

Original

## Agentes de micosis endémicas en un área rural de Argentina: estudio seroepidemiológico en perros

Cristina Elena Canteros<sup>a,\*</sup>, María Julia Madariaga<sup>b</sup>, William Lee<sup>a</sup>, María Cristina Rivas<sup>a</sup>,  
Graciela Davel<sup>a</sup> y Ricardo Iachini<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Departamento Micología, INEI, ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, Buenos Aires, Argentina

<sup>b</sup> Instituto de Zoonosis Luis Pasteur, Buenos Aires, Argentina

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 16 de agosto de 2009

Aceptado el 6 de noviembre de 2009

On-line el 25 de enero de 2010

#### Palabras clave:

Paracoccidiodomicosis

Histoplasmosis

Coccidiodomicosis

Seroepidemiología

Perros

### RESUMEN

**Antecedentes:** Los hongos *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum* y *Coccidioides* sp. son los agentes etiológicos de paracoccidiodomicosis, histoplasmosis y coccidiodomicosis, respectivamente. Estas 3 micosis son endémicas en distintas áreas geográficas de Argentina. En Latinoamérica existen antecedentes de investigación de áreas endémicas que utilizan perros domésticos como indicadores epidemiológicos.

**Objetivo:** Determinar la presencia de *P. brasiliensis*, *H. capsulatum* y *Coccidioides* sp. en una zona rural del noreste de Argentina, denominada interfluvio Teuco-Bermejito, provincia del Chaco.

**Métodos:** Se evaluaron 89 sueros de igual número de perros domésticos que habitaban 10 comunidades del área. Mediante la técnica de *western blot* se buscaron anticuerpos específicos contra los antígenos extracelulares fúngicos específicos: anti-gP43 de *P. brasiliensis*, anti-H/M de *H. capsulatum* y anti-120, 82 y 48 kDa de *Coccidioides* sp.

**Resultados:** Nueve de los 89 sueros (10%) mostraron anticuerpos específicos contra uno o más de los antígenos probados. Ocho sueros tuvieron anticuerpos anti-H/M y uno solamente tuvo anticuerpos anti-M. Uno de estos 9 sueros reveló, además, anti-gP43 y otro reaccionó contra los 3 antígenos probados.

**Conclusiones:** Este es el primer estudio realizado en Argentina que utiliza perros domésticos para detectar áreas endémicas de paracoccidiodomicosis, histoplasmosis y coccidiodomicosis. Nuestros resultados indican que *H. capsulatum* es el principal agente de micosis endémicas en el interfluvio Teuco-Bermejito. Probablemente, los humanos que habitan esta zona tengan una exposición similar a este hongo y, por tanto, el diagnóstico de histoplasmosis debe considerarse cuando los pacientes que habitan esta área geográfica presenten manifestaciones clínicas pulmonares o mucocutáneas compatibles con la enfermedad.

© 2009 Revista Iberoamericana de Micología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

## Endemic fungal pathogens in a rural setting of Argentina: seroepidemiological study in dogs

### ABSTRACT

**Background:** Three fungal species causing human disease, namely *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum* and *Coccidioides* sp., are endemic in different areas of Argentina. Rates of infection in domestic dogs have been used in other Latin American countries as indicators of the presence of these pathogens in a given area. We used such an approach to investigate the epidemiological relevance of paracoccidiodomyco-  
cosis, histoplasmosis and coccidiodomyco-  
cosis in our country.

**Aim:** To investigate the presence of *P. brasiliensis*, *H. capsulatum* and *Coccidioides* sp. in a rural area of Argentina called Interfluvio Teuco-Bermejito, located in Chaco province.

**Methods:** We applied Western Blotting to determine the presence of specific antibodies in sera from 89 domestic dogs inhabiting the area. Antibodies against the following extra-cellular fungal antigens were investigated: gP43 of *P. brasiliensis*, H/M of *H. capsulatum* and 120, 82 and 48 kDa antigen bands of *Coccidioides* sp.

**Results:** Specific antibodies against *H. capsulatum* were found in 9/89 (10%) sera: 8 reacted against both H and M antigens and 1 only reacted against antigen M. Of these 9 sera, one showed additional anti-gP43 activity and another reacted against all the fungal antigens tested.

#### Keywords:

Paracoccidiodomyco-  
cosis

Histoplasmosis

Coccidiodomyco-  
cosis

Seroepidemiology

Dogs

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: ccanteros@anlis.gov.ar (C.E. Canteros).

**Conclusions:** This is the first study using dog infection to assess the presence of endemic fungal pathogens in Argentina. Our results suggest that *H. capsulatum* is the main dimorphic fungal pathogen in the Interfluvio Teuco-Bermejito area. Therefore, the diagnosis of histoplasmosis should be taken into account in patients living in this geographic region who show pulmonary or mucocutaneous symptoms compatible with the disease.

