

MOISÉS GUEDES DE SENE

**AVALIAÇÃO DO TESTE ELISA DURANTE
O TRATAMENTO DE PACIENTES
COM PARACOCCIDIOIDOMICOSE: COMPARAÇÃO
COM A IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA E
A MICRO-IMUNODIFUSÃO DUPLA
EM GEL DE ÁGAR**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Patologia da
Faculdade de Medicina de Botucatu -
UNESP, para obtenção do título de
Mestre.**

Orientador: Prof. Dr. Júlio Defaveri

Botucatu
2001

Aos meus pais,
Geraldo (in memorian) e Divanir,
que nunca mediram esforços para que
eu pudesse concretizar meus objetivos,
pelo amor e incentivo constantes.

À minha noiva ***Juliana***
e aos meus irmãos,
Gustavo e Ana Márcia,
por todo apoio que me deram, pelo
amor e compreensão.

Ao *Professor **Julio Defaveri***, que me
recebeu e que muito contribuiu para meu
ingresso no meio científico.

Pela confiança depositada, pelo apoio e
sugestões nos momentos mais difíceis.

*Ao Professor **Rinaldo Poncio Mendes**,*
pesquisador exigente, cuja dedicação à
ciência e à formação científica o
tornaram um exemplo a ser seguido.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível graças à colaboração direta ou indireta de muitas pessoas. Manifestamos nossa gratidão a todas elas e de forma particular:

aos funcionários e amigos do Laboratório de Imunopatologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, **Sras. Maria Isabel C. Silva, Izáira M. de Carvalho, Soraia I. de Oliveira e Fernanda Maria D. Rodrigues**, pela colaboração na execução de diversas atividades práticas e, em especial, à **Sra. Laura F. de Castro** e ao **Sr. Claudinei J. Figueira**, pelo auxílio na preparação dos exames laboratoriais e preparo dos antígenos;

a todos os colegas do Curso de Pós-Graduação em Patologia, especialmente às pós-graduandas **Rita de Cássia Alves Siqueira** e **Patrícia de Medeiros Rocha**, por todo auxílio que deram em muitas etapas deste trabalho e pela amizade;

à **Profa. Dra. Denise Fecchio**, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, que sempre incentivou e colaborou para minha formação acadêmica e científica;

à Profa. **Dra. Daisy Maria Fávero Salvadori**, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, por todas as atenções dispensadas diante de minhas solicitações como aluno de Pós-graduação;

à **Tânia Alice Andrade**, secretária do Curso de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, pela eficiência em resolver os empasses burocráticos referentes ao Curso de Pós-graduação e pela amizade;

à **Profa. Dra. Lídia Raquel de Carvalho**, do Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências, UNESP, pelo tratamento estatístico dos dados obtidos e pela análise dos resultados;

a todos os docentes da Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP e, em especial, ao **Prof. Dr. Rinaldo Poncio Mendes**, por ter cedido informações clínicas dos pacientes incluídos no estudo e, principalmente, pela análise crítica dos resultados e sugestões sempre pertinentes;

aos funcionários da Biblioteca do Campus de Botucatu e, em especial, à **Sra. Marluci Betini**, pela orientação quanto à busca do material bibliográfico;

aos funcionários da Secção de Pós-graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, **Vera Lúcia A. Mengue, Regina C. Spadin, Lilian Cristina N. B. Nunes, Adnice Ruiz P. Leme e Nathanael Pinheiro Salles**, pela atenção nas solicitações e pela cordialidade;

à **Profa. Dra. Maria Cristina I. Mattos**, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, por ceder gentilmente a

imagem de microscopia de varredura eletrônica do *Paracoccidioides brasiliensis*;

à **CAPES**, pela bolsa de estudo cedida.

**Quando as portas da percepção forem
limpas, veremos as coisas como elas
realmente são, infinitas.**

William Blake

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunopatologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	Esquema representativo do tratamento e monitoramento sorológico da paracoccidiodomicose.....	15
FIGURA 2-	Reações de imunofluorescência indireta (IFI) mostrando fluorescência em células fúngicas.....	34
FIGURA 3-	Reações de imunodifusão dupla em gel de ágar (ID) mostrando bandas de precipitação em soros diluídos.....	35

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1-	Evolução sorológica da imunodifusão dupla em gel de ágar (ID), imunofluorescência indireta (IFI) e a reação imunoenzimática (ELISA) durante o tratamento de 11 pacientes com a forma aguda da paracoccidiodomicose.....	37
GRÁFICO 2-	Evolução sorológica da imunodifusão dupla em gel de ágar (ID), imunofluorescência indireta (IFI) e a reação imunoenzimática (ELISA) durante o tratamento de 18 pacientes com a forma crônica da paracoccidiodomicose.....	38
GRÁFICO 3-	Exemplo do comportamento da imunofluorescência indireta (IFI) e do teste imunoenzimático (ELISA) em 2 casos agudos da paracoccidiodomicose com cura sorológica pela imunodifusão dupla em gel de ágar (ID).....	46
GRÁFICO 4-	Exemplo do comportamento da imunofluorescência indireta (IFI) e do teste imunoenzimático (ELISA) em 2 casos crônicos da paracoccidiodomicose com cura sorológica pela imunodifusão dupla em gel de ágar (ID).....	47

LISTA DE TABELAS

TABELA	1-	Distribuição dos pacientes com diferentes formas clínicas da paracoccidiodomicose em grupos de estudo, conforme a fase de tratamento.	20
TABELA	2-	Tempo de seguimento, após instituição do tratamento anti-fúngico, de 39 pacientes com paracoccidiodomicose, segundo a forma clínica.....	21
TABELA	3-	Reação de imunofluorescência indireta: distribuição dos resultados sorológicos obtidos em pacientes com paracoccidiodomicose (Pbmicoses), doadores e pacientes com outras micoses sistêmicas no período pré-tratamento de acordo com os títulos de anticorpos.....	30
TABELA	4-	Reação de imunodifusão dupla: distribuição dos resultados sorológicos obtidos em pacientes com paracoccidiodomicose (Pbmicoses), doadores e pacientes com outras micoses sistêmicas no período pré-tratamento de acordo com os títulos de anticorpos.....	31
TABELA	5-	Reação imunoenzimática (ELISA): distribuição dos resultados sorológicos obtidos em pacientes com paracoccidiodomicose (Pbmicoses), doadores e pacientes com outras micoses sistêmicas no período pré-tratamento de acordo com os títulos de anticorpos.....	32
TABELA	6-	Distribuição dos resultados de sensibilidade, especificidade, valores preditivos e eficiência da imunofluorescência indireta (IFI), imunodifusão dupla em gel de ágar (ID) e teste imunoenzimático obtidos a partir de estudo em pacientes com paracoccidiodomicose, doadores e pacientes com outras micoses sistêmicas no período pré-tratamento.	33
TABELA	7-	Distribuição dos resultados sorológicos obtidos em 413 amostras de soro de 39 pacientes com paracoccidiodomicose coletadas antes e durante o	

tratamento anti-fúngico. Correlação entre a imunodifusão dupla em gel de ágar (ID) e a imunofluorescência indireta (IFI), de acordo com o teste de correlação de Spearman. 39

- TABELA 8-** Distribuição dos resultados sorológicos de 365 amostras de soro de 39 pacientes com paracoccidioidomicose obtidos durante o tratamento anti-fúngico. Correlação entre a imunofluorescência indireta (IFI) e o teste imunoenzimático (ELISA), de acordo com o teste de correlação de Spearman..... 40
- TABELA 9-** Distribuição dos resultados sorológicos de 382 amostras de soro de 39 pacientes com paracoccidioidomicose obtidos durante o tratamento anti-fúngico. Correlação entre a imunodifusão dupla em gel de ágar (ID) e o teste imunoenzimático (ELISA), de acordo com o teste de correlação de Spearman..... 41
- TABELA 10-** Distribuição de 39 pacientes com paracoccidioidomicose sob tratamento anti-fúngico, de acordo com a evolução da pesquisa de anticorpos séricos anti-Paracoccidioides brasiliensis. Comparação da reação imunodifusão dupla em gel de ágar (ID) com o teste imunoenzimático (ELISA), pelo teste da binomial. 42
- TABELA 11-** Distribuição de 39 pacientes com paracoccidioidomicose sob tratamento anti-fúngico, de acordo com a evolução da pesquisa de anticorpos séricos anti-Paracoccidioides brasiliensis. Comparação da reação imunodifusão dupla em gel de ágar (ID) com a imunofluorescência indireta(IFI), pelo teste da binomial. 43
- TABELA 12-** Distribuição de 39 pacientes com paracoccidioidomicose sob tratamento anti-fúngico, de acordo com a evolução da pesquisa de anticorpos séricos anti-Paracoccidioides brasiliensis. Comparação da reação imunofluorescência indireta (IFI) com o teste imunoenzimático (ELISA), pelo teste da binomial. 43
- TABELA 13-** Avaliação do teste imunoenzimático (ELISA) em 16 pacientes com cura sorológica* pela imunodifusão dupla (ID): distribuição dos tempos para negatificação da ID e

do teste ELISA durante o tratamento de 5 pacientes com a forma aguda e 11 com a forma crônica da paracoccidioidomicose..... 45

ABREVIATURAS

μ g = micrograma

μ l = microlitro

Ag-FC/S = mistura do filtrado de cultura com antígeno somático de *P. brasiliensis*

CIE = contraimunoeletroforese

cut-off = limite de reatividade do teste

ELISA = ensaio imunoenzimático (enzyme linked immunosorbent assay)

FC = fixação de complemento

g = grama

h = hora

ID = imunodifusão dupla em gel de ágar

IFI = imunofluorescência indireta

Ig = imunoglobulina

m = minuto

ml = mililitro

°C = graus Celsius

P. brasiliensis = *Paracoccidioides brasiliensis*

Pbmicoe = paracoccidioidomicose

PBS = solução salina tamponada

PBS-Molico5% = solução salina tamponada + leite Molico a 5%

rpm = rotações por minuto

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	16
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	18
3.1. Casuística	19
3.1.1. Critérios para inclusão e exclusão dos pacientes.....	20
3.1.2. Grupos de estudo	20
3.2. Material e métodos	22
3.2.1. Antígenos	22
3.2.1.1. Preparo do antígeno filtrado de cultura/antígeno somático	22
3.2.1.2. Preparo do antígeno para imunofluorescência indireta.....	23
3.2.2. Obtenção dos soros	24
3.2.3. Dosagem de anticorpos <i>anti-P.brasiliensis</i>	24
3.2.3.1. Imunofluorescência indireta	24
3.2.3.2. Imunodifusão dupla (micrométodo) em gel de ágar	25
3.2.3.3. Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	26
3.2.4. Análise estatística	27
3.2.5. Normas bibliográficas.....	28
4. RESULTADOS.....	29
4.1. Avaliação dos testes sorológicos no GRUPO PRÉ-TRATAMENTO	30

4.2. Avaliação dos testes sorológicos no GRUPO EM TRATAMENTO	36
4.3. Avaliação do ELISA no GRUPO CURA SOROLÓGICA	44
5. DISCUSSÃO.....	48
6. CONCLUSÕES.....	57
7. RESUMO.....	60
8. ABSTRACT	63
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

1. INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (Pbmicose), uma das mais importantes micoses sistêmicas da América Latina, é causada pelo *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*), um fungo termodimórfico que, em temperatura ambiente, apresenta-se sob a forma filamentosa ou micelial e, a 37° C, sob a forma de levedura representada por células arredondadas com parede de dupla membrana, exibindo brotamento simples ou múltiplo ^{1,2}.

A composição antigênica do *P. brasiliensis* é complexa e constituída por lipídios, polissacarídeos e proteínas, que se encontram em proporções variáveis, dependendo da virulência da cepa e do seu dimorfismo térmico ^{3,4}.

A penetração do *P. brasiliensis* no hospedeiro ainda não está totalmente esclarecida. Parece acontecer com maior freqüência pela inalação de conídios, que alcançam as vias aéreas superiores e chegam até os pulmões estabelecendo a infecção. Outra via, menos comum, seria a invasão, em geral traumática, de pele ou mucosas ⁵.

No organismo, o *P. brasiliensis* pode ser imediatamente destruído ou então multiplicar-se, produzindo uma lesão de inoculação que, associada à disseminação do fungo para os linfonodos regionais, constitui o complexo primário. Esta lesão pode regredir ou progredir, dependendo de vários fatores ligados ao fungo e ao hospedeiro. Na regressão, o fungo pode ser destruído, ocorrendo cicatrização local (cicatriz estéril) ou persistir,

formando um foco quiescente, com fungos viáveis. A progressão determina o aparecimento de sinais e sintomas⁶.

Grande parte dos indivíduos infectados não desenvolve a doença, mas positiva os testes cutâneos de hipersensibilidade tardia, o que caracteriza a infecção paracoccidioidomicótica⁶.

A Pbmicose tem como principais apresentações clínicas as formas aguda e crônica. A forma aguda ou subaguda, que geralmente se desenvolve a partir de lesão primária não detectada, afeta pessoas jovens de ambos os sexos e progride rapidamente, com disseminação linfática e hematogênica para órgãos linfóides e hematopoiéticos, isto é, baço, fígado, linfonodos e medula óssea, constituindo quadro infeccioso grave^{6,7}.

A forma crônica da doença, que se desenvolve a partir do complexo primário ou de foco quiescente (reinfecção endógena), afeta em geral adultos do sexo masculino. O comprometimento pulmonar é a regra em pacientes com esta forma clínica. As lesões podem permanecer localizadas, caracterizando a forma unifocal ou disseminar constituindo a forma multifocal, cuja gravidade é variável^{6,7}.

A imunidade à infecção envolve um constante combate entre as defesas do hospedeiro e os microorganismos. Na Pbmicose, como em outras micoses sistêmicas, o curso e o resultado da infecção são determinados principalmente pelas interações entre o fungo *P.brasiliensis* e os mecanismos de defesa do hospedeiro.

No hospedeiro, as interações com o parasita causam respostas imunes específicas e inespecíficas. A resposta imune resulta da

proliferação e diferenciação de clones de linfócitos T e B. Neste contexto, a principal função dos linfócitos B é a produção de imunoglobulinas. Estas proteínas desempenham um papel crucial na defesa contra uma variedade de microrganismos, estando presentes em elevadas concentrações e sob formas estáveis nos fluídos corpóreos. Estas propriedades conferem às imunoglobulinas uma relativa facilidade para sua detecção e quantificação, proporcionando um dos principais critérios de avaliação da presença do microrganismo e de atividade da doença, constituindo o sorodiagnóstico⁸. Além disso, a redução dos níveis séricos de imunoglobulinas, a partir da instituição do tratamento, permite que essa variável seja utilizada para monitorar a doença e para avaliação da terapêutica, como critério de cura^{15,16,75}.

