



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

MATEUS HENRIQUE BOSQUETO FIORINI

**AVALIAÇÃO DOS EXAMES MICOLÓGICOS NO DIAGNÓSTICO
DE PACIENTES COM PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Souza Cavalcante

Botucatu

2020

MATEUS HENRIQUE BOSQUETO FIORINI

**AVALIAÇÃO DOS EXAMES MICOLÓGICOS NO DIAGNÓSTICO
PACIENTES COM PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Souza Cavalcante

Botucatu
2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Fiorini, Mateus Henrique Bosqueto.

Avaliação dos exames micológicos no diagnóstico de
pacientes com paracoccidioidomicose / Mateus Henrique
Bosqueto Fiorini. - Botucatu, 2020

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Ricardo de Souza Cavalcante
Capes: 40101096

1. Paracoccidioidomicose - Diagnóstico. 2. Fungos -
Contagem. 3. Exame de escarro. 4. *Paracoccidioides*
brasiliensis.

Palavras-chave: Carga fúngica; Diagnóstico; Micológico
direto; Micológico homogeneizado; Paracoccidioidomicose.

MATEUS HENRIQUE BOSQUETO FIORINI

**AVALIAÇÃO DOS EXAMES MICOLÓGICOS NO DIAGNÓSTICO DE PACIENTES COM
PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

Dissertação apresentada à **Faculdade de Medicina de Botucatu**, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de **Mestre em Doenças Tropicais**

Orientador: Prof(a). Dr(a).....

Comissão examinadora

_____ Prof(a). Dr(a)..... Universidade.....

_____ Prof(a). Dr(a)..... Universidade.....

_____ Prof(a). Dr(a)..... Universidade.....

Botucatu, _____ de _____ de _____.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe Márcia Regina de Almeida Bosqueto por ser minha amiga, companheira e ser o anjo que a vida me presenteou. Por ser toda luz que guiou e iluminou meus caminhos, por acreditar em meu potencial, mesmo quando eu não acreditava. Admiro você por ser essa mulher forte, batalhadora, guerreira, com um coração nobre e puro, acolhedor e do tamanho do mundo. Te amo infinitamente!

Ao meu pai Márcio Roberto Fiorini (*in memoriam*) por me conceder o dom da vida, pelos ensinamentos de amor, respeito e dedicação ao longo dos anos que vivi ao seu lado. Agradeço por todas as boas lembranças que tive contigo, espero que sinta orgulho da pessoa que me tornei.

Ao meu avô José Maria Bosqueto que foi meu segundo pai durante todos esses anos. Por toda ajuda prestada, todo carinho ofertado, ensinamentos e lições de vida com o qual compartilhou comigo. Obrigado por ser meu suporte, minha segurança e fortaleza nos momentos de maior dificuldade. Sem isso, não estaria encerrando mais este ciclo em minha vida.

À minha irmã Emeline Bosqueto Fiorini pelo carinho, paciência e conforto nos momentos mais difíceis, por toda orientação e conselhos que me fizeram seguir em frente com a cabeça erguida. Se hoje cheguei até aqui, foi por você!

Aos meus melhores amigos: João Paulo Gomes Lopes, Bárbara Alexandra Leme Moraes, Matheus da Silva Paulino, Danilo Aparecido Gomes, Luiz Henrique Figueiredo (Billy), Diego Caetano Oliveira e Márcia Albuquerque Sobral. Não sabem o amor, carinho e admiração que tenho por cada um. Sou muito feliz por todas as histórias que compartilhamos juntos, por todo suporte, risadas e ensinamentos. Se hoje sou essa pessoa de alma leve foi graças a vocês. Obrigado por fazer parte da minha vida e da minha história.

A toda equipe do Laboratório de Moléstias Infecciosas: Beatriz Pereira, Camila Marçon, Vanessa Manfio, Mari Gatto, Thaysa Carvalho, Luiz Júnior (Pinguim), Karina Tomazini, Luiza Ikeda, Raquiel Bueno, Raquel Nascimento, Lariza Maza, Thyty Silvestre e Drika Levorato. Cada um de vocês contribuiu para a elaboração deste trabalho, me ensinaram muito desde quando os conheci. Tiveram paciência nos momentos de em que tive dúvidas (foram tantas) e pelo companheirismo durante essa trajetória.

Em especial: Thalita Martins, Guilherme Marques, Nayore Takamy e Carolina Basseto. Vocês se tornaram grandes amigos durante o tempo no Aprimoramento Profissional. Ensinaram-me valores que carregarei a vida inteira. Pelas boas conversas que tivemos, por toda troca de experiência e amizade que prevalecerá ao longo do tempo não importa a distância. Carrego vocês em meu coração e palavras não são o suficiente para agradecer por toda ajuda prestada.

Aos Babalorixás Ricardo Alencar e Juliano Amaral, e o Egbome Luiz Figueiredo por me conduzir no caminho do Candomblé. Pela assistência prestada nos meus momentos de dificuldade, os ensinamentos e fundamentos que hoje tenho orgulho em ter e principalmente, por me colocar no caminho do Orixá. Hoje sou livre como o vento e firme como o ferro! Eparrey Oyá, Ogunhê Ogún. Axé!

Aos meus companheiros de trabalho: Geriane Malfort, Rafael Nunes, Lígia Mozena, Adriana Fogaça e Thalita Almeida. Pela recepção e carinho que tiveram por todo conhecimento e aprendizado transmitido e por fazer parte nesta nova fase da minha vida. Obrigado!

Agradeço a todos que contribuíram diretamente ou indiretamente para a execução deste trabalho. Sinto muito pelas minhas falhas, me perdoe pelos meus erros, amo todos vocês e sou grato por encerrar mais este ciclo em minha jornada!

AGRADECIMENTOS

Ao meu Orientador Dr. Ricardo de Souza Cavalcante que me conduziu durante uma jornada de três anos, um ano em meu Aprimoramento Profissional em Micologia Médica e dois anos de orientação no meu Mestrado em Doenças Tropicais. Por todo conhecimento transmitido, eu agradeço seu compromisso, paciência, dedicação, trabalho e principalmente por me ajudar a concluir mais esta etapa em minha carreira. Sem o seu esforço e companheirismo, eu com certeza não teria chego tão longe. Continue com seu trabalho excepcional, como médico e pesquisador em prol aos pacientes e daqueles que necessitam desta mente brilhante e inspiradora na área da paracoccidiodomicose.

Ao Dr. Rinaldo Pôncio Mendes (Dr. Tietê) que foi peça fundamental para que este trabalho fosse realizado. Sou grato por você me transmitir parte de sua vasta bagagem e experiência na área de Moléstias Infecciosas. Seus conselhos, ensinamentos, responsabilidade e compromisso na área da pesquisa me inspiraram a ser alguém melhor na vida. Agradeço toda sua contribuição na minha banca de qualificação que foram indispensáveis para a finalização deste projeto.

A Dra. Maria Luiza Cotrim Sartor de Oliveira pela colaboração em minha banca de qualificação. Possui vasta experiência no diagnóstico da paracoccidiodomicose e contribuiu grandemente com as análises dos exames citopatológicos, necessários para que o trabalho fosse desenvolvido com qualidade.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

A toda equipe do Laboratório de Moléstias Infecciosas e Parasitárias pela recepção ,
companheirismo ao longo dos anos e toda ajuda fornecida.

Cântigo Negro

*Vem por aqui" - dizem-me alguns com os olhos doces
Estendendo-me os braços, e seguros
De que seria bom que eu os ouvisse
Quando me dizem: "vem vem por aqui!"
Eu olho-os com olhos lassos,
(Há, nos olhos meus, ironias e cansaços)
E cruzo os braços,
E nunca vou por ali...
A minha bglória é esta:
Criar desumanidades!
Não acompanhar ninguém.
- Que eu vivo com o mesmo sem vontade
Com que rasguei o ventre à minha mãe
Se ao que busco saber nenhum de vós responde
Por que me repetis: "vem vem por aqui!"?*

*Prefiro escorregar nos becos lamacentos,
Redemoinhar aos ventos,
Feito farrapos, arrastar os pés sangrentos,
A ir por aí...
Se vim ao mundo, foi
Somente para desflorar florestas virgens,
E desenhar meus próprios pés na areia inexplorada!
O mais que faço não vale nada.*

*Como, pois, sereis vós
Que me dareis machados, ferramentas e coragem
Para eu derrubar os meus obstáculos?...
Corre, nas vossas veias, sangue velho dos avós,
E vós amais o que é fácil!
Eu amo o Longe e a Miragem,
Amo os abismos, as torrentes, os desertos...*

*Eu tenho a minha Loucura !
Levanto-a, como um facho, a arder na noite escura,
E sinto espuma, e sangue, e cânticos nos lábios...*

*Ah, que ninguém me dê piedosas intenções,
Ninguém me peça definições!
Ninguém me diga: "vem por aqui!"
A minha vida é um vendaval que se soltou,
É uma onda que se alevantou,
É um átomo a mais que se animou...
Não sei por onde vou,
Não sei para onde vou
Sei que não vou por aí!"*

José Régio

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Sensibilidade dos exames micológicos e citopatológicos de escarro e imunodifusão dupla em gel de ágar em 16 pacientes com paracoccidiodomicose. Comparação entre sensibilidades pelo teste de Q de Cochran ($p < 0,001$). Sensibilidades seguidas da mesma letra não diferem entre si ($p > 0,05$) enquanto que seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p < 0,05$)31
- FIGURA 2.** Mapa perceptual obtido pela análise de correspondência múltipla para testar as relações entre variáveis clínicas, laboratoriais e radiológicas com a positividade do exame micológico direto de escarro de 24 pacientes com a forma crônica da paracoccidiodomicose34
- FIGURA 3.** Mapa perceptual obtido pela análise de correspondência múltipla para testar as relações entre variáveis clínicas, laboratoriais e radiológicas com a positividade do exame micológico homogeneizado de escarro de 24 pacientes com forma crônica paracoccidiodomicose36
- FIGURA 4.** Mapa perceptual obtido pela análise de correspondência múltipla para testar as relações entre variáveis clínicas, laboratoriais e radiológicas com a carga fúngica do escarro de 20 pacientes com a forma crônica da paracoccidiodomicose39

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1.** Distribuição da forma clínica dos 57 casos que tiveram amostras de escarro coletadas diagnóstico da PCM..... 28
- TABELA 2.** Avaliação de sensibilidade do método micológico direto (MD) comparado ao homogeneizado (MH) de escarro para diagnóstico de paracoccidiodomicose em 24 pacientes admitidos no serviço de infectologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu nos anos de 2018 e 2019..... 30
- TABELA 3.** Associação entre a positividade do exame micológico direto de escarro e características epidemiológicas, clínicas, laboratoriais e radiográficas de 24 pacientes com paracoccidiodomicose. Variáveis categóricas são apresentadas como número absoluto e porcentagem e contínuas como mediana, primeiro e terceiro quartis..... 33
- TABELA 4.** Associação entre a positividade do exame micológico homogeneizado de escarro e características epidemiológicas, clínicas, laboratoriais e radiográficas de 24 pacientes com paracoccidiodomicose. Variáveis categóricas são apresentadas como número absoluto e porcentagem e contínuas como mediana, primeiro e terceiro quartis..... 35
- TABELA 5.** Avaliação da carga fúngica pelo exame micológico homogeneizado de escarro em 20 pacientes com paracoccidiodomicose conforme suas características epidemiológicas e clínicas. Carga fúngica apresentada como mediana, primeiro e terceiros quartis. 38