© 2009 Revista Iberoamericana de Micología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

## Introducción

Los hongos dimórficos *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum* y *Coccidioides* sp. son los agentes causales de la paracoccidioidomicosis, la histoplasmosis y la coccidioidomicosis, respectivamente. Estas micosis son endémicas, de comienzo respiratorio y afectan a la mayoría de los mamíferos, entre ellos a los perros domésticos (*Canis familiaris*)<sup>25,28</sup>. Los individuos susceptibles se infectan por inhalación de conidios o fragmentos de hifas que estos hongos desarrollan en la naturaleza. La infección puede ocurrir en cualquier momento de la vida, puede pasar desapercibida (formas subclínicas) o evolucionar a enfermedad grave y muerte<sup>27</sup>. Reconocer las áreas endémicas para cada una de estas micosis es importante desde el punto de vista epidemiológico y sanitario, puesto que alerta a las autoridades de salud pública sobre los riesgos a los que la población de una región geográfica está expuesta y facilita de esta manera el diagnóstico.

Uno de los principales inconvenientes en la búsqueda de fuentes de infección de *P. brasiliensis*, *H. capsulatum* y *Coccidioides* sp. es la dificultad para recuperarlos de muestras ambientales. Otras especies bacterianas o fúngicas de crecimiento rápido con las que comparten el nicho ecológico inhiben su lento crecimiento en medios de cultivo. Para aislarlos, muchas veces es necesario realizar inoculación experimental en animales susceptibles.

Se realizaron estudios de prevalencia de micosis sistémicas en humanos analizando sueros de donantes de bancos de sangre<sup>3,15</sup> y en sueros de población de reservas aborígenes<sup>17</sup>. Estos estudios revelaron áreas endémicas de histoplasmosis y paracoccidioidomicosis a través de la detección de individuos infectados asintomáticos que tuvieron bajos títulos de anticuerpos, detectables solo por técnicas sensibles como el enzimoimmunoanálisis (EIA). También se utilizó la respuesta celular o humoral de diferentes hospederos no humanos para la detección de reservorios y de áreas geográficas de micosis endémicas<sup>6,8,11</sup>. Los perros domésticos se utilizaron en estudios epidemiológicos de paracoccidioidomicosis, histoplasmosis y coccidioidomicosis. Ono et al<sup>22</sup> evaluaron la presencia de anticuerpos anti-*P. brasiliensis* en sueros de canes mestizos empleando EIA; estos autores compararon las pruebas intradérmicas con el EIA y demostraron correlación entre ambos métodos. Silva Ribeiro et al<sup>31</sup> observaron que los canes que olfatearon áreas contaminadas con conidios de *H. capsulatum* desarrollaban la enfermedad, y confirmaron la utilidad de estos animales en el estudio de áreas endémicas de histoplasmosis; si bien estos autores no evaluaron respuesta humoral, está documentado que los caninos producen anticuerpos circulantes detectables en histoplasmosis<sup>20</sup>. Por su parte, Shubitz et al<sup>30</sup> determinaron que los perros infectados con *Coccidioides* sp., residentes en una región endémica de coccidioidomicosis presentaban anticuerpos séricos contra el hongo.

Entre las técnicas más sensibles y específicas que se utilizan para detectar respuesta humoral se encuentra el *western blot* (WB). La técnica permite reconocer anticuerpos anti-gp43 específicos de paracoccidioidomicosis<sup>1,18</sup> y anticuerpos anti-H (116 kDa) o M (94 kDa), marcadores de histoplasmosis<sup>24</sup>. En la coccidioidomicosis, el WB que utiliza el antígeno crudo revela anticuerpos contra una banda de 120 kDa que corresponde a las

precipitinas observadas en la reacción en tubo<sup>5,14</sup>, las bandas de 82 y 60 kDa descritas por Hung et al<sup>12</sup> causantes de la respuesta humoral y celular durante la infección, y la de 48 kDa que se corresponde con la banda detectada por inmunodifusión (ID)<sup>13,33</sup>.

El objetivo de este trabajo fue investigar si *P. brasiliensis*, *H. capsulatum* y *Coccidioides* sp. forman parte de la microbiota de la zona rural del noroeste de Argentina mediante la detección de anticuerpos específicos en sueros de perros domésticos residentes en la zona.

## Materiales y métodos

Se estudiaron 89 sueros de igual número de perros mestizos, residentes en una región denominada interfluvio Teuco-Bermejito, localizada al noroeste de la provincia del Chaco, Argentina. La zona, de característica semiárida, está ubicada entre los paralelos 24° 18' y 24° 29' de latitud sur y entre los meridianos 61° 34' y 61° 50' de longitud oeste. Los sueros se recogieron por demanda espontánea de los habitantes, en una campaña de detección de enfermedades zoonóticas realizada en julio de 2000 por el Instituto de Zoonosis Luis Pasteur, Gobierno de la Ciudad de Buenos Aires. Los sueros se almacenaron a 20 °C hasta el momento del estudio. En el momento de la recolección se registraron los datos de sexo, edad y localidad donde habitaban los animales.

Los antígenos fúngicos utilizados se producen en el Departamento Micología del INEI-ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán. El antígeno de *P. brasiliensis* se realiza a partir de un filtrado del cultivo de 7 días en agitación a 36 °C de la cepa B-339 (ATCC 32.069) en caldo peptona extracto de levadura (peptona al 2%, extracto de levadura al 1%). El antígeno de *H. capsulatum* se produce a partir de un filtrado del cultivo de la cepa autóctona (90.455) aislada de una forma clínica mucocutánea; ésta se cultiva en medio de Smith (asparagina al 0,7%, NH<sub>4</sub>Cl al 0,7%, MgSO<sub>4</sub>×7 H<sub>2</sub>O al 0,15%, citrato de sodio al 0,09%, citrato férrico al 0,03%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> al 0,13%, glicerina al 2,5% y glucosa al 1%) sin agitación, durante 3 meses a 28 °C. El antígeno de *Coccidioides* se obtiene a partir de un filtrado del desarrollo de 8 semanas de una cepa autóctona de *Coccidioides posadasii* (972579) en cultivo estático en caldo tripticasa (caldo tripticasa al 0,5%, extracto de levadura al 1%, glucosa al 2%) a 28 °C.

