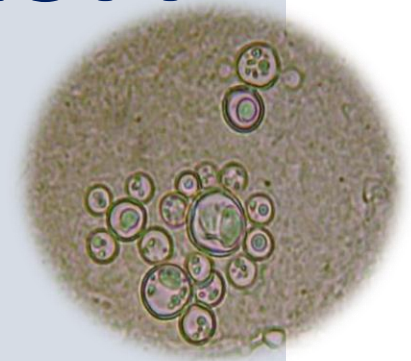


# RESULTADOS DEL PROYECTO CONACYT PINV-18-347

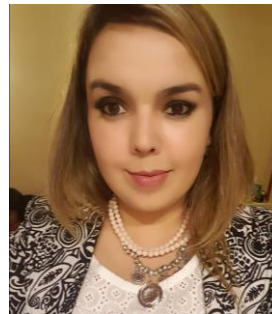
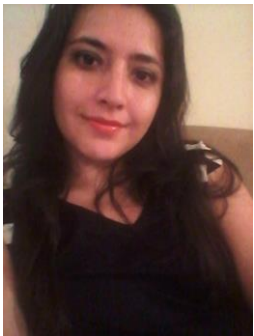
**“Especies de *Paracoccidioides*  
circulantes en Paraguay y su relación con  
características epidemiológicas y clínicas  
de los pacientes”**



# CONACYT-Prociencia I

El objetivo de los fondos concursables es fortalecer la capacidad de investigación y la generación de conocimientos mediante el cofinanciamiento no reembolsable de Proyectos de Investigación cuyo propósito principal sea el avance del conocimiento en diferentes campos de la ciencia y tecnología.

## RESULTADOS DEL PROYECTO CONACYT PINV-18-347 “Especies de *Paracoccidioides* circulantes en Paraguay y su relación con características epidemiológicas y clínicas de los pacientes”



### Equipo de investigadores:

Patricia Araújo, Gustavo Aguilar, Rossana Franco, Mirna Cuevas, José Pereira, Silvana Benítez

En Paraguay: PCM la principal micosis  
sistémica endémica del país

# OBJETIVO GENERAL

- Identificar especies de *Paracoccidioides* circulantes en Paraguay y relacionar con las características epidemiológicas y clínicas de los pacientes

# OBJETIVOS ESPECÍFICOS

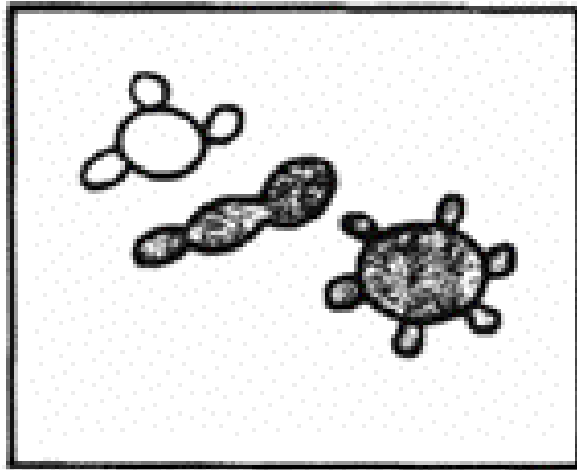
- Aislar cepas de *Paracoccidioides* sp. a partir de muestras clínicas en el período 2020-2021.
- Implementar el método PCR- RFLP para la identificación de especies de *Paracoccidioides* sp.
- Identificar cepas de *Paracoccidioides* obtenidas en el periodo 2017-2021 con el método PCR-RFLP
- Describir las características epidemiológicas y clínicas de los pacientes con Paracocidioidomicosis detectados en el período 2017-2021
- Implementar el método de Nested PCR a para la detección de ADN de *Paracoccidioides* a partir de muestras de reservorios naturales
- Detectar ADN de *Paracoccidioides* sp. en muestras de suelo y realizar la georreferenciación

# Paracoccidioidomycosis (PCM)

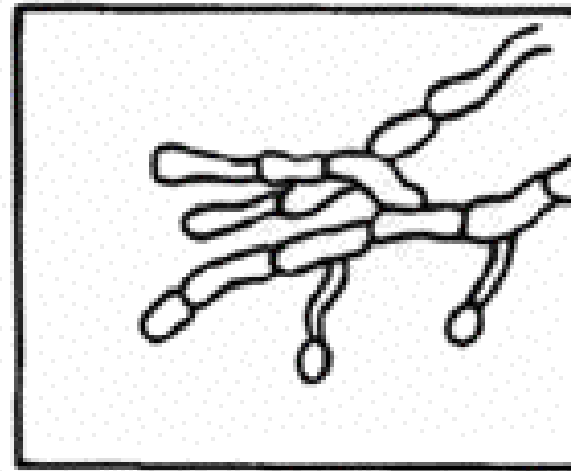


## Definición

Es una micosis sistémica causada por especies del género *Paracoccidioides sp.*



Forma levaduriforme



Forma filamentosa

# Especies de *Paracoccidioides*

## **Complejo *Paracoccidioides brasiliensis***

*S1 Paracoccidioides sensu stricto*

*PS2 Paracoccidioides americana*

*PS3 Paracoccidioides restrepiensis*

*PS4 Paracoccidioides venezuelensis*

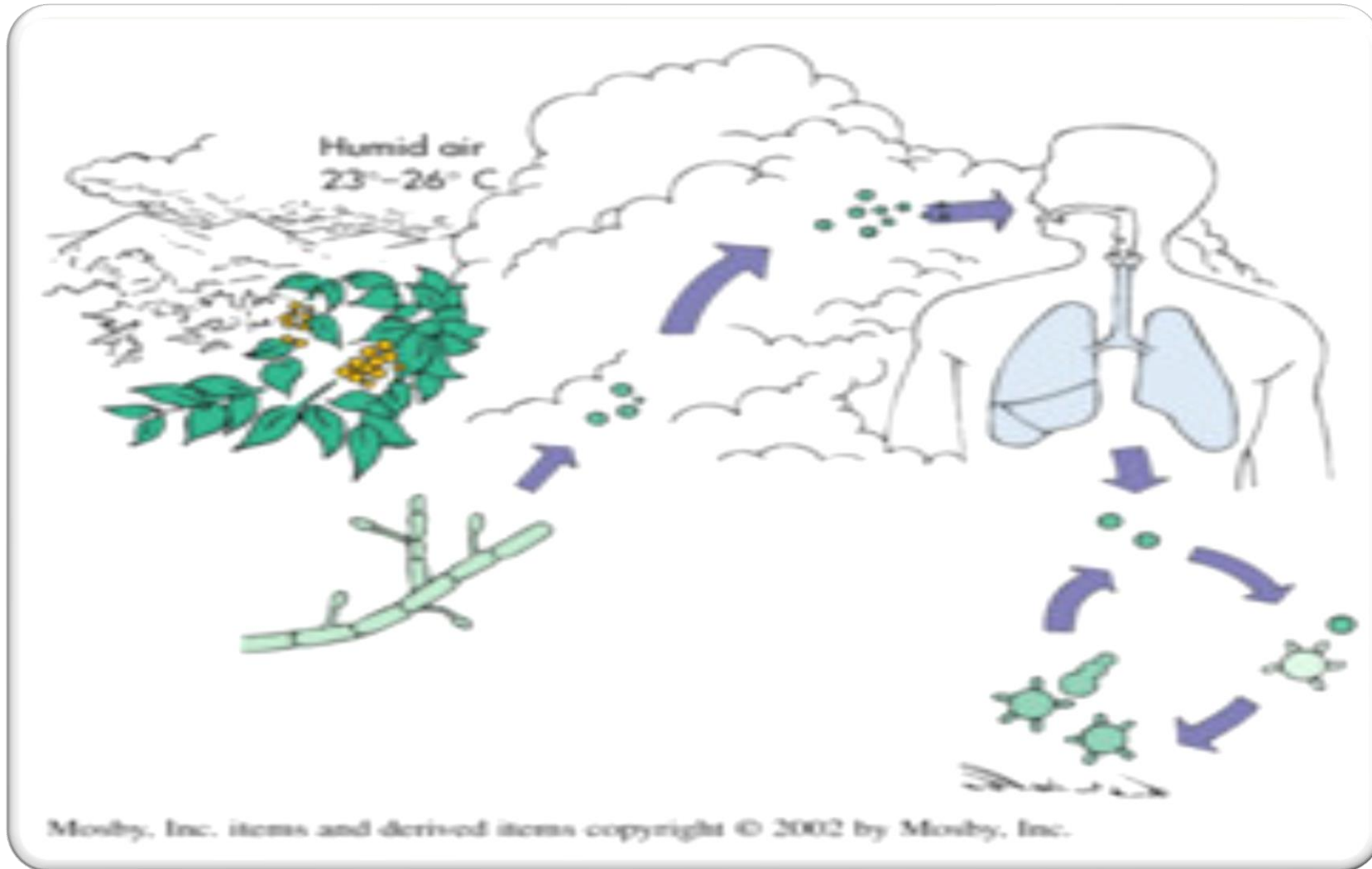
***Paracoccidioides lutzii***

Matute et al 2006

Teixeira et al 2013



# Ciclo Vital *Paracoccidioides* sp.

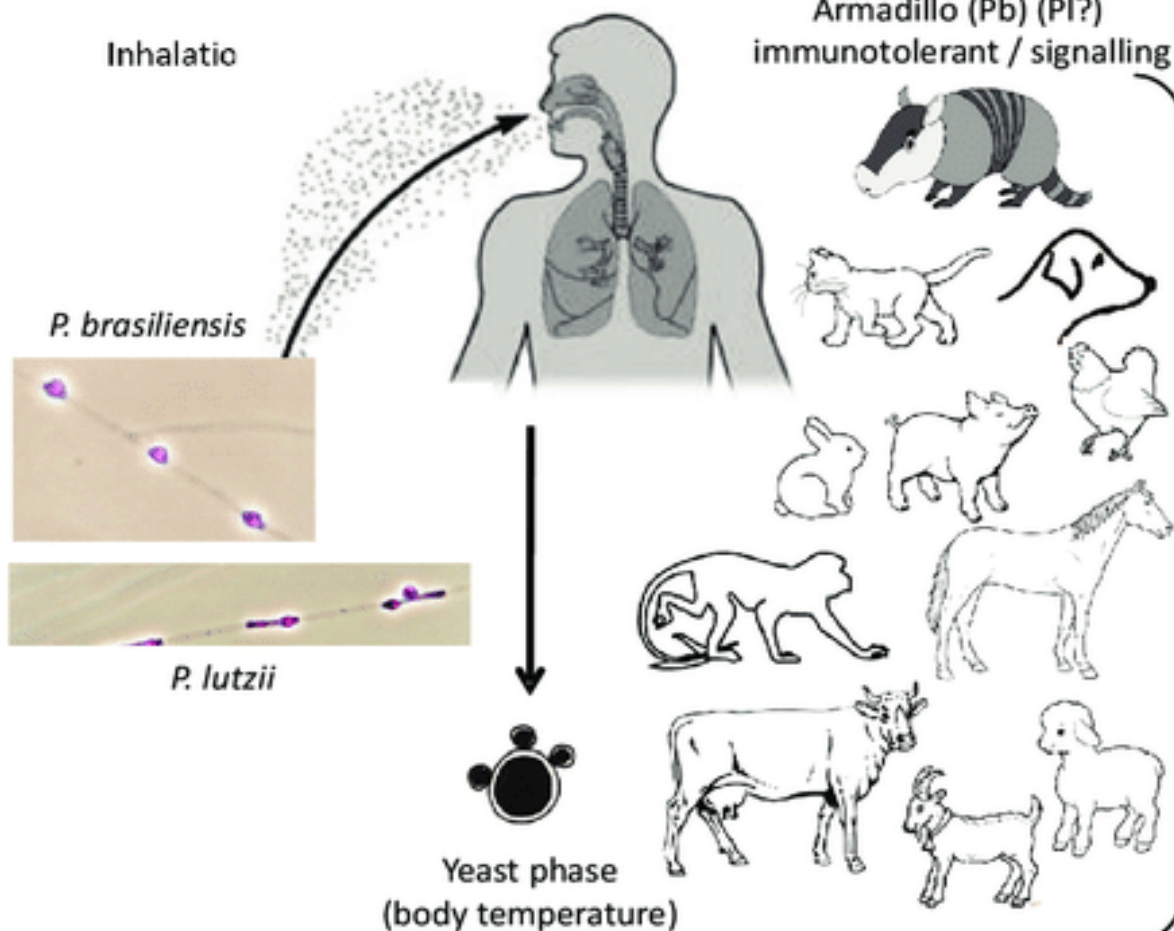


Environment



Coffee and sugar cane plantation / rural workers  
Agriculture activities / Climate conditions (soil humidity)

Inhalatio



Human beings  
predominance of infection  
predisposing factors for disease  
genetic gender (male)  
great inoculum

Animals – infection; rare  
cases of disease

Mendes & Bagagli

# Dos formas clínicas principales

En el adulto (30 -70): forma crónica con síntomas similares a la

## **Tuberculosis**

En niños y adultos jóvenes: forma aguda o subaguda: diseminada

# Forma Crónica 95% de los casos

## Síntomas principales

- Tos
- Espectoración
- Disnea
- Fiebre
- Lesiones en mucosa

# Diagnóstico diferencial

**Manifestación pulmonar:** tuberculosis, coccidioidomycosis, histoplasmosis, blastomycosis, neoplasias

**Lesiones mucocutáneas:** leishmaniosis, esporotricosis, coccidioidomycosis, tuberculosis, blastomycosis, carcinoma espinocelular, lupus vulgar, sífilis tardía, actinomicosis cervicofacial