ABREVIATURAS

μ l- microlitro

β - beta

α - alfa

CP- citopatológico

CTX- cotrimoxazol

HE- hematoxilina-eosina

HIV- vírus da imunodeficiência humana

IDD- imunodifusão dupla em gel de Agar

IFN - intéferon

IL- interleucina

ITC- itraconazol

KOH- hidróxido de potássio

MD- micológico direto

MH- micológico homogeneizado

MO- medula óssea

$^{\circ}$ C - graus Celsius

P. brasiliensis- *Paracoccidioides brasiliensis*

PAAF- punção aspirativa por agulha fina

PCM- paracoccidioidomicose

rpm- rotações por minuto

spp- espécies

Tb- tuberculose

Th- T helper

TNF- fator de necrose tumoral

VHS- velocidade de hemossedimentação

SUMÁRIO

RESUMO	12
<i>Abstract</i>	13
1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Aspectos gerais da paracoccidiodomicose	14
1.2. Diagnóstico de pacientes com paracoccidiodomicose	17
1.3. Justificativa.....	19
2. OBJETIVOS	21
2.1. Objetivo geral	21
2.2. Objetivos específicos	21
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	22
3.1. Delineamento do estudo.....	22
3.2. População do estudo.....	23
3.3. Definições	23
3.4. Coleta de dados clínicos	24
3.5. Coleta de amostras de escarro.....	24
3.6. Exame micológico direto do escarro.....	24
3.7. Exame citopatológico do escarro.....	25
3.8. Quantificação do fungo no escarro	26
3.9. Cultura do escarro.....	26
3.10. Aspectos éticos	26
3.11. Análise estatística	26
4. RESULTADOS	28
4.1 Descrições do grupo	28
4.2 Avaliação da sensibilidade dos exames diagnósticos.....	29
4.3 Associação da sensibilidade dos exames diagnósticos com as características epidemiológicas, clínicas, laboratoriais e radiológicas	32
4.4. Avaliação da carga fúngica no micológico homogeneizado de escarro	36
5. DISCUSSÃO	40
6. CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS	49

RESUMO

Introdução. A paracoccidiodomicose (PCM) é micose endêmica na América Latina causada por fungos do gênero *Paracoccidioides*. O exame micológico do escarro é um método rápido, barato e de simples execução que permite diagnosticar a doença. Poucos estudos têm avaliado a sensibilidade deste método diagnóstico bem como a quantificação do fungo no escarro e sua relação com a gravidade do paciente. Este estudo teve por objetivo avaliar estes parâmetros no escarro de pacientes com PCM no momento do diagnóstico. **Métodos.** Foi realizado um estudo transversal em 24 pacientes com a forma crônica da PCM atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP entre janeiro de 2018 a julho de 2019. Eles coletaram uma ou mais amostras de escarro no momento do diagnóstico para a realização de exame micológico direto (MD) e homogeneizado (MH), exame citopatológico (CP) e cultura. Nas amostras positivas para MH foi realizada a quantificação do fungo. Para comparação de sensibilidade dos métodos foi utilizado o teste Q de Cochran. Foi utilizado teste de Qui- quadrado ou Exato de Fisher para variáveis categóricas e teste de Mann-Whitney para as contínuas independentes e correlação pelo teste de Spearman. Análise de correspondência múltipla foi utilizada para avaliação multivariada. Foi considerado significativo valores de p menores que 0,05. **Resultados.** A sensibilidade geral do MH foi superior ao do MD (78,1 vs 34,1%; $p < 0,01$). Na comparação geral entre os métodos, o MH (80,0%) teve sensibilidade maior que MD (40,0%) e CP (46,7) e não diferiu da Imunodifusão dupla – IDD (53,3%) [$p < 0,01$]. MD, CP e IDD não diferiram entre si. Houve associação entre a positividade do MD e IDD, presença de lesões cutâneas e padrão misto de lesões na radiografia de tórax. A positividade do MH se associou com valores elevados da velocidade de hemossedimentação e padrão alveolar de lesões na radiografia de tórax. Maior carga fúngica no escarro se associou com idade acima de 65 anos, hemoptise e presença de nódulos maiores que 0,6 cm e cavidades no raio-x de tórax. **Conclusões.** Este estudo demonstra a vantagem de se realizar o exame MH de escarro como método padrão para diagnóstico de PCM, em especial na primeira amostra coletada.

Palavras chave: Paracoccidiodomicose, micológico direto, micológico homogeneizado, citopatológico, diagnóstico.

ABSTRACT

Introduction. Paracoccidioidomycosis (PCM) is endemic mycosis in Latin America caused by fungi of the genus *Paracoccidioides*. Sputum mycological examination is fast, inexpensive and simple method that allows the diagnosis of the disease. Few studies have evaluated the sensitivity of this method as well as the fungal quantification of the sputum and its relationship with the severity of the patient. This study aimed to evaluate these parameters in the sputum of PCM patients at the time of diagnosis. **Methods.** A cross-sectional study was carried out on 24 patients with the chronic form of PCM treated at the University Hospital – Botucatu Medical School – UNESP between January 2018 to July 2019. They collected one or more sputum samples at the time of diagnosis for the performing direct (DM) and homogenized (HM) mycological exam, cytopathological (CP) exam and culture. In samples positive for HM, the fungus was quantified. To compare the sensitivity of the methods, the Cochran's Q test was used. Chi-square test or Fisher's Exact test was used for categorical variables and Mann-Whitney test for continuous and correlation by Spearman test. Multiple correspondence analysis was used for multivariate evaluation. P values less than 0.05 were considered significant. **Results.** The sensitivity of HM was higher than that of DM (78.1 vs 34.1%; $p < 0.01$). In the comparison among the methods, HM (80.0%) had a higher sensitivity than DM (40.0%) and CP (46.7) and did not differ from Double Immunodiffusion - DID (53.3%) [$p < 0.01$]. MD, CP and DID did not differ. There was an association between DM and DID positivity, presence of skin lesions and a mixed pattern of lesions on chest radiography. HM positivity was associated with high values of erythrocyte sedimentation rate and alveolar pattern of lesions on chest radiography. Higher fungal load in sputum was associated with age over 65 years, hemoptysis and the presence of nodules larger than 0.6 cm and cavities in the chest x-ray. **Conclusions.** This study demonstrates the advantage of performing the sputum MH exam as a standard method for diagnosing PCM, especially in the first sample collected.

Keywords: Paracoccidioidomycosis, direct mycological, homogenized mycological, cytopathological, diagnosis.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da paracoccidioidomicose

A paracoccidioidomicose (PCM) é micose sistêmica granulomatosa, causada por fungos termo-dimórficos do complexo *Paracoccidioides brasiliensis*, constituído pelas espécies *P. brasiliensis* – e suas espécies crípticas S1, PS2, PS3 e PS4 e a espécie *P. lutzii* (1). Confinada à América Latina, é endêmica em área que se estende do México à Argentina (2). Apesar de incompletos, os dados indicam maior incidência dessa micose no Brasil, onde é diagnosticada com grande frequência no Estado de São Paulo (3). A PCM foi descrita pela primeira vez por Adolpho Lutz (4) em 1908.

Uma das principais características desse fungo imperfeito é o dimorfismo térmico. Em temperatura ambiente apresenta-se na fase filamentosa, sua forma infectante, que ocorre na natureza, com parede rica em β -glucana. Em tecidos humanos e em culturas mantidas a 37°C apresenta-se na fase leveduriforme, sua forma patogênica, com parede rica em α -glucana (1).

Apesar de existirem áreas endêmicas bem definidas para este patógeno, o nicho ecológico de sua fase sapróbia continua mal caracterizado, devido ao pequeno número de vezes em que o fungo foi isolado do ambiente (5, 6), ao longo período de latência da doença (7) e ao pequeno número de relatos da doença em animais domésticos (8) ou selvagens (9, 10).

Admite-se que a infecção seja adquirida quando propágulos da fase micelial do fungo são inalados, instalando-se nos alvéolos pulmonares. A seguir, o fungo passa à fase leveduriforme, transformação considerada fundamental para que se estabeleça a infecção (11, 12). O fungo pode, então, se disseminar por via hematogênica e, ou, linfática para qualquer parte do organismo (11). A penetração cutânea direta do fungo é muito rara,

apesar de ter sido documentada em alguns casos, em acidentes com espinhos e em laboratório ⁽¹³⁾.

Ao entrar no organismo, *P. brasiliensis* pode ser destruído imediatamente ou multiplicar-se, produzindo uma lesão de inoculação e disseminando-se para linfonodos regionais. A infecção paracoccidióidica pode regredir ou progredir, dependendo de fatores ligados ao fungo e ao hospedeiro. A regressão pode ser acompanhada de destruição de todos os fungos, formando-se cicatriz local estéril ou se acompanhar da persistência de focos quiescentes, com fungos viáveis. A progressão da infecção determina o aparecimento de sinais e sintomas, o que caracteriza a doença ativa ⁽¹⁴⁾. Os focos latentes podem apresentar reativação posterior, denominada reinfecção endógena, e levar à doença ativa ⁽¹³⁾.

A PCM se apresenta sob três formas clínicas principais: forma aguda ou subaguda, forma crônica e forma residual. A forma aguda ou subaguda, também chamada forma juvenil responsável por 20 a 25% dos casos, acomete em geral crianças, adolescentes e adultos jovens, caracteriza-se por apresentar instalação mais rápida, de algumas semanas a poucos meses e envolvimento predominante do sistema reticulo endotelial, isto é, baço, fígado, nódulos linfáticos e medula óssea. Nessa forma clínica as manifestações pulmonares são raras e a presença de lesões de mucosa das vias aerodigestivas superiores é pouco frequente. Nos tecidos (linfonodos, baço, fígado e MO) são encontrados muitos fungos em multiplicação e granulomas em geral frouxos. A forma crônica ou do adulto ocorre em 75% a 80% dos casos, em geral acomete indivíduos com idade superior a 30 anos e que apresentam história clínica de longa duração, com frequência acima de seis meses. As manifestações pulmonares são muito frequentes e em geral associadas ao comprometimento de outros órgãos, tais como mucosa das vias aerodigestivas superiores, pele e, por vezes, adrenais. As formas residuais, também denominadas sequelas, são observadas após tratamento e caracterizam-se pelas

manifestações clínicas ligadas à fibrose de lesões prévias, entre as quais destacam as pulmonares em geral acompanhadas de enfisema e síndrome de Addison.⁽¹⁵⁾

Como não é doença de notificação compulsória no Brasil, a real prevalência da PCM não pode ser calculada. Coutinho et al. ⁽¹⁶⁾ estudaram 3181 óbitos por PCM no Brasil entre 1980 e 1995 e demonstraram a grande magnitude e a baixa visibilidade dessa micose, destacando que constituía a oitava causa de morte por doença predominantemente crônica ou repetitiva, entre as infecciosas e parasitárias, e a mais elevada taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas. Os autores também relataram que a taxa média de mortalidade anual era de 1,45 para um milhão de habitantes.

