradérmicos está em desuso por ser uma técnica pouco específica e especialmente por requerer um período de 48 a 72 horas para leitura do resultado (OLIVEIRA *et al.*, 2012; CORTE *et al.*, 2009; ONO *et al.*, 2001).

Nos animais silvestres, há registros na literatura de estudos sorológicos e moleculares que revelaram a positividade da infecção pelo *P. brasiliensis* em diversas espécies, tais como: tatu-galinha (*Dasypus novemcinctus*), quati (*Nasua nasua*), macaco-prego (*Cebus apella*), sagui-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*), gambá-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*), tatu-do-rabo-de-porco (*Cabassous centralis*), bugio-preto (*Alouatta caraya*), preá (*Cavia aperea*), ouriço-cacheiro (*Sphiggurus spinosus*), mão-pelada (*Procyon cancrivorus*) e furão (*Galictis vittata*) (FORTES *et al.*, 2009; RICHINI-PEREIRA *et al.*, 2008; CORTE *et al.*, 2007; NEVES *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 1995). Estes mesmos estudos também foram realizados em diversos animais domésticos como cães, frangos, bovinos leiteiros, ovinos e equinos (OLIVEIRA *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2011; FONTANA *et al.*, 2010;

CANTEROS *et al.*, 2010; CORTE *et al.*, 2009; SILVEIRA *et al.*, 2008; SILVEIRA *et al.*, 2006; RICCI *et al.*, 2004).

Estudo sorológico com cães domésticos, sem raça definida, foi realizado na Argentina, em uma área rural denominada Interflúvio Teuco-Bermejito, na Província de Chaco. Foram incluídos 89 animais de sete comunidades distintas, com mais de um ano de idade, sendo 22 fêmeas, 66 machos e um animal que não teve o sexo determinado. Todos foram negativos nas técnicas de imunodifusão radial dupla em gel de Ágar e contraímunoeletroforese, enquanto que por Western Blotting dois cães, uma fêmea e um macho de três anos, demonstraram soropositividade anti-gp43 (CANTEROS *et al.*, 2010).

No Brasil, estudo com cães no intuito de avaliar a infecção natural pelo *P. brasiliensis* já foi desenvolvido em distintos estados. Em Minas Gerais, um estudo utilizando sorologia e teste intradérmico em 275 cães domésticos, demonstrou que dos 149 animais da área urbana do município de Uberaba 80 apresentaram sorologia positiva e nove foram positivos para os testes intradérmicos, enquanto que dos 126 da área rural, soropositividade encontrada em 102 (FONTANA *et al.*, 2010).

Estudo realizado no município de Monte Negro, Rondônia, Amazônia Ocidental Brasileira, demonstrou positividade de 54,8% das amostras de soro de 126 cães urbanos analisadas por ELISA indireto utilizando gp43, sem diferença estatística observada na soroprevalência em relação ao sexo ou à idade (CORTE *et al.*, 2012).

Ainda utilizando cães, no norte do estado do Paraná o soro de 305 animais foram analisados por ELISA para determinar a presença do anticorpo anti-gp43. Os animais foram divididos em três grupos: 54 cães urbanos (animais com pouco ou nenhum contato com a área rural), 213 cães suburbanos (animais da periferia da cidade, locais sem calçamento ou asfalto) e 38 cães rurais (animais que viviam exclusivamente em área rural). Os resultados obtidos demonstraram que os cães urbanos tiveram uma positividade de 14,8%, os suburbanos de 48,8% enquanto que 89,5% dos animais da área rural foi positivo (ONO *et al.*, 2001).

Nesta mesma região do Paraná, estudo de Corte *et al.*, (2009) avaliou a infecção por *P. brasiliensis* em 100 equinos, 53 machos e 47 fêmeas, com idades entre um e dezesseis anos. As amostras séricas foram analisadas por ELISA e por imunodifusão radial em gel de Ágar, utilizando como antígenos a gp43 e o exoantígeno de *P. brasiliensis*. Não foram observados animais positivos na

imunodifusão radial em gel de Ágar, enquanto que por ELISA a soropositividade foi de 30%. Neste mesmo estado, em Guarapuava, estudo soroepidemiológico demonstrou uma positividade de 37% para gp43 por ELISA a partir de 262 ovinos da região (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Bovinos leiteiros também já foram utilizados como sentinelas da presença do *P. brasiliensis* em um estudo soroepidemiológico realizado no estado do Mato Grosso do Sul. Foram incluídos 400 animais, 340 fêmeas e 60 machos, com idades entre nove meses a 10 anos, demonstrando 17,5% de soropositividade para a gp43 (SILVEIRA *et al.*, 2008).

Semelhante estudo foi realizado em frangos domésticos (*Gallus domesticus*) da região do Pantanal sul matogrossense e da região norte do Estado do Paraná, onde amostras de soro foram testadas por ELISA indireto utilizando gp43 como antígeno. As amostras foram coletadas de 100 animais não confinados e 43 confinados no Paraná, e de 40 animais não confinados no Mato Grosso do Sul. Inicialmente, dois animais foram imunizados com *P. brasiliensis* e tiveram sua resposta humoral avaliada, ambos apresentaram a produção de anticorpos. Os animais não confinados do Mato Grosso do Sul e do Paraná apresentaram positividade de 55% e 16%, respectivamente, enquanto que todos os animais confinados foram negativos (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Entre os animais silvestres, destaque é dado ao tatu-galinha (*Dasypus novemcinctus*), cuja importância se dá pela sua distribuição geográfica na natureza, que se sobrepõem, em grande parte, às áreas em que ocorre a paracoccidiodomicose doença, e pelos seus hábitos de não se afastar de sua toca, o que permite a delimitação com maior precisão da possível reservárea do *P. brasiliensis* e, conseqüentemente, de maior risco para infecção humana. Estes animais, por possuir um íntimo contato com o solo, podem ser considerados como importante sentinela da presença do fungo na região seja por detecção da sua exposição ao agente ou por seu acometimento por PCM, conforme já descrito por diversos autores com casos comprovados por isolamento fúngico ou por exame anátomo-patológico de lesões em fígado, baço, pulmões e linfonodos mesentéricos (BAGAGLI *et al.*, 2003; SILVA-VERGARA *et al.*, 2000; SILVA-VERGARA & MARTINEZ, 1999; CORREDOR *et al.*, 1999; BAGAGLI *et al.*, 1998).

Richini-Pereira *et al.* (2008) avaliou a presença do *P. brasiliensis* por nested-PCR em amostras de tecido de 19 animais silvestres vítimas de

atropelamento no estado de São Paulo, detectando-o em vários órgãos de dois tatus (*Dasypus novemcinctus* e *Dasypus septemcinctus*) e uma preá (*Cavia aperea*), nos pulmões e fígado de um ouriço-cacheiro (*Sphiggurus Spinosus*) e nos pulmões de um mão-pelada (*Procyon cancrivorus*) e um furão (*Galictis vittata*).

No ano seguinte, estes mesmos autores descreveram um estudo com várias espécies de Xenartros, vítimas de atropelamento, mortos em cativeiro, capturados ou encontrados mortos na natureza, onde, utilizando técnicas moleculares e cultura, detectaram *P. brasiliensis* em vários órgãos de sete tatus-galinha (*Dasypus novemcinctus*) e em dois tamanduas-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*), sendo que a positividade foi relativamente alta nos animais da natureza ou que morreram logo após o início do cativeiro enquanto todas as amostras de animais que estavam um longo período em cativeiro foram negativas (RICHINI-PEREIRA *et al.*, 2009).

A soroprevalência para *P. brasiliensis* em primatas do Novo Mundo também foi avaliada em um estudo utilizando soro de 93 animais, 68 macacos-prego (*Cebus* sp.) e 25 bugios-preto (*Alouatta caraya*), capturados no município de Porto Rico, Paraná. As amostras foram analisadas por imunodifusão e ELISA, sendo observada positividade de 44,1% nos macacos-prego de 60% nos bugios-preto por ELISA, enquanto que por imunodifusão todos bugios-preto foram negativos e somente 2,9% dos macacos-prego apresentaram positividade (CORTE *et al.*, 2007).

Por outro lado, em um estudo de Silva-Vergara *et al.* (2001) onde foram capturados 20 gambás-de-orelha-braca (*Didelphis albiventris*), no Triângulo Mineiro, estado de Minas Gerais, para a cultura direta de fígado, baço e pulmões e posterior inoculação intraperitoneal da suspensão dos fragmentos destas vísceras em camundongos, não houve isolamento fúngico durante as 12 semanas de incubação nem desenvolvimento da doença nos animais inoculados.

Em relação aos habitats e comportamentos dos animais silvestres, Costa *et al.* em 1995 realizou um trabalho com teste intradermico com paracoccidioidina em 96 mamíferos silvestres: 33 primatas [macacos-prego (*Cebus apella*), sagüis-de-tufos-branco (*Callithrix jacchus*)], 37 quatis (*Nasua nasua*) e 10 felídeos (*Panthera onca*, *Leopardus pardalis*, *Leopardus wiedii*, *Leopardus tigrinus* e *Leopardus geoffroyi*), demonstrando que os animais de hábito terrestre possuem maior positividade (82,98%) do que os arborícolas (22,45%).

Semelhante estudo foi publicado no mesmo ano e pelos mesmos autores utilizando animais domésticos de vários municípios do estado de São Paulo e

animais silvestres provenientes do Zoológico de São Paulo ou de doações de particulares. Foram incluídos no estudo 632 bovinos, 234 equinos, 98 ovinos, 16 saguis-de-tufos-branco (*Callithrix jacchus*), 36 macacos-prego (*Cebus apella*), 37 quatis (*Nasua nasua*) e três onças-pintada (*Panthera onca*), uma jaguatirica (*Leopardus pardalis*), um gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), quatro gatos-maracajá (*Leopardus wiedii*), e um gato-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*). Observou-se positividade de 40,2% nos bovinos, 63,8% nos equinos, 40,8% nos ovinos, 21,1% nos primatas, 94,6% nos procionídeos e 45,4% nos felídeos (COSTA *et al.*, 1995b).

No Rio Grande do Sul não são descritos estudos utilizando animais silvestres ou domésticos como sentinelas da presença do *P. brasiliensis*, o que justifica a realização do presente trabalho.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Pesquisar a infecção pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis* em animais do Rio Grande do Sul, Brasil, como forma de auxiliar na compreensão dos aspectos ecológicos do fungo em distintas regiões do estado.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a presença de anticorpos IgG específicos contra *P. brasiliensis* no soro dos mamíferos silvestres recebidos pelo Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre (NURFS) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel);
- Avaliar a presença de anticorpos IgG específicos contra *P. brasiliensis* no soro de equinos domésticos de distintos haras da cidade de Bagé;
- Comparar os resultados dos testes sorológicos utilizados (IDGA *versus* ELISA) para detecção de anticorpos anti-gp43 do *P. brasiliensis* em animais silvestres e em equinos;
- Comparar distintos conjugados na eficácia da técnica de ELISA para detecção de anticorpos anti-gp43 do *P. brasiliensis* em diferentes espécies de animais;
- Delimitar possíveis áreas ecológicas do *P. brasiliensis* no Rio Grande do Sul de acordo com a origem dos animais infectados.

3 ARTIGOS

3.1 Artigo 1

WILD ANIMALS AS SENTINELS OF *Paracoccidioides brasiliensis* IN THE STATE OF RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL

Ana Paula Neuschrack Albano, Gabriel Baracy Klafke, Tchana Martinez Brandolt,
Vanusa Pousada da Hora, Angela Leitzke Cabana, Luiz Fernando Minello, Greici
Maia Behling, Marco Antonio Afonso Coimbra, Sérgio Jorge, Elizandro Oliveira dos
Santos, Angelita Reis Gomes, Zoilo Pires de Camargo, Melissa Orzechowski Xavier,
Mário Carlos Araújo Meireles

Artigo sob as normas da revista “Medical Mycology”

**WILD ANIMALS AS SENTINELS OF *Paracoccidioides brasiliensis* IN THE STATE
OF RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL**

ALBANO APN¹, KLAFKE GB², BRANDOLT TM², DA HORA VP³, CABANA, AL⁴,
MINELLO, LF⁵, BEHLING, GM⁵, COIMBRA, MAA⁵, JORGE, S¹, SANTOS, EO⁶, GOMES,
AR⁴, CAMARGO ZP⁷, XAVIER MO², MEIRELES MCA¹.

¹Department of Veterinary Preventive, Veterinary Faculty of Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, Brazil; ²Mycology Lab; Medicine Faculty of Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, Brazil. ³Immunology Lab; Medicine Faculty of Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, Brazil. ⁴Mycology Lab; Veterinary Medicine Faculty of Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Pelotas, Brazil. ⁵Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre, Pelotas, Brazil. ⁶Veterinarians, ⁷Departament of Microbiology, Immunology and Parasitology, Federal University of São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil

Short title: **SEROEPIDEMIOLOGY OF *Paracoccidioides brasiliensis* INFECTION IN
WILD ANIMALS**

KEYWORDS: seroepidemiology, ELISA, *Paracoccidioides brasiliensis*, gp-43, protein A-peroxidase, protein G-peroxidase, wild animals.

***Corresponding author:**

Melissa Orzechowski Xavier

Address: Prof. Carlos Henrique Nogueira, 268. Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil. CEP: 96020-560. Phone: (+55) 53-32330318 / 8871

E-mail: melissaxavier@ig.com.br or melissaxavier@furg.br

* Integral part of the doctoral thesis of the first author

ABSTRACT

Background: *Paracoccidioides brasiliensis* is a dimorphic pathogenic fungus that causes the main systemic mycosis in Brazil. Limited data in the literature is available regarding the ecology of this fungus in the state of Rio Grande do Sul.

Objectives: to evaluate the fungal infection in wild animals by serologic tests as sentinels of the *P. brasiliensis* presence in distinct regions of the most southern state of Brazil.