Los sobrenadantes previamente inactivados con Merthiolate al 1% se separan del micelio por centrifugación, prefiltrado y finalmente filtrado a través de una unidad filtrante con filtro de 0,22 µm de poro. Posteriormente, el filtrado se dializa en un tubo de diálisis Spectra/Por 4 MWCO 12 – 14.000 Daltons (SPECTRUM® Laboratories, Inc.) para eliminar sales, péptidos o proteínas de bajo peso molecular. Posteriormente, los antígenicos se concentran con polietilenglicol y se estandarizan a su «concentración de uso» por la técnica de ID.

Los antisueros respectivos, hechos en conejo, también se producen en el Departamento de Micología según la metodología descrita por Perrotta et al<sup>23</sup>. Brevemente, los antígenos a su concentración de uso se mezclan con adyuvante completo de Freund (Sigma, Chemical Co.) y se inoculan en forma intradérmica en la región dorsal del conejo en más de 30 sitios de inoculación. Posteriormente, el sistema inmunitario del animal se estimula

con vacuna cruda de *Bordetella pertusis* (20 UO/ml). A la sexta semana, si los títulos son  $\geq 1:16$  por ID los conejos se sangran a blanco siguiendo las normativas descritas en la resolución SENASA 617/02<sup>29</sup> para el manejo de animales de laboratorio.

Los antígenos y los sueros hiperinmunes se estandarizan para su uso en pruebas de ID siguiendo la metodología descrita por el CDC<sup>10</sup>, y se utilizan sueros y antígenos de IMMY (immunomycologics, Inc. Norman, EE. UU.) como controles y con partidas anteriores de producción.

Los sueros de los caninos se estudiaron inicialmente mediante la técnica de contraínmuno-electroforesis (CIEF) e ID.

Para realizar la técnica de WB, los antígenos fúngicos (80–100 µg de concentración final) se diluyeron 1:4 en amortiguador de muestra (Tris-HCl de 0,125 M pH 6,8, que contenían SDS al 2%, glicerol al 10%, 2-mercaptoetanol al 5% y azul de bromofenol al 0,025%). Previo tratamiento a 100 °C por 5 min, se inocularon en un gel de poli-acrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes. Se utilizó un peine preparativo de 1,5 mm de espesor, en la primera calle se colocó marcador de peso molecular de proteínas de amplio rango (Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, CA) y en el resto se colocó el antígeno fúngico. La electroforesis se realizó en el sistema mini-Protean II (Bio-Rad) a 200 V por 40 min a 4 °C.

Los geles se electrotransferieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (Immobilon-P, Millipore Corp., Bedford, MA) y se utilizó el sistema Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad). La transferencia se realizó en amortiguador TRIS pH 8,3 (Tris-ClH de 25 mM, glicina de 192 mM y metanol al 20% v:v) a 100 V durante 1 h. La calle que contiene el marcador junto con una calle con antígeno transferido se cortaron y colorearon con azul de Coomassie R-250 (Bio-Rad 161-0400) para ubicar los antígenos específicos y determinar su peso molecular. El resto de la membrana se bloqueó por incubación en amortiguador PBS (PO<sub>4</sub>HNa<sub>2</sub> al 0,19%, PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K al 0,04%, ClNa al 0,8%) adicionado con Tween-20 al 0,5% y albúmina bovina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) al 1% (p:v). Las membranas se conservaron a 20 °C hasta su uso.

El WB se realizó en Mini-Protean<sup>®</sup> II, Multiscreen Apparatus (Bio-Rad). Para determinar la dilución de uso de los sueros caninos para cada uno de los inmunoanálisis se utilizaron los sueros hiperinmunes anti-*H. capsulatum*, anti-*P. brasiliensis* y anti-*Coccidioides* hechos en conejo. Cada uno de estos sueros y un suero control negativo (conejo sin inocular y libre de infección) se enfrentaron al antígeno homólogo correspondiente en diluciones de 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 en PBS. Para detectar la reacción antígeno-anticuerpo se utilizó proteína A-peroxidasa de

rábano (Sigma) diluida 1:3000 y posterior revelado con 4 cloro-1 naftol (Sigma)<sup>9</sup>.

La dilución de uso para estudiar los sueros de los caninos se definió como la dilución en la que cada uno de los sueros controles positivos producidos en conejo detectaron las bandas específicas marcadoras de histoplasmosis, paracoccidioidomicosis y coccidioidomicosis y el suero control negativo no reaccionó.

Se consideraron positivos los sueros de perros que revelaron las bandas específicas marcadoras para cada una de las micosis investigadas, en tanto los que no revelaron bandas o mostraron bandas diferentes de las específicas se consideraron negativos. Los sueros positivos se titularon en diluciones factor 2 en amortiguador PBS.

