



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



KARINE MATTOS

**ABORDAGEM MOLECULAR APLICADA À
PARACOCCIDIOIDOMICOSE: IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES
DO GÊNERO *Paracoccidioides* EM MATOGROSSO DO SUL
PARA O APRIMORAMENTO DO IMUNODIAGNÓSTICO**

CAMPO GRANDE
2023

KARINE MATTOS

**ABORDAGEM MOLECULAR APLICADA À
PARACOCCIDIOIDOMICOSE: IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES
DO GÊNERO *Paracoccidioides* EM MATOGROSSO DO SUL
PARA O APRIMORAMENTO DO IMUNODIAGNÓSTICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Doenças Infecciosas e Parasitárias da
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para
obtenção do título de Doutora.

Orientadora: Prof^a Dr^a Anamaria Mello Miranda
Paniago

Coorientadora: Prof^a Dr^a Simone Schneider Weber

CAMPO GRANDE
2023

KARINE MATTOS

**ABORDAGEM MOLECULAR APLICADA À PARACOCCIDIOIDOMICOSE:
IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DO GÊNERO *Paracoccidioides* EM MATO
GROSSO DO SUL PARA O APRIMORAMENTO DO IMUNODIAGNÓSTICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para obtenção do título de Doutora.

Campo Grande, 08 de agosto de 2023.

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Anamaria Mello Miranda Paniago - UFMS (orientadora)

Dra. Marilene Rodrigues Chang– UFMS (titular)

Dr. Clayton Luiz Borges - UFG (titular)

Dra. Luana Rossato - UFGD (titular)

Dra. Rosane Christine Hahn – UFMT (titular)

Dr. James Venturini – UFMS (suplente)

Dra. Sílvia Naomi de Oliveira Uehara – HRMS (suplente)

DEDICATÓRIA

Para Sophia, Lorena e Aurora.
Tudo é por elas e para elas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço às minhas filhas, Sophia Mattos O. Rodrigues, Lorena Mattos O. Rodrigues e Aurora Mattos O. Rodrigues, por serem a base que me fortalece, por compreenderem minha ausência e apoiarem meus sonhos. Amo vocês mais que tudo neste mundo!

Agradeço aos meus pais, Adelir B. Mattos e Valdir Mattos, às minhas irmãs Karoline Mattos e Letícia Souza Jung, ao meu cunhado Gustavo Blasius Guizoni e à minha sobrinha Mariana Mattos Guizoni, por me acolherem e auxiliarem em todo esse processo. Este sonho não seria possível sem vocês.

Agradeço à minha orientadora Prof^a. Dr^a. Anamaria Melo Miranda Paniago e coorientadora Prof^a. Dr^a. Simone Schneider Weber por me incentivarem e compartilharem seus conhecimentos comigo. Mais que orientadoras, muitas vezes foram minhas “mães” em Mato Grosso do Sul. Obrigada pelo suporte!

Agradeço ao Prof. Dr. James Venturini por gentilmente ceder seu laboratório para realização deste estudo, bem como por toda sabedoria compartilhada e orientação na realização dos experimentos.

Agradeço ao Prof. Dr. Clayton Luiz Borges por compartilhar seus conhecimentos e me acolher em seu grupo de pesquisa. Este vínculo foi muito importante para meu crescimento profissional.

Agradeço ao Dr. Tiago Cocio e ao Prof. Dr. Roberto Martinez pelos ensinamentos e suporte realização dos experimentos.

Agradeço ao Rafael Ovando Fraiha, à Maína de Oliveira Nunes e à Gláucia Moreira Espíndola Lima, farmacêuticos-bioquímicos do laboratório de Micologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pelo auxílio na busca pelos dados dos pacientes e manutenção das cepas utilizadas nos experimentos.

Agradeço às minhas amigas Alessandra Carla Sampaio de Souza e Patrícia Daniele Matos Ferreira Gomes pelo suporte, amizade e companheirismo na realização dos experimentos. Vocês foram essenciais nessa jornada.

"São nossas escolhas, mais do que as nossas capacidades, que mostram quem realmente somos" (J.K. Rowling)

RESUMO

Abordagem Molecular Aplicada à Paracoccidioidomicose: Identificação das Espécies do Gênero *Paracoccidioides* em Mato Grosso do Sul e aprimoramento do Imunodiagnóstico

RESUMO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica ocasionada pelas espécies *P. brasiliensis* sensu stricto, *P. americana*, *P. restrepiensis*, *P. venezuelensis* e *P. lutzii*. A doença é restrita à América Latina, sendo que cerca de 80% dos casos ocorrem no Brasil, principalmente nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste. No entanto, apesar de a região Centro-Oeste do Brasil ser área endêmica de PCM, até o momento a distribuição das espécies envolvidas na etiologia da PCM em Mato Grosso do Sul foi pouco estudada. A reatividade no teste sorológico de imunodifusão dupla (IDD), que é usado não só no diagnóstico, mas também como um critério de cura, pode ser espécie-específica. Objetivou-se neste estudo, através de uma abordagem molecular, conhecer as espécies do gênero *Paracoccidioides* envolvidas na etiologia da PCM no Estado, bem como compreender se a espécie filogenética circulante exerce influência no perfil de reatividade na IDD. Para tanto, foram incluídos treze novos casos de PCM residentes no Mato Grosso do Sul, no período de 2016 a 2019. Destes, todos os indivíduos eram do sexo masculino, a maioria desenvolvia ou já desenvolveu atividade rural, possuíam idade entre 17 e 59 anos, sendo que 11 (84,6%) eram acima de 40 anos. A partir destes casos, foram obtidos dezesseis isolados clínicos e seus DNAs genômicos foram genotipados por tub1-PCR-RFLP. Realizou-se a IDD utilizando exoantígenos das cepas genotipadas neste estudo. Verificou-se que a maioria dos isolados (11/16; 68,8%) eram de *Paracoccidioides brasiliensis* sensu stricto, seguido por *P. restrepiensis* (4/16; 25,0%) e *P. lutzii* (1/16; 6,2%). Com relação aos dados clínicos ou epidemiológicos, não houve diferenças entre casos de PCM com diferentes espécies de *Paracoccidioides*. Em cerca de 30% dos casos, a IDD apresentou resultados falso-negativos. Pacientes com PCM por *P. brasiliensis* e *P. restrepiensis*, ambas do complexo *P. brasiliensis*, apresentam sororreatividade no teste IDD frente a antígenos produzidos a partir dessas espécies, indiferentemente; enquanto a sororreação frente a antígenos produzidos a partir de *P. lutzii* foi baixa. Interessantemente, o único paciente com PCM por *P. lutzii* foi sororreagente apenas a antígeno de *P. lutzii*, indicando uma reação espécie-específica. Baseado nesses resultados, pode-se concluir que *P. brasiliensis* sensu stricto é a espécie predominante em Mato Grosso do Sul. Além disso, o uso de antígenos provenientes de diferentes espécies de *Paracoccidioides* spp aumentam a sensibilidade do teste IDD em pacientes desse estado, o que aprimora não só o diagnóstico, mas principalmente o critério sorológico de cura.

Palavras-chave: Micose sistêmica; *Paracoccidioides* spp; Paracoccidioidomicose; Imunodifusão

Molecular Approach Applied to Paracoccidioidomycosis: Identification of *Paracoccidioides* Species in Mato Grosso do Sul and Improvement of Immunodiagnosis

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis caused by the species *P. brasiliensis* sensu stricto, *P. americana*, *P. restrepiensis*, *P. venezuelensis* and *P. lutzii*. The disease is restricted to Latin America, with approximately 80% of cases occurring in Brazil, mainly in the South, Southeast and Midwest regions. However, the distribution of the species involved in the etiology of PCM in Mato Grosso do Sul, a region in Midwest Brazil known for being an endemic area for PCM, is poorly understood. The reactivity in the serological double immunodiffusion test (DID), which is used to diagnosis and cure criterion, can be species-specific. The objective of this study is to determine the species of the genus *Paracoccidioides* involved in the etiology of PCM in the State and to investigate whether the circulating phylogenetic species influences the reactivity profile in DID. For this purpose, thirteen new cases of PCM residing in Mato Grosso do Sul, in the period from 2016 to 2019, were included. All of these were male, most of whom were engaged in or had previously engaged in rural activity. The age ranged was between 17 and 59 years old, with 11 (84.6%) of the cases being over 40 years old. Sixteen clinical isolates were obtained from these cases, and their genomic DNA were genotyped by tub1-PCR-RFLP. The DID test was conducted using exoantigens from the strains genotyped in this study. The findings revealed that the majority of the isolates (11/16; 68.8%) belonged to *Paracoccidioides brasiliensis* sensu stricto, followed by *P. restrepiensis* (4/16; 25.0%) and *P. lutzii* (1/16; 6.2%). No differences were observed in the clinical and epidemiological data, among the cases of PCM caused by different species of *Paracoccidioides*. Approximately 30% of the cases resulted in false-negative results in the DID test. Patients with PCM caused by *P. brasiliensis* and *P. restrepiensis*, both belonging to the *P. brasiliensis* complex, showed no differences in seroreactivity in the DID test against antigens produced from these species; while seroreaction against antigens produced from *P. lutzii* was low. Interestingly, the only patient with *P. lutzii* PCM was seroreactive exclusively to *P. lutzii* antigen, indicating a species-specific reaction. Based on these findings, it can be concluded that *P. brasiliensis* sensu stricto is the predominant specie in this Mato Grosso do Sul. Furthermore, using antigens from different species of *Paracoccidioides* spp increase the sensitivity of the DID test in patients from this region, thereby improving both the accuracy of diagnosis and the serological criterion for determining cure.

Keywords: Systemic mycosis; *Paracoccidioides* spp; Paracoccidioidomycosis; Immunodiffusion.

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Distribuição geográfica das áreas endêmicas de paracoccidioidomicose na América Latina.....	16
Figura 2-	Propagação dos agentes etiológicos e contágio da PCM.....	17
Figura 3-	Principais técnicas na identificação e caracterização molecular/proteômica de espécies de <i>Paracoccidioides</i>	24
Figura 4-	PCR–RFLP para diferenciação de espécies do gênero <i>Paracoccidioides</i>	26

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
µm	Micrometros
CIE	Contraimunoeletroforese
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FISH	Hibridização in situ fluorescente
FT-IR	Espectroscopia por infravermelho com transformada de Fourier
GP43	Glicoproteína de 43 kDa
HU-UFMS	Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
IDD	Imunodifusão dupla
kDa	Quilodalton
LAMP	Amplificação isotérmica mediada por loop
MALDI-TOF	Espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz
MLSA	Análise de sequência multilocus
MLST	Multilocus Sequence Typing
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PCM	Paracoccidioidomicose
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCR-RFLP	<i>Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
PS2	<i>Paracoccidioides species 2</i>
PS3	<i>Paracoccidioides species 3</i>
PS4	<i>Paracoccidioides species 4</i>
qPCR	<i>Polymerase Chain Reaction real time</i>
S1	Species 1
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
Spp.	Espécies
SSR	Repetições de sequência única
TUB1	α – Tubulina
WB	Western Blot

SUMÁRIO

Capítulo 1 – Introdução

Fundamentação teórica	16
Paracoccidioidomicose	16
O gênero <i>Paracoccidioides</i>	19
Identificação molecular de <i>Paracoccidioides</i> spp.	22
Testes sorológicos na PCM	27
Objetivos	32
Objetivo Geral	32
Objetivos Específicos	32
Referências	33

Capítulo 2 – Artigo

Introduction	43
Materials and methods	45
Results	48
Discussion	54
References	66

Capítulo 3 – Conclusão

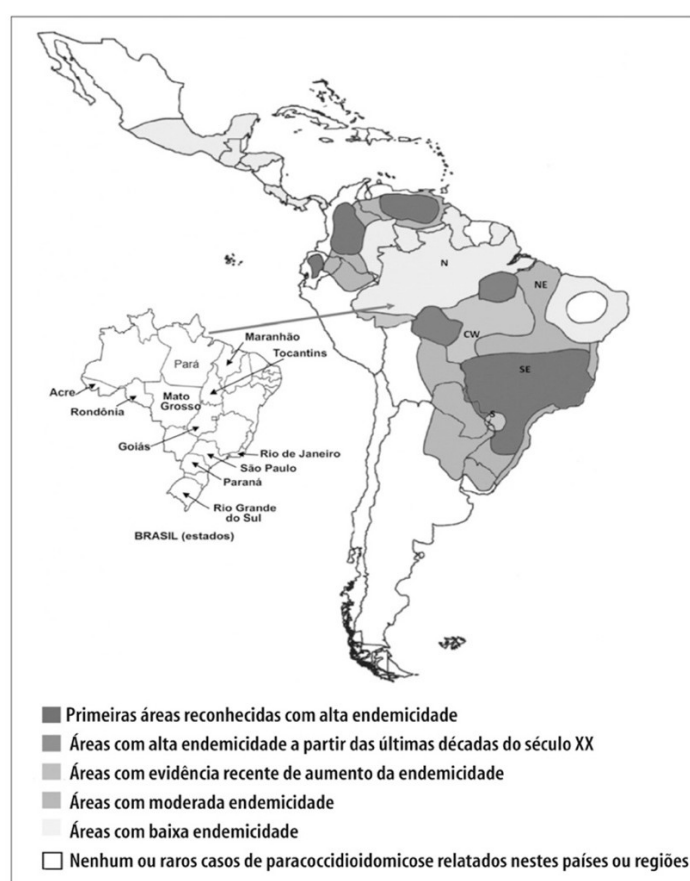
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

1. Fundamentação teórica

1.1 Paracoccidioidomicose

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma infecção fúngica sistêmica, restrita a América Latina, com maior incidência em países como Brasil, Colômbia, Argentina e Venezuela (Martinez, 2017). Em sua grande maioria, cerca de 80% dos casos, ocorre no Brasil, principalmente nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (Martinez, 2017; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2018; Hahn *et al.*, 2019). Com casos também sendo registrados nas regiões Norte e Nordeste, como Maranhão, Tocantins, Acre, Pará e Rondônia (Matos *et al.*, 2012; Vieira Gde *et al.*, 2014; Martinez, 2017) (**Figura 1**).

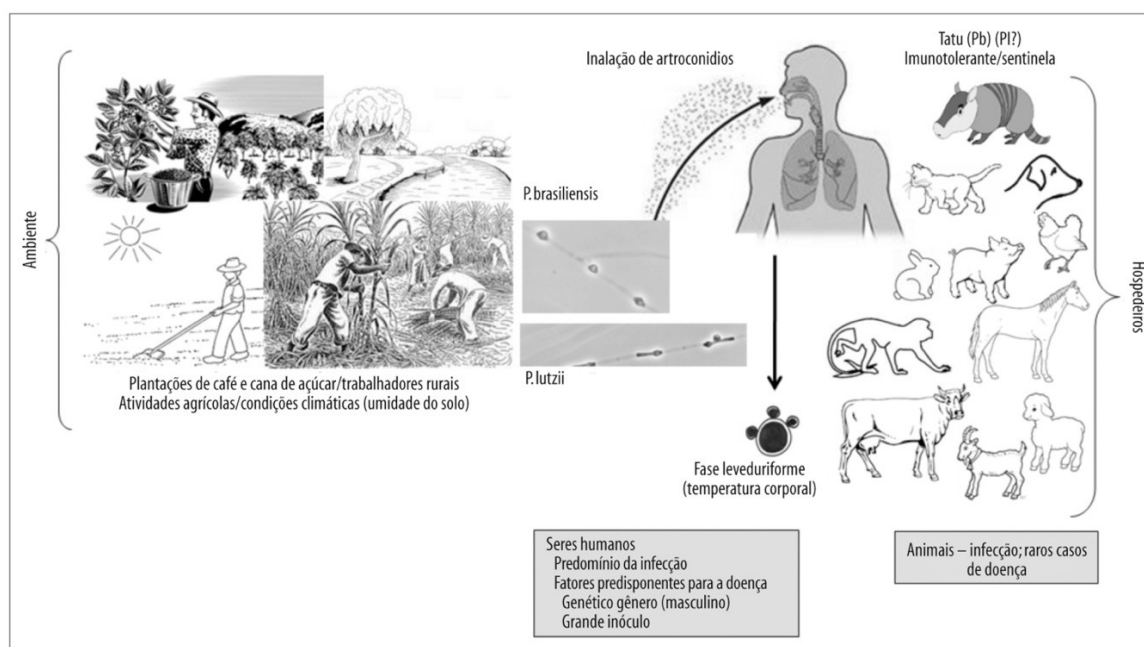
Figura 1 – Distribuição geográfica das áreas endêmicas de paracoccidioidomicose na América Latina.



Fonte: Martinez (2017).

Esta doença ocorre prioritariamente em pessoas da área rural, que trabalham na agricultura ou em atividades que envolvam o manejo do solo. Por conseguinte, a infecção é adquirida quando o indivíduo manipula o solo possivelmente contaminado com propágulos de *Paracoccidioides* spp. (artroconídeos). Como demonstrado na **Figura 2**, estes propágulos, ao serem inalados, entram em contato com os alvéolos pulmonares e transitam para a forma leveduriforme (patogênica), podendo então se disseminar para outros locais do organismo via sistema linfático e/ou hematológico (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2018; Hahn *et al.*, 2022).

