

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

ALINE LYRA PEREIRA

Diagnóstico Sorológico da paracoccidiodomicose: comparação entre os testes de Imunodifusão Dupla (IDD) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA).

VITÓRIA/ES

2012

ALINE LYRA PEREIRA

Diagnóstico Sorológico da paracoccidioidomicose: comparação entre os testes de Imunodifusão Dupla (IDD) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Doenças Infecciosas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mariceli Lamas de Araújo

VITÓRIA/ES

2012

À Deus, a toda minha família, a minha mãe, Eliana, ao Ronaldo e a todos que me deram o apoio imprescindível para a conclusão dessa jornada.

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Pereira, Aline Lyra, 1984-

P436d Diagnóstico Sorológico da paracoccidiodomicose :
comparação entre os testes de Imunodifusão Dupla (IDD) e
Ensaio Imunoenzimático (ELISA) / Aline Lyra Pereira. – 2012.

98 f. : il.

Orientador: Mariceli Lamas de Araújo.

Coorientador: Tânia Regina Grão Veloso.

Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da
Saúde.

1. Paracoccidiodomicose. 2. Sorodiagnóstico. 3.
Imunodifusão. 4. Teste imunoenzimático. I. Araújo, Mariceli
Lamas de. II. Veloso, Tânia Regina Grão. III. Universidade
Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV.
Título.

CDU: 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

A mestranda ALINE LYRA PEREIRA apresentou dissertação intitulada “**Diagnóstico Sorológico da Paracoccidiodomicose comparando os testes de Imunodifusão dupla (IDD) e Imunoenzimático (ELISA)**” em sessão pública, no dia 30 de março de 2012, como requisito final para obtenção do título de **Mestre em Doenças Infecciosas**, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, a qualidade e relevância dos mesmos, a Comissão Examinadora da Dissertação decidiu **aprovar** () **reprovar** a dissertação para habilitar a farmacêutica ALINE LYRA PEREIRA a obter o Grau de MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória, ES, 30 de março de 2012

Prof. Dr. Luiz Cosme Cotta Maláquias
(Membro Externo)

Prof. Dr. Aloisio Falqueto
(Membro Interno)

Profa. Dra. Mariceli Lamas de Araujo
(Orientadora)

Profa. Dra. Tânia Regina Grão Veloso
Co-Orientadora

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por mais esta conquista e por cada pessoa que pôs em minha vida para que essa etapa pudesse se realizar.

Ao Ronaldo pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida acadêmica, me fornecendo todo o suporte, apoio moral, intelectual, com seu companheirismo vinte e quatro horas por dia.

A minha mãe, Eliana, mentora e inspiradora de todas as minhas conquistas, pelo apoio em minha jornada, desde a faculdade. Obrigada por acreditar em mim.

A toda minha família, irmão Leonardo e Rodrigo, ao Rogério, André, Elizete pelo apoio e compreensão.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Mariceli, por quem tenho imensa gratidão por ter acreditado em mim e compartilhado sua sabedoria comigo, desde a iniciação científica, ainda no início da minha vida acadêmica. Obrigada pela dedicação e confiança.

A Prof^a Dr^a Tânia Velloso por me co-orientar nesse trabalho, sempre tão atenciosa e disposta a ajudar, principalmente na parte prática.

À Simone, quem ajudou diretamente nos experimentos no Laboratório, sempre com muita boa vontade, sempre disposta a ajudar. Sem ela, dificilmente seria possível concluir esse trabalho com êxito.

Aos Técnicos do Laboratório de Micologia José Mauro da Vitória, Idenir, Érica, Lia pelas ajudas em momentos oportunos.

A todos os meus amigos que compreenderam minha ausência em momentos importantes.

Às amigas de laboratório Roberta, Adriele, Laura, Keyla pela convivência e momentos de descontração.

A Camila, Lorenzo, Adriana, Fernanda, Lucas por compartilhar dos mesmos sonhos, nos formar mestres.

A amiga Mariane que sempre me ajudou incondicionalmente, desde a pesquisa de artigos na internet até a discussão do meu trabalho.

A Professora Elenice, pela ajuda na padronização do ELISA, com seus conhecimentos, experiência e sobretudo, boa vontade.

Ao Prof^o Cosme, pela ajuda com materiais para a pesquisa e pela vinda a banca de arguição.

A todos os amigos e funcionários do departamento que possibilitaram a conclusão da pesquisa.

Aos pacientes, sem os quais não haveria possibilidade para a realização deste trabalho.

A todos os colegas de turma de mestrado 2010.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas, pelos ensinamentos, compartilhando de suas valiosas experiências.

A Wayna e Fátima pelo auxílio na Secretaria da Pós Graduação.

RESUMO

A paracoccidiodomicose (PCM) é uma micose sistêmica causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*. Está entre as infecções fúngicas mais frequentes da América Latina, sendo o Brasil o país de maior endemicidade, com maior prevalência na região Sudeste. O diagnóstico considerado por muitos autores padrão-ouro para a PCM é o encontro de células fúngicas sugestivas de *Paracoccidioides brasiliensis* no Exame Microscópico Direto (EMD) de escarro ou outros espécimes clínicos, como raspado de lesão, aspirado de linfonodos, biópsia, etc. As provas sorológicas têm grande importância, complementando ou substituindo o exame micológico no diagnóstico/prognóstico da doença. O objetivo do presente estudo foi comparar dois desses testes sorológicos para PCM: a imunodifusão dupla (IDD) e o ensaio imunoenzimático ELISA. A metodologia foi estabelecida comparando-se títulos de anticorpos obtidos de três grupos de pacientes: 145 amostras de soros de 83 pacientes com PCM (Grupo I), 49 doadores saudáveis (Grupo II) e 13 pacientes com IDD positiva para outras micoses pulmonares: 11 com histoplasmose e 2 com aspergilose (Grupo III). Nossos resultados mostraram que 8 (9,6%) e 5 (6,0%) dos pacientes com PCM foram falso-negativos ao teste de IDD e ELISA, respectivamente. Dentro do grupo de pacientes saudáveis, não houve casos de falso positivo na IDD, porém, 5 (10,2%) amostras foram positivas com títulos baixos no ELISA. Entre os 13 pacientes com outras micoses, o ELISA mostrou que 10 (77,0%) foram positivos enquanto a IDD não apresentou qualquer caso de reação cruzada. A sensibilidade do ELISA (93,9%) foi um pouco superior ao da IDD (90,3%). A especificidade do ELISA calculada como base o controle saudável e os pacientes com outras micoses foi 89,7% e 23,1%, respectivamente. A IDD mostrou uma especificidade de 100% para ambos os casos. Os valores preditivos positivos e negativos foram de 100% e 83,8% para IDD e de 88,5% e 90,3% para ELISA, respectivamente. A acurácia dos testes também foi calculada: a IDD teve 94,4% e o ELISA 86,2% de acurácia.

Palavras-chave: paracoccidiodomicose, diagnóstico sorológico, títulos de anticorpo, Imunodifusão dupla (IDD), ensaio imunoenzimático (ELISA).

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. It is among the most common fungal infections in Latin America, with Brazil being the country of highest endemicity, mainly in the Southeast part. The diagnosis considered by many authors as gold standard for the PCM is the finding of suggestive yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis* in the Direct Microscopic Examination of sputum or other clinical specimens, such as scraping the lesion, lymph node aspirate, biopsy, etc. The serological tests are of great importance, since they complement or replace the mycological examination in the diagnosis / prognosis of the disease. The aim of this study was to compare two serological tests for PCM: a double immunodiffusion (IDD) and Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA). The methodology was established by comparing antibody titers obtained from three groups of patients: 145 serum samples from 83 patients with PCM (Group I), 49 healthy blood donors (Group II) and 13 patients with IDD positive for other pulmonary mycoses: 11 with histoplasmosis and 2 with aspergillosis (Group III). Our results showed that eight (9.6%) and 5 (6.0%) of patients with PCM were false negative to the IDD and ELISA tests, respectively. In the group of healthy patients, no cases of false positive in IDD were observed; however, 5 (10.2%) of samples were positive with low titers in ELISA. Among the 13 patients with other mycoses, the ELISA showed that 10 (77.0%) were positive while the IDD tests did not show any case of cross-reaction. The sensitivity of the ELISA (93.9%) was slightly higher than the IDD (90.3%). The specificity of the ELISA calculated basing on the healthy control and patients with other mycoses was 89.7% and 23.1%, respectively. IDD showed 100% of specificity for both cases. The positive predictive and negative predictive values were 100% and 83.8% for IDD and 88.5% and 90.3% for ELISA, respectively. The accuracy of the tests was also calculated: the IDD was 94.4% while ELISA was 86.2%.

Keywords: paracoccidioidomycosis, serodiagnosis, antibody titers, double immunodiffusion (IDD), enzyme immunoassay (ELISA).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Interpretação dos valores do Índice de concordância <i>kappa</i> (<i>k</i>).....	56
Tabela 2: Comparação dos resultados da IDD e do ELISA dos soros de pacientes com PCM, agrupados segundo título de anticorpos.....	58
Tabela 3: Relação entre os títulos da IDD e do ELISA dos soros dos 83 pacientes com PCM.....	59
Tabela 4: Comparação entre IDD e ELISA, segundo critérios: negativo, título baixo e título alto.....	60
Tabela 5: Comparação entre IDD e ELISA, segundo critério qualitativo: resultado negativo ou positivo.....	61
Tabela 6: Escores estabelecidos para títulos de anticorpos encontrados na IDD e ELISA para 11 pacientes em acompanhamento sorológico durante tratamento.....	61
Tabela 7: Distribuição dos resultados da IDD dos três grupos de pacientes estudados, segundo o valor do título de anticorpos, agrupados em negativo, título baixo (1:1 a 1:8) e título alto (1:16 a 1:512).....	65
Tabela 8: Distribuição dos resultados de ELISA dos três grupos de pacientes estudados, segundo o valor do título de anticorpos agrupados em negativo, título baixo (1:50-1:400) e título alto (1:800-1:6400).....	65
Tabela 9: Valores da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo e acurácia dos testes de Imunodifusão Dupla (IDD) e Ensaio Imunoenzimáticos (ELISA) encontrados nos três grupos de pacientes em estudo.....	66
Tabela 10: Valores de Sensibilidade (S), Especificidade (E), Valor Preditivo Positivo (VPP), Valor preditivo Negativo (VPN) da Imunodifusão Dupla (IDD) levantados da literatura.....	75
Tabela 11: Valores de Sensibilidade (S), Especificidade (E), Valor Preditivo Positivo (VPP), Valor preditivo Negativo (VPN) do Ensaio Imunoenzimático (ELISA) levantados da literatura.....	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Pb na forma de levedura.....	24
Figura 2: Pb na forma de hifas (micélio).....	24
Figura 3: Distribuição da PCM na América do Sul	26
Figura 4: Distribuição da Paracoccidiodomicose no Brasil e em outros países da América Latina (Fonte: Shikanai-Yasuda et al., 2006).....	27
Figura 5: História natural da interação entre <i>P. brasiliensis</i> e o homem.....	30
Figura 6: Resposta imunológica nas formas clínicas da paracoccidiodomicose.....	33
Figura 7: representação da lâmina utilizada na Imunodifusão e dos gabaritos feito no agar, com os controles e as diluições.....	51
Figura 8: representação esquemática da placa de ELISA – controles positivo e negativo e amostra 1 e 2.....	53
Figura 9: Distribuição dos títulos de anticorpos detectados por IDD em pacientes com PCM.	57
Figura 10: Distribuição dos títulos de anticorpos detectados por ELISA em pacientes com PCM.....	58
Figura 11: Escores das titulações IDD e ELISA de pacientes (1 a 3) com PCM em acompanhamento seguindo a ordem cronológica (tempo 1,2,3 e 4).....	62
Figura 12: Escores das titulações de pacientes (4 a 7) com PCM em acompanhamento seguindo a ordem cronológica (tempos 1,2,3 e 4).....	63
Figura 13: . Escores das titulações de IDD e ELISA de pacientes (8 a 11) com PCM em acompanhamento, segundo a ordem cronológica (tempos 1,2,3,4 e 5).....	64
Figura 14: Lâmina de teste da Imunodifusão Dupla negativa.....	99
Figura 15: Lâmina de teste de Imunodifusão Dupla positiva (esquerda) com título de 1:16.....	99

Figura 16: montagem da placa de ELISA com os controles positivos e negativos, uma amostra de pacientes do controle saudável e uma amostra de pacientes positivo do grupo.....99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PCM – paracoccidioidomicose

Pb – *Paracoccidioides brasiliensis*

C. albicans – *Candida albicans*

IDD – imunodifusão dupla

ELISA – ensaio imunoenzimático

IB - imunoblot

CIE - contraimuno eletroforese

et al. - e outros colaboradores

EUA – Estados Unidos da América

HIV – “Human immunodeficiency vírus”

HUCAM - Hospital Universitário Antônio Cassiano de Moraes

KOH – Hidróxido de Potássio

MOPS - ácido 3-n-morfolino propanossulfônico

pH – Potencial hidrogeniônico

SIDA – Síndrome da imunodeficiência adquirida

TNF – fator de necrose tumoral

T CD⁴/₄/CD⁸/₈ – subtipos de linfócitos T que possuem marcadores de superfície (CD)

INF – interferon

GSL - glicosfingolipídios

Ig – imunoglobulina

Ac – anticorpos

EMD – exame microscópico direto

UFES – Universidade Federal do Espírito Santo

LISTA DE SÍMBOLOS

% - porcentagem

> - maior que

°C – Graus Celsius

μL - microlitro

μg – microgramas

mL - mililitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVO	22
2.1. Objetivo Geral.....	22
2.2. Objetivos Específicos.....	22
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1. Histórico da Doença e taxonomia do fungo	23
3.2. Agente Etiológico.....	23
3.3. Etiologia	24
3.4. Epidemiologia da PCM	25
3.4.1. Distribuição Mundial	25
3.4.2. Distribuição no Brasil.....	26
3.4.3. Incidência, prevalência e mortalidade	27
3.4.4. Fatores de Risco: Gênero, Faixa etária e Fatores Ambientais	28
3.5. Formas Clínicas.....	29
3.5.1. Forma aguda/subaguda (tipo juvenil)	29
3.5.2. Forma Crônica (tipo adulto).....	29
3.6. Patogênese e Imunidade	31
3.6.1. Citocinas X Th ₁ /Th ₂	31
3.6.2. Componentes Antigênicos do fungo (gp43 e gp70 e outros)	34
3.6.3. Produção de Anticorpos	35
3.7. Diagnóstico Laboratorial	36
3.7.1. Padrão-Ouro	36
3.7.2. Sorologia	37
3.7.2.1. Preparação do antígeno para a realização dos testes.....	38
3.7.2.2. Imunodifusão Dupla (IDD)	39

3.7.2.3.ELISA	41
3.7.2.4 Detecção de antígeno.....	43
3.8. Paracoccidiodomicosis e a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida	45
4. METODOLOGIA	47
4.1. Casuística	47
4.2. Amostras Clínicas	47
4.3. Definição dos Grupos de pacientes	47
4.4. Processamento das amostras	49
4.5. Exame Microscópico Direto (EMD).....	50
4.6. Cultura	50
4.7. Testes Sorológicos	50
4.7.1. Preparo do Antígeno	50
4.7.2. Imunodifusão Dupla (IDD).....	50
4.7.3. ELISA	52
4.8. Avaliação dos testes	54
4.9. Análise Estatística	55
5. RESULTADOS.....	57
5.1. Títulos de anticorpos em soro de paciente com PCM – IDD e ELISA	57
5.2. Avaliação do desempenho dos testes – Sensibilidade, Especificidade, Valores Preditivos Positivos (VPP) e Negativos (VPN) e Acurácia.....	65
6. DISCUSSÃO	67
7. CONCLUSÃO	77
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
9. ANEXOS	88
9.1. ANEXO 1	88
9.1.1. Meios utilizados na Imunodifusão	88

9.1.2. Preparo das Soluções para o ELISA.....	88
9.1.3. Cálculo da quantidade do Antígeno para sensibilização da placa de ELISA	90
9.2.1. Tabelas com a identificação dos pacientes separados por grupo, o título de anticorpos da Imunodifusão Dupla e ELISA.....	90
9.3. ANEXO 3	98

1. INTRODUÇÃO

Recentemente, a paracoccidiodomicose (PCM) foi listada entre as doenças infecciosas negligenciadas na América Latina (Dujardin et al., 2010). A PCM é uma micose sistêmica causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*. A infecção é adquirida pela inalação dos conídios encontrados na natureza que, quando atingem os pulmões, assumem a forma leveduriforme. Assim, a infecção ocorre primariamente nos pulmões, podendo se disseminar para vários órgãos e sistemas, causando lesões secundárias, principalmente nas mucosas, nos linfonodos, na pele e nas glândulas adrenais (Unterkircher et al., 2004; Palmeiro et al., 2005; Oliveira et al., 2008).

A PCM é considerada a micose sistêmica de características endêmicas mais prevalentes na América Latina. Ocorre do México até a Argentina, atingindo principalmente países como Brasil, Argentina, Venezuela e Colômbia. O Brasil é considerado o país de maior endemicidade, com maiores prevalências nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste. Os estados de maior registro da doença no país são: Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais (Unterkircher et al., 2004; Palmeiro et al., 2005; Oliveira et al., 2008; San-Blas & Nino-Vega, 2007; Travassos & Taborda & Colombo, 2008; Yoshida et al., 2009). Casos ocorridos fora desses países ocorrem em pacientes provindos destas áreas endêmicas (Silva et al., 2004a).

A maioria dos casos de PCM no Brasil ocorre em indivíduos do sexo masculino, fumantes e etilistas crônicos, cujas condições de higiene, nutricionais e sócio-econômicas são precárias. Além disso, a maioria é de trabalhadores rurais (70%) que estão em constante contato com a terra e com vegetais (Pellegrino et al., 2003). A infecção pelo *Paracoccidioides brasiliensis* é geralmente adquirida nas duas primeiras décadas de vida, com pico de incidência entre 10 a 20 anos, sendo incomum a evolução para a doença nessa faixa etária. Nos adultos de 30 a 50 anos, pode ocorrer a reativação do foco endógeno, com evolução, para doença, relacionados a fatores do hospedeiro ou ao agente infeccioso (Palmeiro et al., 2005; Oliveira et al., 2008). Estima-se que 1-2% dos infectados possuem a doença ativa e cerca de 10 milhões de pessoas estão infectadas, dentro das áreas endêmicas (Silva et al., 2004a; Camargo et al., 2008).

O conhecimento dos casos da infecção é baseado em inquéritos epidemiológicos com a reação intradérmica de leitura tardia, que, apesar da dificuldade no método devido à heterogeneidade do antígeno, mostram-se positivo em casos de formas subclínicas e crônicas da doença, sendo negativa nas formas agudas e subagudas (tipo juvenil). Esse teste pode mostrar reação cruzada com outros fungos, particularmente com o *Histoplasma capsulatum* (Palmeiro et al., 2005; Oliveira et al., 2008).

PCM é caracterizada por infecção granulomatosa, com envolvimento de células do sistema imunológico e altos níveis de anticorpos. A doença pode se apresentar de várias formas clínicas e as manifestações patológicas podem ser, desde infecções pulmonares assintomáticas, até formas disseminadas e severas. A progressão para a forma crônica da doença é mais comum em homens, podendo se apresentar mais frequentemente com envolvimento pulmonar, podendo acometer tecido cutâneo, mucosa e adrenal e está relacionada, entre outros fatores, com a capacidade do sistema imune (SI) do hospedeiro em responder à infecção pelo *Paracoccidioides brasiliensis*, defesa essa, mediada por células do SI. Pacientes que apresentam um alto nível de resposta imune humoral têm mais chance de desenvolverem a forma disseminada da doença, uma vez que estes anticorpos produzidos não são protetores. Muitos estudos têm sugerido que formas disseminadas de PCM em humanos estão associadas com a diminuição da imunidade mediada por células (Palmeiro et al., 2005; Oliveira et al., 2008; Silva et al., 2004a).

O padrão-ouro para diagnóstico de PCM, segundo o Consenso em paracoccidioidomicose de 2006, é o encontro de elementos fúngicos sugestivos de *Paracoccidioides brasiliensis* em exame a fresco de escarro ou outro espécime clínico (raspado de lesão ou aspirado de linfonodo) ou fragmento de biopsia de órgão supostamente acometido (Shikanai-Yasuda et al., 2006; Silva et al., 2004a). Testes sorológicos específicos têm muita importância no diagnóstico e prognóstico da doença, permitindo ao médico avaliar e acompanhar a resposta dos pacientes frente ao tratamento instituído. Atualmente, estão disponíveis em diferentes serviços de referência em saúde no país os métodos de imunodifusão dupla (ID), contraímunoeletroforese (CIE), imunofluorescência indireta (IFI), ensaio imunoenzimático (ELISA) e imunoblot (IB). Estes testes apresentam sensibilidade

entre 85-100%, quando utilizadas técnicas padronizadas e antígenos adequados. A especificidade depende da técnica utilizada. O título de anticorpos específicos anti-*P. brasiliensis* tem correlação direta com a gravidade das formas clínicas, sendo mais elevados na forma aguda e subaguda da doença. Casos de falso-negativo (FN) podem ocorrer quando o paciente apresenta lesões localizadas ou quando apresenta quadro de imunossupressão, como pela infecção pelo HIV/AIDS, Reações falso-positivas (FP) podem ocorrer em pacientes com histoplasmose ou aspergilose, uma vez que esses fungos são geneticamente próximos do *P. brasiliensis* (Shikanai-Yasuda et al., 2006; Camargo et al., 2008).