# Diagnóstico diferencial

## **Manifestaciones ganglionares:**

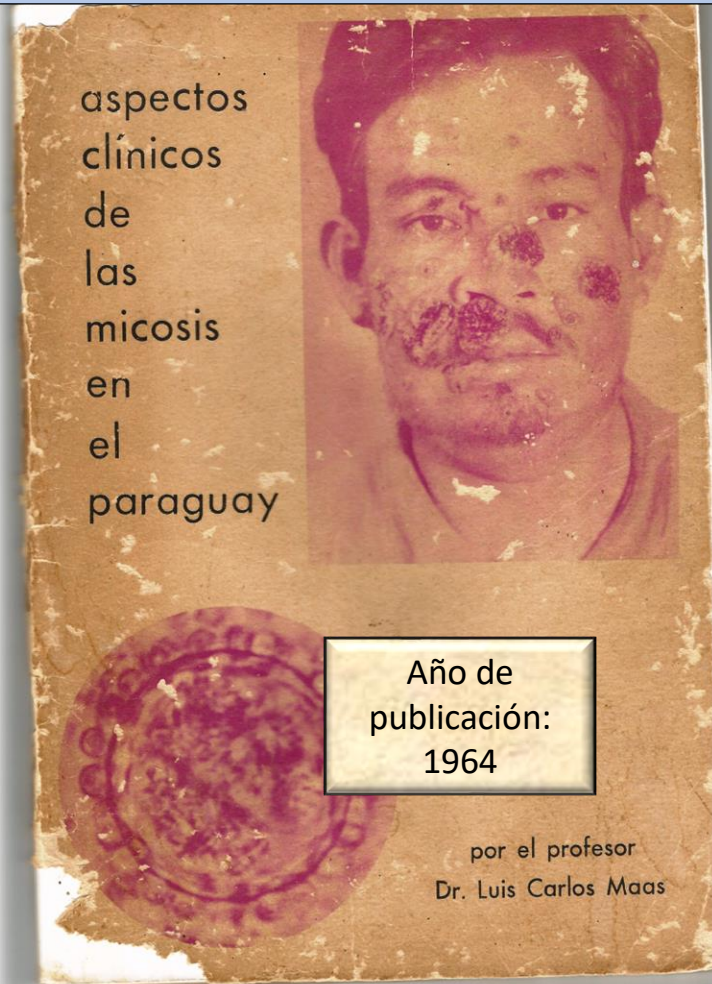
tuberculosis colicuativa,  
coccidioidomicosis, blastomicosis,  
linfomas

## **Manifestaciones viscerales:**

leishmaniosis visceral,  
histoplasmosis, blastomicosis,  
enfermedad de Addison

# Datos publicados-Paraguay

- Primer caso detectado en Paraguay : 1936



# Datos publicados-Paraguay

1976

Mycopathologia vol. 59, 2, pp. 67-80, 1976

## PARACOCCIDIOIDOMICOSIS - EPIDEMIOLOGÍA EN LA REPÚBLICA DEL PARAGUAY, CENTRO DE SUD AMÉRICA

Pedro Anibal ROLON\*

**Periodo de estudio: 1960-1974**

**Cantidad de casos detectados: 87**

**Hombres: 85 Mujeres: 2**

**Rango de Edad predominante: 30-50 años**

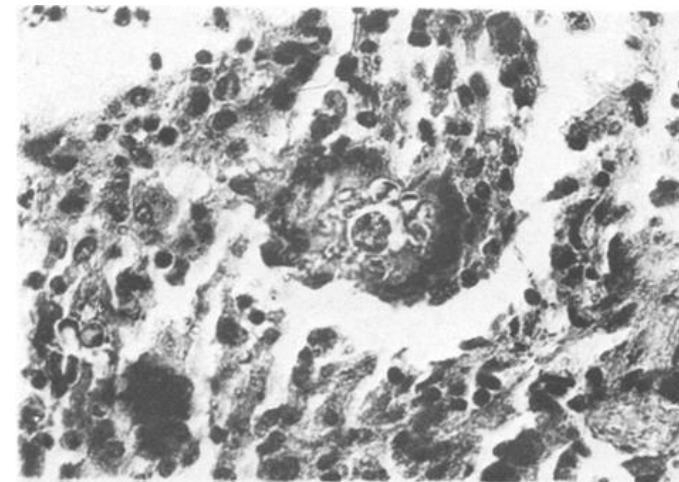


Figura 4b: Disposición típica y demostrativa de la exosporulación del Paracoccidioides br. Tomado de pulmón (A 25/74). H.E. • 450.



# Datos publicados-Paraguay

## Paracoccidioidomicosis: características clínicas y evolutivas de 94 casos

*Pérez D, Oviedo J, Gill S.  
Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y del Ambiente (INERAM)*

**Periodo de estudio: 1980- 2003**

**Cantidad de casos detectados: 94**

**Hombres: 93    Mujeres: 1**

24 (25%) pacientes tenían coneumopatias (13 casos de tuberculosis, 7 silicosis, 2 neumonias comunitarias y 2 neumotórax)

**motivo de consulta:** tos en 43,6%, disnea en 19%, hemoptisis:7,4%

**frecuencia de síntomas:** tos 85%, catarro 72%, fiebre 66%, perdida ponderal 56%, astenia 42,5%, disnea 39%, hemoptisis 31%, sudoración nocturna 24,55, disfonia 24,5% chillido de pecho 6,4%

# Datos publicados-Paraguay

doi:10.18004/rdn2016.0008.02.062-071

Artículo Original / Original Article

**Paracoccidioidomicosis detectados en el período 2004-2013  
en el Laboratorio Central de Salud Pública de Asunción –  
Paraguay**

**Paracoccidioidomycosis detected in the period 2004-2013 in  
the Central Laboratory of Public Health of Asunción –  
Paraguay**

**Patricia Araujo<sup>1</sup>**

**Gustavo Aguilar<sup>1</sup>**

**Nilfo Arce<sup>1</sup>**

**Mario Martínez<sup>1</sup>**

**Periodo de estudio: 2004-2013**  
**Cantidad de casos detectados: 131**  
**Hombres: 127 Mujeres: 4**

En relación al tipo de muestra analizada, en el examen directo se obtuvieron muestras positivas **de 47 esputos, 43 muestras de mucosa oral**, 9 ganglios, 7 lesiones de piel, 6 de mucosa nasal, 2 de lavado broncoalveolar.

Por serología se detectaron 31 casos positivos para *Paracoccidioides brasiliensis*. En 16 pacientes se obtuvieron más de un tipo de muestra positiva.

# RESULTADOS



**Casos de Paracoccidioidomycosis en el periodo 2017 a 2021**

## 84 casos de Paracoccidioidomycosis

80 forma crónica  
4 forma aguda /sub aguda  
81 masculino 3 femenino  
Rango de edad  
Crónica 33 a 82 años  
Aguda 9 a 27 años

## Departamentos con predominio de los casos

1. Alto Paraná	29%
2. Caaguazú	14,5%
3. Cordillera	12,7%
4. San Pedro	10.9%
5. Guairá	7,3%
6. Itapúa	7,3%



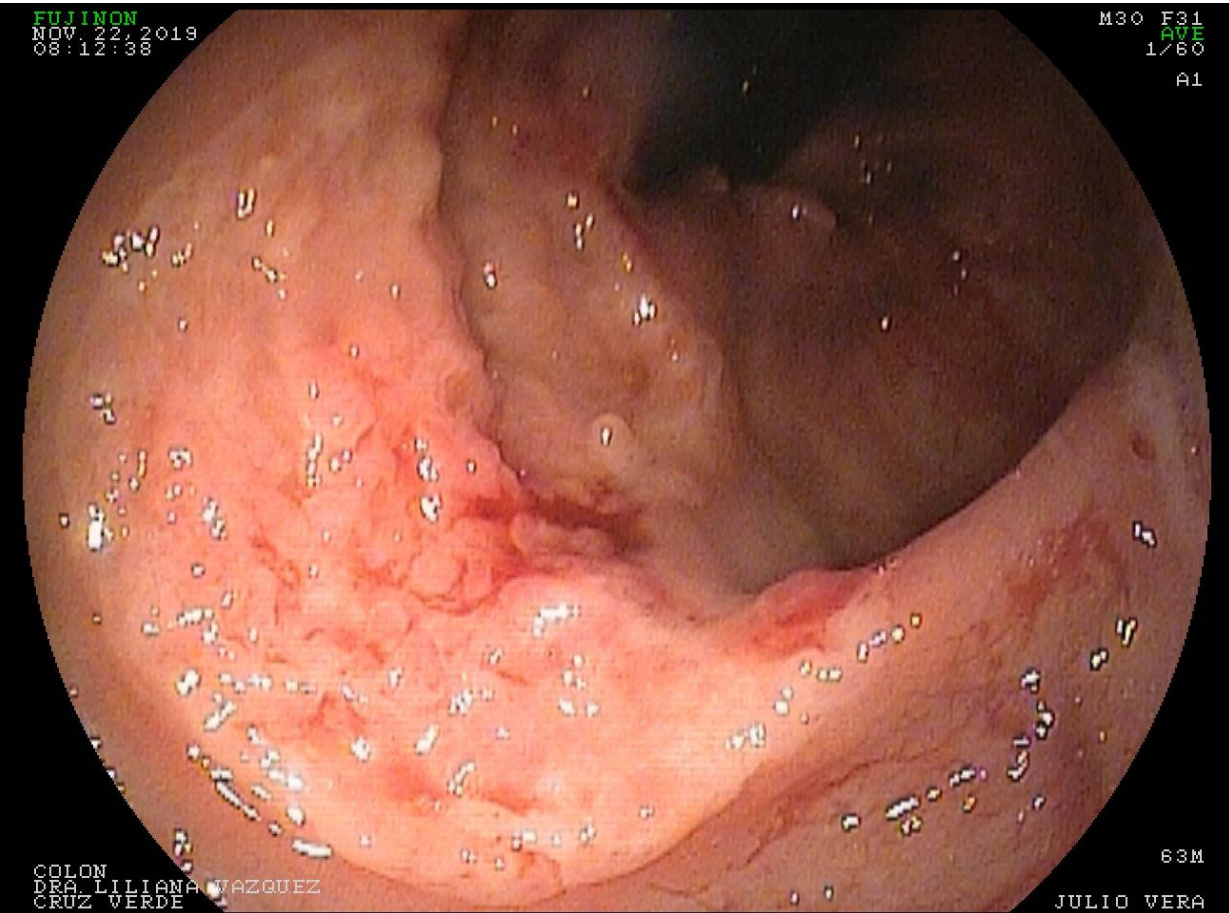
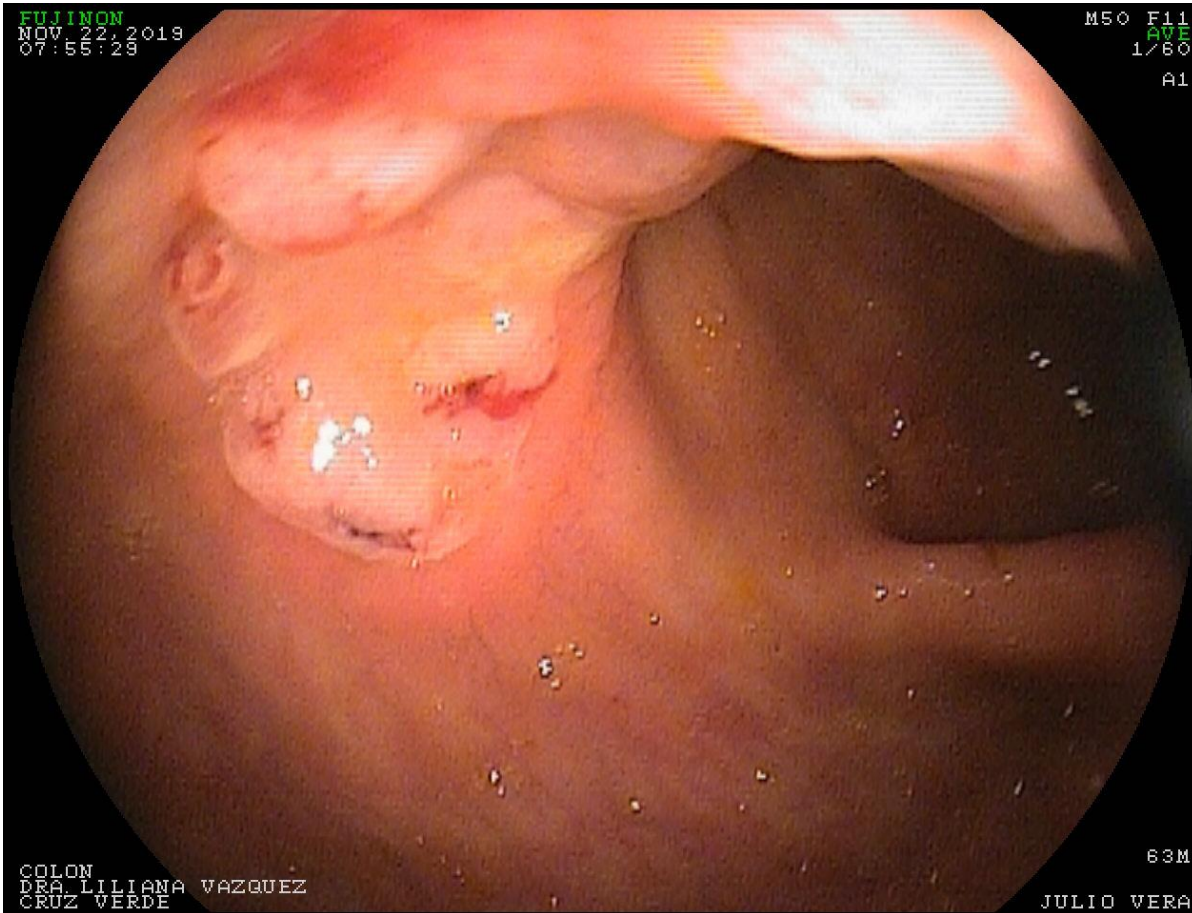