A PCM é observada em pacientes que tiveram ou encontram-se em contato direto e prolongado com o solo, como os trabalhadores rurais ^(3, 11, 17). Predomina em indivíduos do sexo masculino, com razão de masculinidade de 7,2:1, e é mais prevalente na faixa etária entre 30 e 59 anos^(3, 17, 18). O estrogênio pode explicar a menor prevalência de PCM em pacientes do sexo feminino, pois retarda ou impede as transições micélio- levedura e conídio-levedura, necessárias para que o fungo atinja a fase patogênica, o que pode explicar o reduzido número de mulheres afetadas pela doença na idade adulta e a observação da mesma prevalência em ambos os sexos em pacientes com idade inferior a 13 anos ^(17, 19).

Os doentes com PCM revelam comprometimento imune celular específico, isto é, resposta deficiente a antígenos de *P. brasiliensis*, mas não à de outros agentes infecciosos ⁽²⁰⁾. Falhas na apresentação do antígeno, excesso de antígenos e de imunocomplexos circulantes e deficiência de receptores para interleucina-2 (IL-2) parecem estar ligados a uma resposta insatisfatória das células T. O comprometimento da resposta das células T se acompanhada de diminuição da atividade fungicida dos macrófagos. Portanto, os pacientes apresentam comprometimento do braço Th1 da resposta imune celular, com baixos níveis de TNF- α , IFN- γ e IL-2, associado à

manutenção ou à elevação da produção de IL-5, IL-10 e TGF- β , que caracteriza a exacerbação do braço Th2 ⁽²¹⁾.

O tratamento da PCM contempla duas fases – tratamento inicial ou ataque e tratamento de complementar. O tratamento inicial deve ser mantido até que se observe cura clínica e normalização da velocidade de hemossedimentação (VHS). O tratamento de consolidação deve ser feito até um ano após a negativação da sorologia (medida pela imunodifusão dupla ou contraímunoeletroforese), que caracteriza a cura sorológica ⁽²²⁾.

Diversas drogas demonstraram ser eficazes no tratamento da PCM, incluindo os derivados sulfamídicos, a associação sulfametoxazol-trimeotprim, também denominada cotrimoxazol (CMX), Anfotericina B (AmB), e derivados azólicos, tais como cetoconazol (CTC) e itraconazol (ITC). Atualmente, as drogas mais utilizadas no tratamento são o itraconazol e o cotrimoxazol ⁽²³⁾.

Um estudo comparando 130 pacientes tratados com CMX e 47 com ITC demonstrou eficácia semelhante entre estas duas drogas no tratamento de ataque (98% vs 100% respectivamente) e no de complementar (90% vs 100% respectivamente) ⁽²²⁾. O ITC apresentou cura clínica mais rápida que o CMX e menor incidência de manifestações clínicas de efeitos colaterais ⁽²²⁾. No entanto, devido à disponibilidade para uso oral e intravenoso e distribuição gratuita nos Serviços vinculados ao Ministério da Saúde, o CMX é hoje a droga mais utilizada no tratamento da PCM.

1.2. Diagnóstico de pacientes com paracoccidioidomicose

O diagnóstico de PCM é estabelecido a partir da demonstração do *Paracoccidioides* spp em materiais biológicos.

O exame direto realizado ao microscópio óptico (micológico direto), com escarro homogeneizado ⁽²⁴⁾, permite a identificação do fungo devido à sua morfologia e à presença de exo-esporulações. Resultados falsos positivos podem ocorrer nas formas

diminutas, que são confundidas com o *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* e *Cryptococcus* sp. pouco capsuladas. A sensibilidade do exame micológico direto no escarro tem sido pouco estudada e não se tem determinado exatamente quantas amostras devem ser colhidas. No levantamento de 422 casos de PCM no Estado do Mato Grosso do Sul, Paniago et al ⁽²⁵⁾ encontraram 43,5% de sensibilidade do micológico direto de escarro enquanto que Moreto et al ⁽¹⁸⁾, em 401 casos, demonstraram 62,5%. Neste último estudo não foi observado incremento de sensibilidade em amostras sucessivas de escarro.

Outros materiais clínicos como o raspado de lesões tegumentares ou mucosas, bem como as punções aspirativas por agulha fina (PAAF) de linfonodos comprometidos também podem ser analisadas por exame direto, apresentando elevada sensibilidade, devido à grande quantidade de fungos neles presentes.

O exame citológico particularmente a citoinclusão do escarro em parafina também é utilizada com coloração pela hematoxilina-eosina (HE) e pela prata (Gomori-Grocott), com elevada sensibilidade ⁽²⁶⁾. Além disso, o exame histopatológico de tecidos biopsiados permite o reconhecimento do fungo empregando-se as colorações pela HE e pela prata.

Paracoccidioides spp também pode ser identificado através do seu cultivo em meios como o Mycosel (BBL) ou Mycobiotic ágar (Difco), SAHBHI (Difco), ágar- Sabouraud ou ágar extrato de levedura. O crescimento do fungo é lento, em geral, demora de 15 a 20 dias para formar colônias aparentes no meio de cultura. Por esta demora no resultado, a cultura tem sido pouco utilizada como método para confirmação diagnóstica. Na atualidade, com o uso das ferramentas moleculares e a descoberta de mais de uma espécie causadora da PCM, a cultura ganhou forte interesse, pois é o único modo de definir qual o agente da infecção.

Métodos sorológicos também são utilizados para o diagnóstico da PCM. O teste padronizado é a reação de imunodifusão dupla em gel de ágar (IDD), uma prova semi-

quantitativa ⁽²⁷⁾. Apresenta sensibilidade de 90% e especificidade de 100%, empregando um preparado antigênico rico em gp43. Poucos são os casos de reação cruzada, principalmente com o *H. capsulatum*. Este método também permite avaliar a gravidade dos casos, pois títulos elevados são observados em pacientes mais graves.

A contra-imunoelectroforese é outro método sorológico empregado, utilizando-se os mesmos preparados antigênicos que a IDD; é mais sensível que a IDD, mas apresenta a mesma especificidade. Pode ser realizado de maneira semi-quantitativa. Outros métodos como a reação de fixação do complemento, reação de precipitação em tubos, reação de imunofluorescência indireta e os métodos imunoenzimáticos também podem ser utilizados ⁽¹³⁾.

1.3 Justificativa do estudo

A PCM é uma doença prevalente em populações economicamente vulneráveis. No Brasil, a maioria dos pacientes são trabalhadores rurais que dependem exclusivamente do atendimento oferecido pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Além disso, a PCM tem aumentado sua incidência em estados brasileiros com recursos em saúde mais limitados, como Rondônia e Tocantins. Este contexto tem trazido dificuldade quanto ao diagnóstico da doença, que embora seja simples, rápido e barato pelo exame micológico do escarro, são poucos os locais que dispõem de profissionais treinados para a realização deste teste. Nestes estados, concentrados na região norte do Brasil, existe maior prevalência de doença causada por *P. lutzii*, que sabidamente, tem baixa sensibilidade nos testes sorológicos. Isto tem trazido dificuldade para um diagnóstico mais preciso e muitos pacientes acabam recebendo terapia empírica, baseado apenas em dados clínicos e epidemiológicos que norteiam a suspeita da doença.

Embora o exame micológico direto, citopatológico e cultura de escarro em pacientes com comprometimento pulmonar pela PCM sejam formalmente indicados para

o diagnóstico da PCM, poucos estudos tem avaliado a sensibilidade destes testes, incluindo o número de amostras que deve ser coletada. Também não existe na literatura estudo que tenha avaliado a quantificação do fungo no escarro e sua relação com a gravidade do paciente.

A identificação do agente etiológico é fundamental para o melhor manejo das doenças infecciosas. Na PCM é possível visualizar fungos do gênero *Paracoccidioides* em diversos materiais clínicos e por diferentes métodos tais como exame direto, citopatológico, histopatológico e cultura. Neste contexto, o exame micológico sempre teve grande destaque pela sua facilidade de execução, baixo custo e rápido resultado.

Por estes motivos, este estudo teve o objetivo de incrementar respostas diante dos questionamentos acima expostos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os métodos micológicos em amostras de escarro para diagnóstico de pacientes com paracoccidioidomicose forma crônica.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Avaliar a sensibilidade do exame micológico direto de escarro a fresco e escarro homogeneizado;
- 2) Avaliar a sensibilidade do exame citopatológico do escarro utilizando-se a coloração de Gomori-Grocott;
- 3) Estabelecer um critério de quantificação do fungo no exame micológico homogeneizado de escarro no momento do diagnóstico e sua relação com a gravidade da doença.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Delineamento do estudo

Foi realizado um estudo transversal de pacientes com PCM admitidos no Serviço de Infectologia do Hospital das Clínicas da faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista (UNESP) de janeiro de 2018 a julho de 2019.

Os pacientes foram submetidos a coleta de escarro no momento do diagnóstico para a realização de exame micológico direto a fresco e homogeneizado, exame citopatológico e cultura. Quando possível foram realizadas coletas sucessivas de amostras para avaliação de incremento de sensibilidade destes testes. Os dados clínicos foram obtidos no momento da admissão do paciente e através de consulta de prontuários para obtenção dos dados. Todos os pacientes foram avaliados conforme o protocolo de atendimento do serviço.

3.2 População do estudo

Foram incluídos no estudo casos confirmados e casos prováveis da PCM. Foram considerados casos confirmados os pacientes que apresentaram manifestações clínicas sugestivas, nos quais formas típicas da fase leveduriforme de *Paracoccidioides* spp foram demonstradas em materiais clínicos (escarro ou biópsias de laringe, linfonodos, mucosa oral, pele ou pulmão).. Foram considerados casos prováveis os pacientes que apresentaram manifestações clínicas sugestivas e presença de anticorpos séricos específicos demonstrados pela reação de imunodifusão dupla em gel de ágar (IDD). Todos os pacientes incluídos no estudo apresentavam forma crônica da PCM.

3.3 Definições

A classificação de forma clínica e gravidade foi realizada conforme Mendes et al ⁽¹³⁾: a forma crônica da PCM se caracteriza pela instalação lenta, em geral, superior a seis meses. Compromete em geral indivíduos com idade entre 30 e 60 anos. Suas principais manifestações são de comprometimento pulmonar, mucosa de vias aerodigestivas superiores e pele. As adrenais também podem ser comprometidas e menos frequentemente o sistema nervoso central. Os pacientes com forma crônica são classificados quanto à gravidade em leves, moderados e graves. Os casos graves são definidos pela presença de três ou mais dos seguintes critérios: a) perda ponderal maior que 10% do peso habitual; b) comprometimento pulmonar grave; c) comprometimento de outros órgãos como adrenais, sistema nervoso central e ósseo; d) comprometimento de linfonodos superficiais de característica tumoral ou supurativo; e) reação de IDD maior que 1/64. Casos moderados são aqueles que apresentam um ou dois dos critérios acima. Já os casos leves caracterizam-se pela perda ponderal menor que 5%, comprometimento exclusivo de pulmões, mucosa de vias aerodigestivas ou pele e reação de IDD com títulos inferiores à 1/16.

Para a classificação da radiografia de tórax na PCM, a imagem foi dividida em três partes (1) – a) terço superior: área limitada inferiormente por uma linha horizontal imaginária que passa pela bifurcação da traquéia (carina), denominada linha 1 (L1); b) terço médio: área que se inicia em L1 e que termina na linha imaginária chamada linha 2 (L2) que divide em duas partes iguais a área que se encontra entre a linha da carina (L1) e o diafragma; c) terço inferior: área que se encontra entre L2 e o diafragma (figura 1). Os ápices pulmonares, delimitados inferiormente pela borda superior das clavículas, foram considerados como parte dos terços superiores, acima definidos.