Devido à simplicidade do teste, menor custo, sensibilidade e especificidade aceitáveis (>80% e >90%, respectivamente), e experiência acumulada ao longo das décadas, a reação de ID em agar é hoje vista como o principal método de diagnóstico sorológico da PCM. É recomendável que, independente do teste realizado, seja feita a titulação do soro para melhor interpretação da resposta terapêutica, uma vez que os títulos de anticorpos diminuem progressivamente com o controle clínico da doença. É desejável que ocorra a negatificação ou estabilização do teste quando o título do soro atinge 1:2 ou menos, preenchendo assim o critério de cura sorológica. Porém, alguns pacientes podem apresentar já no diagnóstico títulos abaixo de 1:4, o que limita o uso do critério de cura sorológica no seguimento do tratamento (Shikanai-Yasuda et al., 2006).

Outros testes adicionais podem ser utilizados para o sorodiagnóstico, encontrado em centros de referência ou em pesquisas. O Ensaio Imunoenzimático (ELISA) representa um método alternativo, é mais rápido, sensível e indicado para realização de grande número de soros, porém possui uma especificidade menor que da IDD. O teste deve ser rigorosamente padronizado e sua interpretação deve ser cuidadosa. Já o IB possui a vantagem de especificar os tipos de anticorpos séricos contra diversos determinantes antigênicos do fungo (Shikanai-Yasuda et al., 2006).

O *Paracoccidioides brasiliensis* é sensível à maioria das drogas antifúngicas. Anfotericina B, sulfamídicos (sulfadiazina, associação sulfametoxazol/trimetoprim) e azólicos (cetoconazol, fluconazol, itraconazol). As informações sobre esquemas terapêuticos são escassas na literatura, mas estudos sugerem que o itraconazol é uma opção para tratamento de formas leves e moderadas da doença. Os pacientes

com infecção grave, necessitando de internação, devem receber anfotericina-B via endovenosa, em monoterapia ou em associações com azólicos ou sulfametaxazol/trimetopim. A duração do tratamento em geral é longa, o que permite o controle das manifestações clínicas e ajuda a evitar recaídas. Esse paciente deve ser assistido até a obtenção de critérios de cura para os parâmetros clínicos, radiológicos e sorológicos (Shikanai-Yasuda et al., 2006). O presente estudo visa uma melhor avaliação do desempenho e possíveis falhas dos testes de IDD e ELISA, para que no futuro tenhamos um teste almejado por todos: altamente sensível e específico para a PCM.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo Geral

Comparar dois testes, Imunodifusão Dupla (IDD) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA), usados no diagnóstico sorológico da paracoccidiodomicose.

2.2. Objetivos Específicos

1. Comparar os títulos de anticorpos nos dois testes sorológicos, encontrados nas amostras de três grupos de pacientes: com diagnóstico confirmado de PCM (grupo I), pacientes sem diagnóstico de micoses pulmonares (grupo II), negativo para PCM e positivo para outras micoses pulmonares (aspergilose e histoplasmore) (grupo III), buscando uma possível associação entre eles.
2. Avaliar o uso dos dois testes em pacientes acompanhados durante tratamento da paracoccidiodomicose.
3. Calcular o nível de concordância entre os testes.
4. Estabelecer parâmetros como sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia dos dois testes.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Histórico da Doença e taxonomia do fungo

A paracoccidioidomicose (PCM) foi descrita pela primeira vez em 1908, por Adolfo Lutz. Quatro anos mais tarde, Splendore descreveu novos casos em pacientes da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo e estudou minuciosamente a morfologia do fungo que ele denominou de *Zymonema brasiliensis*. Somente em 1930, Floriano Paulo de Almeida instituiu a denominação de *Paracoccidioides brasiliensis*. A paracoccidioidomicose (PCM) é também denominada de doença de Lutz, blastomicose sul-americana, blastomicose brasileira, moléstia de Lutz-Splendore-Almeida e micose de Lutz. A denominação de paracoccidioidomicose veio em 1971 em uma reunião de micologistas das Américas e sua nomenclatura permanece desde então como oficial (Palmeiro et al., 2005).

3.2. Agente Etiológico

A PCM é uma micose sistêmica causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), pertencente à família *Moniliaceae*, da classe *Hyphomycetes*. É um fungo assexuado com crescimento lento em meio de cultura, termodimórfico, que cresce a 37°C na forma de levedura, medindo cerca de 5 a 25 micrômetros (μm) de diâmetro. Os principais componentes da parede celular do fungo são principalmente quitina (presente nas duas formas: levedura e hifas) e α e β -1,3-glucana, sendo a α -1,3-glucana, um polissacarídeo neutro aceito como fator de virulência e determinante para o dimorfismo do fungo, uma vez que é encontrado somente na fase de levedura (San-Blas & Nino-Vega, 2007). Na temperatura ambiente (25°C), o fungo cresce na forma de filamentos septados que dão origem ao micélio, forma encontrada no solo como saprofítica permanente (Palmeiro et al., 2005). Esse dimorfismo térmico do Pb é uma característica particular da morfogenética do fungo, tem as vantagens de ser reversível e de não ser um componente vital do ciclo de vida do fungo e sim uma adaptação às condições do ambiente. Contudo, a conversão para a forma de levedura é requisito para a progressão da infecção. Tal fenômeno ocorre devido a indução de fatores genéticos específicos, através de vias

bioquímicas que modulam a síntese de componentes que afetam a forma do fungo (San-Blas & Nino-Vega, 2007). Esse dimorfismo é importante no diagnóstico laboratorial através da cultura, em que se pode observar crescimento nas temperaturas de 25°C e de 37°C (Palmeiro et al., 2005; Shikanai-Yasuda et al., 2006; Hogan & Klein & Levitz, 1996). Essa habilidade pode ser considerada um fator de virulência, uma vez que o fungo consegue sobreviver às situações inóspitas no ambiente, como mudanças súbitas de temperaturas e se mantendo hábil a invadir o hospedeiro (San-Blas & Nino-Vega, 2007).

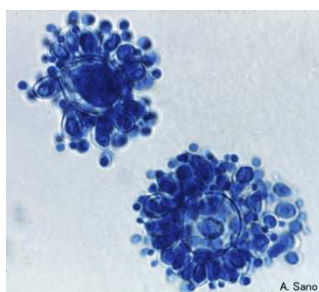


Figura 1. Pb na forma de levedura
(Fonte: Internet)

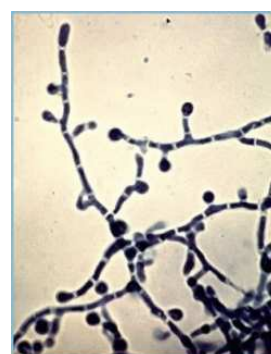


Figura 2: Pb na forma de hifas
(micélio) (Fonte: Internet)

3.3. Etiologia

Acredita-se que a PCM é adquirida pela inalação de propágulos infectantes do fungo, denominados de conídios, encontrados no ambiente, principalmente em áreas rurais, em solos úmidos e ricos e com temperaturas amenas. Porém, as circunstâncias em que ocorre a infecção primária são de difícil compreensão, uma vez que o período de latência do fungo é longo e há falta de grandes surtos epidêmicos (Terçarioli et al., 2007). Além disso, o patógeno tem sido isolado com certa dificuldade, embora se tenha relatos do fungo no solo, principalmente em plantações de café, e de outros materiais como comida de cão, fezes de gato e de pinguim (Terçarioli et al., 2007; . Silva-Vergara & Martinez, 1998). Um estudo feito com amostras de vários tipos de solo demonstrou que a textura do solo, bem como a sua composição química e a umidade, influenciam no crescimento desses fungos (Terçarioli et al., 2007).

Uma vez inalados, em contato com o tecido do hospedeiro a temperatura de 35°C, os conídios dão origem à forma leveduriforme do fungo, considerada sua forma infectante. Até recentemente, acreditava-se que a PCM era uma doença exclusiva do ser humano, porém, muitos relatos têm sido feitos de infecção por *Pb* em outros animais. No Brasil, há poucos relatos de isolamento do fungo em animais silvestres (Palmeiro et al., 2005; Shikanai-Yasuda et al., 2006; Santos et al., 2003). Por muito tempo, os tatus foram considerados o único animal silvestre do qual se conseguiu isolar o fungo. Recentemente, outros mamíferos silvestres como porcos, guaxinim e grisons têm sido reconhecidos também como hospedeiros para o fungo. Porém, o papel da infecção desses animais na ecoepidemiologia da paracoccidiodomicose no Brasil não está esclarecido (Richini-Pereira et al., 2009).

3.4. Epidemiologia da PCM

3.4.1. Distribuição Mundial

A PCM é uma micose endêmica, característica da América Latina e tem sido ao longo de muitos anos, considerada um problema de saúde pública de muitos países da região, uma vez que é a micose sistêmica de maior. A infecção está presente desde o México (23°N) até a Argentina (34°S), excetuando países como o Chile, Guiana, Guiana Francesa, Suriname, Nicarágua, Belize e várias Ilhas da América Central. Essa distribuição geográfica particular é devido à ecologia do fungo (Palmeiro et al., 2005; Shikanai-Yasuda et al., 2006; Silva-Vergara & Martinez, 1998; D Calle et al., 2000). Casos de PCM não autóctone têm sido relatados em países como EUA, na Europa e Leste da Ásia, porém, em todos os casos havia um histórico de residência em países endêmicos por período longo (Queiroz-Telles et al., 2011).



Figura 3: Distribuição da PCM na América do Sul (Adaptado fonte: Internet)

3.4.2. Distribuição no Brasil

Dentre os países onde a PCM é considerada endêmica, o Brasil é considerado o de maior endemicidade (cerca de 80% dos casos) (Ameen, Talhari & Talhari 2009; Calle et al., 2000). Estima-se que mais de 50% dos habitantes das áreas endêmicas são expostos aos esporos do fungo, mas somente uma minoria desenvolve a doença. (Ameen, Talhari & Talhari 2009) Uma vez que a doença não é de notificação compulsória, não se tem dados precisos sobre a real incidência da micose no país, porém, dados baseados em inquéritos epidemiológicos e série de casos indicam que os estados de maior incidência são Rio de Janeiro, Minas Gerais e principalmente, São Paulo, embora a doença seja distribuída por quase todo o território brasileiro (Shikanai-Yasuda et al., 2006; Travassos & Taborda & Colombo, 2008).

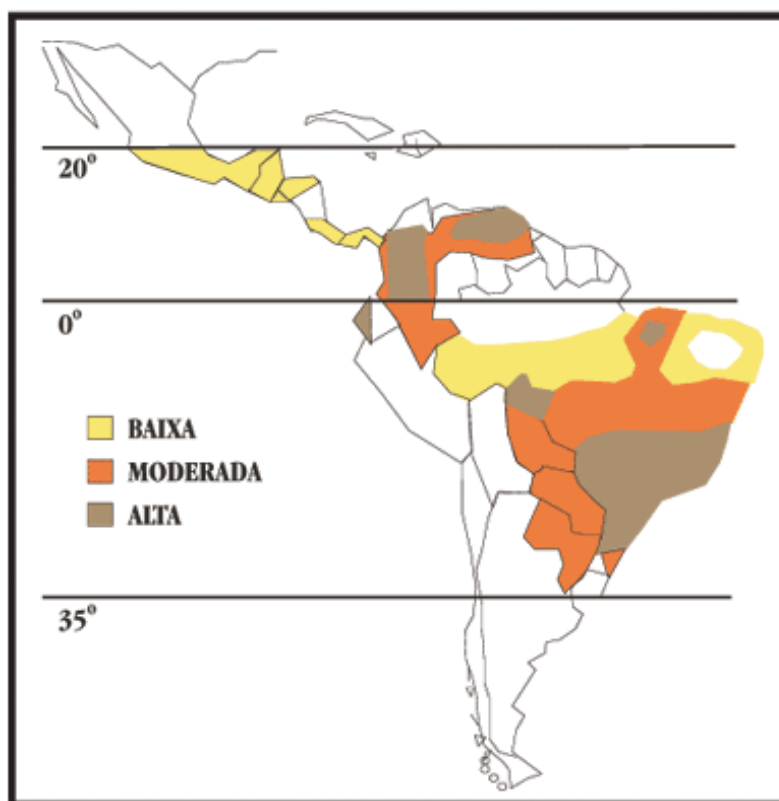


Figura 4: Distribuição da Paracoccidioidomicose no Brasil e em outros países da América Latina (Fonte: Shikanai-Yasuda et al., 2006)

A distribuição do fungo tem sido alterada nas últimas décadas. Anteriormente, a PCM era considerada uma doença rural, porém, hoje, observa-se que a frequência da doença se estendeu também para centros urbanos. Estudos sugerem que isso possa ter acontecido devido ao processo de urbanização intensa, bem como à melhora no diagnóstico da doença, abertura de fronteiras agrícolas com a derrubada de florestas, como a Amazônia, atual fonte endêmica da micose (Palmeiro et al., 2005; Shikanai-Yasuda et al., 2006).

3.4.3. Incidência, prevalência e mortalidade

Estima-se que a incidência de PCM em zonas endêmicas varie de 3 a 4 novos casos/milhão até 1 a 3 novos casos/100 mil habitantes ao ano (Shikanai-Yasuda et al., 2006; Wanke & Aidê, 2009). Informações registradas no Ministério da Saúde atestam que 3.181 casos de mortes por PCM foram registrado no país entre 1980 e 1995, uma taxa de mortalidade de 1,45 casos por milhão de habitantes. No mesmo

estudo, foi apontado pelos autores, que a micose foi a 8ª causa de mortalidade por doença infecciosa predominantemente crônica, ficando a frente da leishmaniose, e a mais alta taxa entre as micoses sistêmicas (Shikanai-Yasuda et al., 2006).

Dados gerais baseados na intradermoreação com paracoccioidina sugerem que a prevalência da PCM seja de 50-75% da população adulta e estima-se que mais de 10 milhões de pessoas que vivem em locais onde a PCM é endêmica, (70% dos casos) em sua maioria trabalhadores rurais, podem ter sido infectados pela inalação de microconídios de *Pb* originados do solo (Pellegrino et al., 2003, Bertini et al., 2006; Travassos & Taborda & Colombo, 2008).

3.4.4. Fatores de Risco: Gêneno, Faixa etária e Fatores Ambientais

A infecção é, principalmente, adquirida nas duas primeiras décadas de vida, com evolução da doença mais comumente encontrada em adultos com faixa etária de 30 a 50 anos, frequentemente associada à reativação do foco endógeno, adquirido nos primeiros anos de vida e, na maioria das vezes, assintomático. Isso pode ocorrer por causas ainda não definidas, mas que levam em consideração fatores inerentes ao fungo, bem como a fatores ligados ao hospedeiro. Um relato de caso feito por Araújo et al. (2009), mostrou que um homem de 43 anos, teve uma recidiva da doença, 25 anos após iniciar o tratamento que havia sido considerado “curado” (Palmeiro et al., 2005; Shikanai-Yasuda et al., 2006; Araújo et al., 2009).

Os homens são mais acometidos pelo *P. brasiliensis* que as mulheres (Palmeiro et al., 2005; Shikanai-Yasuda et al., 2006; Travassos & Taborda & Colombo, 2008). Dados sugerem que a proporção de adultos infectados é de 78 homens para 1 mulher, embora outros dados indiquem 10-15:1 (Grosso et al., 2003; Wanke & Aidê, 2009). Teorias tentam explicar os possíveis motivos para essa diferença. A mais comum se refere ao estilo de vida em que se considera que trabalhadores rurais, mais comumente infectados, são em sua grande maioria, homens em idade produtiva. Entretanto, dados mostram que o β -estradiol, hormônio feminino, é protetor da PCM para o sexo feminino (mas não da infecção do *Pb*), pois foi demonstrado que esse hormônio inibe a transformação do conídio para a forma leveduriforme, crucial para a implantação da doença (Travassos & Taborda & Colombo, 2008). Outro fator de risco para a doença é o tabagismo e o etilismo

crônico, frequentemente associado à micose. Se considerarmos que 32,6% da população adulta do Brasil fuma, sendo 11,2 milhões mulheres e 16,7 milhões homens, isso explica em parte, também, essa diferença. Santos et al. (2003) em um estudo caso-controle encontraram que a chance de adoecer foi 14 vezes maior entre o grupo de fumantes crônicos em relação ao grupo controle, e até 8 anos mais cedo nos pacientes que fumavam 20 ou mais cigarros por dia. Além disso, há evidências de que o tabaco altera a imunidade do indivíduo, tornando-o mais suscetível a doenças como a PCM (Palmeiro et al., 2005; Shikanai-Yasuda et al., 2006).

3.5. Formas Clínicas

Segundo o consenso de paracoccidiodomicose de 2006, a PCM é classificada em forma aguda/subaguda (tipo juvenil) ou forma crônica (tipo adulto) (Shikanai-Yasuda et al., 2006; Wanke & Aidê, 2009; Ameen, Talhari & Talhari 2009).

3.5.1. Forma aguda/subaguda (tipo juvenil)

Essa forma da doença acomete o indivíduo nas 2 primeiras décadas de vida, principalmente entre os 10 e 20 anos de idade, não existindo distinção de incidência entre os sexos (Shikanai-Yasuda et al., 2006; Wanke & Aidê, 2009). Ela é responsável por 3 a 5% dos casos e ocorre em meninos e meninas na mesma proporção. A evolução de infecção por Pb para doença é incomum nessa faixa etária. Sua principal característica é a evolução rápida, em geral mais severa (Palmeiro et al., 2005; Shikanai-Yasuda et al., 2006; Ameen, Talhari & Talhari 2009). Lesões na pele são frequentes, mas em mucosas e nos pulmões não são comuns (Ameen, Talhari & Talhari 2009).

3.5.2. Forma Crônica (tipo adulto)

A forma crônica da PCM corresponde a mais de 90% dos pacientes diagnosticados e tem seu pico de incidência na faixa entre 30 a 60 anos de idade, predominantemente no sexo masculino (Palmeiro et al., 2005; Shikanai-Yasuda et al., 2006; Wanke & Aidê, 2009; Ameen, Talhari & Talhari 2009). Grande parte desses pacientes adquire a doença através de uma reativação do foco quiescente, adquirido muitas vezes há décadas atrás. Por ser uma doença latente, acredita-se que a tendência é aumentar o nº de casos de coinfeção, a medida que aumenta a

prevalência de doenças que causam imunossupressão como é o caso da AIDS, malignidades e terapias multidrogas (Talhari & Talhari 2009).

É uma doença que evolui lentamente e de forma silenciosa. Manifestações pulmonares são frequentes, podendo estar presente em até 90% dos casos, podendo ou não haver outros focos de lesão. Quando restrita a somente à um órgão, a apresentação é denominada unifocal, sendo multifocal quando há lesão em mais de um órgão. Os pulmões podem ser unicamente afetados em até 25% dos casos. Frequentemente a doença se apresenta de forma multifocal, e os principais locais acometidos depois dos pulmões, são mucosas e pele (Palmeiro et al., 2005; Shikanai-Yasuda et al., 2006). Lesões orais estão presentes em mais de 50% destes casos e geralmente, decorrem da contaminação de secreções pulmonares (Talhari & Talhari 2009).

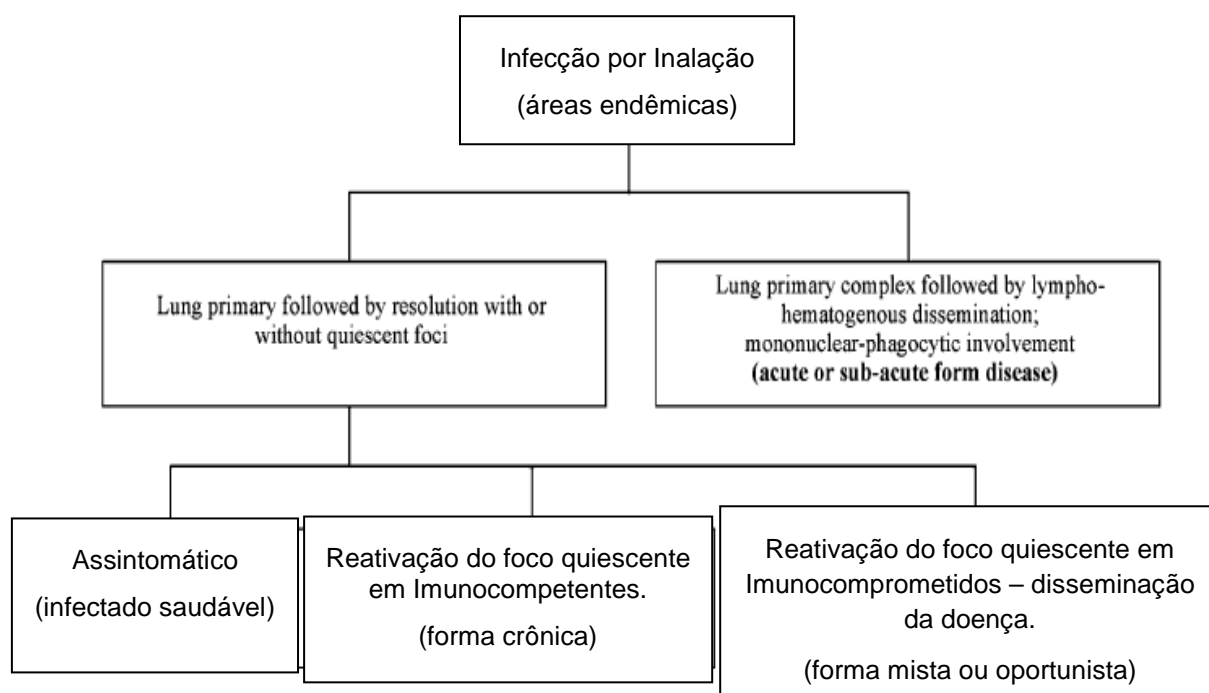


Figura 5: História natural da interação entre *P. brasiliensis* e o homem (Fonte: Adaptado de Benard, 2007)

3.6. Patogênese e Imunidade

A patofisiologia da PCM está longe de ser completamente esclarecida (Grosso et al., 2003). Assim como em outras infecções fúngicas, a paracoccidiodomicose depende da interação entre o fungo e a resposta imunológica do hospedeiro para evoluir para cura espontânea ou disseminar pelo organismo, causando lesões granulomatosas crônicas (Palmeiro et al., 2005; Oliveira et al., 2008; Cavassani et al., 2011). Essa interação tem sido alvo de pesquisas que tentam esclarecer o que torna um indivíduo suscetível ao *P. brasiliensis*, ou mesmo o que leva a reativação de um foco endógeno, tantos anos após a infecção (Sadahiro et al., 2007).

