

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Veterinária**  
**Programa de Pós-Graduação em Veterinária**



Dissertação

**Estudo soroepidemiológico da infecção pelo *Paracoccidioides brasiliensis* em caninos domésticos no sul do Rio Grande do Sul, Brasil**

**Alessandra Jacomelli Teles**

Pelotas, 2015

**Alessandra Jacomelli Teles**

**Estudo soroepidemiológico da infecção pelo *Paracoccidioides brasiliensis* em caninos domésticos no sul do Rio Grande do Sul, Brasil**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Dr. Mário Carlos Araújo Meireles

Co-Orientadora: Dra. Melissa Orzechowski Xavier

Pelotas, 2015

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

T269e Teles, Alessandra Jacomelli

Estudo soropidemiológico da infecção pelo  
Paracoccidioides brasiliensis em caninos domésticos no sul  
do Rio Grande do Sul, Brasil / Alessandra Jacomelli Teles ;  
Mário Carlos Araújo Meireles, orientador ; Melissa  
Orzechowski Xavier, coorientadora. — Pelotas, 2015.

72 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação  
em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade  
Federal de Pelotas, 2015.

1. Cães. 2. Paracoccidioidomicose. 3. Fungo. 4.  
Soropidemiologia. 5. ELISA. I. Meireles, Mário Carlos  
Araújo, orient. II. Xavier, Melissa Orzechowski, coorient. III.  
Título.

CDD : 636.7

Alessandra Jacomelli Teles

Estudo soroepidemiológico da infecção pelo *Paracoccidioides brasiliensis* em caninos domésticos no sul do Rio Grande do Sul, Brasil

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 25 de fevereiro de 2015

Banca examinadora:

Prof. Dr. Mário Carlos Araújo Meireles (Orientador)  
Doutor em Microbiologia e Imunologia pela Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dra. Patrícia da Silva Nascente  
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dra. Ana Raquel Mano Meinerz  
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dra. Antonella de Souza Mattei  
Doutora em Ciências Pneumológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## **Agradecimentos**

Muitas pessoas contribuíram de maneiras diferentes durante o meu período de mestrado, minha eterna gratidão a todas!

Ao meu orientador, Prof. Mário Carlos Araújo Meireles, que sempre me tratou como filha, pela oportunidade que me deu em trabalhar no seu grupo de pesquisa, pela confiança depositada em mim, por responsabilidades e burocracias que auxiliaram no meu crescimento pessoal e profissional.

À Prof<sup>ª</sup>. Melissa Xavier pela co-orientação, pelo apoio, idéias, paciência, incentivo, pela total disponibilidade mesmo durante sua licença e férias. Muito obrigada, tenho certeza de que não conseguiria executar todo esse trabalho sem a sua ajuda.

Ao Gabriel Baracy Klafke por quebrar a cabeça junto comigo até descobrirmos o erro dos primeiros ELISAs, por toda ajuda na execução dos testes e sensibilização de placas pra agilizar minhas idas a Rio Grande.

À Ana Paula Albano por confiar a mim a continuação de seu trabalho, por me fornecer os soros dos cães e todas as informações que precisei.

A todos os animais que participaram desse experimento e a ONG SOS Animais por colaborar com o estudo permitindo a coleta sanguínea dos caninos.

Ao Programa de Pós-graduação em Veterinária UFpel.

Ao CNPq pela bolsa de estudo, à CAPES e FAPERGS pelo auxílio financeiro nos demais projetos de pesquisa.

À banca examinadora que aceitou tão prontamente o convite em fazer parte da defesa dessa dissertação.

Minhas queridas, Ângela e Otávia, é um privilégio quando temos ao nosso lado pessoas tão maravilhosas como vocês. Nunca terei como agradecer por tudo que fizeram e fazem por mim, obrigada pela amizade, sinceridade e por todo tempo que compartilhamos.

Agradeço à pequena grande Angelita, que apostou em mim desde quando eu era bolsista de iniciação científica, me deu tarefas que pareciam impossíveis inúmeras vezes corrigiu meus resumos, artigos e e-mails.

Às colegas de pós-graduação, além das acima citadas, Josiara e Luiza, que tornaram esse período ainda melhor, sempre na companhia de um mate e uma boa risada e se apertando na mesa redonda pra caber mais um.

À Prof<sup>a</sup>. Renata Osório pela amizade e conselhos.

Aos bolsistas, estagiários do MICVET/UFPel por toda disponibilidade.

Ao Prof. Zoilo Pires de Camargo e todo seu grupo de pesquisa por me receberem com tanta cordialidade em seu laboratório. Especialmente ao Anderson Messias Rodrigues, por toda paciência e ensinamento sobre PCR e à Paula Della Terra pela companhia e ajuda durante minha estadia em São Paulo.

À minha família que é base de tudo, pelo amor incondicional, apoio que me impulsionou e vibração com minhas vitórias. À minha querida mãe Elenir que nunca mediu esforços para que eu conquistasse tudo que eu quisesse, com seu caráter de mulher batalhadora e corajosa, ao meu pai Luiz (*in memoriam*) que nos deixou tão precocemente, ainda nos meus primeiros meses de mestrado, por ser um exemplo de força, humanidade e dignidade, sempre com suas palavras sábias e amorosas. Ao meu irmão e minha cunhada, Anderson e Suélem, pelo amor, carinho e orações.

Aos meus sogros, Manuel e Maúde, sempre tão atenciosos e amorosos, agradeço por tudo principalmente por serem como meus pais.

Ao Márcio, meu amor, por suportar meus defeitos, tolerar meus humores e, principalmente me entender. Obrigada pela companhia em todos esses anos, pelos momentos incomparáveis juntos, pelas críticas e acima de tudo amor recíproco.

E por fim, agradeço a Deus por me proporcionar uma vida repleta de oportunidades e por todas essas pessoas maravilhosas que colocou no meu caminho, cada uma de uma forma especial.

*“Com a força de um moinho que trabalha devagar  
Vai buscar o teu caminho, nunca olha para trás.”  
Carlos Maltz e Humberto Gessinger*

## Resumo

TELES, Alessandra Jacomelli. **Estudo soroepidemiológico da infecção pelo *Paracoccidioides brasiliensis* em caninos domésticos no sul do Rio Grande do Sul.** 2015. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

O fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* é o principal causador da paracoccidioidomicose, micose sistêmica restrita à América Latina e endêmica no Brasil. No extremo sul do país a enfermidade é diagnosticada em humanos desde a década de 60 com crescimento do número de casos a partir dos anos 90. Com o propósito de detectar a presença do agente em áreas urbanas, alertando para a possibilidade da exposição de indivíduos suscetíveis à doença, este estudo teve como objetivo investigar a infecção por *P. brasiliensis* em cães no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. Foram avaliados 196 caninos, errantes e semidomiciliados, participantes de um programa de controle populacional dos municípios de Pelotas e Capão do Leão localizados na zona sul do Rio Grande do Sul. Utilizou-se a técnica de ELISA indireto para detecção de anticorpos anti-gp43 de *P. brasiliensis* no soro dos animais. Na técnica sorológica foram testados e comparados dois conjugados diferentes, anti-IgG canina-peroxidase e proteína G-peroxidase, estes foram avaliados quanto à concordância dos resultados nos testes (índice Kappa) e a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo do conjugado proteína G-peroxidase foram calculados considerando o conjugado específico para cães como padrão ouro. A infecção fúngica foi constatada em 58 animais (29,6%), sem diferença significativa quanto ao sexo, idade e raça dos cães ( $P > 0,05$ ). Foram detectados animais soropositivos procedentes de todos os bairros do Distrito Sede de Pelotas, bem como do município vizinho Capão do Leão. Os resultados dos testes com os dois conjugados diferentes resultaram em fraca concordância (Kappa=0,140;  $P < 0,001$ ). A proteína G-peroxidase apresentou baixa sensibilidade e ocorrência de falsos negativos em relação ao conjugado específico, demonstrando não ser uma alternativa viável para realização do imunoensaio na espécie canina. A detecção de anticorpos específicos nos cães do presente estudo comprova a presença e ampla distribuição de *P. brasiliensis* na área urbana da cidade de Pelotas e no município Capão do Leão, e alerta para ocorrência da PCM em indivíduos suscetíveis, bem como a possibilidade da doença em pequenos animais nesta região.

**Palavras-chave:** Cães; paracoccidioidomicose; fungo; soroepidemiologia; ELISA



## Abstract

TELES, Alessandra Jacomelli. **Seroepidemiological study of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in domestic canines in southern Rio Grande do Sul.** 2015. 72f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

The thermally dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* is the main agent that triggers the paracoccidioidomycosis (PCM), a systemic infectious disease restricted to Latin America and endemic in Brazil. In southern Brazil, this disease has been diagnosed in humans since the 60s and the number of cases has increased since the 90s. In order to detect the presence of the agent in urban areas and warn about the possibility of the exposure of susceptible individuals to the disease, this study aimed to investigate the infection by *P. brasiliensis* in dogs in Rio Grande do Sul, southern state of Brazil. 196 dogs which participated in a program of animal population control in the cities of Pelotas and Capão do Leão were evaluated. The indirect ELISA technique was used in order to detect the presence of anti-gp43 antibodies in the animal serum. Two different conjugates were tested and compared in this serological technique, the dog anti-IgG peroxidase and the protein G-peroxidase, that were evaluated for the concordance of the test results (Kappa index). The sensitivity, specificity, positive and negative predictive value of protein G-peroxidase were calculated considering the specific conjugate of dog as a gold standard. The fungal infection was confirmed in 58 animals (29,6%), and no significant difference was found between the gender, age and breed of the dogs ( $P > 0,05$ ). Seropositive animals could be detected coming from the two cities, both Pelotas and Capão do Leão. The result of the tests made with the different conjugate showed poor concordance (Kappa=0,140;  $P < 0,001$ ). The protein G-peroxidase presented low sensitivity and occurrence of false negatives regarding to the specific conjugate, what demonstrated not being a viable alternative to realize an immunoassay in dogs. The detection of specific antibodies in the dogs serum in this study proved the presence and a wide distribution of *P. brasiliensis* in the urban areas of Pelotas and Capão do Leão city and alerted to the occurrence of PCM in susceptible individuals, as well as the possibility of the disease in small animals in the region.

**Key-words:** Dogs; paracoccidioidomycosis; fungus; seroepidemiology; ELISA

## Lista de Figuras

- Figura 1    Procedência dos caninos avaliados e soropositivos para IgG anti-gp43 de *Paracoccidioides brasiliensis* no teste de ELISA.....40

## Lista de Tabelas

Tabela 1	Soropositividade para IgG anti-gp43 de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> em caninos dos municípios de Pelotas e Capão do Leão-RS, utilizando o teste de ELISA indireto, de acordo com as variáveis estudadas.....	38
Tabela 2	Comparação dos resultados do teste de ELISA para detecção de IgG anti- <i>P.brasiliensis</i> em cães entre os distintos conjugados utilizados (Anti-IgG canina e Proteína G-peroxidase).....	39

## Lista de Abreviaturas e Siglas

DO	Densidade óptica
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FURG	Universidade Federal do Rio Grande
gp43	Glicoproteína 43
HIV1	Vírus da Imunodeficiência humana
IgG	Imunoglobulina G
K	Índice Kappa
MICVET	Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária
ml	Mililitro
mm	Milímetro
OPD	orto-fenilenoldiamina
PBS 1X	Tampão fosfato salino uma vez
PBS-T	Tampão fosfato salino com Tween
PCM	Paracoccidiodomicose
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RS	Rio Grande do Sul
UFPEL	Universidade Federal de Pelotas
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo

## Lista de Símbolos

<	Menor
>	Maior
°C	Grau Celsius
%	Porcentagem
µg	Micrograma
µl	Microlitro

## Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>Revisão de Literatura .....</b>	<b>15</b>
2.1	Paracoccidioidomicose: Definição e Histórico.....	15
2.2	Taxonomia, Etiologia e Ecologia .....	16
2.3	Epidemiologia.....	17
2.4	Patogenese e Formas Clínicas.....	18
2.5	PCM em Animais .....	20
<b>3</b>	<b>Objetivos .....</b>	<b>24</b>
3.1	Objetivo geral .....	24
3.2	Objetivos específicos.....	24
<b>4</b>	<b>Artigo.....</b>	<b>25</b>
<b>5</b>	<b>Considerações Finais .....</b>	<b>41</b>
	<b>Referências .....</b>	<b>42</b>
	<b>Apêndices .....</b>	<b>48</b>
Apêndice A.....		49
Artigo publicado na revista Science and Animal Health.....		49
<b>Anexos .....</b>		<b>64</b>
Anexo A.....		65
Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal.....		65
Anexo B.....		66
Normas da Revista Medical Micology .....		66

## 1 Introdução

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica causada por fungos do gênero *Paracoccidioides*, principalmente por *P. brasiliensis*. A primeira descrição da doença foi feita por Adolpho Lutz em 1908, e o agente etiológico foi caracterizado por Afonso Splendore (1912) e Floriano Paulo de Almeida (1930). É considerada a infecção fúngica mais importante da América Latina, ocorrendo em regiões tropicais e subtropicais. O Brasil representa o país com maior número de casos documentados, com maior prevalência nas regiões sul, sudeste e centro-oeste (MARQUES, 2008; PANIAGO et al., 2003; MOREIRA, 2008; VERLI et al., 2005;).

*P. brasiliensis* é um fungo termodimórfico, quando cultivado a 25°C apresenta-se na forma filamentosa e como levedura em culturas a 35-37°C ou em parasitismo (BRUMMER et al., 1993). A infecção provavelmente acontece pela inalação de propágulos fúngicos na fase filamentosa, que atingem os pulmões e podem se diferenciar para fase leveduriforme (BORGES-WALMSLEY et al., 2002; VERLI et al., 2005). O fungo pode disseminar-se por via hematogênica ou linfática acometendo outros órgãos e sistemas orgânicos causando lesões granulomatosas frequentemente observadas nos pulmões, linfonodos, baço, fígado, pele e mucosas. Em geral, a doença é de evolução crônica, e ocorre principalmente em trabalhadores rurais do sexo masculino, com acentuada predominância entre 30 e 50 anos de idade, muitas vezes levando-os a incapacidade de exercer suas atividades físicas (COUTINHO et al., 2002; RESTREPO et al., 2008).

A PCM é endêmica em todo território brasileiro sendo considerada a primeira causa de mortalidade entre as micoses sistêmicas (COUTINHO et al., 2002). A enfermidade é diagnosticada no Rio Grande do Sul desde a década de 60 e na região sul do estado os casos tem aumentado a partir dos anos 90 (SILVA et al., 2003; VERLI et al., 2005; SOUZA et al., 2014).

A doença pode apresentar extenso período de latência e muitos pacientes quando procuram atenção médica podem não estar mais no local onde adquiriram a infecção (SHIKANAI-YASSUDA et al., 2006). Estudos utilizando animais como sentinelas da presença do fungo têm demonstrado que *P. brasiliensis* possui uma

distribuição mais ampla do que registrado, não apenas restrita ao meio rural como era descrita (RICHINI-PEREIRA et al., 2008; ALBANO et al., 2014).