Luego de 42 días



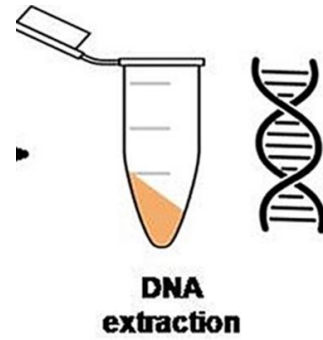
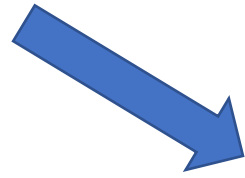
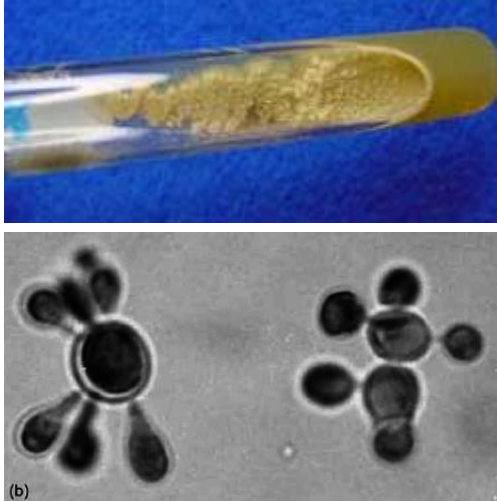




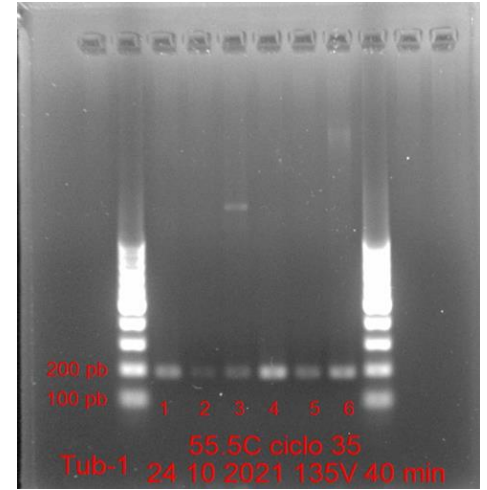
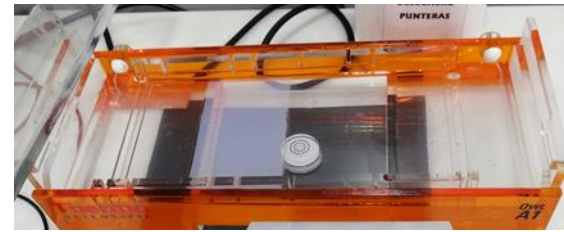
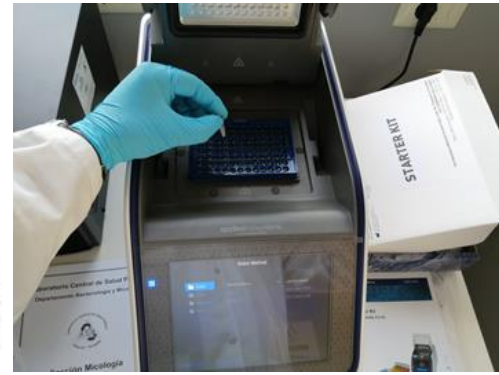
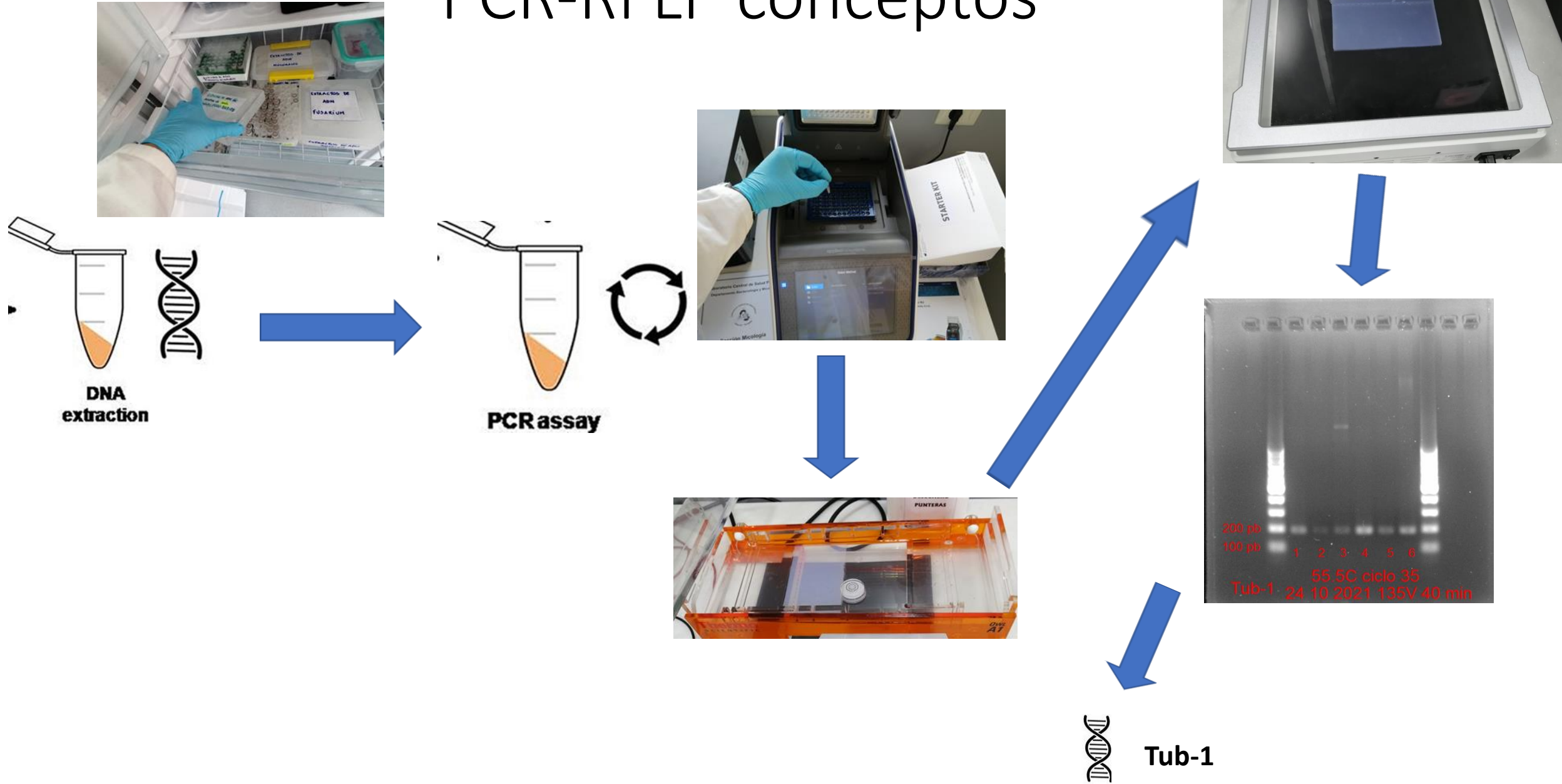


Procesamiento e identificación de las cepas de  
Paracoccidioides sp. y muestras de suelo por  
PCR-RFLP

# PCR-RFLP conceptos



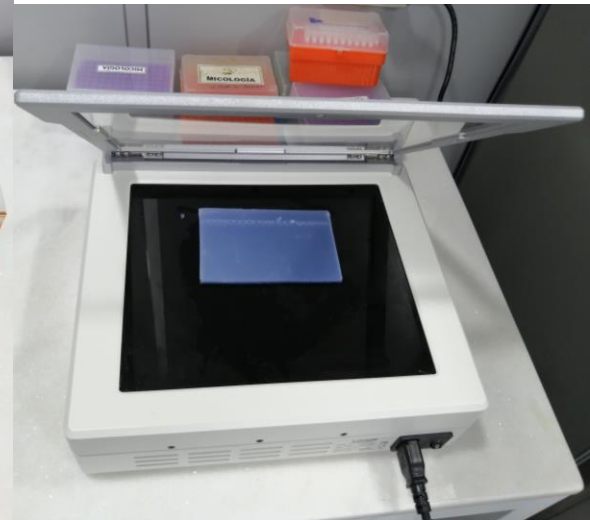
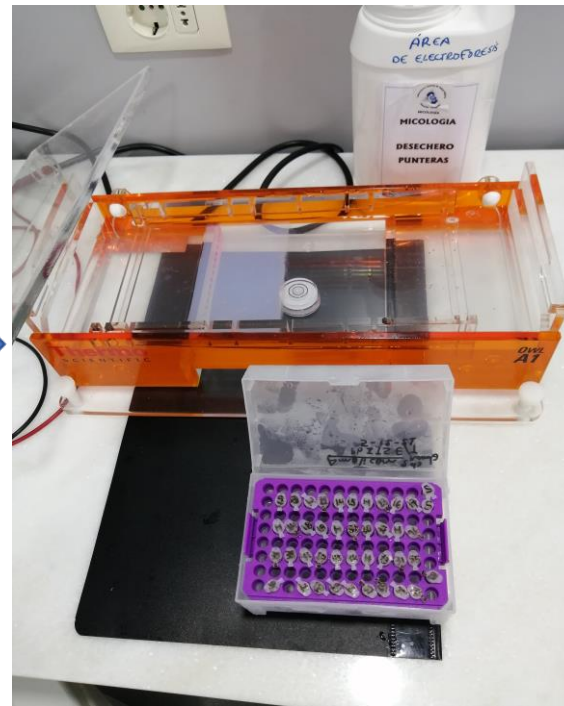
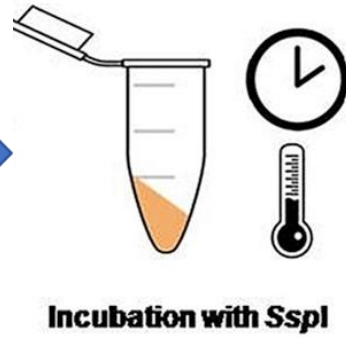
# PCR-RFLP conceptos



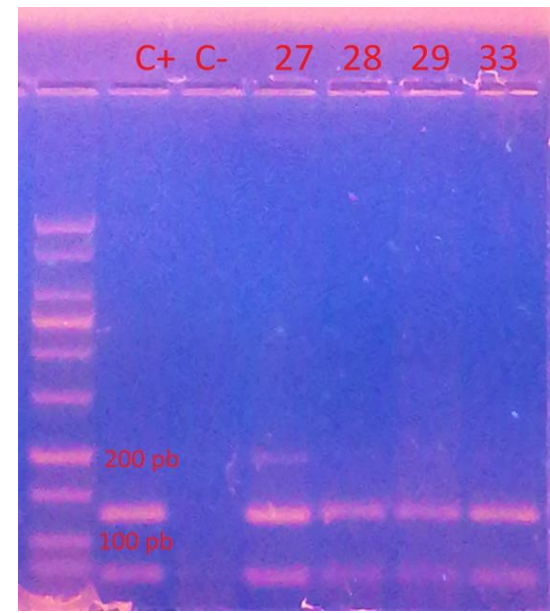
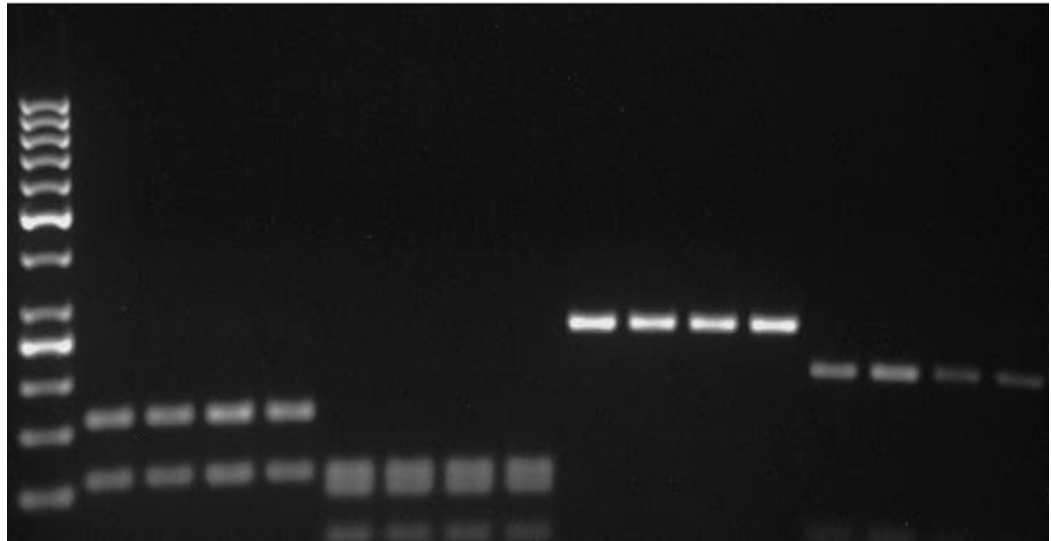
 **Tub-1**