Sabe-se que o controle da infecção se dá pela resposta imune adaptativa do tipo Th1, com envolvimento células T CD₄⁺/CD₈⁺ e principalmente de macrófagos, com produção de citocinas, que tem sido estudada, a fim de auxiliar no entendimento da patogênese da doença (Sadahiro et al., 2007). É aceito que os macrófagos desempenhem um papel central na resistência da PCM, participando do mecanismo inicial da infecção. Estudos microscópicos mostraram que o *P. brasiliensis* é capaz de se reproduzir dentro de macrófagos, embora já se tenha sido relatado que macrófagos ativados por linfócitos têm a capacidade de ingerir e matar o fungo. Apesar de não se entender totalmente, sabe-se que o estudo da interação entre a superfície do fungo e a dos macrófagos é essencial para esclarecer como o fungo invade a célula e escapa dos mecanismos de defesa dessas células (Grosso et al., 2003). A melanina já foi descrita também como fator de virulência, uma vez que consegue aumentar à resistência do fungo a fagocitose pelos macrófagos (Taborda, Silva, Nosanchuk & Travassos, 2008).

Essa organização da resposta celular, chamada de granuloma, permite o controle da replicação do fungo, controlando a doença. Porém, é possível que o fungo permaneça quiescente no interior desses granulomas (Sadahiro et al., 2007).

3.6.1. Citocinas X Th₁/Th₂

Modelos experimentais demonstram que a presença de interferon gama (INF γ) e interleucina dois (IL-2) está relacionada com proteção da doença (Calich et al., 1998). Essa afirmação está de acordo com achados que estabelecem o padrão de resposta Th₁ com o controle da doença, levando a um quadro assintomático ou leve

da doença (Palmeiro et al., 2005; Oliveira et al., 2008; Sadahiro et al., 2007). Isso significa que aqueles pacientes que apresentarem uma resposta imune Th₁ sem alteração, serão capazes de controlar a instalação da PCM (Palmeiro et al., 2005; Sadahiro et al., 2007).

Por outro lado, observa-se que, quando a resposta imune do indivíduo está polarizada para o padrão Th₂, com altos níveis de IL-4, IL-5, IL-10 e TGF-β, há uma progressão da paracoccidiodomicose (Sadahiro et al., 2007; Palmeiro et al., 2005; Benard, 2007).

Recentemente, quimiocinas e citocinas têm sido avaliadas através da análise do RNA mensageiro (RNAm) de pacientes com infecção por paracoccidiodomicose, comparados aos de pacientes com a forma aguda e crônica da doença. Em pacientes com infecção aguda/subaguda se observa uma regulação negativa (“down regulation”) da citocinas Th₁ e uma polarização Th₂. Nos pacientes que apresentavam a forma crônica, havia um misto de células e citocinas Th₁ e Th₂ (Sadahiro et al., 2007; Benard, 2007).

Em estudo feito com células mononucleares de pacientes tratados para PCM, observou-se que o nível de INFγ nos indivíduos com a forma aguda da doença era baixo, e havia o predomínio de citocinas Th₂ e também, um aumento do nível de anticorpos, não protetores anti-Pb (Sadahiro et al., 2007). O nível desses anticorpos diminuiu à medida que se instituiu a terapia e o sistema imune se reestaura. Estudos em modelos animais comprovam que o INFγ desempenha um papel crucial na resistência ao *P. brasiliensis* e, juntamente com os macrófagos, tem um efeito fungicida (Sadahiro et al., 2007).

Em outro estudo, adjuvantes de respostas Th₁ e Th₂ foram utilizadas em camundongos BALB-c infectados com *P. brasiliensis*. Foi observado que aqueles animais estimulados com adjuvantes Th₁ apresentaram granulomas compactos no pulmão, enquanto o outro grupo apresentava granulomas epiteliais, com linfócitos/monócitos e muitas leveduras viáveis e não viáveis na lesão, bem como altos níveis de IL-4, IL-5, IL-10, TNF-α e TGF-β e duas vezes mais antígenos circulantes (Oliveira et al., 2008).

Altos níveis de Il-18, uma citocina próinflamatória da superfamília da IL-1, foram associados a pacientes com a forma juvenil da doença, quando comparados aos indivíduos com a forma crônica e com grupo controle. Il-18, juntamente com o TNF pode ser útil como marcador da atividade e severidade da PCM e também um importante modulador da resposta adaptativa do hospedeiro (Corvino et al., 2006). O mesmo tem sido observado com as chamadas células T reguladoras (Treg). Altos níveis dessa célula têm sido observados em indivíduos com PCM (forma juvenil ou crônica), quando comparado a indivíduos saudáveis, embora a contagem das Treg diminua após o tratamento com antifúngicos (Ferreira et al., 2010).

Devido ao importante papel que a resposta imune do hospedeiro tem frente a infecção da PCM, pesquisadores tem tentado esclarecer como essa interação entre fungo/hospedeiro se dá, para no futuro promover tratamentos que utilizem adjuvantes imunológicos, com capacidade de estimular a resposta Th₁, chamado “terapia imunoestimulatória” (Palmeiro et al., 2005; Oliveira et al., 2008).

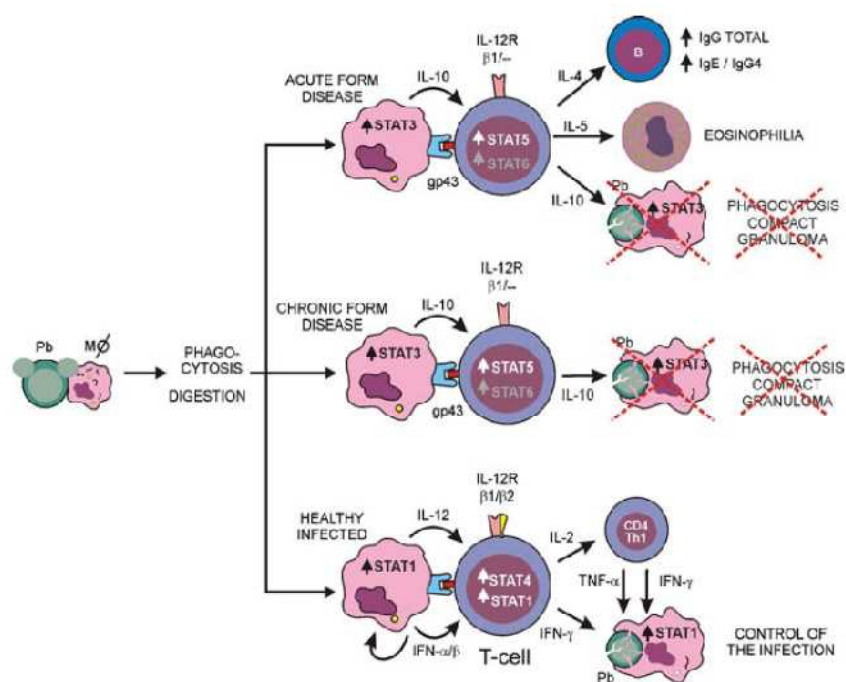


Figura 6: resposta imunológica nas formas clínicas da paracoccidioidomicose. Pb- *P. brasiliensis*, Mφ - macrófago; IL – interleucina; IL2-R – receptor de interleucina, β1 e β – subunidades de IL2-R; INF – interferon; TNF – fator de necrose tumoral; STAT – sinal de tradução e ativação de transcrição; Ig - imunoglobulina. (Fonte: adaptado de Benard, 2007).

3.6.2. Componentes Antigênicos do fungo (gp43 e gp70 e outros)

O principal componente antigênico do *P. brasiliensis* é a glicoproteína extracelular de peso molecular de 43 kilodaltons (gp43), considerado o principal fator de virulência do fungo, é também o principal antígeno para diagnóstico sorológico da PCM (Hogan & Klein & Levitz, 1996; Cavassani et al., 2011). Por ser o principal exoantígeno secretado pelo fungo, esse componente foi encontrado no soro de 100% dos pacientes com PCM, testados com imunoblot (Bertini et al., 2006; Vidal et al., 2004; Hogan & Klein & Levitz, 1996). Há hipóteses de que uma de suas funções seja a de uma laminina que adere a levedura à membrana da célula hospedeira, o que, acredita-se, ser responsável pela entrada do fungo na célula humana na infecção primária (Hogan & Klein & Levitz, 1996; Cavassani et al., 2011). Outras ações como inibição da fagocitose, do NO e do H₂O₂ produzido pelos macrófagos, tem sido relatadas (Cavassani et al., 2011).

A gp43 é o principal antígeno para o diagnóstico imunológico, pois se considera que os anticorpos da maioria dos pacientes diagnosticados com PCM são dirigidos contra esse componente espécie-específico do *P. brasiliensis* (Vidal et al., 2004). Ele é secretado pelas leveduras na fase de infecção (Silva et al., 2004a). Diferentes isoformas do gp43 tem sido relatadas, com variação entre distintos isolados do fungo (Vidal et al., 2004; Camargo et al., 2008).

A gp70 é também uma importante glicoproteína do *P. brasiliensis*, apresenta apenas uma isoforma, e é encontrada principalmente dentro da célula fúngica. Acredita-se que a gp70 não é espécie-específica, uma vez que pacientes infectados com *Histoplasma capsulatum* são reativos à gp70, mas não à gp43 (Grosso et al., 2003). Estudos comprovam que 96% dos pacientes com PCM tem anticorpos anti-gp70 (Grosso et al., 2003; Vidal et al., 2004). Um relato de caso apresentou um paciente de 34 anos, com sorodiagnóstico negativo (IDD e CIE), que, apesar de não ter anticorpos anti-gp43, possuía anti-gp70. Foi recentemente sugerido que essa gp70 facilita a estabilização e progressão da doença em modelos experimentais de infecção primária (Vidal et al., 2004). Esse antígeno pode ser detectado na urina de pacientes em fase aguda da doença (Silvia et al., 2004b).

Além das gp43 e gp70, outras proteínas, glicoproteínas e glicosíngolipídios (GSL) presentes no *P. brasiliensis* são antigênicos em humanos, e sua frequência está relacionada a espécie, estágio de diferenciação e desenvolvimento do fungo. Foi comprovado em modelos experimentais que esses dois antígenos são capazes de induzir a proliferação de linfócitos de pacientes com PCM (Grosso et al., 2003).

A tentativa é de se identificar possíveis novos alvos de marcadores da doença. Um estudo mostrou que, dentre os dois GSL (Pb-1 e Pb-2), soros de pacientes com PCM reagiram fortemente ao Pb-1, molécula que compõe 90-95% dos GSL da levedura de Pb, enquanto Pb-2 compõe apenas 5-10% e não é considerado imunogênico (Bertini et al., 2006).

3.6.3. Produção de Anticorpos

Resposta Th₂ com grande ativação de linfócitos B, associada a altos níveis de anticorpos (Ac) está associada com um mau prognóstico da PCM. Isso porque, além de indicar uma polarização na resposta imune que prejudica o controle da doença, estes Ac não são protetores, isto é, não tem ação neutralizante sob o *P. brasiliensis* (Unterkircher et al., 2004; Shikanai-Yasuda et al., 2006).

Alterações como hipergamaglobulinemia, hiperexpressão de IgE e eosinofilia também aparecem nesse caso. Um estudo feito por Unterkircher et al. (2004) com pacientes com a forma juvenil e a forma crônica da doença, mostrou que os níveis de anticorpos do tipo IgG, particularmente o isotipo IgG1, foi consideravelmente maior nesses pacientes, quando comparados indivíduos saudáveis. Os mesmos autores afirmaram também que esses níveis de anticorpos variam de acordo com a forma clínica e talvez com a severidade da doença: na forma crônica, foram relatados títulos de anticorpos específicos mais altos que Ac naturais, dentre estes, o tipo IgG4 foi encontrado também nesses pacientes, o que indica exposição prolongada ao antígeno. Neves et al. (2003) demonstraram diferenças no perfil dos isotipos de anticorpos de pacientes com formas clínicas variadas. Pacientes com forma adulta unifocal (pulmonar) apresentavam predominância de IgG2, enquanto indivíduos com a forma juvenil exibiam perfil de IgG4, além de IgG2 e na forma adulta multifocal a IgG1. Isso mostra que a forma clínica está diretamente ligada ao

perfil de resposta humoral. Uma das hipóteses do trabalho é que o IgG2 é anticorpo dirigido contra epítomos de carboidratos, uma vez que, quando esses são tratados com metaperiodato de sódio (substância que se liga a esses epítomos), há uma queda na avidade desses anticorpos que se reflete numa diminuição da absorbância no teste do ELISA.

Uma ferramenta que pode ser utilizada para diferenciar essas duas formas clínicas através do estudo de Ac é realizar teste de avidade, como é feito em outras doenças, como a toxoplasmose e dengue. Embora não se tenha um protocolo ainda definido, Yoshida et al. (2009) têm publicado trabalhos nesse campo da pesquisa. Eles conseguiram identificar Ac de moderada-alta avidade nos soros de pacientes que apresentavam a forma crônica da doença, enquanto nos soros da forma aguda, predominava os Ac de baixa avidade.

Analisando esses Ac na pós terapêutica, observou-se que o aumento dos níveis de Ac com alta avidade foi encontrado em pacientes que tinham a forma crônica multifocal, o que não foi demonstrado naqueles indivíduos que apresentavam a forma aguda ou crônica unifocal, talvez devido ao pequeno período de duração da doença, ou mesmo por uma limitação no nº de amostras do estudo. A associação do aumento de Ac de alta avidade e a resposta clínica favorável ao tratamento da forma crônica pode ser uma ferramenta útil para os médicos (Yoshida et al., 2009).

3.7. Diagnóstico Laboratorial

3.7.1. Padrão-Ouro

O diagnóstico considerado por muitos autores padrão-ouro para a PCM é o encontro de células fúngicas sugestivas de *Paracoccidioides brasiliensis* no Exame Microscópico Direto (EMD) de escarro ou outro espécime clínico (raspado de lesão, aspirado de linfonodos) ou fragmento de biopsia (Palmeiro et al., 2005; Shikanai-Yasuda et al., 2006; Wanke & Aidê, 2009; Ameen, Talhari & Talhari 2009).

A cultura em agar Sabouraud também é recomendada, porém, o crescimento do fungo é lento e pode levar até um mês para ser observado (Palmeiro et al., 2005; Ameen, Talhari & Talhari 2009).

3.7.2. Sorologia

Nos anos 50, Fava Neto foi o primeiro a padronizar o teste fixação de complemento em tubo de precipitação para diagnóstico e acompanhamento de pacientes com PCM. Depois, Restrepo introduziu a imunodifusão dupla (IDD), logo após, a contraimunoeletroforese (CIE) e a imunofluorescência indireta (IFI) também foram introduzidos. Mais recentemente técnicas de ELISA (ensaio imunoenzimático) e Imunobloting também têm sido aplicadas (Del Negro et al., 1999).

Os testes sorológicos mais utilizados no diagnóstico e acompanhamento dos pacientes de PCM são: fixação do complemento (CF), contraimunoeletroforese (CIE), imunofluorescência, radioimunoensaio, inibição passiva da hemoaglutinação, imunodifusão dupla (IDD), ensaio imunoenzimático (ELISA e MELISA), dot blot, Western Blot e mais recentemente ELISA de competição (Camargo, 2007).

Diagnóstico sorológico é utilizado como uma importante ferramenta para os médicos. Apesar de não ser conclusivo, ele se mostra útil quando se há suspeita da doença e não há observação do *P. brasiliensis* no EDM, isso porque pacientes crônicos podem apresentar uma quantidade reduzida do fungo nas amostras (Queiroz-Telles et al., 2011). Além disso, a sorologia pode informar ao médico sobre o prognóstico da doença, auxiliando na avaliação da evolução do tratamento (Camargo et al., 2008; Camargo et al., 1994).

Reações falso-negativas (FN) podem ser observadas em pacientes com infecção pulmonar intensa e imunossupressão (Camargo et al., 2008). Um relato de caso de um indivíduo de 34 anos com infecção ativa mostrou que a IDD e a CIE foram negativas e, embora casos como esse sejam raros, o autor atribui o fato à baixa sensibilidade do testes. Reações FN podem ocorrer também quando preparações do antígeno são pobres em gp43 (Vidal et al., 2004).

Embora a gp43 seja considerado o principal exoantígeno da *P. brasiliensis*, há relatos de pacientes sorologicamente negativos para essa substância, enquanto outros indivíduos exibem níveis persistentes desses anticorpos específicos ao longo do curso da PCM (Bertini et al., 2006).

Efeito prozona também pode ocasionar reações FN e ocorre quando os títulos de anticorpos se encontram muito altos, impossibilitando a ligação antígeno X

anticorpo. Embora sejam raros, casos de efeito prozona podem acontecer no diagnóstico da PCM, quando não se dilui o soro durante a realização do teste.

É recomendável que o diagnóstico sorológico seja realizado com pelo menos dois testes, com titulação dos anticorpos, o que se torna útil no seguimento dos pacientes durante o tratamento (Vidal et al., 2004).

3.7.2.1. Preparação do antígeno para a realização dos testes

A produção do antígeno a ser utilizado nos testes imunológicos é o primeiro passo para a realização de um diagnóstico confiável. Em 1986, Puccia et. al. descreveram a identificação de 2 componentes exocelulares separados por cromatografia de afinidade, que chamaram de E₁ e E₂ e demonstraram que a fração E₂ era mais específica para *P. brasiliensis*, mais tarde esta seria identificada como a gp43. Protocolos para obtenção de antígenos são sugeridos na literatura e variam muito, como o uso de sobrenadante de culturas (antígeno bruto filtrado), de frações polissacarídicas, e de antígenos purificados, modificados ou recombinantes (Travassos & Taborda & Colombo, 2008). Porém, muitos laboratórios que trabalham na área não padronizam o preparo desses antígenos, o que faz com que haja diferenças interlaboratórios de protocolos, como variações em relação a meio de cultura, tempo de incubação, temperatura, tamanho inicial do inóculo, dentre outros, podendo comprometer a qualidade do resultado do teste. Puccia et. al. (1986) afirmaram que, por eletroforese, é possível se identificar a proporção dos componentes da cultura, dessas diferentes preparações que variam com as condições de incubação. A necessidade de se produzir antígenos de acordo com esses padrões muitas vezes é suplantada pela limitação tecnológica e financeira do laboratório. Pensando nisso, esforços têm sido feitos para simplificar o método (Camargo, 2007).

A utilização do antígeno bruto é ampla por ser de fácil obtenção, apresenta uma boa especificidade, mas com a desvantagem de possuir componentes que são comuns a outros fungos, o que pode explicar reações cruzadas entre soros de pacientes com PCM e outras micoses como histoplasmose ou lobomicose (doença de Jorge Lobo) (Berzaghi et al., 2004; Mendes-Giannini et. al., 1984).

Já foi provado que podem ocorrer instabilidades na síntese de componentes antigênicos do mesmo isolado de *P. brasiliensis* sob condições de incubação. Quando se usam isolados específicos para produzir antígenos para a realização de testes como a IDD, a cultura poderá ter gp43, porém, isso não é reprodutível e algumas vezes essa preparação pode não conter esse antígeno. Berzaghi et al. (2004) apresentaram a hipótese de que a cultura é composta por diferentes clones e que por alguma razão ainda não esclarecida, somente alguns secretam gp43. Foi demonstrado através da análise da secreção de gp43 de dois diferentes métodos de cultura que, a cultura de isolados *P. brasiliensis* diminuía a capacidade de excretar essa molécula a partir da 3ª subcultura. Uma hipótese para isso é de que esses isolados são infectantes para o homem quando estão na natureza e que, conservados em coleções, são compostos de células policlonais. Isso implica que, quando se utiliza esses isolados no laboratório, o fungo apresenta informações genéticas que podem ser diferentes na sua biologia, antigenemia e propriedades bioquímicas. Testando 90 clones de Pb, eles observaram que todos secretavam a gp43, porém, em concentrações diferentes (Berzaghi et al., 2004).

Dados da literatura indicam também que tratamentos com esses antígenos brutos, como a deglicosilação, podem eliminar esse problema de reação cruzada entre essas doenças, como demonstrado por Puccia et. al., 1991 (Bertini et al., 2006). A purificação de gp43 pode ser feita a partir do sobrenadante da cultura, e essa técnica foi facilitada com a produção de anticorpos monoclonais e tem sido utilizada em testes sorológicos (Camargo et al., 2008).

3.7.2.2. Imunodifusão Dupla (IDD)

Nos últimos anos, a imunodifusão dupla (IDD) tem sido a primeira escolha para diagnóstico inicial de casos suspeitos de PCM, uma vez que apresenta simplicidade na execução, baixo custo, além de alta sensibilidade e especificidade, que variam de 65 a 100%, dependendo do antígeno utilizado (Silva et al., 2004a; Camargo et al., 2008; Camargo, 2007).

Pesquisadores de todo o Brasil testaram o Ag7 (preparação de antígeno rica em gp43, padronizada em 1988) e mostraram uma sensibilidade de 84,3% e especificidade de 98,9%, comprovando que as condições em que esse antígeno é

preparado pode ser uma importante ferramenta no diagnóstico da PCM, embora reações falso-negativas possam ocorrer em 2-3% (Camargo, 2007).