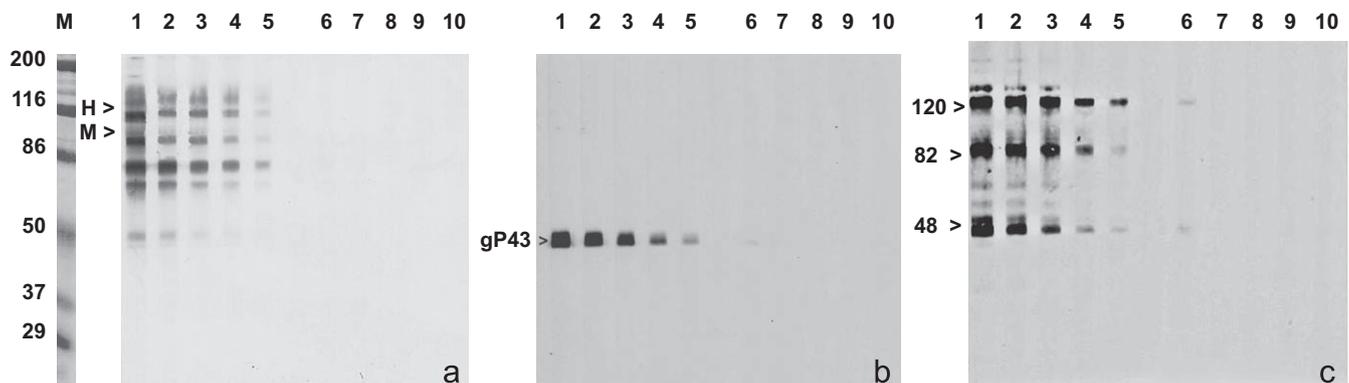
La especificidad de las reacciones se determinaron enfrentando los antígenos electrotransferidos a la membrana frente a sueros heterólogos de candidiasis, aspergilosis y tuberculosis, estos últimos gentilmente cedidos por el Servicio de Micobacterias del INEI-ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán.

## Resultados

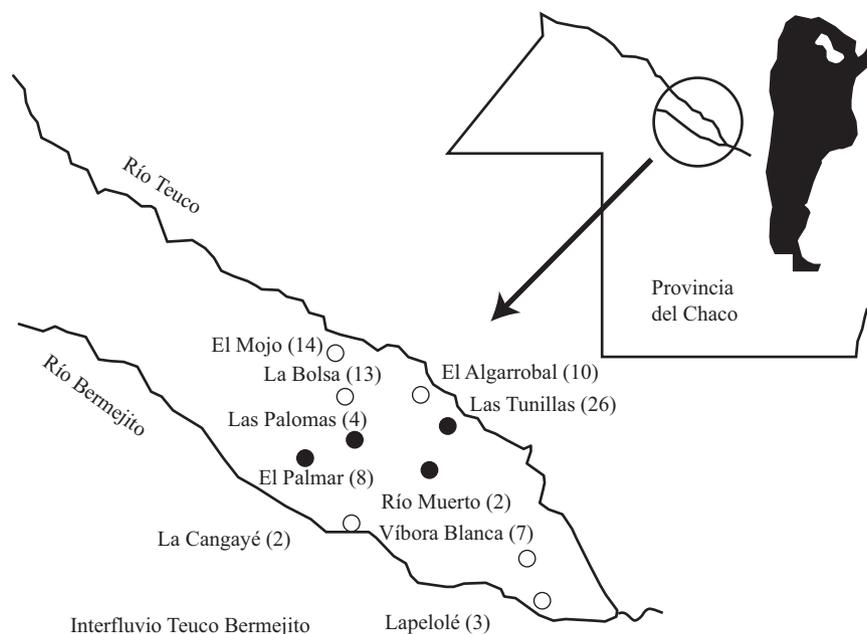
Con la técnica de WB, frente al antígeno de *H. capsulatum*, el suero hiperinmune homólogo producido en conejo reveló las bandas H (116 kDa) y M (94 kDa) y otras 3 bandas de menor peso molecular hasta la dilución 1:800. Frente al antígeno de *P. brasiliensis* el suero hiperinmune homólogo mostró solo una banda de 43 kDa (gP43) hasta 1:800 y frente al antígeno de *Coccidioides* sp. el suero hiperinmune homólogo reveló bandas de 120, 82 y 48 kD hasta 1:800 (fig. 1). Para determinar seropositividad de los caninos se consideraron los anticuerpos contra los antígenos H y M de *H. capsulatum* contra el antígeno gP43 de *P. brasiliensis* y contra las bandas antigénicas: 120, 82 y 48 kD de *Coccidioides* sp.

La dilución de uso se determinó en 1:50 para histoplasmosis y 1:100 para paracoccidioidomicosis y coccidioidomicosis. Los sueros de los caninos se diluyeron al doble de esta dilución para aumentar la especificidad. En nuestro sistema, no observamos reacciones cruzadas con sueros heterólogos de candidiasis, aspergilosis y tuberculosis.

