

INVESTIGAÇÃO SOROLÓGICA DA INFECÇÃO POR *Paracoccidioides lutzii* EM MAMÍFEROS SILVESTRES NO RIO GRANDE DO SUL

TÁBATA DIAS PEREIRA¹; JOSIARA FURTADO MENDES²; ANA PAULA NEUSCHRANK ALBANO³; ÂNGELA LEITZKE CABANA⁴; MELISSA ORZECOWSKI XAVIER⁵; MÁRIO CARLOS ARAÚJO MEIRELES⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – tabata_pd@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Pelotas – josiara.mds@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – neuschrack@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – cabangela@gmail.com

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

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

1. INTRODUÇÃO

Os fungos do gênero *Paracoccidioides* são agentes etiológicos da Paracoccidioidomicose (PCM), micose sistêmica que acomete comumente pacientes humanos, contudo, devido a possibilidade de migração e longo período de latência do fungo, isolados clínicos não refletem a distribuição espacial do mesmo (BAGAGLI et al., 2003; THEODORO et al., 2012). O patógeno ocorre provavelmente no solo gerando aerossóis através dos propágulos infecciosos (fragmentos de hifas ou conídios) que ao serem inalados podem provocar a PCM (TEIXEIRA et al. 2013), doença de grande impacto socio-econômico que afeta principalmente homens trabalhadores rurais com idade entre 30-50 anos, impedindo que eles retornem as suas funções no trabalho devido as sequelas (MENDES et al, 2003).

Pb01-like foi reclassificado como sendo uma nova espécie do gênero *Paracoccidioides*, denominada como *P. lutzii*. É encontrada nas áreas central, sudoeste e norte do Brasil e Equador (THEODORO et al. 2012). A detecção molecular das espécies deste agente no solo bem como de amostras sorológicas provenientes de animais silvestres como tatus (*Dasypus novemcinctus*) são importantes para o monitoramento ambiental e conhecimento da distribuição geográfica (ARANTES et al. 2016). Os patógenos do gênero têm sido descritos através de exames micológico, histopatológico, sorológico ou testes moleculares em outras espécies de mamíferos como: *Saimiri sciureus* (macaco) (JOHNSON et al 1977), *Canis lupus familiaris* (cão) (RICCI et al, 2004), *Equus caballus* (cavalo) (CONTE-DIAZ, et al 1972) entre outros.

A identificação de áreas de risco associadas as diferentes espécies e/ou genótipos pode contribuir para o melhor entendimento da biogeografia e auxiliar no diagnóstico, terapia e prognóstico para a PCM. (BAGAGLI et al.2003; THEODORO et al. 2012). A descoberta da nova espécie do gênero *Paracoccidioides*, mostra a importância que representa o mapeamento do agente. Estudos recentes utilizando animais como sentinelas, comprovaram pela primeira vez a presença de *P. brasiliensis* no estado (ALBANO et al., 2014; 2015; TELES et al., 2015). Sendo assim, o objetivo deste estudo foi verificar a presença de *P. lutzii* através da sorologia de mamíferos silvestres no Rio Grande do Sul (RS).

2. METODOLOGIA

O estudo foi realizado com amostras séricas de mamíferos silvestres provenientes de três diferentes mesorregiões do RS, mesorregião Sudoeste, mesorregião Metropolitana da Cidade de Porto Alegre e mesorregião Sudeste.

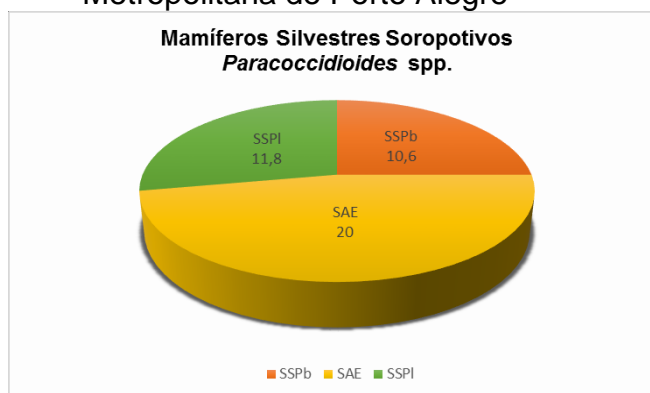
Os animais foram recebidos no Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre de Pelotas, RS, localizado no Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) e pertenciam a seis ordens distintas: Primatas, Rodentia, Carnívora, Marsupialia, Xenarta e Artiodactila.

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. Foram bloqueadas com Leite desnatado em pó (diluído 1:20 em PBS) por 1h a 37°C. Após adicionados os soros na diluição 1:50 em PBS-T, incubadas durante 1h a 37°C. Adicionou-se 100 μ L de conjugado (proteína G e A - 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) com filtro de 450 nm. Todas as amostras foram testadas em triplicata. O controle positivo foi obtido através de uma amostra fortemente positiva de um animal previamente testada (OD: 0,20 a 0,44), o controle negativo correspondeu a um "Pool" de soros negativos também previamente testados (OD de 0,05 a 0,08). As amostras que apresentaram absorbância duas vezes maior que a do controle negativo foram consideradas positivas. Foi realizada análise descritiva dos dados utilizando o teste do Chi-Quadrado a partir do programa SPSS® 20.0 e considerando o índice de significância $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Soropositividade para IgG anti-CFA de *P. lutzii* foi detectada em 31,8% dos mamíferos silvestres (27/85) testados. Destes 17(20%) tinham também IgG anti-gp-43 do *P. brasiliensis* (ALBANO et al., 2014; 2015 e TELES et al., 2015). Contudo, a soropositividade somente para *P. lutzii* ocorreu em 11,8% (10/85) dos animais silvestres estudados (Figura 1).