A infecção por *P. brasiliensis* em cães tem sido investigada em diferentes regiões do Brasil, demonstrando significativa positividade, possivelmente pelo hábito destes animais de farejar e cavar o solo, contribuindo para entendimento da transmissão, ecologia e epidemiologia do fungo (ONO et al., 2001; SILVEIRA et al., 2006; FONTANA et al., 2010). Ressalta-se ainda, a relevância da espécie canina que além de conviver estritamente com humanos, não possui hábitos migratórios, dessa forma podem ser marcadores epidemiológicos sensíveis da distribuição do fungo no ambiente. Assim como em humanos os animais podem se infectar e desenvolver sintomas da PCM, sendo que casos dessa enfermidade em cães já foram descritos em cães (RICCI et al., 2004; FARIAS et al., 2011).

A presença do patógeno no sul do Rio Grande do Sul foi confirmada somente pela infecção em animais silvestres e equinos (ALBANO et al., 2014; ALBANO et al., no prelo), espécies com menor convivência com humanos quando comparado aos cães. No entanto, dados mais específicos da presença do fungo em áreas urbanas nesta região não foram descritos.

Conforme exposto, este estudo buscou investigar a infecção por *P. brasiliensis* em cães domésticos procedentes de distintos bairros do município de Pelotas e da cidade vizinha, Capão do Leão, Rio Grande do Sul. Ainda, avaliar e comparar o uso de dois conjugados diferentes para detecção de anticorpos anti- *P. brasiliensis* em exames sorológicos de caninos.



## 2 Revisão de Literatura

### 2.1 Paracoccidioidomicose: Definição e Histórico

A paracoccidioidomicose (PCM), antigamente conhecida como blastomicose sul-americana, é uma micose sistêmica, caracterizada pelo desenvolvimento de lesões granulomatosas, de evolução geralmente crônica, envolvendo pulmão, pele, membranas mucosas e outros tecidos. Devido ao alto potencial incapacitante a enfermidade representa um importante problema de saúde pública, além de provocar mortes prematuras (RESTREPO et al., 2008).

A história da PCM está intimamente vinculada ao Brasil, pois o micro-organismo foi descoberto, descrito e caracterizado por pesquisadores estrangeiros e brasileiros em nosso país. No ano de 2008 completou o centenário da publicação do médico brasileiro Adolpho Lutz, que descreve pela primeira vez a doença “mycose pseudococcídica”, hoje PCM. No relato pioneiro da enfermidade, Lutz abordou detalhadamente aspectos clínicos, histopatológicos e micológicos da enfermidade em dois pacientes com lesões orais. Ao observar a presença de um agente fúngico diferente de *Coccidioides immitis*, nomeou como grupo de pseudo-coccídios, descrevendo que se apresentavam geralmente com um maior ao centro e outros pequenos ao redor. No cultivo à temperatura ambiente detectou diferença morfológica com a observada no tecido, pois exibia filamentos estreitos, tornando-se hifas com segmentos cilíndricos, constatando se tratar de um fungo dimórfico (MARQUES, 2008).

Em 1912, quatro anos após o primeiro relato da PCM, o médico e bacteriologista italiano Afonso Splendore, descreveu novos casos da doença em São Paulo e através de estudos minuciosos da morfologia fúngica denominou o agente como *Zymonema brasiliensis*. Floriano Paulo de Almeida demonstrou diferenças notáveis em estudo comparativo entre granuloma coccidióico nos Estados Unidos e no Brasil, demonstrando a dessemelhança entre *C. immitis* e o agente da paracoccidioidomicose. Então, em 1930 criou o gênero *Paracoccidioides*

dentro do reino Fungi, renomeando a espécie, anteriormente descrita por Splendore, para *Paracoccidioides brasiliensis*.

Em 1971, durante reunião de micologistas do continente americano em Medellín, Colômbia, a enfermidade anteriormente denominada blastomicose sul-americana, doença de Lutz, doença de Lutz-Splendore-Almeida, passou a ser chamada oficialmente de paracoccidioidomicose (MOREIRA, 2008).

Recentemente Teixeira et al. (2009), do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, descobriram uma nova espécie fúngica capaz de causar a PCM, denominada de *Paracoccidioides lutzii*, em homenagem a Adolpho Lutz, o primeiro a investigar essa doença. Estabelecendo assim que duas espécies distintas de fungos podem causar esta micose.

## 2.2 Taxonomia, Etiologia e Ecologia

*Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo ascomiceto, da Classe Pleomycetes, Ordem Onygenales, Família Onygenaceae, Gênero *Paracoccidioides* e Espécie *brasiliensis* (BIALEK et al., 2000; SAN BLAS et al., 2002). Recentemente foi reclassificado na nova Família Ajellomycetaceae, a qual representa a um clado monofilético que inclui também os gêneros *Blastomyces*, *Emmonsia* e *Histoplasma* (UNTEREINER et al., 2004).

*P. brasiliensis* possui dimorfismo termo-dependente, apresentando-se na forma de levedura em temperaturas de 35-37°C, com colônias cremosas e cerebriformes, que microscopicamente demonstram blastoconídios com paredes espessas, birrefringentes, rodeadas por multibrotamentos, aspecto conhecido como “roda de leme”. As colônias a temperatura de 25°C são filamentosas, de crescimento lento, com coloração branca a amarronzada, e micélios aéreos curtos muito aderidos ao meio de cultura; as hifas são finas e septadas, com artrósporos e clamidoconídios globosos terminais ou intercalares (LACAZ, 2002).

Estudos moleculares recentes evidenciam a variabilidade genética de *P. brasiliensis*, demonstrando que este pode ser um conjunto de espécies crípticas, ou seja, espécies diferentes em que seus caracteres fenotípicos até então conhecidos não são suficientes para distingui-las (FUTUYAMA, 2002). Matute et al. (2006) através de análise de sequências de DNA detectaram três espécies crípticas: S1,

encontrada no Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela; PS2, encontrada no Brasil e Venezuela; e PS3, encontrada apenas na Colômbia.

Estudos filogenéticos e morfológicos constataram uma espécie distinta, também capaz de causar PCM, *P. lutzii*. Diferente de *P. brasiliensis*, que contém um complexo de pelo menos quatro espécies diferentes, *P. lutzii* é composta por uma espécie única, sendo encontrada no centro, sudoeste e norte do Brasil e no Equador (TEIXEIRA et al., 2009; TEIXEIRA et al., 2013).

O isolamento ambiental de *P. brasiliensis* parece ser muito difícil e os dados sobre a ecologia do fungo são pouco conclusivos, isso dificulta o conhecimento acerca do habitat desse micro-organismo, embora estudos sugeriram que o fungo viva como sapróbio no solo (BAGAGLI & BOSCO, 2008). Locais onde a doença é endêmica auxiliam para o entendimento do micronicho do fungo, áreas de alta pluviosidade e umidade, temperaturas variando entre 17 e 24°C, abundante vegetação e próximo a cursos de águas favoreceriam o desenvolvimento e a manutenção desse agente no ambiente (RESTREPO et al., 2001). Estudos experimentais demonstraram que *P. brasiliensis* pode crescer e produzir conídios infecciosos em solo arenoso e argiloso, contendo alto teor de água e que tenham a presença de animais silvestres (TERÇARIOLI et al., 2007).

### **2.3 Epidemiologia**

A PCM é endêmica e restrita a América Latina, do sul do México ao norte da Argentina, com maior incidência na Venezuela, Colômbia e Brasil (RESTREPO et al., 2001). Este último é o país com maior número de casos reportados da enfermidade, embora a prevalência real não seja estabelecida estima-se que a incidência anual nos brasileiros seja de 1-3 casos a cada 100 mil habitantes e mortalidade 1,45/milhão de habitantes (COUTINHO et al., 2002).

A doença é endêmica em todo território brasileiro, sendo mais frequente nos Estados de São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul (COUTINHO et al., 2002; PANIAGO et al., 2003; VERLI et al., 2005).

É considerada a oitava causa de mortalidade entre as doenças crônicas de origem infecciosa e parasitária, e a primeira entre as micoses sistêmicas. Atinge

principalmente indivíduos do sexo masculino, trabalhadores rurais com faixa etária entre 30 e 50 anos de idade (COUTINHO et al., 2002).

O Rio Grande do Sul é endêmico para PCM, pois apresenta condições eco-epidemiológicas favoráveis para o desenvolvimento do fungo. Um estudo retrospectivo sobre a ocorrência da doença registrou 757 casos em humanos em um período de 36 anos (SILVA et al., 2003). Verli et al. (2005) descreveu nesse estado 61 pacientes diagnosticados com a enfermidade, observando ainda que 73,7% desses provinham da região norte do estado, área tipicamente agrícola. Na região sul do estado foram diagnosticados 123 casos por histopatologia desde os anos 60, com predomínio dos casos nas duas últimas décadas (SOUZA et al., 2014). Em todos esses estudos a doença ocorreu principalmente em homens, com faixa etária acima de 40 anos.

O grande fator de risco para a infecção são as profissões ou atividades relacionadas ao manejo do solo contaminado com o fungo, como atividades agrícolas, terraplanagem, preparo de solo, práticas de jardinagens, transporte de produtos vegetais, entre outros. Pode se observar que a grande maioria dos pacientes exerceu atividade agrícola nas duas primeiras décadas de vida, provavelmente nesse período tenha ocorrido a infecção, manifestando-se mais cronicamente como doença. A maioria destes pacientes, quando procuram atenção médica, já saíram da área endêmica, residindo em centros urbanos onde exercem outras atividades, não ligadas ao trato do solo (SHIKANAI-YASSUDA et al., 2006).

## **2.4 Patogenese e Formas Clínicas**

A infecção é adquirida primordialmente através da inalação de propágulos fúngicos na fase filamentosa, sendo que as partículas infectantes são os conídios, devido ao seu pequeno tamanho, que favorece a penetração nos alvéolos pulmonares onde, sob efeito da temperatura corpórea do hospedeiro converte-se em levedura, forma parasitária do fungo. A partir daí, os propágulos fúngicos podem ser destruídos pelo mecanismo de defesa inespecífico ou multiplicar-se produzindo o foco primário da infecção por PCM. Posteriormente o micro-organismo pode disseminar-se para outros órgãos por via linfática ou hematogena (RESTREPO et al., 2008).

A infecção dá origem a uma resposta intensa do hospedeiro com alveolite e presença abundante de neutrófilos, prontamente ocorre o aparecimento de células mononucleares que se convertem em células epiteliais e formação de granulomas atraindo os linfócitos TCD8+. O curso da infecção é determinado pela resposta imune do hospedeiro, em indivíduos imunocompetentes a doença se apresenta de forma subclínica e as manifestações clínicas ocorrem naqueles cuja imunidade celular esteja comprometida. Assim, as crianças e alguns indivíduos infectados pelo HIV desenvolvem doença disseminada com predominância de envolvimento do sistema retículo-endotelial, caracterizando a forma aguda / subaguda da doença, também conhecida como tipo juvenil. Os pacientes adultos tendem a desenvolver uma doença crônica, progressiva, marcada por dano pulmonar mais grave acompanhada na maioria dos casos pela disseminação, acometendo o sistema linfático, a mucosa, as supra-renais, a pele, e/ou outros órgãos. A lesão pulmonar progride para fibrose, deixando sequelas importantes (RESTREPO et al., 2008).

A PCM é classificada em PCM-infecção e PCM-doença de forma aguda ou subaguda (forma juvenil), forma crônica (tipo adulta) ou forma residual (sequelas). A PCM crônica pode ser classificada em PCM unifocal ou multifocal conforme a distribuição anatômica das lesões (FRANCO et al., 1987).

Indivíduos imunocompetentes quando entram em contato com o fungo têm a capacidade de evitar a doença, apresentando a condição chamada de PCM-infecção. Essa forma ocorre independente do sexo, em hospedeiros que residem ou residiram em zona endêmica. Estes, normalmente apresentam reação positiva para antígenos de *P. brasiliensis* em teste intradérmico ou sorológico, mas não desenvolvem a doença (FRANCO et al., 1987).

A PCM-doença pode se apresentar de duas formas clínicas: aguda (tipo juvenil) e a forma crônica. A primeira é menos frequente, representa menos de 10% da casuística geral desta micose, e acomete crianças de ambos os sexos ou adultos abaixo de 30 anos. Possui evolução rápida e muito grave, o que leva a uma taxa significativa de mortalidade (BORGES-WALMSLEY et al., 2002).

A forma crônica da doença progride lentamente e o período de incubação pode durar meses ou anos, acomete preferencialmente o sexo masculino, com idade média de 40 anos. As mulheres são menos afetadas na idade adulta devido à proteção conferida pelos estrógenos, que inibem a transformação de micélio e conídios em leveduras, além da mulher ter menor envolvimento com o trabalho em

área rural, e conseqüente menor exposição ao agente (MARTINEZ, 2005). Os pacientes apresentam fraqueza, emagrecimento, lesões tegumentares e às vezes linfadenopatia. O pulmão é o principal órgão acometido, sua manifestação clínica é muito insidiosa, cursando com tosse seca, posteriormente produtiva, e dispnéia aos esforços. Em decorrência da disseminação hematogênica do fungo a partir do foco primário pulmonar ocorrem lesões em mucosa oral e cutânea, frequentemente distribuídas na face e em torno de orifícios naturais do corpo, como boca, nariz e ânus (SHIKANAIYASUDA, 2006).

## 2.5 PCM em Animais

Nos animais relatos de PCM são raros, mas assim como os humanos eles podem se infectar com *P. brasiliensis* e desenvolver sintomas. Na literatura são relatados casos da doença em diferentes animais silvestres, como em mico-de-cheiro (*Saimiri sciureus*) (JHOHNSON & LANG, 1977), tatu-galinha (*Dasypus novemcinctus*) (NAIFF et al., 1986), tatu-do-rabo-de-porco (*Cabassous centralis*) (CORREDOR et al., 2005), preguiça-real (*Choloepus didactylus*) (TREJO-CHAVES et al., 2011).

No Brasil foram relatados dois casos em caninos, ambos fêmeas, da raça Dobermann. O primeiro ocorreu no município de Mogi Guaçu, São Paulo, em um animal que apresentava linfadenomegalia cervical revelando inflamação granulomatosa com presença de leveduras brotantes no exame histopatológico, e cuja confirmação da PCM foi realizada por imunohistoquímica com anticorpo específico anti-gp43 e por *nested* PCR (RICCI et al., 2004). O segundo caso descreveu uma fêmea canina, de seis anos de idade, com linfadenomegalia generalizada e hepatoesplenomegalia. O animal proveniente da Argentina, com dois anos de idade veio para o Brasil e por participar de exposições esteve em diferentes Estados. O diagnóstico foi realizado por isolamento do agente em cultura micológica, imunohistoquímica, histopatologia do linfonodo poplíteo e análise molecular. O cão foi tratado com sucesso com itraconazol durante dois anos (FARIAS et al., 2011).

A PCM-infecção em animais domésticos e silvestres tem sido bastante estudada, esses estudos fornecem dados para compreensão da ecologia e habitat do fungo, além de auxiliar na detecção de áreas endêmicas da doença. Testes

sorológicos e/ou moleculares específicos para o agente, avaliando a exposição de animais ao *P. brasiliensis*, demonstram ampla distribuição do fungo, não apenas restrita ao meio rural (RICHINI-PEREIRA et al., 2008; ALBANO et al., 2014).