Los animales incluidos en este estudio fueron todos mayores de 1 año, 22 hembras, 66 machos y un animal del que no se determinó sexo. Los caninos habitaban 7 comunidades aborígenes tobas: Lapelolé, Víbora Blanca, Río Muerto, El Algarrobal, Las Tunillas, Las Palomas y La Bolsa, y 3 comunidades criollas:

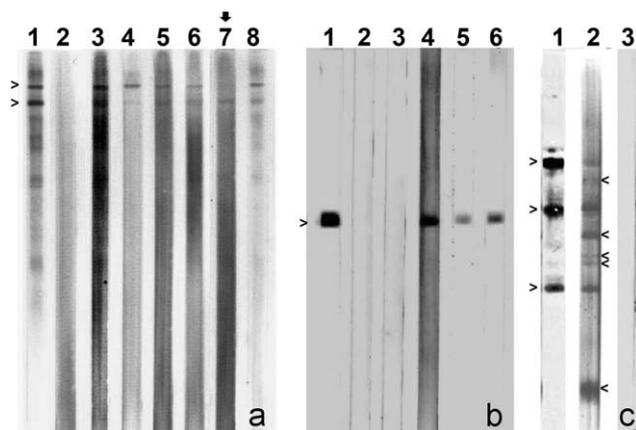


**Figura 1.** Determinación de la dilución de uso del suero. A) Suero anti-*Histoplasma capsulatum* y suero control negativo frente al antígeno de Hc; B) suero anti-*Paracoccidioides brasiliensis* y suero control negativo frente al antígeno de Pb, y C) suero anti-*Coccidioides* y suero control negativo frente al antígeno de *Coccidioides*. M: marcador de peso molecular, los valores que aparecen a la izquierda están en kDa, a la izquierda de cada figura se indica la ubicación de las bandas específicas. Las diluciones de los sueros hiperinmunes hechos en conejo y las diluciones del suero negativo corresponden a calle 1 y 6: dil 1:50, calles 2 y 8: dil 1:100, calles 3 y 7: dil 1:200, calles 4 y 8: dil 1:400, calles 5 y 10 dil 1:800. H > : banda H de *H. capsulatum*, M > : banda M de *H. capsulatum*, gP43 > antígeno gP43 de *P. brasiliensis*, 120 > banda de 120 kDa, 82 > : banda de 82 kDa, 48 > banda de 48 kDa de *Coccidioides* sp.



**Figura 2.** Ubicación geográfica del interfluvio Teuco-Bermejito y de las localidades donde habitaban los perros estudiados. Entre paréntesis se indica el número de perros estudiados por localidad.

(○) Localidades con perros seropositivos. (●) Localidades con perros seronegativos.



**Figura 3.** Detección de anticuerpos específicos en sueros de perros a) anti H y M (sólo se muestra los western blot de 6 de los 9 sueros positivos). Calle 1: control positivo (suero hiperinmune anti-*H. capsulatum* hecho en conejo). Calle 2: control negativo. Calles 3–8: sueros N.º 7, N.º 21, N.º 45 N.º 57 N.º 23 y N.º 62. En la parte superior de esta figura se señala con una flecha el suero que presentó anti-M. b) anti-gP43. Calle 1: control positivo (suero hiperinmune anti-*Paracoccidioides brasiliensis* hecho en conejo). Calles 2 y 3: control negativo. Calles 4 y 5: suero N.º 7 (1:200 y 1:400) y calle 6: suero N.º 45. c) Calle 1: control positivo (suero hiperinmune anti-*Coccidioides* hecho en conejo). Calle 2: suero N.º 7. Calle 3: control negativo. Las flechas (>) a la izquierda de cada figura señalan las bandas marcadoras de infección para cada una de las micosis estudiadas. Las flechas (<) en la línea 2 de la figura c señalan la bandas consideradas no marcadoras.

La Cangayé, El Palmar y El Mojo. La ubicación geográfica de las localidades que habitaban los perros y el número de perros por localidad se muestran en la figura 2.

Las técnicas de contraelectroforesis e ID no detectaron anticuerpos en ninguno de los sueros caninos contra los antígenos fúngicos probados. La técnica de WB evidenció anticuerpos específicos contra *H. capsulatum* en 9 de los 89 (10%) perros estudiados. Ocho de 9 sueros presentaron anticuerpos anti-H y M y uno presentó solo anti-M; en la figura 3a se muestran los WB de 6 de los 9 sueros estudiados. El suero del canino N.º 45 presentó,

además, anti-gP43 (fig. 3b) y el del canino N.º 7 reaccionó frente a los 3 antígenos probados. El suero N.º 7 pertenecía a una hembra preñada y reveló, además de las bandas específicas para *Coccidioides* sp. (120, 82 y 48 kDa), otras de 100, 70, ~60 (duplete) kDa y una < 20 kDa (fig. 3c).

Los perros seropositivos eran todos mestizos, la mayoría machos, y sus edades oscilaban entre el año y los 5 años (mediana=4 años). Los animales habitaban 6 de las 10 comunidades estudiadas. Los títulos de los sueros positivos para cada uno de los antígenos estudiados, el sexo, la edad y la localidad de origen de los animales se consignan en la tabla 1.