A ativação policlonal de linfócitos B é um fenômeno bem documentado em várias doenças infecciosas^{10,11,12,13,14}. Nesse processo, ocorre o aumento de células secretoras de imunoglobulinas, e consequente hipergamaglobulinemia e aumento de complexos imunes circulantes. Na Pbmicose, vários estudos mostraram que há grande reatividade da imunidade humoral^{17,18,19}, com níveis séricos aumentados de IgG^{15,18,20,22}, IgE²³ e IgA^{18,20,24}, cujos níveis guardam relação direta com a gravidade do caso.

Diversos testes sorológicos foram desenvolvidos na tentativa de auxiliar no diagnóstico e no monitoramento de pacientes submetidos ao tratamento específico. Os principais testes desenvolvidos para a Pbmicose incluem a fixação de complemento (FC), testes de precipitação, tais como o

de precipitação em tubos, a imunodifusão dupla em gel de ágar (ID), contraimunoeletroforese (CIE), imunoeletroforese, o teste de imunofluorescência indireta (IFI), testes imunoenzimáticos (ELISA) e o Western-Blot. Em alguns casos, o resultado sorológico é a primeira indicação da natureza micótica da doença.

O valor do teste sorológico no diagnóstico da doença pode ser determinado de acordo com algumas características específicas da reação, destacando-se a sensibilidade e a especificidade. Estes parâmetros estão estritamente relacionados aos antígenos expressos pelo microrganismo usado, à qualidade do sinal produzido no teste e ao *cut-off* adotado. Entretanto, as informações sorológicas obtidas pela utilização destes testes serão válidas se outros parâmetros forem levados em consideração, tais como dados clínicos e epidemiológicos²⁵.

Na Pbmicose, a sensibilidade dos testes sorológicos varia de 90 a 95% e pode alcançar 100%, dependendo do teste utilizado e do estágio da doença. A especificidade varia de acordo com o tipo de teste utilizado, e em geral é elevada. Poucos resultados falso-positivos foram registrados em pacientes com tuberculose, mal de Hansen, candidíase, criptococose e aspergilose²⁵. Entretanto, reações cruzadas foram observadas em casos de histoplasmose e doença de Jorge Lobo, devido à existência de epítomos comuns entre o *P. brasiliensis*, o *H. capsulatum* e o *Paracoccidioides lobo*^{27,28}.

O primeiro registro do uso de um teste sorológico no estudo da Pbmicose refere-se à fixação de complemento (FC), descrita por Moses

em 1916⁹. Utilizando como antígeno da reação um extrato salino de *P. brasiliensis*, o autor obteve resultados promissores para a época, visto que a FC teve uma sensibilidade de 80%. A partir deste estudo pioneiro, vários autores relataram o uso da FC para avaliação sorológica na Pbmicose^{29,30,32,33}.

Em 1955, Fava Netto²⁹ coordenou estudos para a padronização da FC. Utilizando um complemento titulado com 50% de hemólise e um antígeno polissacarídeo de *P. brasiliensis*, o autor observou sensibilidade de 90% com a FC. Fava Netto³⁰ demonstrou que pacientes com doença localizada apresentam baixos títulos de anticorpos, e que em casos de doença disseminada os títulos eram elevados. Esses resultados sugeriam que a reação de FC seria útil não apenas no diagnóstico, mas também na determinação do grau de disseminação e, portanto, de sua gravidade. Os títulos de anticorpos tendiam a diminuir durante e ao fim do tratamento, decréscimo que foi observado em pacientes com melhor resposta clínica. Observou também que, em alguns casos, anticorpos podiam ainda ser detectados mesmo após completa regressão clínica da doença, fenômeno que recebeu denominação de “cicatriz sorológica”.

Em revisão da literatura, observa-se que a sensibilidade da FC varia entre 70 e 100% e a especificidade entre 60 e 90%^{29,30,34} com valores preditivos e eficiência de aproximadamente 80%^{35,36}. Apesar de sua boa sensibilidade, detectando níveis tão baixos quanto 0,1µg de anticorpo por mililitro de soro, a FC mostrou-se de uso limitado devido à baixa

especificidade, à complexidade de sua realização e o grande consumo de reagentes^{28, 30,34}.

Outro teste usado regularmente no imunodiagnóstico e monitoramento de pacientes com Pbmicose é a imunodifusão dupla em gel de ágar (ID), que pertence à categoria dos testes de precipitação em gel. Desde sua introdução por Ouchterlony³⁷, em 1949, várias modificações da técnica de ID têm sido introduzidas, de acordo com sua aplicação em cada doença. Atualmente, a ID é o teste sorológico mais utilizado na Pbmicose.

Lacaz *et al.*³⁸ relataram a primeira ocorrência de precipitação entre o soro de pacientes com Pbmicose e antígenos de *P. brasiliensis* em gel de ágar. O sobrenadante de uma cultura de fungos rompidos por ação mecânica foi usado como fonte de antígenos. Além disso, os pesquisadores demonstraram que, utilizando o mesmo preparado antigênico, os soros que apresentavam anticorpos pelo teste de ID também revelaram reações positivas pela fixação de complemento.

O uso da ID para diagnóstico da Pbmicose foi introduzido por Restrepo³⁹, que observou nível de sensibilidade de 90%. A autora observou, também, que o teste ofereceu vantagens adicionais para controle do tratamento, visto que pacientes com cura clínica apresentaram resultados negativos.

A quantidade de bandas de precipitação observada na ID depende do tipo de antígeno e condições de realização do teste. O número de bandas parece se correlacionar com a gravidade da doença e a redução de seu número ou de sua intensidade foi observada em pacientes que

respondiam ao tratamento. Este achado faz da ID uma boa ferramenta para o diagnóstico e para o seguimento dos pacientes, indicações que podem ser melhor exploradas se títulos forem determinados e curvas sorológicas obtidas^{45,46,47}.

Restrepo & Moncada⁴⁰ usaram como antígeno um filtrado de leveduras do *P. brasiliensis* e obtiveram três bandas de precipitação. A primeira banda (banda 1) estava localizada próximo ao orifício do antígeno, a segunda (banda 2) ocupou uma posição intermediária e a última (banda 3) estava próxima ao orifício do soro. Esses autores fizeram o seguimento sorológico de dezoito pacientes, com avaliação antes, durante e após tratamento. A banda 3 foi a primeira a desaparecer, seguida pela banda 2 e, finalmente pela banda 1, que permaneceu por um período de tempo considerável. Decorridos dois a três anos de seguimento, 85,7% dos pacientes perderam a banda 3, 75% a banda 2 e apenas 27% deixaram de apresentar a banda 1. Alguns anos mais tarde, verificou-se que a banda 1 era formada pelo antígeno E₂, descrito por Yarzabal *et al.*^{41,42}, o qual corresponde à glicoproteína específica gp43 descrita por Puccia *et al.*⁴⁴.

Apesar da grande especificidade da ID, reações cruzadas são possíveis e têm sido relatadas em soros de pacientes com outras micoses sistêmicas, particularmente com a histoplasmose^{28,48,49}.

Em decorrência desta reatividade cruzada, apresentada não só pela ID, mas principalmente por outros testes, e de um menor grau de sensibilidade apresentado pela ID, vários autores têm empenhado esforços na busca de melhores resultados, por meio de variações da técnica e das

preparações antigênicas do *P. brasiliensis*. Assim, Camargo *et al.*⁵⁰, em 1988, utilizando exoantígenos do *P. brasiliensis* como fonte de antígenos para a ID, testou soros de 70 pacientes com Pbmicose confirmada por diagnóstico micológico e soros de outros 79 indivíduos com outras micoses profundas, encontrando sensibilidade de 97,1% e especificidade de 100%.

Da mesma maneira, Silva *et al.*⁵¹, utilizando uma preparação antigênica do *P. brasiliensis* constituída por uma mistura do filtrado de cultura e do antígeno sonicado, conseguiram aumentar a sensibilidade do teste. Esta mistura antigênica foi testada contra soros de pacientes com Pbmicose e soros de pacientes com outras micoses sistêmicas, pela micro-imunodifusão (mID)⁵², macro-imunodifusão (MID) e teste ELISA. Observaram que todos os testes apresentaram melhores resultados de sensibilidade do que com os antígenos usados separadamente. Além disso, relataram elevada especificidade (97%) utilizando esta mistura antigênica. Nesse trabalho, a mID forneceu melhores resultados que a MID. Por fim, os resultados obtidos com o ELISA indicavam maior utilidade no monitoramento sorológico dos pacientes do que quando realizado com os antígenos usados separadamente.

O “cell-free antigens (CFA)”, descrito por Camargo *et al.*⁵³, mostrou excelente reatividade contra soros de 30 pacientes com Pbmicose resultando numa sensibilidade de 100%. Quando testado com soros de 10 pacientes com histoplasmose, aspergilose e candidíase e 20 com doença de Jorge Lobo, apresentou especificidade de 100%, evidenciando a importância do tipo de antígeno na eficácia e confiabilidade do teste sorológico.

Outro aspecto muito importante, que diz respeito à imunodifusão dupla e que merece ser ressaltado em amostras com títulos de anticorpos elevados é a ausência de reação prozona⁵⁴.

Em resumo, a imunodifusão dupla em gel de ágar oferece grandes vantagens ao sorodiagnóstico da Pbmicose, por permitir um diagnóstico acurado, ser técnica relativamente simples, e apresentar boa correlação com a evolução clínica durante o tratamento⁷⁹.

A contra-imunoeletroforese (CIE) e a imunofluorescência indireta (IFI) são testes que também têm sido aplicados no sorodiagnóstico da Pbmicose. Vários pesquisadores adotaram a CIE e utilizaram antígenos extraídos de suspensões de células sonicadas⁵⁵ ou de filtrados de culturas^{56,57}. Níveis de sensibilidade entre 77 e 97% e índices de especificidade acima de 95% foram relatados, obtendo-se valor preditivo de 100% e de eficiência entre 94 e 97%. Correlação positiva foi observada entre melhora clínica e declínio nos níveis de anticorpos^{48,55,57}.

A IFI tem sido utilizada no estudo da relação antigênica entre fungos patogênicos⁵⁸ e, na Pbmicose, principalmente no sorodiagnóstico^{59,60,61,62,63,64}. Duas das principais vantagens da reação de IFI residem na possibilidade de aplicação do teste em soros anti-complementares²⁵ e na caracterização de isótopos de imunoglobulinas anti-*P. brasiliensis*²⁰.

Em 1973, Franco *et al.*⁶⁰ padronizaram a técnica de IFI e simplificaram a preparação do antígeno para a reação. Esses pesquisadores relataram sensibilidade de 100%, utilizando *cut-off* de 1:4, não observando

positividade em soros controles. Entretanto, neste estudo não foram incluídos pacientes com outras micoses sistêmicas, o que poderia comprometer a especificidade do teste dado o baixo limite de reatividade adotado. Alguns anos mais tarde, Petana *et al.*⁶¹ obtiveram resultados similares aos de Franco *et al.*⁶⁰ usando um *cut-off* de 1:10.

Cerca de uma década depois, Mistreta *et al.*⁶² relataram importantes resultados durante o seguimento sorológico de pacientes com Pbmicose submetidos ao tratamento. Os autores verificaram que, um ano após o tratamento, houve diminuição dos títulos de anticorpos pela IFI em 66,2% dos pacientes. Com um *cut-off* de 1:32, o teste apresentou sensibilidade de 85,2%, antes da introdução do tratamento. No entanto, a especificidade não foi avaliada.

O valor apropriado do *cut-off* para a IFI foi discutido em alguns estudos^{63,64}. De acordo com as condições de trabalho do Laboratório de Imunopatologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, os melhores resultados de sensibilidade e especificidade com a IFI foram obtidos com *cut-off* de 1:64.

Apesar da boa sensibilidade do método, reações cruzadas são freqüentes, principalmente em soros de pacientes com histoplasmose⁶³ e isto tem conferido menor grau de especificidade à reação de IFI. Além disso, outros problemas têm limitado o uso da IFI no sorodiagnóstico da Pbmicose, como a necessidade de equipamentos sofisticados e de pessoas bem treinadas, além da subjetividade na avaliação da reação.

Além das técnicas já comentadas, outros procedimentos sorológicos têm sido empregados na Pbmicose, tais como a imunoperoxidase⁶⁵, o Dot-blot^{71,78}, o MELISA^{47,68,69} (magnetic enzyme linked immunosorbent assay) e o ELISA^{26,66,67,70,71,72,76,77,85,87,88} (enzyme linked immunosorbent assay).

O teste ELISA oferece algumas vantagens, tais como a relativa simplicidade de realização, a capacidade de fornecer resultados quantitativos, a durabilidade dos reagentes que podem ser estocados com segurança e, também, a elevada sensibilidade, sendo capaz de detectar níveis baixos de anticorpos, tal como 0,05µg/ml²⁵. Além disso, diferentes classes de imunoglobulinas podem ser determinadas, permitindo uma avaliação mais precisa da resposta imune humoral dos pacientes^{70,71,72}.

Os primeiros estudos envolvendo o teste ELISA na Pbmicose foram realizados por Mendes-Giannini *et al.*^{66,67}. Esses pesquisadores padronizaram o ELISA, utilizando como antígeno filtrado de cultura de leveduras do *P. brasiliensis*. Com títulos maiores ou iguais a 1:40, mostraram que o teste alcançou 100% de sensibilidade e 88% de especificidade. A falta de especificidade foi observada em soros de pacientes com histoplasmose e doença de Jorge Lobo.

A sensibilidade e a especificidade do teste imunoenzimático (ELISA) podem variar, dependendo do antígeno empregado na reação e do *cut-off* adotado. Camargo *et al.*⁷⁶, utilizando como antígeno um filtrado de cultura do fungo e adotando um *cut-off* de 1:400, avaliaram o ELISA em pacientes com Pbmicose e com outras micoses sistêmicas, demonstrando

sensibilidade de 95% e especificidade de 97%. Neste trabalho, entretanto, não foram avaliados soros de pacientes durante o tratamento. Em 1986, Cano *et al.*²⁶ utilizaram o ELISA com antígenos citoplasmáticos e mostraram que 66% dos soros reagiram a títulos maiores ou iguais a 1:128. Apenas 4-5% dos soros de doadores normais, pacientes com histoplasmose e outras micoses sistêmicas reagiram a essa diluição, conferindo 95% de especificidade ao teste. Fato relevante deste trabalho foi a utilização do teste para o monitoramento de pacientes sob tratamento, que revelou declínio gradual dos níveis de anticorpos séricos com a regressão da doença.

