

AVALIAÇÃO SOROLÓGICA DA PRESENÇA DE ANTICORPOS CONTRA *Paracoccidioides brasiliensis* CANINOS DOMÉSTICOS DA REGIÃO SUL DO RIO GRANDE DO SUL

RENATA NOBRE DA FONSECA¹; ALESSANDRA JACOMELLI TELES²;
JOSIARA FURTADO MENDES³ ÂNGELA LEITZKE CABANA⁴; MELISSA
ORZECHOWSKI XAVIER⁵; MÁRIO CARLOS ARAÚJO MEIRELES

¹Universidade Federal de Pelotas – renatanobredafonseca@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – ale.teles@gmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – josiara.mds@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – cabangela@gmail.com

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

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

1. INTRODUÇÃO

Micose sistêmica endêmica de grande interesse para os países da América Latina, a paracoccidioidomicose (PCM) é causada pelos fungos termo-dimórficos do gênero *Paracoccidioides* (SHINAKAI-YASUDA et al., 2006). A inalação dos propágulos fúngicos é considerada a provável forma de infecção (RESTREPO et al., 2008) sendo o Brasil o responsável pelo maior número de casos (COUTINHO et al., 2002).

A PCM acomete principalmente trabalhadores rurais do sexo masculino, muitas vezes incapacitando-os de exercerem suas atividades profissionais. Sugere-se que o fungo *P. brasiliensis* é sapróbio do solo, embora existam muitos estudos sobre seu habitat ainda não há um consenso por parte dos pesquisadores devido à dificuldade de isolamento a partir de amostras ambientais (BAGALI et al., 2002).

De acordo com RICHINI-PEREIRA et al. (2008) e ALBANO et al. (2014), no intuito de eliminar essa dificuldade e promover o esclarecimento acerca da epidemiologia do agente, as pesquisas têm avaliado a reatividade de animais domésticos e silvestres frente ao patógeno, como forma de auxílio na elucidação de aspectos ecoepidemiológicos do micro-organismo.

Neste sentido, segundo ONO et al. (2001); SILVEIRA et al. (2006); FONTANA et al. (2010) e CORTE et al. (2012), 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.

A ecologia do *P. brasiliensis* no Rio Grande do Sul ainda foi totalmente esclarecida, mesmo sendo este estado considerado endêmico para PCM. Estudos recentes realizados por ALBANO et al. (2014) evidenciam a exposição de animais silvestres e de equinos ao *P. brasiliensis* no sul do estado. No entanto, dados mais específicos da presença do fungo em áreas urbanas nesta região não são descritos. Considerando-se 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 (SOUZA et al., 2014), 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 no estado do Rio Grande do Sul, com o objetivo de determinar a presença do fungo nestes locais.

2. METODOLOGIA

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, pluviosidade média anual de 1.379 mm e umidade relativa de cerca de 80% mm (FEE, 2015; CPP-Met-UFPEL, 2015) Foram incluídos no presente estudo 200 cães participantes de um programa de controle populacional, errantes e semidomiciliados, procedentes da cidade de Pelotas e Capão do Leão. Foram coletadas amostras de sangue e mantidas a -20°C até a realização dos testes. 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).

Para avaliação da exposição dos animais ao *P. brasiliensis* as amostras séricas foram submetidas ao teste ELISA indireto, realizado em microplacas de poliestireno de 96 poços (Kasvi, k12-096 – Imp. Curitiba-Paraná), as quais foram sensibilizadas com 27µl anti-IgG de cão conjugada à peroxidase (Sigma®, USA) na diluição 1:12.000, sendo dispostos 100µl/poço e incubadas a 4°C durante 18h (*overnight*). As placas foram então lavadas com solução salina tamponada com fosfato acrescida de 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 (Molico-Nestlé® -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 (100µl por poço), incubadas durante 1h a 37°C. Foram então adicionados 100µL de conjugado (imunoglobulina anti-IgG de cão conjugada à peroxidase) em cada poço, seguido de incubação durante 1h a 37°C. Após a lavagem final, foram adicionados 100µL de substrato (0,005µg de OPD + 11 mL de tampão citrato + 11 µL 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 µL de ácido sulfúrico 1N. A leitura da absorção foi determinada num leitor de microplacas (THERMO PLATE®) utilizando filtro de 450 nm. Todas as amostras foram testadas em triplicata.