As lesões pulmonares observadas na radiografia simples de tórax de pacientes com PCM em atividade foram classificadas em três padrões: alveolares, intersticiais e

mistas. Foi considerado padrão intersticial as lesões reticulares, caracterizadas por opacidades lineares finas ou traves / bandas parenquimatosas grosseiras, nodulares, caracterizadas por nódulos menores que 0,6 cm de diâmetro ou reticulonodulares, no caso da associação dos dois achados anteriores. O padrão misto foi definido como a presença de lesões alveolares e intersticiais na mesma radiografia. Foi registrado o encontro de outras lesões como nódulos maiores que 0,6 cm de diâmetro, massas quando maiores que 3,0 cm, lesões escavadas, brônquios de paredes espessadas, bronquiectasias, espessamento e aderências pleurais e derrame pleural.

3.4 Coleta de dados clínicos

Foram coletadas as seguintes informações dos pacientes no momento da inclusão no estudo: dados demográficos, manifestações clínicas da doença, sintomatologia respiratória, alterações presentes nos exames de imagem pulmonar, dados laboratoriais (velocidade de hemossedimentação, provas de atividade inflamatória, IDD), exames diagnósticos da PCM, tais como: MD, MH, citopatológico, histopatológico e cultura.

3.5 Coleta de amostras de escarro

O escarro foi colhido em frasco estéril de boca larga, recomendando-se que o paciente lavasse bem a boca e fizesse gargarejo com água antes de expectorar. Todas as amostras foram processadas no máximo até duas horas após sua coleta.

3.6 Exame micológico direto do escarro

O exame micológico direto foi realizado no Laboratório de Doenças Tropicais – Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX), da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, segundo as especificações de Lacaz ⁽²⁸⁾.

Foi escolhida uma porção purulenta da amostra de escarro, que foi colocada em lâmina e, posteriormente, adicionado hidróxido de potássio (KOH) a 10%, para clarificação do material. O escarro foi, então, examinado entre lâmina e lamínula em microscópio óptico no aumento de 40x.

Para o exame micológico direto homogeneizado foi aliquoteada porção correspondente a 10 µL de escarro, optando-se pela porção mais purulenta da amostra, e misturado a 10 µL de KOH a 10%. Esta mistura foi agitada fortemente no vórtex e depois encuba em estufa, a 37°C, por um período de 30 minutos. Após este processo, o material centrifugado a 3000 rpm por 30 minutos. Ao final, o sobrenadante foi desprezado e o restante do material colocado entre lâmina e lamínula para observação no microscópio óptico no aumento de 40x ⁽²⁴⁾.

A amostra foi considerada positiva para *Paracoccidioides* spp quando houve identificação de estruturas fúngicas com múltiplos brotamentos e parede celular birrefringente ⁽²⁹⁾.

3.7 Exame citopatológico do escarro

Amostra de escarro à fresco foi encaminhada para exame citopatológico, no Laboratório de Citologia do Departamento de Patologia da FMB – UNESP. Uma porção do escarro, a parte mais representativa como pontos hemorrágicos, purulentos e/ou partes sólidas e espessas, foram colocadas em lâmina e sobre esta, outra lâmina deslizando o material para obtenção de dois esfregaços finos e homogêneos. Uma lâmina foi fixada em álcool 95% para a coloração de Papanicolau e a outra seca no ar para coloração de Giemsa. Ao material excedente no frasco foi adicionado fixador próprio para citoinclusão o qual formou um bloco único que foi posteriormente processado para inclusão em parafina. Cortes microfomo de 4 mm foram confeccionados e corados em HE e Gomori-Grocott.

3.8 Quantificação do fungo no escarro

A determinação da quantificação do *Paracoccidioides* spp no escarro foi feita pelo exame micológico homogeneizado, contando-se o número de células fúngica por campo observado.

3.9 Cultura do escarro

Uma alíquota do escarro, optando-se por uma porção mais purulenta, foi semeada em dois meios: Ágar Sabouraud contendo cloranfenicol e em meio Mycosel (BBL). Ambos foram colocados em estufa 35-37°C, durante um mês para se obter o crescimento fúngico.

3.10 Aspectos éticos

Este projeto foi submetido para avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP e aprovado pelo CAAE 25754519.9.0000.5411. Os pacientes que incluídos no estudo aceitaram participar da pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

3.11 Análise estatística

Para a comparação de sensibilidade do exame micológico direto a fresco, homogeneizado, citopatológico de escarro e sorológico foi utilizado o teste Q de Cochran, seguido do teste de McNemar ou Binomial. Para a relação entre a sensibilidade dos exames, a quantificação do fungo no escarro e as características clínicas e laboratoriais dos pacientes foi feita uma análise bivariada onde as variáveis categóricas foram avaliadas pelo teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher e as variáveis contínuas pelo teste de Mann-Whitney. Devido ao pequeno número de pacientes, foi realizado uma

Análise de Correspondência Múltipla para explorar as relações entre diversas variáveis simultaneamente. Para este modelo foram incluídas as variáveis com carga fatorial maior ou igual a 0,25 e a gravidade da PCM devido a sua importância clínica. A inércia do sistema foi calculada para cada dimensão ⁽³⁰⁾. Também foi realizada correlação pelo método de Spearman.

Todas as análises estatísticas foram realizadas em programa SPSS IBM®, versão 23. Foram consideradas significativas aquelas com valor de p menor que 0,05 e como tendência entre 0,05 e 0,09.

4. RESULTADOS

4.1 *Descrições do grupo*

Foram avaliadas 84 amostras de escarro de 57 pacientes atendidos no Serviço de Infectologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), São Paulo, Brasil, no período de março de 2018 a outubro de 2019. No total, 44 homens e 13 mulheres tiveram amostras encaminhadas ao Laboratório de Moléstias Infecciosas (MI) para diagnóstico da PCM. A forma clínica do grupo foi descrita na tabela 1.

Tabela 1. Distribuição da forma clínica dos 57 casos que tiveram amostras de escarro coletadas diagnóstico da PCM.

Forma clinica	Nº de casos	Doenças Associadas	Masculino	Feminino
Paracoccidioidomicose	24	10	20	4
Tuberculose	11	3	9	2
Criptococose	5	2	3	2
Distúrbios auto-imunes	4	0	3	1
Infecções virais	3	1	3	0
Infecções bacterianas	2	0	1	1
Neoplasias	2	0	1	1
Aspergilose	2	0	1	1
Histoplasmose	2	1	1	1
Total	57	-	44	13

Dos 24 casos admitidos de PCM, 19 eram casos novos e 5 eram considerados como reativação da doença. A idade variou de 35 a 77 anos. A maior incidência da doença ocorreu entre 40 e 60 anos para os homens e 48 e 55 anos para as mulheres. A prevalência do sexo para taxa de masculino e feminino foi de 5:1. Dos 24 pacientes admitidos, 10 casos (41,6%) tinham

outras doenças associadas, sendo a imunossupressão (29,1%) foi a condição de base mais frequente, e a doença mais prevalente foi a Tb (16,7%) nos casos de PCM. Como desfecho, 6 casos (25%) vieram à óbito no decorrer do estudo.

Em relação à área de residência, 14 (58,3%) residiam em zona urbana, cinco (20,8%) residiam em zona rural e os restantes dos pacientes (20,8%) não relataram a área de residência. Mas 10 pacientes (41,6%) que moravam em zona urbana relataram contato com a zona rural, seja na infância ou no trabalho. . A principal atividade ocupacional observada se concentrava em área rural. Nove (37,5%) pacientes relataram serem trabalhadores rurais ou lavradores.

4.2 Avaliação da sensibilidade dos exames diagnósticos

Neste estudo, foram avaliados 24 pacientes com diagnóstico de PCM admitidos entre 2018 e 2019. A mediana de idade foi de 55,0 anos [47,5 – 62,5], com predomínio de homens (83,3%). Infecção pelo HIV foi presente em três pacientes (12,5%) assim como neoplasia maligna, e um (4,2%) transplantado renal. Quatro pacientes (16,7%) tinham tuberculose, sendo dois deles com comprometimento pulmonar. Tabagismo foi presente em 75,0% dos pacientes e etilismo em 29,2%. Todos os pacientes tinham a forma crônica da PCM, com predomínio de doença moderada (62,5%) seguida de grave (25,0%) e leve (12,5%). Além do comprometimento pulmonar presente em todos os pacientes, também foi observada lesões cutâneas (16,7%), linfonodomegalias (16,7%), lesões das mucosas das vias aerodigestivas superiores (12,5%) e laringe (12,5%).

Os dados de sensibilidade dos exames MD e MH são apresentados na tabela 2. Dos 24 pacientes com PCM foram obtidas 41 amostras de escarro, sendo que 13 indivíduos coletaram apenas uma amostra, 11 coletaram 2 e 4 coletaram 3. Na análise do total destas amostras, a sensibilidade do exame MH foi superior ao MD (78,1 vs 34,1%; $p < 0,0001$). Na análise por pacientes, MH apresentou sensibilidade superior ao MD (75,0 vs 29,2%; $p = 0,003$). Nos pacientes que coletaram apenas uma amostra também revelou maior sensibilidade do MH (72,0 vs 0,0%; $p = 0,001$). Para os pacientes com duas amostras coletadas, não foi observado diferença de sensibilidade entre MD e MH e nem incremento da mesma em amostras sucessivas.

Tabela 2. Avaliação de sensibilidade do método micológico direto (MD) comparado ao homogeneizado (MH) de escarro para diagnóstico de paracoccidiodomicose em 24 pacientes admitidos no serviço de infectologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu nos anos de 2018 e 2019.

Método Diagnóstico	MD (%)	MH (%)
Análise por amostras (n=41)	34.1^b	78.1^a
Análise por pacientes		
Primeira amostra – todos os pacientes (n=24)	29,2^b	75,0^a
<i>Pacientes com uma amostra (n=11)</i>	0,0^b	72,7^a
Pacientes com duas amostras (n=13)		
<i>Primeira</i>	53,8 ^{aA}	76,9 ^{aA}
<i>Primeira mais a segunda</i>	69,2 ^{aA}	92,3 ^{aA}

Letras minúsculas comparam a sensibilidade entre MD e MH (linhas) e maiúsculas entre primeira a primeira mais segunda amostras (colunas). Letras iguais indicam semelhança ($p > 0,05$) e letras diferentes indicam desigualdade estatística ($p < 0,05$), sendo a > b.

O exame citopatológico de escarro foi realizado em 15 pacientes e apresentou sensibilidade geral de 46,7%, sem incremento entre primeira e primeira mais segunda amostras.

Quinze pacientes foram submetidos a exame histopatológico, 5 de pulmão, 4 de laringe, 3 de mucosa de vias aerodigestivas superiores e 3 de pele. A sensibilidade do histopatológico foi de 60,0% e não diferiu do exame micológico direto (40,0%, $p=0,37$) e nem do homogeneizado (73,3%, $p=0,68$). Devido ao pequeno número de pacientes que realizaram cito e histopatológico não foi possível a comparação entre ambos.

Das 42 amostras de escarro isoladas em meios de cultura, não houve crescimento de *Paracoccidioides spp.* por causa da contaminação das placas.