Patients/Methods: 128 wild animals from three mesoregions of Rio Grande do Sul, Brazil, were included in the study. Serum samples were evaluated by immunodiffusion and ELISA to detect antibodies anti-gp43 from *P. brasiliensis*. For ELISA technique two conjugates were tested and compared.

Results: although none positive sample was detected by immunodiffusion, 26 animals (20%), of 13 distinct species, were seropositive by ELISA technique. They were from two mesoregion of Rio Grande do Sul, Brazil. Results were similar according to gender, age and family of animals but differed significantly according to the conjugate used ($p < 0.001$), being protein A-peroxidase more sensitive than protein G-peroxidase.

Conclusion: wild animals from the state of Rio Grande do Sul are exposed to *P. brasiliensis* which shows that the fungus can be found in this region although the frequently rigorous winters with including frequent frozen.

INTRODUCTION

Paracoccidioidomycosis (PCM) is the most important systemic mycoses granulomatous in Latin America, with about 80% of reported cases in Brazil. Most cases of the disease occur in adults of working age, which makes it a major public health problem in view of its high incapacitating potential [1]. Studies have shown that PCM in Brazil represents the highest mortality rate among the endemic mycoses, with an annual average of 1.45 per million [2-5]. However, the absence of notifiable difficult to establish the real situation of the disease in different Brazilian states [4].

After over one hundred years since the first description of PCM few is known about the eco-epidemiology of the etiological agent *Paracoccidioides brasiliensis*. This dimorphic fungus inhabits the soil, especially in rural areas, however, its ecological niche is not yet fully defined [6-8]. Regions considered favorable for *P. brasiliensis* correspond to areas of high rainfall, mild temperatures, with proximity to rivers and / or slope hill [9].

Although there is a description of these environmental characteristics favorable to fungal growth, sentinel studies using animals have shown that infection by *P. brasiliensis* seems to be more common than postulated [8, 10-15, 16]. In this sense, considering that the state of Rio Grande do Sul, Brazil, is an endemic area for PCM, but with few data about the ecology of the agent, the study aimed to investigate the infection by *P. brasiliensis* in animals living in different mesoregions of the state.

MATERIAL AND METHODS

Area of Study and animals included

The study included all wild animals treated between January 2010 and July 2012 at Center for Rehabilitation of Wildlife (NURFS), Federal University of Pelotas (UFPel), coming from Rio Grande do Sul. Debilitated animals whose need anesthesia to collect blood

sample could not be accomplished were excluded from the study. The project was developed in accordance with the standards of animal welfare and was approved by the Ethics and Animal Experimentation of the Federal University of Pelotas and the Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA n° 24501-1).

The animals were from three mesoregions of the Rio Grande do Sul state: mesoregion Metropolitan of Porto Alegre city, Southeast and Southwest mesoregions. As climate characteristics, such mesoregions present altitudes between four and 450 m, and humid subtropical climate, with high relative humidity ranging from 70 to 85%, hot summers and cold winters with frequent frosts. The average temperatures of the warmest months range from 23 to 25 °C and cold months of 12-14 °C, and rainfall is evenly distributed throughout the year, with average annual rainfall of 1200-1300 mm [17].

Study Variables and Samples

The variables concerning animals were sex, age (adult / juvenile), order, family, habit and origin (rural / urban). Regarding the habit animals were categorized into land (animals with permanent contact with the ground), arboreal (animals whose life is mainly about the trees and with few contact with the ground), wetlands (animals that live near water bodies and wetlands) or terrestrial / arboreal (animals with mixed habits).

All animals were anesthetized with protocol established in the literature for the species and subjected to a single serum sample for serological analysis, by puncture of jugular vein. After separation of the serum, it was kept stored at -20 °C for serologic tests realization to detect specific IgG anti *P. brasiliensis* by double radial immunodiffusion in agar gel (AGID) test and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using the fungal antigen gp43, a glycoprotein of 43 kDa.

Antigens

The exoantigen was obtained as described by Camargo *et al.* [18], using the *P. brasiliensis* isolate B-339. The gp43 antigen was purified from the *P. brasiliensis* exoantigen by affinity chromatography according to Puccia and Travassos [19] and the protein concentration was determined by the Bradford method using BSA as standard [20].

Immunodiffusion test (AGID)

The immunodiffusion test was conducted providing the gp43 antigen on the central orifice and the samples to be tested in side holes. Serum positive control (*Paracoccidioides* ID positive control - Immuno Mycologics, Inc.) was used in the reaction in the top and bottom holes for reading and final interpretation of the test as described by Camargo *et al.* [18].

ELISA with gp43 antigen

For the ELISA test, polystyrene microplates of 96 wells (Corning Costar Corporation, Corning, NY, USA) were sensitized with gp43 (260ng/well) in 100 µL of carbonate / bicarbonate buffer (pH 9.6) and incubated at 4 °C for 18 hours. The plates were then washed with phosphate buffered saline with 0.5% Tween 20 (PBS-T) and blocked with PBS-1% milk (skimmed milk powder diluted in PBS) for 60 minutes at 37 °C. Then the plate was washed five times with PBS-T and incubated for one hour at 37 °C with the serum to be tested diluted in 1:100 in PBS. After washing five times with PBS-T, 100 µL conjugate (1:10000) were added into each well, followed by incubation for one hour at 37 °C. Following the final wash performed by ten times with PBS-T 100 µL of substrate / chromogen (4mg of OPD dissolved in 10 mL citrate buffer) were added. After incubation for ten minutes at 37 °C, the reaction was blocked by the addition of 100 µL of 1N sulfuric acid, and absorbance was determined in a microplate reader (TECAN Spectra classic) using 450 nm filter. All samples were tested in triplicate. The same commercially available positive control (Immuno Mycologics, Inc., IMMY) was used and serum negative control corresponded to a serum of human umbilical

cord, all equally diluted 1:100 in PBS. Samples which had absorbance greater than twice the negative control were considered positive.

All sera were submitted to the technique twice for comparison of distinct conjugates, protein G-peroxidase (SIGMA ®) and protein A-peroxidase (SIGMA ®) using the same protocol.

Statistical analysis

The results were analyzed using the chi-square test for categorical variables, and the Kappa test for the index agreement between conjugates. Data were analyzed using SPSS® 20.0 and *P*-values lower than 0.05 were considered as statistically significant.

RESULTS

Altogether the study included 128 wild mammals, belonging to 17 species, 11 families and seven different orders (Table 1). Most of the animals studied came from mesoregion of Southeast Riograndense 102 (79.7%), 25 (19.5%) were from the Metropolitan of Porto Alegre city mesoregion, and one animal (0.8%) from the mesoregion of Southwest Riograndense.

All serum samples were negative by AGID test for the detection of anti-gp43 of *P. brasiliensis*. Nevertheless, using the ELISA test, with conjugate protein G-peroxidase and / or protein A-peroxidase, 20.3% of the population was positive, totalizing 26 animals from thirteen different species. Of these, 20 individuals were from mesoregion of Southeast Riograndense and six from the mesoregion Metropolitan of Porto Alegre city, being seronegative the only animal from the mesoregion of Southwest Riograndense (Fig. 1). Results of the variables analyzed according to the seropositivity by ELISA are described in Table 2.

ELISA with protein G-peroxidase as conjugate was able to detect nine positive samples, while using protein A-peroxidase, 23 samples resulted in positive values ($p < 0.001$).

Only six serum samples were positive in both conjugate, protein A-peroxidase and G protein-peroxidase (kappa: 0.305), and these come from a southern long-nosed armadillo (*Dasypus hybridus*), two brown capuchin (*Cebus apella*), two white-eared opossum (*Didelphis albiventris*) and a geoffroy's cat (*Leopardus geoffroy*) (Table 3).

DISCUSSION

This pioneer study proved the presence of the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* in the state of Rio Grande do Sul in wild animals and shows the validity of using animals as sentinels to consolidate the ecological aspects of this important agent of systemic mycosis [8, 12, 14, 15, 21].

In agreement with several other studies [10, 15, 21], none animals were seropositive using the technique of AGID. In contrast, ELISA detected 20.3% seropositivity. Corte *et al.* [13] had also detected low or zero seropositivity in black howler monkey (*Alouatta caraya*) and capuchin monkey (*Cebus* sp.) by AGID, although by ELISA IgG anti-gp43 was detected in 60% and 44.1% of animals, respectively.

The discrepancy between these techniques is justified by their distinct sensitivity [15]. The AGID technique, although more accessible, is less sensitive showing positive results only in serum samples with large concentration of circulating antibodies, a condition found only in individuals with active disease [22]. On the other hand, ELISA technique allows to evidenciate including few concentrations of circulating antibodies, making it ideal for seroepidemiologic study of exposure to the fungus, as the present work.

The seropositivity rate of about 20% in our study is similar to that described in other states of Brazil [10, 23, 24]. However, in Rio Grande do Sul there are no studies to compare results in different mesoregions. In Uruguay, a neighboring country and with similar climatic

characteristics, a seropositivity rate of 23% are described in horses tested [25], a value close to those described in our results.

As already showed in domestic dogs and primates [10, 13, 15, 26], in our study seropositivity did not differ in regarding of sex or age, suggesting that all of them are equally exposed to the infection from the environment. Similarly, the terrestrial wild animals were the most representative (50%) from our study, similar to that observed by Costa *et al.* [16] that found about 80% of seropositive animals with terrestrial habit, and arboreal only 20%, confirming the theory that the soil is the likely reservoir of *P. brasiliensis*.

The infection by *P. brasiliensis* in wide different species of domestic and wild animals has been proved by serology, molecular techniques and intradermal reaction [10, 12, 13, 16]. In addition, our study describes for the first time the presence of anti-gp43 *P. brasiliensis* in species such as six-banded armadillo (*Euphractus sexcinctus*), white-eared opossum (*Didelphis albiventris*), crab-eating raccoon (*Procyon cancrivorus*), capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*), nutria (*Myocastor coypus*), brown brocket (*Mazama guazoubira*), lesser grison (*Galictis cuja*), crab-eating Fox (*Cerdocyon thous*), pampas fox (*Lycalopex gymnocercus*), margay (*Leopardus wiedii*) and geoffroy's cat (*Leopardus geoffroy*).

Unlike that described in humans [27] and in animals [20, 28] in our results seropositivity did not differ between animals coming from rural and urban areas, which suggest that the fungus is not specifically restricted to the rural environment. In fact, Ono *et al.* [15] had detected anti-gp43 of *P. brasiliensis* in dogs strictly urban, also proving the presence of the fungus in that area. One hypothesis for this data is deforestation and / or accelerated growth of cities invading the field, or even the possibility that waterfowl may serve as a dispersing agent in the environment [29].

The *P. brasiliensis* was proved to be present in the environment of the mesoregion of Southeast Riograndense and Metropolitan of Porto Alegre mesoregion, where 19.6% and

24%, respectively, of wild animals had antibodies from anti-gp43 of the fungus. These data are pioneers and extremely relevant considering that the climatic characteristics of various municipalities in these regions are distinct from those described as ideal for the fungus [30], mainly due to the frequent cold winters with freezing temperatures and frost behavior which does not favor its development.

The inaccessibility or absence of secondary antibodies specific for wild animals is a limitation to perform serological studies in this population. To bypass it, the use of conjugates produced from proteins secreted by bacteria, such as protein A-peroxidase and protein G-peroxidase are stimulated [31-34]. These proteins are normal constituents of the cell wall of *Staphylococcus aureus* group C and G streptococci, respectively, and have the ability to bind the Fc portion of circulating immunoglobulins (IgG) from various mammalian species with high specificity [31, 33, 34].

The variability in the degree of affinity and variability in the avidity for immunoglobulin according to the animal species [31, 33, 34] justifies the significant difference in the seropositivity found in our study between conjugates and the low level of agreement between them. Confirming that described by Stöbel *et al.* [33] and Pelli *et al.* [31] the protein A reactivity is wider when compared to protein G, in relation to the number of animals species whose immunoglobulin can be detected. This data can justify the significantly higher seropositivity found in our study when we used protein A-peroxidase *versus* protein G-peroxidase (n = 23 and n = 9, respectively).

Many wild animals included in our study belonged to the species for which haven't yet been described studies to prove or exclude the affinity of these proteins to their immunoglobulins, as lesser grison (*Galictis cuja*), capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*), nutria (*Myocastor coypus*), pampas fox (*Lycalopex gymnocercus*); crab-eating fox (*Cerdocyon thous*), crab-eating raccoon (*Procyon cancrivorus*), geoffroy's cat (*Leopardus*

geoffroy); margay (*Leopardus wiedii*); southern long-nosed armadillo (*Dasypus hybridus*); six-banded armadillo (*Euphractus sexcinctus*).

The detection of a higher number of specimens of white-eared opossum (*Didelphis albiventris*) and the brown brocket (*Mazama guazoubira*) seropositive by protein A (n = 7 and n = 2, respectively) compared to protein G (n = 3 and n = 1, respectively) differs from that described by Pelli *et al.* [31] who observed higher reactivity of the protein G compared with protein A for detection of immunoglobulins in both of these species.

Among the six wild animals seropositive detected by both conjugates, we highlight two brown capuchin (*Cebus apella*), whose description of affinity of both proteins to their IgG has already been described [13, 31, 33, 34]. Nevertheless, the reactivity found in both proteins in a specimen of the geoffroy's cat (*Leopardus geoffroy*) contrasts with the data that protein G has no affinity to Cat's antibodies [31-33], although the other two seropositive cats in our study were detected only by protein A.