Os animais silvestres fornecem um dado muito importante por manterem um contato estrito com o ambiente, favorecendo assim conhecimento de áreas geográficas onde há a presença do fungo, visto que muitos não têm hábitos migratórios como os humanos. Os tatus da espécie *Dasypus novemcinctus* são muito estudados e auxiliam na compreensão da epidemiologia da doença. Esses animais com intenso hábito fossorial e escavatório, cuja distribuição geográfica costuma coincidir com a da PCM, podem ser considerados como sentinela da presença do fungo na região. Diversos autores descreveram a exposição desses animais ao agente, bem como o isolamento fúngico de lesões em fígado, baço, linfonodos mesentéricos e pulmão comprovando o acometimento por PCM (NAIFF et al., 1986; CORREDOR et al., 1999; SILVA-VERGARA et al., 2000; BAGAGLI et al., 2003; ALBANO et al., 2014).

Na literatura ainda são descritos casos de infecção por *P. brasiliensis* em quati (*Nasu 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 (*Spiggurus spinosus*), mão-pelada (*Procyon cancrivorus*) e furão (*Galictis vittata*) (COSTA et al., 1995; CORTE et al., 2007; RICHINI-PEREIRA et al., 2008; RICHINI-PEREIRA et al., 2009; ALBANO et al., 2014).

Já os animais domésticos desempenham um papel de grande importância no estudo epidemiológico da PCM, devido ao contato infinitamente maior com humanos do que os animais silvestres. Estudos já foram realizados em frangos, ovinos, caprinos, bovinos, equinos, caninos e felinos (SILVEIRA et al., 2008; FERREIRA, 2009; CORTE et al., 2009; CANTEROS et al., 2010; FONTANA et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011; CORTE et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013).

Diversos trabalhos têm avaliado a exposição dos cães ao fungo. Mós e Fava Netto (1974), através de reação de fixação do complemento avaliaram soros de 145 cães, sendo 113 procedentes da cidade de São Paulo e 32 de Botucatu. A positividade obtida foi de 74,33 e 78,2% em cães de São Paulo e Botucatu respectivamente, mas não foram observadas lesões sugestivas de PCM em nenhum

dos animais. Ainda nesta mesma região geográfica, Fagundes et al. (2002) em estudo soropidemiológico, utilizando ELISA com exoantígeno de *P. brasiliensis* em 275 cães de áreas rurais da região de Botucatu encontraram 26,5% de positividade.

No norte do Estado do Paraná, Ono et al. (2001) avaliaram 305 caninos quanto a presença de anticorpos anti-gp43 de *P. brasiliensis*, encontrando uma positividade variável de 89,5% em animais de ambiente rural, 48,8% em cães que viviam na periferia da cidade, em locais sem calçamento ou asfalto e 14,8% em animais provenientes exclusivamente de área urbana. Um estudo semelhante realizado com felinos no mesmo Estado demonstrou positividade de 48,8% em animais de áreas rurais e 2% de áreas urbanas (OLIVEIRA et al., 2013).

Silveira et al., (2006) buscando anticorpos contra *P. brasiliensis* em cães soropositivos e soronegativos para leishmaniose, no estado do Mato Grosso do Sul, utilizando a técnica de ELISA encontrou positividade superior em animais positivos para leishmaniose do que nos negativos, sendo 79,9% e 54% respectivamente. Os autores sugerem que a maior reatividade pode ser devido à reatividade cruzada ou a co-infecção de cães por *Leishmania* e *P. brasiliensis*.

Fontana et al. (2010) realizaram sorologia em 149 cães do meio urbano e 126 cães de zona rural de Uberaba, Minas Gerais, através de teste de ELISA com antígeno gp43. Os cães urbanos também foram submetidos à reação intradérmica com o mesmo antígeno, sendo nove positivos para esse teste. A positividade dos cães no teste de ELISA foi de 53,6% na população urbana e 80,5% nos cães rurais.

Um estudo analisou soros de 89 cães que habitavam zona rural Argentina em busca de anticorpos específicos contra os fungos *P. brasiliensis*, *H. capsulatum* e *Coccidioides* sp. Foram utilizados diferentes métodos sorológicos, apenas pela técnica de Western Blotting foi possível constatar anticorpos no soro de dois caninos anti-gp43 antígeno do fungo causador da PCM (CANTEROS et al., 2010).

Em Rondônia, na Amazônia Ocidental Brasileira, pesquisadores avaliaram sorologicamente, por ELISA indireto e imunodifusão em gel de Ágar, 126 cães urbanos, encontrando soropositividade de 54,8% no teste de ELISA e nenhuma reatividade foi detectada pelo teste de imunodifusão (CORTE et al., 2012).

Os dados sobre a ecologia do fungo no Rio Grande do Sul são limitados, mesmo este sendo considerado endêmico para PCM. Recentemente um estudo sorológico avaliou espécies de animais silvestres distintas de diferentes mesoregiões do Estado, encontrando 20% de soropositividade, demonstrando a



exposição dos animais ao *P. brasiliensis* (ALBANO et al., 2014). Estudo semelhante realizado com 200 equinos Puro Sangue Inglês, com até dois anos idade da mesoregião sudoeste do Rio Grande do Sul, revelou positividade de 12%, apresentando anticorpos anti-gp43 do fungo (ALBANO et al., no prelo). Os resultados obtidos pelos autores demonstram que mesmo com invernos rigorosos, incluindo frequentemente temperaturas abaixo de zero o fungo pode ser encontrado no sul do Brasil, aliado a isso não há registros de trabalhos avaliando a exposição de cães ao agente nessa região. Os caninos possuem um contato amplo com o solo, esse fator pode contribuir para entendimento da transmissão, ecologia e epidemiologia do *P. brasiliensis*. Embora raros casos de PCM em cães tenham sido descritos na literatura, a presença do fungo na região alerta para possibilidade da ocorrência da enfermidade nesses animais, sugerindo diagnóstico diferencial na clínica de pequenos animais. Em adição, o fato do convívio entre humanos e cães ser cada vez mais estrito justifica a realização do presente trabalho.

### **3 Objetivos**

#### **3.1 Objetivo geral**

Pesquisar a infecção por *P. brasiliensis* em cães domésticos na região sul do Rio Grande do Sul – Brasil, com finalidade de compreender a ecologia e biologia do fungo na região.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Avaliar a presença de anticorpos IgG específicos contra *P. brasiliensis* nos soros de cães domésticos provenientes de áreas urbanas das cidades de Pelotas e Capão do Leão, RS;

Determinar através da soropositividade canina a presença do patógeno nos diferentes bairros do município de Pelotas/ RS;

Avaliar a relação entre raça, gênero e idade dos animais com a soropositividade;

Comparar o uso de dois distintos conjugados na técnica de ELISA indireto para detecção dos anticorpos contra *P. brasiliensis*;

**4 Artigo**

**INVESTIGAÇÃO SOROLÓGICA DA INFECÇÃO POR *Paracoccidioides brasiliensis* EM CANINOS NO SUL RIO GRANDE DO SUL, BRASIL**

**Alessandra Jacomelli Teles; Gabriel Baracy Klafke; Ângela Leitzke Cabana;  
Ana Paula Neuschrack Albano; Melissa Orzechowski Xavier; Mário Carlos  
Araújo Meireles**

**Irà ser submetido à revista Medical Mycology**

**INVESTIGAÇÃO SOROLÓGICA DA INFECÇÃO POR *Paracoccidioides brasiliensis*  
EM CANINOS NO SUL DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL**

Short title: **INFECÇÃO POR *Paracoccidioides brasiliensis* EM CANINOS NO SUL DO  
BRASIL**

ALESSANDRA JACOMELLI TELES<sup>1</sup>; GABRIEL BARACY KLAFKE<sup>2</sup>; ÂNGELA  
LEITZKE CABANA<sup>1</sup>; ANA PAULA NEUSHRANK ALBANO<sup>1</sup>; MELISSA  
ORZECOWSKI XAVIER<sup>2</sup>; MÁRIO CARLOS ARAÚJO MEIRELES<sup>1</sup>

<sup>1</sup>MICVET - Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária, Departamento de  
Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas – UFPel,  
RS, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Micologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande –  
FURG, RS, Brasil.

**Autor para correspondência:**

**Alessandra Jacomelli Teles**

ale.teles@gmail.com

Rua Barão de Santa Tecla, 1090/402. Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. CEP: 96010-140.

Fone: (+55) 53-32757140/81286632

**Palavras-chave:** sorologia, paracoccidioidomicose, cães, micose, ELISA, gp43

## RESUMO

*Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo dimórfico e principal causador da Paracoccidioidomicose, micose sistêmica endêmica no Brasil. No sul do país há um aumento do número de casos em humanos a partir da década de 90. Em vista de determinar áreas com presença do agente, este estudo teve como objetivo investigar a infecção por *P. brasiliensis* em cães no extremo sul do Brasil e comparar dois conjugados diferentes para detecção de anticorpos contra o fungo nos caninos. Para detecção de anticorpos anti-gp43 de *P. brasiliensis* em soro de cães domésticos foi realizada a técnica de ELISA indireto. Foram incluídos 196 caninos errantes e semidomiciliados dos municípios de Pelotas e Capão do Leão, Rio Grande do Sul. No imunoensaio foram testados e comparados os conjugados anti-IgG de cão e proteína G-peroxidase. A infecção fúngica foi detectada em 58 animais (29,6%), sem diferença significativa quanto ao sexo, idade e raça dos cães. Foram detectados animais soropositivos procedentes de todos os bairros do Distrito Sede de Pelotas, bem como do município vizinho Capão do Leão. A proteína G-peroxidase apresentou baixa sensibilidade e ocorrência de falsos negativos em relação ao conjugado específico. A detecção de anticorpos específicos nos cães comprova a presença e ampla distribuição de *P. brasiliensis* nas cidades de Pelotas e Capão do Leão, e alerta para possibilidade da PCM em indivíduos suscetíveis, bem como a ocorrência da doença em pequenos animais nesta região.

## INTRODUÇÃO

O fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* é o principal agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica de caráter geralmente crônico. A inalação dos propágulos fúngicos é a provável forma de infecção<sup>1</sup>, e a enfermidade é endêmica e restrita a América Latina, sendo o maior número de casos reportados no Brasil<sup>2</sup>.

A PCM acomete principalmente trabalhadores rurais do sexo masculino, muitas vezes levando-os a incapacidade de exercer suas atividades. As manifestações clínicas estão relacionadas às lesões granulomatosas frequentemente observadas nos pulmões, linfonodos, baço, fígado, pele e mucosas<sup>3</sup>.

Sugere-se que o *P. brasiliensis* é sapróbio do solo, embora existam muitas pesquisas sobre o habitat deste fungo, este não está totalmente esclarecido devido à dificuldade de isolamento a partir de amostras ambientais<sup>4</sup>. Na tentativa de driblar essa dificuldade, diversos estudos têm avaliado a reatividade de animais domésticos e silvestres frente ao patógeno, como uma forma de auxílio na elucidação de aspectos eco-epidemiológicos do micro-organismo<sup>5,6</sup>.

A infecção pelo *P. brasiliensis* em caninos tem sido investigada em diferentes regiões do Brasil, demonstrando significativa positividade, possivelmente pelo hábito destes animais de farejar e cavar o solo, contribuindo para entendimento da transmissão, ecologia e epidemiologia do fungo<sup>7, 8, 9, 10</sup>. Assim como em humanos os animais podem se infectar e desenvolver sintomas da PCM, já tendo sido relatados casos da enfermidade em cães<sup>11,12</sup>.

Os dados sobre a ecologia do *P. brasiliensis* no Rio Grande do Sul são limitados, mesmo sendo este estado considerado endêmico para PCM. Estudos recentes evidenciaram a exposição de animais silvestres e de equinos ao *P. brasiliensis* no sul do estado<sup>6,13</sup>. No entanto, dados mais específicos da presença do fungo em áreas urbanas nesta região não são descritos. Tendo em vista que a PCM vem sendo diagnosticada em humanos no município de Pelotas desde os anos 60, com aumento do número de casos a partir da década de 90<sup>14</sup>, este estudo buscou investigar a infecção por *P. brasiliensis* em cães domésticos de áreas urbanas procedentes de distintos bairros do município de Pelotas e da cidade vizinha, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, no intuito de avaliar a presença do fungo nestes locais, bem como comparar dois conjugados distintos na técnica de ELISA indireto utilizada.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Área de estudo**

O estudo foi realizado nos municípios de Pelotas e Capão do Leão, localizados na região sul do Rio Grande do Sul, Brasil. Estas cidades vizinhas caracterizam-se por clima subtropical úmido, temperatura média anual de 17,5 °C, com verões tépidos em que as temperaturas máximas situam-se entre 34 e 36 °C, e invernos com geadas, nevoeiros e temperatura mínima próxima a zero °C, pluviosidade média anual de 1.379 mm e umidade relativa de cerca de 80%<sup>15, 16</sup>. Pelotas possui cerca de 330 mil habitantes e a zona urbana do município denominada Distrito Sede é dividida em sete bairros ou regiões administrativas<sup>17</sup>. Capão do Leão emancipou-se de Pelotas em 1983 e atualmente a população é de 24,3 mil habitantes<sup>18</sup>.

### **Animais incluídos**

Foram incluídos 196 cães participantes de um programa de controle populacional, errantes e semidomiciliados, procedentes da cidade de Pelotas e Capão do Leão. Todos foram submetidos à coleta de sangue periférico por punção de veia cefálica ou jugular, e as amostras foram mantidas em tubos sem anticoagulante sob refrigeração até processamento em laboratório para separação do soro, sendo estes armazenados a -20 °C até a análise sorológica. Os procedimentos foram desenvolvidos de acordo com os princípios éticos e o projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas – UFPel (CEEA 9930-2014) - (Anexo A).

### **Variáveis avaliadas**

De todos os animais incluídos foram coletados dados referentes ao sexo (macho/fêmea); idade (jovem: < 1,5 anos / adulto > 1,5 anos); raça e procedência (município/bairro) para posterior análise.

### **Teste sorológico**

Para detecção de anticorpos anti-gp43 de *P. brasiliensis* em soro de cães domésticos foi realizada a técnica de ELISA indireto de acordo com o descrito previamente por Albano<sup>6</sup> com modificações. A molécula de gp-43 utilizada como antígeno foi cedida pela Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). A obtenção do exoantígeno foi extraído do isolado de *P. brasiliensis* B-339<sup>19</sup>. A partir do exoantígeno foi purificada a molécula gp43 por cromatografia de afinidade<sup>20</sup> e sua concentração foi determinada pelo método de Bradford<sup>21</sup>.

Microplacas de poliestileno de 96 cavidades (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil) foram sensibilizadas com 100µL/poço do antígeno gp43 de *P. brasiliensis* na concentração de 2,6 µg/ml em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6) e incubadas *overnight* (18 horas) a 4°C.

Posteriormente as placas foram bloqueadas com 100  $\mu$ L/poço de PBS-leite 5% (leite desnatado diluído em PBS 1X - Tampão fosfato salino) e incubadas a 37° C por uma hora. Em seguida, foram adicionados os soros sanguíneos diluídos a 1:50 em PBS no volume de 100 $\mu$ L/poço, e as microplacas foram incubadas durante uma hora a 37°C. Na etapa seguinte adicionou-se 100  $\mu$ L/poço do conjugado e a placa foi novamente incubada na temperatura de 37°C por uma hora. A revelação foi feita com 100  $\mu$ L/poço de solução contendo peróxido de hidrogênio e orto-fenilendiamina (OPD) (Sigma, USA) em tampão citrato-fosfato (pH 4) e incubação no escuro por dez minutos. Na sequência a reação foi interrompida pela adição de 100  $\mu$ L/poço de ácido sulfúrico 3M, e a absorbância (DO – Densidade Óptica) foi determinada em leitor de microplacas (THERMO PLATE<sup>®</sup>) utilizando filtro de 450 nm.