Recentemente, com a dosagem de diferentes classes de imunoglobulinas para diagnóstico e seguimento de pacientes com Pbmicose foi demonstrado que o teste ELISA para detecção de IgG e IgM apresentou melhores resultados de eficiência (100%) quando comparado com a IFI (96,2%), a CIE (94,4%) e a FC (75,9%). O ensaio ELISA para IgG e IgA proporcionou valores preditivos positivos e negativos máximos (100%). Além disso, os níveis de IgG e IgM diminuíram após quatro a seis meses de tratamento para os casos agudos da doença⁷⁰.

Del Negro *et al.*^{87,88} seguiram 27 pacientes por dois anos e mostraram declínio de anticorpos pela fixação de complemento, contraímuno eletroforese e ELISA. Os autores ainda afirmaram que somente pacientes com a forma crônica unifocal apresentaram resultados negativos pela FC e ELISA após um ano de tratamento, e após dois anos pela CIE, sugerindo que estes pacientes poderiam necessitar de uma nova terapia.

Pacientes com outras formas clínicas precisaram de dois anos ou mais de terapia, para negativar os testes sorológicos.

Com relação ao tratamento da Pbmicose, uma das maiores dificuldades encontra-se no estabelecimento de critérios de cura. Atualmente, tais critérios são baseados em dados clínicos, micológicos, radiológicos e sorológicos⁷⁴. O protocolo de tratamento aqui considerado é o proposto por Mendes *et al*⁷⁵, e vem sendo utilizado pelo Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por imagem da Faculdade de Medicina de Botucatu. Assim, após confirmação da doença através de diagnóstico micológico, os pacientes são submetidos inicialmente ao tratamento de ataque, o qual é mantido até o desaparecimento das manifestações clínicas, normalização dos valores de hemossedimentação, redução das lesões radiológicas e diminuição dos níveis séricos de anticorpos (Figura 1). Com isso, é instituído um tratamento de manutenção, que se prolonga até a ID se tornar negativa. A partir deste momento, o tratamento de manutenção ainda é mantido por 12 meses (Figura 1).

A reação de imunodifusão dupla em gel de ágar apresenta baixa sensibilidade em relação ao ensaio imunoenzimático (ELISA), detectando anticorpos na quantidade mínima de 3 µg/ml²⁵, tornando-se mais úteis apenas nas fases iniciais do tratamento, quando os níveis de anticorpos geralmente ainda estão elevados. Nas fases mais tardias, com a diminuição dos níveis de anticorpos, há a necessidade de técnicas mais sensíveis, capazes de detectá-los.

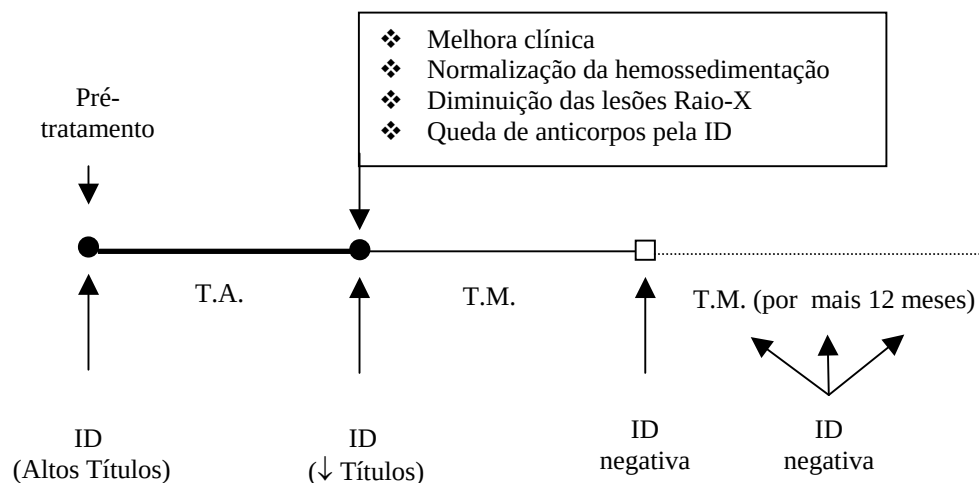


FIGURA 1- Esquema representativo do tratamento e monitoramento sorológico da paracoccidiodomicose, segundo Mendes *et al.*⁷⁵. Notar que o tratamento de manutenção ainda é mantido 12 meses após o encontro de sorologia negativa pela imunodifusão dupla em gel de ágar.

T.A. = Tratamento de ataque; T.M. = Tratamento de manutenção;

ID = imunodifusão dupla em gel de ágar

Estudos com diversos testes sorológicos^{26,35,45,47,51,62,70,71,87,88} demonstraram que pacientes com Pbmicose tendem a apresentar uma queda nos níveis de anticorpos durante o tratamento. Porém, o tempo que cada teste leva para negativar ainda não está totalmente esclarecido.

Considerando o exposto, a aplicação do teste ELISA no monitoramento dos pacientes no decorrer do tratamento e principalmente naqueles doentes em fase de cura sorológica pela ID pode trazer contribuições importantes ao controle de cura da Pbmicose.

2. OBJETIVOS

Considerando o exposto, os objetivos do trabalho foram os seguintes:

1. Determinar os parâmetros sorológicos de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e eficiência dos testes ID, IFI e ELISA no período pré-tratamento.
 2. Avaliar o emprego do teste imunoenzimático (ELISA) durante o tratamento de pacientes com as formas aguda e crônica da Pbmicose, correlacionando-as com os resultados da ID e da IFI.
 3. Avaliar a detecção de anticorpos anti-*P. brasiliensis* pelo teste ELISA em pacientes com sorologia negativa pela ID.
 4. Comparar o tempo necessário para o teste ELISA e a ID negativarem-se.
-

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

Este trabalho teve aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, conforme ofício 118/2000.

3.1. Casuística

Foram estudados 49 pacientes com paracoccidioidomicose confirmada pelo encontro do agente etiológico em escarro, aspirado de linfonodos e, ou, raspado ou exame histopatológico de biópsias tecido, atendidos na Enfermaria e no Ambulatório de Paracoccidioidomicose, da Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP.

Como controle negativo, foram utilizadas 30 amostras de soro provenientes de 30 doadores de sangue do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP. Estes soros passaram por uma bateria de exames sorológicos, os quais foram negativos. Também foram analisados 10 pacientes com outras micoses sistêmicas, seis dos quais com histoplasmose, um com actinomicose, um com criptococose, um com aspergilose e um com adiaspiromicose. Estes pacientes também foram atendidos na Enfermaria e no Ambulatório de Paracoccidioidomicose, da Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP.

Os testes sorológicos foram realizados no Laboratório de Imunopatologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP.

3.1.1. Critérios para inclusão e exclusão dos pacientes

Os critérios para inclusão dos pacientes foram confirmação da doença pela identificação do *P. brasiliensis* em material biológico e assinatura do termo de consentimento para participação em estudo clínico. Para exclusão, os critérios utilizados foram presença de outras doenças em atividade, concomitantes à paracoccidioidomicose, uso de corticosteróides ou outras drogas imunossupressoras e gravidez.

3.1.2. Grupos de estudo

Os testes de IFI, ID e ELISA foram realizados em três grupos de estudo, de acordo com a fase de tratamento dos pacientes com diferentes formas clínicas da Pbmicose, conforme demonstra a tabela 1.

A avaliação da evolução dos níveis de anticorpos séricos anti-*P. brasiliensis* foi feita em 39 pacientes. O seguimento foi de um a 24 meses em 16 desses pacientes, de 25 a 48 meses em 18 deles e por mais de quatro anos nos outros cinco doentes, como se observa na tabela 2.

TABELA 1- Distribuição de 49 pacientes com diferentes formas clínicas da paracoccidioidomicose em grupos de estudo, conforme a fase de tratamento.

Grupos de estudo	Amostras (soros)	Pacientes (número de casos)	
		Forma Aguda/subaguda	Forma Crônica
PRÉ-TRATAMENTO	39	13	26
EM TRATAMENTO	383	12	27
CURA SOROLÓGICA*	159	5	11

* pacientes com pelo menos 12 meses de sorologia negativa pelo teste de imunodifusão dupla em gel de ágar.

TABELA 2 - Tempo de seguimento, após instituição do tratamento anti-fúngico, de 39 pacientes com paracoccidioidomicose, segundo a forma clínica.

Paciente (número)	Forma clínica	Tempo de seguimento (meses)
37	Aguda/Subaguda	41
38	Aguda/Subaguda	50
19	Aguda/Subaguda	21
31	Aguda/Subaguda	31
1	Aguda/Subaguda	14
6	Aguda/Subaguda	15
33	Aguda/Subaguda	36
34	Aguda/Subaguda	39
9	Aguda/Subaguda	19
10	Aguda/Subaguda	20
23	Aguda/Subaguda	23
7	Aguda/Subaguda	27
2	Crônica	17
3	Crônica	19
5	Crônica	19
8	Crônica	20
11	Crônica	21
12	Crônica	22
13	Crônica	22
14	Crônica	22
15	Crônica	23
16	Crônica	24
17	Crônica	26
18	Crônica	28
20	Crônica	30
21	Crônica	31
22	Crônica	32
25	Crônica	33
26	Crônica	34
27	Crônica	35
28	Crônica	35
29	Crônica	35
30	Crônica	38
4	Crônica	38
32	Crônica	43
35	Crônica	51
36	Crônica	78
39	Crônica	83
24	Crônica	97
Forma aguda/subaguda	Md=25 meses	(variação de 14 a 50 meses)
Forma crônica	Md=31 meses	(variação de 17 a 97 meses)

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Antígenos

O antígeno utilizado no teste da imunodifusão dupla em gel de ágar (ID) e no ensaio imunoenzimático (ELISA) foi obtido a partir de uma mistura do antígeno filtrado de cultura e antígeno somático (Ag-FC/S), conforme as especificações de Silva *et al.*⁵¹. Para a imunofluorescência indireta, leveduras intactas foram mortas com formol a 10% e fixadas em lâminas de microscopia .

3.2.1.1. Preparo da mistura de antígeno filtrado de cultura com antígeno somático (Ag-FC/S)

Leveduras viáveis das cepas 18, 113, 192, 265, BT2 e 339 foram colocadas em frascos contendo um meio de cultura sintético. Após incubação a 37°C com agitação por 14 dias, as células fúngicas foram mortas com uma solução contendo *thimerosal* 1:200 (Sigma). A seguir, as culturas foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos e os precipitados de leveduras foram reservados para preparo do antígeno somático. Após filtração em papel de filtro Wattman, alíquotas dos filtrados de cultura foram separadas em pequenos frascos.

Para preparo do antígeno somático, os precipitados de cultura foram misturados, ressuspensos em solução salina estéril e sonificados com pérolas de vidro, com agitação por 24 horas a 4°C, utilizando como inibidor de protease o *phenylmethylsulfonyl fluoride* (Sigma). O produto

sonicado foi centrifugado a 10.000 rpm por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante constituiu o antígeno sonificado.

Antes da diálise e liofilização, o filtrado de cultura e o antígeno somático foram testados pela imunodifusão dupla em dois soros de referência de pacientes com Pbmicose e os melhores resultados foram obtidos pela mistura dos antígenos na proporção de 2:1, respectivamente. A seguir, a mistura foi dialisada e liofilizada.

A dosagem de proteína foi realizada conforme metodologia descrita por Lowry *et al.*⁴³ e a concentração protéica final foi de 3,5 mg/ml.

3.2.1.2. Preparo do antígeno para imunofluorescência

Leveduras das cepas 18, 265 e 113 de *P. brasiliensis* foram colocadas em uma solução contendo formol a 10% e mantidas por doze horas em geladeira a 4°C, tempo necessário para sua morte. Esta solução foi centrifugada a 2000 rpm por 5 minutos; a seguir, o botão de leveduras foi ressuspensionado em solução salina estéril, processo que foi repetido por 3 vezes. Desta solução, pipetou-se 1ml que, a seguir foi diluído em 10 ml de água destilada, a qual constituiu a suspensão de uso para pingar nas lâminas. Para fixação das leveduras, lâminas para microscopia de imunofluorescência (Bioglass) foram imersas em Poly-D-Lisina 0,2 mg/ml (Sigma) por uma hora e secadas naturalmente. Em seguida, adicionou-se suspensão fúngica sobre as lâminas e foram deixadas secar em temperatura ambiente.

3.2.2. Obtenção dos soros

De cada paciente selecionado foram coletados 15 ml de sangue total por meio de punção venosa; os soros obtidos foram colocados em tubos de ensaio e estocados em freezer a -20°C , para posterior análise.

3.2.3. Dosagem de anticorpos anti – *P. brasiliensis*

A dosagem de anticorpos anti-*P. brasiliensis* no soro de pacientes com Pbmicose foi feita pelas técnicas de imunofluorescência indireta (IFI), segundo Franco *et al.*⁶⁰, imunodifusão dupla em gel de ágar (ID), pelo micrométodo, de acordo com Silva *et al.*⁵² e ensaio imunoenzimático (ELISA), segundo Cole *et al.*³¹.

3.2.3.1. Imunofluorescência Indireta (IFI)

Sobre a lâmina contendo leveduras fixadas como especificado no item 3.2.1.2., foram pipetados 20 μl de soro dos pacientes, a partir da diluição 1/64, seguido de diluições seriadas de razão 2. Estas lâminas foram incubadas em estufa a 37°C por 30 minutos, depois de retirado o excesso de soro, lavadas três vezes por 3 minutos em PBS e uma vez em água destilada. Após secagem, foram pipetados 20 μl do anticorpo anti-humano Ig-T conjugado à fluoresceína (DAKO) diluído 1/80 e incubou-se em estufa a 37°C por 30 minutos. Após incubação, as lâminas foram novamente lavadas três vezes por 3 minutos em PBS e uma vez em água destilada e, a seguir, secadas à temperatura ambiente e montadas com glicerina alcalina e lamínula. As lâminas foram examinadas em microscópio

de fluorescência da marca Olympus, modelo BX-60 e a reação foi considerada positiva quando as leveduras apresentavam fluorescência nas paredes celulares.

3.2.3.2. Imunodifusão dupla em gel de ágar, pelo micro-método

Placas de Petri de poliestireno (100 x 15 mm) foram preenchidas com uma camada de 7 ml gel de ágar a 60-65°C e deixadas em temperatura ambiente por 30 minutos, em superfície plana, para solidificação do gel. A seguir, 4 ml de gel a 95-98°C foram pipetados sobre a primeira camada de gel. As placas foram deixadas em temperatura ambiente por 30 minutos, superfície plana, para solidificação. Após esta etapa, colocou-se matriz de plástico contendo 17 rosáseas, cada uma delas com seis orifícios laterais e um central. Posteriormente, removeu-se com espátula o gel que preenchia cada orifício, para pipetar-se o soro.