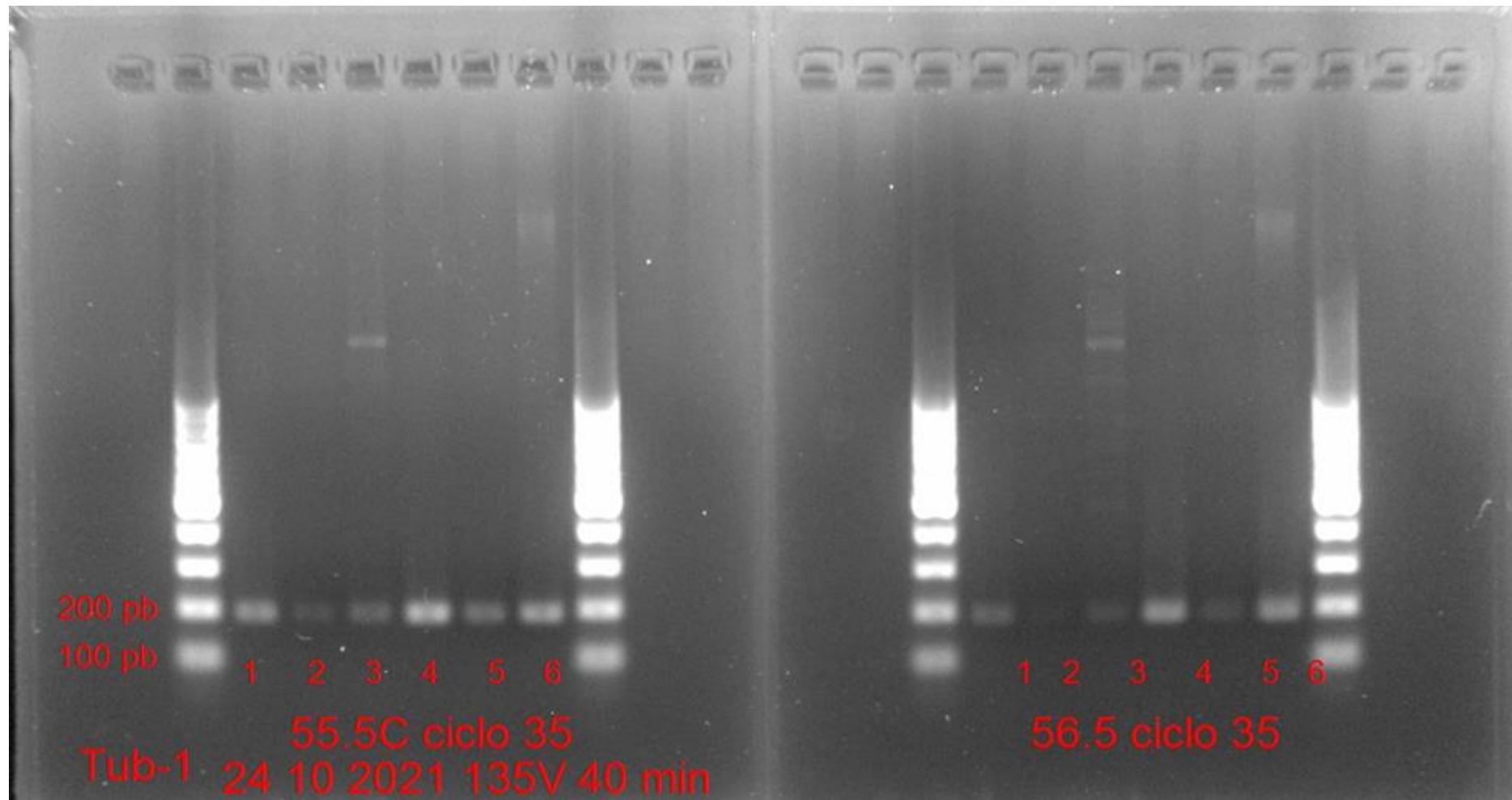
# PCR-RFLP conceptos



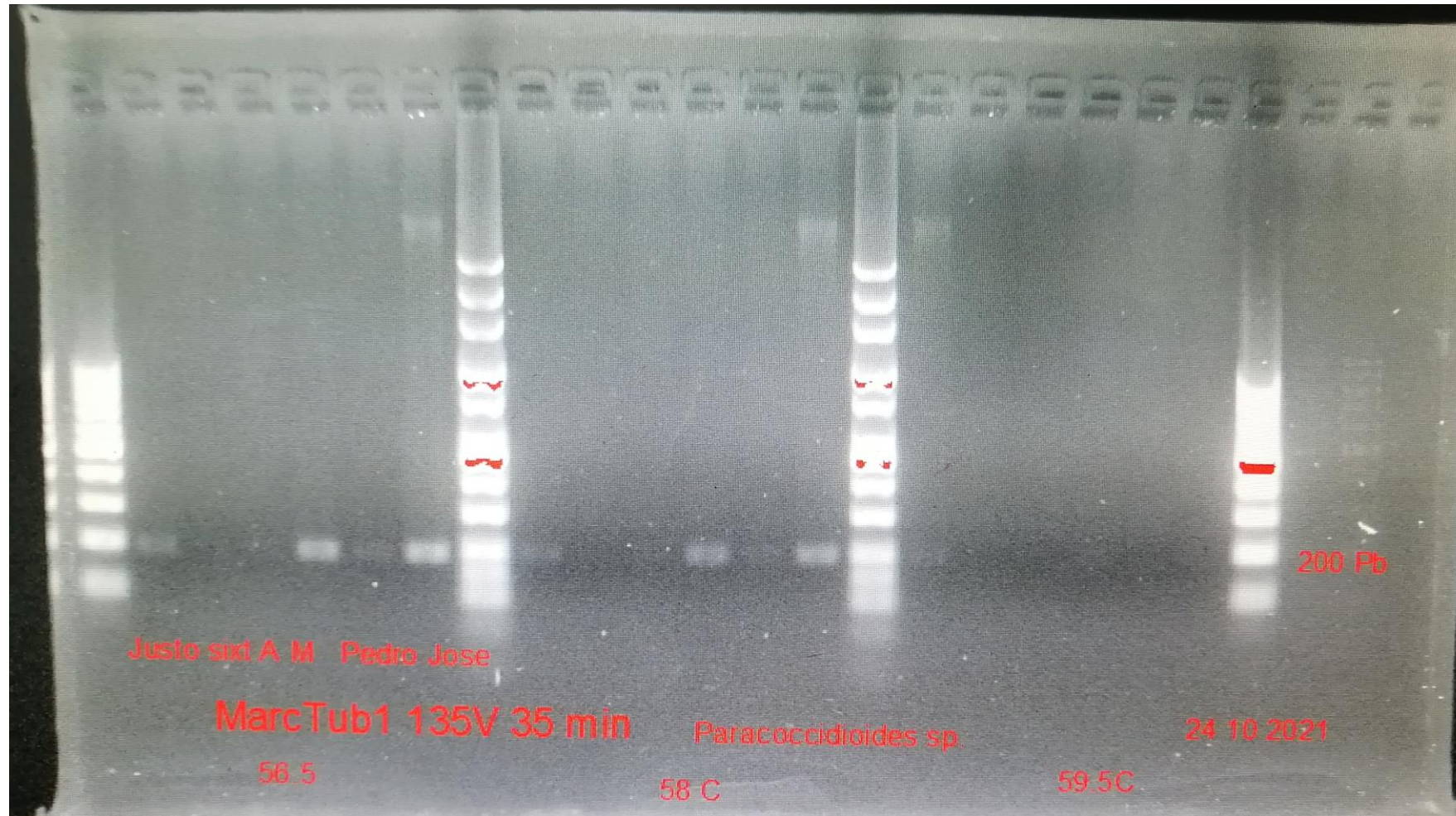
S1				PS2				PS3				<i>P. lutzii</i>			
Pb18	T3B6	EPM85	EPM101	Pb3	Pb dog	EPM99	EPM135	B-339	EPM77	EPM82	EPM83	Pb01	ROSC	JAL	EPM212