Figura 2 – Propagação dos agentes etiológicos e contágio da PCM.



Fonte: Mendes, R. P. e Bagagli, E. Reproduzido de II Consenso Brasileiro em Paracoccidioidomicose – (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2018).

O diagnóstico clínico da PCM é considerado um desafio, pois a doença apresenta características semelhantes a outras doenças, como leishmaniose cutânea, neoplasias, tuberculose e histoplasmose (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2018). Assim, seu diagnóstico é feito pela visualização microscópica, biópsia de tecido e/ou isolamento e cultura do fungo e, indiretamente, pela detecção de anticorpos em testes sorológicos,

onde a reatividade e especificidade dos testes estão diretamente relacionados à preparação dos exoantígenos produzidos *in house*. Ainda, segundo Camargo *et al.* (2003), as análises sorológicas podem apresentar reações cruzadas com outros microrganismos, tais como: *Histoplasma* spp., *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. Portanto, considera-se como diagnóstico padrão-ouro a observação de estruturas sugestivas de *Paracoccidioides* em exame a fresco, cultura ou histopatológico (De Camargo e Rodrigues, 2019).

O Consenso Brasileiro de Paracoccidioidomicose (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2018) sugere que, para fins de vigilância epidemiológica, os casos com sintomas sugestivos devam ser definidos da seguinte forma: a) Caso suspeito, quando após a exclusão de outras doenças com sintomatologia clínica semelhante; b) Caso provável, quando além das manifestações clínicas da paracoccidioidomicose, há a presença de títulos de anticorpos *Paracoccidioides* em testes sorológicos, preferencialmente em IDD ou contraimuno eletroforese (CIE); c) Caso confirmado, quando houver manifestações clínicas compatíveis e presença de estruturas sugestivas de *Paracoccidioides* spp. em técnicas microbiológicas e histopatológicas.

A infecção por *Paracoccidioides* é na maior parte das vezes assintomática e sem quaisquer repercussões clínicas, podendo o fungo permanecer em latência por longos períodos, sendo esta denominada de infecção paracoccidioidica. Quando ocorre lesões teciduais e manifestações clínicas, recebe a denominação de PCM, que se manifesta de duas principais formas: forma aguda/subaguda e crônica (Mendes *et al.*, 2017). A evolução de infecção paracoccidioidica para PCM, depende de fatores ligados à resposta imunológica do hospedeiro, interação parasita-hospedeiro e virulência do fungo (Lacaz *et al.*, 2002).

A forma crônica é responsável por cerca de 90% dos casos de PCM e aflige, em sua maioria, indivíduos do sexo masculino, com faixa etária entre 30 e 60 anos e que desenvolvam algum tipo de atividade associada a agricultura. Apresenta progressão lenta e pode se manifestar em apenas um órgão (geralmente o pulmão) ou atingir mais de um órgão simultaneamente. Nos casos graves observa-se uma perda de peso superior a 10%, grande comprometimento pulmonar, assim como de

glândulas adrenais, sistema nervoso central, medula e linfonodos (Mendes *et al.*, 2017).

Por sua vez, na forma aguda-subaguda ocorre uma progressão rápida da doença, atingindo órgãos do sistema mononuclear fagocitário, tais como linfonodos, baço, fígado, ossos e medula óssea, com manifestações gastrointestinais, linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia, bem como lesões cutâneas. Representando cerca de 10% dos casos desta doença, a forma aguda-subaguda é considerada mais grave, com significativas taxas de mortalidade, e afeta, principalmente, crianças, adolescentes e adultos jovens de ambos os sexos (Bellissimo-Rodrigues *et al.*, 2013; Mendes *et al.*, 2017).

Na infecção paracoccidioidica, observa-se positividade na intradermorreação com paracoccidioidina, um antígeno obtido de *Paracoccidioides* spp.. Por meio deste, observa-se reações intradérmicas intensas em indivíduos saudáveis, assintomáticos e previamente infectados (Franco *et al.*, 1987; Marques, 2012). A infecção paracoccidioidica tem sido observada em alta prevalência em algumas regiões do Brasil (Marques *et al.*, 2013; Magalhães *et al.*, 2014)

Os principais medicamentos para o tratamento da paracoccidioidomicose são itraconazol, cotrimoxazol (combinação de sulfametoxazol/trimetropim) e anfotericina B. Interação medicamentosa, efeitos adversos, terapia de longa duração, são alguns dos fatores que devem ser avaliados na prática clínica e que irão definir qual o fármaco de escolha (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2018; Hahn *et al.*, 2022).

1.2 O gênero *Paracoccidioides*

O agente etiológico da PCM, *Paracoccidioides* spp., foi inicialmente descrito por Adolfo Lutz em 1908 após o isolamento e cultura de um microorganismo presente em lesões orais e granulomas ganglionares de alguns pacientes no Instituto Biológico de São Paulo (Brasil). Pertencem ao reino *Fungi*, filo *Ascomycota*, ordem *Onygenales*, família *Ajellomycetaceae* (*Onygenaceae*). São fungos termodimórficos, capazes de

crescer na forma micelial (infectante) sob condições ambientais para a vida saprobiótica ou quando cultivado em temperatura ambiente (entre 18 e 23°C). Na forma de levedura (patogênica) podem crescer em tecidos de hospedeiros ou quando cultivados em temperatura em torno de 36°C (Restrepo, 1985; Bagagli *et al.*, 2006). O dimorfismo é identificado por filamentos septados com conídios terminais ou intercalares na fase micelial ou brotos múltiplos de uma célula-mãe, semelhante a uma aparência de “roda de leme”, na fase de levedura (Restrepo, 1985; Gonzalez e Hernandez, 2016). Acredita-se que esta capacidade de alteração morfológica da fase miceliana para leveduriforme seja um mecanismo importante para virulência e patogenicidade destes fungos, resultando em alterações da parede celular, expressão de fatores de virulência e de moléculas antigênicas (Kanetsuna *et al.*, 1969; Theodoro *et al.*, 2012).

Microscopicamente, a forma miceliana apresenta hifas finas, septadas, hialinas, com múltiplos núcleos, medindo de 1 a 3 µm e com raros clamidósporos terminais ou intercalares. Já a forma leveduriforme exhibe células esféricas ou ovais com múltiplos brotamentos, medindo de 2-30 µm de diâmetro e múltiplos núcleos (Restrepo, 1978; Angela Restrepo, 1988)

O habitat natural deste fungo ainda não é conhecido. No entanto, alguns estudos descreveram que se adapta bem a solos úmidos e com pH ácido, suportando a hipótese que este é seu ambiente natural. Nesse ambiente, o fungo cresce em sua fase micelial, produzindo conídios que posteriormente poderão ser inalados sob a forma de aerossol, alcançando os alvéolos pulmonares (Restrepo, 1985; Franco *et al.*, 1993; Silva-Vergara *et al.*, 1998). Além do isolamento do solo, é também descrito sua presença em animais domésticos e selvagens como cachorros, pinguins (Garcia *et al.*, 1993), morcegos (Grose e Tamsitt, 1965) e, principalmente, em tatus que são considerados como seu reservatório natural (Corredor *et al.*, 2005; Bagagli *et al.*, 2006).

Desde a descoberta, há mais de dez décadas, até 2009 o gênero *Paracoccidioides* foi descrito como composto por apenas uma espécie: *P. brasiliensis*. Posteriormente, Teixeira *et al.* (2009), avaliando um grupo de *Paracoccidioides* chamado como “Pb01-like” que apresentavam a mesma genealogia, reconheceram a

existência de uma nova espécie, que foi denominada de *P. lutzii* em homenagem a Adolpho Lutz.

Ainda antes da descrição da espécie *P. lutzii*, em alguns Estados do Brasil, como Rondônia e Mato Grosso, observava-se uma baixa reatividade dos testes sorológicos frente aos antígenos de isolados de *P. brasiliensis* obtidos de pacientes de São Paulo. Fato bem demonstrado por Baptista Júnior e colaboradores (2010), que compararam a sensibilidade do teste de imunodifusão utilizando exoantígenos produzidos a partir de cepas das duas diferentes regiões, apontando para possíveis diferenças antigênicas provavelmente relacionadas a peculiaridades filogenéticas. Neste sentido, estudos baseados em análises filogenéticas foram realizados e descobriu-se uma grande variabilidade de espécies dentro do complexo *P. brasiliensis*, amplamente distribuídas na América Latina, sendo: S1 (S1a e S1b), PS2, PS3 e PS4, que posteriormente foram denominados de *P. brasiliensis*, *P. americana*, *P. restrepiensis* e *P. venezuelensis*, respectivamente (Matute *et al.*, 2006; Teixeira *et al.*, 2009; Turissini *et al.*, 2017).

Alguns fatores dificultam a determinação da distribuição geográfica de *Paracoccidioides* spp. tais como: i) o difícil isolamento em cultura a partir de amostras de solo; ii) a praticamente ausente ocorrência de formas pulmonares agudas; e iii) a impossibilidade de definir o local de aquisição da infecção da forma crônica devido ao seu longo período de latência e frequentes migrações dos pacientes. Estudos com animais ou pacientes com a forma aguda-subaguda ou, ainda, com detecção de material genético do fungo direto de amostras de solo têm sido úteis para elucidar a distribuição de cada espécie nas áreas endêmicas (Arantes *et al.*, 2016; de Macedo *et al.*, 2019; Oliveira *et al.*, 2023).

P. brasiliensis pode ser encontrado em toda a América do Sul, principalmente no Sul e Sudeste do Brasil, Argentina e Paraguai (Gegembauer *et al.*, 2014; Hrycyk *et al.*, 2018; De Macedo *et al.*, 2019). *P. americana* tem distribuição irregular, com casos descritos no Sul e Sudeste do Brasil e na Venezuela (Matute *et al.*, 2006; Theodoro *et al.*, 2012; De Macedo *et al.*, 2016; Roberto *et al.*, 2016; Hrycyk *et al.*, 2018; De Macedo *et al.*, 2019). Por um tempo *P. restrepiensis* foi descrito como endêmico e restrito à Colômbia (Matute *et al.*, 2006). No entanto, estudos recentes

descreveram sua presença em isolados de São Paulo (Cocio *et al.*, 2020; Pereira *et al.*, 2021). Por sua vez, até o momento estudos demonstram que *P. venezuelensis* é uma espécie restrita à Venezuela (Matute *et al.*, 2006; Munoz *et al.*, 2016; Turissini *et al.*, 2017).

As espécies do complexo *P. brasiliensis* não são comumente encontradas na região Centro-Oeste do Brasil. Por outro lado, a espécie *P. lutzii*, apesar de ainda não possuir sua distribuição geográfica totalmente conhecida, é considerada endêmica no Mato Grosso e Goiás (Marques-Da-Silva *et al.*, 2012; Theodoro *et al.*, 2012; Gegembauer *et al.*, 2014; Teixeira Mde *et al.*, 2014; Hahn *et al.*, 2019). Porém, estudo realizado com antígenos de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* (Pereira *et al.*, 2020), demonstrou que cerca de 20% dos casos de PCM em Mato Grosso do Sul são provavelmente devido à infecção por *P. lutzii*. Além da região Centro-Oeste, há também descrição desta espécie nas regiões Sul e Sudeste, demonstrando que *P. lutzii* não se encontra restrito a região que é considerado endêmico (Takayama *et al.*, 2010; Arantes *et al.*, 2016).

1.3 Identificação molecular de *Paracoccidioides* spp.

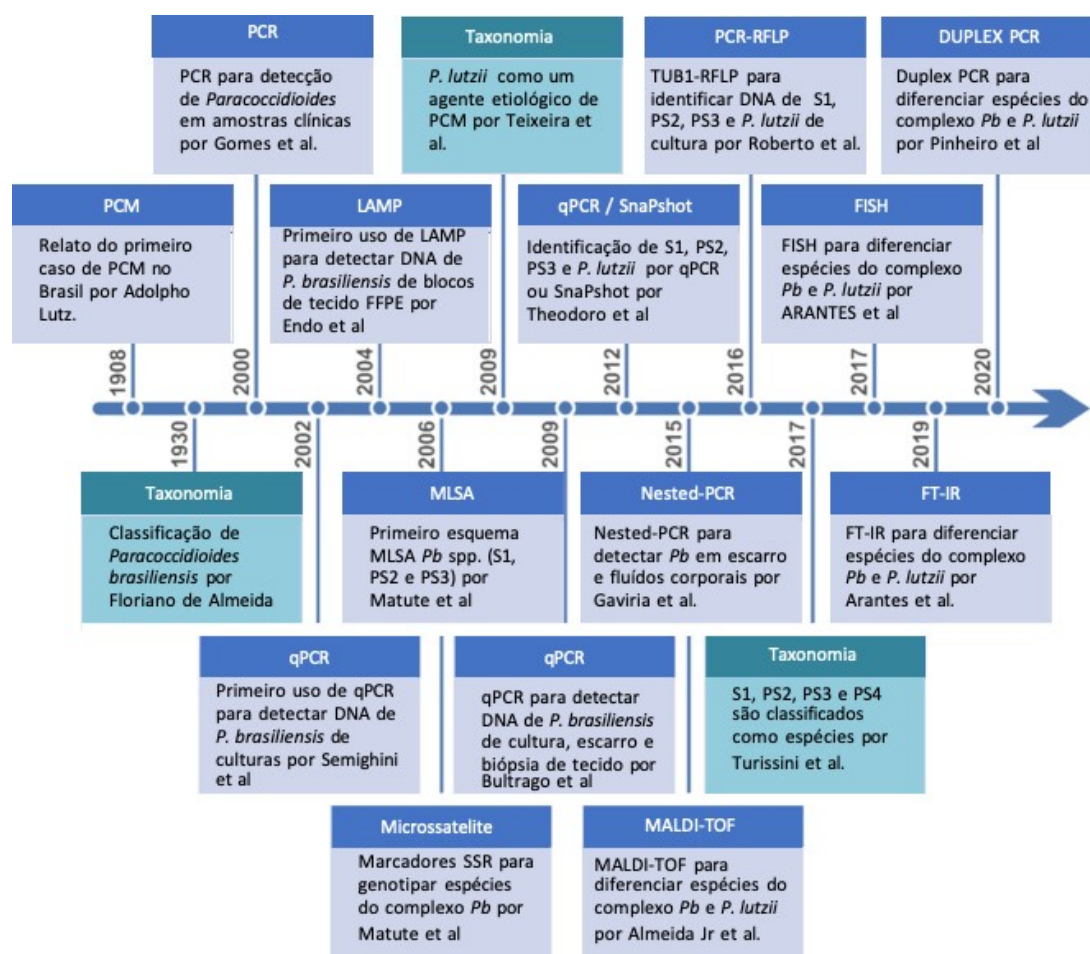
Métodos moleculares têm sido utilizados para o diagnóstico da PCM a partir de amostras clínicas (Gomes *et al.*, 2000), mas principalmente na identificação das espécies filogenéticas do gênero *Paracoccidioides* isolados de cultura (Matute *et al.*, 2006; Turissini *et al.*, 2017).

Algumas metodologias, como PCR, Nested-PCR, qPCR (PCR em tempo real), PCR-RFLP, microssatélites, MLST (*Multilocus Sequence Typing*) e sequenciamento do genoma completo são utilizadas para compreensão de questões filogenéticas e evolutivas das espécies de *Paracoccidioides*, bem como de dados epidemiológicos e identificação das espécies causadoras da PCM (Semighini *et al.*, 2002; Nascimento *et al.*, 2004; Matute *et al.*, 2006; Salgado-Salazar *et al.*, 2010; Arantes *et al.*, 2016; Turissini *et al.*, 2017; De Melo Teixeira *et al.*, 2020).

Devido ao alto custo e necessidade de profissionais capacitados, poucas dessas tecnologias estão disponíveis para uso na rotina clínica para diferenciação das espécies isoladas em cultura. Por este fato, a falta de conhecimento da espécie envolvida na etiologia de um caso de PCM impede o desenvolvimento de pesquisas que possam atender a importantes demandas do manejo clínico, tais como o aprimoramento de testes sorológicos espécie-específicos e a avaliação de diferenças na resposta aos medicamentos antifúngicos.

A **Figura 3** ilustra os principais marcos do desenvolvimento de técnicas moleculares para diagnóstico de PCM e identificação de espécies de *Paracoccidioides* spp. (Pinheiro *et al.*, 2020).

Figura 3 – Linha do tempo do desenvolvimento das principais técnicas para identificação e caracterização molecular/proteômica de espécies de *Paracoccidioides*.