Como antígeno foi utilizada uma mistura do filtrado de cultura com o antígeno somático (Ag-FC/S), conforme foi descrito por Silva *et al.*⁵¹. No orifício central da rosásea pipetaram-se 15 µl do antígeno Ag-FC/S e, nos orifícios laterais, pipetou-se o soro não diluído (puro) e diluições seriadas a partir de 1/2. A placa foi incubada em câmara úmida por 48 h em temperatura ambiente. Decorrido o tempo de incubação, a matriz foi retirada, a placa lavada com água destilada e, por fim, a leitura das linhas de precipitação foi realizada sobre luz branca indireta.

3.2.3.3. Ensaio imunoenzimático (ELISA)

O antígeno Ag-FC/S foi diluído em tampão carbonato-bicarbonato com pH 9,6 e uma alíquota de 100 µl (2,6 µg Ag/orifício) foi

adicionada em cada orifício da placa com fundo plano (Hemobag-96 orifícios). A placa foi incubada em câmara úmida em temperatura ambiente por 18 horas. Após este período, os sítios livres da placa foram bloqueados adicionando-se 200 µl de tampão bloqueador PBS-Molico-5% por orifício. A placa foi incubada em câmara úmida por uma hora em temperatura ambiente e depois lavada três vezes com 200 µl de PBS-Tween-20 por orifício. A seguir, os soros dos pacientes e controles foram diluídos em PBS-Molico-5%, com diluição inicial de 1/100 e, as seguintes, diluições seriadas de razão 2. Adicionaram-se 100µl de cada diluição na placa, que foi incubada em câmara úmida por duas horas a 37°C e, decorrido este tempo, a placa foi lavada quatro vezes com PBS-Tween-20. Após lavagem, 100 µl do anticorpo IgG anti-humano conjugado à peroxidase (Sigma) diluído em PBS-Molico-5% foi adicionado em cada orifício da placa. A placa foi incubada em câmara úmida por duas horas a 37°C e depois lavada 4 vezes com PBS-Tween-20. A seguir, 100 µl de uma solução reveladora (substrato), constituída por 10mg de o-phenylenediamine (Sigma), 25 ml de tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 5,0 e 10µl de H₂O₂ (Sigma), foi adicionada em cada orifício da placa, que foi incubada em câmara úmida a temperatura ambiente e protegida da luz, por 5 minutos. A reação foi bloqueada acrescentando-se 50µl de H₂SO₄ 2N. Procedeu-se a leitura da reação em leitor automático de ELISA Multiskan MCC/340 Titertek em comprimento de onda de 492 nm. A média da absorbância obtida com soros diluídos a 1:100, de indivíduos clinicamente saudáveis (controles negativos), somada a duas vezes o valor do desvio padrão, foi estabelecida como *cut-off* da reação.

3.2.4. Análise estatística

Para avaliação da qualidade diagnóstica dos testes sorológicos empregados neste estudo foram avaliados os parâmetros de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e eficiência de acordo com as equações definidas por Galen & Gambino⁷³.

No grupo de pacientes avaliados durante o tratamento, a evolução da pesquisa de anticorpos anti-*P. brasiliensis* por diferentes testes sorológicos foi submetida à estatística pelo teste de correlação de Spearman, conforme as especificações de Fisher & Belle⁸¹ e pelo teste da binomial, de acordo com Siegel⁸².

No grupo de pacientes com cura sorológica pela ID, a análise estatística aplicada para avaliação do tempo decorrido até os testes sorológicos apresentarem resultados negativos foi feita pela prova de Wilcoxon⁸¹ e o teste U de Mann Whitney⁸¹.

Em cada hipótese testada, as estatísticas calculadas foram consideradas significativas quando o valor de p era menor que 0,05.

3.2.5. Normas bibliográficas

As referências bibliográficas foram apresentadas de acordo com as normas definidas pela revista "*Journal of Medical & Veterinary Micrology*".

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação dos testes sorológicos no GRUPO PRÉ-TRATAMENTO

Sensibilidade, especificidade, valores preditivos e eficiência dos testes foram determinadas a partir do estudo sorológico de 39 pacientes com Pbmicose, 30 doadores de sangue e 10 doentes com outras micoses sistêmicas. Os resultados obtidos com a IFI podem ser observados na Tabela 3. Dos 39 pacientes com Pbmicose, 36 (92,3%) apresentaram sorologia positiva pela IFI, 20 dos quais (51,3%) tinham títulos iguais a 1/256 ou 1/512. No grupo de doadores, dois indivíduos foram reativos, com títulos de 1/64 e 1/128. Entre os pacientes com outras micoses sistêmicas, três com histoplasmoze revelaram sorologia positiva com título de 1/64, 1/128 e 1/512 e o paciente com adiaspiromicose apresentou título de 1/128.

TABELA 3 - Reação de imunofluorescência indireta: distribuição dos resultados sorológicos, de acordo com os títulos de anticorpos, obtidos em pacientes com paracoccidioidomicose (Pbmicose), doadores de sangue e doentes com outras micoses sistêmicas no período pré-tratamento.

GRUPOS	Títulos de anticorpos imunofluorescência indireta				
	<i>n</i>	<i>Negativo</i>	<i>1/64 – 1/128</i>	<i>1/256 – 1/512</i>	<i>> 1/512</i>
<i>Pbmicose</i>	39	3	13	20	3
	(100,0%)	(7,7%)	(33,3%)	(51,3%)	(7,7%)
<i>Doadores</i>	30	28	2		
	(100,0%)	(93,3%)	(6,7%)		
<i>Outras micoses sistêmicas</i>	10	6	3	1	
	100,0%)	(60,0%)	(30,0%)	(10,0%)	

n= número de indivíduos; ()= porcentagem de indivíduos, em cada grupo

Na Tabela 4 estão expressos os resultados obtidos com a ID, no período pré-tratamento. Dos 39 pacientes com Pbmíose, 37 (94,9%) foram positivos pela ID. Trinta pacientes (76,9%) apresentaram títulos abaixo de 1/64; os títulos observados com maior frequência foram 1/16 e 1/32, vistos em 16 pacientes (41%). Nenhum dos 30 doadores de sangue reagiram à ID. Um paciente com histoplasmose revelou positividade em soro não diluído (puro).

TABELA 4 - Reação de imunodifusão dupla em gel de ágar: distribuição dos resultados sorológicos, de acordo com os títulos de anticorpos, obtidos em pacientes com paracoccidiodomicose (Pbmíose), doadores de sangue e doentes com outras micoses sistêmicas no período pré-tratamento.

GRUPOS	Títulos de anticorpos imunodifusão dupla				
	<i>n</i>	<i>Negativo</i>	<i>P – 1/8</i>	<i>1/16 – 1/32</i>	<i>> 1/32</i>
<i>Pbmíose</i>	39	2	14	16	7
	(100,0%)	(5,1%)	(35,9%)	(41,0%)	(18,0%)
<i>Doadores</i>	30	30			
	(100,0%)	(100,0%)			
<i>Outras micoses sistêmicas</i>	10	9	1		
	(100,0%)	(90,0%)	(10,0%)		

n = número de indivíduos; () = porcentagem de indivíduos, em cada grupo;
P = soro não diluído (Puro)

Os resultados do ELISA estão apresentados na Tabela 5. O ELISA foi positivo em todos os pacientes com Pbmicose. Trinta e seis doentes (92,3%) apresentaram titulação acima de 1/6400; os títulos observados com maior frequência se encontraram acima de 1/25600, revelados por 19 pacientes (48,7%). Todos os doadores apresentaram resultados negativos. Um paciente com histoplasmose foi positivo com título de 1/100 e o paciente com adiaspiromicose reagiu com título de 1/200. Importante ressaltar que o paciente com histoplasmose que apresentou título de 1/100 pelo ELISA, também revelou positividade com título de 1/512 pela IFI e com soro não diluído pela ID.

TABELA 5 - Reação imunoenzimática (ELISA): distribuição dos resultados sorológicos, de acordo com os títulos de anticorpos, obtidos em pacientes com paracoccidioidomicose (Pbmicose), doadores de sangue e doentes com outras micoses sistêmicas no período pré-tratamento.

GRUPOS	Títulos de anticorpos ELISA			
	<i>n</i>	<i>Negativo</i>	<i>1/100 - 1/6400</i>	<i>1/12800 - 1/25600</i> <i>> 1/25600</i>
<i>Pbmicose</i>	39		3	17 19
	(100,0%)		(7,7%)	(43,6%) (48,7%)
<i>Doadores</i>	30	30		
	(100,0%)	(100,0%)		
<i>Outras micoses sistêmicas</i>	10	8	2	
	(100,0%)	(80,0%)	(20,0%)	

n= número de indivíduos; ()= porcentagem de indivíduos, em cada grupo

Na Tabela 6 são revelados os resultados de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos e eficiência obtidos com a IFI, ID e ELISA. A maior sensibilidade foi observada com o ELISA (100%). Nos doadores de sangue, a ID e o ELISA foram 100% específicos. Entretanto, quando pacientes com outras micoses sistêmicas foram avaliados, a especificidade diminuiu nos três testes, porém, particularmente com a IFI, que apresentou especificidade bastante comprometida (60%), como revela a Tabela 6.

A Figura 2 ilustra o padrão de imunofluorescência fortemente positivo e controle negativo, ambos com diluição de 1/64. As bandas de precipitação da ID podem ser observadas na Figura 3.

TABELA 6 - Distribuição dos resultados de sensibilidade, especificidade, valores preditivos e eficiência dos testes de imunofluorescência indireta (IFI), imunodifusão dupla em gel de ágar (ID) e imunoenzimático (ELISA) obtidos a partir do estudo de pacientes com paracoccidioidomicose, doadores de sangue e doentes com outras micoses sistêmicas, no período pré-tratamento.

Testes	Parâmetros sorológicos						
	<i>sensibilidade</i>	<i>especificidade</i>			<i>VPP</i>	<i>VPN</i>	<i>eficiência</i>
		*	**	***			
<i>IFI</i>	92,3%	93,3%	60,0%	85,0%	85,7%	92,0%	88,6%
<i>ID</i>	94,9%	100,0%	90,0%	97,5%	97,4%	95,0%	96,2%
<i>ELISA</i>	100,0%	100,0%	80,0%	95,0%	95,0%	100,0%	97,4%

VPP= valor preditivo positivo;

VPN= valor preditivo negativo;

** Especificidade dos testes em doadores de sangue;*

*** Especificidade dos testes em pacientes com outras micoses sistêmicas;*

**** Especificidade dos testes em doadores de sangue e pacientes com outras micoses sistêmicas, avaliada em seu conjunto.*

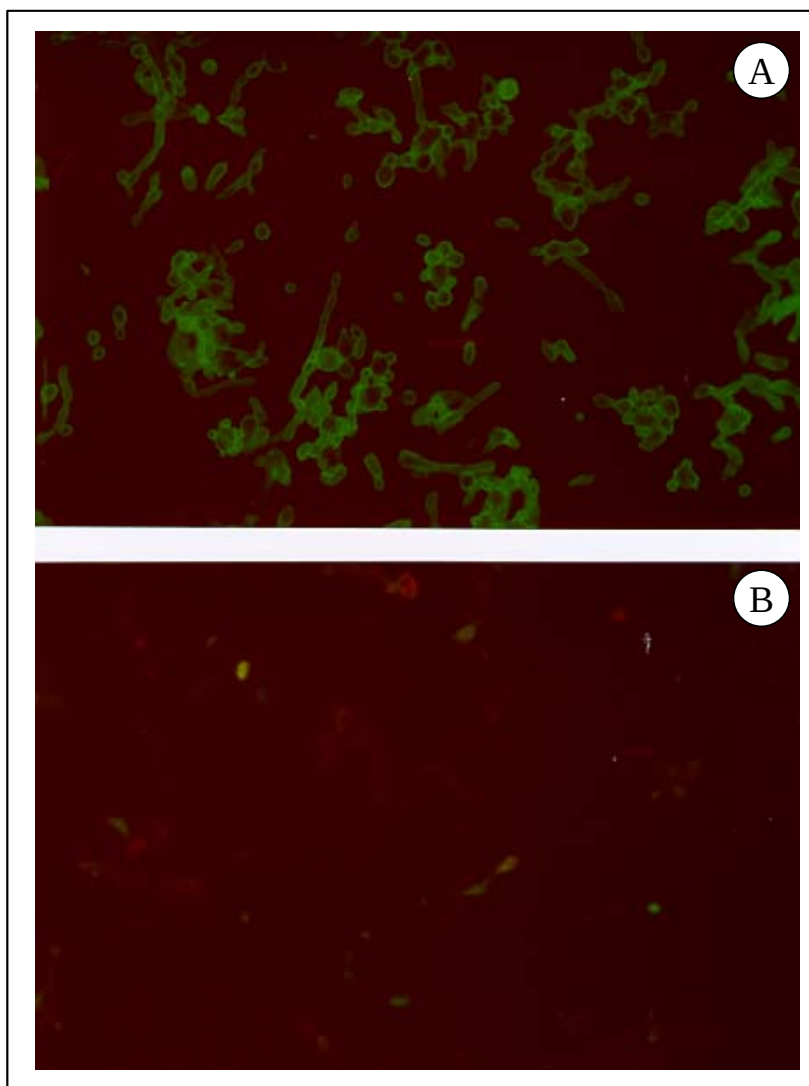


FIGURA 2 - Reações de imunofluorescência indireta (IFI). A) Reação positiva em soro de paciente com paracoccidioidomicose, mostrando fungos com intensa fluorescência da parede celular (Aumento 400x). B) Reação negativa em soro controle, com ausência de fluorescência da parede celular fúngica, em meio a grumos de fluorescência inespecífica (Aumento 400x).