Entre todas as etapas do teste, após a incubação foi realizada a lavagem da microplaca com 300  $\mu$ L/poço de solução salina tamponada com fosfato adicionado de 0,5% de Tween 20 (PBS-T), por cinco vezes.

Foram utilizados dois conjugados distintos, proteína G-peroxidase isolada de *Streptococcus* sp. (Sigma, USA), diluída a 1:10.000, e imunoglobulina de coelho anti-IgG de cão conjugada à peroxidase (Sigma, USA) na diluição 1:12.000. Todos os soros foram testados em triplicata e submetidos duas vezes ao ensaio para comparação da presença de anticorpos contra *P. brasiliensis* frente aos diferentes conjugados. No teste com proteína G utilizou-se como controle positivo soro disponível comercialmente (Immuno Mycologics, Inc. Immy - DO entre 0,868 e 0,558) e, como controle negativo, foi utilizado um *pool* de soros caninos previamente testados (DO variando entre 0,052 e 0,118), todos diluídos igualmente a 1:50 em PBS. No ensaio com conjugado anti-IgG canina utilizou-se soros de cães anteriormente testados como controle positivo (DO entre 0,837 e 0,670) e negativo (DO variando entre 0,137 e 0,156).

### **Análise de dados**

Foi construído um banco de dados com as informações dos animais, quanto a sexo, idade, raça, procedência e as médias das DOs detectadas nos ensaios imunoenzimáticos. As amostras que apresentaram absorbância ao menos duas vezes superior à média do controle negativo foram consideradas positivas. As amostras positivas foram avaliadas quanto à intensidade da positividade sendo classificadas em fracamente positivas quando o valor da DO foi de duas a três vezes o valor do controle negativo; moderadamente positiva, de três a quatro vezes o valor do controle negativo; e fortemente positiva, acima de quatro vezes o valor do controle negativo.



Os resultados foram analisados por meio do teste do qui-quadrado para variáveis categóricas. A concordância entre os conjugados utilizados no teste sorológico foi determinada pelo índice de Kappa e interpretada de acordo com Shrout<sup>22</sup>, considerando  $k < 0,1$ , ausente;  $k = 0,10 - 0,40$ , fraca;  $k = 0,41 - 0,60$ , discreta;  $k = 0,61 - 0,80$ , moderada; e  $k = 0,81 - 1,00$ , substancial. Os dados foram analisados utilizando o SPSS Statitics v. 20.0 (IBM<sup>®</sup>) e *P-valores* inferiores a 0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Em adição, foi calculada a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da proteína-G peroxidase considerando o conjugado específico como padrão-ouro.

## RESULTADOS

Dos 196 cães avaliados 167 (85,2%) eram fêmeas, 179 (91,3%) adultos e 161 (82,1%) sem raça definida. Os 35 animais de raça definida pertenciam a 18 raças distintas, com maior representatividade da raça Pastor Alemão ( $n=5$ ), e Poodle e Dachshund com quatro exemplares cada. Quanto à origem, foram testados cães procedentes de todos os bairros do município de Pelotas, sendo os principais Três Vendas e Fragata, ambos com 58 animais (correspondendo a 29,6% da população de Pelotas cada). Em adição foram incluídos 15 caninos do município vizinho, Capão do Leão (Figura 1).

A infecção por *P. brasiliensis* foi detectada em 58 caninos (29,6%), e a soropositividade não diferiu em relação ao sexo, idade e raça dos animais estudados ( $P > 0,05$ ) (Tabela 1). Por outro lado, embora tenha sido detectada uma diferença significativa de taxa de soropositividade em relação à procedência, todas as regiões avaliadas da cidade de Pelotas apresentaram animais positivos. Nos bairros Laranjal e Fragata 46,2% e 44,8% dos cães foram soropositivos, respectivamente, enquanto que nas outras localidades a taxa variou de zero a 25,9% ( $P = 0,007$ ). No município do Capão do Leão a soropositividade foi de 20% (Figura 1).

Dos 58 animais positivos no ensaio imunoenzimático com o conjugado específico para cães somente seis (10,3%) foram considerados positivos no teste quando utilizada a proteína G-peroxidase como conjugado, resultando em fraca concordância (Kappa= 0,140;  $P < 0,001$ ). Todos os soros caninos detectados pela proteína G-peroxidase foram classificados como de intensidade moderada e/ou fortemente positiva no teste com anti-IgG canina (Tabela 2). O teste com Proteína G apresentou sensibilidade de 10,3% e 100% de especificidade, e o valor preditivo positivo foi de 100% e valor preditivo negativo de 72,6%.

## DISCUSSÃO

O presente estudo fornece dados sobre a exposição de caninos domésticos ao fungo *P. brasiliensis* no extremo sul do Brasil, sendo a soropositividade observada de 29,6%, demonstrando a presença do agente nas cidades de Pelotas e Capão do Leão. Embora diversos trabalhos tenham investigado essa infecção fúngica em cães, sua grande maioria avalia animais de áreas rurais<sup>23</sup>, sendo o diferencial deste a inclusão de cães urbanos. Estudo semelhante realizado por Corte et al.<sup>10</sup> também abordou caninos de áreas urbanas, em Rondônia, na Amazônia Ocidental Brasileira, evidenciando soropositividade de 54,8%, superior a observada em nossa análise. Soropositividade superior a do presente estudo também foi relatada por Fontana et al.<sup>9</sup> em Uberaba, Minas Gerais, sendo de 53,6% na população canina urbana e 80,5% na rural. Por outro lado, ainda que a positividade tenha sido elevada em cães de zona rural (89,5%) e periférica (48,8%) no norte do Estado do Paraná, descrita por Ono et al.<sup>7</sup>, apenas 14,8% dos caninos de zona urbana apresentaram anticorpos para *P. brasiliensis*, correspondendo a praticamente metade da taxa de soropositividade encontrada em nosso estudo. Ressalta-se ainda que o estudo realizado por Ono et al.<sup>7</sup> é o único com cães na região sul do Brasil, demonstrando a escassez de dados nessa parte do país e a importância do presente trabalho que aborda caninos do extremo sul do Brasil.

A PCM é endêmica no Rio Grande do Sul e, na região de Pelotas há um crescimento do número de casos da micose em humanos nas últimas décadas, porém, considerando o extenso período de latência que a enfermidade pode apresentar, existe a possibilidade de se tratarem de casos alóctones<sup>14</sup>. Portanto, o resultado obtido neste trabalho é de extrema importância no que tange a população humana e animal, visto que ambos podem se infectar e desenvolver sintomas da micose. Até o presente momento os dados sobre a presença do patógeno no sul do Rio Grande do Sul foram atestados somente pela infecção em animais silvestres e equinos<sup>6,13</sup>, espécies com menor convivência com humanos quando comparado aos cães. Ressalta-se a relevância da espécie canina estudada que além de conviver estritamente com humanos, não possui hábitos migratórios, confirmando a existência do fungo na área urbana dos municípios de Pelotas e Capão do Leão.

A soropositividade não foi influenciada pelo sexo, raça e idade dos caninos avaliados, isso se deve ao fato de que todos esses estão em contato com o ambiente e têm os mesmos hábitos típicos da espécie como farejar e cavar o solo, podendo igualmente entrar em contato com o fungo e se infectar por inalarem seus propágulos. Pesquisas anteriores também não observaram diferença significativa em relação a essas variáveis, como demonstrado em

outros estudos com cães<sup>8,9</sup> e em distintas espécies como felinos, equinos, suínos e animais silvestres<sup>6,24, 25, 26</sup>.

Pode-se constatar que todos os bairros avaliados da cidade de Pelotas e o município de Capão do Leão apresentaram cães reagentes ao antígeno gp43, demonstrando a ampla distribuição do fungo nestes municípios. Nos bairros Laranjal e Fragata quase metade dos cães oriundos dessas localidades reagiram positivamente no imunoensaio. Embora esses dois bairros localizem-se na zona urbana de Pelotas muitas áreas apresentam uma carência de serviços urbanos básicos, como saneamento e pavimentação de rua, tendo apenas algumas vias principais asfaltadas<sup>27</sup>. A falta de pavimentação pode propiciar a exposição direta ao solo e possível contato com o agente da PCM, por esse motivo sugere-se que locais com infraestrutura urbana deficiente possam favorecer a manutenção no ambiente e possível contato dos hospedeiros ao *P. brasiliensis*.

O bairro Laranjal recebeu esse nome principalmente devido ao terreno arenoso propício à produção e cultivos de cítricos e caracteriza-se por ser uma Zona de Proteção Legal, por apresentar paisagens de dunas, banhados e matas nativas, além de ser banhado pela Lagoa dos Patos, maior laguna do Brasil e a segunda maior de toda a América do Sul<sup>27</sup>. Dos 13 cães provindos do Laranjal, seis apresentaram anticorpos anti-gp43 de *P. brasiliensis*, esse fato aliado as características geográficas do local sugerem que esse seja um habitat propício para o fungo. De fato, locais descritos na literatura como favoráveis para o desenvolvimento e manutenção do *P. brasiliensis* no ambiente, caracterizam-se por temperaturas variando entre 17 e 24°C, áreas de alta pluviosidade e umidade, abundante vegetação e próximo a cursos de águas<sup>28</sup>. Em adição, estudos experimentais demonstraram que o *P. brasiliensis* pode crescer e produzir conídios infecciosos em solo arenoso e argiloso, contendo alto teor de água e que tenham a presença de animais silvestres<sup>29</sup>.

Em relação aos ensaios imunoenzimáticos observou-se fraco grau de concordância entre os testes com os conjugados distintos. A sensibilidade da proteína G-peroxidase foi extremamente baixa (10,3%), demonstrando que este conjugado necessita de elevada quantidade de anticorpos para ser detectado pelo imunoensaio, visto que identificou somente cães moderadamente ou fortemente positivos no ensaio com anti-IgG específica. Nas condições desse estudo, o valor preditivo negativo do teste com proteína G-peroxidase indica a ocorrência de falso-negativos (27,4%), constatando que esse não é confiável para excluir a possibilidade de infecção, não sendo uma alternativa viável para realização do ensaio de ELISA na espécie canina. Albano et al.<sup>13</sup> utilizando esse conjugado encontrou 12% de soropositividade em equinos no sudoeste do RS, enquanto que na pesquisa realizada por

Silveira et al.<sup>30</sup> no Mato Grosso do Sul, 17,5% dos bovinos foram positivos. No estudo de Albano et al.<sup>6</sup> com diferentes espécies de animais silvestres a proteína G-peroxidase apresentou resultados inferiores quando comparada ao outro conjugado testado, proteína A-peroxidase, embora a detecção de anticorpos anti-gp43 pelo segundo conjugado tenha sido mais ampla, três animais foram identificados somente pela proteína G-peroxidase. Assim, a proteína G-peroxidase pode ser uma opção acessível para realizar testes com animais em que o conjugado espécie-específico seja indisponível.

O teste de ELISA realizado com anticorpo secundário específico oferece maior confiabilidade ao resultado, pois o mesmo tem a capacidade de detectar anticorpos próprios da espécie em interesse. Corroborando com os dados do presente estudo, outros autores, em investigações sorológicas da infecção por *P. brasiliensis* em cães utilizando anti-IgG canina-peroxidase encontraram níveis altos de positividade<sup>7, 8, 9, 10</sup>.

Conclui-se que *P. brasiliensis* está amplamente distribuído na área urbana da cidade de Pelotas e no município de Capão do Leão. A presença do fungo na região, comprovada pela infecção em cães, serve de alerta para ocorrência da PCM em indivíduos suscetíveis, visto haver necessidade de diagnóstico precoce desta enfermidade para minimizar o impacto que a mesma apresenta em humanos, com significativa mortalidade e alto poder incapacitante dos pacientes<sup>1, 2</sup>. Apesar dos casos de PCM serem raros em caninos, a evidência da exposição destes animais ao fungo salienta que esta doença também deve ser considerada como diagnóstico diferencial na clínica de pequenos animais nesta região.

#### **AGRADECIMENTOS**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul. Ao Prof. Dr. Zoilo Pires de Camargo da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) por fornecer o exoantígeno para execução desse estudo. À ONG SOS Animais por permitir a coleta sanguínea dos caninos desse experimento.

#### **CONFLITO DE INTERESSES**

Os autores declaram não existir conflitos de interesse.

## REFERÊNCIAS

- 1- RESTREPO A, TOBÓN A, AGUDELO C. Paracoccidioidomycosis. In: Hospenthal DR, Rinaldi MG, editors. *Diagnosis and Treatment of Human Mycoses*. Totowa, NJ: Humana Press, 2008: 331–342.
- 2- COUTINHO ZF, SILVA D, LAZÉRA M, et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saude Publica*. 2002; 18(5): 1441-54.
- 3- SHIKANAI-YASUDA MA, TELLES FILHO FQ, MENDES RP, COLOMBO AL, MORETTI ML. Guidelines in paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006; 39(3): 297-310.
- 4- BAGAGLI E, BOSCO SMG. Armadillos and dimorphic pathogenic fungi: Ecological and evolutionary aspects. In *The biology of the Xenarthra* University Press of Florida, Gainesville, 2008: 103-110.
- 5- RICHINI-PEREIRA VB, BOSCO SMG, GRIESE J, et al. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in road-killed wild animals. *Med Mycol*. 2008; 46(1):. 35-40.
- 6- ALBANO AP, KLAFKE GB, BRANDOLT TM, et al. Wild animals as sentinels of *Paracoccidioides brasiliensis* in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mycopathologia*. 2014; 177(3-4):. 207-15.
- 7- ONO MA, BRACARENSE APFRL, MORAIS HSA, TRAPP SM, BELITARDO DR, CAMARGO ZP. Canine paracoccidioidomycosis: a seroepidemiologic study. *Med Mycol*. 2001; 39(3):. 277-282.
- 8- SILVEIRA IH, DOMINGOS K, KOUCHI EM, et al. Serological detection of antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* in dogs with leishmaniasis. *Mycopathologia*. 2006; 162: 325–329.
- 9- 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.
- 10- CORTE AC, GENNARI SM, LABRUNA MB, et al. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in dogs from Western Brazilian Amazon. *Pesqui. Vet. Bras*. 2012; 32(7): 649-652.
- 11- RICCI G, MOTA FT, WAKAMATSU A, SERAFIM RC, FRANCO M. Canine paracoccidioidomycosis. *Med Mycol*. 2004; 42: 379-383.
- 12- FARIAS MR, CONDAS LAZ, RIBEIRO MG, et al. Paracoccidioidomycosis in a dog: Case report of generalized lymphadenomegaly. *Mycopathologia*. 2011; 172: 147-152.