Nos 15 pacientes que tiveram avaliação de todos estes testes realizou-se uma comparação de suas sensibilidades. O exame MH teve sensibilidade de 80,0%, maior que MD (40,0%) e citopatológico (46,7%) e não diferiu da IDD (53,3%). MD, citopatológico e IDD não diferiram entre si (Figura 1).

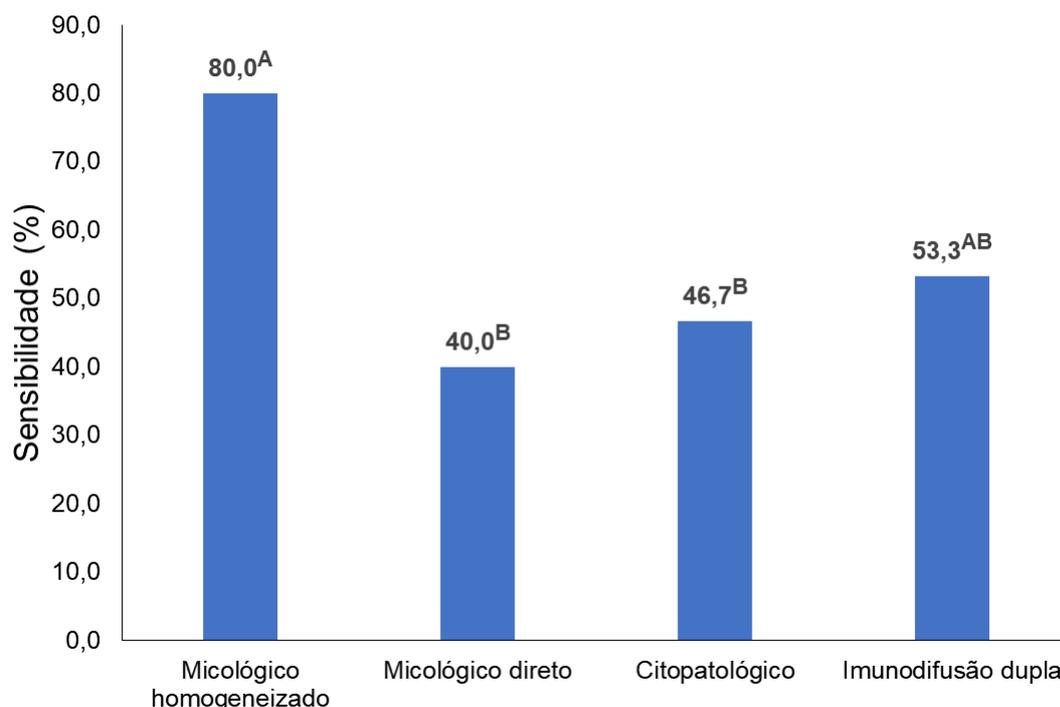


Figura 1. Sensibilidade dos exames micológicos e citopatológicos de escarro e imunodifusão dupla em gel de ágar em 16 pacientes com paracoccidioidomicose. Comparação entre sensibilidades pelo teste de Q de Cochran ($p < 0,001$). Sensibilidades seguidas da mesma letra não diferem entre si ($p > 0,05$) enquanto que seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p < 0,05$).

4.3 Associação da sensibilidade dos exames diagnósticos com as características epidemiológicas, clínicas, laboratoriais e radiológicas

A positividade do exame micológico direto de escarro se associou com a presença de lesão de pele (44,4 vs 0,0%, $p = 0,01$), valores mais elevados de velocidade de hemossedimentação (78,0 vs 23,5 mm/h, $p = 0,03$), a positividade da IDD (88,9 vs 37,5% $p = 0,03$), conforme apresenta a tabela 3. Também títulos mais elevados de anticorpos, medidos pela IDD, foram observados nos pacientes com MD positivo (1:16 vs não reagente; $p = 0,03$). Houve uma tendência da associação entre a positividade do MD e o padrão misto de lesões na radiografia de tórax (71,4 vs 23,1%; $p = 0,06$). Na análise de correspondência múltipla, a positividade do MD associou-se com a presença de lesão de pele, IDD positiva e padrão de lesão mista no raio-x de tórax. A velocidade de hemossedimentação mostrou um comportamento distinto, afastando-se das demais variáveis principalmente na dimensão 2. O mapa perceptual apresentado na figura 2 demonstra estas associações.

Em relação ao exame MH, a única variável que demonstrou associação foi o padrão de lesão intersticial na radiografia de tórax, conforme mostra a tabela 4. Esta condição foi mais prevalente nos pacientes com MH negativo (100,0 vs 23,5%; $p = 0,03$). Naqueles com exame positivo prevaleceu o padrão

misto e alveolar. Foi observado uma tendência entre positividade do MH e pacientes mais velhos (57,5 [49,5 – 65,5] vs 46,5 [43,5 – 52,5]; $p=0,09$) e valores elevados de velocidade de hemossedimentação (55,0 vs 0,0%; $p=0,09$). Na análise de correspondência múltipla, foi possível observar a relação entre o padrão intersticial e negatividade do MH, enquanto que lesões alveolares no raio-x de tórax e valores elevados de hemossedimentação se associaram com a positividade deste teste. O mapa perceptual apresentado na figura 3 demonstra estas associações.

Tabela 3. Associação entre a positividade do exame micológico direto de escarro e características epidemiológicas, clínicas, laboratoriais e radiográficas de 24 pacientes com paracoccidiodomicose. Variáveis categóricas são apresentadas como número absoluto e porcentagem e contínuas como mediana, primeiro e terceiro quartis.

Variáveis	MD positivo (n=09)	MD negativo (n=15)	Valor de p
Idade (anos)	53,0 [49,0 – 58,0]	58,0 [47,0 – 65,0]	0,81
Sexo masculino	09 (100,0)	11 (73,3)	0,25
Condições de base			
<i>Imunossupressão</i>	03 (33,3)	04 (26,7)	1,00
<i>Tuberculose</i>	01 (11,1)	03 (20,0)	1,00
<i>Tabagismo</i>	08 (88,9)	10 (66,7)	0,35
<i>Etilismo</i>	04 (44,4)	03 (20,0)	0,36
Órgãos comprometidos			
<i>Mucosa oral</i>	00 (0,0)	03 (20,0)	0,26
<i>Laringe</i>	01 (11,1)	02 (13,3)	1,00
Pele	04 (44,4)	00 (0,0)	0,01
<i>Linfonodos</i>	02 (22,2)	02 (13,3)	0,61
Sintomas respiratórios			
<i>Dispneia</i>	05 (55,6)	08 (53,3)	1,00
Expectoração			
<i>Branca</i>	04 (44,4)	05 (33,3)	0,67
<i>Amarelada</i>	02 (22,2)	07 (46,7)	0,38
<i>Hemoptoica</i>	03 (33,3)	03 (20,0)	0,63
Gravidade da PCM			
<i>Leve</i>	00 (0,0)	03 (20,0)	0,26
<i>Moderada</i>	05 (55,6)	10 (66,7)	0,67
<i>Grave</i>	04 (44,4)	02 (13,3)	0,15
IDD positiva	08 (88,9)	06 (40,0)	0,03
VHS elevada	07 (77,8)	04 (26,7)	0,03
Radiografia de tórax			
Padrão de lesões			
<i>Alveolar</i>	01 (14,3)	04 (30,8)	0,61

<i>Intersticial</i>	01 (14,3)	06 (46,2)	0,32
Misto	05 (71,4)	03 (23,1)	0,06
Cavidades	03 (42,9)	07 (53,8)	1,00
Nódulos	03 (42,9)	05 (38,5)	1,00
Mais que 1/3 do parênquima	06 (85,7)	07 (53,8)	0,32
total			

MD = micológico direto; VHS = velocidade de hemossedimentação; IDD = Imunodifusão dupla em gel de ágar; ND = soro não diluído (puro); NR = soro não reagente.

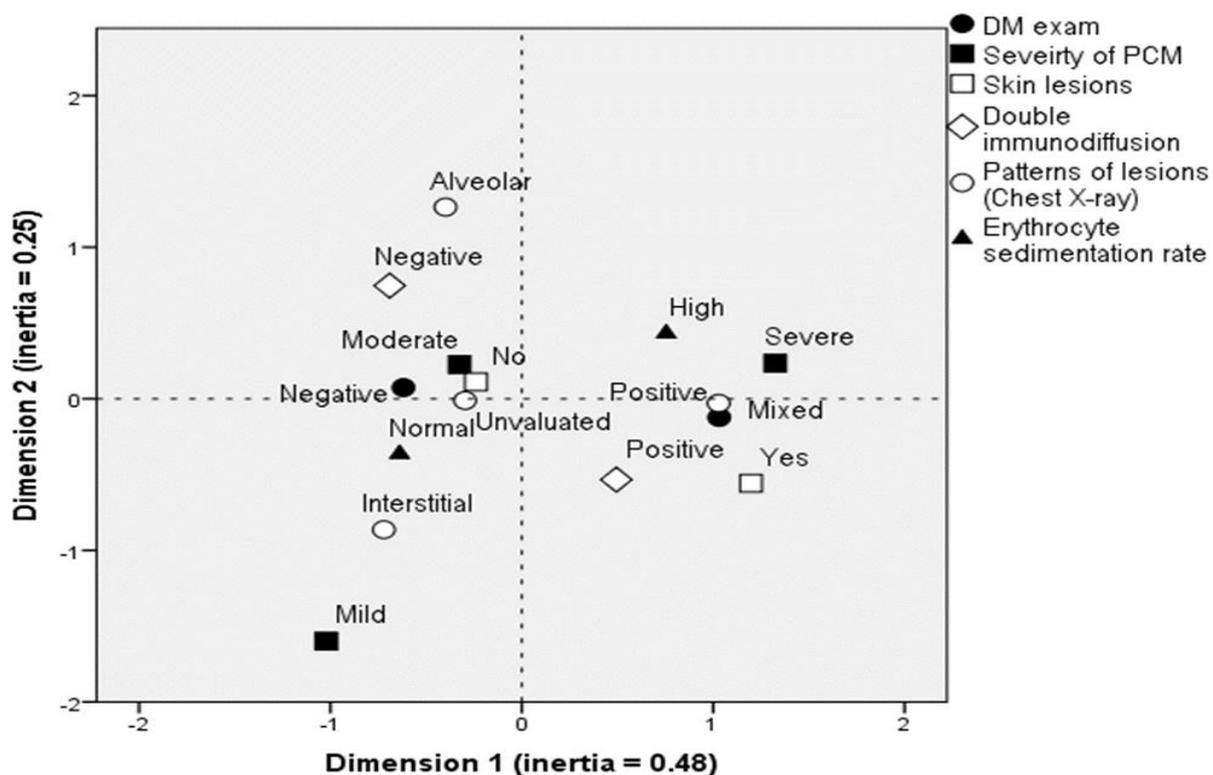


Figura 2. Mapa perceptual obtido pela análise de correspondência múltipla para testar as relações entre variáveis clínicas, laboratoriais e radiológicas com a positividade do exame micológico direto de escarro de 24 pacientes com a forma crônica da paracoccidioidomicose.

Tabela 4. Associação entre a positividade do exame micológico homogeneizado de escarro e características epidemiológicas, clínicas, laboratoriais e radiográficas de 24 pacientes com paracoccidioomicose. Variáveis categóricas são apresentadas como número absoluto e porcentagem e contínuas como mediana, primeiro e terceiro quartis.