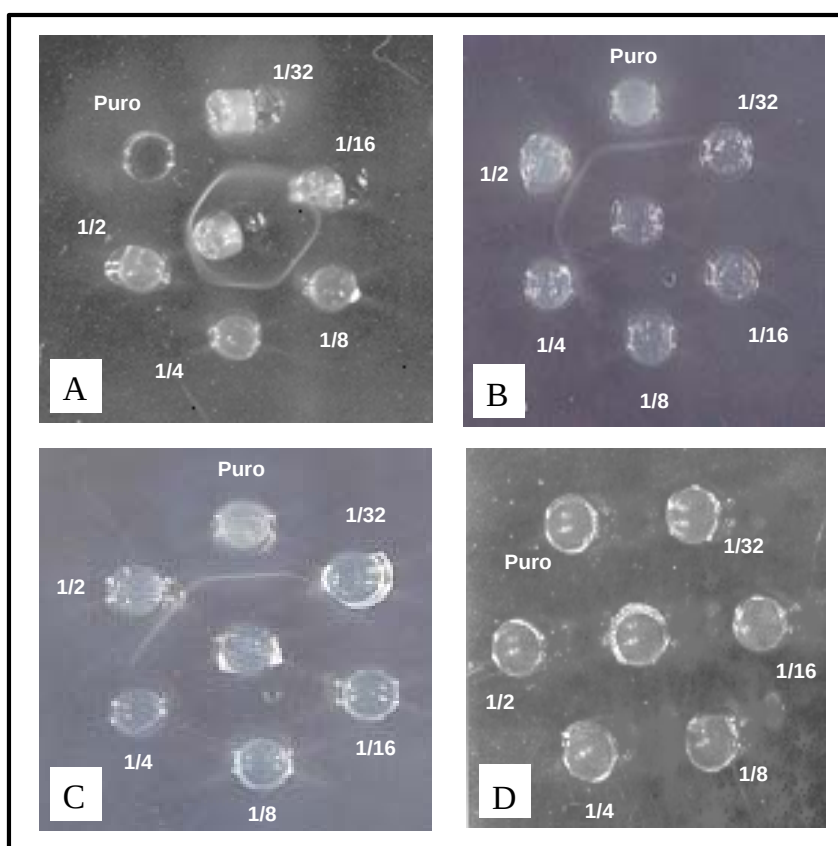


FIGURA 3 - Reações de imunodifusão dupla em gel de ágar (ID) mostrando bandas de precipitação em soros diluídos . A) Reação positiva com título de 1/32; B) Reação positiva com título de 1/4; C) Reação positiva com título de 1/2; D) Reação negativa, com ausência de bandas de precipitação.

4.2. Avaliação dos testes sorológicos no GRUPO EM TRATAMENTO

As curvas sorológicas de IFI, ID e ELISA foram determinadas a partir do estudo evolutivo dos níveis séricos de anticorpos anti-*P. brasiliensis* em 11 pacientes com a forma aguda e 18 com a forma crônica da Pbmicose, conforme demonstram os Gráficos 1 e 2, respectivamente. Em ambas as formas clínicas, a IFI manteve-se positiva em baixos títulos durante todo o tratamento. Por outro lado, a ID e o ELISA mostraram tendência a exibir resultados negativos, sendo que os títulos do ELISA se negativaram mais tardiamente que com a ID.

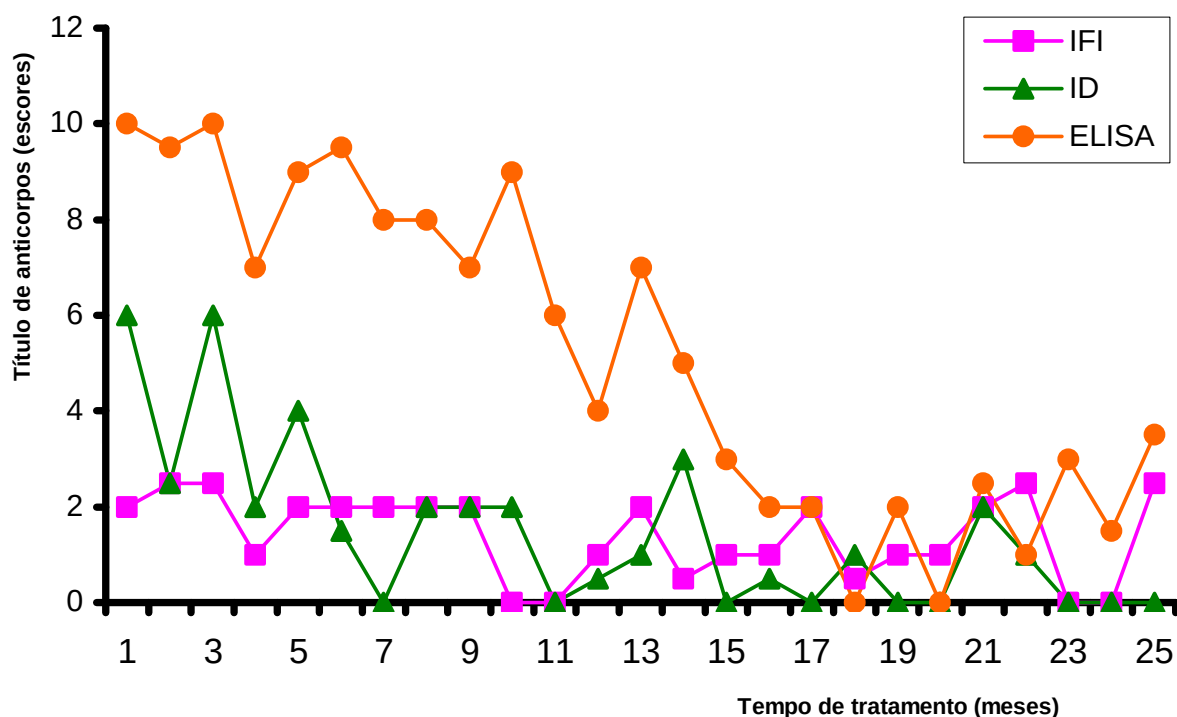


GRÁFICO 1 - Evolução sorológica da imunodifusão dupla em gel de ágar (ID), imunofluorescência indireta (IFI) e do teste imunoenzimático (ELISA), durante o tratamento de 11 pacientes com a forma aguda da paracoccidiodomicose.

Para comparação da evolução dos testes, os títulos de anticorpos foram convertidos em escores e medianas destes títulos foram determinadas em cada mês de tratamento:

Escore 0: negativo

Escore 1: IFI=1/64; ID= não diluído (Puro); ELISA=1/100

Escore 2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12: diluições seriadas com razão 2, a partir do escore 1 de cada teste.

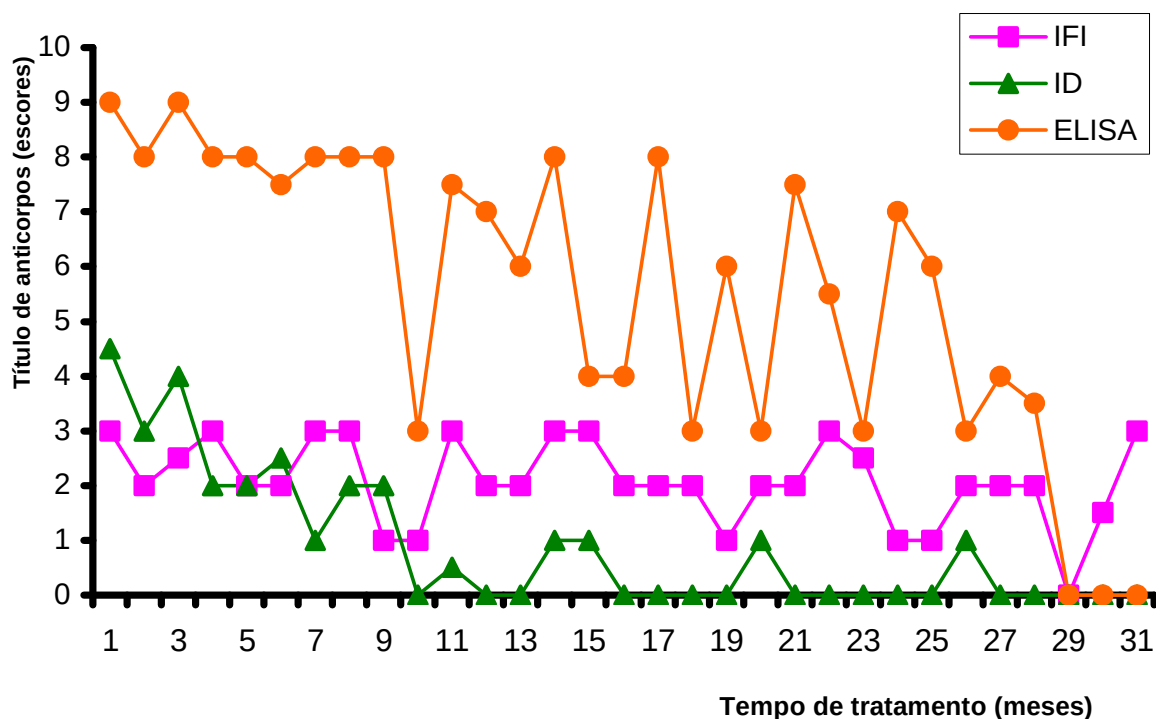


GRÁFICO 2 - Evolução sorológica da imunodifusão dupla em gel de ágar (ID), imunofluorescência indireta (IFI) e do teste imunoenzimático (ELISA), durante o tratamento de 18 pacientes com a forma crônica da paracoccidiodomicose.

Para comparação da evolução dos testes, os títulos de anticorpos foram convertidos em escores e medianas destes títulos foram determinadas em cada mês de tratamento:

Escore 0: negativo

Escore 1: IFI=1/64; não diluído (Puro); ELISA=1/100

Escore 2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12: diluições seriadas com razão 2, a partir do escore 1 de cada teste.

A análise de correlações entre os testes, analisados dois a dois, estão expressos nas Tabelas 7,8 e 9. A maior correlação foi verificada entre a ID e o ELISA ($r= 0,61591$; $p<0,05$), como revela a Tabela 9.

TABELA 7 - Distribuição dos resultados sorológicos obtidos em 413 amostras de soro de 39 pacientes com paracoccidioidomicose coletadas antes e durante o tratamento anti-fúngico. Correlação entre a imunodifusão dupla em gel de ágar (ID) e a imunofluorescência indireta (IFI), de acordo com o teste de correlação de Spearman.

Testes sorológicos										
IFI	ID									
	Negativo	P	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
Negativo	62	4	4	1	4		1			
1/64	45	6	9	5	2	1	4			
1/128	60	8	20	12	5	3	7	1	1	
1/256	37	8	12	11	4	1	13			
1/512	6	3	5	4	3	3	2			1
1/1024		1		1			2		1	

$r = 0,34794$

$p < 0,05$

P= soro não diluído (Puro)

TABELA 8 - Distribuição dos resultados sorológicos obtidos em 365 amostras de soro de 39 pacientes com paracoccidioidomicose, coletadas antes e durante o tratamento anti-fúngico. Correlação entre a imunofluorescência indireta (IFI) e o teste imunoenzimático (ELISA), de acordo com o teste de correlação de Spearman.

ELISA	Testes sorológicos IFI					
	<i>Negativo</i>	<i>1/64</i>	<i>1/128</i>	<i>1/256</i>	<i>1/512</i>	<i>1/1024</i>
<i>Negativo</i>	33	25	31	13	2	
<i>1/100</i>	1	1	4	2		
<i>1/200</i>	4	1	4	1		
<i>1/400</i>	4	5	2	7	1	
<i>1/800</i>	1	3	2	3		
<i>1/1600</i>	1	3				
<i>1/3200</i>	4	6	9	7		
<i>1/6400</i>	11	9	11	8	1	1
<i>1/12800</i>	9	11	27	4	10	
<i>1/25600</i>	4	2	8	9	8	1
<i>1/51200</i>	3	5	14	11	4	1
<i>1/102400</i>	1	1	4	3	1	1
<i>1/204800</i>				1		1

$r = 0,33638$

$p < 0,05$

TABELA 9 - Distribuição dos resultados sorológicos obtidos em 382 amostras de soro de 39 pacientes com paracoccidioidomicose, coletadas antes e durante o tratamento anti-fúngico. Correlação entre a imunodifusão dupla em gel de ágar (ID) e o teste imunoenzimático (ELISA), de acordo com o teste de correlação de Spearman.

ELISA	Testes sorológicos ID									
	Negativo	P	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
Negativo	94	3	5	2						
1/100	6	1	1							
1/200	9				1					
1/400	14	2	2	2						
1/800	7	1	1							
1/1600	3		1							
1/3200	17	2	3	1	2		1			
1/6400	22	6	6	5		2				
1/12800	24	8	21	14	4	2	5			
1/25600	2	4	8	4	6	2	5			1
1/51200	10		2	5	3	2	15		1	
1/102400	2	3		1	2		2	1		
1/204800							1		1	

$r=0,61591$

$p<0,05$

P= soro não diluído (Puro)

O estudo da evolução dos níveis séricos de anticorpos anti-*P. brasiliensis* após introdução do tratamento anti-fúngico revelou que foi maior a frequência de não-reagentes com a ID do que se observou com o ELISA ($p=0,011$) ou com a IFI ($p<0,001$), como demonstram as Tabelas 10 e 11. Por outro lado, foi maior a frequência de pacientes que negativaram com o ELISA do que com a IFI ($p=0,011$), como revela a Tabela 12.

TABELA 10- Distribuição de 39 pacientes com paracoccidioidomicose sob tratamento anti-fúngico, de acordo com a capacidade de negatizar os níveis anticorpos séricos anti-*Paracoccidioides brasiliensis*. Comparação da reação imunodifusão dupla em gel de ágar (ID) com o teste imunoenzimático (ELISA), pelo teste da binomial.

Testes sorológicos			
ELISA	ID		Total
	Negativo	Positivo	
Negativo	23	1	24
Positivo	9	6	15
Total	32	7	39

$p=0,022$ (bilateral); $p=0,011$ (unilateral)

TABELA 11- Distribuição de 39 pacientes com paracoccidioidomicose sob tratamento anti-fúngico, de acordo com a capacidade de negatizar os níveis de anticorpos séricos anti-*Paracoccidioides brasiliensis*. Comparação da reação imunodifusão dupla em gel de ágar (ID) com a imunofluorescência indireta (IFI), pelo teste da binomial.

Testes sorológicos			
IFI	ID		Total
	Negativo	Positivo	
Negativo	5	0	5
Positivo	24	10	34
Total	29	10	39

$p < 0,002$ (bilateral); $p < 0,001$ (unilateral)

TABELA 12- Distribuição de 39 pacientes com paracoccidioidomicose sob tratamento anti-fúngico, de acordo com a capacidade de negatizar os níveis de anticorpos séricos anti-*Paracoccidioides brasiliensis*. Comparação da reação imunofluorescência indireta (IFI) com o teste imunoenzimático (ELISA), pelo teste da binomial.