- 13- ALBANO AP, KLAFKE GB, BRANDOLT TM, et al. Seroepidemiology of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in horses of Rio Grande do Sul, Brazil. *Braz J Microbiol.* (in press).
- 14- SOUZA SP; JORGE VM, XAVIER MO. Paracoccidioidomycosis in southern Rio Grande do Sul: A retrospective study of histopathologically diagnosed cases. *Braz J Microbiol.* 2014; 45 (1): 243-247
- 15- Dados oficiais sobre temperaturas e pluviosidade do Centro de Pesquisas e Previsões Meteorológicas da Universidade Federal de Pelotas (CPPMet- UFPel)
- 16- ROSA, Mario. *Geografia de Pelotas*. Pelotas: Ed. UFPel, 1985.
- 17- CAMARA MUNICIPAL DE PELOTAS. *Lei Ordinária nº 5490 de 24 de julho de 2008*. Dispõe sobre a delimitação dos distritos do município de Pelotas e das regiões administrativas do seu distrito sede (zona urbana), e dá outras providências. Disponível em: <http://camara-municipal-de-pelotas.jusbrasil.com.br/legislacao/484949/lei-5490-08>. Acesso em: 20 dez. 2014.
- 18- IBGE, Disponível em: <<http://cod.ibge.gov.br/5IOQ>> <<http://cod.ibge.gov.br/DB6>> Acesso em: 20 jan. 2015.
- 19- CAMARGO ZP, UNTERKIRCHER C, CAMPOY SP, TRAVASSOS LR. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion test. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 2147–2151.
- 20- 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.
- 21- 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.
- 22- SHROUT P. Measurement reliability and agreement in psychiatry. *Statist. Meth. Med. Res.* 1998; 7:301-317.
- 23- FAGUNDES, R. Q.; ARAÚJO JÚNIOR., J. P.; MODOLO, R.; BAGAGLI, E. Serological detection of Paracoccidioidomycosis in dogs from the endemic area of Botucatu-SP, Brazil. *Annual Review of Biomedical Sciences*, Pirenópolis-GO, 2002.
- 24- BELITARDO DR, CALEFI AS, BORGES IK, et al. Detection of antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* in free-range domestic pigs (*Sus scrofa*). *Mycopathologia*. 2014; 177(1-2): 91-95.

- 25- OLIVEIRA GG, BALITARDO DR, BALARIN MRS, FREIRE RL, CAMARGO ZP, ONO MA. Serological survey of paracoccidioidomycosis in cats. *Mycopathologia*. 2013; 176 (3-4): 299-302.
- 26- CORTE AC, ITANO EN, FREIRE RL, CAMARGO ZP, ONO MA. Detecção de anticorpos para *Paracoccidioides brasiliensis* em cavalos da região norte do Estado do Paraná. *Semina: Ciências Agrárias*. 2009; 30(2): 441-446.
- 27- NEBEL GCS. Conflitos Ambientais No Pontal Da Barra - Pelotas/RS - Desde Uma Perspectiva Etnográfica Na Educação Ambiental. Dissertação de Mestrado em Educação Ambiental da Universidade Federal do Rio Grande, de 2014.
- 28- RESTREPO A, MCEWEN JG, CASTAÑEDA E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol*. 2001; 39: 233-241.
- 29- TERÇARIOLI GR, BAGAGLI E, REIS GM, et al. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* In soil: growth ability, conidia production and molecular detection. *BMC Microbiol*. 2007; 7: 92.
- 30- SILVEIRA LH, PAES RCS, MEDEIROS EV, ITANO EN, CAMARGO ZP, ONO MA. Occurrence of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis* in dairy cattle from Mato Grosso do Sul, Brazil. *Mycopathologia*. 2008; 165: 367-371.

Tabela 1: Soropositividade para IgG anti-gp43 de *Paracoccidioides brasiliensis* em caninos dos municípios de Pelotas e Capão do Leão-RS, utilizando o teste de ELISA indireto, de acordo com as variáveis estudadas

Variáveis		Positivos ELISA		Valores de <i>P</i>
		n / Total	%	
Sexo	Macho	5/29	17,2	0,114
	Fêmea	53/167	31,7	
Idade	Jovem (< 1,5 anos)	6/17	35,3	0,590
	Adulto (>1,5 anos)	52/179	29,1	
Raça	Sem raça definida	45/161	28,0	0,280
	Raça definida	13/35	37,1	



Tabela 2: Comparação dos resultados do teste de ELISA para detecção de IgG anti-*P.brasiliensis* em cães entre os distintos conjugados utilizados (Anti-IgG canina e Proteína G-peroxidase)

Proteína G	Anti-Ig G canina				Total n (%)
	Negativo (n)	Fracamente positivo (n)	Moderadamente positivo (n)	Fortemente positivo (n)	
Negativo	138	44	5	3	190 (96,9%)
Positivo	0	0	2	4	6 (3,1%)
Total n (%)	138 (70,4%)	44 (22,4%)	7 (3,6%)	7 (3,6%)	196 (100%)

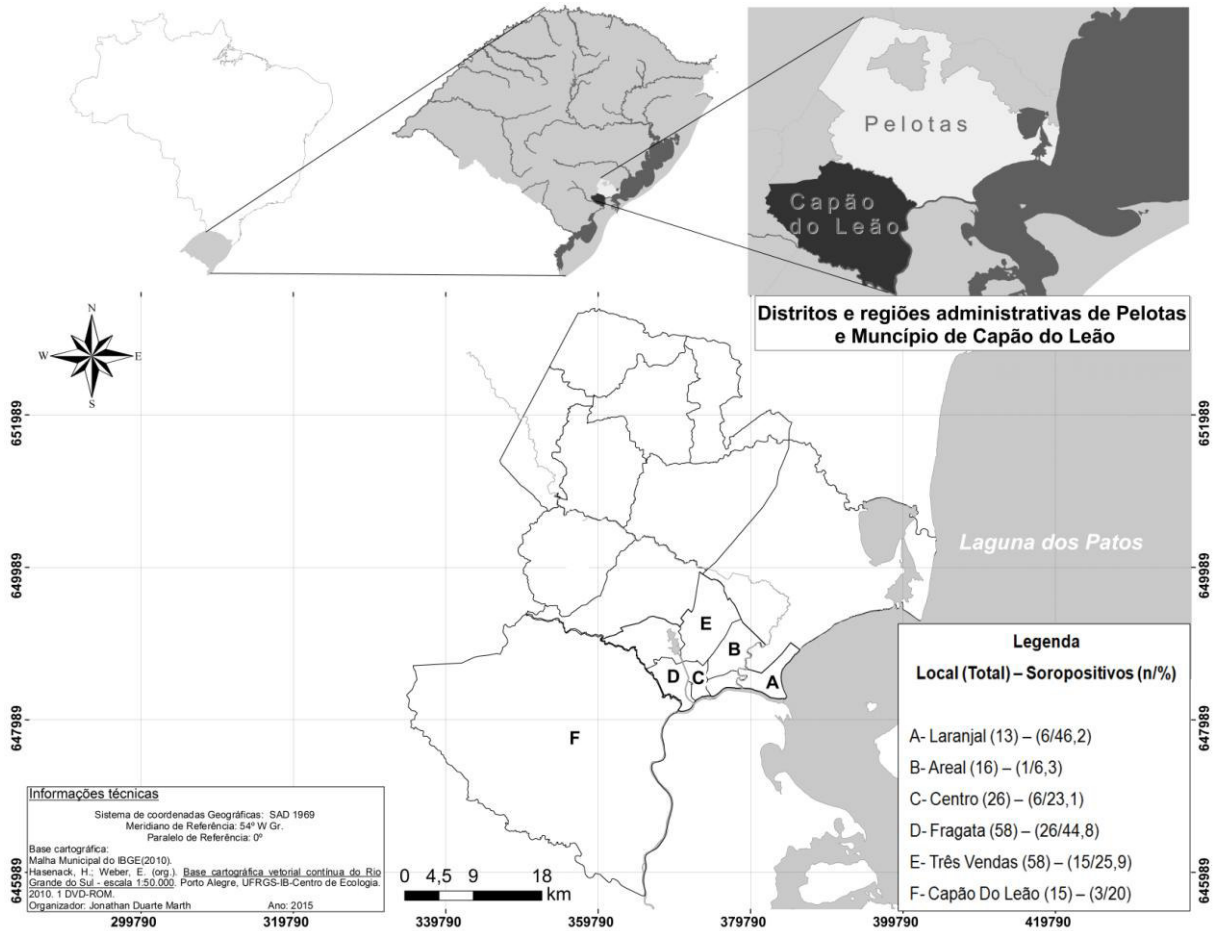


Figura 1: Procedência dos caninos avaliados e soropositivos para IgG anti-gp43 de *Paracoccidioides brasiliensis* no teste de ELISA.

## 5 Considerações Finais

O fungo *P. brasiliensis* está presente no sul do Rio Grande do Sul, comprovado pela infecção fúngica detectada em caninos domésticos dessa região.

Anticorpos IgG específicos contra *P. brasiliensis* foram detectados em cães dos municípios de Pelotas e Capão do Leão/RS, comprovando a exposição dos animais ao agente.

O patógeno está amplamente distribuído em Pelotas e Capão do Leão, com maior ocorrência nos bairros Laranjal e Fragata do município de Pelotas/ RS;

A soropositividade não foi influenciada pelo sexo, raça e idade dos caninos avaliados, constatando que todos os animais podem igualmente entrar em contato com o fungo e se infectar.

Os testes de ELISA com os conjugados distintos apresentaram fraco grau de concordância, sendo que o anti-Ig G canina-peroxidase oferece maior confiabilidade ao resultado. A proteína G-peroxidase necessita de elevada quantidade de anticorpos para positivar um teste de imunoensaio e culmina com resultados falso-negativos, constatando que esse conjugado não é uma alternativa viável para realização do ensaio de ELISA na espécie canina, pois não é confiável para excluir a possibilidade de infecção.

## Referências

ALBANO, A.P.; KLAFKE, G.B.; BRANDOLT, T.M.; DA HORA, V.P.; MINELLO, L.F.; JORGE, S. SANTOS, E.O.; BEHLING, G.M. CAMARGO, Z.P.; XAVIER, M.O.; MEIRELES, M.C. Wild animals as sentinels of *Paracoccidioides brasiliensis* in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Mycopathologia**, v. 177, n.3-4, p. 207-15, 2014.

ALBANO, A.P; KLAFKE, G.B. ; BRANDOLT, T. M. ; HORA, V. P. ; NOGUEIRA, C. E. W. ; XAVIER, M. O. ; MEIRELES, M. C. A. Seroepidemiology of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in horses of Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, (no prelo).

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, 2008. p.103-110.

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

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.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clinical Microbiology Reviews**; 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. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 27, p. 14-19, 2010.

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.; CASTA-O, J. H.; PERALTA, L. A.; D'EZ, S.; ARANGO, M.; McEWEN, J.; RESTREPO, A. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in na endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. **Revista Iberoamericana de Micologia**, Barcelona, v.16, p.216-220, 1999.

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.

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.; 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. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 7, p. 649-652, 2012.

COSTA, E. O.; DINIZ, L. S.; FAVA NETTO, C.; ARRUDA, C.; DAGLI, M. L. Delayed hypersensitivity test with paracoccidioidin in captive Latin American wild mammals. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, Oxfordshire, 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.

FAGUNDES, R. Q.; ARAÚJO JÚNIOR., J. P.; MODOLO, R.; BAGAGLI, E. Serological detection of Paracoccidioidomycosis in dogs from the endemic area of Botucatu-SP, Brazil. **Annual Review of Biomedical Sciences**, Pirenópolis-GO, 2002.

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.

FONTANA, F.F.; SANTOS, C.T.B.; ESTEVES, F.M.; ROCHA, A.; FERNANDES, G.F.; AMARAL, C.C.; DOMINGUES, M.A.; CAMARGO, Z.P.; SILVAVERGARA, M.L. Seroepidemiological survey of paracoccidioidomycosis Infection among urban and

rural dogs from Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Mycopathologia**. v. 169, p.159-165, 2010.

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**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 2, p. 129-133, 1987.

FUTUYAMA, D.J. **Biologia Evolutiva**. 2 ed. Ribeirão Preto. Funpec, 2002, 117p.  
FERREIRA, J. B. Soroepidemiologia de paracoccidioidomicose em caprinos do município de Pitanga, Paraná. 2009. 36 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) Centro de Ciências Biológicas Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

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

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.  
MARQUES, S.A. Paracoccidioidomicose: centenário do primeiro relato de caso. **An Bras Dermatol**.v.83, n.3, p.271-273, 2008.

MARTINEZ, R. Paracoccidioidomicose (Blastomycose Sul-americana). In: FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. 3ª. ed., São Paulo: Editora Atheneu, 2005. cap. 84.1, 1371-1373.

MATUTE, D.R., McEWEEN, J.G., MONTES, B.A, SAN-BLAS, G., BAGAGLI, E., RAUSCHER, J.T., RESTREPO, A., MORAIS, F., NINO-VEJA, G., TAYLOR, J.W. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Molecular Biology and Evolution**, 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.

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

NAIFF, R.D.; FERREIRA, L.C.L.; BARRET, T.V.; NAIF, M.F.; ARIAS, J.R. Paracoccidioidomycose enzoótica em tatus (*Dasybus novemcinctus*) no estado do Pará. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 28, p. 19-27, 1986.

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(1), p. 63-8, 2012.

OLIVEIRA, G.G.; BALITARDO, D.R.; BALARIN, M.R.S.; FREIRE, R.L.; CAMARGO, Z.P.; ONO, M.A. Serological survey of paracoccidioidomycosis in cats. **Mycopathologia**, v. 176 (3-4), p. 299-302, 2013.

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.; 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.

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.; TOBÓN, A.; AGUDELO, C. Paracoccidioidomycosis. In: **Diagnosis and Treatment of Human Mycoses**. Hospenthal DR, Rinaldi MG, editors. Totowa, NJ: Humana Press; p. 331–342, 2008.

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

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.; ZANCOPE-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.

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.

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.

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

SILVA, P. Z.; OLIVEIRA, F. M.; SEVERO, L. C. Paracoccidioidomicose e Gastrectomia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 747-9, nov/dez, 2003.

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.

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

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.

SOUZA, S.P.; JORGE, V.M.; XAVIER, M.O. Paracoccidioidomycosis in southern Rio Grande do Sul: A retrospective study of histopathologically diagnosed cases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.45, n.1, p. 243-247, 2014.

TEIXEIRA, M.M.; THEODORO, R.C.; OLIVEIRA, F.F.; MACHADO, G.C.; HAHN, R.C.; BAGAGLI, E.; SAN BLAS; G.; FELIPE, M.S. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. **Medical Mycology**, v. 52, p.19–28, 2013.



TEIXEIRA, M.M.; THEODORO, R.C.; CARVALHO, M.J.; FERNANDES, L.; PAES, H.C.; HAHN, R.C.; MENDOZA, L.; BAGAGLI, E.; SAN BLAS, G.; FELIPE, M.S. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 52, p. 273–283, 2009.

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. Journal of Comparative Pathology**, v. 144, p. 231-234, 2011.

UNTEREINER, W.A, SCOTT, J.A., NAVEAU, F.A., SIGLER, L., BACHEWISH, J., ANGUS, A. The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associate Onygenales. **Mycologia**, v.96, n.4, p.812-21, 2004.

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

## **Apêndices**

## Apêndice A

Artigo publicado na revista *Science and Animal Health*  
ISSN: 2318-356X V.2 N.1 JAN/JUN 2014 P. 50-66

SCIENCE AND ANIMAL HEALTH  
Faculdade de Veterinária e Programa de Pós-graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas

### HISTOPLAMOSE EM CÃES E GATOS NO BRASIL

TELES, Alessandra Jacomelli<sup>1</sup>; GOMES, Angelita dos Reis<sup>2</sup>; CABANA, Ângela Leitzke<sup>2</sup>; OSÓRIO, Luiza da Gama<sup>3</sup>; MARTINS, Otávia de Almeida<sup>1</sup>; WALLER, Stefanie Bressan<sup>4</sup>; FARIA, Renata Osório de<sup>5</sup>; MEIRELES, Mário Carlos Araújo Meireles<sup>6</sup>.