Variáveis	MH positivo (n=20)	MH negativo (n=05)	Valor de p
Idade (anos)	57,5 [49,5 – 65,5]	46,5 [43,5 – 52,5]	0,09
Sexo masculino	16 (80,0)	04 (100,0)	1,00
Condições de base			
<i>Imunossupressão</i>	07 (35,0)	00 (0,0)	0,28
<i>Tuberculose</i>	04 (20,0)	00 (0,0)	1,00
<i>Tabagismo</i>	15 (75,0)	03 (75,0)	1,00
<i>Etilismo</i>	06 (30,0)	01 (25,0)	1,00
Órgãos comprometidos			
<i>Mucosa oral</i>	02 (10,0)	01 (25,0)	0,43
<i>Laringe</i>	03 (15,0)	00 (0,0)	1,00
<i>Pele</i>	04 (20,0)	00 (0,0)	1,00
<i>Linfonodos</i>	03 (15,0)	01 (25,0)	0,54
Sintomas respiratórios			
<i>Dispneia</i>	10 (50,0)	03 (75,0)	0,59
Expectoração			
<i>Branca</i>	06 (30,0)	03 (75,0)	0,13
<i>Amarelada</i>	08 (40,0)	01 (25,0)	1,00
<i>Hemoptoica</i>	06 (30,0)	00 (0,0)	0,53
Gravidade da PCM			
<i>Leve</i>	02 (10,0)	01 (25,0)	0,43
<i>Moderada</i>	12 (60,0)	03 (75,0)	1,00
<i>Grave</i>	06 (30,0)	00 (0,0)	0,53
IDD positiva	11 (55,0)	03 (75,0)	0,61
VHS elevada	11 (55,0)	00 (0,0)	0,09
Radiografia de tórax			
Padrão de lesões			
<i>Alveolar</i>	05 (29,4)	00 (0,0)	0,53
Intersticial	04 (23,5)	03 (100,0)	0,03
<i>Misto</i>	08 (47,1)	00 (0,0)	0,24
Cavidades	10 (58,8)	00 (0,0)	0,21
Nódulos	08 (47,1)	00 (0,0)	0,24
Mais que 1/3 do parênquima	12 (70,6)	01 (33,3)	0,27
total			

MH = micológico homogeneizado; VHS = velocidade de hemossedimentação; IDD = Imunodifusão dupla em gel de ágar; ND = soro não diluído (puro); NR = soro não reagente.

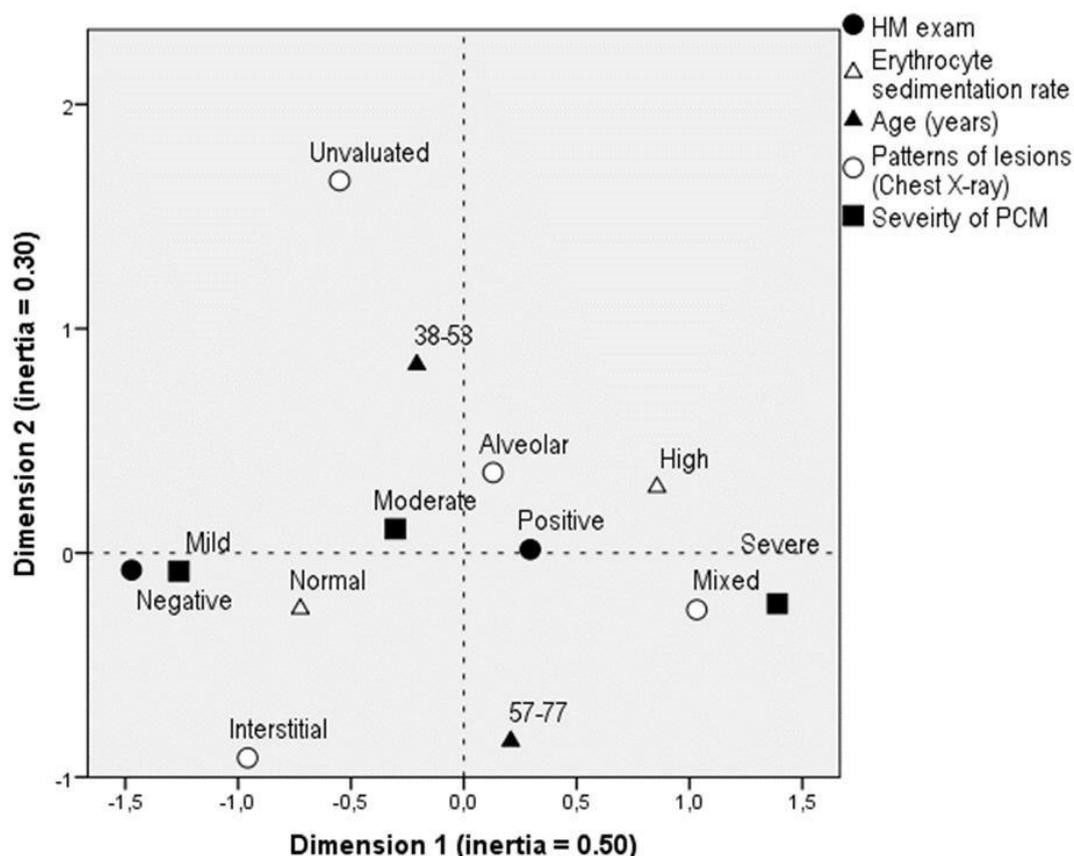


Figura 3. Mapa perceptual obtido pela análise de correspondência múltipla para testar as relações entre variáveis clínicas, laboratoriais e radiológicas com a positividade do exame micológico homogeneizado de escarro de 24 pacientes com forma crônica paracoccidioidomicose.

4.4 Avaliação da carga fúngica no micológico homogeneizado de escarro

A quantificação da carga fúngica no escarro foi realizada no exame micológico homogeneizado, portanto em 20 pacientes que tiveram este teste positivo. A mediana de células fúngica por campo foi de 9,5 células/campo [7,0

– 25,5]. Os pacientes com micológico direto positivo tiveram maior carga fúngica, pelo exame homogeneizado, que aqueles com teste negativo (24,0 [10,0 – 35,0] vs 6,0 [0,0 – 9,0]; $p=0,004$).

Houve uma correlação positiva entre carga fúngica e idade ($r_s = 0,476$; $p=0,03$). A carga fúngica foi maior em pacientes com escarro hemoptoico comparados àqueles com escarro amarelado (22,5 [10,0 – 35,0] vs 6,0 [5,0 – 7,0], $p=0,002$), conforme mostra a tabela 5. A carga fúngica não se diferenciou entre pacientes com escarro amarelado e branco (6,0 [5,0 – 7,0] vs 12,0 [0,0 – 27,0]; $p>0,05$). Outro fator associado a maior carga fúngica foi a presença de nódulos no exame de radiografia de tórax (22,5 [8,0 – 43,5] vs 7,0 [2,5 – 11,0]; $p=0,03$). Sexo masculino, tabagismo e presença de cavidades no raio-x de tórax apresentaram tendência para uma maior carga fúngica. Na análise de correspondência múltipla a maior carga fúngica se associou com idade acima de 65 anos, escarro hemoptoico e presença de cavidades e nódulos no exame de imagem, conforme apresenta a figura 4.

Tabela 5. Avaliação da carga fúngica pelo exame micológico homogeneizado de escarro em 20 pacientes com paracoccidioidomicose conforme suas características epidemiológicas e clínicas. Carga fúngica apresentada como mediana, primeiro e terceiros quartis.

Variáveis	Presente	Ausente	Valor de p
Sexo masculino	10,0 [7,0 – 24,0]	6,0 [5,0 – 6,0]	0,07
Condições de base			
<i>Imunossupressão*</i>	10,0 [6,0 – 21,0]	9,0 [6,0 – 24,0]	0,86
Tabagismo	11,0 [7,0 – 25,5]	5,5 [2,5 – 7,5]	0,06
Órgãos comprometidos			
<i>Mucosa oral</i>	7,0 [0,0 – 15,0]	9,0 [6,0 – 24,0]	0,42
<i>Laringe</i>	15,0 [9,0 – 27,0]	7,0 [6,0 – 21,0]	0,28
<i>Pele</i>	19,5 [9,5 – 62,0]	8,0 [5,5 – 18,0]	0,12
<i>Linfonodos</i>	15,0 [0,0 – 27,0]	9,0 [6,0 – 21,0]	0,87
Sintomas respiratórios			
<i>Dispneia</i>	9,0 [6,0 – 24,0]	10,0 [6,0 – 21,0]	0,93
Expectoração			0,02
<i>Branca</i>	12,0 [0,0 – 27,0] ^{ab}	---	
<i>Amarelada</i>	6,0 [5,0 – 7,0] ^b	---	
<i>Hemoptoica</i>	22,5 [10,0 – 35,0] ^a	---	
Gravidade da PCM			0,34
<i>Leve-moderada**</i>	8,0 [5,0 – 21,0] ^a	---	
<i>Grave</i>	10,5 [7,0 – 24,0] ^a	---	
IDD positiva	11,0 [6,5 – 31,0]	8,0 [5,5 – 12,0]	0,26
VHS elevada	9,0 [7,0 – 12,0]	9,0 [0,0 – 27,0]	0,76
Radiografia de tórax			
Padrão de lesões			0,29
<i>Alveolar</i>	7,0 [6,0 – 9,0] ^a	---	
<i>Intersticial</i>	7,0 [0,0 – 27,0] ^a	---	
<i>Misto</i>	11,0 [8,0 – 38,0] ^a	---	
Cavidades	12,5 [9,0 – 24,0]	6,5 [0,0 – 12,0]	0,07
Nódulos	22,5 [8,0 – 43,5]	7,0 [2,5 – 11,0]	0,03

IDD = Imunodifusão dupla em gel de ágar. VHS = velocidade de hemossedimentação.

*Imunossuprimidos = infecção pelo HIV, neoplasia maligna e transplante renal

**Leve-moderada = dos 20 pacientes com MH positivo, apenas 2 apresentavam a forma leve. Para permitir uma avaliação estatística mais adequada, os pacientes com forma leve e moderada foram agrupados.

Letras comparam colunas. Letras iguais indicam semelhança ($p > 0,05$) e letras diferentes indicam desigualdade estatística ($p < 0,05$), sendo $a > b$.