## Discusión

Los estudios de seroprevalencia aplicados a poblaciones sedentarias permiten interpretar la presencia de anticuerpos como indicativo de que la infección se adquirió en el sitio donde los individuos habitan. Los perros domésticos son susceptibles a adquirir las infecciones fúngicas por hongos dimórficos, difícilmente se trasladan fuera del sitio donde nacen y conviven estrechamente con los humanos, lo que los convierte en excelentes marcadores epidemiológicos de micosis endémicas. Sumado a esto, estas mascotas olfatean continuamente su medio, con mayor probabilidad de inhalar conidios y fragmentos de hifas de *P. brasiliensis*, *H. capsulatum* y *Coccidioides* sp., y son capaces de producir respuesta humoral<sup>22,30,31</sup>.

El área del interfluvio Teuco-Bermejito posee un clima seco en invierno y veranos con registros pluviométricos de entre 700 y 800 mm. Las temperaturas estivales llegan a los 46 °C y las invernales a los 6 °C bajo 0. La vegetación es arbustiva, salpicada de peladares (suelo desnudo) y existen zonas con bosques inundables. En esta zona la población vive en comunidades de pocos habitantes dedicados a la agricultura y a la cría de caprinos, aves de corral y otros animales<sup>19</sup>. En general, están dadas las condiciones para que cualquiera de los agentes de micosis endémicas encuentre allí su hábitat.

**Tabla 1**  
Sueros positivos por *western blot* contra los antígenos probados

Localidad estudiada (número de perros estudiados)	Identificación del perro con WB positivo	Edad	Sexo	Título de anticuerpos anti-			
				<i>Histoplasma capsulatum</i> (bandas)	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	<i>Coccidioides sp.</i>	
La Bolsa Río Muerto La Cangayé	(13) (2) (2)	N.º 7 *	3	hembra	1:200 (H/M)	1:400	1:200
El Algarrobal	(10)	N.º 21	4	macho	1:400 (H/M)	N	N
		N.º 23	4	macho	1:100 (M)	N	N
		N.º 45	3	macho	1:400 (H/M)	1:200	N
		N.º 52	4	macho	1:200 (H/M)	N	N
Lapelolé	(3)	N.º 62	1	macho	1:200 (H/M)	N	N
Víbora Blanca	(7)	N.º 70	4	macho	1:200 (H/M)	N	N
El Palmar	(8)	*					
Las Tunillas	(26)	*					
El Mojo	(14)	N.º 143	5	macho	1:200 (H/M)	N	N
Las Palomas	(4)	N.º 156	4	macho	1:100 (H/M)	N	N
		*					

H: banda H de *Histoplasma capsulatum*; M: banda M de *Histoplasma capsulatum*; N: negativo; WB: *western blot*.

\* No se detectaron anticuerpos contra los hongos estudiados.

En la bibliografía consultada, la provincia del Chaco está incluida dentro del área endémica de paracoccidioidomicosis<sup>27</sup>. Incluso un estudio realizado en la década de 1980 en la localidad de Juan José Castelli, ubicada geográficamente a 80 km del Teuco-Bermejito, demostró el 21,3% de personas reactivas a la paracoccidioidina<sup>2</sup>. A diferencia de estos autores, en nuestro estudio el porcentaje de perros seropositivos para *P. brasiliensis* fue del 2,2%, muy similar al 1,6% de personas reactivas a paracoccidioidina encontrado en 1996 por Mangiaterra et al<sup>16</sup> en otra área geográfica cercana (a 27° 10' de latitud sur y 58° 50' de longitud oeste). Las metodologías utilizadas por Mangiaterra et al<sup>16</sup> y Bogado et al<sup>2</sup> fueron pruebas de detección de inmunidad celular, y la metodología empleada en nuestro estudio fue de inmunidad humoral; sin embargo, existen trabajos que documentan correlación entre ambas metodologías cuando la búsqueda de anticuerpos se realiza por métodos sensibles como el EIA<sup>7,22</sup>. Probablemente, la diferencia encontrada entre los estudios de la década de 1980 (Bogado) y los más recientes de Mangiaterra et al<sup>16</sup> y el aquí presentado se deba a cambios epidemiológicos asociados a la deforestación para extender las áreas de cultivo y el consecuente cambio climático.

El 10% de los perros analizados presentaba anticuerpos anti-*H. capsulatum*; esto también coincide con lo informado por Mangiaterra et al<sup>16</sup>: el porcentaje de pacientes histoplasmina positivo fue del 9,2%. Es probable que los cambios climáticos, agudizados en los últimos años, produjeran cambios en la microbiota de la zona, favorecieron la instalación de *H. capsulatum* y desplazaran a *P. brasiliensis*. Además, la cría de aves de corral puede haber colaborado en la dispersión de este hongo en el ambiente y haber ocupado micronichos asociados a sus excretas.

El WB del suero del perro N.º 7 frente al antígeno de *Coccidioides* reveló 5 bandas intensas: las bandas marcadoras de coccidioidomicosis señaladas a la izquierda de la figura 3c y otras de diferente peso molecular. Estudios realizados en nuestro laboratorio, con sueros de perros con coccidioidomicosis probada nos permite afirmar que las bandas señaladas a la izquierda (110, 82 y 48 kDa) son las marcadoras de infección, mientras que las señaladas a la derecha de la calle 2 de la figura 3c no aparecen en perros con coccidioidomicosis, excepto la banda de <20 kDa que aparece en ocasiones (datos no publicados). La presencia de estas bandas no consideradas marcadoras podría deberse a reacciones cruzadas entre antígenos fúngicos y otros microorganismos a los que el perro pudo estar expuesto. Es importante señalar que el animal era

una hembra preñada, esta condición la convierte en más susceptible de adquirir infecciones, por lo que la infección mixta es una probabilidad<sup>28</sup>. La misma explicación cabría para el suero N.º 45; este perro podría haber estado expuesto a los 2 hongos: *H. capsulatum* y *P. brasiliensis*.