# Detección del gen tub-1 de las cepas aisladas de pacientes

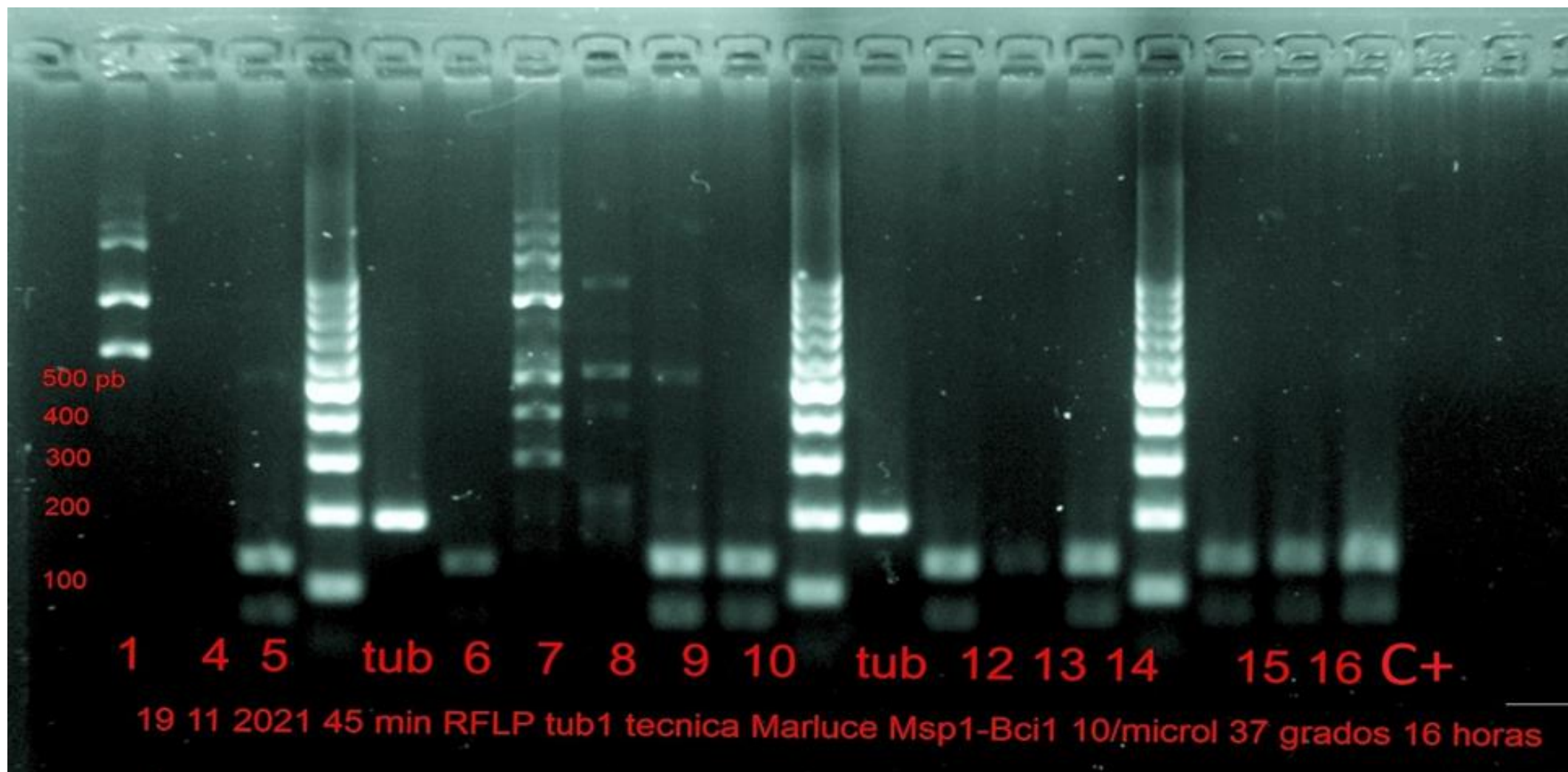


# Detección del gen tub-1 de las cepas aisladas de pacientes

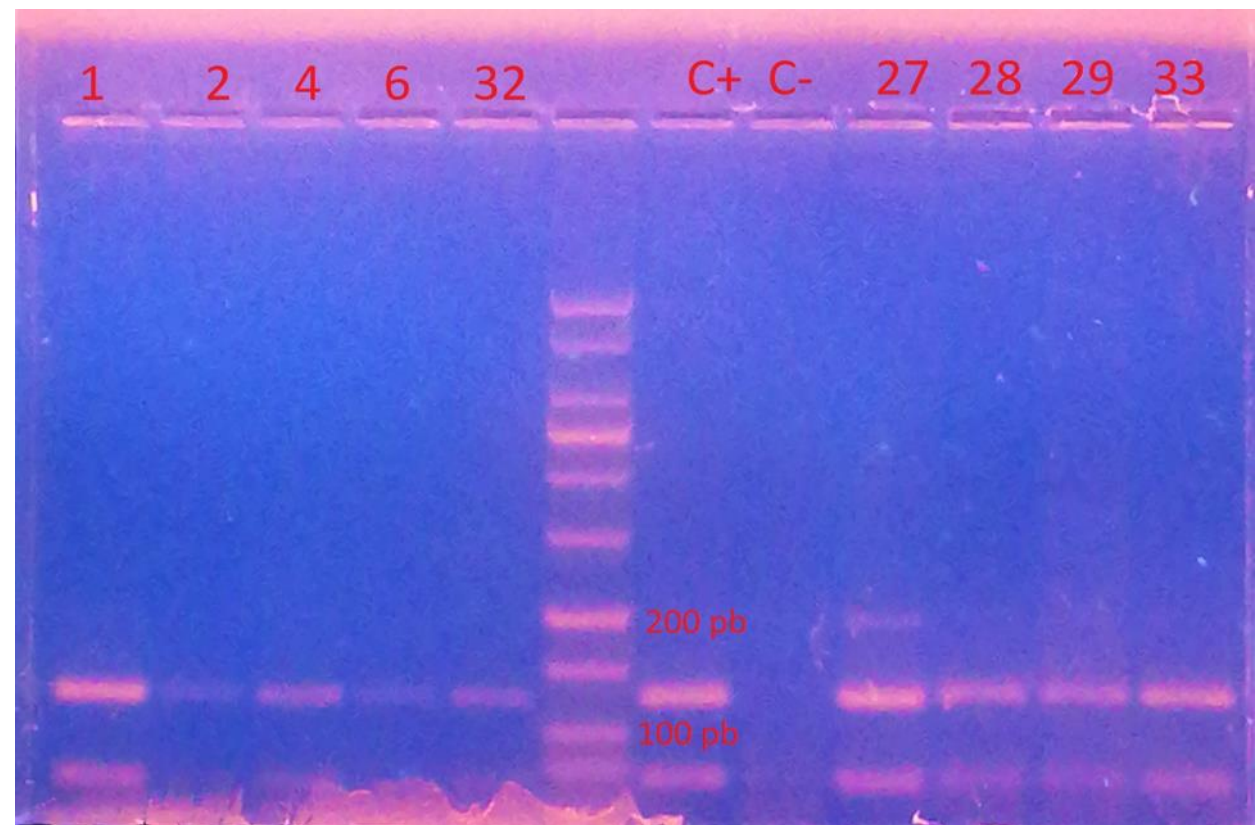
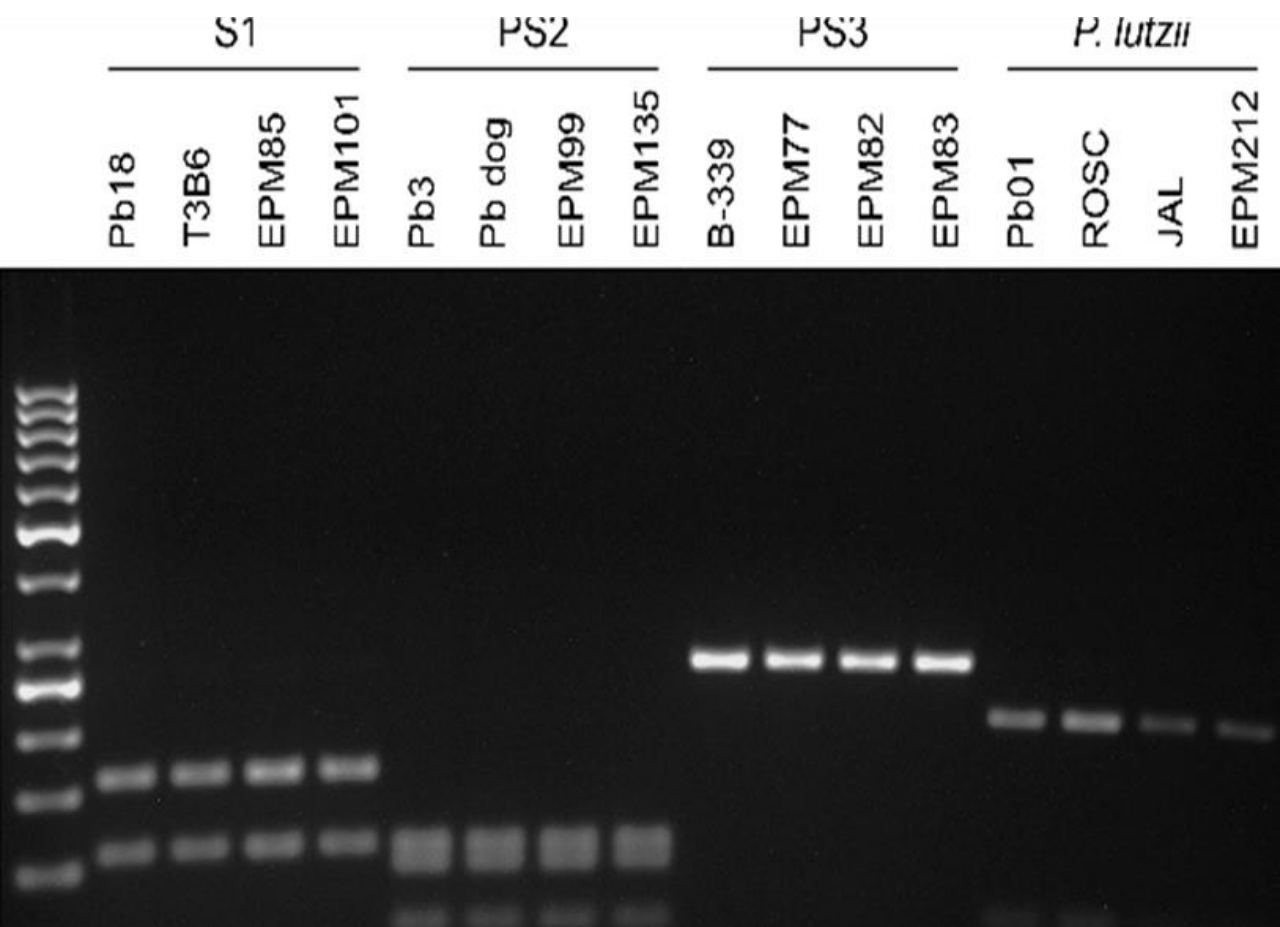




# PCR-RFLP de las cepas aisladas de pacientes



# PCR-RFLP de las cepas aisladas de pacientes

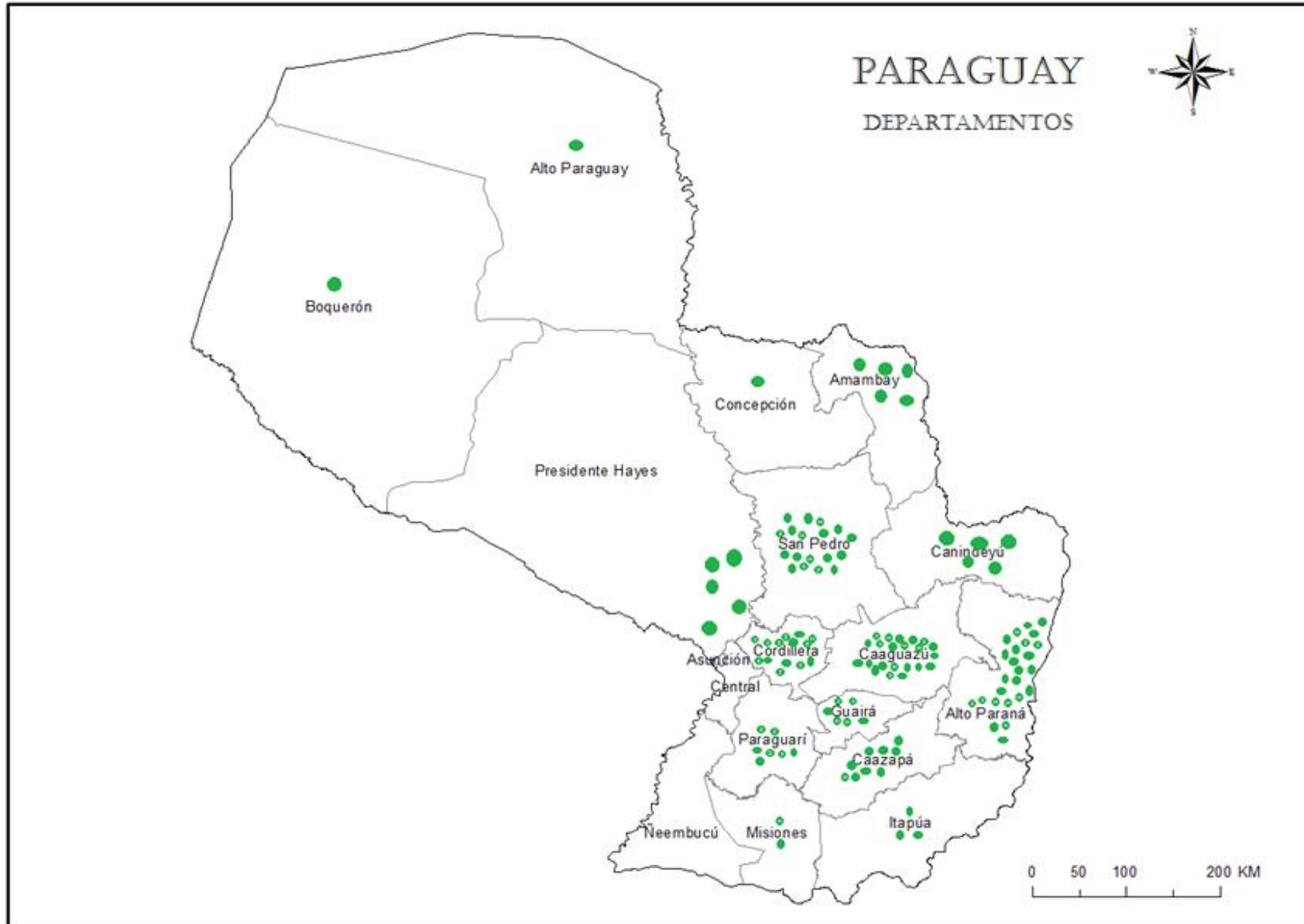


## Caracterización Molecular de cepas de Paracoccidioides aisladas de pacientes

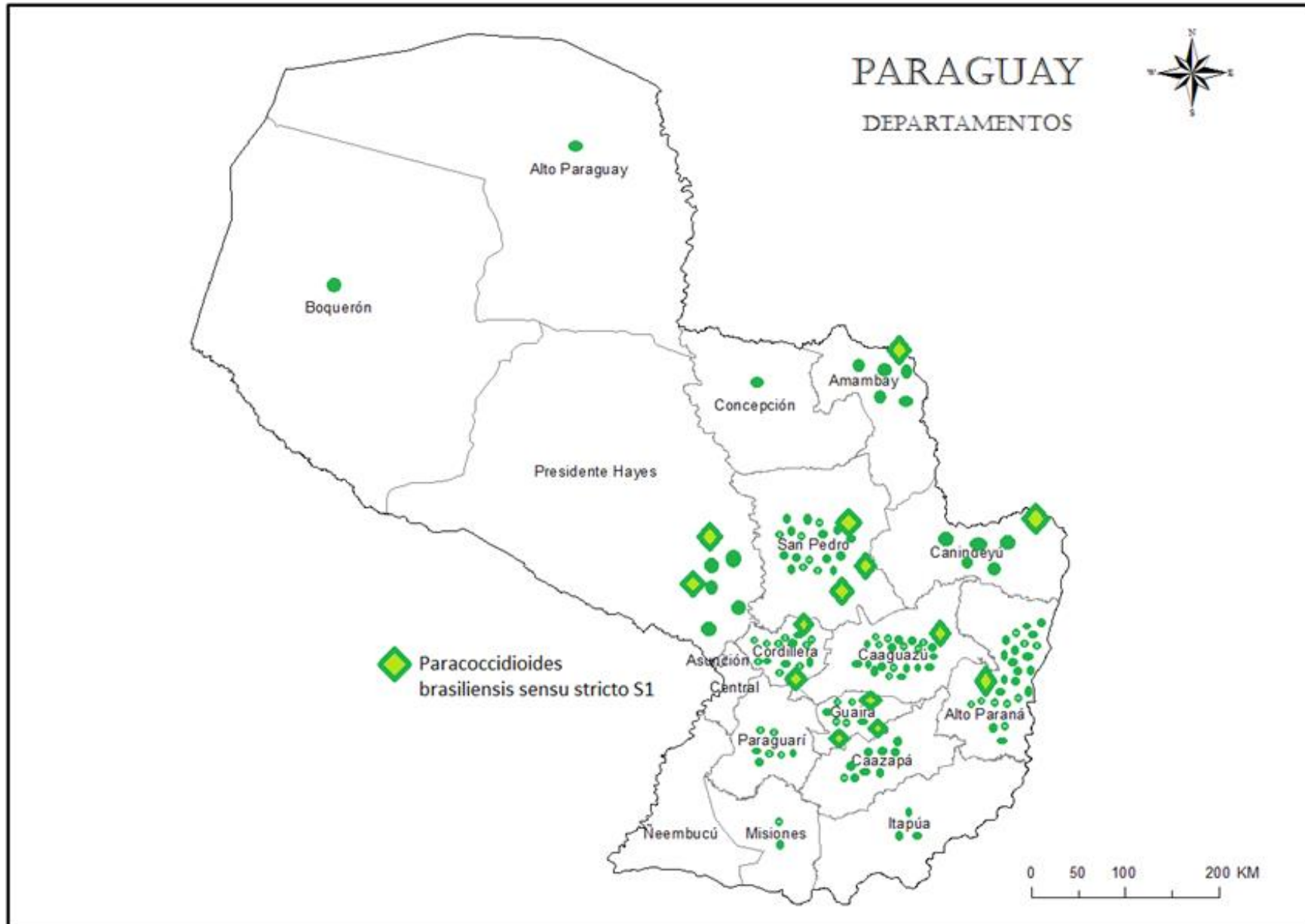
2013				
4 cepas		Paracoccidioides brasiliensis sensu stricto (S1)		
2014				
3 cepas		Paracoccidioides brasiliensis sensu stricto (S1)		
2015				
2 cepas		Paracoccidioides brasiliensis sensu stricto (S1)		
2016				
2 cepas		Paracoccidioides brasiliensis sensu stricto (S1)		
2017				
6 cepas		Paracoccidioides brasiliensis sensu stricto (S1)		
2018				
7 cepas		Paracoccidioides brasiliensis sensu stricto (S1)		
2019				
2 cepas		Paracoccidioides brasiliensis sensu stricto (S1)		
2021				
3 cepas		Paracoccidioides brasiliensis sensu stricto (S1)		