Figura 1: Soropositividade no ELISA para detecção de IgG anti-*Paracoccidioides* spp. de mamíferos silvestres provenientes das mesorregiões Sudeste, Sudoeste e Metropolitana de Porto Alegre



SSPb = Soropositivos somente para *P. brasiliensis*
SAE = Soropositivos para ambas espécies
SSPI = Soropositivos somente para *P. lutzii*

A variável origem não teve associação com a soropositividade dos animais estudados, não tendo influência significativa nos resultados ($p=0,249$).

Dos 27 animais reagentes neste estudo para IgG anti-CFA de *P. lutzii*, 17 foram igualmente positivos no ELISA para detecção de anticorpos anti-gp43 de *P. brasiliensis* (ALBANO et al., 2014; 2015 e TELES et al., 2015). De acordo com estudo realizado por Gegembauer et al. 2014, anticorpos anti-gp43 só são detectados em indivíduos infectados por *P. brasiliensis*, no entanto, a detecção de anticorpos anti-*P.lutzii*-CFA pode ocorrer na infecção por ambas as espécies (*P. brasiliensis* e *P. lutzii*) Nesse contexto, podemos afirmar que ao menos 10 dos 27 animais positivos em nosso estudo foram expostos ao *P. lutzii*, nos quais foram encontrados somente anticorpos anti-CFA, sendo os mesmos negativos quando testados para IgG anti-gp43.

P. lutzii é o novo agente da PCM, e, segundo estudos recentes, a espécie fúngica tem seu epicentro na região centro-oeste do Brasil, ao contrário de *P. brasiliensis* que é descrito nas regiões Sul, Sudeste e norte do país (TEIXEIRA et al., 2013; THEODORO et al., 2012; ARANTES et al., 2013; GEGEMBAUER et al., 2014; HAHN et al., 2014). Portanto, esta pesquisa, parte de um projeto de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Veterinária na UFPEL, é a primeira a descrever animais que apresentaram anticorpos específicos contra *P. lutzii* no RS, sugerindo que o fungo está presente também no Sul do Brasil.

4. CONCLUSÕES

Anticorpos específicos contra *P.lutzii* foram detectados em mamíferos silvestres nas mesoregiões Metropolitana de Porto Alegre, Sudeste e Sudoeste do RS. Este estudo contribui com uma melhor compreensão da ecologia do agente sugerindo que o mesmo não está restrito às regiões específicas do país como previamente cogitado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARANTES, T. D.; THEODORO, R. C.; DE MELO TEIXEIRA, M.; BOSCO, S. D. M. G. & BAGAGLI, E. Environmental Mapping of *Paracoccidioides* spp. in Brazil Reveals New Clues into Genetic Diversity, Biogeography and Wild Host Association. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 10, n. 4, p. 1-18, 2016.

ARANTES, T. D.; THEODORO, R. C.; MACORIS, S. A. G. & BAGAGLI, E. Detection of *Paracoccidioides* spp. in environmental aerosol samples. **Medical Mycology**, Oxford, v. 51, n. 1, p. 83-92, 2013.

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**, The Hague, v. 177, n. 3-4, p. 207-215, 2014.

ALBANO, A. P. 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.

BAGAGLI, E.; FRANCO, M.; BOSCO, S. D. M.; HEBELER-BARBOSA, F.; TRINCA, L. A. & MONTENEGRO, M. R. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. **Medical mycology**, Oxford, v. 41, n. 3, p. 217-223, 2003.

CONTI-DIAZ, I. A.; ALVAREZ, B. J.; GEZUELE, E.; GONZÁLEZ, M. H.; DUARTE, J. & FALCON, J. Intradermal reaction survey with paracoccidioidin and histoplasmin in horses. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 14, n. 6, 372, 1972.

GEGEMBAUER, G.; ARAUJO, L. M.; PEREIRA, E. F.; RODRIGUES, A. M.; PANIAGO, A. M. M.; HAHN, R. C. & de CAMARGO, Z. P. Serology of paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides lutzii*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 8, n. 7, p. e2986, 2014.

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

JOHNSON, W. D. & LANG, C. M. Paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis) in a squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). **Veterinary pathology**, Basel, v. 14, n. 4, p. 368, 1977.

MENDES, R. P.; SHIKANAI-YASUDA, M. A. Paracoccidioidomicose. In: Cimerman S, Cimerman B, (eds). **Medicina Tropical**, Atheneu, São Paulo, v.1, n.4, p. 505 – 545, 2003.

RICCI, G.; Mota, F. T.; WAKAMATSU, A.; SERAFIM, R. C.; BORRA, R. C. & FRANCO, M. Canine paracoccidioidomycosis. **Medical mycology**, Oxford, v. 42, n.4, p. 379-383, 2004.

TELES, A. J.; KLAFKE, G. B.; CABANA, A. L.; ALBANO, A. P. N.; XAVIER, M. O.; MEIRELES, M. C. A. Serological Investigation of *Paracoccidioides brasiliensis* Infection in Dogs from Southern Rio Grande do Sul, Brazil. **Mycopathologia**, The Hague, v.181, n.3, p.323-328, 2016.

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**, San Diego, v. 52, n. 2, p. 273-283, 2009.

THEODORO, R. C.; TEIXEIRA, M. M.; FELIPE, M. S. S.; PADUAN, K. S.; RIBOLLA, P. M.; SAN-BLAS, G. & BAGAGLI, E. Genus *Paracoccidioides*: species recognition and biogeographic aspects. **PloS one**, San Francisco, v. 7, n. 5, p. e37694, 2012.