Testes sorológicos			
ELISA	IFI		Total
	Negativo	Positivo	
Negativo	5	13	18
Positivo	3	18	21
Total	8	31	39

$p = 0,022$ (bilateral); $p = 0,011$ (unilateral)

4.3. Avaliação do ELISA no GRUPO CURA SOROLÓGICA

Nesta etapa, o objetivo foi avaliar o tempo para que se negativasse o teste imunoenzimático (ELISA) em pacientes com cura sorológica pela imunodifusão dupla em gel de ágar (ID). Considerou-se cura sorológica a permanência de ID negativa por pelo menos 12 meses consecutivos, após introdução do tratamento antifúngico. Por esses critérios foram avaliados 16 pacientes, cinco dos quais com a forma aguda e 11 com a forma crônica da doença.

O tempo para que a reação sorológica se negativasse foi maior quando se utilizou o ELISA (Md=20,0 meses) do que o observado com a ID (Md=13,5 meses) ($p<0,001$), como demonstra a Tabela 13.

O tempo para que se negativassem as reações sorológicas dos doentes com a forma aguda/subaguda não diferiu daquele apresentado pela forma crônica, independentemente da reação sorológica utilizada ($p>0,05$), como revela a tabela 13.

Exemplos da evolução dos níveis de anticorpos, determinados pela ID, IFI e ELISA em pacientes com cura sorológica, são apresentados nos gráficos 3 (pacientes com a forma aguda ou subaguda) e 4 (doentes com a forma crônica).

TABELA 11 - Avaliação do teste imunoenzimático (ELISA) em 16 pacientes com cura sorológica* pela imunodifusão dupla (ID): distribuição dos tempos para negatização da ID (tID) e do teste ELISA (tELISA) durante o tratamento de 5 pacientes com a forma aguda e 11 com a forma crônica da paracoccidiodomicose.

Paciente	Forma clínica	Tempo de negatização (meses)		Diferença (t ELISA - t ID)
		t ELISA	t ID	
6	A ou SA	37	25	12
1	A ou SA	20	10	10
9	A ou SA	20	20	0
10	A ou SA	30	17	13
23	A ou SA	14	6	8
3	C	11	6	5
5	C	23	6	17
8	C	83	63	20
12	C	15	12	3
16	C	15	15	0
17	C	90	80	10
18	C	12	4	8
20	C	22	16	6
21	C	13	0	13
26	C	20	11	9
28	C	40	31	9
		20**	13,5**	9**

* pacientes com resultados de imunodifusão dupla negativa por pelo menos 12 meses;

** mediana; A ou SA=forma aguda ou subaguda; C=forma crônica

Prova de Wilcoxon
ELISA vs ID
T=0 $p<0,001$

Teste U de Mann Whitney (A ou SA versus crônica)
ELISA U=25 $p>0,05$
ID U=24 $p>0,05$
Diferença: tELISA menos tID U=26 $p>0,05$

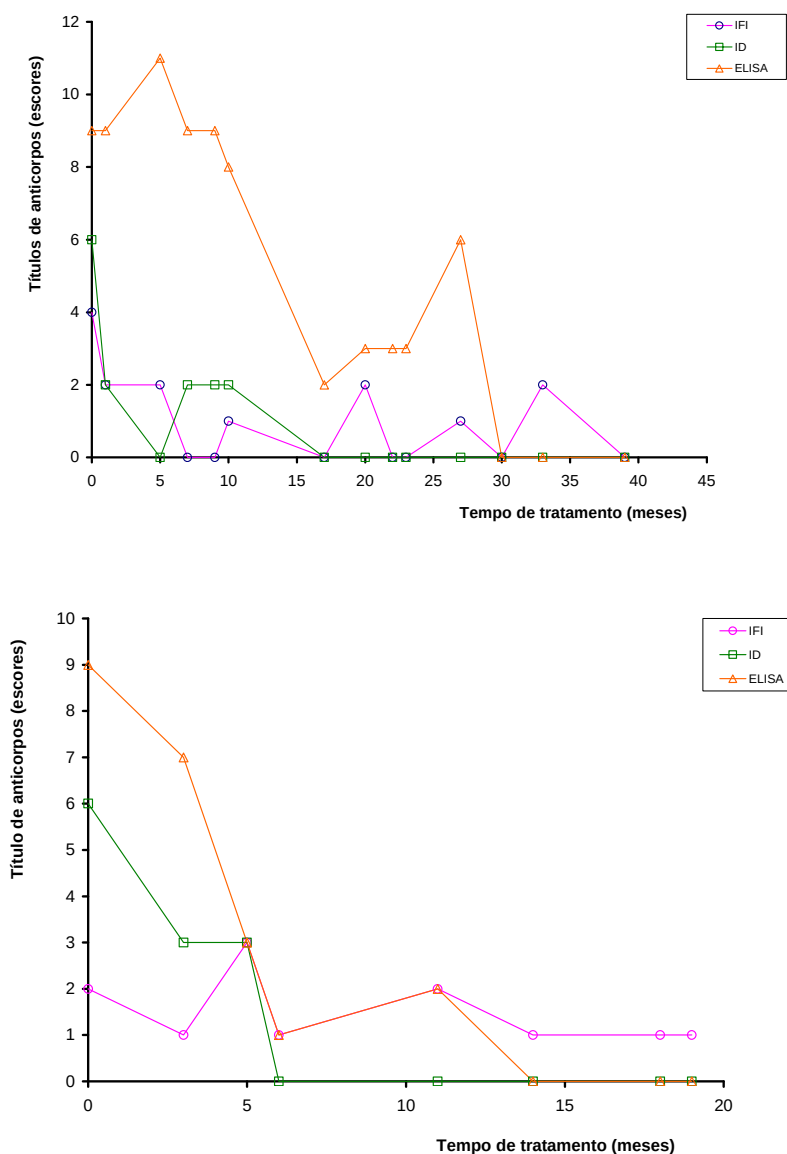


GRÁFICO 3 - Comportamento da imunofluorescência indireta (IFI) e do teste imunoenzimático (ELISA) em dois casos com a forma aguda ou subaguda da paracoccidioidomicose, com cura sorológica pela imunodifusão dupla em gel de ágar (ID).
 Para comparação da evolução dos testes, os títulos de anticorpos foram convertidos em escores:
Escore 0: negativo
Escore 1: IFI=1/64; ID=não diluído (Puro); ELISA=1/100
Escore 2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12: diluições seriadas com razão 2, a partir do escore 1 de cada teste.

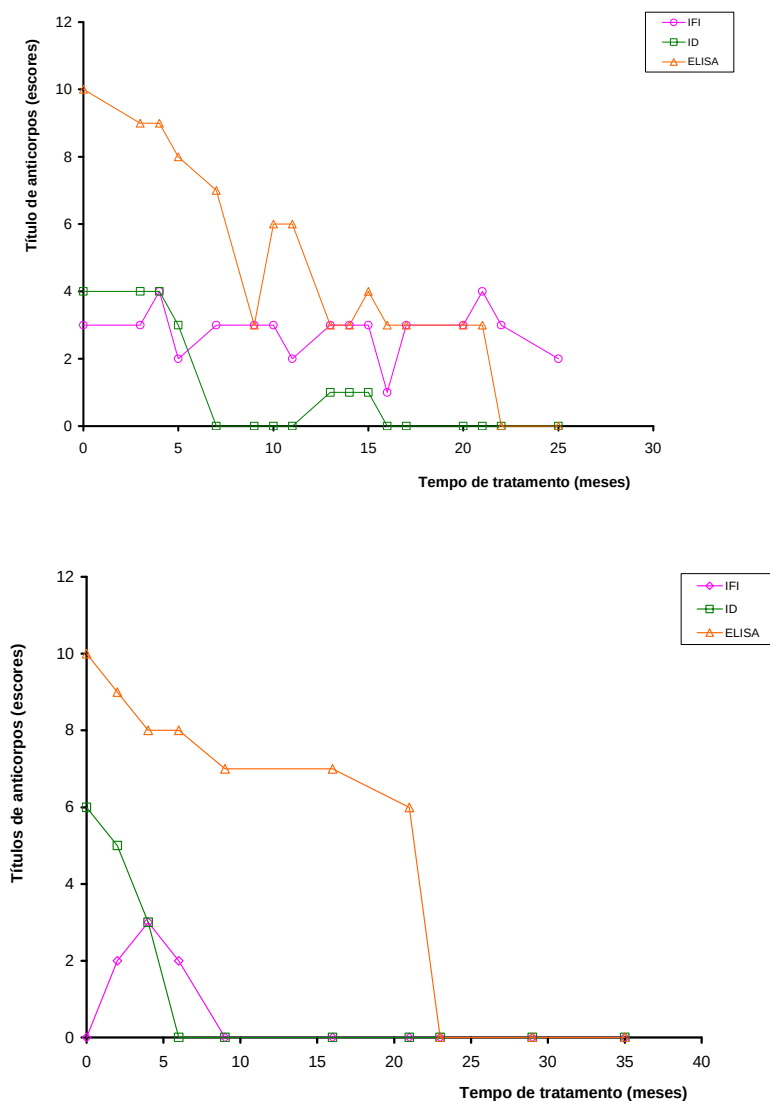


GRÁFICO 4 - Comportamento da imunofluorescência indireta (IFI) e do teste imunoenzimático (ELISA) em dois casos crônicos da paracoccidioidomicose, com cura sorológica pela imunodifusão dupla em gel de ágar (ID).

Para comparação da evolução dos testes, os títulos de anticorpos foram convertidos em escores:

Escore 0: negativo

Escore 1: IFI=1/64; ID=não diluído (Puro); ELISA=1/100

Escore 2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12: diluições seriadas com razão 2, a partir do escore 1 de cada teste.

5. DISCUSSÃO

O diagnóstico etiológico da Pbmicose está baseado na demonstração da fase leveduriforme do *P. brasiliensis* em líquidos corpóreos e fragmentos de tecido ou no seu isolamento em cultura. Porém, algumas vezes esta demonstração se torna difícil, requerendo várias amostras de material biológico, o que acaba retardando o diagnóstico da doença. Neste contexto, testes sorológicos tornam-se bastante úteis e, juntamente com informações clínicas, podem fornecer a primeira indicação diagnóstica da doença.

Nesta discussão, comentaremos primeiramente o antígeno adotado e os parâmetros sorológicos (sensibilidade, especificidade, valores preditivos e eficiência), estabelecidos com diferentes testes no período pré-tratamento. A seguir, serão discutidos os resultados sorológicos obtidos durante o tratamento de pacientes com diferentes formas clínicas da doença e, por fim, os resultados do teste ELISA em pacientes que apresentaram cura sorológica pela ID.

Ao se considerar um teste para se detectar anticorpos são relevantes a técnica propriamente dita e a qualidade do antígeno utilizado. As variações nestes dois parâmetros são as causas principais das diferenças observadas nos resultados sorológicos entre os diferentes serviços e que dificultam a comparação entre os resultados relatados por diferentes autores. Outros fatores são causas de variações nos testes sorológicos, como o número de casos estudados, a forma clínica e gravidade dos pacientes, entre

outros. Um excelente exemplo dessa dificuldade constitui o trabalho de Moyer *et al.*⁸³, que compararam testes sorológicos para diagnóstico da brucelose utilizando os mesmos métodos e a mesma preparação antigênica, nos mesmos soros, os quais foram dosados em diferentes centros de referência, o CDC (Centers for Disease Control, Atlanta-USA) e o UHL (Hygienic Laboratory, University of Iowa-USA), ambos com grande experiência nessa área de pesquisa. Os autores observaram um número significativo de casos com dosagens discrepantes, apesar da uniformização dos métodos e da amostragem.

O antígeno empregado é um dos principais fatores que determinam o valor diagnóstico dos testes sorológicos. Na Pbmicose, muitas preparações antigênicas foram desenvolvidas, buscando aumentar a sensibilidade e diminuir as reações cruzadas contra outros fungos, particularmente o *H. capsulatum*^{50,51,53}. Um grande avanço na sorologia da Pbmicose foi a identificação e a purificação da glicoproteína gp43⁴⁴, a qual está presente em concentrações variáveis, dependendo da preparação antigênica. Entretanto, a purificação desta glicoproteína é complexa, aspecto que dificulta a rotina laboratorial para monitoramento sorológico da Pbmicose. No presente trabalho, utilizou-se uma preparação antigênica padronizada no Laboratório de Imunopatologia do Departamento de Patologia, constituída pela mistura do filtrado de cultura e do antígeno somático, preparado conforme descrito por Silva *et al.*⁵¹. Com esta mistura de antígenos os autores observaram elevada sensibilidade nos testes ID e ELISA.

A IFI apresentou sensibilidade de 92,3% e valores preditivos em torno de 90%. Esses resultados confirmam aqueles encontrados por outros pesquisadores, que relataram sensibilidade em torno de 100% quando adotados títulos de *cut-off* abaixo de 1/32^{60,61,63} e diminuição da sensibilidade, quando títulos de *cut-off* iguais ou superiores a 1/32, foram empregados^{62,79}.

A IFI teve especificidade de 90% em soros de doadores de sangue e se mostrou bastante reduzida (60%) quando o teste foi realizado em soros de pacientes com outras micoses sistêmicas. Esses resultados também confirmam os observados por outros autores^{28,63}. Com a IFI obtivemos reatividade cruzada principalmente com soros de pacientes com histoplasmose, resultado que provavelmente se deve ao compartilhamento de epítomos comuns entre alguns antígenos do *H. capsulatum* e do *P. brasiliensis*. Além disso, dois soros de doadores foram positivos pela IFI, na diluição de 1/64. Estes resultados estão de acordo com os achados de Del Negro *et al.*³⁶, que também verificaram positividade pela IFI em soros controles, utilizando *cut-off* de 1/64.

Os dois doadores com IFI positiva poderiam ter sido infectados pelo *P. brasiliensis*, pois são moradores de uma região endêmica de Pbmicose. Por outro lado, esses doadores também poderiam ter sido infectados pelo *H. capsulatum*, fungo que se apresenta muito difundido nesta região⁸⁹.

No presente estudo, a eficiência da IFI foi de 88%, valor intermediário aos relatados por Del Negro *et al.*³⁶ e Bueno *et al.*⁷⁰, que

observaram, respectivamente, valores de 80% e 96,2%. Nosso resultado é explicado pela ocorrência de reações falso-positivas, observado em soros de doadores e de pacientes com histoplasmosse.

Quanto à ID, observamos sensibilidade de 95%, valor concordante com diversos trabalhos^{34,36,51,53}, que relataram sensibilidade da ID variando de 90% a 100%. Por outro lado, baixos níveis de sensibilidade com a ID também têm sido relatados^{79,86}. A especificidade da ID em geral é elevada, embora algumas reações cruzadas possam ocorrer^{28,48,49}. No presente estudo a especificidade foi de 90%, valor este resultante da reatividade cruzada observada com soro não diluído de um paciente com histoplasmosse. Ressalta-se que este soro apresentou reação positiva pelo teste ELISA, no título limite de 1/100 e pela IFI, com o elevado título de 1/512, sugerindo que este paciente também poderia apresentar infecção paracoccidióidica. Esta hipótese poderia ser comprovada com obtenção de reações positivas após absorção do soro deste paciente com antígenos do *H. capsulatum*.