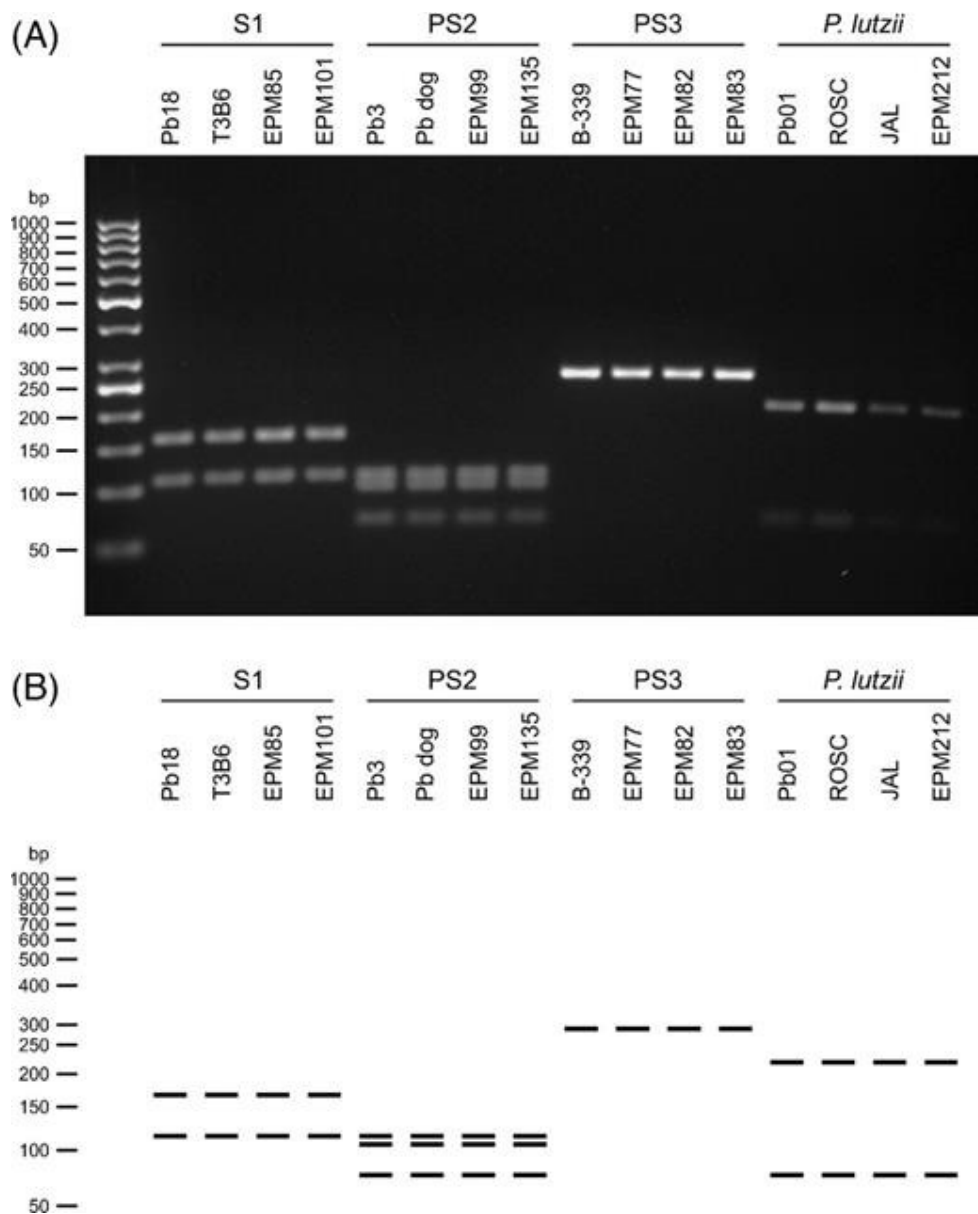
Legenda: PCM: paracoccidioidomicose; *Pb*: *Paracoccidioides brasiliensis*; qPCR: reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real; LAMP: amplificação isotérmica mediada por loop; FFPE: inclusão em parafina fixada em formol; MLSA: análise de sequência multilocus; SSR: repetições de sequência única; SNP: polimorfismo de nucleotídeo único; MALDI-ToF: espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz; PCR-RFLP: polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição por reação em cadeia da polimerase; TUB1: cadeia alfa tubulina-1; FISH: hibridização *in situ* fluorescente; FT-IR: Espectroscopia por infravermelho com transformada de Fourier.
Fonte: Adaptado de Pinheiro *et al.* (2020)

Dentre as técnicas citadas, a PCR-RFLP tem se destacado como uma boa opção quando avaliado a relação custo-benefício e por possibilitar a diferenciação das

espécies de *Paracoccidioides*. Esta abordagem utiliza PCR convencional como base do método e, posteriormente, enzimas de restrição, que reconhecem sequências específicas do DNA, clivam a dupla fita em sítios específicos e geram fragmentos de DNA com diferentes pesos moleculares (Saiki *et al.*, 1985; Roberto *et al.*, 2016). O emprego desta abordagem em isolados de *Paracoccidioides* foi descrito por Nino-Vega *et al.* (2000), utilizando amostras coletadas de diferentes países da América Latina.

Mais recentemente, Roberto e colaboradores (2016) descreveram o uso da técnica PCR-RFLP, utilizando o gene da α -tubulina como produto de PCR, que foi em seguida digerido pelas enzimas de restrição BclI de *Bacillus caldolyticus* e MspI de *Moraxella* spp (**Figura 4**). Os autores conseguiram verificar a possibilidade de diferenciação de quatro espécies crípticas de *Paracoccidioides*, sendo: *P. brasiliensis* sensu stricto, *P. restrepiensis*, *P. americana* e *P. lutzii*. Desde então, tal técnica tem sido utilizada por diferentes estudos para a identificação das espécies do gênero *Paracoccidioides* (Hrycyk *et al.*, 2018; Cocio *et al.*, 2020).

Figura 4 - PCR-RFLP para diferenciação de espécies do gênero *Paracoccidioides*.



Fonte: Roberto *et al.* (2016).

Uma das desvantagens desta técnica é não possibilitar diferenciação de S1a e S1b, o que dificulta estudos epidemiológicos que buscam conhecer a distribuição das espécies de *Paracoccidioides*, bem como estudos que objetivam, em

um futuro, reconhecer diferenças clínicas entre as espécies (Roberto *et al.*, 2016). Além disso, pesquisas também buscam entender a relação evolutiva, ampliar os estudos taxonômicos e de variedades genéticas destes agentes. Para tanto, o sequenciamento completo de nova geração é uma técnica capaz de responder estes questionamentos, avaliar a diversidade genômica de isolados e diferenças evolutivas, podendo ser uma excelente alternativa tanto do ponto de vista diagnóstico, como também epidemiológico (Munoz *et al.*, 2016; De Melo Teixeira *et al.*, 2020).

1.3 Testes sorológicos na PCM

A confirmação do diagnóstico de PCM se dá pela visualização em microscopia de células leveduriformes com múltiplos brotos, com um formato característico de “leme de navio” no exame direto de amostras clínicas e/ou por exame histopatológico de tecido biopsiado. O isolamento em cultura e posterior identificação fenotípica é útil para definir o diagnóstico, no entanto, o rendimento da cultura é baixo (Ferreira e do Lago Moraes, 2000).

Assim, os testes sorológicos não são padrão-ouro para o diagnóstico, porém são de grande importância quando a coleta de amostra clínica é difícil, como de linfonodos intra-abdominais, adrenais, sistema nervoso central, ou mesmo, pulmões em pacientes que não têm produção de escarro. Têm a vantagem de um resultado mais rápido que a cultura e histopatológico, e serem testes de mais baixo custo e metodologicamente mais simples que os testes moleculares (Camargo *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2020).

Diversos são os testes sorológicos empregados no diagnóstico da paracoccidioidomicose, sendo a imunodifusão dupla (IDD), Western Blot (WB), contraimunoeletroforese, imunoeletroforese e ELISA os mais comumente utilizados.

A técnica de WB além de poder ser empregada na caracterização de antígenos, também apresenta alta sensibilidade diagnóstica (Ortiz *et al.*, 1998; Takahachi *et al.*, 1999). Casotto (1990) demonstrou que a técnica WB é uma

ferramenta útil para o diagnóstico da PCM. Para tanto, o autor utilizou componentes de extrato leveduriforme de *Paracoccidioides* spp. e verificou detecção de anticorpos específicos frente a soro de pacientes com PCM, bem como reação cruzada com *Histoplasma capsulatum*, *Candida* spp e *Aspergillus* spp.

O teste de ELISA é uma técnica que se tornou popular para a identificação de anticorpos e antígenos na prática clínica ou em pesquisas, por ser um teste rápido, simples de executar, relativamente, barato e que permite uma avaliação mais precisa da resposta humoral, por avaliar diferentes classes de imunoglobulinas. Porém, com esta técnica observa-se altas taxas de reatividade cruzada com candidíase, criptococose e histoplasmose (Mendes-Giannini *et al.*, 1984; Albuquerque; da Silva; Camargo, 2005). Ademais, estudo realizado por Kamikawa e colaboradores (2017), também demonstrou positividade em soro de pessoas aparentemente saudáveis, que residem em áreas endêmicas.

A sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos variam de acordo com a técnica utilizada, mas, de uma forma geral, costumam ser elevadas. Ademais, estes valores podem variar de acordo com a gravidade da doença, o estágio em que a doença se encontra, bem como pela técnica empregada para a produção do antígeno e da cepa utilizada (Mendes-Giannini *et al.*, 1984; Takahachi *et al.*, 1999; Marques da Silva *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2020). O armazenamento de amostras é uma das preocupações associadas as técnicas de imunodiagnóstico, devido uma possível influência do ciclo congelamento-descongelamento entre os testes e retestes. No entanto, estudo recente realizado por Tomazini *et al.* (2023) demonstrou persistência da titulação por até seis anos em amostras de soro armazenadas a -80°C.

Além de útil no diagnóstico, o teste sorológico de imunodifusão permite acompanhamento da resposta imunológica do hospedeiro durante e após o tratamento antifúngico (Mendes-Giannini *et al.*, 2000; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2018). A cura sorológica sustentada por 12 meses, ou seja, a sororreversão observada na imunodifusão durante o acompanhamento, reflete indiretamente a recuperação da imunidade celular específica do hospedeiro frente a infecção por *Paracoccidioides* (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2018).

Desde a sua introdução por Ouchterlony (1949), diversas modificações foram realizadas ao longo dos anos para o aprimoramento da técnica de imunodifusão radial em gel de ágar. O uso desta técnica para o diagnóstico da PCM foi inserido por Restrepo (1966), que verificou uma sensibilidade de 90%, e atualmente é o teste sorológico mais utilizado. De uma forma geral, a IDD oferece vantagens para o imunodiagnóstico, por ser uma técnica relativamente simples, que apresenta boa correlação com a evolução clínica durante o tratamento, podendo assim fazer um melhor acompanhamento do paciente. A titulação dos anticorpos pode variar de acordo com a gravidade da doença, bem como a condições do paciente. Por exemplo, pacientes com alto grau de imunossupressão podem apresentar resultados falso-negativos (De Camargo e De Franco, 2000; Mendes *et al.*, 2017).

Porém, ainda hoje, o teste de imunodifusão dupla para detecção de anticorpos anti-*Paracoccidioides* não tem padronização, nem do tipo e nem da concentração usada em diferentes laboratórios (Vidal *et al.*, 2014). Além disso, sabendo-se que os anticorpos são espécie-específicos, ou seja, soro de pacientes com PCM por *P. lutzii* são não-reatores na imunodifusão com antígenos obtidos do complexo *P. brasiliensis* (Baptista-Junior *et al.*, 2010, Gergembauer *et al.*, 2014), é importante que a imunodifusão seja realizada com antígenos das duas espécies. (Camargo *et al.*, 2003; Baptista Júnior *et al.*, 2010)

A identificação de antígenos tem auxiliado na busca de alvos que vislumbram aumento da especificidade e sensibilidade do diagnóstico sorológico. No entanto, este é um campo ainda pouco explorado, não somente com relação a quantidade de estudos, como também pela alta complexidade antigênica das espécies de *Paracoccidioides*. Para o diagnóstico da PCM, estudos tm caracterizado e identificado antígenos extraídos da parede celular, antígenos intracelulares, e antígenos filtrados de culturas de antígenos (exoantígenos ou *cell free antigens*), sendo este último o mais utilizado na rotina dos laboratórios de pesquisa (Yarzabal, 1982; De Camargo *et al.*, 1988; Camargo *et al.*, 2003; Gegembauer *et al.*, 2014, Da Silva *et al.*, 2016).

Dentre as proteínas encontradas, a glicoproteína de 43 kDa - gp43, inicialmente descrita por Puccia *et al.* (1986), está presente exclusivamente no

complexo *Paracoccidioides brasiliensis* e é, sem dúvidas, a mais estudada. Contudo, outras proteínas como a Pb27 e Pb40, identificadas a partir de frações enriquecidas com antígenos de superfície da parede celular, também tem demonstrado resultados promissores (Diniz *et al.*, 1999; Diniz *et al.*, 2001; Goes *et al.*, 2005). A molécula imunodominante para a espécie *P. lutzii* é desconhecida até o momento. Porém, estudo têm proposto intensa reação de seis isoformas da enolase associada à superfície oscilando na faixa de 54 kDa em imunoblots (Rodrigues *et al.*, 2020).

Para que o teste diagnóstico apresente uma boa sensibilidade e especificidade, o reconhecimento do substrato antigênico é parte fundamental da técnica. Estudos têm sido realizados buscando diferenças no perfil proteico e na antigenicidade de exoantígenos obtidos de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. Gegembauer *et al.* (2014) avaliaram exoantígenos que foram produzidos a partir de isolados clínicos de *P. brasiliensis* (S1b), *P. restrepiensis* e *P. lutzii* e compararam suas reatividades sorológicas. O exoantígeno produzido da cepa de *P. lutzii* apresentou maior soro reatividade em soro de pacientes com isolado fúngico de *P. lutzii*, quando comparado ao exoantígeno produzido de cepas do complexo *P. brasiliensis*, corroborando com estudos que sugerem um diferente perfil proteico de exoantígenos provenientes de *P. lutzii* (Queiroz Junior Lde *et al.*, 2014; De Arruda Grossklaus *et al.*, 2016; Pereira *et al.*, 2020).

Tendo em vista que a PCM apresenta grande impacto clínico e social nas áreas de alta endemicidade, devido ao tratamento de longa duração, maior número de casos crônicos e as frequentes sequelas incapacitantes ocasionadas pela doença, faz-se necessário a obtenção de dados epidemiológicos confiáveis para que ocorra melhor controle desse problema de saúde pública. No serviço de DIP/HU-UFMS são atendidos cerca de 1-2 casos novos ao mês e realizado acompanhamento sistemático de cerca de 200 pacientes. Desta forma, é de suma importância realizar o correto diagnóstico e diferenciação das espécies, visto que marcadores sorológicos são utilizados para acompanhar a evolução dos pacientes e avaliar a eficácia terapêutica. Ainda, mais estudos são necessários para avaliar se as manifestações clínicas podem variar de acordo com a espécie (Pereira *et al.*, 2020).

Nesse sentido, o presente estudo busca com a identificação molecular de espécies de *Paracoccidioides* por testes moleculares, contribuir com o conhecimento da distribuição geográfica das espécies, bem como aprimorar o diagnóstico e o acompanhamento sorológico dos pacientes com PCM. Os resultados poderão, ainda, auxiliar na elaboração de protocolos para a produção de exoantígenos para imunodiagnóstico da PCM, bem como propor uma ferramenta de triagem molecular para detecção e diferenciação das espécies.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar as espécies do gênero *Paracoccidioides* envolvidas na etiologia da PCM em Mato Grosso do Sul, bem como avaliar a sororreatividade frente a antígenos obtidos de diferentes espécies.

2.2 Objetivos Específicos

- Conhecer as diferentes espécies pertencentes ao gênero *Paracoccidioides* em Mato Grosso do Sul;
- Descrever as características sócio-demográficas e clínicas dos casos de PCM por espécie identificada.
- Determinar o perfil de sororreatividade dos pacientes com PCM frente a exoantígenos produzidos a partir de cepas genotipadas de *Paracoccidioides* spp.

3. REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE CF, DA SILVA SH, CAMARGO ZP. Improvement of the specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol*. V.43, n. 4, p. 1944-6, Apr 2005.
- ALMEIDA, J.N.; DEL NEGRO, G.M.B.; GRENFELL, R.C.; VIDAL, M.S.M.; THOMAZ, D.Y.; DE FIGUEIREDO, D.S.Y.; BAGAGLI, E.; JULIANO NETO, L.; BENARD, G. MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of the dimorphic fungi *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii*. **J. Clin. Microbiol.** v. 53, p. 1383–1386, 2015.
- ANGELA RESTREPO, M. Immune response to *Paracoccidioides brasiliensis* in human and animal hosts. **Curr Top Med Mycol**, v. 2, p. 239-77, 1988.
- ARANTES, T. D. et al. Environmental Mapping of *Paracoccidioides* spp. in Brazil Reveals New Clues into Genetic Diversity, Biogeography and Wild Host Association. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 4, p. e0004606, Apr 2016.
- ARANTES, T.D.; THEODORO, R.C.; TEIXEIRA, M.D.M.; BAGAGLI, E. Use of fluorescent oligonucleotide probes for differentiation between *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* in yeast and mycelial phase. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 112, p. 140–145, 2017.
- BAGAGLI, E. et al. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. **Infect Genet Evol**, v. 6, n. 5, p. 344-51, Sep 2006.
- BELLISSIMO-RODRIGUES, F. et al. Endemic paracoccidioidomycosis: relationship between clinical presentation and patients' demographic features. **Med Mycol**, v. 51, n. 3, p. 313-8, Apr 2013.
- BITRAGO, M.J.; MERINO, P.; PUENTE, S.; GOMEZ-LOPEZ, A.; ARRIBI, A.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M.; GUTIERREZ, M.C.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; CUENCA-ESTRELLA, M. Utility of real-time PCR for the detection of *Paracoccidioides brasiliensis* DNA in the diagnosis of imported paracoccidioidomycosis. **Med. Mycol.** v. 47, p. 879–882, 2009.
- CAMARGO, Z. P. et al. Simplified method for producing *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for use in immunodiffusion tests. **Med Mycol**, v. 41, n. 6, p. 539-42, Dec 2003.
- CASOTTO, M. Characterization of the cellular antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast form. **J Clin Microbiol**, v. 28, n. 6, p. 1188-93, Jun 1990.

COCIO, T. A. et al. Characterization of a *Paracoccidioides* spp. strain from southeastern Brazil genotyped as *Paracoccidioides restrepiensis* (PS3) and review of this phylogenetic species. **Genet Mol Biol**, v. 43, n. 2, p. e20190201, 2020.

CORREDOR, G. G. et al. The naked-tailed armadillo *Cabassous centralis* (Miller 1899): a new host to *Paracoccidioides brasiliensis*. Molecular identification of the isolate. **Med Mycol**, v. 43, n. 3, p. 275-80, May 2005.

DA SILVA, J. F. et al. Advances and challenges in paracoccidioidomycosis serology caused by *Paracoccidioides* species complex: an update. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 84, n. 1, p. 87-94, Jan 2016.

DE ARRUDA GROSSKLAUS, D. et al. Profile of exoantigens from clinical isolates of *Paracoccidioides lutzii* IN Mato Grosso, Brazil. **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 45, n. 3, p. 265-272, 2016.

DE CAMARGO, Z. et al. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. **J Clin Microbiol**, v. 26, n. 10, p. 2147-51, Oct 1988.

DE CAMARGO, Z. P.; DE FRANCO, M. F. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Rev Iberoam Micol**, v. 17, n. 2, p. 41-8, Jun 2000.

DE CAMARGO, Z. P.; RODRIGUES, A. M. *Paracoccidioides* complex. In: (Ed.). **Pocket Guide to Mycological Diagnosis**: CRC Press Taylor & Francis Group, 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300 ..., 2019. p.125-134.

DE MACEDO, P. M. et al. *Paracoccidioides brasiliensis* PS2: First Autochthonous *Paracoccidioidomycosis* Case Report in Rio de Janeiro, Brazil, and Literature Review. **Mycopathologia**, v. 181, n. 9-10, p. 701-8, Oct 2016.

DE MACEDO, P. M. et al. Clinical features and genetic background of the sympatric species *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides americana*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 13, n. 4, p. e0007309, Apr 2019.

DE MELO TEIXEIRA, M. et al. Genomic diversity of the human pathogen *Paracoccidioides* across the South American continent. **Fungal Genetics and Biology**, v. 140, p. 103395, 2020.

DINIZ, S. N. et al. In vitro granuloma formation, NO production and cytokines profile from human mononuclear cells induced by fractionated antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Hum Immunol**, v. 62, n. 8, p. 799-808, Aug 2001.

DINIZ, S. N. et al. In vitro human immune reactivity of fast protein liquid chromatography fractionated *Paracoccidioides brasiliensis* soluble antigens. **Microbes Infect**, v. 1, n. 5, p. 353-60, Apr 1999.

ENDO, S.; KOMORI, T.; RICCI, G.; SANO, A.; YOKOYAMA, K.; OHORI, A.; KAMEI, K.; FRANCO, M.; MIYAJI, M.; NISHIMURA, K. Detection of gp43 of *Paracoccidioides brasiliensis* by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. **FEMS Microbiol.** v. 234, p. 93–97, 2004.

FERREIRA, A. W.; DO LAGO MORAES, S. Diagnóstico Laboratorial Das Principais Doenças Infecciosas E Autoimunes. Grupo Gen-Guanabara Koogan, 2000.

FRANCO, M. et al. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 20, n. 2, p. 129-32, Apr-Jun 1987.

FRANCO, M. F. et al. **Paracoccidioidomycosis**. CRC press, 1993.

GARCIA, N. M. et al. [Paracoccidioides brasiliensis, a new sample isolated from feces of a penguin (Pygoscelis adeliae)]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 35, n. 3, p. 227-35, May-Jun 1993.

GAVIRIA, M.; RIVERA, V.; MUÑOZ-CADAVID, C.; CANO, L.E.; NARANJO, T.W. Validation and clinical application of a nested PCR for paracoccidioidomycosis diagnosis in clinical samples from Colombian patients. **Braz. J. Infect. Dis.** v. 19, p. 376–383, 2015.

GEGEMBAUER, G. et al. Serology of paracoccidioidomycosis due to Paracoccidioides lutzii. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 7, p. e2986, Jul 2014.

GOES, T. S. et al. Identification of immunogenic proteins from Paracoccidioides brasiliensis antigenic fractions F0, FII and FIII. **Immunol Lett**, v. 101, n. 1, p. 24-31, Oct 15 2005.

GONZALEZ, A.; HERNANDEZ, O. New insights into a complex fungal pathogen: the case of Paracoccidioides spp. **Yeast**, v. 33, n. 4, p. 113-28, Apr 2016.

GOMES, G. M.; CISALPINO, P. S.; TABORDA, C. P.; DE CAMARGO, Z. P. PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. **J. Clin. Microbiol.** v. 38, p. 3478–3480, 2000.

GROSE, E.; TAMSITT, J. R. Paracoccidioides brasiliensis recovered from the intestinal tract of three bats (Artibeus lituratus) in Colombia, S.A. **Sabouraudia**, v. 4, n. 2, p. 124-5, Jun 1965.

HAHN, R. C. et al. Paracoccidioidomycosis: Current Status and Future Trends. **Clin Microbiol Rev**, v. 35, n. 4, p. e0023321, Dec 21 2022.

HAHN, R. C. et al. Clinical and epidemiological features of paracoccidioidomycosis due to Paracoccidioides lutzii. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 13, n. 6, p. e0007437, Jun 2019.

HRZYCYK, M. F. et al. Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*, *P. lutzii* and related species: infection in armadillos, soil occurrence and mycological aspects. **Med Mycol**, v. 56, n. 8, p. 950-962, Nov 1 2018.

KAMIKAWA, C. M.; MENDES, R. P.; VICENTINI, A. P. Standardization and validation of Dot-ELISA assay for *Paracoccidioides brasiliensis* antibody detection. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, v. 23, p. 11, 2017.

KANETSUNA, F. et al. Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. **J Bacteriol**, v. 97, n. 3, p. 1036-41, Mar 1969.

LACAZ, C. D. S. et al. Tratado de micologia médica. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, p. 297-298, 2002.

MAGALHÃES, E. M. et al. Prevalence of paracoccidioidomycosis infection by intradermal reaction in rural areas in Alfenas, Minas Gerais, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 56, n. 4, p. 281-5, 2014 Jul-Aug 2014.

MARQUES, A. P. D. C. Infecção pelo *Paracoccidioides brasiliensis* em população de assentamentos rurais de Jaraguari, Mato Grosso do Sul. Estudo epidemiológico utilizando a intradermorreação com gp43 e retestagem para avaliação do fenômeno booster. 2012.

MARQUES, A. P. D. C. et al. Evaluation of *Paracoccidioides brasiliensis* Infection by gp 43 Intradermal Test in Rural Settlements in Central-West Brazil. **Mycopathologia**, v. 176, n. 1-2, p. 41-47, AUG 2013 2013.

MARQUES-DA-SILVA, S. H. et al. Occurrence of *Paracoccidioides lutzii* in the Amazon region: description of two cases. **Am J Trop Med Hyg**, v. 87, n. 4, p. 710-4, Oct 2012.

MARTINEZ, R. New Trends in Paracoccidioidomycosis Epidemiology. **J Fungi (Basel)**, v. 3, n. 1, Jan 3 2017.

MATOS, W. B. et al. Paracoccidioidomycosis in the state of Maranhao, Brazil: geographical and clinical aspects. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 45, n. 3, p. 385-9, Jun 2012.

MATUTE, D. R. et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. **Mol Biol Evol**, v. 23, n. 1, p. 65-73, Jan 2006.

MENDES, R. P. et al. Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. **Open Microbiol J**, v. 11, p. 224-282, 2017.

MENDES-GIANNINI, M. J.; CAMARGO, M. E.; LACAZ, C. S.; FERREIRA, A. W. Immunoenzymatic absorption test for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **J Clin Microbiol.** v. 20, n. 1, p. 103-8, Jul 1984.

MENDES-GIANNINI, M. J. et al. Pathogenesis II: fungal responses to host responses: interaction of host cells with fungi. **Med Mycol**, v. 38 Suppl 1, p. 113-23, 2000.

MUNOZ, J. F. et al. Genome Diversity, Recombination, and Virulence across the Major Lineages of Paracoccidioides. **mSphere**, v. 1, n. 5, Sep-Oct 2016.

NASCIMENTO, É. et al. Detection and selection of microsatellites in the genome of Paracoccidioides brasiliensis as molecular markers for clinical and epidemiological studies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 5007-5014, 2004.

NINO-VEGA, G. A. et al. RFLP analysis reveals marked geographical isolation between strains of Paracoccidioides brasiliensis. **Med Mycol**, v. 38, n. 6, p. 437-41, Dec 2000.

OLIVEIRA, L.B.Z.; DELLA COLETTA, A.M.; GARDIZANI, T.P.; GARCES, H.G.; BAGAGLI, E.; TRILLES, L.; BARROZO, L.V.; MARQUES, S.A.; FAVERI, J.; DIAS-MELICIO, L.A. Molecular Phylogenetic Analysis of Paracoccidioides Species Complex Present in Paracoccidioidomycosis Patient Tissue Samples. **Microorganisms**. v. 11, n. 3, p. 562, Feb 2023.

ORTIZ, B. L. et al. Use of the 27-kilodalton recombinant protein from Paracoccidioides brasiliensis in serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 5, n. 6, p. 826-30, Nov 1998.

OUCHTERLONY, O. Antigen-antibody reactions in gels. **Acta Pathol Microbiol Scand**, v. 26, n. 4, p. 507-15, 1949.

PEREIRA, E. F. et al. Comparison of clinico-epidemiological and radiological features in paracoccidioidomycosis patients regarding serological classification using antigens from Paracoccidioides brasiliensis complex and Paracoccidioides lutzii. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 14, n. 8, p. e0008485, Aug 2020.

PINHEIRO, B. G. et al. Molecular Tools for Detection and Identification of Paracoccidioides Species: Current Status and Future Perspectives. **J Fungi (Basel)**, v. 6, n. 4, Nov 18 2020.

PINHEIRO, B. G. Development of New Molecular Tools for the Identification of Paracoccidioides spp.; Universidade Federal de São Paulo: São Paulo, Brazil, 2020.

PUCCIA, R. et al. Exocellular components of Paracoccidioides brasiliensis: identification of a specific antigen. **Infect Immun**, v. 53, n. 1, p. 199-206, Jul 1986.

QUEIROZ JUNIOR LDE, P. et al. Serological and antigenic profiles of clinical isolates of *Paracoccidioides* spp. from Central Western Brazil. **Mycoses**, v. 57, n. 8, p. 466-72, Aug 2014.

RESTREPO, A. Actualización sobre la paracoccidioidomicosis. **Acta Med Colombiana**, v. 3, p. 33-66, 1978.

RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Sabouraudia**, v. 23, n. 5, p. 323-34, Oct 1985.

RESTREPO, M. A. La prueba de inmunodiffusion en el diagnostico de la paracoccidioidomicosis. **Sabouraudia**, v. 4, n. 4, p. 223-230, 1966.

ROBERTO, T. N. et al. Identifying *Paracoccidioides* phylogenetic species by PCR-RFLP of the alpha-tubulin gene. **Med Mycol**, v. 54, n. 3, p. 240-7, Mar 2016.

RODRIGUES, A. M. et al. Immunoproteomic Analysis Reveals Novel Candidate Antigens for the Diagnosis of Paracoccidioidomycosis Due to *Paracoccidioides lutzii*. **J Fungi (Basel)**, v. 6, n. 4, Dec 11 2020.

SAIKI, R. K. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, n. 4732, p. 1350-4, Dec 20 1985.

SALGADO-SALAZAR, C. et al. The human fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* (Onygenales: Ajellomycetaceae) is a complex of two species: phylogenetic evidence from five mitochondrial markers. **Cladistics**, v. 26, n. 6, p. 613-624, 2010.

SEMIGHINI, C. P. et al. Molecular identification of *Paracoccidioides brasiliensis* by 5 nuclease assay. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 44, n. 4, p. 383-386, 2002.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. [Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis]. **Epidemiol Serv Saude**, v. 27, n. spe, p. e0500001, Aug 16 2018.

SILVA-VERGARA, M. L. et al. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibia, State of Minas Gerais, Brazil. **Med Mycol**, v. 36, n. 1, p. 37-42, Feb 1998.

TAKAHACHI, G. et al. Importância do western blott no diagnóstico seguro da Paracoccidioidomicose. INTERNATIONAL MEETING IN PARACOCIDOIDOMYCOSIS, 1999.

TAKAYAMA, A. et al. An atypical *Paracoccidioides brasiliensis* clinical isolate based on multiple gene analysis. **Med Mycol**, v. 48, n. 1, p. 64-72, Feb 2010.

TEIXEIRA MDE, M. et al. Paracoccidioides lutzii sp. nov.: biological and clinical implications. **Med Mycol**, v. 52, n. 1, p. 19-28, Jan 2014.

TEIXEIRA, M. M. et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the Paracoccidioides genus. **Mol Phylogenet Evol**, v. 52, n. 2, p. 273-83, Aug 2009.

TELES, F. R.; MARTINS, M. L. Laboratorial diagnosis of paracoccidioidomycosis and new insights for the future of fungal diagnosis. **Talanta**, v. 85, n. 5, p. 2254-64, Oct 15 2011.

THEODORO, R. C. et al. Genus paracoccidioides: Species recognition and biogeographic aspects. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e37694, 2012.

TOMAZINI, K. A. et al. Reproducibility of double agar gel immunodiffusion test using stored serum and plasma from paracoccidioidomycosis patients. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, v. 29, p. e20220045, 2023.

TURISSINI, D. A. et al. Species boundaries in the human pathogen Paracoccidioides. **Fungal Genet Biol**, v. 106, p. 9-25, Sep 2017.

VIDAL M. S. M.; DEL NEGRO, G. M. B.; VICENTINI, A. P.; SVIDZINSKI, T. I. E.; MENDES-GIANNINI, M. J.; et al. Serological Diagnosis of Paracoccidioidomycosis: High Rate of Inter-laboratorial Variability among Medical Mycology Reference Centers. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 9, p. e3174, 2014.

VIEIRA GDE, D. et al. Paracoccidioidomycosis in a western Brazilian Amazon State: clinical-epidemiologic profile and spatial distribution of the disease. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 47, n. 1, p. 63-8, Jan-Feb 2014.

YARZABAL, L. Composición antigénica de Paracoccidioides brasiliensis. **Paracoccidioidomycose—blastomycose sul-americana.**, p. 59-67, 1982.

CAPÍTULO 2 – ARTIGO



OPEN ACCESS

Citation: Mattos K, Cocio TA, Chaves EGA, Borges CL, Venturini J, de Carvalho LR, et al. (2021) An update on the occurrence of *Paracoccidioides* species in the Midwest region, Brazil: Molecular epidemiology, clinical aspects and serological profile of patients from Mato Grosso do Sul State.

PLoS Negl Trop Dis 15(4): e0009317.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009317>

Editor: Claudio Guedes Salgado, Universidade

Federal do Para, BRAZIL

Received: September 6, 2020

Accepted: March 17, 2021

Published: April 7, 2021

PeerReviewHistory: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here:

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009317>

Copyright:© 2021 Mattos et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

RESEARCH ARTICLE

An update on the occurrence of *Paracoccidioides* species in the Midwest region, Brazil: Molecular epidemiology, clinical aspects and serological profile of patients from Mato Grosso do Sul State

Karine Mattos¹, Tiago Alexandre Cocio², Edilânia Gomes Araújo Chaves³, Clayton Luiz Borges³, James Venturini¹, Lidia Raquel de Carvalho⁴, Rinaldo Poncio Mendes^{1,5}, Anamaria Mello Miranda Paniago¹, Simone Schneider Weber^{6,7*}

1 Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil, **2** Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP), Universidade de São Paulo, São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, **3** Laboratório de Biologia Molecular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil, **4** Universidade Estadual Paulista (UNESP), Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociência de Botucatu, Botucatu, São Paulo, Brazil, **5** Universidade Estadual Paulista 'Júlio Mesquita Filho' (UNESP), Faculdade de Medicina de Botucatu, São Paulo, Brazil, **6** Laboratório de Biociência (LaBio), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil, **7** Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia (ICET), Universidade Federal do Amazonas, Itacoatiara, Amazonas, Brazil.