Existe escasa documentación de casos de coccidioidomicosis en pacientes que habitan esta área geográfica de Argentina, el último se informó en 1946<sup>21</sup>; sin embargo, *Coccidioides sp.* podría encontrar las condiciones óptimas para su desarrollo en la región estudiada durante la estación seca.

Es importante recalcar que este trabajo se realizó con el fin de detectar contacto de los perros con *P. brasiliensis*, *H. capsulatum* y *Coccidioides sp.*, y reconocer indirectamente la presencia de éstos en el medio ambiente de las comunidades estudiadas. La presencia de anticuerpos puede deberse a una infección ocurrida en el pasado y ya resuelta por el hospedero o a una infección reciente. Por tanto, no podemos confirmar si los perros estaban enfermos o no en el momento de la toma de muestra, ya que se requerirían otros estudios que no pudieron realizarse. Como era de esperar, solo la técnica de WB nos permitió evidenciar anticuerpos; esto se debe a la alta sensibilidad del método y coincide con las observaciones de otros autores que realizaron estudios seroepidemiológicos en caninos<sup>22</sup>.

Como el estudio fue por demanda espontánea y no representa el total de la población canina, no se pudo calcular un porcentaje de infección por localidad. Sin embargo, a pesar del elevado número de perros analizados en las Las Tunillas (n=27), todos fueron seronegativos, mientras que en la localidad de La Cangayé y Lapelolé nos llamó la atención que 2/2 y 1/3 perros estudiados, respectivamente, fueran seropositivos.

Independientemente de que estas micosis endémicas no pueden transmitirse de perros a humanos en forma directa, los animales pueden contraer la infección, desarrollar la enfermedad y morir a causa de paracoccidioidomicosis<sup>25</sup>, histoplasmosis<sup>4,20,31</sup> y coccidioidomicosis<sup>26,30,32</sup>, y pueden reintegrar el hongo al medio ambiente. La confirmación de infección o enfermedad en animales domésticos es importante desde el punto de vista sanitario, puesto que estos mamíferos pueden convertirse en reservorios de hongos dimórficos.

Este es el primer estudio realizado en Argentina donde se utilizan perros domésticos como centinelas en la detección de áreas endémicas. Los resultados nos permitieron determinar que el principal agente causal de micosis endémicas al que se

exponen los caninos del interfluvio Teuco-Bermejito es *H. capsulatum*. Probablemente, los humanos que habitan la zona tengan una exposición similar a este hongo. Este hecho debe alertar a los efectores de salud para considerar el diagnóstico diferencial de histoplasmosis en pacientes residentes del área que acuden a la consulta médica con cuadros respiratorios o lesiones en la piel o las mucosas, entre otras manifestaciones clínicas de la enfermedad.

## Agradecimiento

Agradecemos a la Dra. Viviana Ritacco por las sugerencias y la revisión del inglés.