Intra-species affinity / avidity of the protein A and G to immunoglobulins described in the literature [33, 34] were also found in our study. The mainly occurs in the group of white-eared opossum (*Didelphis albiventris*) where we detected a positive animal exclusively using protein G conjugated, five individuals solely by protein A-peroxidase, and two other individuals with reactivity to both conjugates. Kelly *et al.* [34] and Stöbel *et al.* [33] suggest that intraspecies variability can occur for a variety of reasons, such as differences in the concentration of antibodies in the sera tested, or in different classes and subclasses of immunoglobulins, serum presence of inhibitors of the binding of these proteins to immunoglobulins, or even individual genetic variations that modify the receptor, the binding sites of the proteins to immunoglobulins.

CONCLUSION

The ELISA results indicate that protein A conjugate reactivity is wider when compared to protein G and AGID used for detection of antibody anti-gp43 showed low sensitivity, in the distinct animals species. Wild animals from the state of Rio Grande do Sul are exposed to *P. brasiliensis* which shows that the fungus can be found in this region although the frequently rigorous winters with including frequent frost.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) grant nº 478346/2010 - 7 (Edital Universal 14/2010).

CONFLICT OF INTEREST

Authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- 1 Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev* 1993; **6**: 89-117.
- 2 Prado MF, Silva MB, Laurenti R, *et al.* Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2009; **104**: 513-521.
- 3 Paniago AM, Aguiar JI, Aguiar ES, *et al.* Paracoccidioidomycosis: a clinical and epidemiological study of 422 cases observed in Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; **36**: 455-459.

- 4 Coutinho ZF, Silva D, Lazéra M, *et al.* Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cadernos de Saúde Pública Rio de Janeiro* 2002; **18**: 1441-1454.
- 5 Marques AS. Paracoccidioidomicose. *An Bras Dermatol* 1998; **73**: 455-469.
- 6 Bagagli E, Franco M, Bosco SMG, *et al.* High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillo (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. *Medical Mycology* 2003; **41**: 217-223.
- 7 Restrepo A, Baumgardner DJ, Bagagli E, *et al.* Clues to the presence of pathogenic fungi in certain environments. *Medical Mycology* 2000; **38**: 67-77.
- 8 Bagagli E, Sano, A, Coelho KI, *et al.* Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg* 1998; **58**: 505-512.
- 9 Londero AT, Ramos CD, Lopes JO, Benevenga JP. “Reservárea” da paracoccidioidomicose no Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1972; **14**: 377-380.
- 10 Corte AC, Itano EM, Freire RL, Camargo ZP, Ono MA. Detecção de anticorpos para *Paracoccidioides brasiliensis* em cavalos da região norte do Estado do Paraná. *Semina Ciências Agrárias Londrina* 2009, **30**: 441-446.
- 11 Fortes RM, Kipnis A, Junqueira-Kipnis ANA. *Paracoccidioides brasiliensis* pancreatic destruction in *Calomys callosus* experimentally infected. *BMC Microbiology* 2009; **9**: 84.
- 12 Richini-Pereira VB, Bosco SMG, Griesse J, *et al.* Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. *Medical Mycology* 2008; **46**: 35-40.
- 13 Corte AC, Svoboda WK, Navarro IT, *et al.* Paracoccidioidomycosis in wild monkeys from Paraná State, Brazil. *Mycopathologia* 2007; **164**: 225-228.
- 14 Neves S, Petroni T, Fedatto P, Ono MA. Paracoccidioidomicose em animais silvestres e domésticos. *Semina Ciências Agrárias Londrina* 2006; **27**: 481-488.

- 15 Ono MA, Bracarense APFRL, Morais HAS, *et al.* Canine paracoccidioidomycosis: a seroepidemiologic study. *Medical Mycology* 2001; **39**: 277-282.
- 16 Costa EO, Diniz LSM, Fava Netto C. The prevalence of positive intradermal reactions to paraccodioidin in domestic and wild animals in São Paulo, Brazil. *Veterinary Research Communications* 1995; **19**: 127-130.
- 17 Fundação de Economia e Estatística (FEE) [<http://www.fee.rs.gov.br/>]. Rio Grande do Sul, Brasil. Disponível em: http://www.fee.rs.gov.br/feedados/consulta/unidades_geo.asp>. Acesso em: setembro 2012.
- 18 Camargo ZP, Unterkircher C, Campoy SP, Travassos LR. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion test. *J Clin Microbiol* 1988; **26**: 2147–2151.
- 19 Puccia R, Travassos LR. 43-kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis and Jorge Lobo's disease. *J Clin Microbiol* 1991; **289**: 298–302.
- 20 Bradford MM. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 1976; **72**: 248–254.
- 21 Canteros CE, Madariaga MJ, Lee W, *et al.* Endemic fungal pathogens in a rural setting of Argentina: Seroepidemiological study in dogs. *Rev Iberoam Micol* 2010; **27**: 14-19.
- 22 Moreira APV. Paracoccidioidomicose: histórico, etiologia, epidemiologia, patogênese, formas clínicas, diagnóstico laboratorial e antígenos. *Boletim Epidemiológico Paulista* 2008; **5**: 51.
- 23 Oliveira GG, Navarro IT, Freire RL, *et al.* Serological survey of Paracoccidioidomycosis in sheep. *Mycopathologia* 2012; **173**: 63-68.
- 24 Silveira LH, Paes RCS, Medeiros EV, *et al.* Occurrence of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in dairy cattle from Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mycopathologia* 2008; **165**: 367-371.

- 25 Conti-Diaz IA, Alvarez BJ, Gezuele E, *et al.* Intradermal reaction survey with paracoccidioidin and histoplasmin in horses. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 1972; **14**: 372-376.
- 26 Silveira LH, Domingos IH, Kouchi K, *et al.* Serological detection of antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* in dogs with leishmaniasis. *Mycopathologia* 2006; **162**: 325-329.
- 27 Restrepo A, Mcewen JG, Castañeda E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Medical Mycology* 2001; **39**: 233-241.
- 28 Fontana FF, Santos, CTB, Esteves FM, *et al.* Seroepidemiological survey of paracoccidioidomycosis Infection among urban and rural dogs from Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Mycopathologia* 2010, **169**: 159-165.
- 29 Conti-Diaz IA, Rilla FD. Hypoteses sobre el nicho ecologico de *Paracoccidioides brasiliensis*. *Revista Medica Del Uruguay* 1989; **5**: 97-103.
- 30 Terçarioli GR, **Bagagli E, Reis GM**, *et al.* Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* In soil: growth ability, conidia production and molecular detection. *BMC Microbiology* 2007; **7**: 92.
- 31 Pelli A, Castellano LR, Cardoso MRS, *et al.* Differential reactivity of serum immunoglobulins from Brazilian wild mammals to staphylococcal A and streptococcal G proteins. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2012, **24**: 148– 152.
- 32 Bhide MR, Curlikb J, Travniceka M, Lazar P. Protein A/G dependent ELISA a promising diagnostic tool in Lyme disease seroprevalence in game animals and hunting dogs. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 2004, **27**: 191–199.
- 33 Stöbel K, Schönberg A, Staak C. A new non-species dependent ELISA for detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* s. I. in zoo animals. *International Journal of Medical Microbiology* 2002, **291**: 88-99.

34 Kelly PJ, Tagwira M, Matthewman L, Mason PR, Wright EP. Reaction of sera from laboratory, domestic and wild animals in Africa with Protein A and a recombinant chimeric Protein AG. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 1993; **16**: 299–305.

Table 1 - Mammals from the state of Rio Grande do Sul, Brazil, included in the serological study for the detection of IgG anti-gp43 of *P. brasiliensis*

ORDER	n	%	FAMILY	SPECIES	n	%
Artiodactyla	08	06	Cervidae	<i>Mazama guazoubira</i>	08	6.2
			Felidae	<i>Leopardus geoffroy</i>	09	7.0
				<i>Leopardus wiedii</i>	03	2.3
			Mustelidae	<i>Galictis cuja</i>	02	1.6
Carnivora	29	23	Canidae	<i>Lycalopex gymnocercus</i>	09	7.0
				<i>Cerdocyon thous</i>	03	2.3
			Procyonidae	<i>Procyon cancrivorus</i>	02	1.6
				<i>Nasua nasua</i>	01	0.8
Marsupialia	51	40	Didelphidae	<i>Didelphis albiventris</i>	51	39.8
Primates	30	23	Cebidae	<i>Cebus apella</i>	13	10.2
			Atelidae	<i>Alouatta guariba clamitans</i>	17	13.3
Rodentia	05	04	Hydrochaeridae	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	01	0.8
			Myocastoridae	<i>Myocastor coypus</i>	04	3.1
				<i>Euphractus sexcinctus</i>	01	0.8
Xenartra	05	04	Dasypodidae	<i>Dasypus novemcinctus</i>	02	1.6
			<i>Dasypus hybridus</i>	01	0.8	
			Myrmecophagidae	<i>Tamandua tetradactyla</i>	01	0.8
TOTAL	128	100			128	100

Table 2 – Number of seropositive wild mammals in ELISA test for the detection of IgG anti-gp43 of *P. brasiliensis* according with variables analyzed

Variables	Animals included n° (%)	Animals seropositives n° (%)	p value*
Sex			
Male	63 (49.2)	11 (42.3)	0.43
Female	65 (50.8)	15 (57.7)	
Age			
Adult	92 (71.9)	19 (73.1)	0.88
Juvenile	36 (28.1)	07 (26.9)	
Habit			
Arboreal	30 (23.4)	03 (11.5)	0.08
Terrestrial	42 (32.8)	13 (50)	
Wetlands	05 (3.9)	02 (7.7)	
Terrestrial/arboreal	51 (39.8)	08 (30.8)	
Order			
Artrodactila	08 (6.2)	03 (11.5)	0.19
Rodentia	05 (3.9)	02 (7.7)	
Xenarta	05 (3.9)	02 (7.7)	
Carnívora	29 (22.7)	08 (30.8)	
Marsupialia	51 (39.8)	08 (30.8)	
Primata	30 (23.4)	03 (11.5)	
Area			
Urban	62 (48.4)	12 (42.3)	0.79
Rural	66 (51.6)	14 (57.8)	

*Chi-square test resulted in p values > 0.05 for all variables analyzed and described.

Table 3 – Number of seropositive wild mammals in ELISA test for the detection of IgG anti-gp43 of *P. brasiliensis*, according with conjugate used

Species (total included in the study)	Only with prot. G - peroxidase	Only with prot. A - peroxidase	Prot. G - peroxidase and prot. A - peroxidase	Total seropositive (%)
Capuchin monkey (n=13) (<i>Cebus apella</i>)	00	01	02	03 (11.5)
Capybara (n=1) (<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>)	00	01	00	01 (3.8)
Lesser grison (n=2) (<i>Galictis cuja</i>)	01	00	00	01 (3.8)
White-eared opossum (n=51) (<i>Didelphis albiventris</i>)	01	05	02	08 (30,8)
Geoffroy's cat (n=9) (<i>Leopardus geoffroy</i>)	00	01	01	02 (7.7)
Margay (n=3) (<i>Leopardus wiedii</i>)	00	01	00	01 (3.8)
Pampas fox (n=9) (<i>Lycalopex gymnocercus</i>)	00	01	00	01 (3.8)
Crab-eating fox (n=3) (<i>Cerdocyon thous</i>)	00	01	00	01 (3.8)
Crab-eating raccoon (n=2) (<i>Procyon cancrivorus</i>)	00	02	00	02 (7.7)
Nutria (n=4)	00	01	00	01 (3.8)

<i>(Myocastor coypus)</i>				
Southern long-nosed armadillo				
(n=1)	00	01	00	01 (3.8)
<i>(Dasypus hybridus)</i>				
Six-banded armadillo (n=1)				
	00	00	01	01 (3.8)
<i>(Euphractus sexcinctus)</i>				
Brown brocket (n=8)				
	01	02	00	03 (11.5)
<i>(Mazama guazoubira)</i>				
TOTAL	03	17	06	26

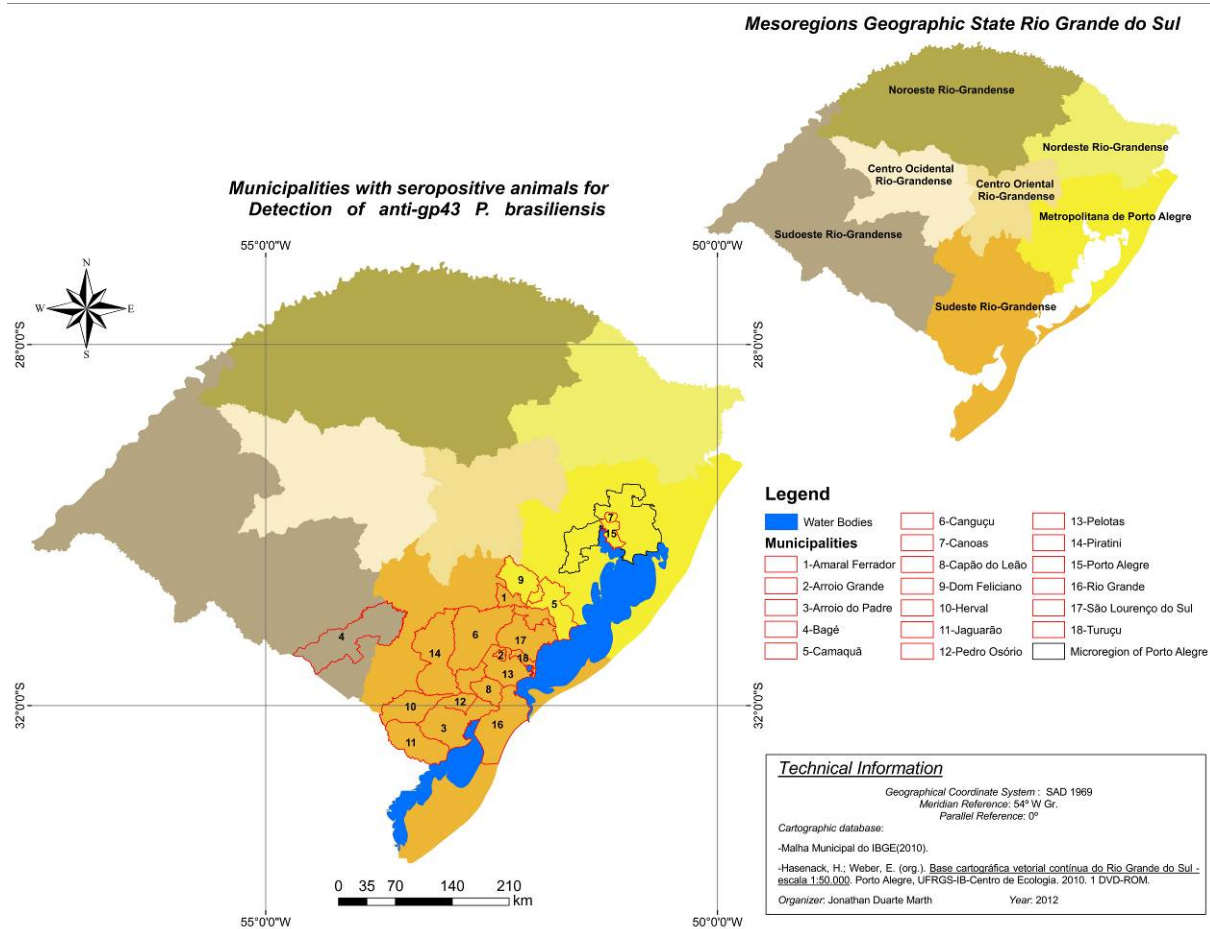


Figure 1. Number of wild animals tested to IgG anti-gp43 of *P. brasiliensis* according to mesoregion.