* weberblood@gmail.com

Abstract

Background

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic and endemic fungal infection in Latin American, mainly in Brazil. The majority of PCM cases occur in large areas in Brazil, comprising the South, Southeast and Midwest regions, with the latter demonstrating a higher incidence of the species *Paracoccidioides lutzii*.

Methodology and main findings

This study presents clinical, molecular and serological data of thirteen new PCM cases during 2016 to 2019 from the state of Mato Grosso do Sul, located in the Midwest region, Brazil. From these thirteen cases, sixteen clinical isolates were obtained and their genomic DNAs were subjected to genotyping by *tub1* -PCR-RFLP. Results showed *Paracoccidioides brasiliensis* sensu stricto (S1) (11/16; 68.8%), *Paracoccidioides restrepiensis* (PS3) (4/16; 25.0%) and *P. lutzii* (1/16; 6.2%) as *Paracoccidioides* species. Therefore, in order to understand whether the type of phylogenetic species that are circulating in the state influence the reactivity profile of serological tests, we performed double agar gel immunodiffusion (DID), using exoantigens from genotyped strains found in this series of PCM cases. Overall, our DID tests have been false negative in about 30% of confirmed PCM cases. All patients were male, most with current or previous rural activity, with ages ranging from 17 to 59 years, with 11 patients (84.6%) over 40 years of age. No clinical or epidemiological differences were found between *Paracoccidioides* species. However, it is important to note that the only case of *P. lutzii* died as an outcome.

Data Availability Statement: All relevant data are within the manuscript and its [Supporting Information](#) files.

Funding: This work was supported by Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino,

Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT/DECIT-MS/CNPq/SES No. 03/2016PPSUS-MS and PPSUS/FUNDECT No.08/2020), and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) de Estratégias de Interação Patógeno Hospedeiro (IPH) (INCT–MCTI/CNPq/CAPES/FAPs n° 16/2014). This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

The doctoral grants were (KM grant numbers: 88882.458447/2019-01 and TAC grant numbers: 88882.180015/2018-01). The Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) supported of publication fee (EDITAL N° 26/2021 PROP/UFMS). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Conclusions

This study suggests *P. brasiliensis sensu stricto* (S1) as the predominant species, showing its wide geographic distribution in Brazil. Furthermore, our findings revealed, for the first time, the occurrence of *P. restrepiensis* (PS3) in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. Despite our setbacks, it would be interesting to provide the complete sequencing of these clinical isolates to complement the molecular information presented.

Author summary

Paracoccidioides spp. complex and *P. lutzii* are etiological agents of paracoccidioidomycosis (PCM), one of the most important systemic mycosis of Latin America. This study aimed to describe the molecular epidemiology associated with clinical and serological data of *Paracoccidioides* spp. in the Mato Grosso do Sul, located in the Midwest region, Brazil. Thus, for the first time in this state, the clinical *Paracoccidioides* species were molecularly identified. Previous findings have frequently been misinterpreted as proving that *P. lutzii* predominates in this region. In fact, we observed that this state differs from others in the Midwest, presenting a higher proportion of PCM cases due to *P. brasiliensis sensu stricto* (S1). In addition, we described the first report of *P. restrepiensis* (PS3) occurrence in the Brazilian Midwest region. Then, we presented an update on the occurrence of *Paracoccidioides* species in the Midwest region from Brazil. On the other hand, our results do not demonstrate clinical and epidemiological differences between *Paracoccidioides* spp. Nevertheless, this study reinforces that other researches should be carried out in order to evaluate an association of clinical manifestations and epidemiology with *Paracoccidioides* species.

Introduction

Paracoccidioidomycosis (PCM) is an endemic systemic fungal infection exclusive to Latin American countries such as Brazil, Argentina, Colombia and Venezuela, where approximately 10 million people have already been infected [1]. Infection in humans with *Paracoccidioides* spp. occurs through the development of activities that involve the management of soil contaminated by conidia, such as agriculture, gardening, soil preparation and earthworks [2]. The chronic form of PCM affects mainly adults aged 30 years or older, usually male patients. The acute/sub-acute form of PCM occurs mainly in children and young adults, who represent approximately 10% to 25% of PCM cases [3].

Etiological agents of PCM are thermodimorphic fungi belonging to the *Paracoccidioides* genus, Ajellomycetaceae family, Onygenales order and Eurotiomycetes class [4]. Currently *Paracoccidioides* spp. complex is composed of five phylogenetic species: *Paracoccidioides brasiliensis* sensu stricto (S1a and S1b), belonging to the paraphyletic group distributed in Brazil, Argentina, Paraguay, Peru and Venezuela; *Paracoccidioides americana* (PS2), belonging to the monophyletic group distributed in Brazil and Venezuela; *Paracoccidioides restrepiensis* (PS3), belonging to the monophyletic group found mainly in Colombia; and *Paracoccidioides venezuelensis* (PS4), belonging to the monophyletic group found exclusively in Venezuela [5–8]. Meanwhile, the *Paracoccidioides lutzii* genotype includes just one species, which is the etiologic agent found in the area endemic to the states of Mato Grosso and Goiás, located in the Midwest region of Brazil, as well as in the Amazon [7,9–12].

PCM diagnosis is performed by visualization or isolation and culture of the fungus and indirectly by detection of antibodies in serological tests, where the reactivity and specificity of the tests are directly related to the preparation of exoantigens produced *in house* [13]. In addition to its low sensitivity in serological analyses, *Paracoccidioides* spp. may also show cross reactions with other microorganisms, such as *Histoplasma* spp., *Candida* spp. and *Aspergillus* spp [14]. Therefore, the observation of *Paracoccidioides* spp. suggestive structures using the

microbiological (fresh examination or culture) and histopathological techniques is considered as the gold standard diagnosis [15].

Molecular biology tools have been a great ally in the identification of phylogenetic species of the genus *Paracoccidioides* spp. for genotypic studies and clinical diagnosis performed directly from samples of patients with PCM [5,11,12,16,17]. Some methodologies such as PCR–Nested [18], conventional PCR [16], qualitative PCR real time [19,20], microsatellites [8,21], mitochondrial markers [22], Multilocus Sequence Typing (MLST) [5] and whole genomic sequencing [23] have been used for the purpose of phylogenetic understanding and for answering important questions that relate genotypic data to epidemiological and serological data. A technique that identifies the species (not variety) of the *Paracoccidioides* spp. complex and *P. lutzii*, both environmental and human samples, is the Polymerase Chain Reaction— Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) of the alpha tubulin (*tub1*) gene [24].

The species *P. brasiliensis* sensu stricto (S1a and S1b) has a geographic distribution in the South and Southeast regions of Brazil and its genotypic frequency is found in the states of São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais and Paraná, both in clinical and environmental samples [2,13,18,24–28]. *P. americana* (PS2) has its genotype frequency in several regions of Brazil, mainly in the South (States of Paraná and Rio Grande do Sul) and Southeast (States of São Paulo and Rio de Janeiro) [12,24,26–28]. The phylogenetic species *P. restrepiensis* (PS3) has been described as geographically restricted to Colombia and neighboring territories [5,8].

However, the occurrence of *P. restrepiensis* (PS3) in Brazil was first shown by Cocio et al. (2020) in a PCM endemic area from the Southeastern region (Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil) [29]. In addition, this species also has been identified in Botucatu, São Paulo, Brazil [30]. In both municipalities, located in the central-west and northwest of the state of São Paulo respectively, *P. brasiliensis* sensu stricto (S1) is the prevalent species [26,28,30].

In short, the territorial distribution of *Paracoccidioides* species is not yet completely known [12,25,31]. In the state of Mato Grosso do Sul, there are no genetic data about the occurrence of *Paracoccidioides* species. In this sense, our

aim was to describe, for the first time, the occurrence of *Paracoccidioides* species using genotyping of clinical isolates, instead of serology. Furthermore, the study aim was also to determine the reactivity profile of exoantigens produced from genotyped strains of the *Paracoccidioides* spp. found circulating in the state.

Materials and methods

Ethics statement

This study was approved by the Human Research Ethics Committee (CAAE: 69793917.0.0000.0021) from the Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). The informed consent document was signed by all participants for research agreement. The parental consent for the participation of the child was obtained in writing, as well the child assent.

Patients and methods

Patients

Location, period and design. This study was conducted with PCM cases diagnosed between May 2016 and October 2019, from the reference center for Infectious and Parasitic Diseases at the UFMS hospital, located in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. Thirteen patients, from whom fungus of the *Paracoccidioides* genus was isolated, participated in the study.

Clinical and sociodemographic analysis. All patients with *Paracoccidioides* species isolated from their clinical sample cultures were included in this study. Clinical and sociodemographic data collected from the medical records database of PCM patients comprise: age, gender, municipality where they live, occupation, agricultural activity, HIV infection, symptoms, clinical form of PCM, severity, affected organs, therapeutic regimen, outcome and sequelae.

The affected organs were identified by clinical examination (skin, peripheral lymph nodes and pharynx), computed tomography (CT) (lungs, deep-chain lymph nodes, spleen, liver, central nervous system and adrenal glands) or by

videoscopy (for larynx and intestine). The PCM clinical form of PCM was classified into acute/subacute or chronic, according to Mendes et al., 2017 [3].

Migratory history. Information about patients' migratory history was obtained by questionnaire applied to each patient and/or the responsible family member. These collected data were: hometown, municipalities they have worked or lived in and previous occupations.

Treatment. PCM cases were treated with Amphotericin B, Itraconazole or Sulfamethoxazole-Trimethoprim combination (also known as Cotrimoxazole), according to the recommendations of the Brazilian guidelines on PCM [13].

Methods

Fungal strains

Sixteen clinical strains from 13 PCM cases, collected from different sources, including 5 skin lesion fragments, 4 lymph node aspirates, 4 oral lesion scrapings, 2 sputum and 1 tracheal aspiration were identified by classical methods of fungal identification and identified as belonging to the genus *Paracoccidioides* spp. These clinical isolates were maintained at 36°C, in the form of yeast cells, in Fava-Netto's medium for further genotyping and/or exoantigen production. Reference strains used in this study are Pb18, representative of *P. brasiliensis* sensu stricto (S1b) [8]; Pbdog—EPM 194, considered *P. americana* (PS2) species [12]; T2—EPM 54, representative of *P. restrepiensis* (PS3) [24] and Pb01-like, which represents *P. lutzii* [7].

Genomic DNA extraction from *Paracoccidioides* strains

The genomic DNAs isolated from *Paracoccidioides* yeast cells (reference and clinical strains) were obtained using the ZR Fungal/Bacterial extraction kit (Zymo Research, Irvine, California, United States), according to the manufacturer's protocol, and quantified using the NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc, Massachusetts, United States).

Identification of *Paracoccidioides* species, phylogenetic analysis and geographic localization for this PCM case series

Clinical isolates from PCM patients were genotyped (tub1-PCR-RFLP) to determine their phylogenetic species, following previously described methodology by Roberto et al. (2016) [24], with modification of primers as described by Hrycyk et al. (2018) [26]. Descriptive analysis of clinical and sociodemographic variables from PCM patients were presented according to the identified phylogenetic species.

The .jpg file generated in the photo, documentation of the tub1 gene fragments from clinical and reference strains submitted to the PCR—RFLP technique in this study, was used as input data for phylogenetic analysis using the PyEph 1.4. That is a software that extracts evolutionary data through of DNA fragments to generate phylogenetic trees using evolutionary methods available in this tool [32]. The method chosen for the phylogenetic analysis of the clinical and reference strains used in this study was Neighbor-Joining (NJ), where a dendrogram was constructed calculating the minimum evolution rate between them, only changing the value of genetic distance rate to 3%.

Production of exoantigens and accomplishment of serological tests

The exoantigens were produced in house, according to the methodology used by Camargo et al. [14], from three genotyped species of *Paracoccidioides* genus, circulating in the state of Mato Grosso do Sul: *P. brasiliensis* sensu stricto—S1b (Pb18) [8], which was designated as Pb_Ag; *P. restrepiensis*—PS3 (EPM01-B_339) [14] named as Pr_Ag; and *P. lutzii* (clinical isolate from this study—MS2451) defined as Pl_Ag. To determine the reactivity profile of produced exoantigens, the double agar gel immunodiffusion technique (DID) was performed as described previously [33], against 13 PCM patients' sera, from the same cases from which the clinical strains were isolated.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed by Fisher's exact test for comparison of two frequencies from independent samples, and the Cochran Q test for

comparison of occurrence of more than two dependent variables. Then, comparison of organs involved occurrence between *P. brasiliensis* and *P. restrepiensis* was analyzed by Fisher's exact test. While, multiple comparisons of its DID reactivity were performed using Cochran Q test. The *P. lutzii* data were not included because only one strain was described. Significance was set up at $p \geq 0.05$. The statistical software used was SAS—Statistical Analysis System, version 9.2.

Results

Sociodemographic and clinical aspects of this PCM case series

The sociodemographic characteristics of the PCM patients included in the study are presented in Table 1. All PCM cases, with isolated fungus from their culture exams, included in the study were male, with a mean age (SD) of 46 years (11.77), with most of them (84.6%, 11/13) over the age of 40. Regarding occupation, 46.1% (6/13) carry out activities with risk for infection by *Paracoccidioides* spp. (4 bricklayers and 2 rural workers), while 69.2% (9/13) are currently participating or have already participated in agricultural activities.

More than 90% of PCM cases were classified as chronic form (12/13), of which 53.8% had severe disease (7/13) and 10 (76.9%) reported fever, as shown in [S1 Table](#). Twelve patients (92.3%) had at least one extra-pulmonary organ affected ([S2 Table](#) and [S1 Fig](#)). Most patients (53.8%, 7/13) were treated with cotrimoxazole, one died at admission, before treatment, and two died during the follow-up ([S1 Table](#)).

Table 1. Sociodemographic characterization of the studied PCM cases, Mato Grosso do Sul, Brazil (2016–2019).

PCM Cases	Sex	Age	Birthplace	Current local ¹	Occupation	Agricultural activity
1	Male	42	Deodópolis, MS	Itaquiraí, MS	Milkman	No
2	Male	17	Miranda, MS	Campo Grande, MS	Not work	No
3	Male	59	Campo Grande, MS	Sidrolândia, MS	Building Painter	Yes
4	Male	56	Pedro Juan Caballero—PY	Ponta Porã, MS	Baker	Yes
5	Male	27	Maracaju, MS	Maracajú, MS	Physical Educator	No
6	Male	45	Paraná—PR	Campo Grande, MS	Bricklayer	Yes
7	Male	43	Glória de Dourados, MS	Campo Grande, MS	Bricklayer	Yes
8	Male	56	Aurora, CE	Rio Verde de Mato Grosso, MS	Farm work	Yes
9	Male	56	Tarumirim, MG	Campo Grande, MS	Bricklayer	Yes
10	Male	56	Guauraci, PR	Campo Grande, MS	Farm work	Yes
11	Male	48	Campo Grande, MS	Campo Grande, MS	Bricklayer	Yes
12	Male	47	Bataypora, MS	Campo Grande, MS	Ignored	Ignored
13	Male	47	Amambaí, MS	Campo Grande, MS	Picture Painter	Yes

¹ considered in this study as the geographic localization of PCM cases

Identification of *Paracoccidioides* species and geographic localization for this PCM case series

The genotyping (*tub1*-PCR-RFLP) of these clinical isolates revealed the occurrence of three different *Paracoccidioides* species: *P. brasiliensis sensu stricto* (S1) (11/16), *P. restrepiensis* (PS3) (4/16) and *P. lutzii* (1/16) ([Table 2](#) and [S2 Fig](#)).

All PCM cases described in this study (n = 13) are of patients current living in Mato Grosso do Sul, Brazil. Nine of them (9/13; 69.2%) were infected by *P. brasiliensis sensu stricto* (S1), three (3/13; 7.7%) by *P. restrepiensis* (PS3) and just one (1/13; 7.7%) by *P. lutzii*. The occurrence of *P. brasiliensis sensu stricto* (S1) did not differ from that of *P. restrepiensis* (PS3) ($p > 0.05$), while the occurrence of this species was higher than that of *P. lutzii* (< 0.001). Regarding the birthplaces, eight PCM patients were born in the state of Mato Grosso do Sul (Midwestern region, Brazil); two in the state of Paraná (Southern region, Brazil), one in the state of Minas

Gerais (Southeast region, Brazil), one in the state of Ceará (Northeast region, Brazil) and another in Pedro Juan Cabajero, Paraguay. It is noteworthy that the migratory history survey showed that the only patient infected by *P. lutzii* lived for a period in the state of Rondônia (Western region, Brazil), despite having been born in the state of Mato Grosso do Sul.