**29 Cepas**  
Caracterizadas

# Mapa de distribución de pacientes con Paracoccidioidomycosis (2012-2021) y cepas caracterizadas

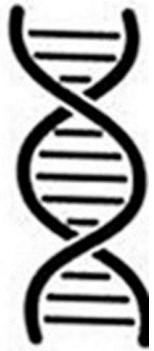


# Mapa de distribución de pacientes y cepas caracterizadas

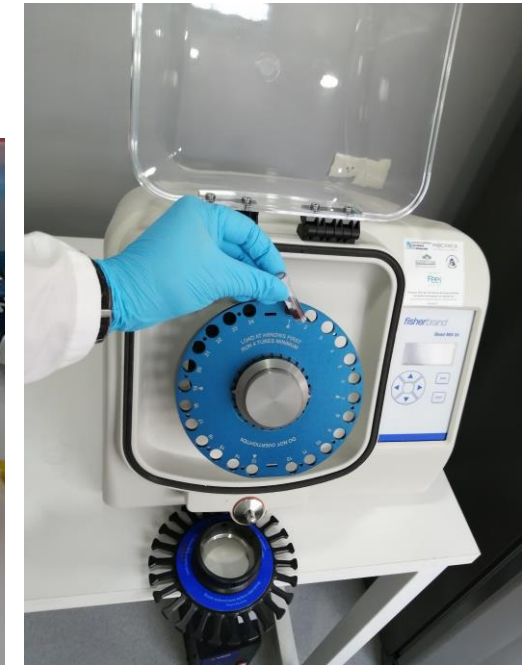
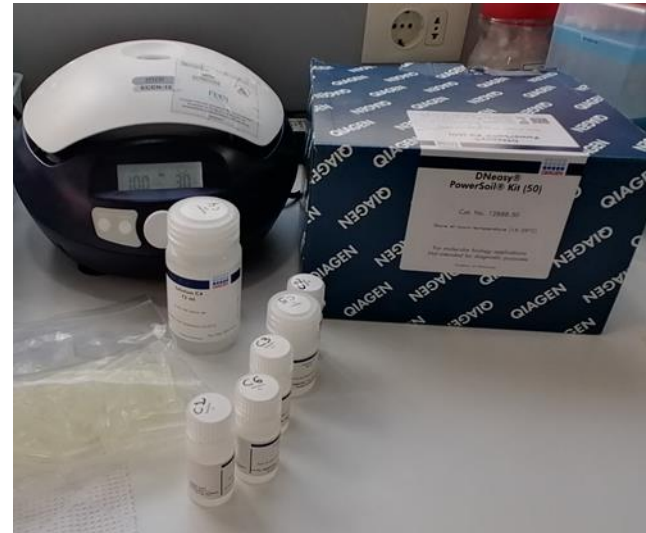


Aplicación de la técnica PCR anidada  
(Nested PCR )a muestras de suelo  
recolectadas en el país

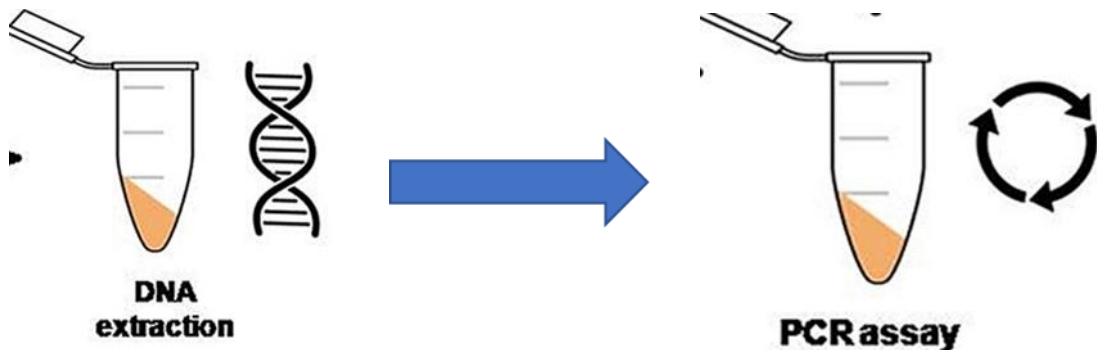
# PCR anidada(Nested PCR) conceptos



**DNA  
extraction**

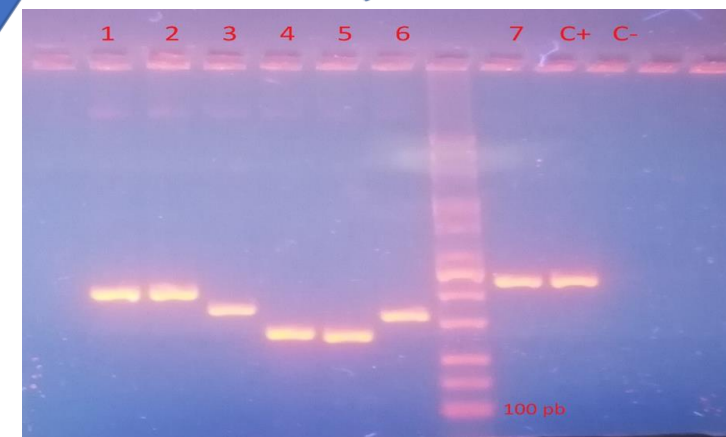
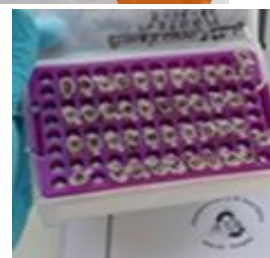


# PCR anidada(Nested PCR) conceptos



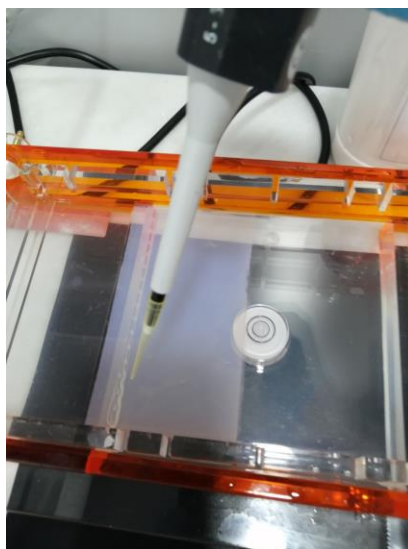
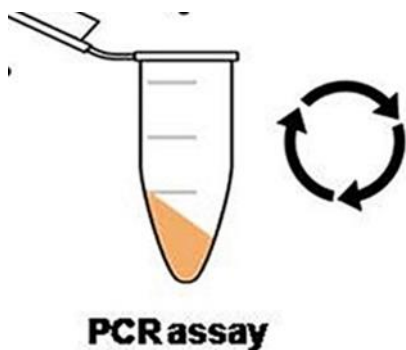
## Primera Ronda