3.2 Artigo 2

SOROEPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO POR *Paracoccidioides brasiliensis* EM EQUINOS DA MESORREGIÃO SUDOESTE DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

**Ana Paula Neuschrack Albano, Gabriel Baracy Klafke, Tchana Martinez
Brandolt, Carlos Eduardo Wayne Nogueira, Zoilo Pires de Camargo, Melissa
Orzechowski Xavier, Mário Carlos Araújo Meireles**

Artigo sob as normas da revista “Pesquisa Veterinária Brasileira”

Seroepidemiologia da infecção por *Paracoccidioides brasiliensis* em equinos da mesorregião sudoeste do Rio Grande do Sul, Brasil¹

Ana Paula Neuschrack Albano², Gabriel Baracy Klafke³, Tchana Martinez Brandolt³, Vanusa Pousada da Hora³, Carlos Eduardo Wayne Nogueira², Zoilo Pires de Camargo⁴, Melissa Orzechowski Xavier³, Mário Carlos Araújo Meireles²

ABSTRACT.- Albano A.P.N., Klafke G.B., Brandolt T.M., da Hora V.P., Nogueira C.E.W., Camargo Z.P., Xavier M.O. & Meireles M.C.A. 2012. [Seroepidemiology of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in horses from southwest mesoregion of Rio Grande do Sul, Brazil.] Seroepidemiologia da infecção por *Paracoccidioides brasiliensis* em equinos da mesorregião sudoeste do Rio Grande do Sul, Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Laboratório de Micologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande, Rua Prof. Carlos Henrique Nogueira, 268. Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. CEP: 96020-560. E-mail: melissaxavier@ig.com.br

The fungus thermally dimorphic *Paracoccidioides brasiliensis* is the etiological agent of the main systemic mycosis in Brazil, the paracoccidioidomycosis. Although the Rio Grande do Sul is considered endemic area of the disease, there are few studies on the ecology of *P. brasiliensis* in the state. In this sense, the study aimed to highlight the presence of *P. brasiliensis* in horses from the mesoregion of Southwest Riograndense using them as sentries. Serological techniques as double immunodiffusion in agar gel (AGID) and indirect ELISA using with protein G-peroxidase as conjugate were performed to detect anti-gp43 *P. brasiliensis* in horses from five different farms in the region of Bagé. Serology was performed in 200 horses breed Pure Blood English, with up to two years old, born and raised exclusively in farms, of which 12% had anti-gp43 antibodies in ELISA, with rates ranging from 0 to 30% according to place of origin ($p < 0.001$), however there was no significant difference in seropositivity considering the sex of the animals ($p = 0.589$). In immunodiffusion all equine serum samples were negative. The results indicate the presence of the fungus *P. brasiliensis* in the middle region of the southwestern state of Rio Grande do Sul, Brazil.

INDEX TERMS: seroepidemiology, ELISA, *Paracoccidioides brasiliensis*, gp-43, protein G-peroxidase, horses.

RESUMO.- O fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da principal micose sistêmica do Brasil, a paracoccidioidomicose. Embora o Rio Grande do Sul seja considerado como área endêmica da doença, existem poucos estudos a respeito da ecologia do *Paracoccidioides brasiliensis* no Estado. Neste sentido, o estudo objetivou evidenciar a presença do *P. brasiliensis* em equinos da mesorregião Sudoeste Rio-Grandense utilizando-os como sentinelas. Para tal foi realizada sorologia a partir das técnicas de imunodifusão radial dupla em gel de Ágar (IDGA) e ELISA indireto utilizando a proteína G-peroxidase como conjugado para detecção de anticorpos anti-gp43 do *P. brasiliensis* em equinos de cinco distintos haras da região de Bagé. A sorologia foi realizada em 200 equinos da raça Pura Sangue Inglês, com até dois anos de idade, nascidos e criados exclusivamente nos haras, dos quais 12% apresentavam anticorpos anti-gp43 no teste de ELISA, com taxas variando de 0 a 30% de acordo com o local de origem ($p < 0,001$), no entanto não foi encontrada diferença significativa de soropositividade considerando o sexo dos animais ($p = 0.589$). Na técnica de imunodifusão todas as amostras séricas dos equinos foram negativas. Os resultados indicam a presença do fungo *P. brasiliensis* na mesorregião sudoeste do estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

² Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Caixa postal 354, Campus Universitário, Pelotas, RS 96010-900, Brasil.

³ Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Rua Botucatu 862, Vila Clementino, São Paulo, SP 04023-062, Brasil.

⁴ Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), General Osório s/n, Campus Saúde FURG, Centro, Rio Grande, RS 96201-900, Brasil. *Autor para correspondência: melissaxavier@ig.com.br

Parte integrante da tese de doutorado do primeiro autor

TERMOS DE INDEXAÇÃO: seroepidemiologia, ELISA, *Paracoccidioides brasiliensis*, gp-43, proteína G-peroxidase, equinos.

INTRODUÇÃO

O fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da principal micose sistêmica do Brasil, a paracoccidioidomicose. Este microrganismo apresenta distribuição geográfica limitada, sendo encontrado do norte da Argentina até o sul do México, com exceção da Guiana, Guiana Francesa, Suriname, Chile e Nicarágua (Brummer et al. 1993, Bárholo et al. 2000, Marques 2003).

A infecção dos indivíduos suscetíveis ocorre por inalação dos propágulos fúngicos da fase filamentosa, os quais são encontrados no ambiente. Embora existam outras hipóteses (Conti-Díaz 2007), o solo úmido é considerado como principal habitat do *P. brasiliensis*. No entanto, estudos acerca do nicho ecológico do *P. brasiliensis* ainda são inconclusivos, sendo a rastreabilidade do fungo no ambiente bastante difícil em função do período prolongado da doença que dificulta associar a fonte de infecção, ausência de surtos e a pouca repetibilidade nas tentativas de isolamento do fungo do ambiente (Bagagli et al. 2008).

Neste sentido, estudos utilizando animais como sentinelas têm sido importantes para comprovar a presença do fungo em determinadas regiões. Considerando que a paracoccidioidomicose é endêmica no Rio Grande do Sul, este estudo buscou evidenciar a presença do *P. brasiliensis* na mesorregião Sudoeste Rio-Grandense do estado a partir da soropidemiologia de equinos de distintos haras. Esta região se caracteriza pelo bioma pampa, o qual é totalmente distinto do restante do país, sendo encontrado somente na metade sul do estado do Rio Grande do Sul do Brasil, Uruguai e na Argentina.

MATERIAL E MÉTODOS

O local do estudo foi o município de Bagé, o qual se situa na região do pampa gaúcho ou microrregião da Campanha Meridional, pertencente à mesorregião do Sudoeste Rio-Grandense, Rio Grande do Sul, Brasil (Fig.1). Apresenta uma altitude média de 212 m e um clima que tanto pode ser enquadrado no tipo subtropical ou temperado, com verões tépidos (com altas temperaturas durante o dia e temperaturas amenas à noite), invernos relativamente frios e com geadas. A temperatura média anual é de 18 °C, e as temperaturas médias mensais variam de 12 °C no inverno a 24 °C no verão. As precipitações costumam ser regularmente distribuídas durante o ano, e o volume médio anual é de 1.472 mm, com médias mensais variando de 104 mm a 142 mm (FEE, 2012).

Foram incluídos no estudo 200 equinos da raça Puro Sangue Inglês, com até dois anos de idade, nascidos e criados exclusivamente em haras (n = 05) do município de Bagé. Os animais foram randomizados, sendo excluídos aqueles que tiveram acesso a outros locais (transporte, participação em provas, leilões, etc.).

De cada animal incluído foi preenchida uma ficha padrão contendo informações sobre gênero do indivíduo, dados do haras de origem, incluindo localização geográfica. Todos os animais foram submetidos à colheita única de amostra sérica para análise sorológica, através de punção da veia jugular, e após separação do soro, o mesmo foi mantido armazenado a - 20 °C para posterior sorologia. Para detecção de IgG específica contra *P. brasiliensis* a partir das técnicas de imunodifusão radial dupla em gel de ágar (IDGA) e o teste de ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando o antígeno fúngico gp43.

O exoantígeno foi obtido como descrito por Camargo et al. (1988), utilizando o isolado B-339 do *P. brasiliensis*. O antígeno gp43 foi purificado a partir do *P. brasiliensis* exoantígeno por cromatografia de afinidade de acordo com Puccia e Travassos (1991) e a concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford utilizando BSA como padrão.

Para a técnica de ELISA, microplacas de poliestireno de 96 cavidades (Corning Costar Corporation, Corning, NY, USA) foram sensibilizadas com 100 µL de gp43 em tampão carbonato/bicarbonato (pH 9.6) e incubadas a 4 °C durante 18 horas. As placas foram posteriormente lavadas com tampão fosfato salina com 0.5% de Tween 20 (PBS-T) e bloqueadas com PBS-leite 1% (leite desnatado em pó diluído em PBS) por 60 minutos a 37 °C. A seguir a placa foi lavada cinco vezes com PBS-T e incubada durante uma hora a 37 °C com os soros a serem testados diluídos em 1:100 em PBS. Após lavagem por cinco vezes com PBS-T foram adicionados em cada poço 100 µL de conjugado (proteína G-peroxidase, SIGMA®), seguido de incubação por uma hora a 37 °C. Na sequência, a última lavagem da placa foi realizada por dez vezes com PBS-T, e em seguida foram adicionados 100 µL substrato/cromógeno (OPD diluído em tampão citrato). Após incubação por dez minutos a 37 °C, a reação foi bloqueada pela adição de 100 µL de ácido sulfúrico 1N, e a absorvância determinada em leitora de microplaca utilizando filtro de 450 nm. Todas as amostras foram testadas em triplicata. Como soro controle positivo foi utilizado um soro comercialmente disponível (*Paracoccidioides* ID positive control IMMY®), e o soro controle

negativo correspondeu a um “pool” de soros negativos de cavalos, previamente testados, que apresentavam absorvências em torno de 0.07 a 0.10 (CORTE, 2009), todos igualmente diluídos em 1:100 em PBS. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram absorvência duas vezes maior do que a do controle negativo.

Os testes IDGA foram realizados conforme descrito previamente por Camargo et al. (1988) com a utilização do exoantígeno de *P.brasiliensis* como reagente.

O trabalho foi desenvolvido de acordo com as normas de bem-estar animal, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (CEEAA nº 7123).

Os resultados foram analisados pelo teste do qui-quadrado para variáveis categóricas, com SPSS® 20.0, e os valores de *p* menores que 0.05 foram considerados como estatisticamente significativos.

RESULTADOS

Dos 200 equinos estudados, 102 fêmeas e 98 machos, o teste de ELISA demonstrou soropositividade em 24 indivíduos, representando 12% da população estudada. Destes, onze animais eram fêmeas e treze machos, não apresentando diferença significativa (*p* = 0.589).

Considerando a soropositividade dos animais em relação ao haras de origem foi encontrada diferença significativa (*p* < 0.001), sendo que duas propriedades apresentaram 30% de positividade e em um haras não foi encontrado nenhum animal positivo (Tabela 1).

DISCUSSÃO

Este estudo avaliou a soropositividade de equinos demonstrando, com pioneirismo a presença do fungo *Paracoccidioides brasiliensis* na mesorregião do Sudoeste Rio-grandense do estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

Em concordância com diversos outros estudos (Canteros et al. 2010, Corte et al. 2009; Ono et al. 2001), nenhum animal testado foi soropositivo pela técnica de imunodifusão radial dupla, no entanto, a partir da técnica de ELISA foi possível detectar 12% de soropositividade nos equinos estudados. Corte et al. (2007) também detectaram baixa ou nula soropositividade em bugios-pretos (*A. caraya*) e em macacos-prego (*Cebus* sp.) pela IDGA, embora pela técnica de ELISA IgG anti-gp43 tenha sido detectada em 60% e 44.1% dos animais, respectivamente.