Fig 1 presents the phylogenetic analysis of the thirteen clinical isolates submitted to this study, using the NJ method to assess the genetic distance between them. The result shows that, thirteen samples evaluated phylogenetically, nine have evolutionary proximity with Pb18, thus belonging to the *P. brasiliensis* sensu stricto (S1). Three clinical isolates had genetic similarity with the reference strain EPM54—T2—*P. restrepiensis* (PS3), thus confirming their inclusion in this clade. Only one isolate (MS2451) had similarity with the reference strain Pb01, characterizing as *P. lutzii*. Pb01, MS2541 and EPM194-Pbdog were considered an external group into *Paracoccidioides* spp. species, showing genetic divergences in comparison to clinical isolates and reference strains of *P. brasiliensis* sensu stricto (S1) and *P. restrepiensis* (PS3), which that have genetic similarity between them.

Table 2. Molecular identification of *Paracoccidioides* clinical strains in Mato Grosso do Sul, Brazil (2016–2019).

PCM Cases	Clinical sample ¹	Clinical strains	Genotyped species ²
1	Sputum	MS1198	<i>P. brasiliensis</i> sensu stricto (S1)
	Lymph node aspirate	MS1185	<i>P. brasiliensis</i> sensu stricto (S1)
2	Skin lesion	MS2185	<i>P. brasiliensis</i> sensu stricto (S1)
	Lymph node aspirate	MS2197	<i>P. brasiliensis</i> sensu stricto (S1)
3	Oral lesion scraping	MS2591	<i>P. brasiliensis</i> sensu stricto (S1)
4	Skin lesion	MS2572	<i>P. brasiliensis</i> sensu stricto (S1)
5	Skin lesion	MS1222	<i>P. brasiliensis</i> sensu stricto (S1)
6	Oral lesion scraping	MS2940	<i>P. brasiliensis</i> sensu stricto (S1)
7	Skin lesion	MS1622	<i>P. brasiliensis</i> sensu stricto (S1)
8	Oral lesion scraping	MS1162	<i>P. brasiliensis</i> sensu stricto (S1)
9	Lymph node aspirate	MS2791	<i>P. brasiliensis</i> sensu stricto (S1)
10	Skin lesion	MS1165	<i>P. restrepiensis</i> (PS3)
11	Oral lesion scraping	MS190	<i>P. restrepiensis</i> (PS3)
	Sputum	MS180	<i>P. restrepiensis</i> (PS3)
12	Lymph node aspirate	MS2343	<i>P. restrepiensis</i> (PS3)
13	Tracheal aspirate	MS2451	<i>P. lutzii</i>

¹ Samples from which were isolated the clinical strains by culture

² by PCR-RFLP of *tub1* gene as described by Roberto et al (2016)

Serological profile for this PCM case series

The serum reactivity of the 13 patients varied according to the exoantigen used in the DID test ([S1 Table](#)). The positivity of the test is higher with *Pb*_Ag and *Pr*_Ag than with *Pl*_Ag. In addition, the serum positivity with homologous antigen was 77.8% for *Pb*_Ag and 66.7% for *Pr*_Ag ($p = 0.87$), and the homologous negativity was not different with these two antigens ($p = 0.87$).

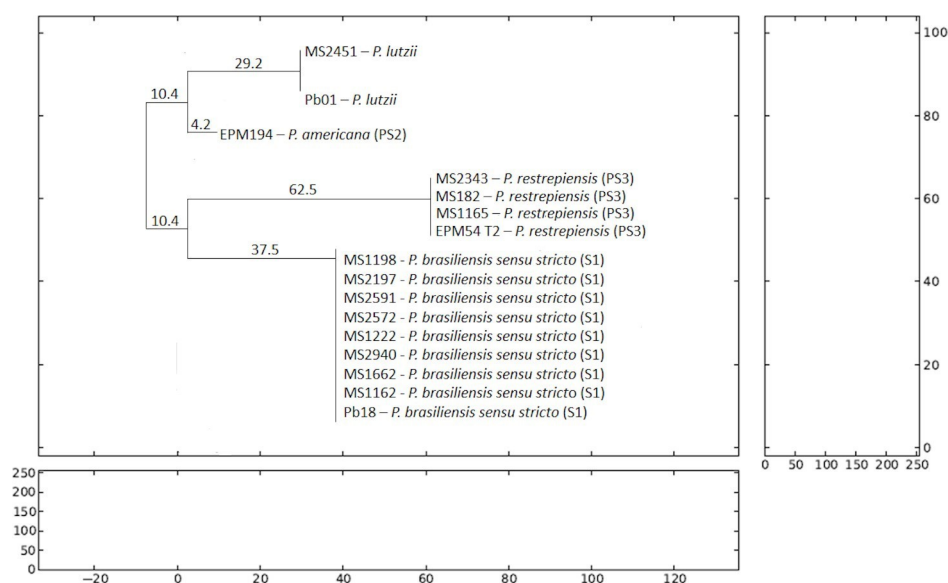


Fig 1. Phylogenetic analysis of *tub1* fragments generated by the PCR—RFLP technique of clinical and reference strains used in this study. The evolutionary method used to analyze the genetic distance between them was Neighbor Joining (NJ). *Pb01* (*P. lutzii*), *MS2451* (*P. lutzii*) and *EPM194* (*P. americana* (PS2)) were considered as species of close genetic variety and external group due to the phenomenon long branch attraction (LBA). *Pb18* (*P. brasiliensis sensu stricto* (S1)) and *EPM54* (*P. restrepiensis* (PS3)) had similarity with the clinical isolates classified in their respective species and showing a common similarity between them.

On the contrary, a few cross-reactions were observed with *Pl*_Ag—one with a patient infected with *P. brasiliensis sensu stricto* (S1) and one with *P. restrepiensis* (PS3) ([S1 Table](#)).

PCM has been confirmed in 100% of cases (13/13) by culture, and DID serology was positive in most (11/13), with 9, 9 and 3 reactive samples using *Pb*_Ag, *Pr*_Ag and *Pb*_Ag, respectively ([S1 Table](#)). Of these, 30.8% (4/13) of samples

presented false negative results when tested with *Pb_Ag* or *Pr_Ag*, and 76.9% (10/13) presented false negative results when using *PI_Ag*. No statistically significant differences ($p \geq 0.05$) in DID reactivity were found between S1 and PS3 cryptic species.

Update on occurrence of *Paracoccidioides* species in the Midwest region

We performed a review of the literature looking for previously reports of PCM cases in the Midwest region, that have been diagnosed by molecular techniques ([S3 Table](#)). The geographic distribution of *Paracoccidioides* species previously reported [[6,7,9,12,24,25,31,34–36](#)] was grouped with our data to present an update on occurrence of phylogenetic species in the Midwest region, Brazil ([Fig 2](#)).

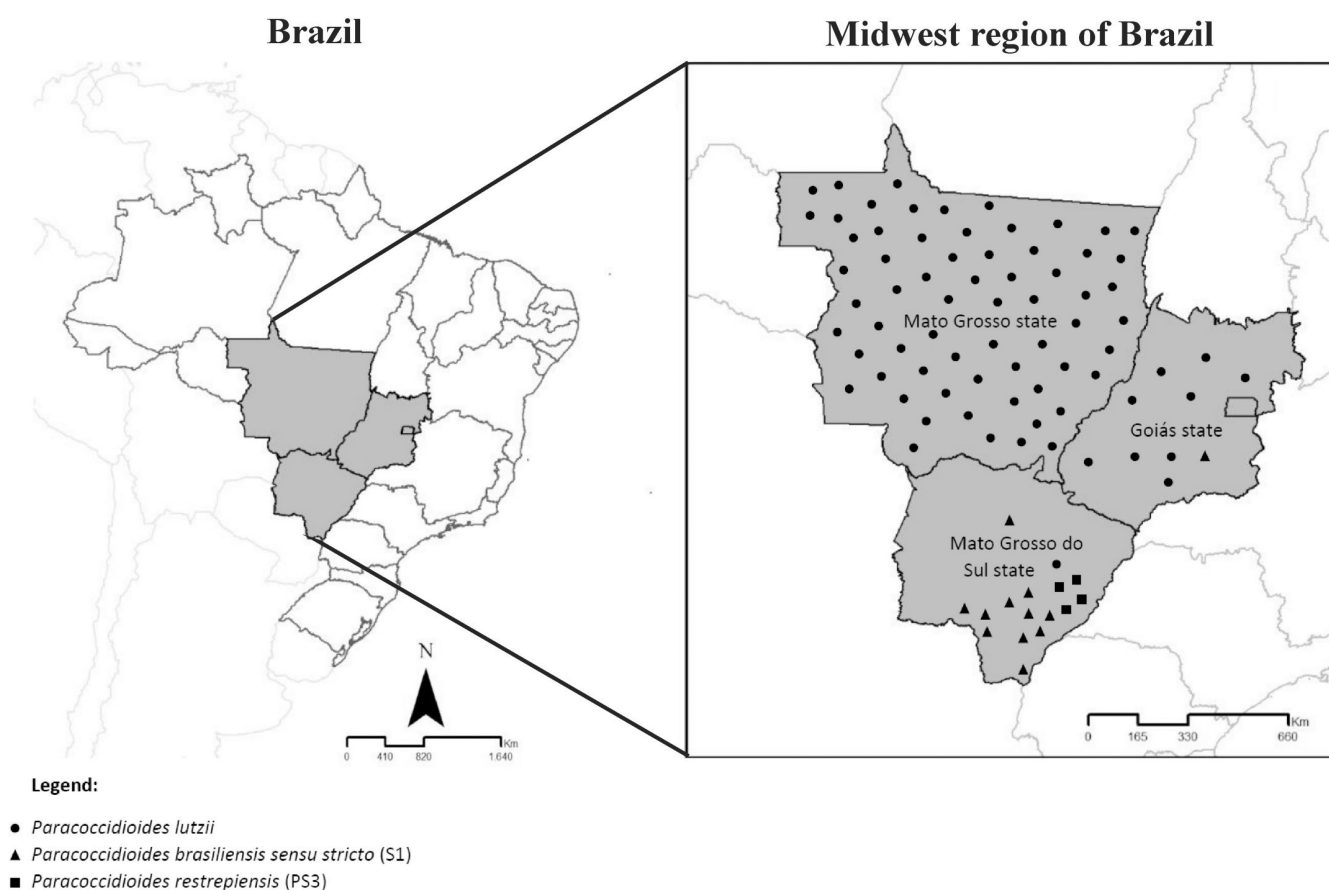


Fig 2. Brazil map showing an update on the *Paracoccidioides* species distribution in the Midwest region, Brazil. The map groups all *Paracoccidioides* clinical isolates previously reported

in the literature [6,7,9,12,24,25,31,33–35] for this region, additionally with found phylogenetic species from this study. The black triangles (▲) represent the geographic distribution of *P. brasiliensis* sensu stricto (S1) in Goiás and Mato Grosso do Sul (MS) states, black circles (●) indicate the presence of *P. lutzii* in the three estates, while black squares (■) are *P. restrepiensis* (PS3) found only in MS state. The map was treated using the vector graphics editor Corel Draw X8. Source: Cartographic bases (shapefiles) from Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE) 2013, with maps.

Discussion

Molecular epidemiology is revealing the geographical distribution of *Paracoccidioides* species into endemic areas [9,24,27,29,31,37]. PCM cases currently are described in almost all regions of Brazil, except the interior of the Northeast [2]. This descriptive study presents a thirteen case PCM series in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil, from which clinical *Paracoccidioides* strains were isolated and genotyped. Thus, for the first time in this state, the clinical *Paracoccidioides* species were molecularly identified, instead of identification being based on serological data. We found nine clinical isolates genotyped as *P. brasiliensis* sensu stricto (S1), three isolates as *P. restrepiensis* (PS3), and only one as *P. lutzii*.

The best choice to identify the *Paracoccidioides* species is the molecular approach using clinical isolates from culture exam; however, it grows slowly in culture media. For example, despite this study having enrolled only 13 PCM cases, this series came from the 56 identified new cases admitted to our reference center between 2016 and 2019, and the continuous character of this procedure should be considered, in order to define the present picture and future directions.

Genotype studies evaluating clinical and environmental isolates from Brazilian South and Southeast regions, bordering the state of Mato Grosso do Sul, have shown an occurrence of *P. brasiliensis* sensu stricto (S1), confirming the predominance of this species in these areas [2,13,24–28]. In addition, *P. restrepiensis* (PS3), a phylogenetic species characterized by Matute et al. (2006), previously considered to be restricted to Colombia, was already found (two isolates—human and soil) in Venezuela in 2016, and recently in Southeastern Brazil

[5,6,24,29]. Now, we present the first report of *P. restrepiensis* (PS3) occurrence in the Brazilian Midwest region. Our findings could suggest that endemic areas for PCM would be expanding from the South and Southeast regions to the Midwest and North in Brazil, maybe due to migration for the establishment of agriculture and animal husbandry [2]. However, further studies are needed to explore this potential spread.

Studies have suggested that the Brazilian Midwest region is the area in which *P. lutzii* is identified with higher frequency than in other regions, based mainly on reports from the state of Mato Grosso [7,9,12,18]. This finding was frequently misinterpreted as meaning that *P. lutzii* predominates other species in this region. In a recent publication, Hahn et al. (2019) reported that during the period 2011 to 2017 only 34 PCM patients at the reference center were treated due to *P. lutzii* in the state of Mato Grosso [9]. In addition, studies on PCM caused by *P. lutzii* from the state of Mato Grosso do Sul were performed based on serological identification [25,30]. The genotyping identification of a great number of fungi of the *Paracoccidioides* genus should be performed to identify the species distribution in different Brazilian regions.

Our findings partially differed from previous expectations, with only one *P. lutzii* isolate. The incidence rate of this disease in adults, who frequently migrate, and the long period of latency after infection, ranging from years to decades, means that it becomes difficult, if not impossible, to determine the geographic origin of these phylogenetic species. Thus, it is possible that the patients had acquired the infection in other locales. Five of 13 (38.5%) patients presented a past history of having lived in other Brazilian states. Four were born in different regions of Brazil (Northeast, South and Southeast), and currently are living in the state of Mato Grosso do Sul. For instance, one patient was born in the state of Ceará, where PCM is rare [38], and another one in Minas Gerais, an important endemic area [39,40]; both patients were infected by *P. brasiliensis sensu stricto* (S1). In addition, two patients were born in the state of Paraná—one infected by *P. restrepiensis* (PS3) and another by *P. brasiliensis sensu stricto* (S1), respectively rare and common genotypes in this Brazilian region. On the other hand, the patient infected by *P. lutzii* was born in the

state of Mato Grosso do Sul, but he lived for some time in the state of Rondônia (Northern region), where this phylogenetic species had already been reported in clinical and environmental samples [11,18].

Observing phylogenetic data of the clinical isolates by the NJ method, strains identified as *P. brasiliensis* sensu stricto (S1) and *P. restrepiensis* (PS3) presented a common ancestry, that can suggest that species 1 (*P. brasiliensis* sensu stricto—S1) suffered speciation by a possible geographic barrier generating the phylogenetic species 3 (*P. restrepiensis*—PS3) [29,31]. The strains Pb01 (*P. lutzii*), MS2451 (*P. lutzii*) and EPM194—Pbdog (*P. americana* (PS2)) were considered as species of the external group in this phylogenetics analysis (NJ), because they belong to species considered as high genetic divergence, respectively [5–8]. We know that the species *P. lutzii* and *P. americana* (PS2) have evolutionary distance compared to other species of the *Paracoccidioides* spp. (*P. brasiliensis* sensu stricto (S1), *P. restrepiensis* (PS3) and *P. venezuelensis* (PS4)) [3–6]. So, the phylogenetic analysis used in this study grouped these clades observing a long branch attraction (LBA) between them [41].

The evolutionary method used in our study, NJ classified *P. lutzii* and *P. americana* (PS2) as genetically close species, but it was a mistake because in the proposed nomenclature classification for species of the genus *Paracoccidioides* spp. these are considered to genetic diverge from each other [6,7]. Thus, *P. lutzii* and *P. americana* (PS2) were considered species that evolved quickly in the *Paracoccidioides* spp, phenomenon known as LBA. Due to the techniques used to identify species and the phylogenetic analysis used in this study, we are limited in terms of the availability of evolutionary methods to assess similarity between strains, but the *tub1*—PCR RFLP method and the phylogenetic tree built by the NJ method were able to answer the aspects of occurrence of *Paracoccidioides* species in the state of Mato Grosso do Sul.