<sup>1</sup>Mestranda do Programa de Pós graduação em Veterinária da UFPEL, <sup>2</sup>MSc., Doutoranda do Programa de Pós graduação em Veterinária da UFPEL, <sup>3</sup>MSc., Doutoranda do Programa de Pós graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS, <sup>4</sup>Mestranda do Programa de Pós graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS, <sup>5</sup>Dra. Prof. Adjunta de Doenças Infeciosas dos Animais Domésticos da UFPEL, <sup>6</sup>Dr. Prof. Associado de Doenças Infeciosas dos Animais Domésticos da UFPEL.

**Resumo** - A histoplasmose é causada pelo *Histoplasma capsulatum*, um fungo dimórfico, saprófita do solo, endêmico em regiões com elevada umidade e índice pluviométrico. Embora possa estar presente em excrementos de aves e morcegos não configura uma zoonose. Os animais se infectam através da inalação de microconídeos fúngicos e podem desenvolver uma infecção assintomática, pulmonar ou sistêmica. Nos últimos anos observa-se um aumento considerável de relatos de enfermidades causadas por este fungo, acometendo diferentes espécies animais. Considerando-se o potencial patogênico do *H. capsulatum* associado à utilização crescente de terapias imunossupressivas, ao surgimento de infecções retrovirais, à melhor capacidade diagnóstica ao contexto atual da Medicina Veterinária, avalia-se a possível emergência de enfermidades fúngicas. O presente trabalho se propôs a realizar detalhada revisão de literatura, abordando os aspectos clínicos, laboratoriais, epidemiológicos, etiológicos e terapêuticos da histoplasmose, compilando dados sobre a frequência da identificação desse fungo em cães e gatos no Brasil.

**Palavras-chave:** Caninos. Felinos. *Histoplasma* sp. Micose sistêmica.

### INTRODUÇÃO

A histoplasmose é uma doença fúngica sistêmica de caráter clínico agudo ou crônico, que pode resultar em infecção subclínica, pulmonar ou disseminada, acometendo humanos e animais. Esta micose é causada pelo fungo dimórfico saprófita do solo, *Histoplasma capsulatum*, que se apresenta no ambiente sob a forma filamentosa e no organismo do hospedeiro adquire a morfologia leveduriforme (LACAZ et al., 2002).

Atualmente relatos indicam que a histoplasmose é comum em gatos assim como em cães,

contrariando estudos anteriores que apontavam os gatos menos suscetíveis que cães. Sendo que dentre as micoses sistêmicas mais frequentes na clínica de pequenos animais, a histoplasmose é a segunda de maior ocorrência em gatos. A infecção por *H. capsulatum* nestas duas espécies geralmente é subclínica e apresenta uma variedade de manifestações clínicas, muitas vezes com sinais inespecíficos como febre, anorexia, emagrecimento progressivo e letargia (BROMEL; SYKES, 2005; BRILHANTE et al., 2012; COELHO et al., 2010). Diante da escassez de informações sobre esta micose no âmbito da veterinária de pequenos animais e tendo em vista a grande importância desta enfermidade em saúde pública, o objetivo do presente trabalho é uma detalhada revisão de literatura apresentando dados epidemiológicos da histoplasmose em cães e gatos no Brasil.

## **ETIOLOGIA**

*H. capsulatum* está presente em solos úmidos com pH ácido e elevado teor de nitrogênio. Excrementos de aves e de morcegos favorecem seu crescimento, por este motivo pode ser encontrado nos habitats desses animais, como cavernas, minas, árvores ocas, sótãos ou porões de casas, galinheiros, construções abandonadas e áreas rurais (DEUS FILHO et al., 2009).

Na natureza, o *H. capsulatum* apresenta-se na sua morfologia filamentosa. Nesta forma, as colônias apresentam crescimento lento, textura algodoadosa e coloração de anverso branca a creme, tornando-se acastanhadas com o passar do tempo, e reverso incolor ou amarelo acastanhado. Microscopicamente são observadas hifas hialinas septadas ramificadas, com cerca de 1 a 3µm de diâmetro; observam-se macro e microconídios em várias fases de desenvolvimento. Os microconídios podem ser piriformes ou esféricos, medindo de 2 a 4µm de diâmetro. Os macroconídios medem em torno 8 a 15µm de diâmetro, tem parede espessa e inicialmente lisa, apresentando, posteriormente, projeções verrucosas ou digitiformes, conhecidas como macroconídios tuberculados ou estalagmoconídios (KAUFFMAN, 2007).

Na fase parasitária, ou quando incubada à temperatura de 37°C, as colônias são cremosas, lisas, brilhantes e úmidas, e possuem coloração branca, tendendo a escurecer com o tempo. No exame microscópico dessa fase é possível observar pequenas células leveduriformes com cerca de 1 a 5 µm de diâmetro, ovaladas e frequentemente apresentam gemulação única

(FERREIRA; BORGES, 2009).

O fungo é um ascomiceto, que em sua forma sexual é chamado *Emmonsiiella capsulata*. Na forma assexuada, existem três variedades do fungo *H. Capsulatum*: *H. capsulatum* var. *capsulatum*, responsável por causar histoplasmose clássica, a apresentação mais comum da enfermidade. *H. capsulatum* var. *duboisii* e *H. capsulatum* var. *farciminosum* (KAUFFMAN, 2007).

## EPIDEMIOLOGIA

Nas últimas décadas, o fungo *H. capsulatum* tem sido descrito como um patógeno de caráter oportunista em pacientes com distúrbios de imunidade celular, tais como transplantados, doentes imunodeprimidos, pacientes em corticoterapia prolongada e, principalmente, pacientes acometidos com a síndrome da imunodeficiência adquirida (CURY et al., 2001; FERREIRA; BORGES, 2009)

*H. capsulatum* tem distribuição mundial principalmente em regiões de clima tropical e temperado, sendo endêmico no Continente Americano, embora alguns casos isolados de histoplasmose clássica tenham sido relatados na Europa e Ásia (QUIST et al., 2011). A variedade *capsulatum*, responsável pela forma clínica mais comum doença tem maior ocorrência nas Américas. Enquanto as variedades *duboisii* ocorrem nas regiões tropicais da África e *farciminosum* na Europa, África e Ásia, responsável pela linfangite epizootica em equinos e mulas e já tendo sido relatado como agente causador da micose em cães no Japão (UEDA et al., 2003).

Nos EUA a maior prevalência localiza-se entre as bacias dos rios Ohio, Missouri e Mississipi, regiões que apresentam condições climáticas apropriadas para o crescimento desse fungo, como elevadas umidade relativa do ar (67 a 87%) e índice de precipitação pluviométrica, assim como temperatura média entre 20 e 30°C (FURCOLOW, 1958; QUIST et al., 2011).

No Brasil já foram relatados surtos e/ou microepidemias em humanos nos Estados de Espírito Santo, Mato Grosso, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo (FERREIRA; BORGES, 2009), Rio Grande do Sul (UNIS et al., 2005; SEVERO et al., 2001), Santa Catarina, Distrito Federal, Paraíba, Amazonas, Bahia (OLIVEIRA et al., 2006) e Ceará (PONTES et al., 2010). Utilizando o teste de reação dérmica com histoplasmina avaliou-se a prevalência, em diversas regiões do País, que apresentou taxas entre 2,6 a 93,2% (LEIMANN et al., 2005),

sendo encontrados os índices mais altos de positividade no Rio de Janeiro (AIDE, 2009).

Assim como em humanos vários animais, domésticos e silvestres, podem ser acometidos por esta micose. Casos já foram relatados em cães (CORDEIRO et al., 2011; TYRE et al., 2007; FERNANDES et al., 2003), gatos (BRILHANTE et al., 2012; MAVRAPOLOU et al., 2010; CARNEIRO et al., 2005), equídeos (NUNES et al., 2006; RICHTER et al., 2003; JOHNSTON et al., 1995; REZABEK et al., 1993), roedores e marsupiais (NAIFF et al., 1996; SILVA-VERGARA et al., 2001), gazelas (FARIÑAS et al., 2009) e aves (QUIST et al., 2011).

Mesmo com o aparecimento de novos casos em animais no Brasil, dados epidemiológicos são escassos e sua prevalência é desconhecida. *H. capsulatum* já foi isolado em várias espécies animais incluindo em silvestres na região Amazônica (NAIFF et al., 1996) e no Rio de Janeiro, dentre estes roedores e marsupiais (ZANCOPÉ-OLIVEIRA; WANKE, 1986). Os dados sobre a ocorrência dessa micose em caninos e felinos foram relacionados na Tabela 1.

Tabela 3 – Frequência da identificação de *H. capsulatum* em cães e gatos no Brasil

<b>Estado</b>	<b>Referência</b>	<b>Diagnóstico</b>	<b>Espécie</b>	<b>Animais (n)</b>
São Paulo	Pará (1946)	CF	Cão	1
Minas Gerais	Silva et al. (1961)	CF	Cão	1
Bahia	Madureira (1963)	HP	Cão	1
Rio de Janeiro	Ribeiro (1985)	DNR	Cão	1
São Paulo	Forjaz e Fischman (1985)	CF	Cão	1
Rio de Janeiro	Silva-Ribeiro et al. (1987)	HTP/HP/CF	Cão	16
Mato Grosso	Fernandes et al. (2003)	CF	Cão	1
Minas Gerais	Carneiro et al. (2005)	CT	Gato	1
Rio de Janeiro	Silva (2007)	CT	Cão	1
Ceará	Cordeiro et al. (2011)	IDGA	Cão	5
Ceará	Brilhante et al. (2012)	CF	Gato	3

CF - Cultura Fúngica

CT-Citologia

HP – Histopatologia

IDGA – Imunodifusão em gel de Ágar

HTP – Teste cutâneo com histoplasmina

A identificação de animais domésticos e silvestres naturalmente infectados por *H. capsulatum* é uma ferramenta importante para monitorar a ocorrência do fungo em uma determinada região, pois estes atuam como sentinelas (marcadores epidemiológicos) para a presença do micro-organismo indicando a existência de fontes de infecção para humanos e animais (CANTEROS et al., 2010; ZANCOPÉ-OLIVEIRA; WANKE, 1986).

A histoplasmose acomete cães e gatos de qualquer idade. Porém, é mais relatada em animais jovens. Raças de cães destinadas a esporte e trabalho como os Weimaraners, Terriers, Pointers e Spaniels britânicos são relatadas na literatura como mais propensas a adquirir essa micose (SELBY et al., 1981). Em um estudo de frequência de casos relatados, gatos persas foram apontados com maior predisposição a contrair essa enfermidade (GINGERICH; GUPTILL, 2008).

### **PATOGENIA**

Homens e animais adquirem a infecção primordialmente através da inalação de propágulos fúngicos na fase filamentosa, sendo que as partículas infectantes são os microconídios, devido ao seu pequeno tamanho, que favorece a penetração nos alvéolos pulmonares. Após a inalação, os microconídios estimulam a resposta inflamatória do hospedeiro, composta por células mononucleadas e macrófagos, que não tem capacidade para destruir o patógeno (FERREIRA; BORGES, 2009), acarretando na maioria das vezes infecção pulmonar primária leve ou subclínica. A infecção por via oral também pode ocorrer, uma vez que alguns animais apresentam somente sinais gastrintestinais (STARK, 1982).

Devido à temperatura corporal do hospedeiro (37°C) ocorre a conversão da forma micelial do fungo para leveduriforme. *H. capsulatum* tem capacidade de multiplicar-se no interior das células do sistema retículo endotelial, e através destas atingir os linfonodos pulmonares, ganhando acesso à circulação sanguínea e disseminando-se para vários órgãos, podendo produzir focos inflamatórios locais (WOODS, 2003; KROETZ; DEEPE, 2012; GUIMARÃES et al., 2006).

Após a terceira semana de infecção ocorre resposta imune, com presença de células gigantes, formação de granulomas e necrose caseosa com posterior calcificação desses focos. Nesse período também há a produção de anticorpos. Normalmente essa resposta leva à cura clínica, mas algumas partículas fúngicas podem permanecer em latência e a imunodepressão permite que haja a reativação da infecção (FERREIRA; BORGES, 2009).

O micro-organismo pode adotar estratégias de sobrevivência para proteção contra as defesas do hospedeiro, como a produção de melanina pelas células leveduriformes de *H. capsulatum* tanto durante a infecção em mamíferos quanto *in vitro*. A melanização está associada à virulência do micro-organismo e interfere com a ação de drogas antifúngicas,

reduzindo a suscetibilidade à anfotericina B (DUIN et al., 2002).

### **MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS**

A apresentação clínica da infecção por *H. capsulatum* depende do estado imunológico do hospedeiro, do número de partículas fúngicas inaladas e da virulência dos microconídios (GUIMARÃES et al., 2006).

Em cães e gatos, a histoplasmose apresenta amplo espectro de síndromes clínicas, sendo classificada sob três formas: assintomática, respiratória e disseminada. A histoplasmose assintomática ou subclínica é a forma mais comum da doença. Neste tipo de manifestação não há sinais clínicos, porém, os animais que vivem em regiões endêmicas comumente reagem positivamente à histoplasmina (COELHO et al., 2010). A forma pulmonar geralmente é benigna e autolimitante, mas pode se apresentar como uma enfermidade complicada que inclui histórico de perda de peso, inapetência e sinais respiratórios, como tosse crônica leve, dispneia, taquipneia e efusão pleural (BRÖMEL; SYKES, 2005).

A forma disseminada envolve múltiplos órgãos ou sistemas, afetando principalmente o fígado, baço, medula óssea e trato gastrointestinal (CLINKENBEAR et al., 1987). Os sinais clínicos comuns de histoplasmose disseminada são inespecíficos e incluem perda de peso, inapetência, febre e letargia. Outros achados clínicos observados são anemia (normocítica, normocrômica, não regenerativa), linfadenopatia, esplenomegalia, hepatomegalia ocasionalmente acompanhada por icterícia e ascite (BRÖMEL; SYKES, 2005; BRILHANTE et al., 2012, GINGERICH; GUPTILL, 2008).

Os sinais gastrointestinais são mais comuns em cães e iniciam com o envolvimento do intestino grosso, cursando com diarreia com hematoquezia, muco e tenesmo, e podendo evoluir pra diarreia aquosa (CLINKENBEARD et al., 1987). Embora incomum, podem ocorrer sinais neurológicos, lesões cutâneas, envolvimento ocular e ósseo (LAVELY et al., 2005; TYRE et al., 2007).

### **MÉTODOS DIAGNÓSTICOS**

O diagnóstico definitivo da histoplasmose é realizado com base na associação dos sinais



clínicos, exames complementares e identificação do *H. capsulatum* no organismo do animal através de métodos laboratoriais. O histórico do animal é importante, considerando cães e gatos com acesso a locais com presença de morcegos, possivelmente contaminados pelo fungo, torna a histoplasmose um diagnóstico diferencial importante em animais provenientes de áreas endêmicas (BROMEL; SYKES, 2005).