Essa discrepância de resultados encontrada entre as técnicas utilizadas está associada à sensibilidade das mesmas (Ono et al. 2001). A técnica de IDGA embora mais acessível, por ter menor custo e ser menos trabalhosa, é pouco sensível. A IDGA se baseia em uma reação de precipitação que se torna visível a olho nu demonstrando resultado positivo somente em amostras séricas com grande quantidade de anticorpos circulantes, o que geralmente é encontrado somente em indivíduos com doença ativa (Moreira 2008). Por este motivo, é uma técnica indicada para diagnóstico de paracoccidioidomicose, sendo inclusive considerada padrão-ouro para esta doença (Ramos e Silva & Saraiva 2008, Palmeiro et al. 2005), no entanto não é capaz de detectar somente a exposição do indivíduo ao fungo. Por outro lado, para detectar esta infecção assintomática a técnica de ELISA é eficaz, permitindo evidenciar mesmo pequenas concentrações de anticorpos circulantes, sendo ideal para estudos relacionados a inquéritos soroepidemiológicos como o presente trabalho.

A taxa de soropositividade de cerca de 12% encontrada nos animais utilizados como sentinelas da presença do *P. brasiliensis* neste estudo é similar ao descrito em outros estados do Brasil, como Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, e Paraná, onde autores descrevem taxas de soropositividade de 17.5 % em estudo com bovinos leiteiros (Silveira et al. 2008), de 30 % em estudo com equinos (Corte et al. 2009) e de 37 % em estudo com ovinos (Oliveira et al. 2012). Por outro lado, no estado de São Paulo, zona considerada hiperendêmica da PCM, autores descrevem taxas ainda maiores, de 63.8 % e 40.8 % de reatividade de animais ao antígeno do *P. brasiliensis* utilizando teste intradérmico (Costa et al. 1995), assim como estudo com 126 cães urbanos da Amazônia que descreve 54.8 % de soropositividade (Corte et al. 2012). No Rio Grande do Sul não são descritos outros estudos similares que permitam a comparação dos resultados obtidos nas distintas mesorregiões do estado, porém, estudo sorológico realizado no Uruguai, país com características climáticas semelhantes às encontradas no estado do RS demonstrou taxa de soropositividade de 23 % nos equinos testados (Conti-Diaz et al. 1972), valor próximo aos descritos em nossos resultados.

Assim como descrito em outros estudos sorológicos com cães domésticos e primatas (Corte et al. 2009; Corte et al. 2007; Silveira et al. 2006; Ono et al. 2001), a soropositividade não diferiu em relação ao sexo dos animais estudados, sugerindo que ambos são igualmente expostos à infecção pelos propágulos

infectantes do *P. brasiliensis* no ambiente, provavelmente devido ao fato dos animais já permanecer em contato direto com o solo, provável habitat natural do fungo, desde seu nascimento.

A diferença significativa encontrada na soropositividade de equinos em relação ao haras de procedência pode indicar que fatores ambientais específicos de cada propriedade estão interferindo na sobrevivência do fungo. Considerando que nenhuma das propriedades utiliza agrotóxicos e/ou pesticidas e que todas tem praticamente o mesmo tipo de vegetação (pastagem, campo nativo melhorado), as características do solo, como pH, umidade e concentração de matéria orgânica e de íons de alumínio (Terçarioli et al. 2007), bem como de proximidade de cursos de água (Conti-Diaz 2007, Restrepo et al. 2001) devem ser avaliadas na tentativa de justificar a presença/ausência do *P. brasiliensis*. Isto porque segundo Terçarioli et al. (2007) o *P. brasiliensis* cresce em solo argiloso ou arenoso e com alta umidade, sendo inibido em solos com elevada concentração de alumínio trocável (H + Al). Em adição, Conti-Díaz (2007) defende a hipótese de que haja outro nicho ecológico para o *P. brasiliensis*, que lhe confere uma estratégia ecológica altamente eficiente ao utilizar animais heterotérmicos que vivem em fontes naturais de água doce durante um período provisório, sendo, portanto, o solo somente seu habitat transitório, assim sendo, mais estudos tornam-se necessários para elucidar a ecoepidemiologia do *P. brasiliensis* no sul do Brasil.

CONCLUSÃO

Anticorpos IgG específicos contra *Paracoccidioides brasiliensis* foram detectados no estudo sorológico dos equinos procedentes da região de Bagé, com diferença significativa de soropositividade de acordo com o haras de procedência.

Agradecimentos.- Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) concessão n ° 478346/2010 - 7 (Edital Universal 14/2010).

REFERÊNCIAS

- Bagagli, E. & Bosco, S.M.G 2008. Armadillos and dimorphic pathogenic fungi: Ecological and evolutionary aspects, p.103-110. In: The biology of the Xenarthra, University Press of Florida, Gainesville.
- Brummer, E., Castaneda, E. & Restrepo, A. 1993. Paracoccidioidomycosis: an update. Clin. Microbiol. Rev. 6:89-117.
- Bártholo, R.M., Florião, R.A., Oliveira, L.P.A. & Moraes, M.G.P. 2000. Um caso fácil: um diagnóstico rápido. Bol. Pneumol. Sanit. 8:2.
- Camargo, Z.P., Unterkircher, C., Campoy, S.P. & Travassos, L.R. 1988. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion test. J. Clin. Microbiol. 26: 2147-2151.
- Canteros C.E., Madariaga M.J., Lee W., Rivas, M.C., Davel, G. & Iachini R. 2010. Endemic fungal pathogens in a rural setting of Argentina: Seroepidemiological study in dogs. Revta. Iberoam. Micol. 27: 14-19.
- Conti-Diaz, I. A. 2007. On the unknown ecological niche of *Paracoccidioides brasiliensis*: our hypothesis of 1989: present status and perspectives. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 49: 131-134.
- Conti-Diaz, I. A., Alvarez, B. J., Gezuele, E., Gonzalez Marini, H., Duarte, J. & Falcon, J. 1972. Intradermal reaction survey with paracoccidioidin and histoplasmin in horses. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 14: 372-376.
- Corte, A.C., Gennari, S.M., Labruna, M.B., Camargo, L.M.A., Itano, E.N., Freire, R.L., Camargo, Z.P. & Ono, M.A. 2012. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in dogs from Western Brazilian Amazon. Pesq. Vet. Bras. 32: 649-652.
- Corte, A.C., Itano, E. N., Freire, R.L., Camargo, Z. P. & Ono, M.A. 2009. Detection of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in horses from northern region of Parana State. Semina. Ciências Agrárias. 30: 431-436.
- Corte, A.C., Svoboda, W.K., Navarro, I.T., Freire, R.L., Malanski, L.S., Shiozawa, M.M., Ludwig, G., Aguiar, L.M., Passos, F.C., Maron, A., Camargo, Z.P., Itano, E.N. & Ono, M. A. 2007. Paracoccidioidomycosis in wild monkeys from Paraná State, Brazil. Mycopathologia. 164: 225-228.
- Costa, E.O., Diniz, L.S.M. & Fava Netto, C. 1995. The prevalence of positive intradermal reactions to paraccodioidin in domestic and wild animals in São Paulo, Brazil. Veterinary Research Communications. 19: 127-130.
- FEE (Fundação de Economia e Estatística), Rio Grande do Sul, Brasil. Disponível em:<http://www.fee.rs.gov.br/feedados/consulta/unidades_geo_mesos.asp?n=Mesorregi%E3o%20Sudeste%20Rio-Grandense>. Acesso em: setembro 2012.

- Marques, A.S. 2003. Paracoccidioidomicose: atualização epidemiológica, clínica e terapêutica. An. Bras. Dermatol. 78: 2.
- Oliveira, G.G., Navarro, I.T., Freire, R.L., Belitardo, D.R., Silveira, L.H., Camargo, Z.P., Itano, E.N. & Ono, M.A. 2012. Serological survey of Paracoccidioidomycosis in sheep. Mycopathologia. 173: 63-68.
- Ono, M.A., Bracarense, A.P.F.R.L., Morais, H.S.A., Trapp, S.M., Belitardo, D.R. & Camargo, Z.P. 2001. Canine paracoccidioidomycosis: a seroepidemiologic study. Medical Mycology. 39: 277-282.
- Palmeiro, M., Cherubini, K. & Yurgel, L. S. 2005. Paracoccidioidomicose – Revisão da Literatura. Scientia Medica. 15: 4.
- Puccia, R. & Travassos, L.R. 1991. 43-kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis and Jorge Lobo's disease. J. Clin. Microbiol. 289: 298-302.
- Ramos-e-Silva, M. & Saraiva, L.E. 2008. Paracoccidioidomycosis. Dermatologic Clinics., 26: 257-269.
- Restrepo, A., Mcewen, J.G. & Castañeda, E. 2001. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? Med Mycol. 39: 233-241.
- Silveira, L.H., Paes, R.C.S., Medeiros, E.V., Itano, E.N., Camargo, Z.P. & Ono, M.A. 2008. Occurrence of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in dairy cattle from Mato Grosso do Sul, Brazil. Mycopathologia. 165: 367-371.
- 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. 2006. Serological detection of antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* in dogs with leishmaniasis. Mycopathologia. 162: 325-329.
- Terçarioli, G.R., Bagagli, E., Reis, G.M., Theodoro, R.C., Bosco, S.D.M.G., Macoris, S.A.G. & Richini-Pereira, V.B. 2007. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. BMC Microbiology. 7: 92.

Legenda da Figura

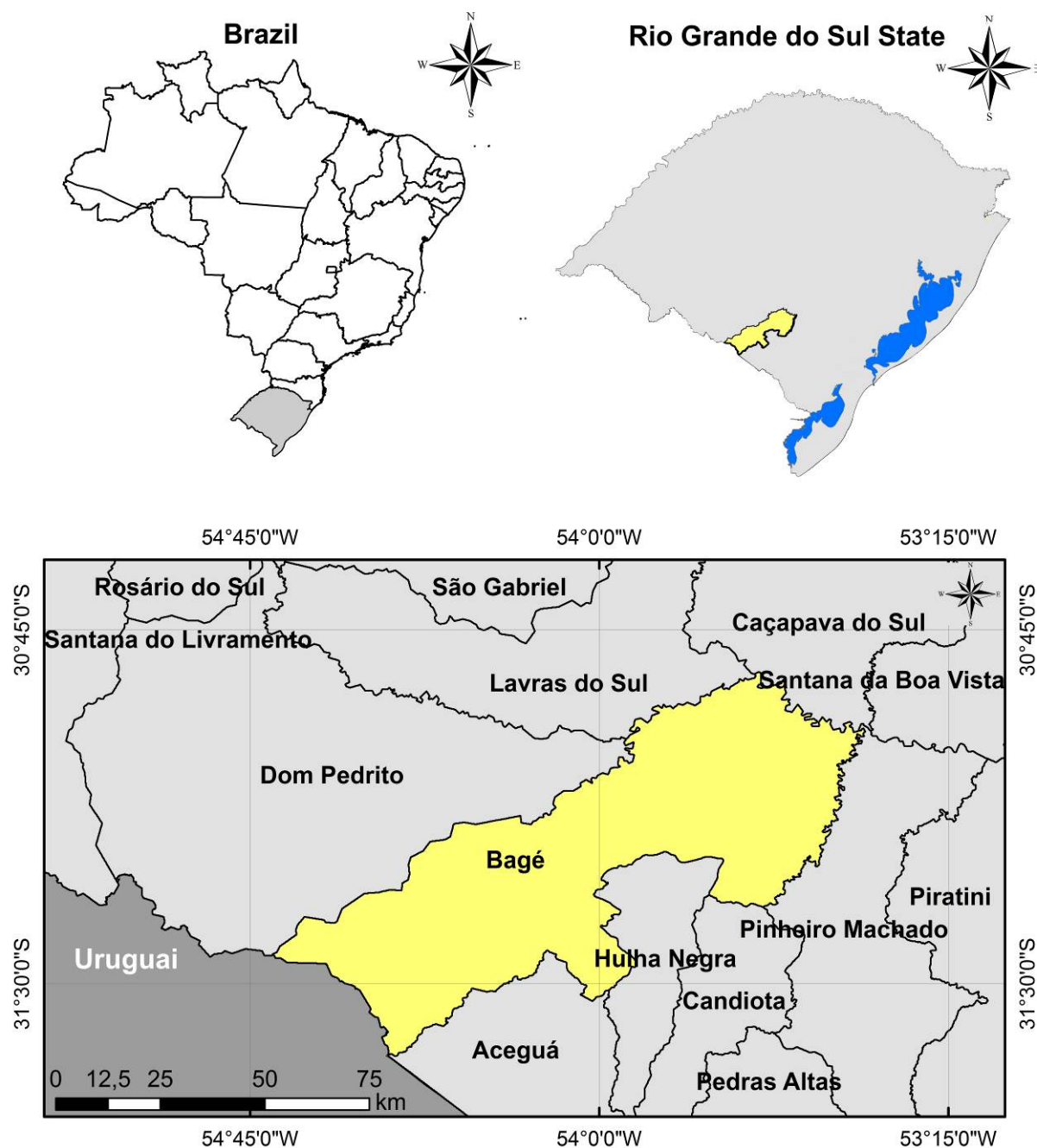
Fig.1. Mapa mostrando o município de Bagé, Rio Grande do Sul, Brasil.

Tabela

Quadro 1 - Resultado do teste de ELISA para pesquisa de anticorpos anti-gp43 do *P. brasiliensis* em equinos de acordo com seu local de origem

Haras	Total de animais estudados	Soropositivos n (%)
1	30	9 (30) ^A
2	103	3 (2.9) ^B
3	30	9 (30) ^A
4	12	0 (0) ^B
5	25	3 (12) ^{AB}
Total	200	24 (12)

Letras maiúsculas correspondem a resultado da análise estatística utilizando teste de qui-quadrado, onde letras iguais significam $p > 0.05$ e letras diferentes $p < 0.05$.



Technical Information

Legenda

-  Rio Grande do Sul State
-  municipality of Bagé
-  Water Bodies

Geographical Coordinate System : SAD 1969
 Meridian Reference: 54° W Gr.
 Parallel Reference: 0°

Cartographic database:

-Malha Municipal do IBGE(2010).