Del Negro et al., em 1991 calcularam a sensibilidade, especificidade e eficiência da IDD de grupos de pacientes (entre indivíduos saudáveis e doentes) e chegaram a uma sensibilidade de 91,3% e especificidade de 100%. Comparando com testes como a fixação do complemento, a IDD se mostrou superior em relação a sensibilidade e especificidade.

Já em 1999, Del Negro et al. encontraram uma sensibilidade de 95,3% no IDD, sendo somente 2 falso-negativos, e esses pacientes apresentavam lesões localizadas.

Diferentes protocolos para preparações de *P. brasiliensis* podem ser utilizados no teste (antígeno bruto, gp43 purificado, gp43 recombinante), porém, todos devem possuir em comum o exoantígeno gp43, responsável por especificidade e sensibilidade de mais de 85% nos testes, em geral (Camargo et al., 2008).

Camargo et al. (1988) analisaram a reatividade de soros de pacientes com PCM frente a antígenos obtidos de diferentes períodos de incubação (após 7, 10, 15, 20, 25 e 30 dias) e mostraram uma maior reatividade dos soros em antígenos de 20 a 25 dias. O pico de concentração da gp43 era de 15 a 20 dias de incubação, com diminuição significativa até os 30 dias. No período de 7 a 10 dias houve um pico de proteínas de 94 kDa, mas que não era detectado nos dias subsequentes. Uma hipótese para isso foi a presença de uma atividade proteolítica no período de incubação da cultura, em que a gp43 se mantinha por mais tempo, provando sua estabilidade frente as outras glicoproteínas.

Gano & Restrepo (1987), analisando a especificidade e sensibilidade da IDD (utilizando a *P. brasiliensis* B339) em grupos de pacientes comprovadamente com PCM, saudáveis e outras micoses profundas acharam uma especificidade de 100% e sensibilidade de 88% no momento do diagnóstico e afirmaram que a terapia causava uma perda de sensibilidade no teste. O valor preditivo positivo foi de 100% em relação aos pacientes saudáveis e com outras doenças. Camargo et al.(1988) citaram uma sensibilidade de 95,6%.

Embora seja um teste de sensibilidade aceitável, a IDD apresenta desvantagens: apresenta reações cruzadas com outras infecções fúngicas e resultados falso-

negativos atribuídos à presença de IgG2 de baixa avidade. Além disso, muitas vezes resultados da IDD não se correlacionam com a clínica, por exemplo, títulos elevados (1:64) mesmo em pacientes considerados tratados e com cura clínica. Por outro lado, embora títulos baixos (1:2 e 1:4) sejam mais frequentemente relatados em pacientes assintomáticos, esses baixos títulos podem estar presentes em pacientes com sintomas da doença (Silva et al., 2004a).

Já foi demonstrado também que pacientes com PCM na forma adulta unifocal podem apresentar produção baixa de anticorpos (principalmente isotipo IgG1), podendo levar a IDD falso-negativa. Isso indica que a apresentação da forma clínica pode influenciar no resultado do diagnóstico sorológico (Neves et al., 2003). Foi observado ainda que pacientes com PCM adulta unifocal, com IDD negativa mas alta concentração de IgG2, apresentaram reação sorológica positiva no ELISA. Uma hipótese para isso é que os epítomos de carboidrato (alvo principal desse isotipo de anticorpo) fica mais exposto em fase sólida (ELISA), uma vez que na forma solúvel, esses epítomos não estão disponíveis para ligação com anticorpos (Neves et al., 2003).

3.7.2.3.ELISA

Ensaio Imunoenzimático (ELISA) são testes muito utilizados, tanto em pesquisa científica como na medicina clínica. São excelentes por apresentarem resultados reprodutivos e com alta sensibilidade. Seu princípio básico é a detecção de anticorpos reagentes ou a detecção do antígeno circulante no soro do paciente. Os resultados podem ser quantitativos ou apenas qualitativos (Berzaghi et al., 2004).

O ELISA para detecção de anticorpos anti-PCM é o mais utilizado entre os laboratórios do Brasil e foi primeiramente descrito por Pons et. al. (1972) e desde então tem sido usado como base para muitas outras publicações sobre detecção de anticorpos nesses pacientes.

Economia e tempo de execução reduzido são as principais vantagens em sua utilização na rotina dos laboratórios. Porém, por ser altamente sensível, o número de reações cruzadas com outras doenças como a Histoplasmoze pode ser uma limitação (Albuquerque et al., 2004). Assim, muitos estudos têm sido desenvolvidos

para tentar diminuir ou eliminar esse problema. A saída parece estar no antígeno utilizado no teste, que pode ser antígeno bruto, parcialmente purificado ou gp43 purificada (Berzaghi et al., 2004).

Mendes-Giannini et. al. (1984), observando que os vários antígenos até então estudados apresentavam especificidade baixa, com reatividade para soros de outras micoses, descreveram uma técnica em que o filtrado da cultura foi usado e o soro do paciente foi previamente absorvido por antígenos de *H. capsulatum*.

Outro trabalho foi sugerido por McGowan et. al. (1985) em que os autores testaram antígenos citoplasmáticos de *P. brasiliensis* e viram que a sensibilidade passou de 87% para 97% e a especificidade foi de 99% e 100%, quando comparadas ao uso de antígeno bruto nos testes de ELISA e IDD, respectivamente. Também em 1985, Ferreira-da-Cruz et al., padronizaram a produção de antígenos de *P. brasiliensis*, *H. capsulatum* e *A. fumigatus* e obtiveram sensibilidade de 100% para PCM, utilizando as técnicas de IDD e contraímunoeletroforese.

Taborda & Camargo (1993) realizaram um “Dot Immunobinding Assay”, um tipo de imunoenensaio em que se utiliza papel de nitrocelulose nos poços da placa de ELISA para a fixação do antígeno, que neste trabalho utilizaram gp43 purificado pela técnica da cromatografia de afinidade. A sensibilidade foi de 100% e apenas 4,3% de todos os casos de pacientes que não tinham PCM (entre controles saudáveis e positivos para outras doenças) tiveram reatividade no teste. Porém, quando se tratava previamente essa gp43 purificada com metaperiodato de Sódio, a especificidade do teste subia para 100%. A conclusão do estudo foi que este teste tem uma utilidade maior quando se dispõe de uma quantidade reduzida de antígeno para a realização do teste, além de obter resultados de fácil visualização.

Del Negro et al. (1999), avaliando o desempenho de testes sorológicos utilizados no diagnóstico e acompanhamento de pacientes de forma aguda e crônica (unifocal e multifocal) de PCM, chegaram a uma sensibilidade de 100% no ELISA, porém, com várias reações cruzadas com soros de outras doenças como histoplasmose e lobomicose. Os autores constataram também que os valores de desvio optico (OD) a 490nm foram significativamente menores naqueles pacientes que apresentavam a forma crônica unifocal da doença, comparados às formas crônica multifocal e também à forma juvenil. Outra importante observação dos autores foi a capacidade

do ELISA de distinguir, por meio do nível de anticorpo, as formas crônicas (unifocal e multifocal) da forma aguda.

Um estudo desenvolvido por Albuquerque et al. (2004) introduziu variações no teste do ELISA a fim de reduzir as reações cruzadas. Gp43 foi tratada com metaperiodado de Sódio e em seguida, soro de pacientes com PCM foram absorvidos com antígenos de *H. capsulatum*, e de *C. albicans*, o que, segundo os autores, elimina anticorpos cruzados. Depois, o soro foi diluído com galactose para eliminar anticorpos anti-galactose e principalmente epitopos de *P. brasiliensis* em comum com *H. capsulatum*. Combinando essas técnicas já padronizadas pela literatura, e, apesar de terem obtido uma melhor especificidade, os autores notaram que essa melhora nem sempre ocorria, isto é, nem sempre observavam uma boa diferenciação entre soros homólogos e soros heterólogos, o que os levou a concluir que outros fatores, ligados a características individuais do soro de cada paciente (o isolado de *P. brasiliensis* responsável pela doença ou a resposta imune contra esse isolado, por exemplo) podem influenciar na reação.

Marques-da-Silva et al. (2006) utilizaram IDD com antígeno bruto para a detecção de anticorpos no Lavado Broncoalveolar (LBA) de pacientes com PCM encontraram positividade em apenas 9 pacientes dos 27 pacientes estudados. Quando analisados os soros desses mesmos 27 indivíduos por ELISA, verificaram uma positividade de 85,18% e uma especificidade de 100%, com títulos entre 1:50 a 1:400.

3.7.2.4 Detecção de antígeno

Ausência de anticorpos anti-gp43 ou títulos baixos ao longo do curso da doença, dificulta o uso do sorodiagnóstico também para o estabelecimento da cura do paciente. Pensando nisso, pesquisadores têm tentado aprimorar técnicas que detectem, ao invés do Ac, o antígeno circulante no soro do paciente durante o tratamento. Tem-se utilizado a gp43 como marcador da doença, uma vez que quase todos os soros de pacientes com PCM possuem esse antígenos circulante. A detecção pode ser feita pelo Western Blot, que pode detectar também a gp70. Observou-se com esta técnica que a gp43 circulante no soro começava a desaparecer no 10^o mês de tratamento, tornando-se indetectável após 2 anos,

sugerindo que a antigenemia pode ser uma importante ferramenta para o acompanhamento dos pacientes em tratamento (Silva et al., 2004a).

A detecção de antígenos nos líquidos corporais (soro, lavado broncoalveolar-LBA) pode ser muito útil em casos de PCM invasiva e pode ser uma alternativa no diagnóstico da PCM (Marques-da-Silva et al., 2006). Apesar de amplamente utilizados, os testes voltados para a pesquisa de anticorpos no soro dos pacientes têm sido questionados como ferramenta de acompanhamento durante o tratamento por não apresentarem, algumas vezes, correlação com a clínica do paciente. Por isso, técnicas voltadas para a detecção de antígeno no soro do paciente pode ser mais promissoras (Silva et al., 2004a).

Outros tipos de ELISA também podem ser usados, não só na determinação de anticorpos no soro do paciente, como também podem auxiliar na detecção de antígenos do *P. brasiliensis*. Freitas-da-Silva & Roche-Barreira (1991) utilizaram **ELISA de captura** para determinar a antigenemia em pacientes com PCM. Em 66,3% dos soros não foi detectada a presença do antígeno. Essa baixa sensibilidade pode ser devido a características individuais da doença ou instituição do tratamento ou ainda a formação de complexo imune que elimina epitopos livres não permitindo a detecção pelo teste. Porém, se observou que esse teste pode ser útil para se fazer correlação com a clínica, uma vez que eles observaram que, com a introdução do tratamento, havia uma queda brusca dos antígenos circulantes no soro do paciente, correlação que muitas vezes não se observa com os anticorpos. Silva et al. (2004a), utilizando a mesma técnica de ELISA de captura observaram que a gp43 começou a desaparecer da circulação 10 meses após início do tratamento e com 2 anos não foi mais detectada nos 23 pacientes com PCM analisados no estudo. Gómez et al. (1997) realizaram um estudo no mesmo formato e chegaram a uma sensibilidade de 80,4%, com reação cruzada com soro heterólogo em 39,6%.

Há relatos de que uma fração de alta massa molecular também pode ser detectada em pacientes com PCM, pelo método de ELISA de captura. A vantagem é que essa fração do antígeno é comum em pacientes crônicos, o que não ocorre com a gp43, que é mais abundante nos pacientes com a forma aguda da doença (Fredrich et al., 2010).

3.8. Paracoccidioidomicosis e a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

A Organização Mundial de Saúde estimou que em 2002, existiam mais de 1.500.000 indivíduos portadores do vírus HIV, na América Latina. Devido à prevalência relativamente elevada da paracoccidioidomicose no Brasil, é de se esperar um número razoável de casos de co-infecção PCM/AIDS. A PCM é a quarta micose sistêmica mais comum entre os pacientes com AIDS (Belissimo-Rodrigues et al., 2010). Porém, pouco mais de uma centena de casos de PCM foram relatados em associação com a AIDS. Esses pacientes apresentam particularidades em relação aos indivíduos imunocompetentes. Em geral, os pacientes imunossuprimidos apresentam uma reativação do foco quiescente, o que para outros pacientes, resultaria em um quadro clínico característico da forma crônica da doença. Porém, na maior parte das vezes, esse quadro é caracterizado por infecções disseminadas, características de infecção aguda (Benard, 2007). Alguns autores chamam de forma mista (Shikanai-Yasuda et al., 2006; Benard, 2007). Isso leva a concluir que os aspectos abordados para se classificar em forma aguda/subaguda ou crônica se aplica a indivíduos imunocompetentes, não podendo ser extrapolados aos pacientes PCM/AIDS.

Godoy et. al. (2006), relataram um caso de co-infecção que foi diagnosticada *post-mortem*, e citaram que casos como este podem ser subdiagnosticados e subestimados em sua frequência, embora a análise de série de necrópsias em pacientes imunossuprimidos, em áreas endêmicas para o fungo, não confirmem essa suposição. Grande parte dos indivíduos co-infectados apresenta níveis de linfócito TCD₄⁺ menores que 200 células/mL e os anticorpos anti-Pb não estão presentes em 40% dos casos, o que pode comprometer o diagnóstico sorológico desses pacientes (Shikanai-Yasuda et al., 2006; Godoy et al., 2005).

Pacientes co-infectados com HIV exibem particularidades no diagnóstico sorológico. Uma significativa proporção de resultados falso negativos nesses testes tem sido observada (Shikanai-Yasuda et al., 2006). Yeo & Wong (2002) citaram que testes sorológicos não são importantes em paciente com AIDS, uma vez que a resposta dos anticorpos é de difícil detecção. Apesar disso, Belissimo-Rodrigues et.al (2010) compararam diferentes técnicas sorológicas em pacientes co-infectados e em pacientes não co-infectados por PCM/AIDS, mostrando que resultados falso-

negativos são realmente mais comuns em pacientes co-infectados com HIV/AIDS, correspondendo a 1/3 das amostras, quando se utilizou a técnica da imunodifusão. Outros estudos citam porcentagens de 33% até 66% de falso-negativos. O uso de duas técnicas, ELISA combinada com contraímunoelctroforese ou imunodifusão dupla pode aumentar para 100% a detecção dos soros positivos (Belissimo-Rodrigues et al., 2010). Além disso, a comparação de título de anticorpo entre esses dois grupos de pacientes mostra que a os co-infectados exibem títulos menores no soro. Existem outros fatores que podem contribuir para o baixo nível de anticorpos nesse grupo, como a rápida progressão da doença em pacientes infectados pelo HIV. Entretanto, nestes pacientes, a PCM pode ser uma consequência de uma reativação de foco primário de infecção, adquirido anos atrás (Godoy et al., 2005)

4. METODOLOGIA

4.1. Casuística

Foi realizado um estudo descritivo, retrospectivo / prospectivo de 145 pacientes entre casos suspeitos, casos confirmados ou doadores controle atendidos nos Ambulatórios do Hospital Universitário Cassiano Antonio de Moraes (HUCAM), encaminhados ao Laboratório de Micologia Clínica do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), no período de janeiro de 2005 a dezembro de 2010.

4.2. Amostras Clínicas

A principal amostra clínica analisada foi o soro, no período de janeiro de 2005 a dezembro de 2010. Quando solicitadas, outras amostras clínicas (como escarro, raspado de lesão) eram também usadas. Amostras como biópsia, punção ganglionar, LBA, etc foram obtidas por médicos acompanhando os casos.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa/CCS/UFES em 2009 e os pacientes foram dispensados da assinatura do termo de consentimento para a realização dos exames por se tratar de uma rotina para diagnóstico laboratorial.

4.3. Definição dos Grupos de pacientes

GRUPO I (83 pacientes e 142 soros)

Pacientes encaminhados ao Laboratório de Micologia e que tiveram diagnóstico laboratorial de PMC confirmado ou para fins de prognóstico (acompanhamento do tratamento) da PCM.

Dentro deste grupo, foi feita uma subdivisão segundo o critério do título de anticorpos no teste da Imunodifusão. Para pacientes com soros repetidos durante o período, foi considerado somente o primeiro título apresentado no banco de dados.

IDD^{neg} – amostras de pacientes com PCM mas com IDD negativa, segundo critérios do teste.

IDD^{baixo} – amostras de pacientes com PCM comprovada, com títulos na IDD de 1:1 até 1:8.

IDD^{alto} – amostras de pacientes com PCM comprovada, com títulos na IDD de 1:16 até 1:512.

Para o ELISA, foi feita uma subdivisão parecida, segundo o critério do título de anticorpos no teste da imunodifusão.

ELISA^{neg} – amostras de pacientes com PCM mas com ELISA negativo, segundo critérios do teste.

ELISA^{baixo} – amostras de pacientes com PCM comprovada, com títulos na ELISA de 1:50 até 1:400.

ELISA^{alto} - amostras de pacientes com PCM comprovada, com títulos na IDD de 1:800 até 1:51200.

Dentro desse grupo foram analisados também pacientes que, durante o período do estudo, foram acompanhados através da sorologia durante o tratamento, com pelo menos 3 soros consecutivos. Foram sorteados aleatoriamente 11 pacientes (41 soros), entre os 28 pacientes que apresentavam esses critérios.

GRUPO II (n=49)

Pacientes atendidos no HUCAM que residem nas mesmas regiões dos pacientes do grupo I, pareados por gênero e faixa etária, sem histórico de doenças infecciosas, com resultados de IDD e ELISA negativos para PCM.

GRUPO III (n=13)

Pacientes encaminhados ao Laboratório de Micologia do HUCAM entre 2005 a 2010 para diagnóstico de outras micoses pulmonares. Apresentaram sorologia positiva para Histoplasmose (11 amostras) e Aspergilose (2 amostras) e sorologia negativa para PCM.

4.4. Processamento das amostras

Lavado e aspirado Broncoalveolar, Líquido Cefalorraquidiano

Recebida a amostra, realizou-se primeiro sua centrifugação por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi usada para EMD e cultura.

Escarro

Ao todo são requeridas três amostras do paciente, sendo coletadas em dias consecutivos, após rigorosa higienização bucal e acondicionamento em frasco estéril. Após o recebimento da amostra, esta foi analisada para verificar sua viabilidade. Amostra sem material purulento foi descartada, prosseguindo com a petição de nova coleta.

Após o recebimento da amostra de escarro, realizou-se primeiro a cultura, tomando-se o cuidado de selecionar a parte purulenta do material. Após a retirada de material para cultura, adicionou-se ao frasco com a amostra, solução de KOH 15% e incubou-se a 37°C por 24 horas. Decorrido esse período a amostra foi centrifugada por 10 minutos. Descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi usado para EMD.

Biópsias

O material de biópsia, ao chegar ao laboratório, foi fragmentado com lâmina de bisturi. Para a observação microscópica direta, os fragmentos devem apresentar espessura razoável, a fim de que sua espessura não prejudique a transiluminação. Os fragmentos de biópsia foram usados em preparação microscópica para EMD.

Pus, Secreções e Aspirado de medula óssea

Recebida a amostra, foi realizado o EMD, sem centrifugação.

4.5. Exame Microscópico Direto (EMD)

Foi realizado mediante adição de 2 gotas de KOH 15% e Tinta Parker ao material clínico, previamente processado como no ítem 4.3. A lâmina foi observada no microscópio óptico com aumentos de 400 e 1000x.

4.6. Cultura

Os materiais clínicos foram submetidos a cultivo, através da sua inoculação nos meios de cultura agar Sabouraud dextrose e agar Mycosel[®], em duplicata. As culturas foram incubadas a temperatura ambiente por até 30 dias.

4.7. Testes Sorológicos

4.7.1. Preparo do Antígeno

O extrato antigênico utilizado no decorrer de todo o trabalho foi produzido conforme descrito previamente por Negroni, 1968 com algumas modificações.

O isolado de *Paracoccidioides brasiliensis* 182 foi cultivado em agar Sabouraud por 13 dias na fase leveduriforme, à 37°C. Após esse período, um inóculo obtido a partir dessa cultura foi adicionado ao frasco do tipo Erlenmeyer contendo 200mL do meio líquido composto por Neopeptona (60,0g, Difco), 72,0g de glicose, 9,0g de extrato de levedura e 0,2g de Thiamina (Difco) e incubado a 37°C com 100 rotações por minuto e durante 30 dias. Após este período de incubação, o sobrenadante da cultura foi recolhido por filtração. Adicionou-se Thimerosal (Mertiolate- Sigma) ao extrato antigênico na concentração de 50mL de extrato do antígeno/10mg de thimerosal, como conservante. O extrato antigênico foi armazenado sob congelamento a 20°C. A dosagem de proteínas totais do antígeno produzido foi determinada segundo a técnica descrita por Lowry, 1951.

4.7.2. Imunodifusão Dupla (IDD)

Lâminas comuns de microscopia foram inicialmente revestidas com uma fina camada de agar 1% em água destilada. Após secagem em estufa, foi adicionada uma camada de 3 mm de espessura de agar 1% (Agar citrato).

O antígeno Pb182 foi colocado nos orifícios centrais (3 mm de diâmetro) de cada lâmina (cor amarela) (figura 7), e a amostra de soro, não diluída e em diluições de 1:2 a 1:512, foram acrescentadas em orifícios laterais (3 mm de diâmetro) distantes 5 mm do central. As diluições foram realizadas em solução salina. Para cada reação foi usado um controle positivo (cor vermelha) correspondente a soro de paciente com PCM e cm título conhecido

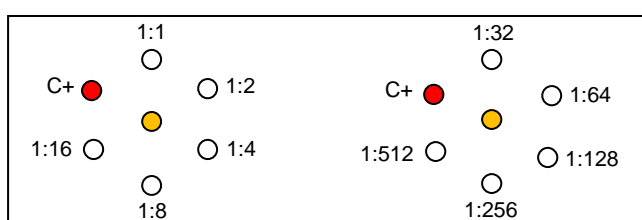


Figura 7: representação da lâmina utilizada na Imunodifusão e dos gabaritos feito no agar, com os controles e as diluições.

