

DETECÇÃO SOROLÓGICA DA INFECÇÃO POR *P. lutzii* EM EQUINOS NO RIO GRANDE DO SUL

JOSIARA FURTADO MENDES¹; GABRIEL BARACY KLAFKE²; OTÁVIA DE ALMEIDA MARTINS³; ÂNGELA LEITZKE CABANA⁴; MELISSA ORZECOWSKI XAVIER⁵; MÁRIO CARLOS ARAÚJO MEIRELES⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – josiara.mds@hotmail.com

²Universidade Federal do Rio Grande – gabrielklafke@yahoo.com.br

³Universidade Federal de Pelotas – otavia.martins@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – cabanangela@gmail.com

⁵Universidade Federal do Rio Grande – melissaxavier@ig.com.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – meireles@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica que ocorre em vários países da América Latina, principalmente Brasil, Venezuela e Colômbia. Acomete, sobretudo, indivíduos da população rural, e é causada por fungos termodimórficos do gênero *Paracoccidioides* (LACAZ et al., 2002; TEIXEIRA, 2013).

A PCM era tradicionalmente considerada como sendo causada unicamente pelo *P. brasiliensis*, mas uma nova espécie, *P. lutzii*, foi descoberta na região Centro-Oeste do Brasil e vem sendo descrita como agente etiológico da doença em diferentes estados (TEIXEIRA et al., 2009; GEGEMBAUER et al., 2014; HAHN et al., 2014).

Após mais de cem anos da primeira descrição da PCM pouco se sabe sobre a ecoepidemiologia dos fungos do gênero *Paracoccidioides*, assim como, aspectos biológicos da interação patógeno/hospedeiro. Este fungo habita o solo, especialmente de áreas rurais (CONTI-DIAZ, 2007), no entanto, seu nicho ecológico ainda não está totalmente definido. Vários fatores contribuem para essa limitação, como a dificuldade do isolamento do fungo do meio ambiente e o período de latência prolongado que a doença pode apresentar (BAGAGLI et al., 2003; THEODORO et al., 2012).

A investigação da infecção fúngica em animais vem representando uma excelente estratégia para estudos sobre a ecologia do agente (BAGLAGLI et al., 2003). Desta forma, recentemente, estudos utilizando animais como sentinelas, comprovaram pela primeira vez a presença de *P. brasiliensis* no estado do Rio Grande do Sul (RS) (ALBANO et al., 2014a e b). No entanto, embora o RS seja considerado endêmico para PCM há varias décadas (LONDERO et al., 1978; VERLI et al., 2005), estudos sobre a presença de *P. lutzii* no estado não são descritos. Sendo assim, este estudo teve como objetivo avaliar a infecção por *P. lutzii* em equinos oriundos da mesorregião do Sudoeste Riograndense, utilizando esses animais como sentinelas.

2. METODOLOGIA

O estudo foi realizado com amostras séricas de animais provenientes da cidade de Bagé, que pertence à mesorregião Sudoeste Riograndense, RS, Brasil. O clima da região pode ser caracterizado como temperado ou subtropical. A temperatura média anual é de 18°C, e as temperaturas médias mensais variam entre 12 ° C no inverno e 24 ° C no verão. Duzentos cavalos puro-sangue (Puro

Sangue Inglês), até dois anos de idade, nascidos e criados exclusivamente em cinco fazendas diferentes na cidade de Bagé, foram incluídos no estudo. Os animais foram escolhidos aleatoriamente, e aqueles que tinham tido acesso a qualquer outro local (por exemplo, transporte, participação em eventos, leilões) foram excluídos.