-Hasenack, H.; Weber, E. (org.). Base cartográfica vetorial contínua do Rio Grande do Sul - escala 1:50.000. Porto Alegre, UFRGS-IB-Centro de Ecologia. 2010. 1 DVD-ROM.

Organizer: Jonathan Duarte Marth

Year: 2012

4 CONCLUSÃO GERAL

- Diversas espécies de animais silvestres procedentes das mesorregiões do Sudeste Rio-grandense e Metropolitana de Porto Alegre apresentaram IgG específica contra *Paracoccidioides brasiliensis*, comprovando sua exposição ao fungo e infecção assintomática;

- Anticorpos IgG específicos contra *Paracoccidioides brasiliensis* foram detectados no estudo sorológico dos equinos procedentes da região de Bagé, com diferença significativa de soropositividade de acordo com o haras de procedência;

- A técnica de imunodifusão radial dupla em gel de Ágar (IDGA) não é eficaz para detecção de infecções assintomáticas, sendo o teste de ensaio imunoenzimático (ELISA) mais indicado para estudos soroepidemiológicos que utilizam animais como sentinelas para a presença do *P. brasiliensis* em uma determinada região;

- Taxas maiores de soropositividade para IgG anti-gp43 do *P. brasiliensis* em animais silvestres são detectadas utilizando o conjugado proteína A–peroxidase. Por outro lado, este conjugado não reconhece IgG equina, sendo necessária a proteína G-peroxidase para estudos envolvendo esta espécie animal;

- A partir da procedência dos animais soropositivos encontrados no estudo pôde-se concluir que o fungo *P. brasiliensis* está presente em duas mesorregiões do estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

5 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, O.P.; JORGE JUNIOR, J.; SCULLY, C. Paracoccidioidomycosis of the mouth: an emerging deep mycosis. Crit. Rev. Oral Biol. Med., v. 14, p. 268-74, 2003.

BAGAGLI, E.; SANO, A.; COELHO, K.I.; ALQUATI, S.; MIYAJI, M.; CAMARGO, Z.P. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. Am. J. Trop. Med. Hyg., v. 58, p. 505-512, 1998.

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

BAGAGLI, E.; BOSCO, S.M.G. Armadillos and dimorphic pathogenic fungi: Ecological and evolutionary aspects. In *The biology of the Xenarthra* University Press of Florida, Gainesville, p.103-110, 2008.

BIALEK, R.; IBRICEVIC, A.; FOTHERGILL, A.; BEGEROW, D. Small subunit ribosomal DNA sequence shows *Paracoccidioides brasiliensis* closely related to *Blastomyces dermatitidis*. J. Clin. Microbiol. v. 38, p. 3190-3193, 2000.

BISINELLI, J.; TELLES, F.Q.; SOBRINHO, J.A.; RAPOPORT, A. Manifestações estomatológicas da paracoccidioidomicose. Odonto Ciência, v. 67, p. 683-687, 2001.

BORGES-WALMSLEY, M. I.; CHEN, D.; SHU, X.; WALMSLEY, A. R. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. Trends in Microbiology, Cambridge. v. 10, n. 2, p. 80-87, 2002.

BOUSQUET, A.; DUSSART, C.; DROUILLARD, I.; CHARBEL, E.C.; BOIRON, P. Imported mycosis: a review of paracoccidioidomycosis. Med. Mal. Infect. v. 37, n. 3, p. 210-214, 2007.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. Clin. Microbiol. Rev., v. 6, p. 89-117, 1993.

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

CONTI-DIAZ, I. A. La vía inhalatoria de infección en el ratón y su relevancia en la dilucidación de la patogenia de algunas micosis profundas. Análisis de estudios pioneros realizados en Uruguay. Revista Médica del Uruguay. v. 24, p. 56-61, 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. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*. v. 14, n. 6, p. 372-376, 1972.

CORREDOR, G.G.; PERALTA, L.A.; CASTANO, J.H.; ZULUAGA, J.S.; HENAO, B.; ARANGO, M.; TABARES, A.M.R.; MATURE, D.; MCEWEN, J.G.; RESTREPO, A. The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. *Medical Mycology*. v. 43, p. 275–280, 2005.

CORREDOR, G.G.; CASTAÑO J.H.; PERALTA L.A.; DÍEZ S.; ARANGO M.; MCEWEN J.; RESTREPO, A. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. *Revta. Iberoam. Micol*. v. 16, p. 216-220, 1999.

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

CORTE, A.C.; ITANO, E. N.; FREIRE, R.L.; CAMARGO, Z. P.; ONO, M.A. Detection of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in horses from northern region of Parana State. *Semina. Ciências Agrárias*. v. 30, p. 431-436, 2009.

CORTE, A. C.; ITANO, E.N.; FREIRE, R.L.; CAMARGO, Z.P.; ONO, M.A. Detecção de anticorpos para *Paracoccidioides brasiliensis* em cavalos da região norte do Estado do Paraná. *Semina: Ciências Agrárias*. v. 30, n. 2, p. 441-446, 2009

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

COSTA, E.O.; DINIZ, L.S.M.; FAVA NETTO, C. The prevalence of positive intradermal reactions to paraccodioidin in domestic and wild animals in São Paulo, Brazil. *Veterinary Research Communications*, v. 19, n. 2, p. 127-130, 1995.

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

COUTINHO, Z.F.; SILVA, D.; LAZÉRA, M.; PETRI, V.; OLIVEIRA, R.M.O.; SABORZA, P.C.; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cadernos de Saúde Pública*, Rio de Janeiro. v. 18, n. 5, p. 1441-1454, 2002.

DUARTE, A.L.W.P.; BARUFFA, G.; TERRA, H.B.G.; RENCK, D.V.; MOURA, D.; PETRUCCI, C. Paracoccidioidomicose sistêmica com envolvimento do sistema nervoso central. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 32, n. 4, p. 439-442, 1999.

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

FARIAS, M.R.; WERNER, J.; MURO, M.D.; MARQUES, S.A.; MARQUES, M.E.A.; FRANCO, M.F.; RIBEIRO, M.G.; CUSTODIO, C.C.; CONDAS, L.A.Z.; BOSCO, S.M.G.; BAGAGLI, E. Canine Paracoccidioidomycosis: case report of generalized lymphadenitis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*. v. 47, n. 14, p. 64. 2005

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

FORTES, R.M.; KIPNIS, A.; JUNQUEIRA-KIPNIS, A.N.A. *Paracoccidioides brasiliensis* pancreatic destruction in *Calomys callosus* experimentally infected. *BMC Microbiology*. v. 9, p. 84, 2009.

FRANCO, M.; MONTENEGRO, M.R.; MENDES, R.P.; MARQUES, S.A.; DILLON, N.L.; MOTA, N.G. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification on its clinical forms. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 20, n. 2, p. 129-133, 1987.

GONZALEZ, J.F.; MONTIEL, N.A.; MAASS, R.L. First report on the diagnosis and treatment of encephalic and urinary paracoccidioidomycosis in a cat. *J. Feline Med. Surg*. v. 12, p. 659-662, 2010.

HERR, R.A.; TARCHA, E.J.; TABORDA, P.R.; TAYLOR, J.W.; AJELLO, L.; MENDOZA, L. Phylogenetic analysis of *Lacazia loboi* places this previously uncharacterized pathogen within the dimorphic Onygenales. *J. Clin. Microbiol*. v. 39, p. 309–314, 2001.

JOHNSON, W.D. & LANG, C.M. - Paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis) in squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Vet. Path*. v. 14, p.368-371, 1977.

KLOETZEL, K.; BUENO, A.C.; QUEIROZ, R. Involvement of the tracheobronchial tree in South American blastomycosis. *Diseases of the Chest*. v. 44, p. 368-372, 1963.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS – VACCARI E.M.; MELO, N.T. Tratado de micologia médica. 9 ed. São Paulo, Brasil: Sarvier 2002. 1104p.

LONDERO, L.T.; SEVERO, L.C. The gamut of progressive pulmonary paracoccidioidomycoses. *Mycopathologia*. v. 75, p. 65-74, 1981.

LONDERO, L.T.; FISCHMAN, O. Perianal and/or rectal lesions in South American blastomycosis. *Mycopathologia et mycologia applicata*. v. 32, n. 3, p. 231-236, 1967.

LONDERO, A.T.; RAMOS, C.D.; LOPES, J. O.; BENEVENGA, J.P. "Reservárea" da paracoccidioidomicose no Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*. v. 14, n. 6, p. 377-380, 1972.

MACKINNON, J.E. Blastomycosis sudamericana experimental evolutiva obtenida por vía pulmonar. *Na. Fac. Med. Montevideo*. v. 44, p. 355-358, 1959.

MARQUES, A.S. Paracoccidioidomicose: atualização epidemiológica, clínica e terapêutica. *An. Bras. Dermatol.* v. 78, n. 2, 2003.

MARQUES, A.S. Paracoccidioidomicose. *An. Bras. Dermatol.* v. 73, n. 5, p. 455-469, 1998.

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

MOREIRA, A.P.V. Paracoccidioidomicose: histórico, etiologia, epidemiologia, patogênese, formas clínicas, diagnóstico laboratorial e antígenos. *Boletim Epidemiológico Paulista*. v. 5, n. 51, 2008

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. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*. v. 28, p. 19-27, 1986.

NEVES, S.; PETRONI, T.; FEDATTO, P.; ONO, M. Paracoccidioidomicose em animais silvestres e domésticos. *Semina: Ciências Agrárias*. v. 27, n. 3, p. 481-488, 2006.

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

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

ONO, M.A.; KISHIMA, M.O.; ITANO, E.N.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; CAMARGO, Z.P. Experimental paracoccidioidomycosis in dogs. *Medical Mycology*. v. 41, p. 265-268, 2003.

ONO, M.A.; ITANO, E.N.; MIZUNO, L.T.; MIZUNO, E.H.F.; CAMARGO, Z.P. Inhibition of *Paracoccidioides brasiliensis* by pesticides: Is this a partial explanation for the difficulty in isolating this fungus from the soil? *Medical Mycology*. v. 40, n. 5, p. 493- 50, 2002.

ONO, M.A.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; MORAIS, H.S.A.; TRAPP, S.M.; BELITARDO, D.R.; CAMARGO, Z.P. Canine paracoccidioidomycosis: a seroepidemiologic study. *Medical Mycology*. v. 39, n. 3, p. 277-282, 2001.

PANIAGO, A.M.; AGUIAR, J.I.; AGUIAR, E.S.; da CUNHA, R.V.; PEREIRA, G.R.; LONDERO, A.T.; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis: a clinical and epidemiological study of 422 cases observed in Mato Grosso do Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 36, n.4, p.455-459, 2003.

PEDROSO, V.S.P.; LYON, A.C.; ARAÚJO, S.A.; VELOSO, J.M.R.; PEDROSO, E.R.P.; TEIXEIRA, A.L. Paracoccidioidomycosis case series with and without central nervous system involvement. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 45, n.5, p. 586-590, 2012.

PEDROSO, V.S.P.; VILELA, M.C.; PEDROSO, E.R.P.; TEIXEIRA, A.L. Paracoccidioidomycose com comprometimento do sistema nervoso central: revisão sistemática da literatura. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v. 42, n. 6, p. 691-697, 2009.

PETERSON, S.W.; SIGLER, L. Molecular genetic variation in *Emmonsia crescens* and *Emmonsia parva*, etiologic agents of adiaspiromycosis, and their phylogenetic relationship to *Blastomyces dermatitidis* (*Ajellomyces dermatitidis*) and other systemic fungal pathogens. *J. Clin. Microbiol.* v. 36, p. 2918–2925, 1998.

PRADO, M.F.; SILVA, M.B.; LAURENTI, R.; TRAVASSOS, L.R.; TABORDA, C.P. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 104, p. 513-521, 2009.

RAMOS-e-SILVA, M.; SARAIVA, L. do E. Paracoccidioidomycosis. *Dermatologic Clinics*. v. 26, p. 257-269, 2008.

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

RESTREPO, A.; BAUMGARDNER, D.J.; BAGAGLI, E.; COOPER Jr, C.R.; MCGINNIS, M.R.; LAZERA, M.S.; BARBOSA, F.H.; BOSCO, S.M.; CAMARGO, Z.P.; COELHO, K.I.; FORTES, S.T.; FRANCO, M.; MONTENEGRO, M.R.; SANO, A.; WANKE, B. Clues to the presence of pathogenic fungi in certain environments. *Medical Mycology*. v. 38, n. 1, p. 67-77, 2000.

RESTREPO, A. Morphological aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* in lymph nodes: implications for the prolonged latency of paracoccidioidomycosis? *Medical Mycology*. v. 38, p. 317-322, 2000.

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

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

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

SAN-BLAS, G.; NINO-VEGA, G.; ITURRIAGA T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: Molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. Medical Mycology. v. 40, n. 3, p. 225-42, 2002.

SEVERO, L. C.; GEYER, G. R. ; LONDERO, L. T.; RIZZON, C. F. C. Primary lymph node complex in paracoccidioidomycosis. Mycopathologia. v. 67, p. 115-118, 1979.

SEVERO, L. C. ; LONDERO, L. T. ; GEYER, G. R. ; PORTO, N. S. Acute pulmonary paracoccidioidomycosis in an immunosupressed in patient. Mycopathologia. v. 68, p. 171-178, 1979.

SILVA, P. Z.; OLIVEIRA, F. M.; SEVERO, L. C. Paracoccidioidomycose e Gastrectomia. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v. 36, p. 747-749, 2003.

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

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

SILVA-VERGARA, M.L.; MARTINEZ, R.; CHADU, A.; MADEIRA, M.; FREITAS-SILVA, G.; MAFFEI, C.M.L. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá, State of Minas Gerais. Brazil. Medical Mycology. v. 36, p. 37-41, 1998.