As lâminas foram incubadas em câmara úmida por 48 horas para a formação de linhas de precipitação antígeno-anticorpo. Posteriormente, as mesmas foram submersas em solução salina por 24 horas e levadas em estufa para secagem do gel. Após a secagem foram coradas por solução de negro de amido para serem lidas.

Interpretação dos resultados: foram consideradas positivas as amostras que, além de formarem linha no controle positivo, formavam linha de precipitação pelo menos no poço onde havia somente o soro (sem diluição). O título de anticorpo foi dado como a maior diluição em que se observava a formação da linha de precipitação.

Foi considerado negativo na imunodifusão dupla o resultado que não apresentava linha de precipitação do antígeno com o soro do paciente, mas apresentava positividade no controle positivo (controle da reação).

4.7.3. ELISA

A dosagem do Antígeno foi feita segundo o método de Lowry, 1951. Com a concentração do antígeno, foi calculado o volume dessa solução que seria utilizado para sensibilizar a placa do ELISA. (cálculos mostrado no anexo 1)

1ª Etapa: sensibilização da placa.

Adicionou-se o antígeno a uma concentração de 480µg/placa (5µg/poço) a 10 mL de tampão carbonato-bicarbonato e homogeneizado. Cada poço foi preenchido com 100µL da solução do tampão mais o antígeno. Então, a placa foi levada a estufa a 37°C por 1 hora. Em seguida foi colocada na geladeira por 24 horas.

2ª Etapa: bloqueio da placa.

Retirou-se a placa da geladeira, o líquido desperdiçado e lavou-se 5 vezes com PBS-T. O excesso de tampão foi retirado da placa em almofada de papel. Em seguida, adicionou-se a solução de 10mL de tampão PBS-T a 0,5g de Leite Mólico (mólico 0,5%). Homogeneizado, 100µL foi adicionado a cada poço da placa, em seguida colocado na estufa a 37°C por 2 horas. As placas foram congeladas até por no máximo 2 semanas antes de serem utilizadas.

3ª Etapa: teste de ELISA com soro do paciente.

Após descongelamento da placa, a mesma foi lavada por 5 vezes com solução de PSB-T. Para diluição do soro, foi utilizado PBS Gelatina 0,25% (dissolve-se 0,062g de gelatina sem sabor a 25mL de PBS-T. A gelatina foi aquecida em gotas de água destilada até completa dissolução da gelatina e em seguida adicionada ao tampão). Com PBS-T gelatina pronto, 100µL foi colocada em toda a placa, sendo que na coluna 2, mais 100µL foram adicionados. 4µL de soro foram adicionados aos 200µL de PBS-T gelatina, sendo os controles positivos e negativos, e os soros de pacientes em duplicada, como mostrado a seguir.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	branco	C+										
B	branco	C+										
C	branco	C-										
D	branco	C-										
E	branco	A1										
F	branco	A1										
G	branco	A2										
H	branco	A2										

Diluições: 1:50 1:100 1:200 1:400 1:800 1:1600 1:3200 1:6400 1:12800 1:25600 1:51200

Figura 8: representação esquemática da placa de ELISA – controles positivo e negativo e amostra 1 e 2.

Após adicionar os soros, a placa foi levada a estufa a 37°C por 1 hora. Em seguida, lavada 5 vezes com PBS-T. 10 µL do conjugado foram adicionados em 10mL de PSB-T (conjugado IgG cabra anti-IgG humana marcado com peroxidase- da Sigma) – diluição 1:1000. Então, adicionados 100 µL da solução em cada poço e levado a estufa a 37°C por mais 1 hora. A solução reveladora (substrato) foi composta por 12,5mg de o-fenilenodiamina (OPD–Sigma) + 10µL de H₂O₂ 30% em 10mL de tampão citrato 0,1M pH 4,5. Adicionou-se então 100 µL em cada poço, deixando-se reagir por 8 minutos, sob abrigo da luz. Em seguida, 50 µL da solução de ácido sulfúrico 4N foi adicionada para parar a reação do substrato. A leitura espectrofotométrica foi efetuada em 492nm

Interpretação dos resultados: o cutoff (ponto de corte) da reação foi definido como a média mais 2 vezes o desvio padrão (dp) do controle negativo. Para cada amostra foi estipulado o título, que corresponde a maior diluição do soro no qual a densidade optica (DO) permanecia mais elevada que o valor do cutoff. Foram consideradas

negativas as amostras na qual a leitura da menor diluição (1:50) era inferior ao valor do cutoff (Belíssimo-Rodrigues et. al., 2010)

Obtenção dos controles:

O controle positivo usado na realização do teste foi um “Pool” de soro de pacientes com sorologia positiva na Imunodifusão Dupla. Foram escolhidos ao acaso 20 amostras e coletados quantidades iguais de cada um dos soros.

Para o controle negativo, foi feito também um “Pool” de soro de pacientes sabidamente saudáveis, com Imunodifusão dupla negativa, que compõe o grupo II do estudo. Também foram escolhidos ao acaso 20 soros e adicionados partes iguais.

4.8. Avaliação dos testes

Sensibilidade (S) de um teste diagnóstico é a probabilidade que o resultado do teste seja positivo quando a doença está presente. Assim, a sensibilidade foi calculada pela proporção de pacientes (indivíduos com a doença) que apresentam teste positivo em relação a todos os doentes (com ou sem resultado positivo)

$$S = \frac{\text{resultados positivos no teste } x}{\text{Total de doentes}}$$

Especificidade de um teste diagnóstico é a probabilidade que o resultado seja negativo quando a doença não se encontra presente. Assim, a especificidade constituiu a proporção de indivíduos saudáveis (não doentes, do grupo controle) que apresentaram teste negativo.

$$E = \frac{\text{resultados negativos no teste } x}{\text{Total de não doentes}}$$

Valor Preditivo Positivo (VPP) é usado para ajudar a prever qual a probabilidade de se ter a doença se o resultado do teste for positivo. VPP também é conhecido como probabilidade pós-teste e probabilidade posterior de se ter a doença.

$$\text{VPP} = \frac{\text{resultados positivos no teste X}}{\text{resultados positivos no teste X} + \text{resultados positivos no teste não X}}$$

Todos os resultados positivos (entre doentes e não doentes)

Valor Preditivo Negativo (VPN) é usado para ajudar a prever qual a probabilidade de não ter a doença se o resultado do teste for negativo. VPN também é conhecido como probabilidade pós-teste e probabilidade posterior de não ter a doença.

$$\text{VPN} = \frac{\text{resultados negativos no teste X}}{\text{resultados negativos no teste X} + \text{resultados negativos no teste não X}}$$

Todos os resultados negativos (entre doentes e não doentes)

A *Acurácia* de um teste revela sua exatidão e é calculada pela proporção entre resultados verdadeiros - positivos e negativos, e o total de resultados observados. A multiplicação do valor encontrado, por 100, permitiu sua expressão em porcentagem.

4.9. Análise Estatística

O método estatístico usado foi o método de *Kappa*, que consiste no cálculo de um coeficiente de correlação interclasses, considerado também probabilidade.

Assim, temos que $k = [\text{Pr}(x) - \text{Pr}(e)]/[1 - \text{Pr}(e)]$, em que k expressa a correlação entre os resultados, $\text{Pr}(x)$ expressa a concordância observada entre determinada classe e $\text{Pr}(e)$ expressa a probabilidade global de acordo aleatório. A interpretação dos valores de k segue tabela 1 abaixo:

Tabela 1: Interpretação dos valores do índice de concordância kappa (k)

k	Interpretação
<0	sem concordância
0,0-0,20	concordância insignificante
0,21-0,4	concordância baixa
0,41-0,60	concordância moderada
0,61-0,8	concordância substancial
0,81-1,00	concordância quase perfeita

Note: K=correlation between the results

Fonte: Adaptado de Landis JR, Koch GG. *The measurement of observer agreement for categorical data*. Biometrics 1977; **33**: 159-174

5. RESULTADOS

5.1. Títulos de anticorpos em soro de paciente com PCM – IDD e ELISA

No período de janeiro de 2005 a dezembro de 2010, cerca de 852 amostras de soro de pacientes foram encaminhadas para a sorologia no Laboratório de Micologia do HUCAM. Desta amostra foram selecionados aleatoriamente os soros de paciente com diagnóstico comprovado de paracoccidioidomicose e os grupos foram estabelecidos de acordo com o item 4.3 de Materiais e Métodos. No total, 142 soros de 83 pacientes com PCM foram analisados. Cada soro foi submetido aos testes de IDD e ELISA. Quando necessário, os testes foram repetidos.

A Figura 9 mostra a distribuição dos títulos de anticorpos detectados por IDD dos 83 pacientes com PCM. O título 1:4 foi o mais frequente (19,2%) e somente 1 paciente teve título muito alto (1:512). Foram encontrados 8 casos testes falso negativo.

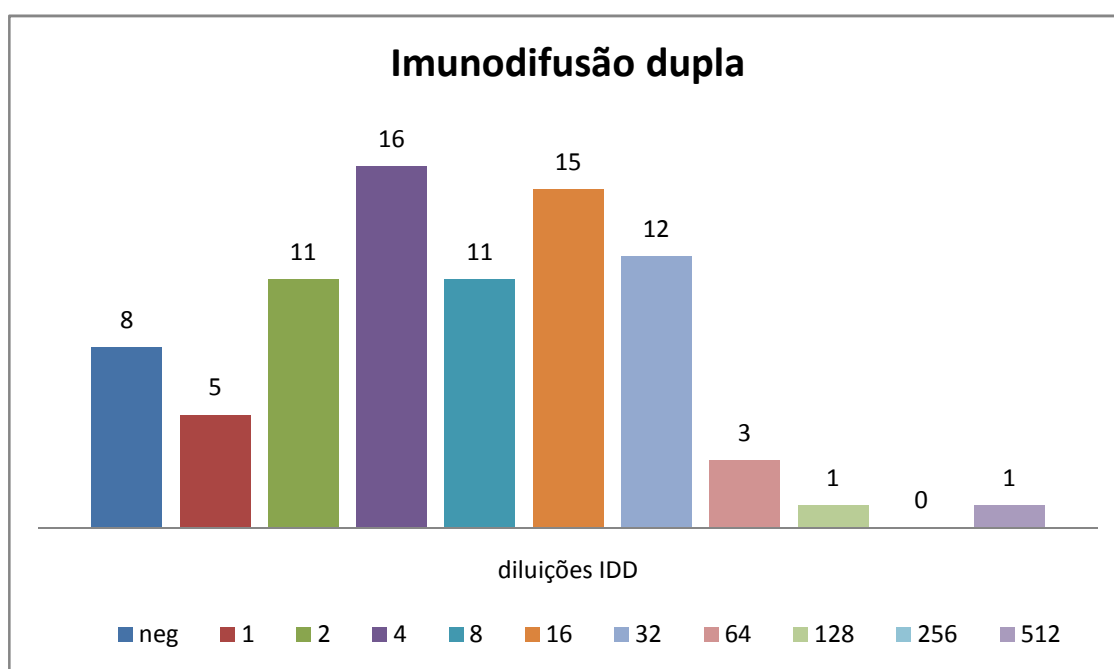


Figura 9: Distribuição dos títulos de anticorpos detectados por IDD em pacientes com PCM.

A Figura 10 mostra a distribuição dos títulos de anticorpos detectados por ELISA, nos 83 soros dos pacientes com PCM. Observa-se que os títulos 1:50 e 1:800 foram os mais observados (21,6%) e (20,4%), respectivamente. Títulos com diluições acima de 1:6400 não foram encontradas em nosso estudo e 5 (6,0%) dos pacientes

tiveram o resultado negativo no ELISA. Observa-se uma semelhança nas distribuições das titulações em ambos os testes.

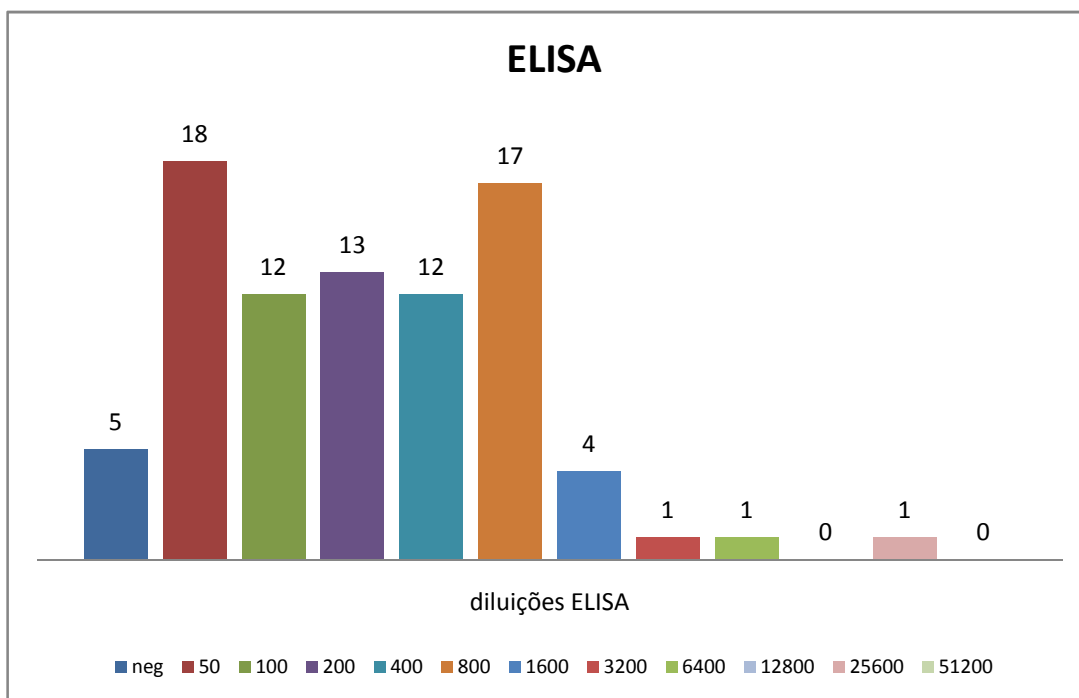


Figura 10: Distribuição dos títulos de anticorpos detectados por ELISA em pacientes com PCM.

Para uma análise mais direcionada, os 83 pacientes com PCM (do grupo 1) foram sub-agrupados segundo o resultado da titulação por IDD e ELISA em: a) negativo, b) título baixo e c) título alto. Segundo a IDD, os resultados foram: 8 (9,6%) pacientes tiveram IDD^{neg}, 43 (51,8%) tiveram IDD^{baixo}, e 32 (38,6%) IDD^{alto}. Segundo resultados do ELISA, observou-se que 5 (6,0%) tiveram ELISA^{neg}, 55 (66,2%) tiveram ELISA^{baixo} e 23 (27,8%) ELISA^{alto} (Tabela 2)

Tabela 2: Comparação dos resultados da IDD e do ELISA dos soros de pacientes com PCM, agrupados segundo título de anticorpos.

	TESTES SOROLÓGICOS			TOTAL
	Classificação			
	negativo	baixo	alto	
IDD	8 (9,6%)	43 (51,8%)	32 (38,6%)	83
ELISA	5 (6,0%)	55 (66,2%)	23 (27,8%)	83

Analisando os 142 soros dos 83 pacientes do grupo I, a combinação dos resultados dos dois testes é representada na Tabela 3. As diluições foram combinadas e a quantidade de soro de cada combinação foi representada por números. Os títulos de 1:4 (IDD) e 1:50 (ELISA) foram os mais observados (34 e 40 casos, respectivamente). Fazendo esta interposição somente seis soros foram negativos nos dois testes.

Tabela 3: Relação entre os títulos da IDD e do ELISA dos soros dos 83 pacientes com PCM.

ELISA	IDD										TOTAL
	neg	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:512	
neg	6	3		1							10
1:50	10	5	11	8	2	4					40
1:100	1	1	3	8	4	1	1	1			20
1:200		1	4	7	3	4	4				23
1:400		1	1	1	3	6	1	1	1		16
1:800		1	4	7	4	5	5				27
1:1600				1		1	3	1			6
1:3200				1			1				2
1:6400										1	1
1:12800											0
1:25600											0
1:51200											0
TOTAL	17	11	23	34	16	21	15	3	1	1	142 soros

neg – resultado negativo

Para analisar a concordância entre os dois testes, segundo a classificação em negativo, título baixo ou título alto, os 142 soros dos 83 pacientes foram agrupados e os resultados foram combinados na Tabela 4. O índice de concordância *Kappa* para os três grupos foi de 0,197, o que representa uma concordância insignificante entre os dois testes, com base na interpretação da Tabela 1, apresentada na metodologia.

Tabela 4: Comparação entre IDD e ELISA, segundo critério: negativo, título baixo e título alto.

TESTES SOROLÓGICOS				
ELISA	IDD			TOTAL
	IDD ^{neg}	IDD ^{baixo}	IDD ^{alto}	
ELISA ^{neg}	6 (4,2%)	4 (2,8%)	0	10
ELISA ^{baixo}	11 (7,7%)	62 (43,9%)	24 (16,9%)	97
ELISA ^{alto}	0	18 (12,6%)	17 (11,9%)	35
TOTAL	17	85	41	142 soros

Índice K = 0,197

Valor de p = 0,003

Intervalo de confiança 95% = 0,325 – 0,069

Combinações entre valores extremos (negativo na IDD com título alto no ELISA, e vice versa) não foram encontrados. A maior frequência entre os resultados combinados foi entre os títulos baixos de ambos os testes, 62 (43,9%).

Quando os resultados dos dois testes foram transformados em critérios qualitativos: positivos (considerado para qualquer valor de diluição) e negativos, observou-se que houve uma concordância entre os resultados, como mostra a tabela 5. O índice de concordância *Kappa*, foi de 0,4, o que representa uma concordância baixa entre os dois testes, com base na interpretação da tabela 1, apresentada na metodologia.

Tabela 5: Comparação entre IDD e ELISA, segundo critério qualitativo: resultado negativo ou positivo.

TESTES SOROLÓGICOS			
ELISA	IDD		TOTAL
	negativo	positivo	
negativo	6 (4,1%)	4 (2,7%)	10
positivo	11 (7,6%)	121 (85,6%)	132
TOTAL	17	125	142

Índice K = 0,40

Valor de $p < 0,003$

Intervalo de confiança 95% = 0,548 – 0,233

Dentre os resultados negativos, observa-se que 6 (4,1%) das amostras foram negativas nos dois testes, porém, 11 (7,6%) foram negativos na IDD mas não no ELISA. 85,6% dos resultados se mostraram positivos em ambos os testes.

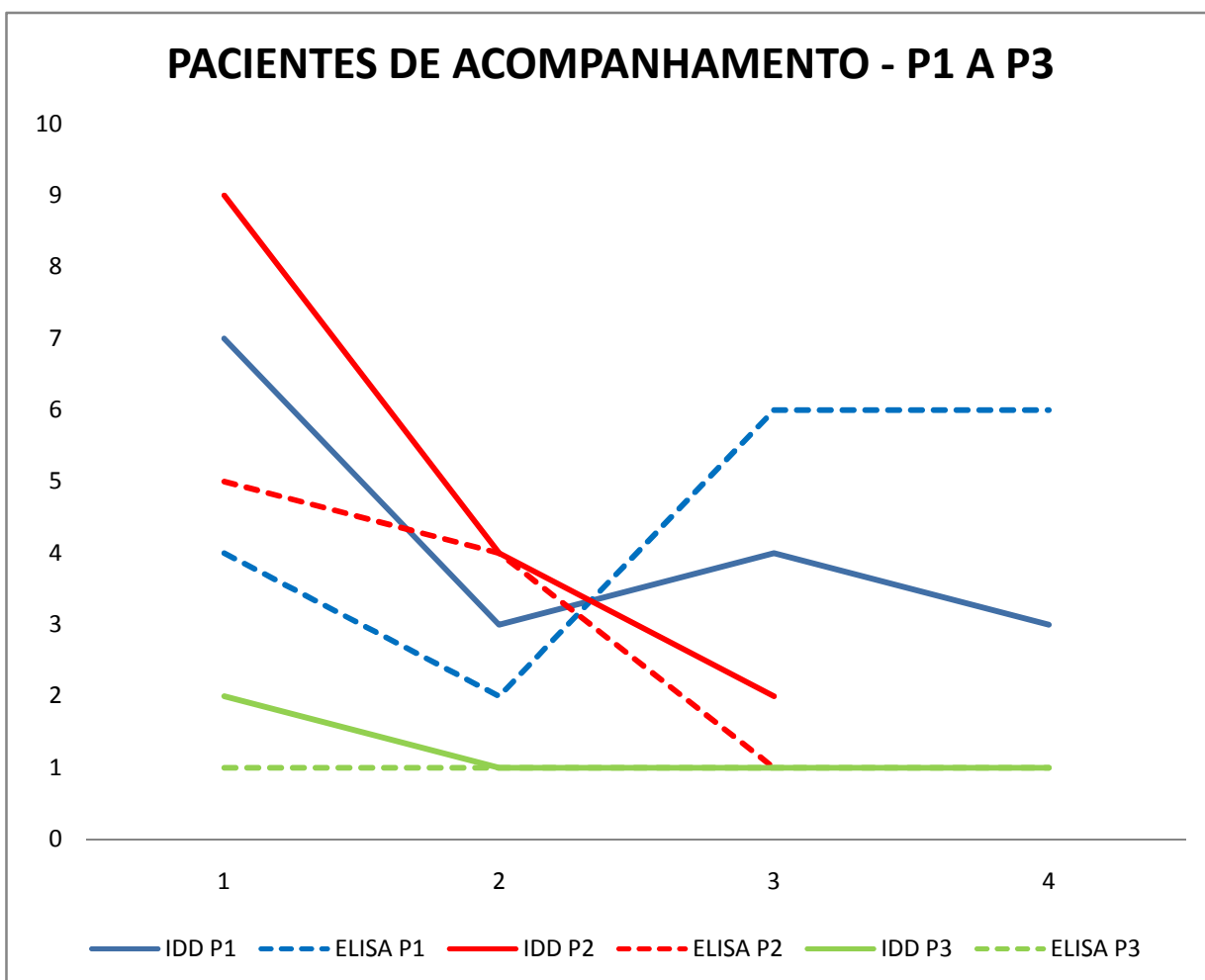
Para os 11 pacientes do grupo I que tinham um histórico de acompanhamento sorológico com pelo menos 3 soros consecutivos foram construídos três gráficos que mostram o comportamento das titulações dos soros seriados de cada paciente, em ambos os testes. As Figuras 11, 12 e 13 mostram os resultados por grupo de representados por P1 a P3 P4 a P7 e P8 a P11, respectivamente. Para essa representação, foi criado um escore para as titulações, como mostra a Tabela 6. As linhas contínuas representam as titulações da IDD e as tracejadas representam as titulações do ELISA. Cores iguais foram utilizadas para o mesmo paciente.