As amostras foram submetidas ao teste ELISA, realizado em microplacas de poliestireno de 96 poços (Kasvi, k12-096 – Imp. Curitiba-Paraná), as quais foram sensibilizadas com 27 μ L de *cell-free antigen* (CFA) PLEPM 208 de *P. lutzii* diluído em 11 mL de tampão bicarbonato (pH 9,6) e incubadas a 4°C durante 18h. As placas foram então lavadas com solução salina tamponada com fosfato com 0,5% de Tween 20 (PBS-T). Lavagens das placas com esta mesma solução foram realizadas entre cada etapa do teste. Na sequência, foram bloqueadas com Leite desnatado em pó (diluído 1:20 em PBS) por 1h a 37°C. Em seguida foram adicionados os soros a serem testados na diluição 1:50 em PBS-T, incubadas durante 1h a 37°C. Foram então adicionados 100 μ L de conjugado (proteína G - peroxidase, Sigma®, 1:10.000) em cada poço, seguido de incubação durante 1h a 37°C. Após a lavagem final, foram adicionados 100 μ L de substrato (0,005 μ g de OPD + 11 mL de tampão citrato + 11 μ L de H₂O₂), a placa foi incubada por 10 minutos a 37°C no escuro, e a seguir a reação foi bloqueada pela adição de 100 μ L de ácido sulfúrico 1N. A leitura da absorção foi determinada num leitor de microplacas (TECAN Spectra clássico) usando filtro de 450 nm. Todas as amostras foram testadas em triplicata. O controle positivo foi obtido através de uma amostra fortemente positiva de um equino previamente testada (OD: 0,39 a 0,81), o controle negativo correspondeu a um "Pool" de soros negativos de cavalos também previamente testados (OD de 0,12 a 0,29). As amostras que apresentaram absorbância duas vezes maior que a do controle negativo foram consideradas positivas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os equinos incluídos nesse estudo pertenciam a cinco fazendas diferentes na região de Bagé, RS, Brasil. Dos 200 cavalos estudados, 102 eram do sexo feminino e 98 machos. O ELISA mostrou soropositividade em 20 animais (10%), sendo 11 fêmeas e nove machos, sem diferença significativa ($p=0,706$) entre o sexo dos animais. Indicando que ambos estão igualmente infectados pelo *P. lutzii* independente do sexo, o que concorda com estudos realizados por Ono et al. (2001) e Corte et al. (2009) onde não houve diferença significativa entre o sexo dos animais quando testados para *P. brasiliensis*. Já que os animais estão condicionados ao mesmo manejo, vivem no mesmo local em contato direto com o solo.

No entanto, em relação à procedência, a soropositividade diferiu significativamente ($p<0,001$), variando de 2,9% a 43,3% entre quatro haras, e em um não houve nenhum animal reativo. Sabendo-se que o *Paracoccidioides* spp. tem seu habitat no solo, e desenvolve-se preferencialmente em locais úmidos, próximos a cursos d'água (TERÇARIOLI et al., 2007), a diferença de soropositividade dos animais estudados pode estar associada as condições ambientais do local onde vivem, pois apesar da vegetação semelhante na região, cursos d'água próximos as propriedades podem confirmar a presença ou não do *P. lutzii* em cada uma, reforçando a hipótese descrita por Conti-Diaz (2007) que a proximidade de água é uma condição favorável para a presença das espécies do gênero *Paracoccidioides*.

P. lutzii é o novo agente da PCM, segundo estudos recentes a espécie fúngica tem seu epicentro na região centro oeste do Brasil, ao contrario de *P. brasiliensis* que é descrito nas regiões Sul e Sudeste do país (GEGEMBAUER et al., 2014;

HAHN et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2013, THEODORO et al., 2012). Portanto, este é o primeiro relato a descrever animais que apresentaram anticorpos contra *P. lutzii*, sugerindo que o fungo está presente no RS. O que pode ser confirmado pelo fato de que apenas soros de animais ou humanos que já entraram em contato com *P. lutzii* são capazes de reconhecer moléculas antigênicas de *P. lutzii*-CFA, que foi a proteína utilizada neste trabalho (GEGEMBAUER et al, 2014).

Todos os animais incluídos neste estudo haviam sido previamente testados para detecção sorológica da infecção por *P. brasiliensis* (ALBANO et al., 2014b), e, dos 20 animais reagentes neste estudo, dez eram negativos para anticorpos anti-*P. brasiliensis* e dez positivos em ambos os testes. Sendo que esses dez animais negativos para *P. brasiliensis* foram positivos quando testados com anticorpos anti-*P. lutzii*. Segundo estudos realizados por Gegembauer et al. (2014) e Teixeira et al. (2014), somente animais soropositivos para *P. lutzii* são capazes de reconhecer moléculas antigênicas de *P. lutzii*-CFA. Soros de animais reagentes a *P. brasiliensis* não reconhecem antígenos de *P. lutzii*-CFA. O mesmo ocorre em relação à molécula gp43, somente animais expostos a *P. brasiliensis* são reagentes a gp43, animais soropositivos a *P. lutzii*, não reagem a essa molécula. Neste estudo, houve dez animais que reagiram a ambas as espécies do gênero *Paracoccidioides*. O que pode caracterizar uma reação cruzada entre as espécies, sendo que neste momento não é possível afirmar para qual das duas espécies os animais apresentaram anticorpos, ou ainda se apresentaram para as duas espécies do gênero, está hipótese só poderá ser esclarecida com o avanço nos estudos da PCM.