O exame micológico é considerado o padrão-ouro do diagnóstico de histoplasmose, fundamenta-se na observação de estruturas fúngicas de *H. capsulatum* através de exame direto e cultivo de materiais biológicos. A cultura micológica pode ser realizada com amostras de punção de medula óssea, linfonodos, lavado bronco alveolar e biopsias ou swabs cutâneos. Os meios de cultivo normalmente utilizados são ágar-Sabouraud dextrose, ágar-batata e Mycosel®, as amostras são incubadas a temperatura ambiente (25°C) de 6 a 12 semanas (UNIS et al., 2004; GUIMARÃES et al., 2006).

Sob essas condições o fungo desenvolve-se inicialmente com morfologia filamentosa. Embora, apresentem à micromorfologia macroconídeos tuberculados sugestivos do fungo *H. capsulatum*, para diagnóstico definitivo de histoplasmose é necessário a caracterização do dimorfismo térmico através da conversão para fase leveduriforme realizada em meio de cultivo ágar infusão de cérebro-coração (BHI) a 35-37°C (Unis et al., 2004). A estrutura das leveduras *H. capsulatum* é muito semelhante à de outros micro-organismos patógenos, e essas características podem levar a erro durante a identificação convencional para fins de diagnóstico (KAUFFMAN, 2007).

A cultura fúngica é um procedimento demorado o que pode tardar o início de terapia adequada. Os cultivos para identificação do fungo devem ser manipulados com máxima precaução, devido ao seu potencial patogênico na fase micelial, por esse motivo devendo se cumprir medidas de segurança laboratorial nível três (COELHO et al., 2010).

Geralmente, no exame histopatológico e citológico, o micro-organismo é visualizado parasitando macrófagos, sendo que a sensibilidade deste método diagnóstico é baixa, devido à dificuldade na observação das leveduras e que elas podem ser confundidas pela sua semelhança com, por exemplo, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii* e outros patógenos intracelulares. Por este motivo utilizam-se colorações específicas, como a prata-metenamina, de Gacott, que se liga à quitina da parede celular dos fungos (LACAZ et al., 2002).

Os testes sorológicos para detecção de anticorpos contribuem com um diagnóstico mais

rápido, específico e sensível, porém pode haver resultados falso-positivos, devido a reações cruzadas com outros patógenos fúngicos que compartilham as mesmas estruturas antigênicas. Outro empecilho desse método diagnóstico são os resultados falso-negativos em animais imunodeprimidos ou em infecções agudas, devido à formação de anticorpos somente na terceira ou quarta semana após a exposição ao fungo. Os exames sorológicos utilizados são a imunodifusão dupla (ID) e a reação de fixação do complemento, entretanto, atualmente o teste de ELISA indireto complementa esse tipo de diagnóstico, por ser uma técnica de maior especificidade e mais sensível (GUIMARÃES et al., 2004).

A ID detecta anticorpos circulantes contra os antígenos M e H de *H. capsulatum* (GUIMARÃES et al., 2006). A linha de precipitação M surge no início da infecção e permanece após a cura, enquanto que a linha H é detectada em associação a linha do antígeno M em animais com infecção ativa e progressiva da doença (KAUFFMAN, 2007). Porém, esse método diagnóstico teve positividade baixa em estudos com cães e gatos (CLINKENBEARD et al., 1987).

Atualmente a utilização de técnicas moleculares possibilita um resultado precoce e mais acurado, pois tem maior sensibilidade e especificidade. O diagnóstico molecular através da reação de PCR como modificações PCR *nested*, detecta o DNA ribossômico (DNAr) do agente em amostras clínicas de animais infectados. Através das regiões ITS (*Internal Transcribed Spacer*) permite a identificação de gênero e/ou de espécie, principalmente na evidênciação de polimorfismos do fungo (JIANG et al., 2000).

Outros componentes gênicos podem ser detectados por esse método como o gene que codifica para a proteína de 100kDa, específica do *H. capsulatum* e o gene que codifica para o antígeno M do *H. capsulatum* (BIALEK et al., 2002, GUEDES et al., 2003).

Em um estudo utilizando o PCR *nested* em amostras de pele ulceradas de um cão doente no Japão e posterior sequenciamento das regiões ITS do DNAr demonstrou 99,7% de semelhança com *Ajellomyces capsulatus*, o teleomorfo de *H. capsulatum* (UEDA et al., 2003). Embora não haja achados patognomônicos para histoplasmose em exames laboratoriais, alguns exames não específicos podem complementar o diagnóstico como: hemograma, broncoscopia e radiografias (COELHO et al., 2010).

## TRATAMENTO

O *H. capsulatum* é sensível a diversos antifúngicos, tais como anfotericina B, cetoconazol, itraconazol e fluconazol (FERREIRA; BORGES, 2009). Em cães e gatos o tratamento de eleição para histoplasmose é o itraconazol. Recomenda-se a administração uma ou duas vezes ao dia, na dose 10 mg/kg, por via oral durante um período mínimo de 4 a 6 meses, até pelo menos 2 meses após o desaparecimento dos sinais clínicos (BRÖMEL; SYKES, 2005). Considera-se, entretanto, que a terapia com itraconazol por período maior que dois meses possa causar um aumento moderado da enzima ALT, geralmente assintomático (HODGES et al., 1994). Porém, dados demonstram que o itraconazol foi eficaz na dose de 5 mg/kg por via oral a cada 12 horas pelo período de 60 a 130 dias no tratamento de gatos com histoplasmose disseminada (HODGES et al., 1994). O fluconazol pode ser uma alternativa em animais que apresentem lesões intraoculares e sinais neurológicos, devido à sua melhor penetração nestes tecidos, comparado ao itraconazol (BRÖMEL; SYKES, 2005).

Embora o itraconazol seja mais eficaz e com menores efeitos colaterais que o cetoconazol, este último comumente apresenta custo mais acessível. Entretanto, sua eficácia pode ser questionável frente ao *H. capsulatum* e toxicidade relativamente elevada, uma vez que estudo utilizando cetoconazol como tratamento em 16 gatos, demonstrou que 11 foram a óbito (DAVIES; TROY, 1996). Já, o mesmo fármaco foi curativo em um cão apresentando lesões cutâneas de histoplasmose, utilizando-se a dose de 20 mg/kg por 6 meses (MACKIE et al., 1997).

Em humanos a anfotericina B é utilizada como o antifúngico mais eficiente para o tratamento dessa micose (FERREIRA; BORGES, 2009). Esse medicamento também demonstrou resultado positivo no tratamento da histoplasmose disseminada e localizada em cães, embora apresente sinais adversos como diminuição do apetite, flebite, letargia e azotemia devido à nefrotoxicidade (MITCHELL; STARK, 1980). A utilização de anfotericina B (na dose 0,25-0,5 mg/kg IV q 48 horas até uma dose cumulativa de 5-10 mg/kg é em cães e 4-8 mg/kg em gatos) em associação com itraconazol ou cetoconazol fornece um controle mais eficaz de formas mais severas de histoplasmose (COELHO et al., 2010).

Durante e após a terapia antifúngica é indicado o monitoramento dos os sinais clínicos e alterações laboratoriais associadas à histoplasmose e efeitos colaterais dos antifúngicos utilizados (BRÖMEL; SYKES, 2005).

O prognóstico depende envolvimento sistêmico e da gravidade dos sinais clínicos associados. Em cães com histoplasmose pulmonar e gatos que não estejam severamente debilitados o

prognóstico é favorável após um tratamento prolongado com itraconazol (COELHO et al., 2010).

## CONCLUSÃO

Avalia-se que a frequência de doenças causada por fungos pode ser grandemente subestimada, principalmente em Medicina Veterinária. Pouco se sabe acerca da real ocorrência destas doenças em animais, uma vez que infecções fúngicas não são doenças de notificação obrigatória e a estimativa de sua ocorrência é dependente de relatos de casos e mais recentemente de inquéritos epidemiológicos regionais. Assim, observa-se que informações e relatos de histoplasmose em animais ainda são escassos. Reforça-se a falta de evidências da transmissão de *H. capsulatum* a partir de animais para os seres humanos, sendo assim descartada a característica zoonótica desta micose. No âmbito da saúde pública, há um grande benefício em utilizar a vigilância epidemiológica desta micose em animais, uma vez que atuam como sentinelas da histoplasmose, podendo servir de alerta à exposição humana.

## Agradecimentos

Aos órgãos financiadores CAPES, CNPq e FAPERGS e ao laboratório de micologia da Faculdade de Veterinária na Universidade Federal de Pelotas/MICVET/UFPel.

## HISTOPLASMOSIS IN DOGS AND CATS IN BRAZIL

**Abstract** - Histoplasmosis is caused by *Histoplasma capsulatum*, a dimorphic and soil saprophytic fungus, endemic in regions with high humidity and rainfall. While it may be present in droppings from birds and bat it does not entail a zoonosis. The animals become infected through the inhalation of fungal microconidia and may develop an asymptomatic, pulmonary or systemic, infection. In recent years there has been a considerable increase in reports of diseases caused by this fungus, affecting different animal species. Considering the pathogenic potential of *H. capsulatum* associated with increased use of immunosuppressive therapies, the emergence of retroviral infections, a better diagnostic capacity on the Veterinary Medicine current context, may explain the possible emergence of fungal diseases. This study aimed to perform a detailed literature review addressing the clinical, laboratory, epidemiological, etiological and therapeutic aspects of histoplasmosis, compiling data on the frequency of identification of fungal pathogens in dogs and cats in Brazil.

**Key words:** Dogs. Cats. *Histoplasma* sp. systemic mycosis

### LA HISTOPLASMOSIS EN PERROS Y GATOS EN BRASIL

**RESUMEN:** La histoplasmosis es causada por el *Histoplasma capsulatum*, un hongo dimórfico, saprófito del suelo, endémico en regiones con elevada humedad e índices pluviométricos. Aún pudiendo hacerse presente en excrementos de aves y murciélagos no se considera una zoonosis. Los animales se infectan a través de la inhalación de microconídeos y pueden desarrollar una infección asintomática, pulmonar o sistémica. En los últimos años se observó un aumento considerable de relatos de enfermedades causadas por este hongo, afectando distintas especies animales. Considerando el potencial patógeno del *H. capsulatum* asociado a la creciente utilización de terapias inmunosupresivas, al surgimiento de infecciones retrovirales, a la mejor capacidad de diagnóstico y al contexto actual de la Medicina Veterinaria, se evalúa la posibilidad del surgimiento de enfermedades causadas por hongos. El presente trabajo, se propone realizar detallada revisión literaria, tratando de aspectos clínicos, laboratoriales, epidemiológicos, etiológicos y terapéuticos de la histoplasmosis, reuniendo datos sobre la frecuencia de identificación del hongo en perros y gatos en Brasil.

**Palabras clave:** Perros, gatos, *Histoplasma* sp. micosis sistémica.

### REFERÊNCIAS

AIDÉ, M.A. Histoplasmosis. **J. bras. Pneumol.**, v.35, n.11, p.1145-1151, 2009.

BIALEK, R.; FEUCHT, A.; AEPINUS, C.; et al. Evaluation of two nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue. **J. clin. Microbiol.**, v. 40, p. 1644-1647, 2002.

BRILHANTE, R. S. N.; COELHO, C. G. V.; SIDRIM J. J. C.; et al. Feline Histoplasmosis in Brazil: Clinical and Laboratory Aspects and a Comparative Approach of Published Reports. **Mycopathologia**, v. 173, p. 193-197, 2012.

BROMEL, C.; SYKES, J. Histoplasmosis in dogs and cats. **Clin Tech Small Anim Pract**, v. 20, p. 227-232, 2005.

CANTEROS, C.E.; MADARIAGA, M.J, LEE, W.; et al. Agentes de micosis endêmicas em un área rural de Argentina: estudio seroepidemiológico em perros. **Rev iberoam micol**, v.27, n.1, p.14-19, 2010.

CARNEIRO, R. A.; LAVALLE, G. E.; ARAÚJO, R. B. Histoplasmosse cutânea em gato: relato de caso. **Arq bras med vet zootec**, v. 57, p. 158-161, 2005.

CLINKENBEARD, K.D.; COWELL, R.L.; TYLER, R.D. Disseminated histoplasmosis in cats: 12 cases (1981-1986). **J Am Vet Med Assoc**; v.190, n.11, p.1445-1448, 1987.

COELHO, C.G.V., BRILHANTE, R. S. N. ; CORDEIRO, R. A.; et al. Histoplasmosse em Medicina Veterinária: enfoque para cães e gatos. **Clin Vet**, v. XV, p. 44-50, 2010.

CORDEIRO, R.A.; COELHO, C.G.V.; BRILHANTE, R.S.N.; et al. Serological evidence of *Histoplasma capsulatum* infection among dogs with leishmaniasis in Brasil. **Acta Tropica**, v.119, p.203-205, 2011.

CURY, G.C.; DINIZ FILHO, A.; CRUZ, A.G.C.; et al. Surto de histoplasmose em Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brasil. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v.34, n.5, p.483-486, 2001.

DAVIES, C.; TROY, G.C. Deep mycotic infections in cats. **J. Am Anim Hosp Assoc**, v. 32, p. 380-391, 1996.

DEUS FILHO, A.; WANKE, B.; CAVALCANTI, M. A. S.; et al. B. Histoplasmose no Nordeste do Brasil. Relato de três casos. **Rev Port Pneumol**, v. XV, p. 109-114, 2009.

DUIN, D. V.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J. D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 11, p. 3394-3400, 2002.

FARIÑAS, F.; FOLRES, L.; RODRÍGUES, P.; et al. Histoplasmosis diseminada en una gacela dorca (*Gazella dorcas neglecta*) mantenida en condiciones de cautividad en España. **Rev Iberoam Micol**, v.26, n.2, p.152-154, 2009.

FERNADES, C.G.N.; MOURA, S.T.; AVILA, M.; et al. Histoplasmose em um cão na zona urbana de Cuiabá, Mato Grosso. **Clín Vet**, n.46, p. 44-46, 2003.

FERREIRA, M. S.; BORGES A. S. Histoplasmose. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 42(2), p. 192-198, mar-abr, 2009.

FORJAZ, M. H. H.; FISCHMAN, O. Animal histoplasmosis in Brazil - Isolation of *Histoplasma capsulatum* from a dog on the northern coast of São Paulo. **Mykosen**, v. 28, n. 4, p. 191-194, 1985.

FURCOLOW, M. L. Recent studies on the epidemiology of histoplasmosis. **Ann NY Acad Sci**, v. 72, n. 3 p. 129-163, 1958.

GINGERICH, K.; GUPTILL, L. Canine and feline histoplasmosis: A review of a widespread fungus. **Veterinary Medicine**, v. 103, n. 5, p. 248, 2008.

GUEDES, H. L. M.; GUIMARÃES, A. J. ; MUNIZ, M. M.; et al. PCR assay for identification of *Histoplasma capsulatum* based on the nucleotide sequence of the M antigen. **J Clin Microb**, v. 41, p. 535- 539, 2003.

GUIMARÃES, A. J. M.; PIZZINI, C. V.; GUEDES, H. L. M.; et al. ELISA for early diagnosis of histoplasmosis. **J Med Microb**, v. 53, p. 509-514, 2004.

GUIMARÃES, A. J. NOSANCHUK, J. D.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M. Diagnosis of histoplasmosis. **Braz J Microbiol**, v. 37, p. 1-13 , 2006.