Tabela 6: Escores estabelecidos para títulos de anticorpos encontrados na IDD e ELISA para 11 pacientes em acompanhamento sorológico durante tratamento.

Nº DO ESCORE	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
TITULO IDD	NEG	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:512
TITULO ELISA	NEG	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800

neg – resultado negativo

Figura 11: Escores das titulações IDD e ELISA de pacientes (1 a 3) com PCM em acompanhamento seguindo a ordem cronológica (tempo 1,2,3 e4) .

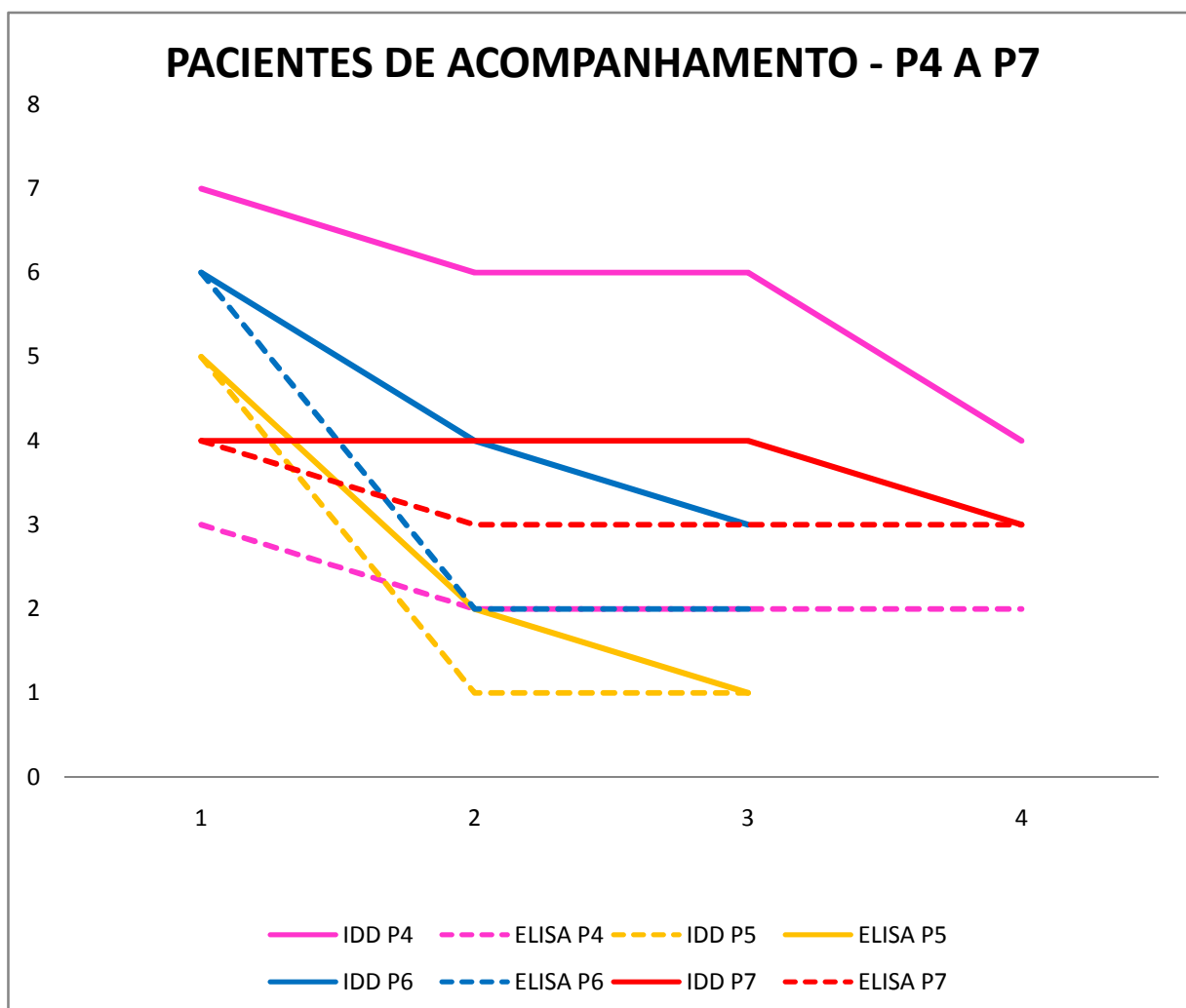


IDD – teste imunodifusão dupla

ELISA – teste ensaio imunoenzimático

Px – paciente

Figura 12: Escores das titulações de pacientes (4 a 7) com PCM em acompanhamento seguindo a ordem cronológica (tempos 1,2,3 e 4).

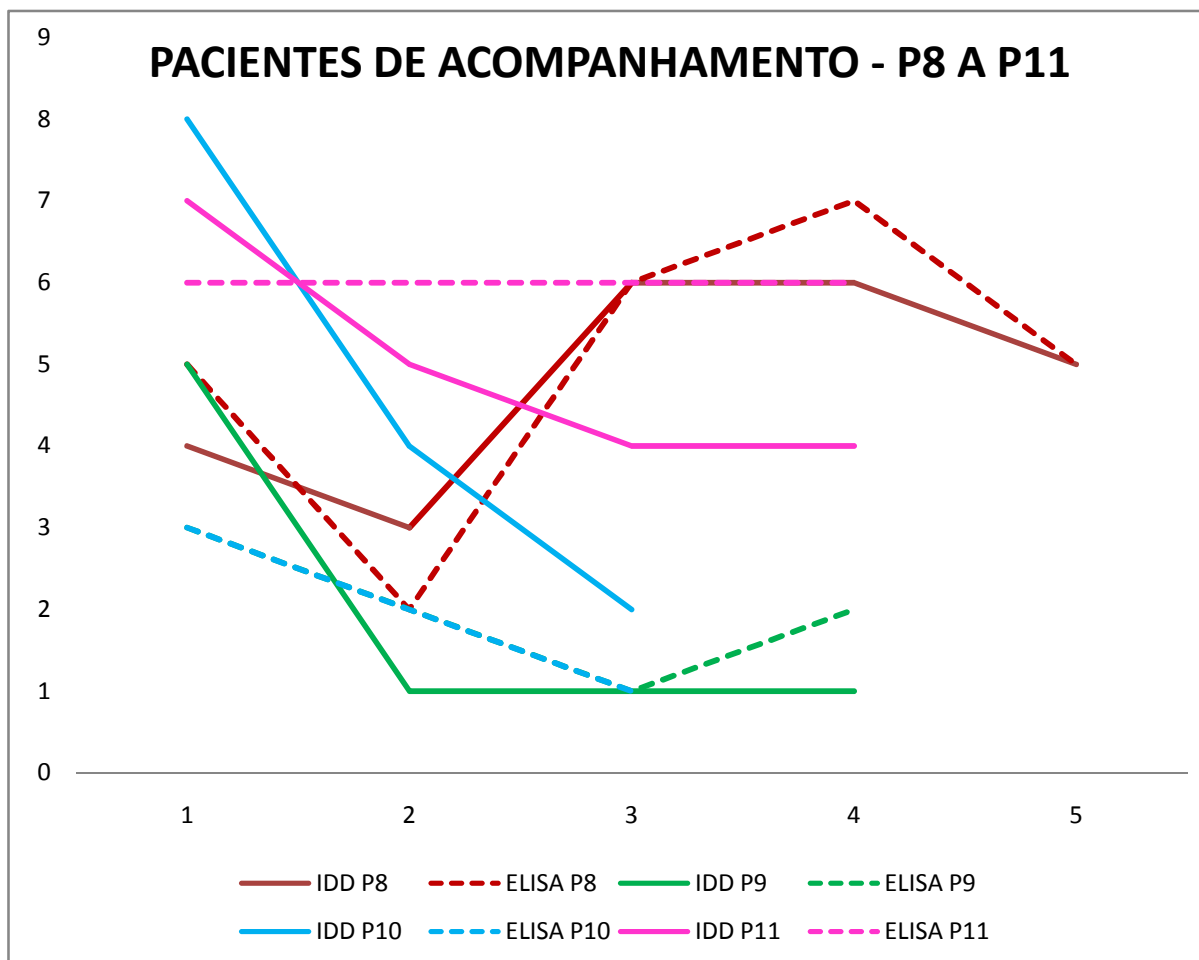


IDD – teste imunodifusão dupla

ELISA – teste ensaio imunoenzimático

Px – paciente x

Figura 13: . Escores das titulações de IDD e ELISA de pacientes (8 a 11) com PCM em acompanhamento, segundo a ordem cronológica (tempos 1,2,3,4 e 5).



IDD – teste imunodifusão dupla

ELISA – teste ensaio imunoenzimático

Px – paciente x

O grupo II foi composto de 49 doadores saudáveis, com exclusão de diagnóstico de PCM e/ou outras micoses pulmonares. As 49 amostras (100%) desses indivíduos foram negativos na IDD. No grupo III, composto por pacientes com outras micoses pulmonares, todas as 13 amostras (100%) também foram negativas na IDD (Tabela 7).

Tabela 7: Distribuição dos resultados da IDD dos três grupos de pacientes estudados, segundo o valor do título de anticorpos, agrupados em negativo, título baixo (1:1 a 1:8) e título alto (1:16 a 1:512).

GRUPOS	n	IDD			TOTAL
		neg	1:1 - 1:8	1:16 - 1:512	
PCM	83	8 (9,6%)	43 (51,8%)	32 (38,6%)	83
Controles Saudáveis	49	49 (100%)	-	-	49
Outras Micoses	13	13 (100%)	-	-	13
TOTAL PACIENTES	139				

Fazendo a mesma análise para o desempenho do ELISA, observou-se que alguns soros do grupo II (saudáveis) e do grupo III (histoplasmose e aspergilose) foram reativos, com titulações baixas no teste, como mostra a tabela 8. No grupo III, 2 (15,5%) tiveram títulos altos no ELISA. Dentre os 3 pacientes do grupo III, negativos no ELISA, 1 tinha aspergilose e 2 tinham histoplasmose.

Tabela 8: Distribuição dos resultados de ELISA dos três grupos de pacientes estudados, segundo o valor do título de anticorpos agrupados em negativo, título baixo (1:50-1:400) e título alto (1:800-1:6400)

GRUPOS	n	ELISA			TOTAL
		neg	1:50 - 1:400	1:800 - 1:6400	
PCM	83	5 (6,0%)	55 (66,2%)	23 (27,8%)	83
Controles Saudáveis	49	44 (89,8%)	5 (10,2%)	-	49
Outras Micoses	13	3 (23,0%)	8 (61,5%)	2 (15,5%)	13
TOTAL PACIENTES	139				

5.2. Avaliação do desempenho dos testes – Sensibilidade, Especificidade, Valores Preditivos Positivos (VPP) e Negativos (VPN) e Acurácia

A sensibilidade de ambos os testes foi boa (superior a 90%). Porém, a especificidade do ELISA, calculado em relação ao grupo de pacientes com outras micoses foi muito baixa (23,1%). O VPP da IDD foi de 100% e a acurácia do mesmo foi superior à do ELISA.

Tabela 9: Valores da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo e acurácia dos testes de Imunodifusão Dupla (IDD) e Ensaio Imunoenzimáticos (ELISA) encontrados nos três grupos de pacientes em estudo.

TESTES SOROLÓGICOS		
	IDD	ELISA
SENSIBILIDADE	90,30%	93,90%
ESPECIFICIDADE*	100%	89,70%
ESPECIFICIDADE**	100%	23,10%
VPP	100%	88,50%
VPN	83,80%	90,30%
ACURÁCIA	94,40%	86,20%

* especificidade calculada sobre controles saudáveis

** especificidade calculada sobre outras micoses

VPP – valor preditivo positivo

VPN – valor preditivo negativo

6. DISCUSSÃO

O diagnóstico sorológico da paracoccidiodomicose, apesar de não ser considerado padrão ouro, tem grande importância na rotina dos laboratórios, pois sabe-se que, muitas vezes, a demonstração do fungo ou a cultura não é possível. Outros testes como a pesquisa do antígeno circulante, muitas vezes também se torna difícil, como mostram alguns trabalhos (Freitas-da-Silva & Roche-Barreira, 1991). Por isso, cada vez mais, os testes sorológicos são utilizados como uma importante ferramenta para diagnóstico e prognóstico.

A quantificação de anticorpos, através desses testes, é especialmente importante no prognóstico da doença. Normalmente, altos níveis de anticorpos significam um mau prognóstico por estarem relacionados a uma resposta imune predominante de padrão Th2, com produção de altos níveis de Ac chamados de não protetores, o que dificulta o organismo reagir contra o fungo, uma vez que o combate ao antígeno é comprovadamente padrão Th1. E por isso, quando se institui um tratamento ao doente, os níveis de anticorpos diminuem; é a resposta Th1 se reestruturando para combater o fungo (Sadahiro et al., 2007).

Sabendo da utilidade que testes sorológicos têm na rotina da PCM, muitos estudos têm sido desenvolvidos para aprimorar, padronizar e até mesmo descobrir novos testes. Apesar de todos os esforços, até hoje não se têm estes testes padronizados.

Em nosso estudo, analisamos a Imunodifusão Dupla em agar (IDD), por ser de fácil execução, baixo custo e boa sensibilidade e especificidade, mas com a desvantagem no tempo da execução. O outro teste analisado, o Ensaio Imunoenzimático (ELISA), é um teste com ampla utilização em toda as áreas da medicina, com sensibilidade mais alta que a IDD, de execução mais rápida, porém, com uma especificidade menor e custo mais elevado.

Ao se considerar um teste baseado na detecção de anticorpos, é relevante considerar a técnica usada, o tipo de antígeno (antígeno bruto, filtrado de cultura, antígeno modificado, etc.), a qualidade do antígeno (como ele foi produzido) e como o resultado foi interpretado. As variações nestes parâmetros são as principais causas das diferenças observadas nos resultados entre os diferentes serviços e dificultam a comparação entre os resultados relatados por diferentes autores. Outros fatores como, o número de casos estudados, a forma clínica e gravidade dos

pacientes, entre outros, podem interferir também nos resultados apresentados na literatura.

O antígeno usado em nosso estudo é produzido pelo nosso laboratório, a partir do isolado 182, obtido de paciente do ES na forma de antígeno bruto a partir da cultura de 13 dias de incubação, baseado no protocolo de Negrone, 1968. Berzaghi et al. (2004) afirmaram que, quando se usam isolados específicos para produzir antígenos para a realização de testes como a IDD, a cultura poderá ter gp43, porém, isso não é reprodutível e algumas vezes essa preparação pode conter diferentes concentrações da molécula ou mesmo, não conter esse antígeno. Os autores apresentaram a hipótese de que a cultura é composta por diferentes clones e que por alguma razão ainda não esclarecida, somente alguns secretam gp43. Camargo et al. (1988) provaram que o pico de produção da gp43 ocorre entre o 7º e o 10º dia de cultura.

Embora o IDD seja considerado um teste de baixo custo e simples, resultados falso negativo têm sido relatados (Neves et al., 2003). Em nosso estudo, dentre os 83 pacientes com PCM, foi observado que 8 (9,6%) pacientes tiveram a IDD negativa (Figura 9). Muitas teorias tentam explicar possíveis motivos para essa falta de reatividade, dentre elas, perfil de produção de anticorpos, forma clínica e estado imune do hospedeiro, entre outros.

Camargo (2008) relatou que, em seu laboratório, uma taxa de 2-3% de resultados falsos negativos têm ocorrido na IDD e diz que esses pacientes podem apresentar várias outras doenças de envolvimento pulmonar e que, no momento do diagnóstico, o sistema imune do paciente está deprimido, não sendo capaz de produzir anticorpos suficientes para a precipitação no teste IDD.

Neves et. al. (2003), realizaram em estudo com 28 pacientes IDD^{neg} e 18 IDD^{pos} e mostraram um padrão diferente nos subtipos de IgG presentes nos dois casos. Eles observaram que os 28 IDD^{neg} tinham mais IgG2 de baixa afinidade, enquanto os IDD^{pos} apresentavam mais IgG1 e IgG4. A IgG2 parece ser dirigida contra epítomos carboidratos.

A forma clínica da doença parece estar também diretamente ligada ao perfil de anticorpos expressos. A forma aguda da doença parece apresentar maior concentração de anticorpos de baixa afinidade, podendo a IDD ser negativa.

Analisando esses Ac na pós terapêutica, observou-se que o aumento dos níveis de Ac com alta avidéz foi encontrado nos pacientes que tinham a forma crônica multifocal, o que não foi demonstrado naqueles indivíduos que apresentavam a forma aguda ou crônica unifocal, talvez devido ao pequeno período de duração da doença, ou mesmo por uma limitação no nº de amostras do estudo (Yoshida et al., 2009).

Um relato de caso apresentou um paciente de 34 anos, com sorodiagnóstico negativo para PCM (IDD) que tinha anticorpos anti-gp43 não reativos, mas possuía anticorpos anti-gp70 (presente em cerca de 96% dos soros de pacientes com PCM), apesar da gp43 ser considerada o principal componente antigênico do *P. brasiliensis*. Por esse motivo, muitos autores questionam a utilização de testes sorológicos direcionados somente a gp43 (Vidal et al., 2004). Além disso, quatro diferentes isoformas de gp43 têm sido relatadas, com diferentes padrões de sororeatividade (Moura-Campo et. al., 1995).

Essa falta de reatividade de Ac anti-*P. brasiliensis* em alguns soros não está bem esclarecida, mas o que se acredita é que nem todos os epítomos antigênicos expressados pela gp43 estão igualmente presentes em todos as cepas de *P. brasiliensis* (Vidal et al., 2004). Isso suplanta a hipótese de que, para esses casos IDD^{neg}, a preparação antigênica utilizada no teste pode ser diferente da que apresenta o *P. brasiliensis* causador da doença, ou seja, o paciente pode estar infectado com uma cepa antigenicamente diferente da usada na obtenção de antígenos para IDD, uma vez que diferenças fenotípicas podem ocorrer entre cepas diferentes. Uma boa ideia seria então, utilizar um preparado de antígenos de diversas cepas fenotipicamente diferentes de *P. brasiliensis*, o que diminuiria as reações falso-negativas. Outra explicação seria que o excesso de antígeno no organismo do paciente que, utilizaria os anticorpos existentes para formação de imunocomplexos, e assim, menos anticorpos estariam disponíveis para positivar a reação (Moretto 2010).

Analisando o ELISA, observou-se que 5 (6,0%) das amostras foram falso negativas no teste, sendo que dessas 5, 4 foram IDD^{neg} e 1 soro era IDD^{pos} (título de 1:1) (Figura 10 e Tabela 3). Para os 4 casos de ELISA^{neg} e IDD^{neg} (Tabela 3), é possível que o paciente possa ter apresentado uma baixa produção de anticorpos ou produzido anticorpos de baixa afinidade, por motivos variados, que, sem uma

análise detalhada, fica difícil inferir. É comum se afirmar que ELISA é um teste mais sensível que IDD e, contraditoriamente, fica difícil justificar porque houve um único caso de ELISA^{neg} e IDD^{pos}.

O ELISA, apesar de ser considerado um teste mais sensível que a IDD, apresenta uma complexidade que pode influenciar nos resultados. Quando se analisa o procedimento desde o início, observa-se que na fase de sensibilização da placa, não somente o antígeno utilizado se mostra importante, mas a concentração que é utilizada. Na literatura, concentrações variadas de antígenos são usadas para a sensibilização da placa. O tempo de incubação e de bloqueio também varia muito entre os laboratórios. A diluição inicial do soro do paciente também varia: alguns autores utilizam a diluição 1:50, outros iniciam com a diluição 1:100 e alguns em 1:200. Outra diferença entre os protocolos é a concentração do conjugado, que varia de 1:1.000 a 1:10.000, além da concentração do revelador. São muitas as variáveis que influenciam no resultado, mas, sem dúvida, uma variável observada por nós que influencia muito nos dados é a forma de se interpretar as leituras dos testes. Autores interpretam os pontos de corte de formas variadas, desde valores fixos, independentes de ensaios, a comparações com valores de um só poço de leitura (ex.: leitura do poço 1:200). (Del Negro et. al., 1999) Observamos que, análises diferentes imprimem resultados muito diferentes. Neste estudo optou-se pela interpretação dos resultados ensaio a ensaio. Desta forma pretende-se diminuir ao máximo as interferências inerentes ao teste, bem como uma possível falha durante a execução do mesmo.