## Bibliografía

- Blotta MH, Camargo ZP. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: Relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol.* 1993;31:671–6.
- Bogado MM, de Camargo NP, de Franchisena EM, Fontana C, Giménez M, de Storni LP. Encuesta con paracoccidioidina en la Provincia del Chaco. *República Argentina Rev Arg Micol.* 1985;8:21–3.
- Botteon FA, Camargo ZP, Benard G, Coelho RF, Chamone DA, Itano EN. *Paracoccidioides brasiliensis*-reactive antibodies in Brazilian blood donors. *Med Mycol.* 2002;40:387–91.
- Clinkenbeard KD, Cowell RL, Tyler RD. Disseminated histoplasmosis in dogs: 12 cases (1981–1986). *J Am Vet Med Assoc.* 1988;193:1443–7.
- Cole GT, Kruse D, Seshan KR. Antigen complex of *Coccidioides immitis* which elicits a precipitin antibody response in patients. *Infect Immun.* 1991;59:2434–46.
- Costa EO, Diniz LS, Netto CR, Arruda C, Dagli ML. Epidemiological study of sporotrichosis and histoplasmosis in captive Latin American wild mammals São Paulo, Brazil. *Mycopathologia.* 1994;125:19–22.
- Eisele RC, Juliani LC, Belitardo DR, Itano EN, Estevão D, Bracarense AP, et al. Immune response in dogs experimentally infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* 2004;42:549–53.
- Fernandes GR, Deps P, Tomimori-Yamashita J, Camargo ZP. IgM and IgG antibody response to *Paracoccidioides brasiliensis* in naturally infected wild armadillos (*Dasypus novemcinctus*). *Med Mycol.* 2004;42:363–8.
- Gandhi BM, Bhargava DK, Irshad M, Chawla TC, Dube A, Tandon BN. Enzyme linked protein-A: An ELISA for detection of IgG antibodies against *Mycobacterium tuberculosis* in intestinal tuberculosis. *Tubercle.* 1986;67:219–24.
- Harrel WK, Ashworth H, Britt LE, George JR, Gray SB, Green JH, et al. Procedural manual for production of bacterial, fungal and parasitic reagents. 3 ed, Atlanta, EE. UU.: Department of Health and Human Service, CDC; 1978.
- Higgins JC, Leith GS, Voss ED, Pappagianis D. Seroprevalence of antibodies against *Coccidioides immitis* in healthy horses. *J Am Vet Med Assoc.* 2005;226:1888–92.
- Hung CY, Ampel NM, Christian L, Seshan KR, Cole GT. A major cell surface antigen of *Coccidioides immitis* which elicits both humoral and cellular immune responses. *Infect Immun.* 2000;68:584–93.
- Johnson SM, Pappagianis D. The coccidioid complement fixation and immunodiffusion-complement fixation antigen is a chitinase. *Infect Immun.* 1992;60:2588–92.
- Kruse D, Cole GT. Isolation of tube precipitin antibody-reactive fractions of *Coccidioides immitis*. *Infect Immun.* 1990;58:169–78.
- Maluf ML, Pereira SR, Takahachi G, Svidzinski TI. Prevalence of paracoccidioidomycosis infection determined by serologic test in donors blood in the Northwest of Paraná Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003;36:11–6.
- Mangiaterra M, Alonso J, Galván M, Giusano G, Gorodner J. Histoplasmin and paracoccidioidin skin reactivity in infantile population of northern Argentina. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1996;38:349–53.
- Martinez R, Vitali LH, Henriques JH, Machado AA, Albernaz A, Lima AA. Seroepidemiological survey for infections caused by fungus of systemic mycoses in the Xacriabá Indian Reserve, Minas Gerais State, Brazil *Rev Soc Bras Med Trop* 2002;35:347–50.
- Mendes-Giannini MJ, Bueno JP, Shikanai-Yasuda MA, Ferreira AW, Masuda A. Detection of the 43,000-molecular-weight glycoprotein in sera of patients with paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol.* 1989;27:2842–5.
- Ministerio de Gobierno, Justicia y Trabajo del Chaco, Chaco, Argentina Proyecto Teuco-Bermejito [actualizado 2009; consultado 12/8/2009]. Disponible en: <http://www.chaco.gov.ar/MinisterioDeGobierno/PueblosOriginarios/>.
- Mitchell M, Stara DR. Disseminated canine histoplasmosis: A clinical survey of 24 cases in Texas. *Can Vet J.* 1989;21:95–100.
- Negróni P, Coccidioidomycosis in Argentina En: Ajello L, editor, *Coccidioidomycosis. Proceedings of the 2nd Coccidioidomycosis Symposium.* Phoenix, Arizona; 1967:273–278.
- Ono MA, Bracarense AP, Morais HS, Trapp SM, Belitardo DR, Camargo ZP. Canine paracoccidioidomycosis: A seroepidemiologic study. *Med Mycol.* 2001;39:277–82.
- Perrotta D, Vivot W, Lee W, Rivas C, Rodero L, Canteros C, et al. Producción de antisueros fúngicos específicos en conejos. *Rev Argent Microbiol.* 1998;30:115–21.
- Pizzini CV, Zancopé-Oliveira RM, Reiss E, Hajjeh R, Kaufman L, Peralta JM. Evaluation of a western blot test in an outbreak of acute pulmonary histoplasmosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1999;6:20–3.
- Ricci G, Mota FT, Wakamatsu A, Serafim RC, Borra RC, Franco M. Canine paracoccidioidomycosis. *Med Mycol.* 2004;42:379–83.
- Rubensohn M, Stack S. Coccidioidomycosis in a dog. *Can Vet J.* 2003;44:159–60.
- Rubinstein P, Negróni R. *Micosis broncopulmonares del adulto y el niño.* 2 ed. Buenos Aires: Ediciones Beta SRL; 1981.
- Selby LA, Becker SV, Hayes Jr. HW. Epidemiologic risk factors associated with canine systemic mycoses. *Am J Epidemiol.* 1981;113:133–9.
- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) Resolución 617/02. 18/7/2002. B.O.: 24/7/2002 Disponible en: <http://www.unsl.edu.ar/%7Efqbf/cicua/Archivos/Resolucion-SENASA-617-2002.pdf>.
- Shubitz LE, Butkiewicz CD, Dial SM, Lindan CP. Incidence of coccidioides infection among dogs residing in a region in which the organism is endemic. *J Am Vet Med Assoc.* 2005;226:1846–50.
- Silva-Ribeiro VL, Ferreira-da-Cruz MR, Wanke B, Galvao-Castro B. Canine histoplasmosis in Rio de Janeiro: Natural and experimental infections. *J Med Vet Mycol.* 1987;25:319–22.
- Wanke B, Lazera M, Monteiro PC, Lima FC, Leal MJ, Ferreira Filho PL, et al. Investigation of an outbreak of endemic coccidioidomycosis in Brazil's northeastern state of Piauí with a review of the occurrence and distribution of *Coccidioides immitis* in three other Brazilian states. *Mycopathologia.* 1999;148:57–67.
- Zimmer BL, Pappagianis D. Characterization of a soluble protein of *Coccidioides immitis* with activity as an immunodiffusion-complement fixation antigen. *J Clin Microbiol.* 1988;26:2250–6.