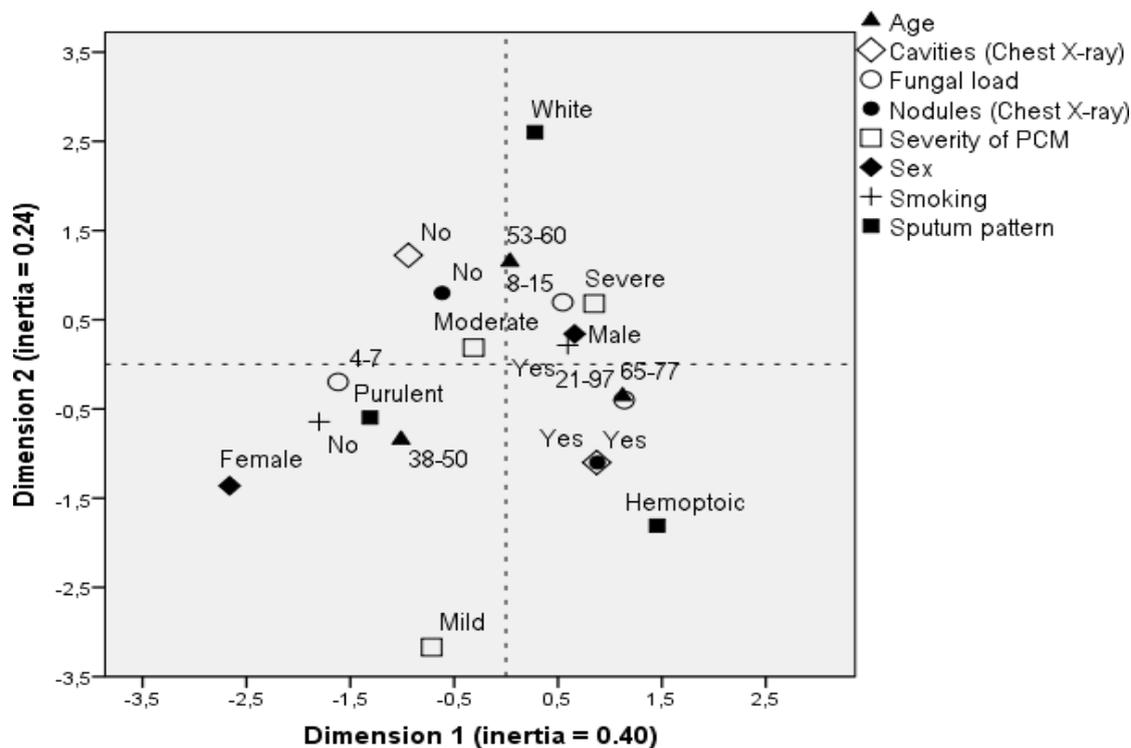


Figura 4. Mapa perceptual obtido pela análise de correspondência múltipla para testar as relações entre variáveis clínicas, laboratoriais e radiológicas com a carga fúngica do escarro de 20 pacientes com a forma crônica da paracoccidiodomicose.

5. DISCUSSÃO

Neste estudo foram avaliados dois métodos de exame micológico em amostras de escarro, o material clínico mais comumente coletado para diagnóstico da PCM, uma vez que a maioria dos pacientes apresentam comprometimento pulmonar. A sensibilidade do exame micológico direto no total de amostras foi de 34,1%, inferior ao encontrado por Moreto (61,9%)⁽³¹⁾ e por Paniago (43,5%)⁽²⁵⁾. Esta diferença de sensibilidade pode estar relacionada a qualidade da coleta do escarro, fator que não foi avaliado neste estudo.

Este estudo demonstra claramente que a sensibilidade do exame micológico homogeneizado é superior ao direto, tanto na avaliação por amostras quanto por paciente. Esta superioridade somente não foi observada quando duas amostras puderam ser coletadas. A vantagem do exame homogeneizado havia sido descrita previamente por Lopes⁽²⁴⁾. Este autor foi quem propôs esta técnica. Em avaliação de 19 pacientes, no momento do diagnóstico da PCM, ele observou sensibilidade de 68,4% para MD e 100,0% para MH. A centrifugação e homogeneização do escarro permitem clarear o material observado na lâmina, eliminando estruturas que podem dificultar a visualização do fungo. Desta forma, pequenas quantidades de fungo que não são identificadas no MD podem ser observadas no MH. Este fato pode ser por

nós observado ao identificar que a mediana de carga fúngica em pacientes com MD negativo, mas MH positivo, era pequena, com apenas seis células/campo. Lopes também avaliou a carga fúngica no escarro e observou mediana de cinco células/campo em pacientes com MD negativo e MH positivo. Além da maior sensibilidade do MH existe outra vantagem no uso desta técnica. Ela se assemelha ao exame de baciloscopia de escarro, utilizado para o diagnóstico de tuberculose. A tuberculose é uma doença endêmica em toda a América Latina e muitos laboratórios já se encontram preparados para a realização deste teste, fato que facilita a implementação do MH por estes serviços.

Embora este estudo não tenha encontrado uma sensibilidade do MH tão elevada como Lopes, ele vem corroborar o benefício do uso desta técnica para o diagnóstico da PCM, em especial, na primeira amostra de escarro coletada. Todos os pacientes que coletaram apenas uma amostra tinham MD negativo enquanto que 72,7% apresentaram MH positivo, indicando que diante de uma única amostra existe grande vantagem desta última técnica. Na PCM, é relativamente frequente, se dispor de apenas uma amostra de escarro por paciente. Isso se deve a dois principais motivos: pacientes com pouca quantidade de secreção respiratória, que dificulta uma segunda coleta, e pela impossibilidade de retorno frequente ao serviço de saúde, seja para consultas ou coleta de exames. Muitos pacientes são trabalhadores rurais e saídas frequentes para atendimento médico ameaçam a permanência no emprego. Neste estudo, a principal razão para a coleta de apenas uma amostra foi a pequena produção de secreção. Embora os pacientes incluídos nesta pesquisa tenham as condições socioeconômicas acima descritas, a adesão ao

tratamento é elevada (90,3%), no serviço onde este estudo foi realizado, como já demonstrado anteriormente por Mendes e colaboradores ⁽³²⁾. Entretanto, há locais onde a adesão é baixa, como observado por Andrade e colaboradores na região Centro-Oeste do Brasil (44,6%) ⁽³³⁾. Desta forma, é importante se considerar a possibilidade de obtenção de amostra única para o diagnóstico. Neste contexto, o uso de ferramentas de maior sensibilidade auxilia sobremaneira o diagnóstico. O exame MH é uma possibilidade factível para contribuir neste cenário.

Este é o primeiro estudo que associa variáveis clínicas, laboratoriais e radiológicas com a sensibilidade dos exames micológicos de escarro. A positividade da IDD e os títulos mais elevados deste teste se associaram com a maior sensibilidade do MD. Na infecção pelo *Paracoccidioides* spp, o desenvolvimento da resposta imune celular, pelo perfil Th1/Th17, é capaz de conter o fungo com a ativação de células efetoras tais como macrófagos e neutrófilos que o destroem. A elaboração de resposta com perfil Th2/Th9 é inadequada para o controle e eliminação do agente, com subsequente evolução para doença ^(34, 35). Embora os pacientes com a forma crônica tenham uma polarização mais próxima do perfil Th1/Th17, observa-se produção elevada de anticorpos que indica a menor habilidade destes indivíduos em combater o fungo. Esta condição pode justificar a maior prevalência da visualização do fungo em pacientes com IDD positiva. Outra associação identificada neste estudo foi à presença de lesões cutâneas e a maior sensibilidade do MD. Pode ser que as lesões de pele sejam um indicativo de maior disseminação da doença ou simplesmente de maior comprometimento pulmonar pela PCM.

Outra associação encontrada foi entre o padrão misto de lesões na radiografia de tórax e a positividade do MD. As lesões intersticiais são as mais características na PCM em decorrência da disseminação linfática do fungo pelo pulmão ⁽¹³⁾. A presença de lesões alveolares indica um processo inflamatório que sai do interstício e atinge as vias aéreas ⁽³⁶⁾. No padrão misto ocorrem lesões intersticiais e alveolares associadas indicando um exuberante processo inflamatório que pode levar a maior possibilidade de se identificar fungos no escarro.

As alterações radiográficas também se associaram com o MH. Padrão intersticial foi mais prevalente nos pacientes com MH negativo. Ao contrário das lesões alveolares, este padrão está associada a um processo menos exudativo ⁽³⁶⁾ que provavelmente ocasiona menor produção de secreção pulmonar e consequente dificuldade em se visualizar o fungo no escarro. Um achado neste estudo que reforça esta hipótese foi a associação entre o padrão alveolar e a positividade do MH observada na análise de correspondência múltipla. Neste sentido, valores elevados de VHS também se associaram a positividade do MH sugerindo que nestes pacientes deva haver importante inflamação nos pulmões.

A carga fúngica no escarro é um parâmetro pouco avaliado nos estudos. Foi possível identificar apenas o trabalho de Lopes ⁽²⁴⁾. No entanto, este autor apenas demonstrou que os pacientes com MD positivo tinham carga fúngica maior que aqueles com MD negativo, sem avaliar associação com demais variáveis dos pacientes. Este achado de Lopes também foi observado neste estudo, reforçando a superior sensibilidade do MH comparada ao MD. Entretanto, aqui foram avaliadas associações entre as demais variáveis dos

pacientes. Um interessante achado foi a associação entre idade, especialmente maiores que 65 anos, e maior carga fúngica. Indivíduos idosos sofrem um processo de imunossenescência o qual é caracterizado pela manutenção do número de células do sistema imune, mas com redução de suas funções ⁽³⁷⁾. As principais alterações funcionais ocorrem com as células apresentadoras de antígeno que reduzem sua capacidade de se comunicar com os linfócitos T e de serem ativadas por componentes da imunidade inata. Este fenômeno leva a redução de resposta com perfil Th1 e aumento do Th2 com consequente prejuízo sobre o controle da infecção fúngica ⁽³⁸⁾ que pode explicar a maior carga fúngica encontrada no escarro de idosos.

As alterações radiológicas também se associaram com a carga fúngica. A presença de nódulos maiores que 0,6 cm e cavidades foram mais prevalentes em pacientes com maior quantidade de fungo no escarro. Marchiori e colaboradores observaram a associação entre os achados radiológicos e as alterações histopatológicas pulmonares na PCM. Eles identificaram que os nódulos grandes e as cavidades apresentavam intenso processo inflamatório exudativo, com preenchimento dos espaços alveolares e grande quantidade de fungos ⁽³⁶⁾. O escarro hemoptoico também se associou com maior carga fúngica neste estudo. Nas doenças granulomatosas, a hemoptise ocorre quando o processo inflamatório presente nos granulomas atinge os vasos sanguíneos levando a rotura destes. Este é um sinal de grande comprometimento do parênquima pulmonar que pode estar associado a maior liberação de fungo nas secreções respiratórias.

A maior limitação deste estudo refere-se à pequena amostra de pacientes incluída nesta avaliação. Como a PCM não apresenta incidência

elevada, no período do estudo não foi possível a inclusão de mais casos. Uma amostra maior poderia trazer outras informações importantes ao entendimento da sensibilidade dos exames de escarro na PCM.

Das amostras de escarro isoladas em meio de cultura, não houve crescimento fúngico já que o material isolado não é estéril e contém diversos microrganismos que contaminam o meio de cultura, em especial as espécies do gênero *Candida spp*. Outra hipótese que vale a ser investigada, é sobre a viabilidade fúngica no momento do isolamento do material em meio de cultura o que pode ter impedido o crescimento do *Paracoccidioides*.

No presente estudo também foi observado uma tendência em níveis mais elevados de PCR com micológico direto positivo. A PCR é uma proteína de fase aguda, produzida pelo fígado em resposta a citocinas inflamatórias tais como IL-6, IL-1, TGF β e TNF- α e participa do sistema imune inato para eliminação de agentes infecciosos ^(33, 34). Também tem sido demonstrado seu papel como preditor de gravidade para diversas doenças ⁽³²⁾. Essa associação entre biomarcadores de atividade inflamatória e a positividade do exame micológico direto podem indicar que a sensibilidade deste teste é maior para pacientes mais graves.