4. CONCLUSÕES

Anticorpos específicos contra o *P. lutzii* foram detectados no estudo sorológico de equinos da região de Bagé, mostrando que o fungo é encontrado na mesorregião do Sudoeste Riograndense, Brasil.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBANO, A. P. N.; KLAFKE, G. B.; BRANDOLT, T. M.; DA HORA, V.P; MINELLO, L. F.; CAMARGO, Z. P.; XAVIER, M. O.; MEIRELES, M. C. A Wild Animals as Sentinels of *Paracoccidioides brasiliensis* in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Mycopathologia**, Netherlands, V.207, n.15, p. 177-184, 2014.

2014 Apr;177(3-4):207-15. (a)

ALBANO, A.N.; KLAFKE, G.B.; BRANDOLT, T.M.; DA HORA, V.P.; NOGUEIRA, C. E. W.; XAVIER, M.O.; MEIRELES, M.C.A. Seroepidemiology of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in horses from Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo,v.46,n.2, p.513-517,2015. (b)

BAGAGLI, E.; FRANCO, M.; BOSCO, S.M.G.; High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillo (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. **Medical Mycology**, Oxford , v. 41, n.3, p. 217-233, 2003.

CONTI-DIAZ, I.A. On the unknown ecological niche of *Paracoccidioides brasiliensis*: our hypothesis of 1989: present status and perspectives. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.49, n.4, p.131–134, 2007.

CORTE, A.C.; ITANO, E.M.; 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 Londrina**, Paraná, v.30, n.5, p. 441-446, 2009.

GEGEMBAUER, G; ARAUJO, L.M.; PEREIRA, E.F.; RODRIGUES, A.M.; PANIAGO, A.M.M; HAHN, R.C.; CAMARGO, Z.P. Serology of Paracoccidioidomycosis Due to *Paracoccidioides lutzii*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, California, v.8, n.7, s/p, 2014.

HAHN, R.C.; RODRIGUES, A.M.; FONTES, C.J.F.; NERY, A.F.; TADANO, T.; QUEIROZ-JUNIOR, L.P.; CAMARGO, Z.P. Case Report: Fatal Fungemia due to *Paracoccidioides lutzii*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, American, v. 91, n.2, p. 394-398, 2014.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. **Tratado de Micologia Médica Lacaz**. São Paulo: Sarvier, 2002.

LONDERO, A. T.; RAMOS, C. D.; LOPES, J. O. S. Progressive pulmonary paracoccidioidomycosis a study of 34 cases observed in Rio Grande do Sul (Brazil). **Mycopathologia**, Netherlands, v. 63, n.1, p. 53-56, 1978.

ONO, M.A.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; MORAIS, H.S.A. Canine paracoccidioidomycosis: a seroepidemiologic study. **Medical Mycology**, Oxford, v.39, n.6, p.277-282, 2001.

TEIXEIRA, M.M.; THEODORO, R.C.; CARVALHO, M.J.A. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, USA, v.52, n.4, p. 273-283, 2009.

TEIXEIRA, M.M.; THEODORO, R.C.; OLIVEIRA, F.F.M.; MACHADO, G.C.; HAHN, R.C.; BAGLAGLI, E.; SAN-BLAS, G.; FELIPE, M.S.S. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. **Medical Mycology**, Oxford, v.52, n.1, p. 19-28, 2013.

TEIXEIRA, M.M.; THEODORO, R.C.; NINO-VEJA, G.; BAGAGLI, E.; FELIPE, M.S.S. *Paracoccidioides* Species Complex: Ecology, Phylogeny, Sexual Reproduction, and Virulence. **PLoS Pathogens**, California, v. 10, n.10, s/p, 2014.

TERÇARIOLI, G.R.; BAGAGLI, E.; REIS, G.M. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* In soil: growth ability, conidia production and molecular detection. **Bio Med Central Microbiology**, London, v.92, n.7, s/p, 2007.

THEODORO, R.C.; TEIXEIRA, M.D.M.; FELIPE, M.S.S.; PADUAN, K.D.S.; RIBOLLA, P.M.; Genus *Paracoccidioides*: Species Recognition and Biogeographic Aspects. **PLoS ONE**, California, v.7, n.5, s/p, 2012.

VERLI, F. D.; MARINHO, S. A.; SOUZA, S. C.; ZANCANARO, M. A.; YURGEL, L. S. Clinical-epidemiologic profile of paracoccidioidomycosis at the Stomatology Department of São Lucas Hospital, Pontifícia Universidade Católica of Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v.38, n.3, p.234-237, 2005.