O controle positivo, utilizado em todos os testes, foi obtido através de uma amostra previamente testada e com resultado positivo. O controle negativo correspondeu a um "Pool" de soros negativos dos animais também previamente testados. As amostras que apresentaram absorbância duas vezes maior que a do controle negativo foram consideradas positivas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 200 cães testados, 171 (85,5%) eram fêmeas, 182 (91%) eram adultos e 164 (82%) não tinham raça definida. Os cães eram procedentes de todos os bairros do município de Pelotas, sendo o Três Vendas e Fragata os principais, ambos com 58 animais. Em adição foram incluídos 04 animais de dois distritos rurais do município (Monte Bonito e Cascata) e 15 caninos do município vizinho, Capão do Leão.

A infecção por *P. brasiliensis* foi detectada em 60 caninos, e a soropositividade não diferiu em relação ao sexo, idade e raça dos animais estudados ($p>0,05$). Além disso, todas as regiões avaliadas da cidade de Pelotas apresentaram animais positivos, com exceção da Cascata que teve apenas dois

cães testados e ambos foram negativos. Os bairros Laranjal e Fragata apresentaram as maiores taxas de soropositividade, sendo, respectivamente 46,2% e 44,8% de cães soropositivos, 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% (Tabela 1).

Tabela 1: Soropositividade de *P. brasiliensis* (gp43) em caninos nos diferentes municípios de Pelotas e Capão do Leão, RS, Brasil.

Origem		Animais Soropositivos	
Município	Bairros	n/Total	%
Pelotas	Areal	1/16	6.3
	Três Vendas	15/58	25.9
	Centro	6/26	23.1
	Fragata	26/58	44.8
	Laranjal	6/13	46.2
Capão do Leão	Não informado	3/15	20
		1/10	10

Estudo semelhante realizado por Corte et al. (2012), também abordou caninos de áreas urbanas, em Rondônia, na Amazônia Ocidental Brasileira, evidenciando soropositividade de 54,8%. Soropositividade relatada por Fontana et al. (2010) 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 e periférica no norte do Estado do Paraná, descrita por Ono et al. (2001) apenas 14,8% dos caninos de zona urbana apresentaram anticorpos para *P. brasiliensis*. Ressalta-se ainda que o estudo realizado por Ono et al. (2001) 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.

4. CONCLUSÕES

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 Três Vendas 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.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBANO, A.P.N.; KLAFFE, 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.A. Wild Animals as Sentinels of *Paracoccidioides brasiliensis* in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Mycopathologia*, v.13, n.3, p. 177-184, 2014.

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

CORTE, A.C.; GENNARI, S.M.; LABRUNA, M.B.; CAMARGO, L.M.A.; ITANO, E.N.; FREIRES, R.L.; CAMARGO, Z.P.; ONO, M.A. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in dogs from Western Brazilian Amazon. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.32, n. 7, p. 649-652, 2012.

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

Dados oficiais sobre temperaturas e pluviosidade do Centro de Pesquisas e Previsões Meteorológicas da Universidade Federal de Pelotas (CPPMet- UFPel, 2015).

FEE. Fundação de Economia e Estatística. Acessado em jul. 2015. Online. Disponível em: http://www.fee.rs.gov.br/feedados/consulta/unidades_geo.asp.

FONTANA, F.F.; DOS SANTOS, C.T.B.; ESTEVES, F.M.; ROCHA, A.; FERNANDES, G.F.; DO AMARAL, C.C.; DOMINGUES, M.A.; DE CAMARGO, Z.P.; SILVA-VERGARA, M.L. Seroepidemiological survey of paracoccidioidomycosis Infection among urban and rural dogs from Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Mycopathologia**, v.169, n.3, p.159-165, 2010.

RESTREPO, A.; TOBÓN, A.M.; AGUDELO, C.A. Paracoccidioidomycosis. **Diagnosis and Treatment of Human Mycoses**, Totowa, p. 331-342, 2008.

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

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

SILVEIRA, L. H.; DOMINGOS, I. H.; KOUCHI, K.; ITANO, E. N.; SILVA, E. A.; LANDGRAF, V. O.; WERNECK, S.M.; CAMARGO, Z.P.; ONO, M. A. Serological detection of antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* in dogs with leishmaniasis. **Mycopathologia**, v.162, n.5, p.325-329, 2006.

SHIKANAI-YASUDA, M.A.; TELLES, F.Q.F.; MENDES, R.P.; COLOMBO, A.L.; MORETTI, M.L. Guidelines in paracoccidioidomycosis. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.39, n.3, p.297-310, 2006.