Knowledge of the geographical distribution of species regarding genotype is important to define the antigen used in the serological tests, for diagnosis and control of cure, and in specific clinical, radiological and therapeutic aspects if differences are detected. Our serological results showed a high positivity

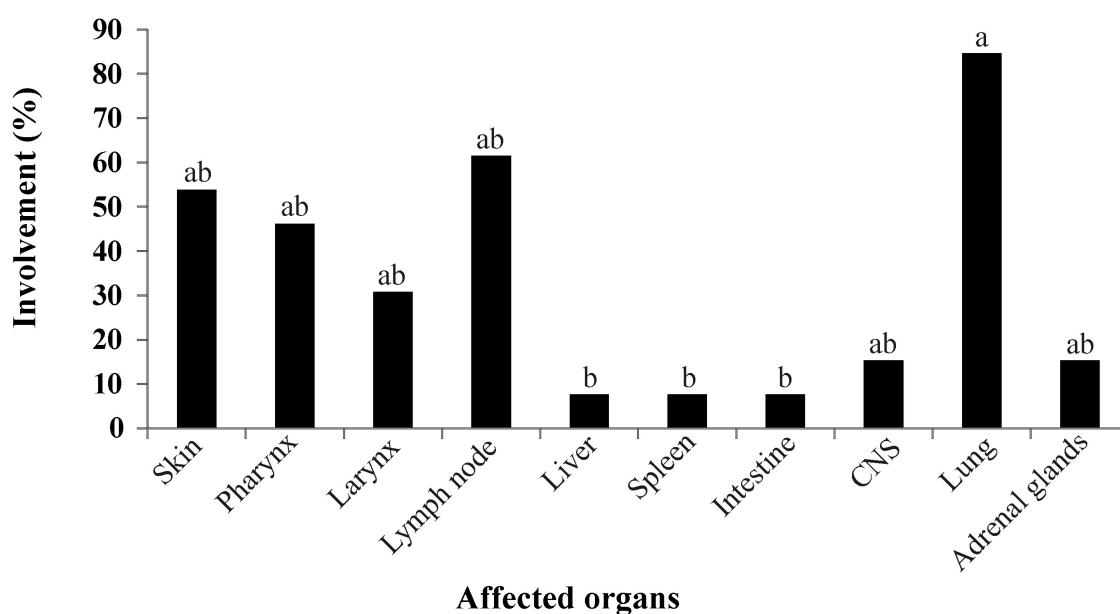
for heterologous antigens between *P. brasiliensis* sensu stricto (S1) and *P. restrepiensis* (PS3), both from the *Paracoccidioides* spp. complex. Similar results were recently observed between *P. brasiliensis* sensu stricto (S1) and *P. americana* (PS2), once again between species from the *Paracoccidioides* spp. complex [27]. On the other hand, serum from only two PCM patients—one infected by *P. brasiliensis* sensu stricto (S1) and one by *P. restrepiensis* (PS3) reacted with the *P. lutzii* antigen, and serum from the patient infected by *P. lutzii* did not react with the *P. brasiliensis* sensu stricto (S1) antigen nor with the *P. restrepiensis* (PS3) antigen. This explains the previous results of false negative reactions in the serum of patients infected by *P. lutzii* tested with the antigen from *P. restrepiensis* (PS3)-B339, which belongs to the *Paracoccidioides* spp. complex. Species from the *Paracoccidioides* spp. complex present similar protein profiles, explaining the cross reactions among its cryptic species [42], while *P. lutzii* isolates present different protein profiles, which will demand future studies to define a better antigen for a more specific serological diagnosis [35,42].

The genotypic identification of clinical and environmental isolates of *Paracoccidioides* spp in countries in Latin America such as Brazil, Argentina, Paraguay and Colombia has been important to understand the geographic distribution of this species in these endemic regions of the PCM [2]. Some countries in South America have the genotypic classification determined according to the relationship between the phylogenetic frequency of each species and its geographic region. *P. restrepiensis* (PS3) was determined to be a species found exclusively in Colombia, but has been identified in countries such as Venezuela, Brazil, Argentina, Peru and Bolivia [5,23,24,29]. These reports of the presence of *P. restrepiensis* (PS3) in countries outside of Colombia suggest a possible evidence of geographic expansion of the species in countries that the presence of this clade is unexpected in other regions of South America, but genotypic studies must be carried out to respond to the genotypic frequency of species of *Paracoccidioides* spp. genus so far exclusive in certain regions and countries of Latin America. Another species of the genus *Paracoccidioides* spp. that has been observed in a phylogenetic and genotypic study in South American countries is *P. brasiliensis* sensu stricto (S1)

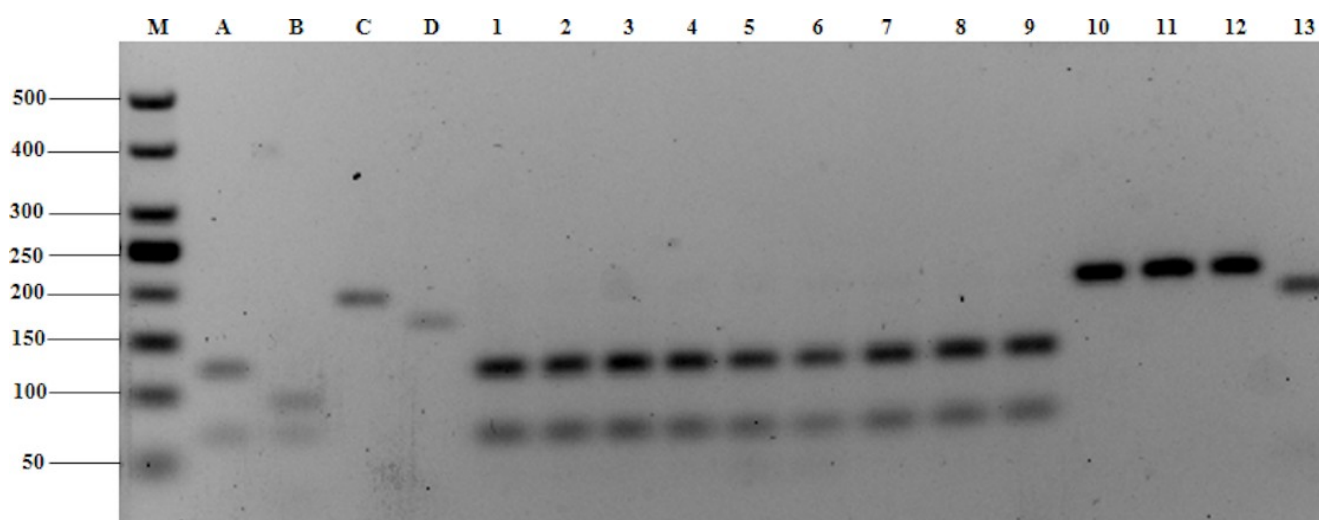
where, its genotypic frequency found in Argentina and Paraguay, corroborating with data from the South and Southeast of Brazil, as well as observed in the Mato Grosso do Sul, MS shown in this study [23]. *P. lutzii* was found in Ecuador [10], showing unexpected evidence of his clade outside its endemic region in the Midwest region of Brazil. With that, we observe the geographic distribution of species until then exclusive in certain countries of South America.

Our findings reinforce the importance of the identification at molecular level of the fungal species occurring in every endemic area. Which could be the key target for the best development of the diagnosis and follow-up of PCM patients.

Supporting information



S1 Fig. Affected organs of 13 PCM patients from the state of Mato Grosso do Sul, Brazil, with genotyping identification of the etiological agent. Period 2016–2019. Lower-case letters compare occurrences; frequencies followed by the same letter do not differ, while those followed by different letters are statistically different ($p < 0.05$). Multiple comparisons were performed using Cochran Q test. (TIF)



S2 Fig. PCR–RFLP detection and species identification of *Paracoccidioides* genus. Fragment standard after digestion with *Bcl*I and *Msp*I endonucleases (*tub*1 PCR-RFLP describe by Roberto et al., 2016 and modified by Hrycyk et al., 2018), showing a similarity between clinical isolates and reference strains of *Paracoccidioides* species. 3% agarose gel verifying similarity of fragments between the reference strains: **A:** Pb18—*P. brasiliensis sensu stricto* (S1); **B:** Pbdog— EPM 194—*P. americana* (PS2); **C:** EPM 54—T2—*P. restrepiensis* (PS3); **D:** Pb01—*P. lutzii*; and the clinical samples in this study (**1** to **13**—see in [Table 2](#)). **M:** 50 bp DNA ladder molecular weight marker (Sinapse Inc., USA). (TIF)

10	<i>P. restrepiensis</i>	Chronic	Moderate	No	No	Itraconazole	Loss to follow-up	-	Yes	No	Yes	Yes	No	No	No	No	Yes	No	(+)	(-)	(-)
11	<i>P. restrepiensis</i>	Chronic	Severe	No	Yes	Cotrimoxazole	In treatment	-	No	Yes	No	Yes	No	No	No	No	Yes	No	(+)	(+)	(-)
12	<i>P. restrepiensis</i>	Chronic	Severe	No	Yes	Amphotericin B	Death	-	No	Yes	No	Yes	No	No	No	No	Yes	No	(-)	(+)	(+)
13	<i>P. lutzii</i>	Chronic	Severe	No	No	No treatment	Death	-	No	No	No	No	No	No	No	No	Yes	No	(-)	(-)	(+)

¹ determined by PCR-RFLP of *tub1* gene as described by Roberto et al (2016); ² defined by clinical exam; ³ DID reactivity using produced exoantigens from *Paracoccidioides* species circulating in Mato Grosso do Sul; ^a *Pb*_Ag exoantigen from *P. brasiliensis* sensu stricto (*Pb*18, S1b); ^b *Pr*_Ag exoantigen from *P. restrepiensis* (PS3, EPM01: B_339); and ^c *Pl*_Ag exoantigen from *P. lutzii* (MS2451 clinical isolate of this study)

S2 Table. Organs involved in 13 PCM cases stratified by genotyped species.
(XLSX)

Organs involved	<i>P. brasiliensis</i> sensu stricto (n = 9)	<i>P. restrepiensis</i> (n = 3)	<i>P. lutzii</i> (n = 1)	n-value*
Skin	6	1	-	0.52
Pharynx	4	3	-	0.20
Larynx	3	1	-	0.99
Lymph node	5	3	-	0.49
Liver	1	-	-	0.99
Spleen	1	-	-	0.99
Intestine	1	-	-	0.99
Central Nervous System	2	-	-	0.99
Lungs	7	3	1	0.99
Adrenal glands	2	-	-	0.99

* Comparison of prevalences between *P. brasiliensis* and *P. restrepiensis* by Fisher's exact test.

S3 Table. Geographic distribution of clinical isolates identified by molecular biology in the Midwest region of Brazil.
(XLSX)

Clinical isolates		Geographic localization	Molecular technique	Identified Species	Type of study	References
Original ID	Other ID					
State of Mato Grosso (MT)						
189	-	Mato Grosso, Brazil	MLST and <i>tub1</i> – PCR RFLP	<i>P. lutzii</i>	Phylogenetic	[7, 11, 24]
9840	-	Mato Grosso, Brazil	MLST	<i>P. lutzii</i>	Phylogenetic Serological	[7, 25]
84	-	Mato Grosso, Brazil	MLST and <i>tub1</i> – PCR RFLP	<i>P. lutzii</i>	Phylogenetic	[7, 11, 24]
Raj2	-	Mato Grosso, Brazil	MLST and <i>tub1</i> – PCR RFLP	<i>P. lutzii</i>	Phylogenetic	[7, 11, 24]
61	-	Mato Grosso, Brazil	MLST and <i>tub1</i> – PCR RFLP	<i>P. lutzii</i>	Phylogenetic	[7, 11, 24]
206	-	Mato Grosso, Brazil	MLST and <i>tub1</i> – PCR RFLP	<i>P. lutzii</i>	Phylogenetic	[7, 11, 24]
351	-	Mato Grosso, Brazil	MLST and <i>tub1</i> – PCR RFLP	<i>P. lutzii</i>	Phylogenetic	[7, 11, 24]
57	-	Mato Grosso, Brazil	MLST and <i>tub1</i> – PCR RFLP	<i>P. lutzii</i>	Phylogenetic	[7, 11, 24]
218	-	Mato Grosso, Brazil	MLST and <i>tub1</i> – PCR RFLP	<i>P. lutzii</i>	Phylogenetic	[7, 11, 24]
7	-	Mato Grosso, Brazil	MLST and <i>tub1</i> – PCR RFLP	<i>P. lutzii</i>	Phylogenetic	[7, 11, 24]
133	-	Mato Grosso, Brazil	MLST	<i>P. lutzii</i>	Phylogenetic	[7, 11]
694	-	Mato Grosso, Brazil	MLST	<i>P. lutzii</i>	Phylogenetic	[7, 11]
JT-2	-	Mato Grosso, Brazil	MLST	<i>P. lutzii</i>	Phylogenetic	[7]
369	-	Mato Grosso, Brazil	MLST	<i>P. lutzii</i>	Phylogenetic	[7]
283	-	Mato Grosso, Brazil	MLST	<i>P. lutzii</i>	Phylogenetic	[7]
375	-	Mato Grosso, Brazil	MLST	<i>P. lutzii</i>	Phylogenetic	[7]
397	-	Mato Grosso, Brazil	MLST and <i>tub1</i> – PCR RFLP	<i>P. lutzii</i>	Phylogenetic	[7, 11, 24]
JAL	-	Mato Grosso, Brazil	MLST	<i>P. lutzii</i>	Phylogenetic	[12]
EE	-	Mato Grosso, Brazil	MLST	<i>P. lutzii</i>	Phylogenetic	[11, 35]
5979	-	Mato Grosso, Brazil	MLST	<i>P. lutzii</i>	Phylogenetic	[11]

3159	-	Mato Grosso, Brazil	MLST	<i>P. lutzii</i>	Serological	[25]
2875	-	Mato Grosso, Brazil	MLST	<i>P. lutzii</i>	Serological	[25]
2912	-	Mato Grosso, Brazil	MLST	<i>P. lutzii</i>	Serological	[25]
JMS	-	Mato Grosso, Brazil	MLST	<i>P. lutzii</i>	Phylogenetic	[11, 34]
JHS	-	Mato Grosso, Brazil	MLST	<i>P. lutzii</i>	Phylogenetic	[11, 34]
MFC	-	Mato Grosso, Brazil	MLST	<i>P. lutzii</i>	Phylogenetic	[11, 34, 35]
MND	-	Mato Grosso, Brazil	MLST	<i>P. lutzii</i>	Phylogenetic	[34]
2226	-	Mato Grosso, Brazil	MLST	<i>P. lutzii</i>	Phylogenetic	[34]
2422	-	Mato Grosso, Brazil	MLST	<i>P. lutzii</i>	Phylogenetic	[34]
31AMS	-	Mato Grosso, Brazil	MLST	<i>P. lutzii</i>	Serological	[35]
MT isolates*	-	Mato Grosso, Brazil	<i>tub1</i> – PCR RFLP and HSP sequence	<i>P. lutzii</i>	Epidemiology	[9]
State of Goiás (GO)						
135	-	Goiás Brazil	MLST	<i>P. lutzii</i>	Phylogenetic	[7]
Pb01	ATCC – MYA - 826	Goiás, Brazil	MLST	<i>P. lutzii</i>	Phylogenetic	[7]
ED01	-	Goiás, Brazil	RAPD and Trem sequence	<i>P. lutzii</i>	Phylogenetic	[6, 11, 34]
Pb66	-	Goiás, Brazil	MLST	<i>P. lutzii</i>	Epidemiology	[12, 25]
EP01	-	Goiás, Brazil	MLST	<i>P. lutzii</i>	Serological	[25]
2912	-	Goiás, Brazil	MLST	<i>P. lutzii</i>	Serological	[25]
8334	-	Goiás, Brazil	MLST	<i>P. lutzii</i>	Serological	[11, 25]
8941	-	Goiás, Brazil	MLST	<i>P. lutzii</i>	Serological	[25]
1578	-	Goiás, Brazil	Whole genome sequence	<i>P. lutzii</i>	Phylogenetic	[6, 11, 25]
Pb13	B19	Goiás, Brazil	<i>tub1</i> – PCR RFLP	<i>P. brasiliensis sensu stricto</i> (S1)	Phylogenetic	[24]
State of Mato Grosso do Sul (MT)						
MS1	-	Mato Grosso do Sul, Brazil	Whole genome sequence	<i>P. brasiliensis sensu stricto</i> (S1a)	Phylogenetic	[6, 11]
MS2	-	Mato Grosso do Sul, Brazil	Whole genome sequence	<i>P. brasiliensis sensu stricto</i> (S1a)	Phylogenetic	[6, 11]
MS1198	-	Mato Grosso do Sul, Brazil	<i>tub1</i> – PCR RFLP	<i>P. brasiliensis sensu stricto</i> (S1)	Molecular Epidemiology	This study
MS1185	-	Mato Grosso do Sul, Brazil	<i>tub1</i> – PCR RFLP	<i>P. brasiliensis sensu stricto</i> (S1)	Molecular Epidemiology	This study
MS2185	-	Mato Grosso do Sul, Brazil	<i>tub1</i> – PCR RFLP	<i>P. brasiliensis sensu stricto</i> (S1)	Molecular Epidemiology	This study