SILVA-VERGARA, M.L.; MARTINEZ, R. Role of the armadillo *Dasypus novemcinctus* in the epidemiology of paracoccidioidomycosis. Mycopathologia. v. 144, p. 131-133, 1999.

SILVA-VERGARA, M.L.; MARTINEZ, R.; CAMARGO, Z.P.; MALTA, M.H.; 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. Medical Mycology. v. 38, p. 193–199, 2000.

SILVA-VERGARA, M. L.; MARTINEZ, R.; MALTA, M.E.B.; RAMIREZ, L.E.; FRANCO, F.A. The marsupial *Didelphis albiventris* is an improbable host of

Paracoccidioides brasiliensis in na endemic area of paracoccidioidomycosis in Minas Gerais, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. v. 96, p. 771-772, 2001.

SOUZA, S.P. PARACOCCIDIOIDOMICOSE NO EXTREMO SUL DO RIO GRANDE DO SUL. 2011. XXf. Monografia de Conclusão de Curso (Curso de Especialização Agentes Infecto-Parasitários de Interesse Humano) - Universidade Federal do Rio Grande, 2011.

TAYLOR, J.W. Molecular phylogenetic classification of fungi. Arch. Med. Res. v. 26, p. 307–314, 1995.

TERÇARIOLI, G.R.; BAGAGLI, E.; REIS, G.M.; THEODORO, R.C.; BOSCO, S.D.M.G.; MACORIS, S.A.G.; RICHINI-PEREIRA, V.B. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* In soil: growth ability, conidia production and molecular detection. BMC Microbiology. v. 7, p.92, 2007.

TREJO-CHÁVEZ, A.; RAMÍREZ-ROMERO, R.; ANCER-RODRÍGUEZ, J.; NEVÁREZ-GARZA, A.M.; RÓDRÍGUEZ-TOVAR, L.E. Disseminated *Paracoccidioidomycosis* in a Southern two-toed sloth (*Choloepus didactylus*). J. Comp. Pathol. v. 144, p. 231-234, 2011.

WANKE, B.; LONDERO, A.T. Epidemiology and paracoccidioidomycosis. In: FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G. (Ed.) *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton: CRC Press. p.109-120. 1994.

VERLI, F.D.; MARINHO, A.S.; SOUZA, S.C.; FIGUEIREDO, M.A.S.; YURGEL, L.S. Perfil clínico epidemiológico dos pacientes portadores de *Paracoccidioidomycose* no Serviço de estomatologia do Hospital São Lucas da Pontifica Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v. 38, p. 234-237, 2005.

ANEXOS

AUTORIZAÇÃO ICMBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 24501-1	Data da Emissão: 07/02/2011 15:28
Dados do titular	
Nome: Ana Paula Neuschrank Albano	CPF: 691.305.660-53
Título do Projeto: Paracoccidioides brasiliensis: avaliação micológica e sorológica em animais silvestres na região sul do Brasil	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS	CNPJ: 92.242.080/0001-00

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Revisão bibliográfica	07/2010	12/2010
2	Coleta das amostras	07/2010	07/2013
3	Análise e manutenção das amostras	07/2010	07/2013
4	Exame micológico e histopatológico	07/2010	07/2013
5	Preparação de material	07/2010	07/2013
6	Imunodifusão radial dupla	11/2010	07/2013
7	Elisa	01/2012	07/2013
8	Análise dos resultados	01/2013	11/2013
9	Preparação de artigos científicos, relatórios e tese	03/2013	11/2013

De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas à autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, possessor ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexploradas ou ameaçadas de sobreexploração.

Outras ressalvas

1	O planejamento e execução das atividades de contenção (física e química) e de coleta de material biológico em cativeiro são de responsabilidade da equipe técnica do mantenedor e devem ser acordadas previamente com os executores do projeto.
2	Encaminhar à ESEC do Taim a lista das espécies encontradas e a cópia de toda a publicação gerada pela pesquisa, dissertação, artigos, resumos, separatas.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	GREICI MAIA BEHUNG	coletora de material biológico	008.844.610-76	9062275541 SSP-RS	Brasileira
2	Luiz Fernando Minello	coletor de material biológico	429.618.320-34	2026812475 SSP/CP-RS	
3	Alice Teixeira Meireles Leite	Coletora de material biológico	632.606.200-44	1004996102 SSP-RS	Brasileira
4	Gielde Maricano	coletora de material biológico	416.423.920-49	1005306939 SSP-RS-RS	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 62763346



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 24501-1	Data da Emissão: 07/02/2011 15:28
Dados do titular	
Nome: Ana Paula Neuschrank Albano	CPF: 691.305.660-53
Título do Projeto: Paracoccidioides brasiliensis: avaliação micológica e sorológica em animais silvestres na região sul do Brasil	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS	CNPJ: 92.242.080/0001-00

5	Ana Luisa Schifino Valente	coletora de material biológico	612.648.110-68	1041344869 SSP-RS	Brasil
6	Sérgio Jorge	coletor de material biológico	140.431.628-04	24590503-0 SSP-RS	Brasil
7	Marco Antonio Afonso Coimbra	coletor de material biológico	961.017.760-34	7070902701 SSP-RS	Brasil
8	Melissa Orzechowski Xavier	coletora de material biológico	984.912.530-68	6068748678 SUS-RS	Brasil
9	Rodolfo Pinho da Silva Filho	coletor de material biológico	401.790.010-00	606891052 SSP-RS-RS	Brasil
10	ROSANE NAUDERER	coletora de material biológico	677.114.990-00	7027756084 SUS-RS	

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		RS	ESTACÃO ECOLÓGICA DO TAIM	UC Federal
2	PELOTAS	RS	BR 392 km 0 até km 200	Fora de UC
3		RS	BR 471	Fora de UC
4	PELOTAS	RS	BR 116 km 400 até km 659	Fora de UC
5	PELOTAS	RS	BR 293 km 11 até km 172	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Felidae, Canidae, Xenarthra, Rodentia, Primates, Perissodactyla, Mustelidae, Didelphimorphia, Chiroptera, Artiodactyla, Mephitidae, Procyonidae, Lagomorpha
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Mustelidae, Felidae, Canidae, Xenarthra, Rodentia, Primates, Perissodactyla, Lagomorpha, Didelphimorphia, Chiroptera, Artiodactyla, Procyonidae, Mephitidae

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Carnívoros)	Sangue, Ectoparasita, Pêlo, Fragmento de tecido/órgão, Fezes, Urina, Animal morto ou partes (carcassa/osso/pele)
2	Amostras biológicas (Outros mamíferos)	Urina, Pêlo, Fragmento de tecido/órgão, Fezes, Animal morto ou partes (carcassa/osso/pele, Sangue, Ectoparasita)
3	Amostras biológicas (Primates)	Fragmento de tecido/órgão, Pêlo, Sangue, Urina, Ectoparasita, Fezes, Animal morto ou partes (carcassa/osso/pele)

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS	Tese de doutorado

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 62763346



Página 2/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 24501-1	Data da Emissão: 07/02/2011 15:28
Dados do titular	
Nome: Ana Paula Neuschrank Albano	CPF: 691.305.660-53
Título do Projeto: Paracoccidioides brasiliensis: avaliação micológica e sorológica em animais silvestres na região sul do Brasil	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS	CNPJ: 92.242.080/0001-00

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Taxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 62763346



Página 3/3

NORMAS DAS REVISTAS

**MEDICAL
MYCOLOGY**

MEDICAL MYCOLOGY

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Aims & Scope

As an official publication of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM), *Medical Mycology*, is an international journal, which focuses on original and innovative studies of all aspects of medical, veterinary and environmental mycology. The topics include, but are not limited to, mycological, biochemical and molecular investigations of etiological agents of mycoses; aspects of pathogenesis, immunology, and epidemiology of mycoses; laboratory approaches to the identification of fungal pathogens; antifungal susceptibility, therapy and prophylaxis; mode of antifungal action; pharmacokinetics and assessments of new antifungal agents; and investigations of the mycological aspects of the indoor environment, with a focus on human and animal health. The aim of the journal is to present the preeminent scientific reports on these aspects of mycology to provide a comprehensive reference base for medical mycologists, microbiologists, clinicians, and environmental specialists.

Types of Papers Considered for Publication

1. Types of Papers

1.1 Original Papers. Manuscripts must have: (a) a Cover-Page that includes the full title and a short title, name(s) and affiliation(s) of all author(s), the name, telephone/ fax numbers and email address of the designated corresponding author, and a list of up to five keywords; (b) a separate page for a Summary or Abstract of up to 250 words prepared without sub headers; (c) text consisting of Introduction, Materials and methods, Results, Discussion and References; (d) References must be numbered sequentially in the order in which they first appear in the text, the numbers cited in the text within non-superscript, square brackets, e.g., [1] and included in the same numerical order in the Reference section; (e) each Table should be submitted as a separate page and should have footnoted descriptions of all abbreviations contained in the Table (see section below on Tables for more detailed information); (f) each Figure should be submitted as a separate file (page), with appropriate figure legends allowing a reader to understand their contents without reference to the text (see section below on Figures for more detailed information). Manuscripts MUST be in English, double-spaced, in no less than size 12 point, without line numbering and up to approximately 30 manuscript pages (10-12 print pages) including cover-page, abstract, text, references, and tables/figures.

1.2 Reviews. Authors must first electronically submit an outline of their proposed article for evaluation by the journal. The outline should be no more than two, double-spaced pages in 12 point, in which the authors describe the objectives and contents of the report. The outline must be submitted to the Reviews Editor, Wiley Schell: wiley.schell@duke.edu. Once the proposal has been evaluated, the authors will be informed of the results of the Review Editor's initial consideration of their proposal. Reviews are NOT restricted by the formatting or length requirements of Original Papers.

1.3 Case Reports. Such articles should be submitted to *Medical Mycology* Case Reports via www.ees.elsevier.com/mmcr from which all information pertaining to this on-line, open access ISHAM journal may be obtained.

MEDICAL MYCOLOGY

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

1.4 Short Communications. These manuscripts are to provide an opportunity for the presentation of preliminary or brief observations that do not warrant an original paper. The manuscript should be prepared as an original paper, except they may be no more than 12–15 manuscript pages (approximately 5–7 print pages) including cover-page, abstract, text, references, and tables/figures.

1.5 Letters to the Editor. Letters are to allow readers the opportunity to discuss issues related to previously published original articles, short communications, and reviews in *Medical Mycology*. Letters are NOT to be used for the presentation of the authors' preliminary data from their own investigations. Letters should be no more than 5 double-spaced manuscript pages including references (approximately 2 print pages), in no less than size 12 point.

2. Submission of Manuscripts

All submissions **MUST** be uploaded as Word files to the *Medical Mycology* ScholarOne site at mc.manuscriptcentral.com/tmmy. Users who have not previously submitted work through this site must create an account from the link on the login page. Assistance with this and all other areas of the site is available in the User Guide, which is accessed via the 'Get Help Now' button at the top right corner of all ScholarOne Manuscript web pages.

Manuscript Structure

1. Preparation of Manuscripts

Manuscripts **MUST** be in English, double-spaced, in no less than size 12 point, organized as appropriate for the manuscript type and have one inch margins all around. Statistics and measurements should be given in numerals when followed by a unit, e.g., mg, ml, etc. In contrast, numerals employed in other circumstance, e.g., two patients, should be spelled out if less than ten (10). ALL abbreviations, even those commonly used in medical mycology, e.g., Sabouraud glucose agar (SGA), must be defined when first used in the abstract and text. Please NOTE that the inability of authors to clearly present the contents of their submissions in English may constitute grounds for the immediate rejection of the papers or their return to authors so that they can correct their English usage prior to assignment to an associate editor.

For authors who require professional assistance with English usage, there are companies that will provide assistance for a fee. A list of these companies and contact information may be obtained from the Editor-in-Chief.

2. References

In preparing your citations please note that software programs available to format references MAY OR MAY NOT contain a format style option for *Medical Mycology* or for the use of the Vancouver system. Consequently, such programs should be used cautiously and should be carefully reviewed by the authors to ensure that citations meet the style/format requirements

MEDICAL MYCOLOGY

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

of the journal. References must be numbered sequentially in the order in which they first appear in the text, the numbers cited in the text within square brackets, i.e., [1], at the end of the sentences in which they appear, before the punctuation. They should be included in the same numerical order in the Reference section. **Citation numbers MUST NOT be indicated in superscript.** Articles with six or more authors are to be cited by the names of the first three authors, with the remaining authors replaced by *et al.* Journal names must be abbreviated, without the use of periods, in italic font. The volume number must be in **bold font**, issue numbers are not to be included and all page numbers must appear for each citation (e.g. 105-107, NOT 105-7).

2.1 Journal article

Author AB, Author CD, Author EF, *et al.* [if six or more] Title of paper. *J Title Abbrev* 1995; 00: 000-000. If the title is in a language other than English, the authors should provide the English translation. The name of the original language should be included within a bracket, e.g., [in Spanish], after pagination at the end of the citation.

2.2 Book chapter

Author AB, Author CD, Author EF, *et al.* [if six or more] Chapter title. In: Editor AB, Editor CD, eds. *Book Title With Initial Uppercase Letters* (as indicated here and in italic font), 5th edn. Place: Publisher, 1995: 000-000.

2.3 Book

Author AB, Author CD (eds). *Book Title With Initial Uppercase Letters* (as indicated here and in italic font), 5th edn. Place: Publisher, 1995.

2.4 Thesis

Author AB. Paper title with lowercase initials to all words, except the first word. PhD thesis, University of X, 1995.

2.5 Conference proceedings/Supplements

Author AB. Paper title. In: Editor AB, ed. Proceedings Title, place, date. Place: publisher, 1995: 000-000.

2.6 Meeting abstracts

Abstracts of works presented at scientific meetings should be cited in brackets within the text of the manuscripts rather than in the Reference sections. The citations should be formatted as: Author AB. Abstract title. Name of meeting, its location, the date and abstract number.