Os melhores resultados encontrados no pré-tratamento foram obtidos com o teste ELISA, o qual revelou sensibilidade de 100%. Esse resultado é similar ao observado por Mendes-Giannini *et al.*⁷⁷, que utilizaram a gp43 como antígeno, que além de sensibilidade de 100%, não encontraram reações inespecíficas após absorção com um filtrado de cultura de *H. capsulatum*⁸⁵. Resultados semelhantes foram encontrados por Bueno *et al.*⁷⁰, que desenvolveram um teste 100% sensível, específico e eficiente. Por outro lado, Cano *et al.*²⁶ observaram sensibilidade bastante baixa de 66%, resultado este que poderia ser reflexo do antígeno empregado, visto que o limite de reatividade de 1/128 adotado pelos autores não foi tão elevado. A semelhança de nossos resultados com os observados por Bueno *et al.*⁷⁰ e Mendes-Giannini *et al.*⁷⁷, sugere que a preparação

antigênica aqui utilizada deve conter elevado nível de gp43. Além disso, os resultados do presente estudo demonstraram que o teste ELISA apresentou excelente discriminação entre os soros de pacientes com Pbmicose e doadores (100%). No entanto, quando soros de pacientes com outras micoses sistêmicas foram estudados, a especificidade ficou reduzida a 80%.

O elevado valor de eficiência (97,4%) observado com o ELISA está de acordo com aquele relatado por Bueno *et al.*⁷⁰, que observaram eficiência de 100%. Por outro lado, o valor elevado do VPP (95%) observado no presente trabalho contrasta com um menor valor (87%) relatado por Cano *et al.*²⁶, discrepância esta explicada pela maior sensibilidade do ELISA no presente estudo, 100% contra 66% daqueles autores.

Em resumo, na fase pré-tratamento observamos que, em termos de sensibilidade, o teste ELISA apresentou o melhor resultado (100%), seguido pela ID (94,9%), e pela IFI (92,3%). Embora a especificidade possa ser estudada em soros de indivíduos normais, é de fundamental importância a avaliação desta utilizando-se soros de pacientes com outras micoses sistêmicas, cujas manifestações clínicas pudessem ser confundidas com Pbmicose. Assim, os resultados do presente estudo revelaram especificidade de 60% para a IFI, 80% para o ELISA e 90% para a ID. Esses resultados conferem ao teste imunoenzimático ELISA uma especificidade bem maior que a IFI, frente a pacientes com outras micoses sistêmicas. Esse achado, sugere que se incorpore este teste ELISA na rotina de atendimento de pacientes com quadro clínico compatível com Pbmicose. Os valores de VPP, VPN e eficiência também reforçam a inclusão do ELISA na rotina laboratorial para pacientes com suspeita de Pbmicose. Em relação às três variáveis, os resultados da IFI são os piores. Por outro lado, o ELISA apresentou os melhores resultados para VPN e eficiência e só foi superado pela ID em relação ao VPP. Assim, a análise das

cinco variáveis que avaliam uma reação sorológica permite sugerir que a rotina laboratorial para pacientes com suspeita de Pbmicose seja feita com a ID e ELISA.

Para análise da evolução sorológica dos pacientes foram realizadas curvas sorológicas para os três testes, utilizando-se as medianas dos títulos de anticorpos determinados a cada mês de tratamento. Da análise da três curvas, a IFI apresentou o pior desempenho, pois manteve-se positiva, em baixos títulos, durante todo o período de seguimento, tanto nos casos agudos como nos casos crônicos da doença. Ao contrário, as curvas sorológicas obtidas com a ID e o teste ELISA expressaram melhor a evolução clínica dos pacientes, pois os títulos de anticorpos não só diminuíram, mas, também, tenderam a negativar em ambas as formas clínicas. Entre ambos, o ELISA mostrou melhor desempenho, pois títulos de anticorpos ainda eram detectados pelo ELISA, quando a maioria dos resultados de ID apresentavam-se negativos. Esses resultados são semelhantes aos relatados por vários autores que estudaram a ID e o ELISA, mostrando que os níveis séricos de anticorpos anti-*P. brasiliensis* diminuem com o tratamento e que podem inclusive se negativar^{26,47,51,62,70,71,87,88}.

Os estudos de correlação revelaram resultados muito melhores para o par ID-ELISA ($r=0,61591$) que para os pares ID-IFI ($r=0,34794$) e IFI-ELISA ($r=0,33638$). Baixas correlações entre a ID e a IFI ($r=0,44507$) também foram observadas por Mendes *et al*⁷⁹, resultado explicado pela cicatriz sorológica da IFI. Em conclusão, esses achados mostram que o ELISA se aproxima bastante da ID no controle de cura de pacientes com Pbmicose.

Analisando a cinética na qual os três testes se negativaram, observamos que, em geral, a ID negativou-se primeiro, seguida pelo ELISA e IFI. Poucos pacientes

apresentam IFI não reagente, mesmo após muitos anos de seguimento. A persistência de soros positivos à IFI talvez possa estar relacionada à sua elevada sensibilidade, associada à baixa especificidade. Neste caso, infecção prévia por outros fungos poderia explicar, pelo menos em alguns casos, a positividade persistente da IFI.

Na fase de cura sorológica, observou-se que, em geral, o ELISA se negativou nove meses após a ID, com títulos que variaram de 1/100 a 1/12800. Esses resultados estão, em parte, de acordo com os relatados por Mendes-Giannini *et al*⁷⁷, os quais verificaram que pacientes considerados curados, com sorologia negativa pela ID, apresentavam ainda reação positiva ao ELISA, porém apenas com títulos baixos, de 1/40. Entretanto, os autores não avaliaram o tempo que o ELISA levou para negativar.

Os resultados do presente estudo avalizam os critérios propostos por Mendes *et al*⁷⁵, em Serviços que contam com a ID, mas não com o ELISA. Como o ELISA se negativa e o faz após a ID, o teste imunoenzimático pode ser utilizado como referência para suspensão do tratamento de manutenção. Entretanto, esse teste deve ser melhor avaliado em maior número de pacientes, submetidos a seguimento por tempo mais prolongado.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados do presente estudo, pode-se concluir que:

Avaliação sorológica no período pré-tratamento

- 1) A IFI apresentou uma especificidade muito baixa, o que compromete seu uso no diagnóstico da Pbmicose.
- 2) O ELISA apresentou maior sensibilidade, VPN e eficiência que IFI e ID.
- 3) O ELISA e a ID apresentaram maior especificidade que a IFI, em soros de doadores; no entanto, a especificidade, analisada em soros de pacientes com outras micoses sistêmicas, foi maior com a ID e menor com a IFI, cabendo ao ELISA uma posição intermediária, mais próxima da ID.

Avaliação sorológica durante a evolução do tratamento

- 4) IFI, ID e ELISA revelaram diminuição dos níveis séricos de anticorpos após instituição do tratamento antifúngico.
 - 5) É maior a frequência de testes que se negativam à ID, que ao ELISA e à IFI
 - 6) O teste que melhor se correlacionou com a ID foi o ELISA.
-

- 7) A IFI mostrou-se de uso limitado no monitoramento do tratamento, visto que se manteve positiva em baixos títulos, durante todo o período de seguimento.

Avaliação do ELISA em pacientes com sorologia negativa pela ID, após tratamento anti-fúngico

- 8) O ELISA mostrou-se de maior utilidade durante o tratamento, por continuar detectando anticorpos nove meses após a ID apresentar resultados negativos.
- 9) O conjunto dos achados sugere que o ELISA seja utilizado, de acordo com as especificações do presente estudo, em maior número de pacientes, com o objetivo de torná-lo teste de referência para o monitoramento da resposta ao tratamento na Pbmicose.
-

7. RESUMO

A paracoccidioidomicose (Pbmicosse) é micose sistêmica causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, que acomete principalmente trabalhadores rurais do sexo masculino. A doença tem como principais manifestações clínicas a forma aguda/subaguda e a forma crônica. Métodos sorológicos têm considerável valor na Pbmicosse e diferentes testes têm sido utilizados no diagnóstico e monitoramento da resposta do paciente ao tratamento. O objetivo deste estudo foi avaliar a IFI, a ID e o ELISA antes e após introdução do tratamento de pacientes com a forma aguda/subaguda e a forma crônica da Pbmicosse. Para cada teste, os seguintes parâmetros foram avaliados: sensibilidade (SE), especificidade (EP), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e eficiência (EF). No período pré-tratamento a IFI teve SE=92,3%, VPP= 87,5%, VPN= 92% e EF=88,6%. A ID teve SE=94,93%, VPP=97,4%, VPN=95% e EF=96,2%. Para o ELISA, SE=100%, VPP=95%, VPN=100% e EF=97,4%. No grupo de doadores de sangue, a EP da IFI, da ID e do ELISA foram, respectivamente, de 93,3%, 100% e 100%. Em soros de pacientes com outras micoses sistêmicas (histoplasmose, criptococose, actinomicose, aspergilose e adiaspiromicosse), as EP para os testes foram de 60%, 90% e 80%, respectivamente. Durante o tratamento, maior correlação foi obtida entre a ID e o ELISA ($r= 0,61591$, $p<0,05$), obtendo-se baixas correlações com a IFI. O tempo necessário para negativar o ELISA (Md= 20,0 meses) foi maior do que a ID (Md= 13,5 meses). O ELISA se negativou em geral nove meses após a ID, o que sugere que este teste passe a ser um referencial para suspensão do tratamento de manutenção. Devido à sua elevada sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e eficiência, o ELISA deve ser incluído na rotina sorológica de pacientes com Pbmicosse.

Palavras-chave: paracoccidioidomicose, ELISA, ID, IFI, monitoramento sorológico.

8. ABSTRACT

Pararaccidioidomycosis (Pbmycosis) is a systemic mycosis caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*, which often affects rural workers, usually male adults. The overt disease is manifested by two clinical forms, acute/subacute and chronic forms. Serological methods are of considerable value in Pbmycosis, and various tests have been utilized in the diagnostic and monitoring the patient's response to treatment. The aim of this study was to evaluate the reliability of the double immunodiffusion test (ID), indirect immunofluorescence (IIF) and immunoenzymatic assay (ELISA) in the pre-treatment and during the period of treatment of patients with acute/subacute and chronic forms of Pbmycosis. For each test the following parameters were evaluated: Sensitivity (SE), Specificity (SP), Positive and Negative Predictive Values (PPV and NPV) and Efficiency (EF). In the pre-treatment period these values for IFI were SE=92.3%, PPV=87.5%, NPV=92% and EF=88.6%. For ID: SE=94.9%, PPV=97.4%, NPV=95% EF=96.2%. For ELISA: SE=100%, PPV=95%, NPV=100% and EF=97.4%. In the group of blood donors, for IFI, ID and ELISA the ES were, respectively, 93.3%, 100% and 100%. In patients with other deep mycosis (histoplasmosis, cryptococcosis, actinomycosis, aspergillosis and adiaspiromycosis) the ES for these tests were respectively 60%, 90% and 80%. During the period of treatment, the highest correlation was observed between ID and ELISA ($r=0.61591$, $p<0.05$), and the lowest correlations with IFI. The time elapsed to negative the ELISA was larger (Md=20 months) than for ID (Md= 13,5 meses). In overall, the ELISA negativated nine months after ID. This result suggests that the ELISA may be a referential test to monitoring the time for interruption of the treatment in Pbmycosis. Moreover, owing to its high values of SE, SP, PPV, NPV and EF, ELISA should be included in the serological routine for patients with Pbmycosis.

Key words: Paracoccidioidomycosis, ELISA Double Immunodiffusion test, Indirect Immunofluorescence test, serological follow-up.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Marques AS, Franco M, Mendes RP, *et al.* Aspectos epidemiológicos da paracoccidioidomicose na área endêmica de Botucatu (São Paulo-Brasil). *Rev Inst Med Trop* 1983; **25**: 87-92.
 2. Lacaz CS. *Paracoccidioides brasiliensis*, morphology, evolutionary cycle, maintenance during saprophytic life, biology, virulence, taxonomy. In: Franco MF, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, eds. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1994:13-25.
 3. Kashino SS, Calich VLG, Burger E, *et al.* *In vivo* and *in vitro* characteristics of six *Paracoccidioides brasiliensis* strains. *Mycopathologia* 1985; **92**: 173-178.
 4. Kanetsuna F, Carbonelle LM, Moreno RE, *et al.* Cell wall composition of the yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Bacteriol* 1969; **97**: 1030-1036.
 5. Franco MF, Montenegro MRG. Anatomia Patológica. In: Del Negro G, Lacaz CS, Fiorillo AM. *Paracoccidioidomicose*. São Paulo, Sarvier 1982:97-117.
 6. Franco MF, Montenegro MRG, Mendes RP, *et al.* Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev Soc Med Trop São Paulo* 1987; **20**: 129-132.
-

7. Mendes RP. The gamut of clinical manifestations. In: Franco MF, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, eds. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1994.p.233-258.
 8. Camargo ZP, Cano LE. Humoral Immunity. In: Franco MF, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, eds. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1994:p. 187-201.
 9. Moses A. Fixação de complemento na blastomicose. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1916; **8**: 68-75.
 10. Chequer-Bou-Habib D, Daniel-Ribeiro C, Banic DM, Franciscone do Valle AC, Galvão-Castro B. Polyclonal B cell activation in paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 1989; **108**: 89-93.
 11. Daniel-Ribeiro C, Banic DM, Ahned II, Galvão-Castro B. Polyclonal B lymphocyte activation and sensitization of erythrocytes by IgG in human malaria relevance to the development of anaemia in a holoendemic area in North Western Brazil (Arquimenes-Rondia). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1986; **81**: 169-177.
 12. Galvão-Castro B, Sá-Ferreira JA, Marzochi KF, et al. Polyclonal B cell activation , circulating immune complexes and autoimmunity in human American leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 1984; **56**: 58-65.
 13. Ortiz-Ortiz L, Parks E, Rodrigues M, Weigle WD. Polyclonal B lymphocyte activation during *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 1980; **124**: 121-128.
-