Amplificación de ITS





# PCR anidada(Nested PCR) conceptos



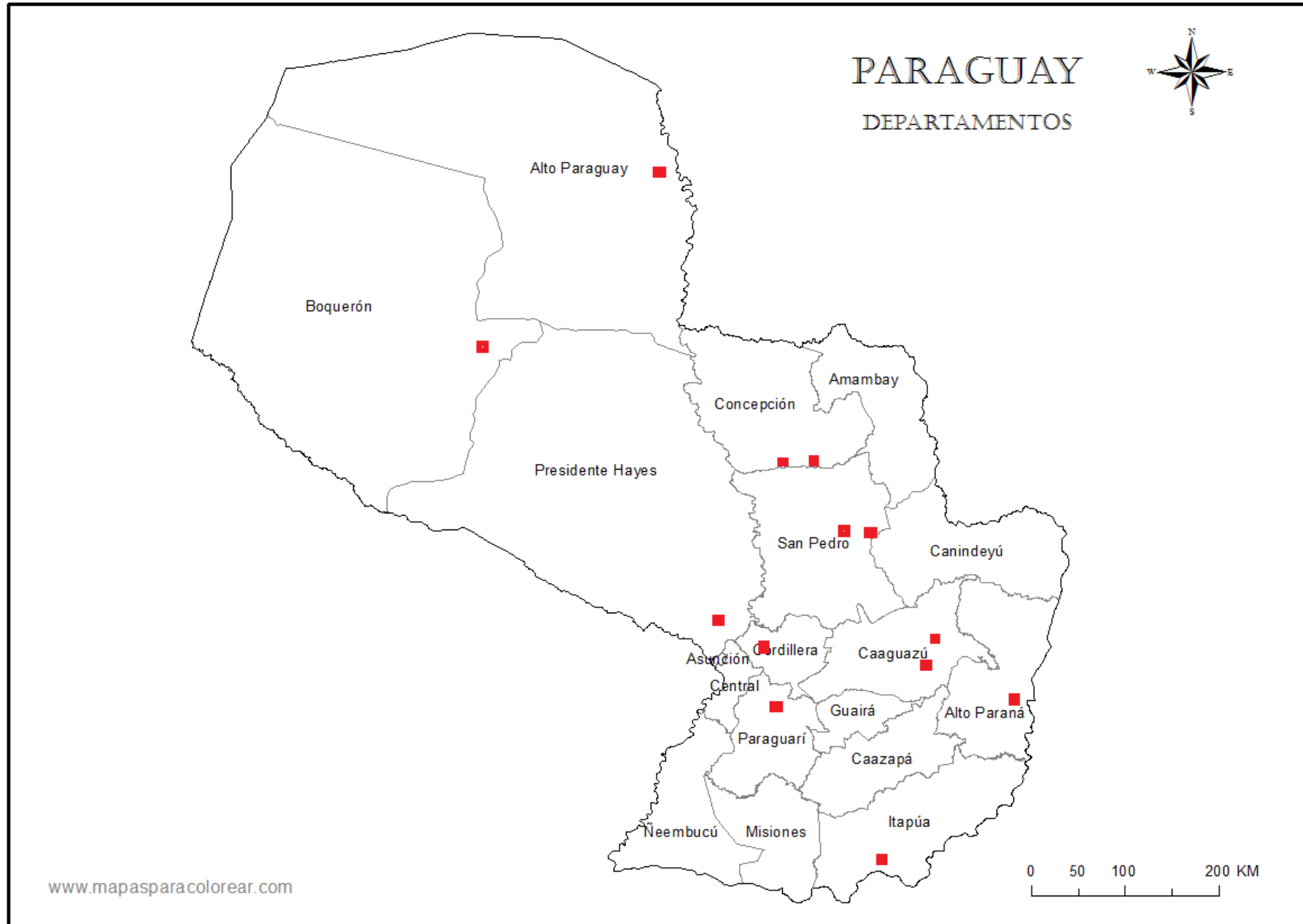
## Segunda Ronda

Detectar PbITS E/T



PbITS E/T

# Mapa de los lugares de toma de muestra de suelo

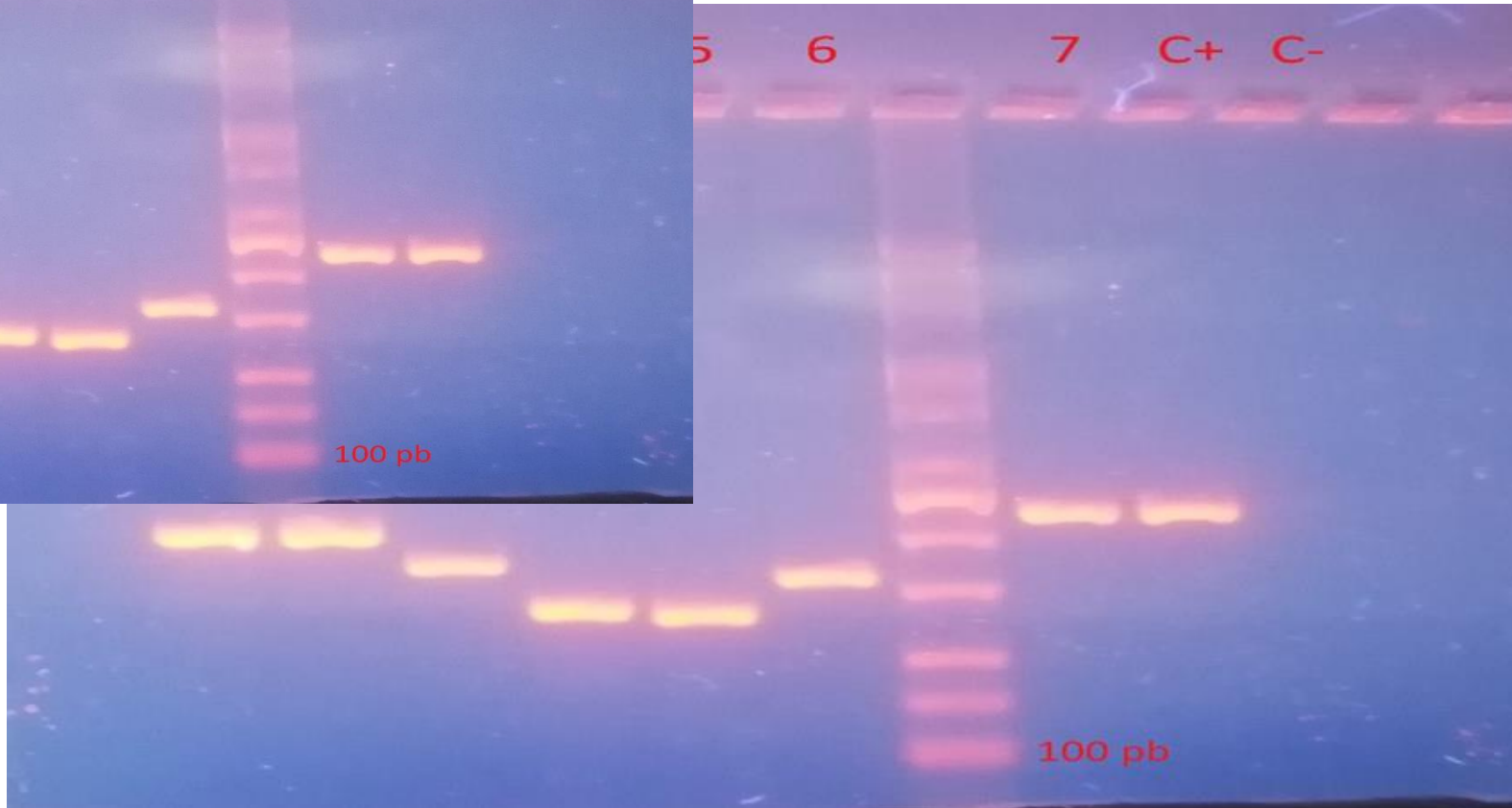
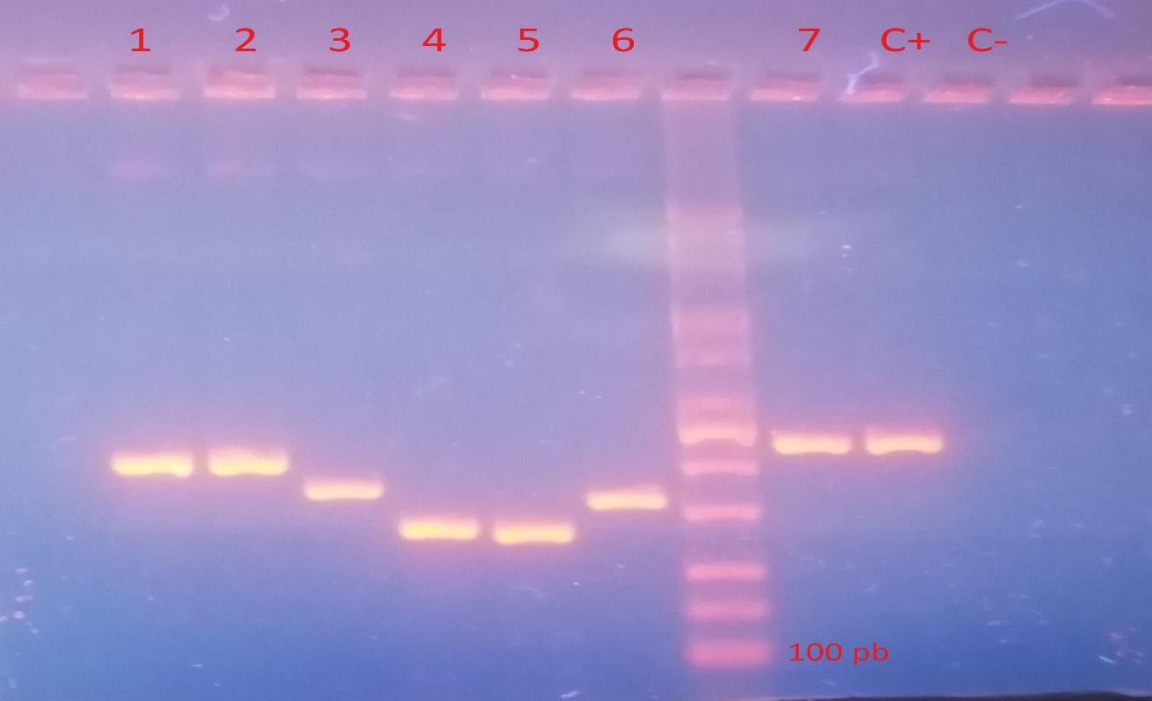


## Tipo de lugar de toma de muestra de suelo

74 Muestras de suelo (68 sitios diferentes)

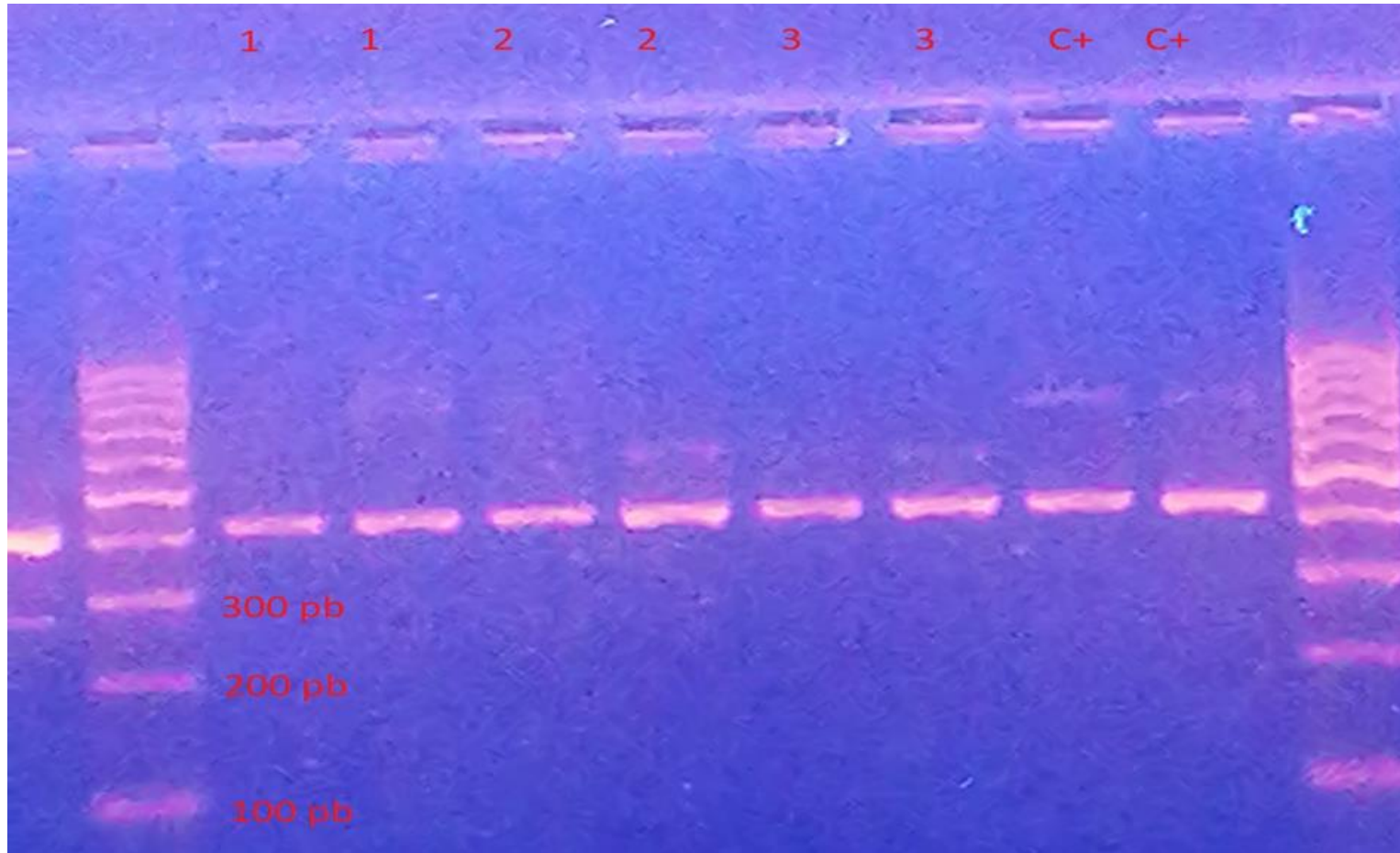
	Número estudiados	
Suelo de campo abierto	22	
Madriguera de armadillo	16	
Suelo al lado de nacimiento de agua	1	
Suelo borde de arroyo	16	
Suelo de huerta	13	

## (PCR anidada) de cultivo



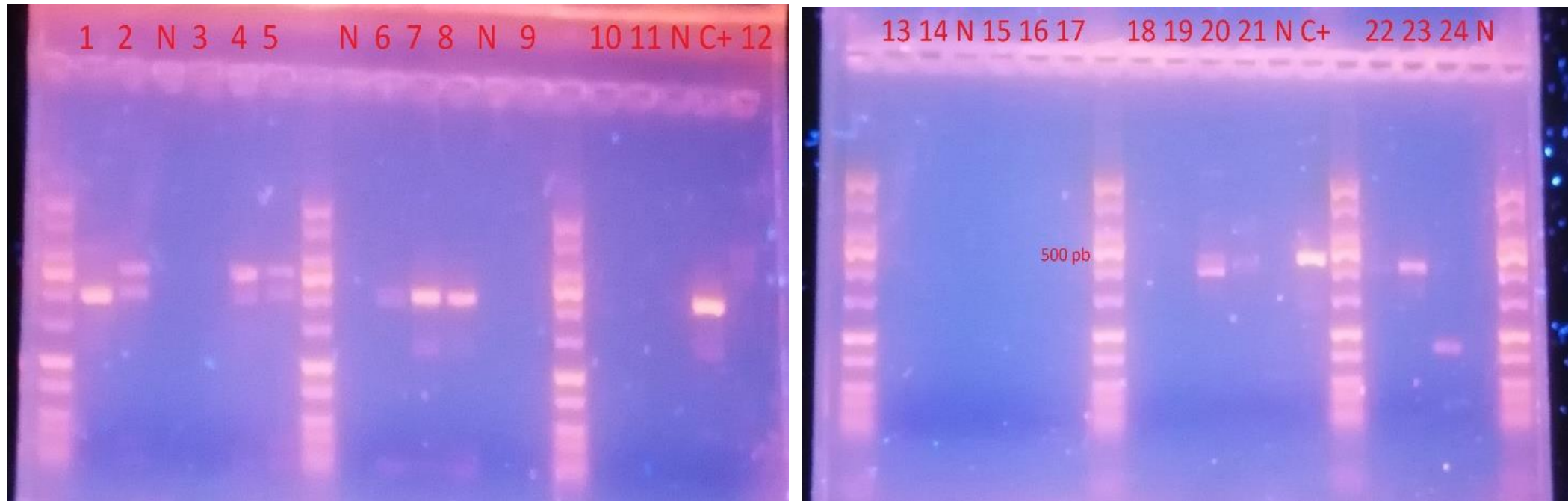
Detección de ITS (1ra ronda) de cepas:1- *Candida albicans* ATCC 90028;  
2-*Candida tropicalis* R902021;3- *Candida parapsilopsis* ATTC 22019; 4- *Candida glabrata* R1317; 5- *Clavispora lusitaniae* R7919; *Pichia kudriavzevii* ATCC 6258 (*C. krusei*);7-Cepa de *Paracoccidioides* spp. 11-908; C+: Mar-30(S1)