HODGES, R.D.; LEGENDRE, A.M.; ADAMS, L.G.; et al. Itraconazole for the treatment of histoplasmosis in cats. **J Vet Intern Med**, v. 8, p. 409-413, 1994.

JIANG, B.; BARTLETT, M. S. ; ALLEN, S. D.; et al. Typing of *Histoplasma capsulatum* isolates based on nucleotide sequence variation in the internal transcribed spacer regions of rRNA genes. **J Clin Microbi**, v. 38, p. 241-245, 2000.

JOHNSTON, P.F.; REAMS, R.; JAKOVljeVIC, S.; et al. Disseminated histoplasmosis in a horse. **Can Vet J**, v.36, p.707-709, 1995.

KAUFFMAN, C. A. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. **Clin Microbiol Rev**, v. 20, n. 1, p. 115-132, 2007.

KROETZ, D. N.; DEEPE, G. S. The role of cytokines and chemokines in *Histoplasma capsulatum* infection. **Cytokine**, v. 58, p.112–117, 2012.

LACAZ, C. S.; PORTO, E. ; MARTINS, J. E. C; et al. T. Histoplasmosse clássica. **Tratado de micologia médica**. São Paulo, Editora Sarvier, 2002, p. 594-617.

LAVELY, J.; LIPSITZ, D. Fungal Infections of the central nervous system in the dog and cat. **Clin Tech Small Anim Pract**, v. 20, p. 212-219, 2005.

LEIMANN, B.C.Q.; PIZZINI, C.V.; MUNIZ, M.M.; et al. Histoplasmosis in a Brazilian center: clinical forms and laboratory tests. **Rev Iberoam Micol**, v.22, p.141-146, 2005.

MACKIE, J.T.; KAUFMAN, L.; ELLIS, D. Confirmed histoplasmosis in an Australian dog. **Aust Vet J**, v. 75, p. 362-363, 1997.

MAVROPOULOU, A.; GRANDI, G.; CALVI, L.; et al. Disseminated histoplasmosis in a cat in Europe. **J Small Anim Pract**, v.51, p.176-180, 2010.

MITCHELL, M.; STARK, D.R. Disseminated canine histoplasmosis: A clinical survey of 24 cases in Texas. **Can Vet J**, v. 21, p. 95-100, 1980.

NAIFF, R. D.; BARRET, T. B.; NAIFF, M. F.; et al. New records of *Histoplasma capsulatum* from wild animals in the Brazilian Amazon. **Rev Inst Med Tropic São Paulo**, v. 38, n. 4, p. 273-277, 1996.

NUNES, J. MACKIE, J.T.; KIUPEL, M. Equine histoplasmosis presenting as a tumor in the abdominal cavity. **J Vet Diagn Invest**, v.18, p. 508-510, 2006.

OLIVEIRA, F. M. et al. Microepidemia de histoplasmosse em Blumenau, Santa Catarina. **J Bras Pneumol**, v.32, n. 4, p.375-378, 2006.

PARÁ, M. Histoplasmosis in Brazil. **Am J Trop Med**, v.26, p. 273-292, 1946.

PONTES, L.B.; LEITÃO, T.M.J.S.; LIMA, G.G; et al. Características clínico-evolutivas de 134 pacientes com histoplasmosse disseminada associada a SIDA no Estado do Ceará. **Rev Soc Bras Med Tropic**, v.43, n.1, p.27-31, 2010.

QUIST, E.M.; BELCHER, C.; LEVINE, G.; et al. Disseminated histoplasmosis with concurrent oral candidiasis in an Eclectus parrot (*Eclectus roratus*). **Avian Pathol**, v.40, n.2, p.207-211, 2011.

REZABEK, G.B.; DONAHUE, R.C.; GILES, R.C.; et al. Histoplasmosis in Horses. **J Comp Pathol**, v.109, p.47-55, 1993.

RIBEIRO, V.L.S. **Histoplasmose canina no Rio de Janeiro**. 1985. Rio de Janeiro, 80 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) – Fundação Oswaldo Cruz.

RICHTER, M.; HAUSER, B.; KAPS, S.; et al. Keratitis due to *Histoplasma spp.* in a horse. **Veter Ophthalm**, v.6, n.2, p.99-103, 2003.

SELBY, L. A.; BECKER, S. B.; HAYES, H. W. Epidemiologic risk factors associated with canine systemic mycoses. **American Journal of Epidemiology**, v. 113, n. 2, p. 133-139, 1981.

SEVERO, L.C.; OLIVEIRA, F.M.; IRION, K.; et al. Histoplasmosis in Rio Grande do Sul, Brazil: a 21-year experience. **Revi Inst Med Trop São Paulo**, v.43, n.4, p.183-187, 2001.

SILVA, A. V. **Histoplasmose em cão – Relato de caso**. 2007. Rio de Janeiro, 20 f. Monografia (Especialização em Patologia Clínica) – Universidade Castelo Branco, Curso de Pós-graduação Qualittas/UCB.

SILVA, J.M.L.; BARBOSA, M.; HIPOLITO, O. Um caso de histoplasmose em cão em Minas Gerais. **Arq Esc Super Vet do Estado de Minas Gerais**, v.13, p. 40-43, 1961.

SILVA-RIBEIRO, V. L.; FERREIRA-DACRUZ, M. F.; WANKE, B.; et al. Canine histoplasmosis in Rio de Janeiro: natural and experimental infections. **J Med Vet Mycol**, v. 25, n.5, p. 319-322, 1987.

SILVA-VERGARA, M.L.; MARTINEZ, R. MALTA, M.H.B.; et al. *Histoplasma capsulatum* isolated from *Didelphis albiventris (Marsupialia: Didelphidae)* in the state of Minas Gerais, Brazil. **Rev Iberoam Micol**, v.18, p.180-182, 2001.

STARK, D.R. Primary gastrointestinal histoplasmosis in a cat. **J Ame Anim Hosp Assoc**, v. 18, p.154-156, 1982.

TYRE, E.; EISENBART, D.; FOLEY, P.; et al. Histoplasmosis in a dog from New Brunswick. **Can Vet J**, v. 48, p. 734 -736, 2007.

UEDA, Y.; SANO, A.; TAMURA, M.; et al. Diagnosis of histoplasmosis by detection of the internal transcribed spacer region of fungal rRNA gene from a paraffin- embedded skin sample from a dog in Japan. **Vet Microbiol**, v. 94, p. 219-224, 2003.

UNIS, G.; PÊGAS, K. L.; SEVERO, L. C.. Histoplasmoma pulmonar no Rio Grande do Sul. **Rev Soc Bras Med Tropic**, v. 38, n.1, p. 11, 2005.

UNIS, G.; SILVA, V.B., SEVERO, L.C. Histoplasmose disseminada e SIDA. Importância do meio de cultivo para o espécime clínico-broncoscópico. **Rev Soc Bras Med Tropic**, v. 37(3), p. 234-237, 2004.

WOODS, J.P. Knocking on the right door and making a comfortable home: *Histoplasma*



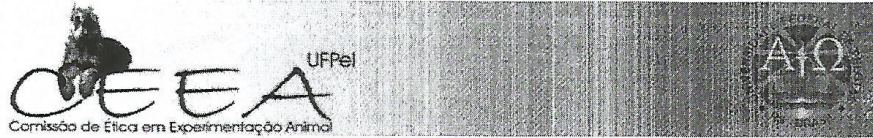
*capsulatum* intracellular pathogenesis. **Curr Opin Microbiol**, v. 6 p. 327-331, 2003.

ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M.; WANKE, B. Isolamento do *Histoplasma capsulatum* de animais silvestres no município do Rio de Janeiro. **Cad de Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v. 2 (1), p. 42-521986.

## **Anexos**

## Anexo A

### Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal



Pelotas, 17 de dezembro de 2014

**De:** Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

*Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)*

**Para:** Professor Mário Carlos Araújo Meireles

*Faculdade de Veterinária*

Senhor Professor:

A CEEA analisou o projeto intitulado: “**Avaliação sorológica da presença de anticorpos contra *Paracoccidoides brasiliensis* em felinos domésticos (*Felis catus*) da região sul do Rio Grande do Sul**”, processo nº23110.009930/2014-91, 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 9930-2014).

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

Atenciosamente,

**Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva**

*Presidente da CEEA*

Ciente em: 18/12/2014

Assinatura do Professor Responsável:

## Anexo B

### Normas da Revista Medical Mycology

Medical Mycology/Norms

Official journal for The International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM)

2011 Impact Factor: 2.261

5-year Impact Factor: 2.205

Online ISSN 1460-2709 - Print ISSN 1369-3786

#### JOURNAL POLICIES

##### SCOPE OF THE JOURNAL

As an official publication of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM), *Medical Mycology* is an international journal that 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.

#### MANUSCRIPT PREPARATION

##### SUBMISSION

All submissions must be uploaded as Word files to the Medical Mycology ScholarOne Manuscripts site at [mc.manuscriptcentral.com/tmmy](http://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. If you need additional help, please contact [mmy@oup.com](mailto:mmy@oup.com).

#### Permissions

Written permission should be obtained to adapt a part of or reprint an entire table, graph, or illustration that has been previously published. Authors are responsible for obtaining permission from the copyright holder to use copyrighted material prior to submission, and are responsible for paying any associated fees.

#### LANGUAGE EDITING PRE-SUBMISSION

OUP offers pre-submission language editing through Oxford Language Editing, a service for researchers all over the world. Language editing, particularly if English is not your first language, can be used to ensure that the academic content of your paper is fully understood by the journal editors and reviewers. Visit

[www.oxfordlanguageediting.com](http://www.oxfordlanguageediting.com) to find out more about the freelance editors available and the different services offered. Please note that edited manuscripts will still need to undergo peer-review by the journal.

## ARTICLE TYPES

Papers may be submitted in the following categories.

### 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 cited sequentially in the order in which they first appear in the text as superscript Arabic numerals 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.

### 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, Riina Richardson: [Riina.Richardson@manchester.ac.uk](mailto:Riina.Richardson@manchester.ac.uk). 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.

### Case Reports

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

### 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.

### 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.

## MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

Please refer to a recent issue of *Medical Mycology* for guidance on style and layout of articles. Also refer to the Article Types section for guidance on relevant information for each article type.

### File Formats

All manuscripts must be submitted as Microsoft Word documents (.doc files).

### Manuscript Preparation

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.

### References

Authors are responsible for the accuracy and completeness of their references and for correct text citation. In preparing your citations please follow the AMA Manual of Style, 10th Edition.

Some key style points that *Medical Mycology* articles must follow:

- Number references in the order they appear in the text; do not alphabetize.
- In text, tables, and legends, identify references with superscript Arabic numerals.
- When listing references, follow AMA style and abbreviate names of journals according to the journals listed in PubMed. The abbreviation should be in italic font and a period inserted after the final abbreviation, e.g., *J Clin Microbil.* ↓see period
- List all authors up to 6, but if more than 6, list the first 3 by name and the rest by “et al.” \*
- Journal references should include the issue number in parentheses after the volume number and before page numbers which should be inclusive (685-692, NOT 685-2).

Examples of reference style:

#### Journal article

Author AB, Author CD, Author EF, et al. [if more than six authors] Title of paper. J Title Abbrev. 1995; 00 (1): 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. For example, Author AB, Author CD, Author EF, et al. [if more than six authors] Title of paper. J Title Abbrev 1995; 00 (1): 000–000 [in Spanish].

#### Book chapter

Author AB, Author CD, Author EF, et al. [if more than six] 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.

#### Book

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

#### Thesis

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

#### Conference proceedings/Supplements

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

#### 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.

#### 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].

### **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 page at the end of the main document 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 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.

### **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. For more information about preparing figures, see our Figures page here. Authors will be charged USD 600 for each figure reproduced in color in the print version of the journal (for more information about charges, see the Medical Mycology Charges page here). However, any figure submitted as a color original may appear in color in the journal's online 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 indi

### **Supplementary Files**

Supplementary information, including extensive data sets, large figures, audio and DVD/video material, can be made available as part of the online version of your manuscript. Please do not include supplementary information within the main manuscript file, but upload the material as separate file(s), labeled 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.

### **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 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.

### **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).

### **Acknowledgments**

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



## FUNDING

Details of all funding sources for the work in question also should be given in the Acknowledgments section.

The following rules should be followed:

- The sentence should begin: “This work was supported by ...”
- The full official funding agency name should be given, i.e. “the National Cancer Institute at the National Institutes of Health” or simply “National Institutes of Health” not “NCI” (one of the 27 sub-institutions) or “NCI at NIH.” Please see here for a full RIN-approved list of UK funding agencies.
- Grant numbers should be complete and accurate and provided in brackets as follows: “[grant number ABX CDXXXXXX]”
- Multiple grant numbers should be separated by a comma as follows: “[grant numbers ABX CDXXXXXX, EFX GHXXXXXX]”
- Agencies should be separated by a semi-colon (plus “and” before the last funding agency)
- Where individuals need to be specified for certain sources of funding the following text should be added after the relevant agency or grant number “to [author initials].”

An example is given here: “This work was supported by the National Institutes of Health [P50 CA098252 and CA118790 to R.B.S.R.] and the Alcohol & Education Research Council [HFY GR667789].”

## DECLARATION OF INTEREST

This section should appear after the Acknowledgments and should include any 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.

#### JOURNAL COPYEDITING STYLE

Authors are referred to this document and the *AMA Manual of Style*, 10th Edition.

#### PERMISSION TO REPRODUCE THIRD-PARTY MATERIAL

All copyright permission must be cleared and, if necessary, paid for by the author; this includes applications and payments to DACS (Data Access Control System), ARS (Artists Rights Society), and similar licensing agencies where appropriate. It is also the author's responsibility to include acknowledgements as stipulated by particular institutions.

#### COPYRIGHT AND LICENSE

mmy@oup.com It is a condition of publication in *Medical Mycology* that the authors grant an exclusive license to the journal's sponsoring society, the International Society for Human and Animal Mycology. This ensures that all of the necessary rights needed for publication of the article are in place including provision for any requests from third parties to reproduce the content to be as widely disseminated as possible. No article will be published unless the signed license has been received at Oxford Journals. Once your article is received into production at Oxford Journals, you will receive a "Welcome" email that contains the link to your online license. If it is not possible for you to complete your license online, please email mmy@oup.com. Any queries about the license form should be sent as soon as possible to Rights and Permissions so that any issues can be resolved quickly and to avoid any delay in publication.

As part of the license agreement, authors may use their own material in other publications, provided that the journal is acknowledged as the original place of publication and Oxford University Press is acknowledged as the publisher. Work submitted for publication must be original, previously unpublished, and not under consideration for publication elsewhere. If previously published figures, tables, or parts of text are to be included, the copyright-holder's permission must have been obtained prior to submission. For more information on how to obtain permissions, please consult Rights and Permissions.

#### PROOFS

Authors are sent page proofs by email. To avoid delays in publication, proofs should be checked immediately and corrections, as well as answers to any queries, returned to the publishers as an annotated PDF within 2 working days. Further details are supplied with the proof. It is the author's responsibility to check proofs thoroughly. Excessive alterations in the proof stage may delay publication of the article to a subsequent issue. Authors who make extensive amendments to the text at the page-proof stage will be charged an additional fee.

#### OFFPRINTS

The journal will provide a URL to authors for free electronic access to the published version of the article. Offprints and reprints may be purchased in multiples of 50, either through the Author Services site or using this order form.