14. Teixeira HC, Calich VLG, Singer-Vermes LM, Russo M. Macrophage and B lymphocyte in murine paracoccidioidomycosis. *In Proc Congr Int Hum Anim Mycol* 1991; **4**:87.
 15. Fava Netto C. Imunologia da paracoccidioidomicose. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1976; **18**: 42-53.
 16. Restrepo A. Procedimientos serologicos en la paracoccidioidomicosis. *Adel Microbiol Enfermed Infect* 1984; **3**: 183-211.
 17. Franco M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol*, 1987; **25**: 5-18.
 18. Restrepo A. Inmunidad Humoral, in *Paracoccidioidomicose*, Del Negro G, Lacaz CS and Fiorillo AM, Eds., Savier-EDUSP, São Paulo 1982: 127-132.
 19. Restrepo A . Immune responses to *Paracoccidioides brasiliensis* in human and animal hosts. *C Trop Med Mycol* 1988; **2**: 239-277.
 20. Biagioni L, Souza MJ, Chamma LG, et al. Serology of paracoccidioidomycosis. Correlation between class-specific antibodies and clinical forms of the disease. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1984; **78**: 617-621.
 21. Correa A, Giraldo R. Study of immune mechanisms in paracoccidioidomycosis. Changes in immunoglobulins (IgG, IgM and IgA) *PAHO Scient Publ*, 1972; **254**: 245-253.
-

22. Restrepo A, Restrepo F, Aristizabal IH, *et al.* Immune response in paracoccidioidomycosis. Controlled study of 16 patients before and after treatment. *Sabouraudia* 1978; **16**: 151-163.
 23. Arango M, Yarzabal L. T-cell dysfunction and hyperimmunoglobulinemia E in paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 1982; **79**: 115-124.
 24. Conti-Dia IA, Mackinnon JE, Calegari L, *et al.* Estudio comparativo de la inmuno-electroforesis-inmunodifusión (IEOF-ID) y de la inmuno-electroforesis (IEF) en el diagnóstico de la paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 1978; **63**: 161-165.
 25. Mendes-Giannini MJS, Del Negro GB, Siqueira AM. Serodiagnosis. In: Franco MF, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, eds. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1994: 345-363.
 26. Cano LE, Brummer E, Stevens DA, Restrepo A. An evaluation of the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for quantitation of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol* 1986; **24**: 467-475.
 27. Puccia R, Travassos LR. 43-kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis* : immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis or Jorge Lobo disease. *J Clin Microbiol* 1991; **29**: 1610-1615.
 28. Negroni R, Iovanitti C, Robles AM. Estudio de las reacciones
-

serologicas cruzadas entre antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum*. *Rev Assoc Arg Microbiol* 1976; **8**: 68-73.

29. Fava Netto C. Estudos quantitativos sobre a fixação de complemento na blastomicose sul-americana, com antígeno polissacarídico. *Arq Cir Clin Exp* 1955; **18**: 197-254.
 30. Fava Netto C. Contribuição para o estudo imunológico da blastomicose de Lutz. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1961; **21**: 99-194.
 31. Cole GT, Kirkland TN, Franco M, et al. Immunoreactivity of a surface wall fraction produced by spherules of *Coccidioides immitis*. *Infect Immun* 1988; **56**: 2695-2701.
 32. Fava Netto C, Guerra MAG, Costa EO, Yasuda PH. Contribuição à sorologia da paracoccidioidomicose. Comparação entre reações de fixação de complemento pelas técnicas de Wadsworth, Maltaner & Maltaner e micrométodo e reações de precipitação em meio líquido e gel de ágar. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1976; **18**: 81-86.
 33. Wadsworth A, Maltaner F, Maltaner E. Quantitative studies of the complement fixation reaction with siphilitic serum and tissue extract: technic of the practical quantitative test. *J Immunol* 1938; **35**: 217-225.
 34. Restrepo A, Moncada LH. Serologic procedures in the diagnosis of paracoccidioidomycosis. *PAHO Scient Publ* 1970; **205**: 101-110.
 35. Cano LE, Restrepo A. Predictive values of serologic tests in the
-

- diagnosis and follow-up of patients with paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1987; **29**: 276-283.
36. Del Negro GMB, Garcia NM, Rodrigues EG, et al. The sensitivity, specificity and efficiency values of some serological tests used in the diagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1991; **33**: 277-280.
37. Ouchterlony O. Antigen- antibody reactions in gels. *Acta Path Microbiol Scand* 1949; **26**: 507-515.
38. Lacaz CS, Ferri RJ, Fava Netto C, et al. Aspectos imunoquímicos na blastomicose sul- americana e blastomicose queloidiana (Doença de Jorge Lobo). *Med Cir Far* 1962; **298**: 63-67.
39. Restrepo A. La prueba de inmunodifusion em el diagnostico de la paracoccidioidomycosis. *Sabouraudia* 1966; **4**: 223-230.
40. Restrepo A, Moncada LH. Characterization of the precipitin bands detected in the immunodiffusion test for paracoccidioidomycosis. *Appl Microbiol* 1974; **28**: 138-144.
41. Yarzabal LA, Andrieu S, Bout D, Naquira F. Isolation of a specific antigen with alkaline phosphatase activity from soluble extracts of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia* 1976; **14**: 275-280.
42. Yarzabal LA, Bout D, Naquira F, Fruit J, Andrieu S. Identification and purification of the specific antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*
-

responsible for immunoelectroforetic band E. *Sabouraudia* 1977; **15**: 79-85.

43. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; **193**: 265-275.
 44. Puccia R, Schenkman S, Philip A, Gorin J, Travassos LR, *et al.* Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis* : identification of a specific antigen. *Infect Immun* 1986; **53**: 199-206.
 45. Ferreira Da Cruz MF, Vale F, Espinera MCD, *et al.* Study of antibodies in paracoccidioidomycosis : follow-up of patients during and after treatment. *J Med Vet Mycol* 1990; **28**: 151-158.
 46. Lazo SRF. La inmunodifusion em el diagnostico de la blastomicosis sudamericana. *Rev Ecuat Hig Med Trop* 1968; **25**: 253-260.
 47. Campos EP, Dib Neto I, Unterkircher C, Camargo ZP. Serological evaluation in follow-up of the paracoccidioidomycosis patients. *Rev Microbiol* 1990; **21**: 11-17.
 48. Siqueira AM. *Avaliação da sensibilidade e especificidade de algumas provas sorológicas no diagnóstico, prognóstico e controle da cura da paracoccidioidomicose. Caracterização imunoquímica do antígeno E₂ do Paracoccidioides brasiliensis.* Tese, Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, 1982.
-

49. Negroni R. Estudio de las reacciones inmunologicas cruzadas em algunas micosis profundas por medio de la microimmunodifusion. *Rev Assoc Arg Microbiol* 1970; **2**: 274-281.
 50. Camargo ZP, Unterkircher C, Campoy SP, Travassos LR. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. *J Clin Microbiol* 1988; **26(10)**: 2147-2151.
 51. Silva MIC, Carvalho IM, Franco T, et al. The use of a mixture of somatic and culture filtrate antigens in the evaluation of the immune response to *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol* 1991; **29**: 331-334.
 52. Silva MIC, Chamma LG, Franco MF. Agar gel microdiffusion reaction in the serologic diagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1989; **31**: 40-43.
 53. Camargo ZP, Taborda CP, Rodrigues EG, Travassos LR. The use of cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests. *J Med Vet Mycol* 1991; **29**: 31-38.
 54. Cox RA. Serodiagnosis of coccidioidomycosis, histoplasmosis e blastomycosis. *Lab Management* 1985; **3**: 46-54.
 55. Fiorillo AM, Martinez R. Natureza de anticorpos precipitantes específicos da paracoccidioidomicose (Blastomicose sul-americana), revelados por contra-imunoeletoforese. *Rev Inst Med Trop São Paulo* **26**: 25-31.
-

56. Conti-Diaz IA, Somma-Moreira RE, Gezuele E, et al. Immuno-electro-osmophoresis-immunodiffusion in paracoccidioidomycosis. *Sabouraudia* 1973; **11**: 39-41.
 57. Siqueira AM, Lacaz CS. Serologic characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* E₂ antigen. *Braz J Med Biol Res* 1991; **24**: 807-812.
 58. Silva ME, Kaplan W, Miranda JL. Antigenic relationships between *Paracoccidioides lobo*i and other pathogenic fungi determined by immunofluorescence. *Mycopath Mycol Appl* 1968; **36**: 97-106.
 59. Kaplan W. Application of immunofluorescence to the diagnosis of paracoccidioidomycosis. *PAHO Scient Publ* 1992; **254**: 224-230.
 60. Franco MF, Fava Netto C, Chamma LG. Reação de imunofluorescência indireta para o diagnóstico sorológico da blastomicose sul-americana. Padronização da reação de fixação de complemento. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1973; **15**: 393-398.
 61. Petana WB, Wanke B. A modification of the indirect fluorescence test (IFI) for paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop* 1976; **6**: 323-326.
 62. Mistretta T, Souza MJ, Chamma LG, et al. Serology of paracoccidioidomycosis. I. Evaluation of the indirect immunofluorescent test. *Mycopathol* 1985; **89**: 13-17.
-

63. Restrepo A, Moncada LH. Indirect fluorescent antibody and quantitative agar-gel immunodiffusion test for the serological diagnosis of paracoccidioidomycosis. *Appl Microbiol* 1972; **24**: 132-137.
 64. Cano MIN, Aguiar MSM, Lacaz CS. Reevaluacion del titulo significativo de la prueba de inmunofluorescencia indirecta em la paracoccidioidomocosis. *Rev Arg Micol* 1988; **11**: 5-9.
 65. Pons L, Gimenez M, Guilleron C, Szarfman A. La tecnica de la inmunoperoxidase em la detection de anticuerpos específicos em la infeccion humana por *Paracoccidioides brasiliensis*. *Medicina* 1976; **36**: 510-512.
 66. Mendes MJS, Ferreira AW, Camargo ME, *et al.* Aplicação do teste imunoenzimático ELISA ao diagnóstico sorológico da paracoccidioidomicose, utilizando antígeno metabólico total e fração E₂, ed. *Proc. Enc. Paracoccidioidomicose*, Barra Bonita, São Paulo, 1979.
 67. Mendes MJS. *Padronização de testes imunoenzimáticos para o diagnóstico sorológico da paracoccidioidomicose. Teste ELISA-abs.* Tese, Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas), São Paulo, 1982.
 68. Camargo ZP, Unterkircher C, Drouhet E. Comparison between magnetic enzyme-linked immunosorbent assay (MELISA) in the diagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol* 1986; **24**: 77-79.
-

69. Camargo ZP, Guesdon JL, Drouhet E, Improvisi L. Magnetic enzyme-linked immunosorbent assay (MELISA) for determination of specific IgG in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol* 1984; **22**: 291-299.
 70. Bueno JP, Mendes-Giannini MJS, Del Negro GMB, et al. IgG, IgM and IgA antibody response for the diagnosis and follow-up of paracoccidioidomycosis: comparison of counterimmunoelectrophoresis and complement fixation. *J Med Vet Mycol* 1997; **35**: 213-217.
 71. Martins R, Marques S, Alves M, Fecchio D, & Franco MF. Serological follow-up of patients with paracoccidioidomycosis treated with itraconazole using Dot-Blot, ELISA and Western-Blot. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1997; **39**: 261-269.
 72. Juvenale M, Del Negro GMB, Mendes-Giannini MJS, et al. Classes e subclasses de imunoglobulinas anti-antígeno somático de *Paracoccidioides brasiliensis* na paracoccidioidomicose humana. In: *Proc. Congr. Inter. Paracoccidioidomycosis*. 1999: E32-168.
 73. Gallen RS, Gambino SR. How to the determine the predictive value and efficiency of a test. In: Gallen RS, Gambino SR, eds. *Beyond Normality: The Predictive Value and Efficiency of Medical Diagnosis*. New York, John Wiley & Sons, 1975:29-40.
 74. Mendes RP. Critérios de cura da paracoccidioidomicose. In *Proc. Col Int Paracoccidioidomycosis*, 1986: 51.
-

75. Mendes RP, Negroni R, Arechavala A. Treatment and Control of Cure. In: Franco MF, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, eds. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1994: 233-258.
 76. Camargo ZP, Guesdon JL, Drouhet E, Improvisi L. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the paracoccidioidomycosis. *Mycopathol* 1984; **88**: 31-37.
 77. Mendes-Giannini MJS, Bueno JP, Shikanai-Yasuda MA *et al.* Antibody response to the 43 kDa glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* as a marker for the evaluation of patients under treatment. *Am J Trop Med Hyg* 1990; **43**: 200-206.
 78. Taborda CP, Camargo ZP. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by Dot Immunobinding assay for antibody detection using the purified and specific antigen gp43. *J Clin Microbiol* 1994; **32**: 554-556.
 79. Mendes RP, Defaveri J, Sene MG, *et al.* Serological follow-up paracoccidioidomycosis (PBM) patients under treatment. *Rev Soc Bras Med Trop* 2000; **33**: 459.
 80. Camargo ZP, Franco MF. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev Iberoam Micol* 2000; **17**: 41-48.
 81. Fisher LD, Belle GV. *Biostatistics. A Methodology for the Health Sciences*. Wiley Interscience. New York, 1993: 991.
-

82. Siegel S. Estatística não paramétrica para as ciências do comportamento. *McGraw-Hill do Brasil*,1975.
 83. Moyer NP, Evins GM, Pigott NE, *et al.* Comparison of serological screening tests for brucellosis. *J Clin Microbiol* 1987; **25**: 1969-1972.
 84. Ferreira AW, Ávila SLM. *Sorologia: Importância e Parâmetros*. Em: Ferreira AW, Ávila SLM. *Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes*. Ed. Guanabara Koogan S.A., 1996:1-6.
 85. Mendes-Giannini MJS, Camargo ME, Lacaz CS, Ferreira AW. Immunoenzymatic absorption test for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol* 1984; **20**: 103-108.
 86. Restrepo A. Report of activities of the committee on paracoccidioidomycosis serodiagnosis. *In. ISHAM Myc Newsletter* 1992; **59**: 4.
 87. Del Negro GMB, Pereira CN, Andrade HF, *et al.* Antibody response in the follow-up of paracoccidioidomycosis patients with acute and chronic forms: evaluation of three different tests and review. *In. Proc. Congr. Inter. Paracoccidioidomycosis* 1999: **E50**-186.
 88. Del Negro GMB, Pereira CN, Andrade HF, *et al.* Evaluation of tests for antibody response in the follow-up of patients with acute and chronic forms of paracoccidioidomycosis. *J Med Microbiol* 2000; **49**: 37-46.
-

89. Agapejev S, Mendes RP, Ueda AK, Pinto AE, Lima MMF. Histoplasmose- levantamento necroscópico na Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP. *Anais Cong Soc Bras Med Trop* 1985, **154**: 137.