# Detección de PBITS ET en suelo sembrado artificialmente de cultivo de *Paracoccidioides brasiliensis*



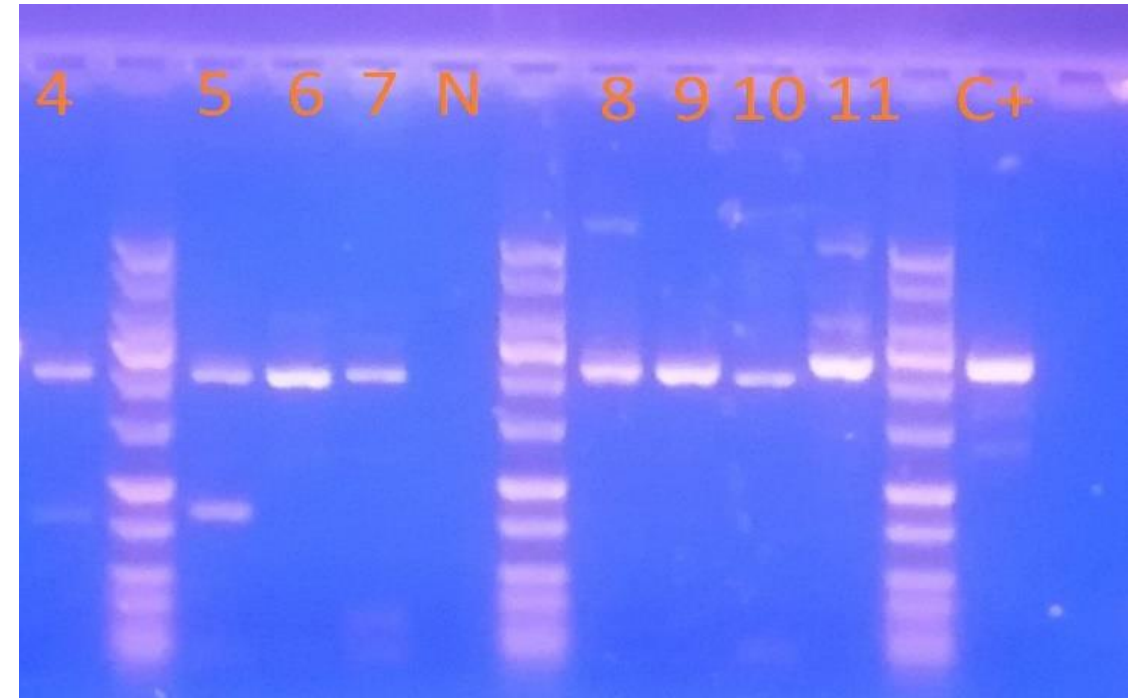
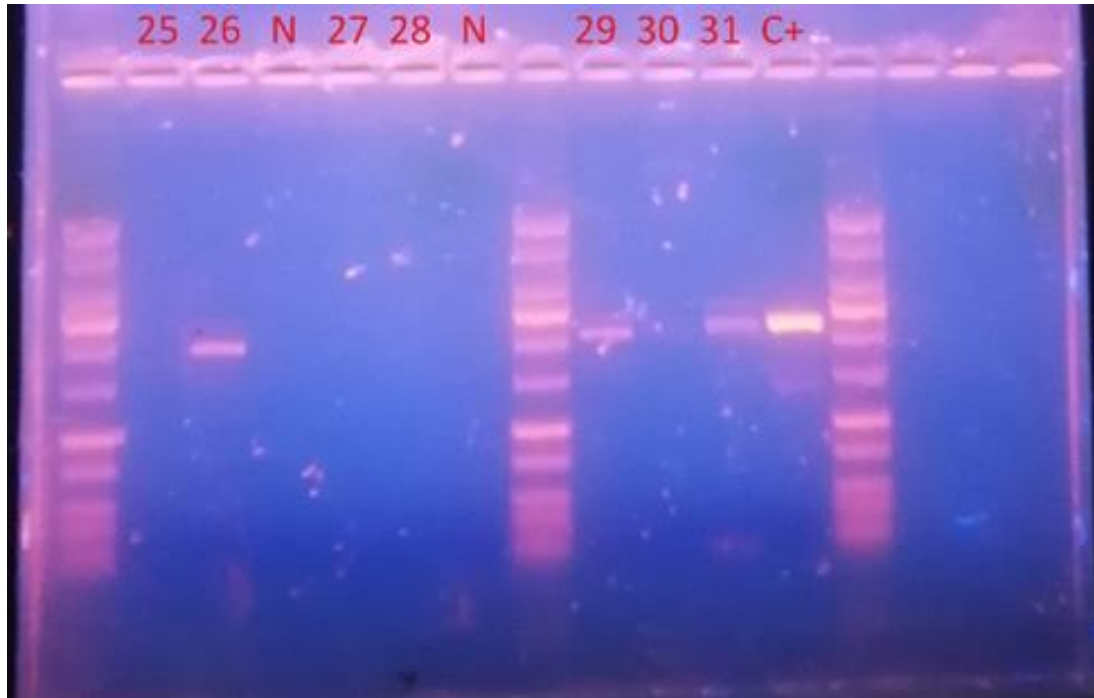
Prueba para detección de Pbits ET de suelos a partir de ADN de *Paracoccidioides brasiliensis* S1 (Mar 30): Diluciones iniciales en suelo: 1: ~ 3600 UFC; 2: ~ 1500 UFC; 3: ~ 400 UFC para 250 mg de suelo.

## Detección de PbITS ET (Paracoccidioides spp.) en muestras de suelo del país



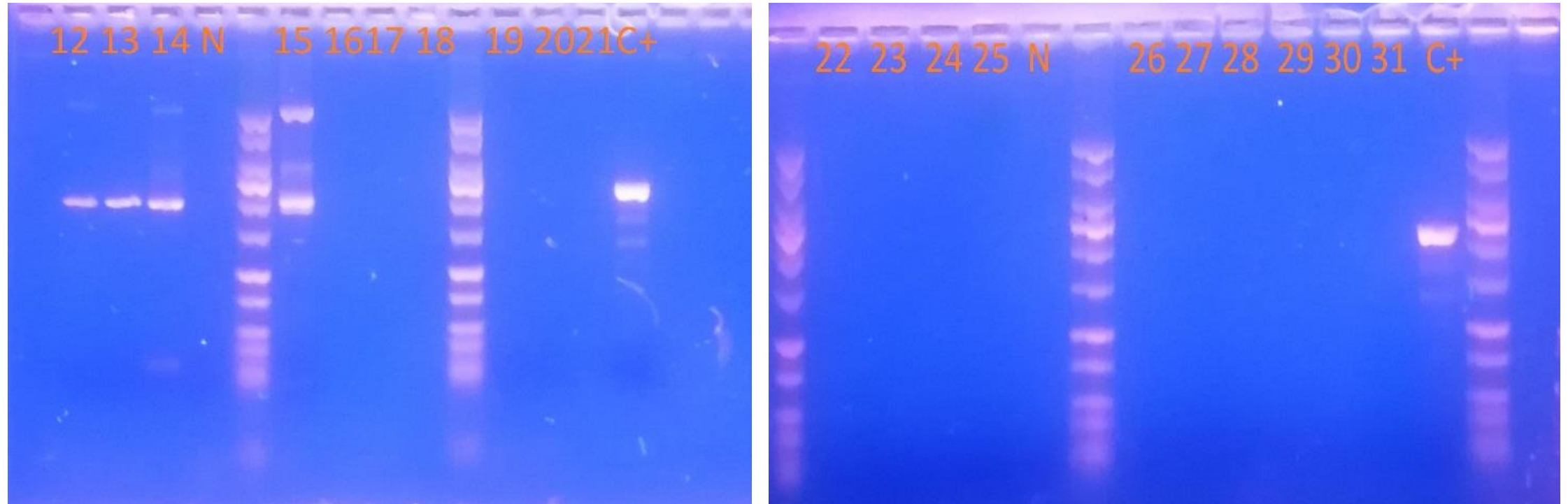
Nested PCR con primers PbITS E/T(450 pb) de ADN extraído con el kit DNesy PowerSoil Qiagen

## Detección de PbITS ET (Paracoccidioides spp.) en muestras de suelo del país



Nested PCR con primers PbITS E/T(450 pb) de ADN extraído con el kit DNesy PowerSoil Qiagen

## Detección de PbITS ET (Paracoccidioides spp.) en muestras de suelo del país



Nested PCR con primers PbITS E/T(450 pb) de ADN extraído con el kit DNesy PowerSoil Qiagen



# Tabla de resultados de Nested PCR de suelo

Tipo de lugar de toma de muestra de suelo		
74 Muestras de suelo (68 sitios diferentes)		
	Número estudiados (sitios diferentes)	Detección de PbITS E/T por Nested PCR
Suelo de campo abierto	22	0
Madriguera de armadillo	16	13 (81 %)
Suelo al lado de Naciente de agua	1	1 (100 %)
Suelo borde de arroyo	16	1 (6%)
Suelo de huerta	13	4 (31 %)
		<b>Total = 19</b>

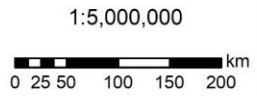
Proyecto PINV-18-347 Especies de Paracoccidioides circulantes en Paraguay y su relación con características epidemiológicas y clínicas de los pacientes

### MAPA DE MUESTREO DE SUELOS



**Leyenda**

- Puntos de muestreo de suelo
- Principales ríos y arroyos
- Vías principales
- Límites departamentales



**Fuente**

Dirección General de Estadísticas,  
Encuestas y Censos, año 2012  
Datum WGS 1984 UTM 21S  
Noviembre de 2021



# Conclusión

- Reporte por primera vez de identificación de Paracoccidioides en suelo de seis departamentos: San Pedro, Alto Paraná; Caaguazú, Itapúa, Amambay y Cordillera
- Caracterización molecular de 29 cepas aisladas de pacientes en el país como *Paracoccidioides brasiliensis* sensu stricto S1
- La detección del hongo en el suelo y la genotipificación de las cepas aisladas ayudaran a definir las áreas endémicas en el país de PCM, permitiendo así impulsar acciones de planificación en salud pública ante este hongo sistémico.





Logros importantes con el  
proyecto

CONOCIMIENTO ACTUALIZADO DE LA EPIDEMIOLOGÍA DE LA  
PARACOCCIDIOIDOMICOSIS EN PARAGUAY

PRIMERA CARACTERIZACIÓN MOLECULAR REALIZADA EN EL PAÍS DE  
UNA MICOSIS ENDÉMICA

FORTALECIMIENTO DEL LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA PARA  
EJECUCIÓN DE ESTUDIOS ECOEPIDEMIOLÓGICOS E IMPLEMENTACIÓN  
DE TÉCNICAS MOLECULARES



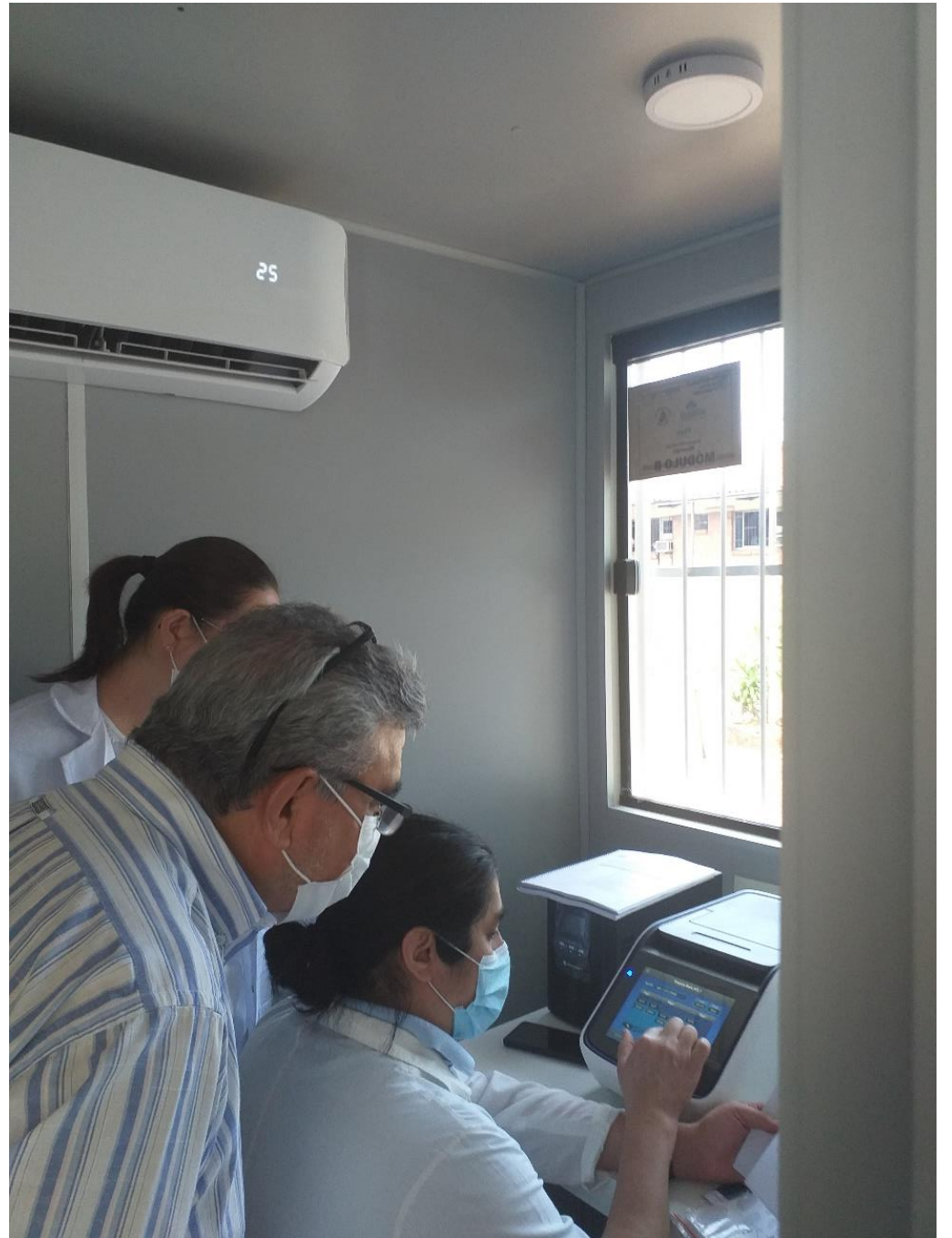




















- Agradecimientos

Autoridades del LCSP

Equipo administrativo Alter Vida

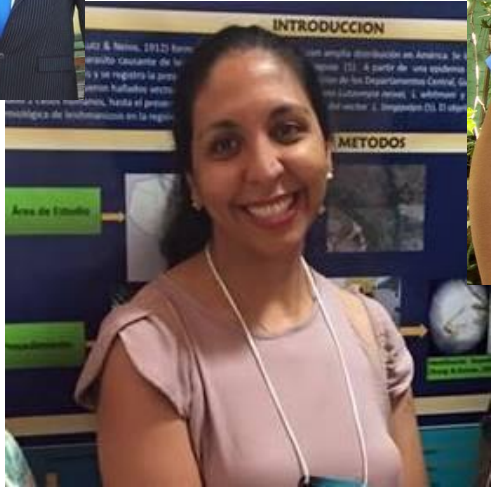
Bioquímicos que colaboraron con el proyecto

Unidad de Capacitación LCSP

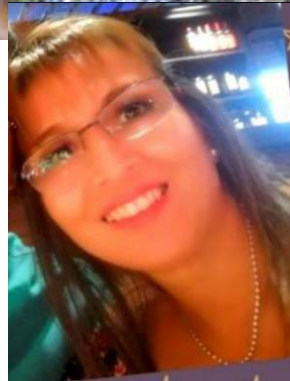
Personas de distintas regiones que ayudaron a las colectas ambientales

Compañeros del Departamento de Mantenimiento y Servicios  
Generales

# Equipo de trabajo para colecta de muestras ambientales



# Vigilancia de las micosis Red de Micología diagnóstico de Paracoccidioidomicosis en laboratorios públicos y privados

















Con el apoyo de:



**Muchas gracias!!**