A análise dos 142 soros dos 83 pacientes com PCM permitiram estabelecer uma relação entre os resultados dos dois testes. Agrupando-se os títulos em valores quantitativos de título negativo, título baixo e título alto, observou-se que os testes concordam em 60,0% equivalente ao índice estatístico de concordância *Kappa* de 0,197 (Tabela 4), o que representa uma concordância insignificante entre IDD e ELISA. Porém, quando se agrupa os testes segundo critérios qualitativos (negativo ou positivo), esse índice passa de 0,197 para 0,4 (Tabela 5), isso é, de fraca a uma concordância baixa. Isso mostra que os dois testes não devem ser comparados, em se tratando de títulos.

O que pode explicar esse fato é a hipótese formulada por Neves et al. (2003) que afirmaram que epítopos do gp43 podem se comportar de forma diferente nos dois testes (em forma de solução ou fixado em fase sólida), isso é, eles ficam mais expostos quando em fase sólida (ELISA), o que facilita a ligação ao anticorpo, uma vez que em seus testes os resultados negativos na IDD foram positivos no ELISA. E é por esse motivo também que o ELISA tem mais reações cruzadas, pois são justamente esses epítopos com terminais de carboidrato os responsáveis pelas reações cruzadas com soros de pacientes com outras micoses.

Analisando os 11 pacientes que tinham pelo menos 3 soros positivos e consecutivos durante o período de estudo, os Figuras 11, 12 e 13 mostram o comportamento das titulações nos dois testes. Pode-se observar que, no geral, as curvas da IDD (linha cheia) e do ELISA (linha tracejada) para o mesmo paciente se assemelharam. O paciente 1 (P1) foi particularmente interessante pois, no início, o título da IDD era superior ao do ELISA e, após a 2ª sorologia, houve uma inversão. Em relação ao aumento do título (em ambos os testes), é possível que esse paciente tenha tido uma recaída, ou tenha interrompido o tratamento. Outro paciente interessante foi o paciente 4 (P4) que, apesar de apresentar comportamento parecido ao longo do acompanhamento os títulos da IDD se mantiveram bem superiores aos do ELISA. Outro comportamento atípico foi o do paciente 11 (P11). O ELISA se manteve invariável, enquanto a IDD mostrou uma queda nos títulos de anticorpos.

Isso mostrou que os testes podem dar uma resposta diferente ao médico quanto ao nível de anticorpos que o paciente apresenta. Um estudo com mais amostras e correlação clínica talvez pudesse ajudar a visualizar algum padrão, que, olhando somente para esses 11 casos, não foi possível detectar.

O desempenho da IDD foi superior ao ELISA quando analisamos os grupos de indivíduos saudáveis (grupo II) e os pacientes com outras micoses pulmonares (grupo III). Dos 49 indivíduos doadores saudáveis e dos 13 positivos para outras micoses, não houve qualquer caso de falso positivo na IDD (Tabela 7). Ao contrário do que se apresenta na literatura, o nosso antígeno se mostrou muito específico, quando usado na imunodifusão dupla. O que vai de encontro ao que afirmaram Berzaghi et al. (2004) e Mendes-Giannini et. al. (1984) que, apesar da utilização de antígeno bruto ter a vantagem de ser de fácil obtenção, ele tem a desvantagem de

possuir epítomos comuns a outros fungos, podendo produzir reações cruzadas com outras doenças como histoplasmose e lobomicose.

Porém, o ELISA mostrou que das 49 amostras de pacientes saudáveis, 5 (10,2%) amostras deram positivas em diluições baixas. No grupo de pacientes com outras micoses, 10 (77,0%) dos 13 indivíduos foram positivos com títulos baixos no ELISA, sendo que 2 (15,5%) com títulos altos de anticorpos (Tabela 8). Apesar do desempenho do teste não ter sido satisfatório, esse resultado era esperado, baseando-se em trabalhos já publicados.

Na literatura há muitos relatos de reações cruzadas entre esses soros. Esse problema, entre os soros de pacientes com *H. capsulatum* e o antígeno de *P. brasiliensis*, é relatado desde o primeiro estudo sorológico em nos anos 60, sobre a fixação do complemento (Albuquerque et al., 2004). Apesar de ser relatado também na IDD, em nosso estudo, bem como a rotina do nosso laboratório, essas reações cruzadas raramente ocorrem. Entretanto, o ELISA, mostrou uma taxa reação cruzada muito alta. Sabendo disso, muitos trabalhos tentam explicar esse fato e diminuir essas reações.

Ferreira et al. (2008) citaram que, reações cruzadas ocorrem quando se utiliza antígenos provenientes do sobrenadante da cultura. Essa ligação inespecífica parece ser devido aos epítomos carboidratados periodato-sensíveis da gp43 que podem se ligar a soros de pacientes com histoplasmose, principalmente. Autores afirmam que a ligação específica do *P. brasiliensis* com o soro do paciente com PCM parece ser 85% envolvida com epítomo protéicos. Porém, Camargo et al. (1994) afirmaram que, no ELISA, essas ligações entre Ac do paciente e epítomos de carboidratos são, em geral 45%, do total de reações.

Como dito anteriormente nessa discussão, essa mesma idéia complementa o que foi exposto anteriormente por Neves et al. (2003) ao afirmarem que o antígeno Pb pode se comportar de forma diferente ao entrar em contato com o anticorpo do paciente. Albuquerque et al. (2004) explicam que reações específicas com a gp43 são obtidas quando estão em solução, como é o caso da IDD, e que, quando fixadas em fase sólida, como no plástico da placa de ELISA, aumentam o número de ligações não específicas (entre epítomos de carboidrato). Além disso, a configuração espacial da “gp43 glycan” contém unidades terminais β -galactofuranosil quando estão fixadas

ao plástico, o que contribui para o aumento das reações cruzadas entre soros heterólogos.

Resumindo, ligações inespecíficas entre epítopos de carboidrato da gp43 e o soro de pacientes com histoplasmose são mais comum no teste do ELISA, uma vez que essa parte da molécula fica mais exposta em fase sólida, tornando o ELISA menos específico que o IDD, quando se usa o mesmo antígeno.

Ferreira et al. (2008) demonstraram que esses antígenos de *P. brasiliensis* tratados com metaperiodato de sódio eliminam esses epítopos carboidratos.

Outra técnica utilizada para esse fim é colocar o soro do paciente em contato com antígenos de *H. capsulatum* e *C. albicans* antes da realização do teste, o que se acredita eliminar anticorpos cruzados. Comparando os resultados do ELISA usando antígeno filtrado de cultura e soro de paciente previamente absorvido com *H. capsulatum*, os autores perceberam que a diluição com valor diagnóstico caía de 1:80 na IDD para 1:40, quando se utilizava esse antígeno absorvido. Além disso, não houve qualquer reação cruzada com soro de pacientes saudáveis ou soros heterólogos, mostrando que essa técnica pode realmente diminuir esse problema de baixa especificidade do teste (Mendes-Giannini et. al. 1984; Camargo et. al., 1984).

McGowan et. al. (1985), ao perceber que essas reações cruzadas estavam diretamente ligadas à gp43, um exoantígeno, testaram antígenos citoplasmáticos de *P. brasiliensis* e viram que a sensibilidade passou de 87% para 97% e a especificidade foi de 99% e 100%, quando comparada ao uso de antígeno bruto nos testes de ELISA e IDD, respectivamente.

A sensibilidade da IDD encontrada em nosso estudo foi de 90,3%, dentro do que é relatado na literatura (Tabela 9). A especificidade de 100% superou alguns trabalhos da literatura. É sabido que essas variáveis (S e E) são influenciadas pelo antígeno usado na realização dos testes. A Tabela 10 mostra alguns resultados de S, E, VPP e VPN para IDD, publicados na literatura.

Para o ELISA, a sensibilidade foi relativamente maior (93,9%) que a IDD, o que também está de acordo com outros estudos. A especificidade em relação aos controles saudáveis de 89,7%, também foi aceitável, comparada a outros trabalhos. Porém, a especificidade, em relação a outras micoses, foi muito baixa (23,1%).

Apesar de muitos autores relatarem alta taxa de reação cruzada, alguns deles não publicaram o valor calculado para especificidade (Tabela 9).

Tabela 10: Valores de Sensibilidade (S), Especificidade (E), Valor Preditivo Positivo (VPP), Valor preditivo Negativo (VPN) da Imunodifusão Dupla (IDD) levantados da literatura.

REFERÊNCIA	ANTIGENO USADO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE*	ESPECIFICIDADE**	VPP	VPN
McGowan et. al., 1985	antígeno citoplasmático	97,00%	100,00%	100%	100%	
Gano & Restrepo, 1987	filtrado de cultura (B339)	88,40%	100%	100%	100%	
Del Negro et al., 1991	filtrado de cultura	91,30%	100%	100%		
Restrepo 1992	Ag7	84,30%		98,90%		
Del Negro et al., 1999	filtrado de cultura	95,30%				
Sene 2001	filtrado de cultura + antígeno somático	94,90%	100%	90%	97%	95%
Nosso estudo	antígeno filtrado	90,3%	100%	100%	83,8%	94,4%

* especificidade calculada sobre controles saudáveis

** especificidade calculada sobre outras micoses

VPP – valor preditivo positivo

VPN – valor preditivo negativo

Tabela 11: Valores de Sensibilidade (S), Especificidade (E), Valor Preditivo Positivo (VPP), Valor preditivo Negativo (VPN) do Ensaio Imunoenzimático (ELISA) levantados da literatura.

REFERÊNCIA	ANTIGENO USADO	SENSIBILIDADE	ESPECIFICIDADE*	ESPECIFICIDADE**	VPP	VPN
Mendes-Giannini et. al., 1984	filtrado de cultura	100,00%		88%		
Camargo et. al, 1984	antígeno absorvido com <i>C. albicans</i>	95,00%		93,40%		
McGowan et. al., 1985	antígeno citoplasmático	100,00%		99,00%	99%	
Del Negro et al., 1999	antígeno somático	100,00%				
Sene 2001	filtrado de cultura + antígeno somático	100,00%	100%	80%	95%	100%
Nosso estudo	filtrado de cultura	93,9%	89,7%	23%	88,5%	90,3%

* especificidade calculada sobre controles saudáveis

** especificidade calculada sobre outras micoses

VPP – valor preditivo positivo

VPN – valor preditivo negativo

7. CONCLUSÃO

- 1) Em geral, os dois testes sorológicos (IDD e ELISA) são adequados ao diagnóstico da PCM;
- 2) Resultado falso negativo foi mais observado com IDD (9,6%) do que com ELISA (6,0%)
- 3) No teste de IDD, 43 (51,8%) das amostras de soro foram classificadas com títulos baixos e 32 (38,6%), títulos alto
- 4) No teste as porcentagens de amostras com títulos baixos e títulos altos foi de 55 (66,2%) e 23 (27,8%), respectivamente.
- 5) o índice de concordância entre os testes foi considerado insignificante (0,197), quando se classificou as amostras em: resultado negativo, título baixo e título alto
- 6) O índice de concordância entre os testes foi considerado baixo (0,4), quando se classificou qualitativamente as amostras em: resultado negativo e resultado positivo.
- 7) Analisando-se os 11 pacientes de acompanhamento foi mostrado que, quando comparados os dois testes, não houve um padrão que se repetia em todas as amostras, mas ambos os testes permitiram visualizar a queda no título de anticorpos para a maioria dos pacientes
- 8) No grupo de 49 doadores saudáveis (grupo II), não houve amostra com resultado falso-positivo na IDD, mas foi observada uma taxa de 10,2% de casos de falso positivos para ELISA, .
- 9) No grupo de 13 pacientes positivos para outras micoses (grupo III), não houveram casos de reação cruzada no testes da IDD. No ELISA, uma taxa de 77,0% de falso-positivo foi obtida.
- 10) No geral, sensibilidade do ELISA foi maior que a da IDD (93,9% x 90,3%).
- 11) A especificidade calculada sobre o controle saudável da IDD foi maior que o do ELISA (100% x 89,7%).

9) a especificidade, calculada sobre os pacientes com outras micoses, foi maior para a IDD do que para ELISA (100% x 23,0%).

10) O valor preditivo positivo para IDD foi de 83,8% e de 88,5% para ELISA. Valor preditivo negativo foi de 94,4% para IDD e 90,3%, para ELISA.

11) a acurácia da IDD foi maior que a do ELISA, 94,4% e 83,2%, respectivamente.

12) em resumo, o antígeno usado em nosso estudo se mostrou altamente específico quando utilizado na IDD, o que não se observou no ELISA.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albuquerque CF, Marques da Silva SH, Camargo ZP. Improvement of the Specificity of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Paracoccidioidomycosis. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43 (4): 1944-1946.

Ameen M, Talhari C, Talhari S. Advances in paracoccidioidomycosis. *Clinical and Experimental dermatology* 2009; 35: 576-580.

Araújo SA, Prado LGR, Veloso JMR, Pedroso ERP. Case of recurrent Paracoccidioidomycosis: 25 Years after Initial Treatment. *The Brazilian Journal of Infections Disease* 2008; 13 (5): 402.

Belissimo-Rodrigues F, Vitali LH, Martinez R. Serological diagnosis of paracoccidioidomycosis in HIV-coinfection patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010;205 (7): 904-907.

Benard G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 2008; 165: 209-221.

Bertini S, Colombo AL, Takahashi HK, Straus AH. Expression of Antibodies Directed to *Paracoccidioides brasiliensis* glycosphingolipids during the course of Paracoccidioidomycosis Treatment. *Clinical and Vaccine Immunology* 2007; 14 (2): 150-156.

Berzaghi R, Marques da Silva SH, Camargo ZP. Variable gp43 Secretion by *Paracoccidioides brasiliensis* clones obtained by Two Different Culture Methods. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43 (1): 491-493.

Blotta MHSL, Camargo ZP. Immunological response to cell-free antigens in paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol* 1993; 31:671-676.

Blumer SO, Jalbert M, Kaufman L. Rapid and Reliable Method for production of a Specific *Paracoccidioides brasiliensis* Immunodiffusion Test Antigen. *Journal of Clinical Microbiology* 1984; 19 (3): 404-407.

Braga CJM, Tittiner GMG, Henao JEM, Teixeira AF, Massis LM, Sbrogio-Almeida ME, Taborda CP, Travassos LR, Ferreira LCS. *Paracoccidioides brasiliensis* Vaccine

Formulation Base don the gp43-derived P10 Sequece and the Salmonella entérica FliC Flagellin. Infectios and Immunity 2009; 77 (4): 1700-1707.

Calle D, Rosero DS, Orozco LC, Camargo D, Casteneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis in Colombia: an ecological study. Epidemiol. Infect. 2001; 126: 309-315.

Camargo KC, Vallejo MC, Camargo ZP, Puccia R. Use of recombinant gp43 Isoforms Expressed in *Pichia pastoris* for Diagnosis of Paracoccidioidomycosis. Clinical and Vaccine Immunology 2008; 15 (4): 622-629.

Camargo ZP, Gesztesi JL, Saraiva ECO, Taborda CP, Vicentini AP, Lopes JD. Monoclonal Antibody Capture Enzyme Immunoassay for Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* Antibodies in Paracoccidioidomycosis. Journal of Clinical Microbiology 1994; 32 (10): 2377-2381.

Camargo ZP, Guesdon JL, Drouhet E, Improvisi L. Enzime-liked immunoasorbent assay (ELISA)in the paracoccidioidomycosis. Comparasion with contraimmunoefroforesis and erythro-immunoassay. Mycophatologia 1984; 81:31-7.

Camargo ZP, Unterkircher C, Campoy SP, Travassos LR. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* Exoantigens for Immunodiffusion Tests. Journal os Clinical Microbiology 1988; 26 (10): 2147-2151.

Camargo ZP, Unterkircher CS, Travassos ZP. Identification of antigenic polypeptides. J Med Vet Mycol 1989; 27: 407-412.

Camargo ZP. Serology of paracoccidioidomycosis. Mycopathologia 2007; 165: 289-302.

Cavassi, KA, Tristao FSM, Oliveira LL, Rocha FA, Vancim JO, Moreira AP, Campanelli AP, Panagio LA, Milanezi CM, Martinez R, Rossi MA, Silva JS. Cell-free antigens from *Paracoccidioides brasiliensis* drive IL-4 producton and Increase the Severity of Paracoccidioidomycosis. Plos One 2011; 6(6): e21423.

Corvino CL, Mamoni RL, Fagundes GZZ, Blotta MHSL. Serum interleukin-18 and soluble tumour necrosis factor receptor 2 are associated with disease severity in patients with paracoccidioidomycosis. *Clinical and Experimental Immunology* 2006; 147: 483-490.

Del Negro GMB, Pereira CN, Andrade HF, Palacios SA, Cecilia MMSV, Benard G. Evaluation of tests for antibody response en the follow-up of aptients with acute and chronic forms of paracoccidioidomycosis. *Journal Med Microbiol* 1999;49: 37-46.

Del Negro GMB, Garcia NM, Rodrigues EG, Cno MIN, Aguiar MSMV, Lirio VS, Lacaz CS. The Sensitivity, Specificity and Efficiency Values of some Serological Tests Used in the Diagnosis of Paracoccidioidomycosis. *Ver. Inst. Med. Tropical São Paulo* 1991; 33 (4): 277-280.

Dujardin JC, Herrera S, Rosario V, Arevalo J, Boelaert M, Carrasco HJ, Correa-Oliveira R, Garcia L, Gotuzzo E, Gyorkos TW, Kalergis AM, Kouri G, Larraga V, Lutumba P, Garcia MAM, Manrique-Saide PC, Modabber F, Nieot A, Pluschke G, Robello C, Arias AR, Rumbo M, Preciado JIS, Sundar S, Torres J, Torrico F, Van der Stuyft P, Victoir K, Olesen OF. Research Priorities for Neglected Infectious Disease in Latin America and the Caribbean Region. *Neglected Tropical Disease* 2010; 4 (10): e780.

Ferreira AP, Correa T, Cunha R, Marques MJ, Montesano MA, Souza MA, Teixeira HC. Human serum antibody reactivity towards *Paracoccidioides brasiliensis* antigens treated with sodium metaperiodate. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2008; 41 (4): 325-329.

Ferreira MC, Oliveira RTD, Silva RM, Blotta MHSL, Mamoni RL. Involvement of Regulatory T Cell in the Immunosupression Characteristic of Patients with Paracoccidioidomycosis. *Infection and Immunity* 2010; 78 (10):4392-4401.

Ferreira-da-Cruz MF, Galvão-Castro B, Wanke B. Produção e padronização dos antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), *Histoplasma Capsulatum* (Hc) e *Aspergillus fumigatus* (Af) para uso no imunodiagnostico. Comparação entre as técnicas de Imunodifusão e Imunoeletrosmoforese. *Mem Inst. Oswaldo Cruz* 1985; 80 (3): 301-305.

Freitas-da-Silva G, Roque-Barreira MC. Antigenemia in Paracoccidioidomycosis. *Journal of Clinical Microbiology* 1992; 30 (2): 381-385.

Frerich AL, Nagashima LA, Pavanelli WR, Marquez AS, Kaminami MS, Carlos NJ, Sano A, Ono MA, Itano EN. High molecular mass fraction in clinical isolates *Paracoccidioides brasiliensis*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2010; 43 (5): 526-530.

Gano LE, Restrepo A. Predictive Value of Serologic tests in the Diagnosis and Follow-Up of Patients with Paracoccidioidomycosis. *Ver. Inst. Med Tropical São Paulo* 1987; 29 (5): 276-283.

Godoy P, Leis SSR, Resende UM. Paracoccidioidomycose e síndrome de imunodeficiência adquirida: relato de necropsia. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2006; 39(1):79-81.

Gómez BL, Figueroa JI, Hamilton AJ, Ortiz B, Robledo MA, Hay RJ, Restrepo A. Use of Monoclonal Antibodies in Diagnosis of Paracoccidioidomycosis: NEw Strategies for Detection of Circulating Antigens. *Journal of Clinical Microbiology* 1997; 38 (12): 3278-3283.

Grosso DM, Almenida SR, Mariano M, Lopes JD. Characterization of gp70 and anti-gp70 monoclonal antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* Pathogenesis. *Infection and Immunity* 2003; 71 (11):6534-6542.

Hogan LH, Klein BS, Levits SM. Virulence factors of Medically Important Fungi. *Clinical Microbiology Reviews* 1996; 9 (4): 469-488.

Iwai LK, Yoshida M, Sadahiro A, Silva WR, Marin ML, Goldberg AC, Juliano MA, Juliano L, Shikanai-Yasuda A, Kalil J, Cunha-Neto E, Travassos LR. T-cell recognition of *Paracoccidioides brasiliensis* gp-43-Derived Peptides in Patients with Paracoccidioidomycosis and Healthy Individuals. *Clinical and Vaccine Immunology* 2007; 14 (4): 474-476.

Kurokawa CS, Lopes CR, Sugizaki MF, Kuramae EE, Franco F, Perraçoli MTS. Virulence Profile of ten *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. Association with

Morphologic and Genetic Patterns. Rev. Inst. Med. Tropical São Paulo 2005; 47 (5):257-262.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 195; 193(1): 265-75.

Maluf MLF, Pereira SRC, Takahachi G, Svidzinski E. Prevalence of paracoccidioidomycosis infectin determined by sorologic tests in donor's blood in the Northwest of Paraná, Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2003; 36 (1) 11-16.

Marques AS. Paracoccidioidomycosis: Epidemiological, Clinical and Treatment update. Na Brás Dermatol, Rio de Janeiro 2003; 78 (2):135-150.

Marques da Silva SH, Grosso DM, Lopes JD, Colombo AL, Blotta MHSL, Queiroz-Telles F, Camargo ZP. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* gp70 circulating antigen and Follow-Up os Pacients undergoins antimycotic therapy. Journal of Clinical Microbiology 2004b; 42 (10): 4480-4486.