É interessante notar que não foram encontradas estas associações com a positividade do exame micológico homogeneizado de escarro. Este parece ser um sinal indireto de que este teste, por ser mais sensível, permite um diagnóstico em fases mais precoces da doença, que esta ainda não alcançou maior gravidade.

A quantificação de *Paracoccidioides spp* no escarro do paciente foi realizada neste estudo e por Lopes ⁽²³⁾ até o momento. A tendência encontrada

entre maior carga fúngica e a extensão das lesões pulmonares na radiografia de tórax é um indicativo que os indivíduos mais graves tenham maior quantidade de fungo no escarro. Foi também evidenciado maior carga fúngica nos pacientes que exibiam escarro esbranquiçado ou hemoptoico comparado com aqueles que apresentavam escarro amarelado. Associação positiva também foi encontrado entre os sexos, em que os homens tiveram maior carga fúngica. Como não foi possível uma análise multivariada para definir fatores de confusão, foi feita análise entre as variáveis estudadas e observado que os homens referiram baixa frequência de escarros amarelados. Talvez o sexo não tenha relação direta com esta questão. A explicação mais razoável parece ser que os escarros esbranquiçados e hemoptoicos contenham estruturas fúngicas mais preservadas do que os escarros amarelados e nos quais predominam secreções purulentas, em que a estrutura fúngica pode estar degradada, tornando mais difícil sua visualização.

A maior limitação deste estudo refere-se a pequena amostra de pacientes incluída nesta avaliação. Embora não se saiba a real incidência da PCM, acredita-se que não seja elevada. No serviço onde esta pesquisa foi desenvolvida são admitidos cerca de 15 pacientes novos ao ano, dos quais 11 a 12 apresentam a forma crônica da doença. Por este motivo, não foi possível no período de 18 meses uma amostra maior de pacientes. Outro problema encontrado, já anteriormente comentado, foi a dificuldade de alguns pacientes em obter amostras sequenciais de escarro, para que se possa ter uma análise mais fidedigna no incremento da sensibilidade do diagnóstico da PCM. O que se pode considerar é que a pequena amostra de pacientes deste estudo não foi suficiente para demonstrar a associação entre a gravidade da doença com a

positividade do exame micológico e com a carga fúngica no escarro. No entanto, alguns achados como a associação com níveis de IDD e de VHS e a tendência com a extensão das lesões pulmonares na radiografia de tórax trazem sinais de que exista esta associação.

Diante dos resultados encontrados, este estudo traz a proposta da realização de exame homogeneizado de escarro como protocolo ao menos na primeira amostra, devido a sua maior sensibilidade em substituir ao exame MD. Além disso, naqueles pacientes com valores baixos de VHS, poucas áreas afetadas nos pulmões e baixos títulos de IDD, há maior probabilidade do exame micológico direto não ser suficiente para concluir o diagnóstico da PCM, devido à baixa sensibilidade nestas condições, o que seria forte indicativo para se utilizar o exame homogeneizado de escarro. Pelos achados deste estudo, a carga fúngica pode ser um potencial preditor da gravidade da doença, em especial da lesão pulmonar, porém estudos futuros, com maior casuística de pacientes, são necessários para se definir seu uso clínico.

6. CONCLUSÕES

As seguintes conclusões puderam ser obtidas do presente estudo:

1. A sensibilidade do exame MH é maior que MD, em especial quando apenas uma amostra de escarro é avaliada;
2. Amostras sequenciais de escarro não aumentaram a sensibilidade do MD e MH, porém pacientes que conseguiram obter duas amostras tiveram maior sensibilidade para ambos os exames já na primeira amostra coletada;
3. Positividade da IDD, assim como títulos mais elevados deste teste, presença de lesões cutâneas e padrão misto de lesão na radiografia de tórax se associaram com a maior sensibilidade do MD;
4. O padrão intersticial de lesão na radiografia de tórax se associou com a negatividade do MH; padrão alveolar e VHS elevado se associaram com MH positivo;
5. Idade acima de 65 anos, hemoptise e presença de nódulos maiores que 0,6 cm e cavidades na radiografia de tórax se associaram com maior carga fúngica no escarro.

REFERÊNCIAS

1. Teixeira M M, Theodoro R C, Carvalho M J A, Fernandes L, Paes H C, Hahn R C, Mendoza L, Bagagli E, San-Blas G, Felipe M S S. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus molecular phylogenetics and evolution. Elsevier. 2009; 52: 273-283.
2. Restrepo A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology*. 1985; 23: 323-34.
3. Marques SA, Franco MF, Mendes RP, Silva NCA, Baccili C, Curcelli ED, et al. Aspectos epidemiológicos da paracoccidioidomicose na área endêmica de Botucatu (São Paulo-Brasil). *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1983; 25(2):87-92.
4. Lutz A. Uma mycose pseudococcidica localisada na bocca e observada no Brazil. *Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomycoses americanas. Brazil-Med*. 1908; 13: 121-24, 15:141-4.
5. Albornoz MB. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. *Sabouraudia*. 1971; 9: 248-53.
6. Franco M, Bagagli E, Scapolio S, Lacaz CS. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. *Med Mycol* 2000; 38: 185 – 91.
7. Restrepo A. Morphological aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* in lymph nodes: implications for the prolonged latency of *Paracoccidioidomycosis*? *Med Mycol*. 2000; 38: 317-22.
8. Ricci G, Mota FT, Wakamatsu A, Serafim RC, Borra RC, Franco M. Canine *Paracoccidioidomycosis*. *Med Mycol*. 2004; 42: 379-83.
9. Grose E, Tamsitt JR. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia, S.A. *Sabouraudia*. 1965; 4(2): 124-5.

10. Costa EO, Diniz LSM, Fava Netto C, Arruda C, Dagli MLZ. Delayed hypersensitivity test with paracoccidioidin in captive Latin America wild mammals. *J Med Vet Mycol.* 1995; 33: 39-42.
11. Franco M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol.* 1986; 25:5-18.
12. Camargo ZP, Franco MF. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev Iberoam Micol.* 2000; 17:41-48.
13. Mendes RP, Cavalcante RS, Marques SA, Marques MEA, Venturini J, Sylvestre TF, Paniago AMM, Pereira AC, da Silva JF, Fabro AT, Bosco SMG, Bagagli E, Hahn RC, Levorato AD. Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. *Open Microbiol J.* 2017; 11:224-282.
14. Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques SA, Dillon NL, Mota NGS. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1987; 20(2): 129-32.
15. Mendes RP. The gamut of clinical manifestations. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton: CRC Press; 1994. p. 233-58.
16. Coutinho Z F, Silva D, Lazéra M, Petri V, Oliveira R M, Sabroza P C, et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saúde Pública.* 2002; 18(5): 1441-54.
17. Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover EP, Feldman D, Stevens DA. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infec Immun.* 1984; 46(2): 346-53.
18. Moreto TC, Marques MEA, Oliveira MLSC, Moris DV, Carvalho LR, Mendes RP. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2011; 105: 473– 478.
19. Borges-Walmsley MI, Chen D, Shu X, Walmsley AR. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbiologia* 2002; 10(2): 80-7.
20. Benard G, Hong MA, Del Negro GMB, Batista L, Shikanai-Yasuda MA, Duarte AJS. Antigen-specific immunosuppression in paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg.* 1996; 54(1): 7-12.

21. Benard G, Romano CC, Cacere CR, Juvenale M, Mendes-Giannini MJS, Duarte AJS. Imbalance of IL-2, IFN- γ and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine*. 2001; 13(4): 248-52.
22. Cavalcante RS, Sylvestre TF, Levorato AD, de Carvalho LR, Mendes RP. Comparison between Itraconazole and Cotrimoxazole in the Treatment of Paracoccidioidomycosis. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; 8(4): e2793. doi: 10.1371/journal.pntd.0002793.
23. Shikanai-Yasuda MA, Mendes RP, Colombo AL, Queiroz-Telles F, Kono ASG, Paniago AM, Nathan A, Valle ACFD, Bagagli E, Benard G, Ferreira MS, Teixeira MM, Silva-Vergara ML, Pereira RM, Cavalcante RS, Hahn R, Durlacher RR, Khoury Z, Camargo ZP, Moretti ML, Martinez R. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2017; 50(5):715-740.
24. Lopes OSS. Descrição de uma técnica de concentração para pesquisa do *Paracoccidioides brasiliensis* no escarro. *Hospital* 1955; 5:69-79.
25. Paniago AM, Aguiar JI, Aguiar ES, da Cunha RV, Pereira GR, Londero AT, Wanke B. Paracoccidioidomycosis: a clinical and epidemiological study of 422 cases observed in Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003; 36(4):455-9.
26. Iwama de Mattos MCF, Mendes RP, Marcondes-Machado J, et al. Sputum cytology in the diagnosis of pulmonary paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 1991; 114:187-191.
27. Restrepo A. La prueba de inmunodifusion en el diagnostico de la paracoccidioidomycosis. *Sabouraudia* 1966; 4:223-230.
28. Lacaz CS. Técnica Micológica. Métodos de coloração e cultivo de cogumelos. Técnica geral de identificação dos fungos de interesse médico. Exames micológicos de uso corrente. Provas imunoalérgicas empregadas no diagnóstico das micoses. Preparo de alérgenos e vacinas. In: Lacaz CS. *Manual de Micologia Médica*. 3 ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 1960. p. 506-23.
29. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC. *Micologia Médica*. In: *Paracoccidioidomycose*. 8ª ed. São Paulo, Brasil: Editora Sarvier, 1991; p. 248-61.

30. Sourial N, Wolfson C, Zhu B, Quail J, Fletcher J, Karunanathan S, Bandeen-Roche K, Béland F, Bergman H. Correspondence analysis is a useful tool to uncover the relationships among categorical variables. *J Clin Epidemiol.* 2010; 63(6):638-46.
 31. Moreto TC. Diagnóstico da paracoccidiodomicose em pacientes atendidos em serviços de rotina de hospital universitário. 2010 [Dissertação de mestrado]. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/89945>
 32. Mendes RP, Moris DV, Carvalho LC, Oliveira EF, Cavalcante R. Treatment compliance in paracoccidiodomycosis. *Biomedica*, 2008:28. Supplement 1:103-5.
 33. Andrade UV, Oliveira SMDVL, Chang MR, Pereira EF, Marques APDC, Carvalho LR, Mendes RP, Paniago AMM. Treatment compliance of patients with paracoccidiodomycosis in Central-West Brazil. *J Bras Pneumol.* 2019; 45(2):e20180167.
 34. Benard G. An overview of the immunopathology of human paracoccidiodomycosis. *Mycopathologia* 2008; 165(4-5): 209-21.
 35. de Castro LF, Ferreira MC, da Silva RM, Blotta MH de SL, Longhi LN, Mamoni RL. Characterization of the immune response in human paracoccidiodomycosis. *J Infect* 2013; 67(5): 470-85.
 36. Marchiori E, Valiante PM, Mano CM, Zanetti G, Escuissato DL, Souza AS Jr, Capone D. Paracoccidiodomycosis: high-resolution computed tomography-pathologic correlation. *Eur J Radiol.* 2011; 77(1):80-4.
 37. Castle SC. Clinical relevance of age-related immune dysfunction. *Clin Infect Dis.* 2000; 31(2):578-85.
 38. Hof H. Mycoses in the Elderly. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2010) 29:5–13.
-