MS2197	-	Mato Grosso do Sul, Brazil	<i>tub1</i> – PCR RFLP	<i>P. brasiliensis sensu stricto</i> (S1)	Molecular Epidemiology	This study
MS2591	-	Mato Grosso do Sul, Brazil	<i>tub1</i> – PCR RFLP	<i>P. brasiliensis sensu stricto</i> (S1)	Molecular Epidemiology	This study
MS2572	-	Mato Grosso do Sul, Brazil	<i>tub1</i> – PCR RFLP	<i>P. brasiliensis sensu stricto</i> (S1)	Molecular Epidemiology	This study
MS1222	-	Mato Grosso do Sul, Brazil	<i>tub1</i> – PCR RFLP	<i>P. brasiliensis sensu stricto</i> (S1)	Molecular Epidemiology	This study
MS2940	-	Mato Grosso do Sul, Brazil	<i>tub1</i> – PCR RFLP	<i>P. brasiliensis sensu stricto</i> (S1)	Molecular Epidemiology	This study
MS1622	-	Mato Grosso do Sul, Brazil	<i>tub1</i> – PCR RFLP	<i>P. brasiliensis sensu stricto</i> (S1)	Molecular Epidemiology Serological	This study
MS1162	-	Mato Grosso do Sul, Brazil	<i>tub1</i> – PCR RFLP	<i>P. brasiliensis sensu stricto</i> (S1)	Molecular Epidemiology Serological	This study
MS2791	-	Mato Grosso do Sul, Brazil	<i>tub1</i> – PCR RFLP	<i>P. brasiliensis sensu stricto</i> (S1)	Molecular Epidemiology	This study
MS1165	-	Mato Grosso do Sul, Brazil	<i>tub1</i> – PCR RFLP	<i>P. restrepiensis</i> (PS3)	Molecular Epidemiology	This study
MS190	-	Mato Grosso do Sul, Brazil	<i>tub1</i> – PCR RFLP	<i>P. restrepiensis</i> (PS3)	Molecular Epidemiology	This study
MS180	-	Mato Grosso do Sul, Brazil	<i>tub1</i> – PCR RFLP	<i>P. restrepiensis</i> (PS3)	Molecular Epidemiology	This study
MS2343	-	Mato Grosso do Sul, Brazil	<i>tub1</i> – PCR RFLP	<i>P. restrepiensis</i> (PS3)	Molecular Epidemiology	This study
MS2451	-	Mato Grosso do Sul, Brazil	<i>tub1</i> – PCR RFLP	<i>P. lutzii</i>	Molecular Epidemiology	This study

Legend:* 34 isolates from Mato Grosso State was genotyped by *tub1* – PCR RFLP and sequence of Heat Shock Protein (HSP) and your identifications were not informed.
Random Amplified Polymorphic DNA; RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism; Trem - Transposable element mariner.

MLST - Multi Local Sequence Typing; RAPD -

Acknowledgments

Authors thank the Prof. Dr. Roberto Martinez from Universidade de São Paulo (USP) by support in the RFLP method and Msc. Anderson Fuentes Ferreira from Universidade Federal do Ceará (UFC) by helping in the map imagen construction.

Author Contributions

Conceptualization: Clayton Luiz Borges, Rinaldo Poncio Mendes, Anamaria Mello Miranda Paniago, Simone Schneider Weber.

Data curation: Karine Mattos, Tiago Alexandre Cocio, Edilânia Gomes Araújo Chaves, Lídia Raquel de Carvalho, Rinaldo Poncio Mendes.

Funding acquisition: Clayton Luiz Borges, Anamaria Mello Miranda Paniago, Simone Schneider Weber.

Investigation: Karine Mattos, Clayton Luiz Borges, James Venturini, Anamaria Mello Miranda Paniago, Simone Schneider Weber.

Software: Simone Schneider Weber.

Supervision: Anamaria Mello Miranda Paniago.

Writing – original draft: Karine Mattos, Tiago Alexandre Cocio, Edilânia Gomes Araújo Chaves, Simone Schneider Weber.

Writing – review & editing: James Venturini, Lídia Raquel de Carvalho, Rinaldo Poncio Mendes, Anamaria Mello Miranda Paniago.

References

1. Restrepo A, Cano LE, Gonzalez A. THE POWER OF THE SMALL: THE EXAMPLE OF *Paracoccidioides brasiliensis* CONIDIA. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2015; 57 Suppl 19:5–10. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000700003> PMID: [26465363](#).
2. Martinez R. New Trends in *Paracoccidioidomycosis* Epidemiology. *J Fungi (Basel)*. 2017; 3(1). <https://doi.org/10.3390/jof3010001> PMID: [29371520](#).
3. Mendes RP, Cavalcante RS, Marques SA, Marques MEA, Venturini J, Sylvestre TF, et al. *Paracoccidioidomycosis*: Current Perspectives from Brazil. *Open Microbiol J*. 2017; 11:224–82. <https://doi.org/10.2174/1874285801711010224> PMID: [29204222](#).
4. Gonzalez A, Hernandez O. New insights into a complex fungal pathogen: the case of *Paracoccidioides* spp. *Yeast*. 2016; 33(4):113–28. <https://doi.org/10.1002/yea.3147> PMID: [26683539](#).
5. Matute DR, McEwen JG, Puccia R, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol*. 2006; 23(1):65–73. <https://doi.org/10.1093/molbev/msj008> PMID: [16151188](#).

6. Munoz JF, Farrer RA, Desjardins CA, Gallo JE, Sykes S, Sakthikumar S, et al. Genome Diversity, Recombination, and Virulence across the Major Lineages of *Paracoccidioides*. *mSphere*. 2016; 1(5). <https://doi.org/10.1128/mSphere.00213-16> PMID: [27704050](#).
7. Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJ, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol*. 2009; 52(2):273–83. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.04.005> PMID: [19376249](#).
8. Turissini DA, Gomez OM, Teixeira MM, McEwen JG, Matute DR. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. *Fungal Genet Biol*. 2017; 106:9–25. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.05.007> PMID: [28602831](#).
9. Hahn RC, Rodrigues AM, Della Terra PP, Nery AF, Hoffmann-Santos HD, Gois HM, et al. Clinical and epidemiological features of paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides lutzii*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019; 13(6):e0007437. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007437> PMID: [31163028](#).
10. Marques-da-Silva SH, Rodrigues AM, de Hoog GS, Silveira-Gomes F, Camargo ZP. Occurrence of *Paracoccidioides lutzii* in the Amazon region: description of two cases. *Am J Trop Med Hyg*. 2012; 87 (4):710–4. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.12-0340> PMID: [22927496](#).
11. Teixeira Mde M, Theodoro RC, Oliveira FF, Machado GC, Hahn RC, Bagagli E, et al. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. *Med Mycol*. 2014; 52(1):19–28. <https://doi.org/10.3109/13693786.2013.794311> PMID: [23768243](#).
12. Theodoro RC, Teixeira Mde M, Felipe MS, Paduan Kdos S, Ribolla PM, San-Blas G, et al. Genus *paracoccidioides*: Species recognition and biogeographic aspects. *PLoS One*. 2012; 7(5):e37694. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037694> PMID: [22666382](#).
13. Shikanai-Yasuda MA, Mendes RP, Colombo AL, Queiroz-Telles F, Kono ASG, Paniago AMM, et al. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2017; 50(5):715–40. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0230-2017> PMID: [28746570](#).
14. de Camargo ZP, Berzaghi R, Amaral CC, Silva SH. Simplified method for producing *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for use in immunodiffusion tests. *Med Mycol*. 2003; 41(6):539–42. <https://doi.org/10.1080/13693780310001615358> PMID: [14725330](#).
15. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev*. 1993; 6 (2):89–117. <https://doi.org/10.1128/cmr.6.2.89> PMID: [8472249](#).
16. Gomes GM, Cisalpino PS, Taborda CP, de Camargo ZP. PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol*. 2000; 38(9):3478–80. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.9.3478-3480.2000> PMID: [10970409](#).
17. Dias L, de Carvalho LF, Romano CC. Application of PCR in serum samples for diagnosis of paracoccidioidomycosis in the southern Bahia-Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012; 6(11):e1909. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001909> PMID: [23209853](#).
18. Arantes TD, Theodoro RC, Teixeira Mde M, Bosco Sde M, Bagagli E. Environmental Mapping of *Paracoccidioides* spp. in Brazil Reveals New Clues into Genetic Diversity, Biogeography and Wild Host Association. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10(4):e0004606. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004606> PMID: [27045486](#).
19. Semighini CP, de Camargo ZP, Puccia R, Goldman MH, Goldman GH. Molecular identification of *Paracoccidioides brasiliensis* by 5' nuclease assay. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2002; 44(4):383–6. [https://doi.org/10.1016/s0732-8893\(02\)00472-8](https://doi.org/10.1016/s0732-8893(02)00472-8) PMID: [12543545](#).
20. Rocha-Silva F, Gomes LI, Gracielle-Melo C, Goes AM, Caligiorne RB. Real Time Polymerase Chain Reaction (rt-PCR): A New Patent to Diagnostic Purposes for

- Paracoccidioidomycosis. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov*. 2017; 10(2):143–9. <https://doi.org/10.2174/1872214810666160905150958> PMID: [27593543](#).
21. Nascimento E, Martinez R, Rodrigues Lopes A, de Souza Bernardes LA, Pomponio Barco C, Goldman MHS, et al. Detection and Selection of Microsatellites in the Genome of *Paracoccidioides brasiliensis* as Molecular Markers for Clinical and Epidemiological Studies. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004; 42(11):5007–14. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.11.5007-5014.2004> PMID: [15528688](#)
 22. Salgado-Salazar C, Jones LR, Restrepo A, McEwen JG. The human fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* (Onygenales: Ajellomycetaceae) is a complex of two species: phylogenetic evidence from five mitochondrial markers. *Cladistics*. 2010; 26(6):613–24. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2010.00307.x>
 23. Teixeira MM, Cattana ME, Matute DR, Munoz JF, Arechavala A, Isbell K, et al. Genomic diversity of the human pathogen *Paracoccidioides* across the South American continent. *Fungal Genet Biol*. 2020; 140:103395. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2020.103395> PMID: [32325168](#).
 24. Roberto TN, Rodrigues AM, Hahn RC, de Camargo ZP. Identifying *Paracoccidioides* phylogenetic species by PCR-RFLP of the alpha-tubulin gene. *Med Mycol*. 2016; 54(3):240–7. <https://doi.org/10.1093/mmy/myv083> PMID: [26667263](#).
 25. Gegembauer G, Araujo LM, Pereira EF, Rodrigues AM, Paniago AM, Hahn RC, et al. Serology of paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides lutzii*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8(7):e2986. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002986> PMID: [25032829](#).
 26. Hrycyk MF, Garcia Garces H, Bosco SMG, de Oliveira SL, Marques SA, Bagagli E. Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*, *P. lutzii* and related species: infection in armadillos, soil occurrence and mycological aspects. *Med Mycol*. 2018; 56(8):950–62. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx142> PMID: [29325170](#).
 27. de Macedo PM, Teixeira MM, Barker BM, Zancoppe-Oliveira RM, Almeida-Paes R, Francesconi do Valle AC. Clinical features and genetic background of the sympatric species *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides americana*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019; 13(4):e0007309. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007309> PMID: [30986220](#)
 28. Cocio TA, Nascimento E, von Zeska Kress MR, Bagagli E, Martinez R. Phylogenetic Species of *Paracoccidioides* spp. Isolated from Clinical and Environmental Samples in a Hyperendemic Area of Paracoccidioidomycosis in Southeastern Brazil. *J Fungi (Basel)*. 2020; 6(3). <https://doi.org/10.3390/jof6030132> PMID: [32796579](#).
 29. Cocio TA, Nascimento E, Kress M, Bagagli E, Martinez R. Characterization of a *Paracoccidioides* spp. strain from southeastern Brazil genotyped as *Paracoccidioides restrepiensis* (PS3) and review of this phylogenetic species. *Genet Mol Biol*. 2020; 43(2):e20190201. <https://doi.org/10.1590/1678-4685GMB-2019-0201> PMID: [32502230](#).
 30. Pereira BAS. Pathogenicity and immunogenicity of clinical isolates of the *Paracoccidioides brasiliensis* complex [Master]. Repositório Institucional Unesp—Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu; 2019.
 31. Teixeira MM, Theodoro RC, Nino-Vega G, Bagagli E, Felipe MS. *Paracoccidioides* species complex: ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence. *PLoS Pathog*. 2014; 10(10):e1004397. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004397> PMID: [25357210](#)
 32. Pavel AB, Vasile CI. PyElph—a software tool for gel images analysis and phylogenetics. *BMC Bioinformatics*. 2012; 13:9. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-9> PMID: [22244131](#)
 33. de Camargo ZP. Serology of paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*. 2008; 165(4–5):289–302. <https://doi.org/10.1007/s11046-007-9060-5> PMID: [18777635](#)

34. Alves FL, Ribeiro MA, Hahn RC, de Melo Teixeira M, de Camargo ZP, Cisalpino PS, et al. Transposable elements and two other molecular markers as typing tools for the genus *Paracoccidioides*. *Med Mycol*. 2015; 53(2):165–70. <https://doi.org/10.1093/mmy/myu074> PMID: [25541559](#)
35. de Arruda Grossklaus D, Terumi Takahara D, Silvana Kruger C, Maria Gonzaga A, Pires de Camargo Z, Ferreira Nery A, et al. PROFILE OF EXOANTIGENS FROM CLINICAL ISOLATES OF *Paracoccidioides lutzii* IN MATO GROSSO, BRAZIL. *Revista de Patologia Tropical / Journal of Tropical Pathology*. 2016; 45(3):265–72. <https://doi.org/10.5216/rpt.v45i3.43514>
36. Marini MM, Zanforlin T, Santos PC, Barros RR, Guerra AC, Puccia R, et al. Identification and characterization of Tc1/mariner-like DNA transposons in genomes of the pathogenic fungi of the *Paracoccidioides* species complex. *BMC genomics*. 2010; 11(1):130. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-130> PMID: [20178623](#)
37. Hahn RC, Macedo AM, Fontes CJF, Batista RD, Santos NL, Hamdan JS. Randomly Amplified Polymorphic DNA as a Valuable Tool for Epidemiological Studies of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003; 41(7):2849–54. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.7.2849-2854.2003> PMID: [12843011](#)
38. Facanha MC, Souza AdQ, Café VS, Wanke B. *Paracoccidioidomycosis*: description of two cases autochthonous in Ceará. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2010; 14:86–8. PMID: [20428661](#)
39. Magalhães EMdS Ribeiro CdF, Dâmaso CS Coelho LFL, Silva RR Ferreira EB, et al. Prevalence of paracoccidioidomycosis infection by intradermal reaction in rural areas in Alfenas, Minas Gerais, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2014; 56(4):281–5. <https://doi.org/10.1590/s0036-46652014000400002> PMID: [25076426](#)
40. Martinez R, Vitali LH, Henriques JHdS, Machado AA, Albernaz A, Lima AA. Inquérito soropidemiológico para infecções por fungos causadores de micoses sistêmicas na Reserva Indígena Xacriabá, Estado de Minas Gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2002; 35(4):347–50. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822002000400011> PMID: [12170330](#)
41. Bergsten J. A review of long-branch attraction. *Cladistics*. 2005; 21(2):163–93. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2005.00059.x>
42. Queiroz Júnior LdP, de Camargo ZP, Tadano T, Rodrigues AM, Takarara DT, Gegembauer G, et al. Serological and antigenic profiles of clinical isolates of *Paracoccidioides* spp. from Central Western Brazil. *Mycoses*. 2014; 57(8):466–72. <https://doi.org/10.1111/myc.12183> PMID: [24635832](#)

CAPÍTULO 3 – CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

O estudo, nas condições em que foi desenvolvido, permite concluir que:

- A maioria dos isolados submetidos a tipagem molecular foram identificados como *P. brasiliensis* stricto sensu, indicando que, possivelmente, esta é a espécie predominante nos casos de PCM em Mato Grosso do Sul.
- Casos de PCM por *P. restrepiensis* também foram observados, assim como um único caso de PCM por *P. lutzii*. Este último, no entanto, havia residido em Rondônia, onde pode ter adquirido a infecção.
- Nenhuma associação foi observada entre a espécie de *Paracoccidioides* e os órgãos acometidos pela PCM.
- Pacientes com PCM por *P. brasiliensis* e *P. restrepiensis*, ambas do complexo *P. brasiliensis*, apresentaram sororreatividade no teste IDD frente a antígenos produzidos a partir dessas espécies, indiferentemente; enquanto a sororreação frente a antígenos produzidos a partir de *P. lutzii* foi baixa. Além disso, o único paciente com PCM por *P. lutzii* foi sororreagente apenas a antígeno de *P. lutzii*, indicando uma reação espécie-específica.
- Esses achados reforçam a importância de se conhecer a espécie envolvida na PCM e de se utilizar antígenos das diferentes espécies no teste de imunodifusão, tanto para aprimorar o diagnóstico quanto para o controle de cura