Marques-da-Silva SH, Colombo AL, Blotta MHSL, Queiroz-Telles F, Balthazar AB, Lopes JD, Camargo ZP. Diagnosis of Paracoccidioidomycosis by Detection of Antigen and Antibody in Bronchoalveolar Lavage Fluids. Clinical and Vaccine Immunology 2006; 13 (12): 1363-1366.

Marques-da-Silva SH, Colombo AL, Blotta MHSL, Queiroz-Telles F, Lopes JD, Camargo ZP. Diagnosis of Neuroparacoccidioidomycosis by Detection of Circulating Antigen and Antibody in Cerebrospinal Fluid. Journal of Clinical Microbiologu 2005; 43 (9): 4680-4683.

Marques-da-Silva SH, Colombo AL, Blotta MHSL, Queiroz-Telles F, Lopes JD, Camargo ZP. Monitoring gp43 Antigenemia in Paracoccidioidomycosis Patients during Therapy. Journal os Clinical Microbiology 2004a; 42 (6): 2419-2424.

McGowan KL, Buckley HR. Preparation and Use of Cytoplasmic Antigens for the Serodiansis of Paracoccidioidomycosis. Journal os Clinical Microbiology 1985; 22 (1): 39-43.

Mendes-Giannini MJS, Camaro ME, Lacaz CS, Ferreira AW. Immunoenzymatic Absorption Test for Serodiagnosis of Paracoccidioidomycosis. *Journal of Clinical Microbiology* 1984; 20 (1): 103-108.

Moreto TC. Diagnóstico de paracoccidioidomicose em pacientes atendidos em Serviço de rotina de hospital universitário. Dissertação de mestrado- Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, 2010.

Moura ACL. Estudo Clínico e Imunológico de cura de paracoccidioidomicose crônica. Tese – Programa de Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de Minas Gerais 2008.

Moura-Campo MC, Gesztesi JL, Vicentini AP, Lopes JD, Camargo ZP. Expression and isoforms of gp43 in different strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. MEd. Vet. Mycol.* 1995; 33: 223-227.

Negróni R. Nuevos estudios sobre antígenos para las pruebas serológicas em La blastomicose sudamericana. *Derm Ibero-lat-amer* 1968; 4: 409-416.

Neves AR, Mamoni RL, Rossi CL, Camargo ZP, Blotta MHAL. Negative Immunodiffusion Test Results Obtains with Sera os Paracoccidioidomycosis Patients May Be Related to Low-Activity Immunoglobulin G2 Antibodies Directed against Carbohydrate Epitopes. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2003; 10 (5): 802-807.

Nogueira LMC, Ferreira LCL, Rodrigues RR, Santos M, Talhari C, Talhari S. AIDS-associated paracoccidioidomycosis in patients with a CD4+ T –cell count of 4 cell/mm². *Na Bras Dermatol* 2011; 86 (4sup):S129-32.

Oliveira LL, Coltri KC, Cardoso CRB, Roque-Barreira MC, Panunto-Castelo A. *Neglected Tropical Disease* 2008; 2 (3): e183.

Palmeiro M, Cherubini K, Yurgel LS. Paracoccidioidomycosis – Literature Review. *Scientia Medica* 2005; 15 (4): 275-278.

Pellegrino A, Capriles CH, Magaldi S, Oca IM, Ruiz ME, Pérez C, Mata-Essayag S. Case Report: Severe Juvenil Tupe Paracoccidioidomycosis with Hepatitis C. Am. J. Med. Hyg. 2003; 68 (3):301-303.

Pons L, Gimenez M, Guilleron C, Szarfman A. La técnica de La inmunoperoxidaseen La detection de anticuerpos específicos em La infeccion humana por *Paracoccidioides brasiliensis*. Medicina 1972;36 :510-2.

Puccia R, Schenkman S, Gorin PAJ, Travassos LR. Exocellular Components of *Paracoccidioides brasiliensis* Identification of a Specific Antigen. Infection and Immunity 1986; 53 (1): 199-206.

Queiroz-Telles F, Escuissato DL. Pulmonary Paracoccidioidomycosis. Semin Respir Crit Care Med 2011; 32: 764-774.

Restrepo A, Moncada LH. Indirect Fluorescent-Antibody and Qauntitative Agar-Gel immunodiffusion Tests for the Serological Diagnosis of Paracoccidioidomycosis. Applied Microbiology 1972; 24(1): 132-137.

Restrepo, A. Reportof activities of the comminittee on paracoccidioidomycosis serodiagnosis. ISHAM Myc Newsletter 1992; 59: 4.

Richini-Pereira VB, Bosco SMG, Theodoro RC, Macoris SAG, Bagali E. Molecular approaches for eco-epidemiological studies of *Paracoccidioides brasiliensis*. Mem. Inst. Oswalvo Cruz 2009; 104 (4): 636-643.

Sadahiro A, Diogo CL, Oshiro TM, Shikanai-Yasuda MA. Kinetics of INF- γ , TNF- α and IL-4 production by mononuclear cell stimulated with gp43 peptides in patients cured of paracoccidioidomycosis. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2007; 40(2): 156-162.

San-Blas G, Nino-Vega G. Paracoccidioides brasiliensis: chemical and molecular tolos for research on cell wall, antifungal, diagnosis, taxonomy. Mycopathologia 2008; 165: 183-195.

Santos WA, Silva BM, Passos ED, Zandonade E, Falqueto A. Association between smoking and paracoccidioidomycosis: a case-control study in the State of Espírito Santo, Brazil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro 2003; 19(1): 245-253.

Sene, MG. Avaliação do teste ELISA durante o tratamento de pacientes com paracoccidioidomicose: comparação com a imunofluorescência indireta e a micro-imunodifusão dupla em gel de Agar. Dissertação de mestrado - Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, 2001.

Shikanai-Yasuda MA, Filho FQT, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. Guidelines in paracoccidioidomycosis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2006; 39 (3): 297-310.

Silva-Vergara ML, Martinez R. Epidemiological survey with paracoccidioidin and histoplasmin in agricultural coffee area in Ibia, Minas Gerais State, Brazil. *Rev Oberoam Micol* 1998; 15: 294-297.

Silveira-Gomes F, Sarmento DN, Pinto TM, Pimentel RF, Nepomuceno LB, Espírito Santo EPT, Mesquita-da-Costa M, Camargo ZP, Marques-da-Silva SH. Development and Evaluation of a Latex Agglutination Test for the Serodiagnosis of Paracoccidioidomycosis. *Clinical and Vaccine Immunology* 2011; 18 (4): 604-608.

Taborda CP, Camargo ZP. Diagnosis of Paracoccidioidomycosis by Dot Immunobinding Assay for Antibody Detection Using the Purified and Specific Antigen gp43. *Journal of Clinical Microbiology* 1994; 32 (2): 554-556.

Taborda CP, Silva MB, Nosanchuk JD, Travassos LR. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi. *Mycopathologia* 2008; 165(4-5): 331-339.

Terçarioli GR, Bagagli S, Reis GM, Theodoro RC, Bosco SMG, Macores SAG, Richini-Pereira VR. Ecological study of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil: growth ability, conidia production and molecular detection. *BMC Microbiology* 2007; 7 (92): 1-8.

Travassos LR, Taborda CP, Colombo AL. Treatment options for paracoccidioidomycosis and new strategies investigated. *Expert Reviews* 2008; 6 (2): 251-262.

Unterkircher CS, Leão MCP, Blotta MHSL, Camargo ZP. Natural antibodies in Paracoccidioidomycosis. *Brazilian Journal of Microbiology* 2004; 35: 59-63.

Vidal MSM, Benard G, Brito T, Dnatas KC, Pereira NC, França FOS, Silva AMG, Martins JEC. Atypical Serological Response Marked by a Lack of Detectable Anti-gp43 Antibodies in a Patients with Disseminated Paracoccidioidomycosis. *Journal of Clinical Microbiology* 2005; 43 (6): 3014-3016.

Wanke B, Aldê MA. Chapter 6 – Paracoccidioidomycosis. *J Bras Pneumol* 2009; 35 (12): 1245-1249.

Xavier MO, Pasqualotto AC, Cardoso ICE, Severo LC. Clinical and Vaccine Immunology 2009; 16 (1): 132-133.

Yeo SF, Wong B. Current Status of Nonculture Methods for Diagnosis of Invasive Fungal Infection. *Clinical Microbiology Reviews* 2002; 15 (3): 465-484.

Yoshida M, Sanchez MCA, Shikanai-Yasuda MA. Increase Immunoglobulin G anti-*Paracoccidioides brasiliensis* Serum Antibody Avidity as a Predictor of Favorable Posttherapeutic Evolution in Paracoccidioidomycosis. *Clinical and Vaccine Immunology* 2009; 16(11): 1583-1586.

9. ANEXOS

9.1. ANEXO 1

9.1.1. Meios utilizados na Imunodifusão

Ágar 1%

Agar purificado -----1g

Água destilada ----- 100mL

Modo de preparo: fundir o Agar em banho Maria fumegante e utiliza-lo imediatamente para revestimento.

Ágar citrato

Água purificada ----- 1g

NaCl ----- 0,9g

Citrato de sódio ----- 0,4g

Mertiolato ----- 0,01g

Água destilada ----- 100mL

Modo de preparo: misturar tudo em banho Maria fumegante até dissolução. Distribuir em tubos de ensaio.

9.1.2. Preparo das Soluções para o ELISA

TAMPÃO CARBONATO-BICARBONATO (pH=9,6)

Na₂CO₃ ----- 5,25g

NaHCO₃ ----- 4,25g

NaN₃ ----- 3,25g

Água destilada qsp ----- 500mL

Modo de preparo: adicionou-se as substâncias à água lentamente, sob homogeneização constante. Em seguida, o pH foi aferido e ajustado quando necessário.

TAMPÃO CITRATO (pH=4,5)

Ácido Cítrico ----- 9,5g em 500mL de água destilada

NaHPO₄ ----- 7g em 100mL de água destilada

Modo de preparo: adicionou-se ao 100mL de solução de fosfato à solução de ácido cítrico até atingir o pH=4,5. Completou-se o volume para 500mL de água destilada.

TAMPÃO PBS SOLUÇÃO MÃE (10x) (pH=7,4)

NaCl ----- 80g

KCl ----- 2g

Na₂KPO₄ ----- 11,5g

KH₂PO₄ ----- 2g

Água destilada ----- 1.000mL

Modo de preparo: adicionou-se as substâncias à água lentamente, sob homogeneização constante. Em seguida, o pH foi aferido e ajustado quando necessário.

TAMPÃO PBS TWEEN 0,1% (PBS-T)

PBS solução mãe ----- 100mL

Água Destilada ----- 900mL

Tween ----- 1mL

Modo de preparo: adicionou-se a solução de PBS 10x água destilada e em seguida adicionou-se o Tween. Homogenizou-se a solução até a completa mistura das soluções com o Tween.

9.1.3. Cálculo da quantidade do Antígeno para sensibilização da placa de ELISA

A sensibilização da placa foi feita com 5µg do antígeno por poço. Então, por placa, foi adicionado um total de 480µg. Com o valor da dosagem do antígeno, calculo-se a quantidade de solução do antígeno que foi adicionada a cada placa no momento da sensibilização. O primeiro lote do antígeno tinha uma concentração de 36mg/mL.

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

$$36.000 \times V_i = 480 \times 10.000$$

$V_i = 134\mu\text{L}$ da solução do antígeno foi adicionada ao tampão carbonato-bicarbonato no momento da sensibilização da placa

9.2. ANEXO 2

9.2.1. Tabelas com a identificação dos pacientes separados por grupo, o título de anticorpos da Imunodifusão Dupla e ELISA.

Grupo I – Título de anticorpos de 83 Pacientes com paracoccidiodomicose, entre 142 soros. Quando um mesmo paciente tinha mais de um soro, foi considerado o primeiro soro (linhas sem preenchimentos). Os demais soros (com preenchimento cinza) são de pacientes repetidos.

Nº	NOME PACIENTE	ID	ELISA
020/08	EBC	1	1/100
556/10	NDC	1	1/200
122/09	JMS	1	1/400
508/10	ATS	1	1/50
461/10	AGO	1	1/50
441/10	HD	1	1/50
005/07	JLS	1	1/50

232/10	SR	1	1/50
666/09	HD	1	neg
477/08	SRFS	1	neg
394/10	AIN	1	NEG
583/10	JFF	2	1/100
119/10	JMS	2	1/100
184/08	NL	2	1/100
499/10	AA	2	1/200
475/09	JMA	2	1/200
568/10	LG	2	1/200
402/10	ZLA	2	1/400
477/10	AJCS	2	1/50
522/06	FO	2	1/50
300/10	GS	2	1/50
588/10	IGC	2	1/50
200/09	JLS	2	1/50
962/05	JNP	2	1/50
144/10	JVS	2	1/50
364/10	JMS	2	1/50
586/10	JMS	2	1/50
474/08	WFB	2	1/50
459/10	PAV	2	1/200
683/10	GCS	2	1/800
526/09	JS	2	1/800
234/09	WFB	2	1/800
612/10	ZAA	2	1/800
212/10	AA	2	1/50
680/09	BC	4	1/100
211/10	CRS	4	1/100
361/06	NL	4	1/100
133/07	NL	4	1/100
078/10	SAF	4	1/100
599/09	SR	4	1/100

529/10	SR	4	1/100
259/10	VLSS	4	1/100
636/10	JMR	4	1/1600
309/09	GCC	4	1/200
480/10	GM	4	1/200
428/08	HD	4	1/200
340/08	JJC	4	1/200
001/06	NL	4	1/200
237/08	AS	4	1/200
389/10	VLL	4	1/200
467/10	CRS	4	1/3200
631/05	JNP	4	1/400
617/09	AA	4	1/50
036/08	BM	4	1/50
388/06	DAD	4	1/50
134/10	EC	4	1/50
410/06	FO	4	1/50
003/08	FCN	4	1/50
577/09	SRB	4	1/50
022/08	SRFS	4	1/50
143/08	IA	4	1/800
204/08	IA	4	1/800
377/10	IAS	4	1/800
446/08	SFF	4	1/800
082/09	SFF	4	1/800
153/09	WFB	4	1/800
264/09	ZLA	4	1/800
072/07	DAM	4	neg
093/08	AB	8	1/100
552/08	MAM	8	1/100
125/06	OH	8	1/100
228/10	ZLA	8	1/100

492/08	FCN	8	1/200
112/10	FSC	8	1/200
632/08	JJC	8	1/200
300/08	AJCS	8	1/400
377/07	JNP	8	1/400
544/07	JCV	8	1/400
286/10	HR	8	1/50
482/10	IB	8	1/50
023/08	IA	8	1/800
513/08	JLPB	8	1/800
563/08	SR	8	1/800
432/08	TGD	8	1/800
698/09	ESR	16	1/100
405/06	JNP	16	1/1600
413/08	JC	16	1/200
703/09	LG	16	1/200
482/08	PMR	16	1/200
696/09	WLZ	16	1/200
017/08	CSS	16	1/400
243/10	FMS	16	1/400
416/09	JS	16	1/400
010/08	JJC	16	1/400
025/10	JCP	16	1/400
674/10	SFD	16	1/400
928/05	DAM	16	1/50
009/06	DAM	16	1/50
233/10	GNP	16	1/50
402/08	PM	16	1/50
307/10	DFP	16	1/800
017/06	FO	16	1/800
1002/05	JNP	16	1/800
394/09	NDC	16	1/800
117/08	SR	16	1/800

586/05	DAM	32	1/100
158/09	ATS	32	1/1600
443/09	AGP	32	1/1600
215/08	SRB	32	1/1600
508/09	JS	32	1/200
486/08	SRB	32	1/200
591/09	VM	32	1/200
366/07	WFB	32	1/200
444/09	JGL	32	1/3200
338/08	AJS	32	1/400
431/09	AGP	32	1/800
514/09	CRS	32	1/800
664/06	IA	32	1/800
666/10	JRS	32	1/800
531/10	MJF	32	1/800
082/07	SRFS	64	1/100
505/08	MSV	64	1/1600
767/09	SFD	64	1/400
347/07	HD	128	1/400
377/09	IAS	512	1/6400
555/07	JRS	neg	1/100
538/10	NA	neg	1/50
469/09	EBH	neg	1/50
517/10	JL	neg	1/50
636/08	JCV	neg	1/50
591/07	JLS	neg	1/50
005/08	JLS	neg	1/50
129/08	JLS	neg	1/50
557/10	JCLM	neg	1/50
060/07	OH	neg	1/50
383/07	OH	neg	1/50
353/09	IFS	neg	neg
305/10	JJV	neg	neg

605/09	JCV	neg	neg
536/10	JCV	neg	neg
156/09	LR	neg	neg
285/07	OH	neg	neg

Nº - número interno do laboratório usado para identificação das amostras.

Nome do paciente – por motivos de sigilo, foram usados somente as iniciais.

ID – imunodifusão dupla

ELISA – ensaio imunoenzimático

Grupo de acompanhamento (grupo I) – títulos de anticorpos dos 11 pacientes (41 soros) do grupo I que tiveram um acompanhamento sorológico.

Nº PACIENTE	N SORO	NOME PACIENTE	ID	ELISA
P1	366/07	WFB	32	1/200
	474/08		2	1/50
	153/09		4	1/800
	234/09		2	1/800
P2	347/07	HD	128	1/400
	428/08		4	1/200
	666/09		1	neg
P3	005/07	JLS	1	1/50
	591/07		neg	1/50
	005/08		neg	1/50
	129/08		neg	1/50
P4	586/05	DAD	32	1/100
	928/05		16	1/50
	009/06		16	1/50
	388/06		4	1/50
	072/07		4	neg
	544/07	JCD	8	1/400

P5	636/08		neg	1/50
	605/09		neg	neg
P6	017/06		16	1/800
	410/06	FO	4	1/50
	522/06		2	1/50
	001/06		4	1/200
P7	361/06	NL	4	1/100
	133/07		4	1/100
	184/08		2	1/100
	631/05		4	1/400
P8	962/05		2	1/50
	1002/05	JNP	16	1/800
	405/06		16	1/1600
	377/07		8	1/400
	125/06		8	1/100
P9	060/07	OH	neg	1/50
	285/07		neg	neg
	383/07		neg	1/50
P10	082/07		64	1/100
	022/08	SRFS	4	1/50
	477/08		1	neg
P11	664/06		32	1/800
	023/08	IA	8	1/800
	143/08		4	1/800
	204/08		4	1/800

P – número criado para a construção dos gráficos 3, 4 e 5.

Nº - número interno do laboratório usado para identificação das amostras.

Nome do paciente – por motivos de sigilo, foram usados somente as iniciais.

ID – imunodifusão dupla

ELISA – ensaio imunoenzimático

Grupo III – Títulos de anticorpos dos 13 pacientes com diagnóstico confirmado para outras micoses. 11 tinham histoplasnose e 2 deles, aspergilose.

FUNGO	SORO	INICIAIS DO PACIENTE	ID	ELISA
HISTO	961/05	ABR	NEG	1/400
HISTO	966/05	ASV	NEG	1/800
HISTO	970/05	PM	NEG	1/200
HISTO	137/06	PD	NEG	1/1600
HISTO	043/08	ACD	NEG	1/400
HISTO	139/08	JGS	NEG	NEG
HISTO	243/09	ELO	NEG	1/50
HISTO	307/09	PNC	NEG	NEG
HISTO	335/09	ELO	NEG	1/50
HISTO	726/09	CPS	NEG	1/50
HISTO	547/10	EFC	NEG	1/50
ASP	019/09	CMSMN	NEG	1/50
ASP	155/10	CMPL	NEG	NEG
TOTAL		13 PACIENTES		

Nº - número interno do laboratório usado para identificação das amostras.

Fungo – histo (*Histoplasma capsulatum*) e asp (*Aspergillus fumigatus*)

Nome do paciente – por motivos de sigilo, foram usados somente as iniciais.

ID – imunodifusão dupla

ELISA – ensaio imunoenzimático

9.3. ANEXO 3

As Figuras 14 e 15 mostram resultados de IDD. A Figura 14 mostra exemplo de IDD negativa com o soro controle positivo. A Figura 15 mostra (à esquerda), IDD positiva com título de 1:16. Para as amostras em que a leitura não estava muito clara, técnicos mais experientes foram consultados para se estabelecer o resultado final do teste.

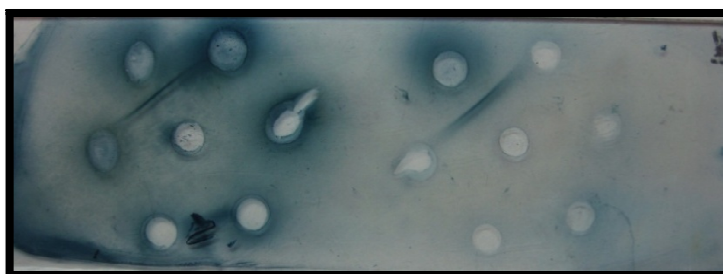


Figura 14: Lâmina de teste da Imunodifusão Dupla negativa.

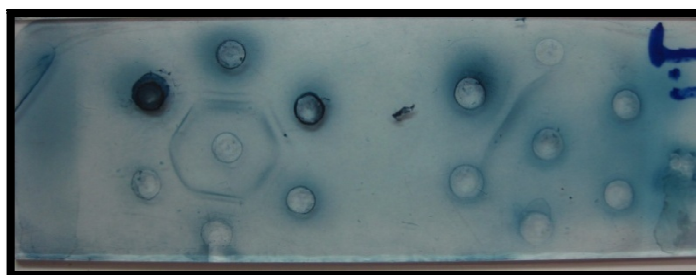


Figura 15: Lâmina de teste de Imunodifusão Dupla positiva (esquerda) com título de 1:16.

A Figura 16 mostra uma placa de ELISA antes da leitura no aparelho de espectrofotometria.



Figura 16: montagem da placa de ELISA com os controles positivos e negativos, uma amostra de pacientes do controle saudável e uma amostra de pacientes positivo do grupo I.