2.7 Personal communications, Unpublished results etc.

References to personal communications, unpublished results and papers submitted for publication (but not yet accepted) should only appear in brackets in the text, and in the following form: [A. B. Author, unpublished results] or [C. D. Author, personal communication].

2.8 Journal article on the Internet

Aboud S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role.

MEDICAL MYCOLOGY

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Am J Nurs [serial on the Internet]. 2002 Jun [cited 2002 Aug 12];102(6):[about 3 p.]. Available from: <<http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>>

2.9 Monograph on the Internet

Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer [monograph on the Internet]. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2002 Jul 9]. Available from: <<http://www.nap.edu/books/0309074029/html>>

2.10 Homepage/Web site

Cancer-Pain.org [homepage on the Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01 [site updated 2002 May 16; cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.cancer-pain.org>

2.11 Part of a homepage/Web site

American Medical Association [homepage on the Internet]. Chicago: The Association; c1995-2002 [updated 2001 Aug 23; cited 2002 Aug 12]. AMA Office of Group Practice Liaison; [about 2 screens]. Available from: <<http://www.ama-assn.org/ama/pub/category/1736.html>>

2.12 Database on the Internet

Open database:

Who's Certified [database on the Internet]. Evanston (IL): The American Board of Medical Specialists. c2000-[cited 2001 Mar 8]. Available from: <http://www.abms.org/newsearch.asp_/www.abms.org/newsearch.asp>

Closed database:

Jablonski S. Online Multiple Congenital Anomaly/Mental Retardation (MCA/MR) Syndromes [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). c1999 [updated 2001 Nov 20; cited 2002 Aug 12]. Available from: <http://www.nlm.nih.gov/mesh/jablonski/syndrome_title.html>

2.13 Part of a database on the Internet

MeSH Browser [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2002-[cited 2003 Jun 10]. Meta-analysis; unique ID: D015201; [about 3 p.]. Available from: <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser_/www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser/> Files updated weekly.

3. Tables

Tables should present only essential data, must be numbered sequentially in the order in which they are first referenced in the text, and all **MUST** be referred to in the text. Each table should be supplied as a separate file (page) and not imbedded within the body of the text. The table header should be **brief and self explanatory**. If it contains generic and species names, these must be spelled out in full, e.g., *Candida albicans*, not *C. albicans*. Column headings should be brief and include units in parentheses where applicable. Only horizontal rule lines should be used and then only for headers and footers. Tables should be considered as 'stand

MEDICAL MYCOLOGY

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

alone' documents through which data are summarized for presentation to readers. As such, all abbreviations employed in the tables **MUST** be defined by footnotes included directly below the tables.

4. Figures/Images

Images should be submitted as **TIF, EPS, PDF or JPG (preferred)** files. Scanned images should be of a sufficient resolution, i.e., 300 dpi for halftones/color, 500 dpi for combination halftones and 1000–1200 dpi for line art. Illustrations should be submitted as individual files, separate from the manuscript text file. The journal has a limited number of free color pages within its annual page allowance provided by the publisher. Therefore, authors may be required to pay USD 1150 for color reproduction in the print version of the journal. However, any figure submitted as a color original may appear in color in the journal's on-line edition, without any charges being assessed to the authors. **NO** part of any image may be enhanced, removed, relocated, introduced or manipulated in any manner after the capture of the original image unless the authors provide the editor with a clear and accurate description of the nature of the image manipulation.

Figures, like Tables, should be considered as 'stand alone' components of the manuscript. As such, authors should provide legends at the end of the text, following the Reference section, which clearly describe the significant features of the illustrated objects. In addition, authors may employ, as warranted, arrows or similar indicators in the figures to assist readers.

5. Supplementary Files

Supplementary information, including extensive data sets, large figures, audio and DVD/video material, can be made available as part of the on-line version of your manuscript. Please do not include supplementary information within the main manuscript file, but upload the material as separate file(s), labelled as 'Supplemental Digital Content'. Please include a sequential number (S1, S2 etc) for each file and a brief description of the content at the appropriate position in the text and a list of the files at the end of the discussion. Please note that supplementary files are not copy-edited and will be presented as submitted.

6. Nomenclature

Proposals of new fungal taxa **MUST** conform to the requirements outlined in the International Code of Nomenclature for Algae, Fungi, and Plants. Some of the provisions are effective as of January 1, 2012, while others will subsequently become effective. The proposed taxon must be supported by deposition of cultures and/or the unique nucleotide and/or amino acid sequences in appropriate collections or databases, along with the new binomial. The identifier assigned to the taxon by these recognized repositories, e.g., Mycobank, must be included in the text, tables and figures. In addition, binomials should appear in italics, must be spelled out in full when first used in the abstract, text, figures/tables. Thereafter, a generic name may be abbreviated to the first initial only, e.g., *Candida albicans* when first cited and *C. albicans* in the remainder of the abstract and text, except at the

MEDICAL MYCOLOGY

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

beginning of a sentence where the genus should be spelled out in entirety. Species names may NEVER be used without the generic full name or abbreviation combined with the full name of the species. For example, it must be *Candida albicans* or *C. albicans*, but never *albicans*, or *C. neoformans* var. *grubii* but never var. *grubii*. The use of abbreviations of generic and species names, e.g., (Ca) for *C. albicans*, in the text is NOT permitted.

7. Nucleotide and/or Amino Acid Sequence Data

Nucleotide and/or amino acid sequence data must be deposited in a freely accessible database. The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers should be included in the Materials and Methods Section of the manuscript. However, in a figure of a phylogenetic tree, the numbers should be shown along with species names (e.g., *Malassezia globosa* AB099880) (No descriptions are needed in the Materials and Methods Section in this case).

Required Statements

1. Humans in Research

When reporting investigations involving human subjects, authors must indicate in the manuscript if the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation within their institutions and/or with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 1983.

2. Animals in Research

Manuscripts containing information related to the experimental use of animals must clearly state that the studies complied with relevant professional and institutional animal welfare policies. Specifically, that procedures involving animals conformed to the ILAR Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (2011 or later editions) of the Institute of Laboratory Animal Research, Commission on Life Sciences, National Research Council (www.nap.edu/catalog/5140.html).

3. Authorship Contributions

Please note that in submitting this manuscript you and your co-authors are confirming that all authors have, in accord with the Committee on Publication Ethics guidelines, (a) made a substantial contribution to the conception and design, acquisition of data, and/or analysis and interpretation of data, (b) participated in the drafting of the article or revising it critically for important intellectual content, (c) have read and approved the final manuscript, AND (d) that the manuscript is not, either in whole or in part, currently under consideration by any other scientific journal and has not been previously published in either hard copy or electronic format. Except for those submitting the manuscript, members of Study Groups should not be individually cited as authors.

Submissions with ten or more authors will ONLY be considered if the corresponding authors provide, in their cover letters, descriptions of each of the author's contributions. Manuscripts drafted or written, in whole or part, by individuals other than those indicated as

MEDICAL MYCOLOGY

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

authors will NOT be considered for publication unless the contributions of these individuals are clearly and accurately presented in the Acknowledgment section of the paper.

4. Acknowledgments

The work of other individuals who assisted in the studies or in the preparation of the submission must be specifically indicated in the Acknowledgment section of the paper.

5. Disclosures of Potential Conflicts of Interest

Although there is no standard definition of Conflict of Interest, the United States National Institutes of Health has published the following statement:

It is the sole responsibility of authors to disclose any affiliation with any organization with a financial interest, direct or indirect, in the subject matter or materials discussed in the manuscript (such as consultancies, employment, expert testimony, honoraria, speakers bureaus, retainers, stock options or ownership) that may be perceived as potentially affecting the conduct or reporting of the work submitted. All sources of funding are to be explicitly stated. If uncertain as to what might be considered a potential conflict of interest, authors should err on the side of full disclosure (i.e., when in doubt, provide full disclosure).

In addition, a conflict of interest may be perceived to exist in such situations as when authors are affiliated with or employed by a private enterprise whose product or competitor's product, e.g., drug, device or diagnostic kit, is the focal point of the paper.

Information about potential conflict of interest must be clearly stated at the point of submission. This may be made available to reviewers and may be published with the manuscript at the discretion of the Editors and Publisher. The journal recommends that you and your co-authors include the sub header, 'Conflict of Interest', in the Acknowledgment section at the end of your manuscript. If no such conflict exists, simply respond 'None'. If you or your co-authors have received funding that meets the criteria described in the paragraph above, the source(s) of the funds must be declared (NOTE – you are NOT required to disclose the amounts of funding that you or your co-authors have received). Furthermore, authors must indicate their employment if describing their or other companies' products.

The intent of this policy is not to prevent authors with these relationships from publishing work, but rather to adopt transparency such that readers can make objective judgments on conclusions drawn.

Post Acceptance Information

1. Electronic Proofs

MEDICAL MYCOLOGY

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

When proofs are ready, corresponding authors will receive e-mail notification with a password and Web address from which to download a PDF. Hard copies of proofs will NOT be mailed. To avoid delays in publication, corrections to proofs must be returned, within 48 hours of receipt.

2. Offprints

Corresponding authors will receive an email with information on how to, at no expense, download a PDF of the final published version of the paper. Additionally, authors are also able to order fifty complimentary offprints.

3. Copyright

It is a condition of publication that authors assign copyright or license the publication rights of their articles, including abstracts, to *ISHAM*. However, special provisions are made for government employees who are not allowed to assign copyright for work conducted as part of their official functions. The second page of the copyright release form clearly describes these provisions. In all other instances, the release of copyright to the society allows it to ensure full copyright protection and to disseminate the article, and the journal, to the widest possible readership in print and electronic formats as appropriate. Authors may, of course, use the article elsewhere after publication without prior permission from Informa UK Ltd., provided that acknowledgment is given to the journal as the original source of publication, and that Informa Healthcare is notified so that records show that its use was properly authorized. Authors retain a number of other rights under the Informa UK Ltd. rights policies documents.

4. NIH Public Access Policy

In consideration of the National Institutes of Health (NIH) and Wellcome Trust Public Access Policies, Informa Healthcare acknowledges that the broad and open dissemination of NIH/Wellcome-funded research benefits future scientific endeavour. Because we value the contribution our journals make to the body of scientific knowledge, our policies accommodate authors who wish to submit to PubMed Central/UK PubMed Central.

1. Informa Healthcare will deposit funded work to PubMed Central/UK PubMed Central for public access posting 12 months (NIH) or 6 months (Wellcome Trust) after final publication in electronic form.
2. 'Funded work' shall be defined as the final peer-reviewed manuscript, which was accepted for publication and that reflects any author-agreed changes made in response to the peer review.
3. This embargo period begins upon final publication of the article in print or electronic form (whichever is sooner).

File name = med myco/instructions for authors - Informa

PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através do e-mail <jurgen.dobereiner@terra.com.br>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word. Havendo necessidade (por causa de figuras "pesadas"), podem ser enviados em CD pelo correio, com uma via impressa, ao Dr. Jürgen Dobereiner, Revista PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA, Caixa Postal 74.591, Seropédica, RJ 23890-000. Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista (www.pvb.com.br) e o modelo em Word (PDF no site). Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.

Apesar de não serem acertas comunicações (Short communications) sob forma de "Notas Científicas", não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Trabalhos sobre Anestesiologia e Cirurgia serão recebidos para submissão somente os da área de Animais Selvagens.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (peer review).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista (impressa e online) e distribuição via correio é cobrada taxa de publicação (pago *abargo*) no valor de R\$ 250,00 por página editorada e impressa, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o Título do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.
b) O(s) Autor(es) deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto FV; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva pode usar Silvana M.M.S. Silva, Inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, Inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e Inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores.

c) o ABSTRACT deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de "INDEX TERMS" ou "TERMS DE INDEXAÇÃO", respectivamente.

d) o RESUMO deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a INTRODUÇÃO deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em MATERIAL E MÉTODOS devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em RESULTADOS deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na DISCUSSÃO devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as CONCLUSÕES devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) Agradecimentos devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de REFERÊNCIAS, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as Instruções do "Style Manual for Biological Journals" (American Institute for Biological Sciences), o "Bibliographic Guide for Editors and Authors" (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

a) os trabalhos devem ser submetidos seguindo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob "Instruções aos Autores" (www.pvb.com.br). A digitalização deve ser na fonte Cambria, corpo 10, entrelinha simples; a página deve ser no formato A4, com 2cm de margens (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta "Inserir" do Word; pois imagens coladas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corriqueiramente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails dos demais autores (para eventualidades e confirmação de endereço para envio do fascículo impresso);

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema "autor e ano"; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de "et al.", mais o ano; se dois trabalhos não se distinguem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, "(Resumo)" ou "(Apud Fulano e o ano.)"; a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Hayes 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et al. 2007);

f) a Lista das REFERÊNCIAS deverá ser apresentada isenta do uso de caixa alta, com os nomes científicos em itálico (grifo), e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão ".jpg"), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse caso, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a trazo leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra "pe". Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos ("slides"). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial à impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, com independência do texto) e serão apresentadas no final do trabalho.

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e colocados no final do texto. Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para agrupamento de colunas. Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, reconhecendo, se possível, com "a" em cada Quadro; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Pelotas, 18 de outubro de 2012

De: Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEE A)
Para: Professor Mário Carlos Araújo Meireles
Faculdade de Veterinária

Senhor Professor:

A CEEA analisou o projeto intitulado: "*Paracoccidioides brasiliensis*: avaliação micológica e sorológica em animais silvestres na região sul do Brasil", processo nº 23110.007123/2012-71, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, considerando ser o assunto pertinente e a metodologia compatível com os princípios éticos em experimentação animal e com os objetivos propostos.

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao Departamento de Pesquisa e Iniciação Científica para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 7123).

Sendo o que tínhamos para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva
Presidente da CEEA

Ciente em: 06/11/2012

Assinatura do Professor Responsável: