

Talísia Collachiti Moreto

**Diagnóstico da paracoccidioidomicose em
pacientes atendidos em Serviços de rotina
de hospital universitário**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Doenças
Tropicais da Faculdade de Medicina de
Botucatu - UNESP, para obtenção do
título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Poncio Mendes

Co-orientadora: Dr^a Adriana Pardini Vicentini Moreira

Botucatu

2010

Talísia Collachiti Moreto

**Diagnóstico da paracoccidioidomicose em
pacientes atendidos em Serviços de rotina
de hospital universitário**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Doenças
Tropicais da Faculdade de Medicina de
Botucatu - UNESP, para obtenção do
título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Poncio Mendes

Co-orientadora: Dr^a Adriana Pardini Vicentini Moreira

Botucatu

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Moreto, Talísia Collachiti.

Diagnóstico da paracoccidiodomicose em pacientes atendidos em Serviços de rotina de hospital universitário / Talísia Collachiti Moreto. – Botucatu, 2010.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Rinaldo Poncio Mendes
Assunto CAPES: 40601005

1. Paracoccidiodomicose - Diagnóstico

Palavras-chave: Diagnóstico; *Immunoblotting*; Imunodifusão; Paracoccidiodomicose; Serviços de rotina

Epígrafe

O único homem que está isento de erros,
é aquele que não arrisca acertar.

Albert Einstein

Dedicatória

A meus pais, *José Carlos* e *Magda*,
pelo apoio incondicional em minhas decisões, pelo
beijo às segundas-feiras de manhãzinha, pelos ouvidos
atentos às histórias, e por sempre estarem de braços e
coração abertos. Obrigada por tudo. Amo vocês!

A minha avó *Mariquinha*, exemplo
de família, força, sabedoria, humildade e amor.

Ao querido *Jorge*, pela atenção e
compreensão nos momentos de tensão, tristeza,
alegria e euforia, auxílio nas indecisões (quantas!), pela
confiança, respeito, amor e companheirismo. Te amo!

A minha irmã *Fabiola*, que mesmo
longe, sempre torceu e quis o melhor para mim.
Você sempre fará parte da minha vida.

A meu orientador, *Dr. Rinaldo "Tietê"*

Poncio Mendes, não apenas pela orientação neste trabalho, mas pela paciência, ensinamentos e conselhos que levarei para sempre. Obrigada.

Aos *pacientes* atendidos no ambulatório de Blastomicose – Hospital das Clínicas / Unesp, objetivo central desse trabalho.

Agradecimientos

A *Deus*, pela oportunidade da vida, por guiar meus caminhos, pela luz nas dificuldades, pela bondade e por me dizer de algum modo “você chega lá!”. Obrigada Senhor.

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

Às colaboradoras desse trabalho, *Dr^a Mariângela E. A. Marques*, *Dr^a Maria Luiza S. C. Oliveira* e *Dr^a Adriana P. Vicentini-Moreira*, pelas correções e atenção.

À responsável pelo Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do Instituto Adolfo Lutz – SP, colaboradora dessa dissertação e amiga, *Dr^a Adriana P. Vicentini-Moreira*, por ter me recebido prontamente em seu laboratório, pela atenção, conselhos, ensinamentos e correções. Também às meninas do laboratório, *Valdelene S. Kohara* e *Angela N. Passos*, que me acolheram, pela paciência, colaboração e dedicação a parte deste trabalho. Obrigada pela amizade construída.

A *Dr^a Lídia R. Carvalho*, do Departamento de Bioestatística – IB / Unesp, pelas análises estatísticas deste trabalho e por me socorrer em vários momentos.

A *Dr^a Ligia V. Barrozo*, pela participação, mesmo que indireta, em minha dissertação.

Aos responsáveis e funcionários do *Hemocentro do Hospital das Clínicas da FMB – UNESP*, pela parceria neste trabalho e, claro, aos doadores de sangue que contribuíram com esta pesquisa.

À responsável pelo Banco de Sangue da Sociedade Portuguesa de Beneficência de Santos, *Dr^a Rosane R. S. Giuliani*, por permitir a coleta de sangue dos doadores, aos funcionários, *Regina, Nascimento, Lenita, Margot, Eliana, Edileusa e Ulisses*, pelo auxílio e bons momentos que juntos passamos, e aos doadores que participaram deste trabalho.

Aos funcionários da Pós-Graduação e do Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem, em especial *Solange S. Cagliari*, pelo auxílio e atenção em todos os momentos em que precisei.

Ao coordenador da Pós-Graduação em Doenças Tropicais, *Paulo Câmara Marques Pereira*, e ao vice-coordenador, *Dr. Benedito Barraviera*, pela confiança em meu trabalho.

Aos amigos e pós-graduandos do Laboratório de Pesquisa de Doenças Tropicais - LEPDT, *André Martins, Eliana Peresi, Fabiana Claviço, Gláucia A. G. Cezário, James Venturini, Larissa Ragozo, Lidiane Ritsue, Mariana Gatto, Mariele M. Picka, Renata A. Bueno, Rodrigo A. Cocato, Tatiane F. Sylvestre, Thaís B. de Carvalho, Thales D. Arantes e Vanessa Nicolete*, pela convivência pacífica, intimidade, conselhos, risos, reclamações, e pelos longos almoços “produtivos”. Admiro cada um a seu modo.

À amiga *Daniela V. Moris*, companheira e “chefe”, sempre com um conselho, explicação ou história. Vários momentos e viagens inesquecíveis. Admiro sua determinação e otimismo.

À amiga *Fabiana Moura*, pessoa maravilhosa, otimista, bem-humorada e sempre animada que aqui conheci. Uma irmãzinha postiça.

Às amigas e companheiras de república *Ana Cláudia M. Azevedo, Denise G. Triglia, Kamila M. R. de Campos, Renata A. Bueno e Carla L. Rodrigues*, pelo convívio, risadas, sugestões nas indecisões e amizade verdadeira. Vocês sempre estarão em meu coração.

Ao funcionário do LEPDT e amigo, *Carlos Roberto Gonçalves de Lima – Carlinhos*, pela convivência, conselhos, momentos de alegria e descontração.

À responsável pelo LEPDT, *Sueli A. Calvi*, pelo auxílio nos momentos em que precisei.

Aos funcionários da limpeza, *Ju, Carlitos e Silvana*, pela dedicação, amizade e principalmente confiança.

Sumário

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO.....	1
1. Aspectos gerais do <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> e da paracoccidioidomicose.....	2
2. Diagnóstico da paracoccidioidomicose.....	7
3. Revisão da literatura.....	13
3.1 Comparação de duas técnicas diagnósticas - imunodifusão e <i>immunoblotting</i>	16
4. Objetivos.....	17
4.1. Objetivo geral.....	17
4.2. Objetivos específicos.....	17
 CAPÍTULO II - CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	 18
1. Casuística.....	19
1.1 - Casuística.....	19
1.2. Definição de Caso.....	19
1.3 - Critérios de inclusão e de exclusão.....	19
1.4 - Grupos controles.....	20
1.5 - Desenho do estudo.....	21
2. Métodos.....	22
2.1 - Revisão de prontuários.....	22
2.2 - Revisão dos laudos de exames cito e histopatológicos...	23
2.3 - Classificação das formas clínicas.....	23
2.4 - Laboratórios.....	24
2.5 - Soros.....	24
2.5.1 - Soros humanos.....	24
2.5.2 - Soros hiperimunes obtidos em coelhos.....	24
2.6 - Amostras de <i>P. brasiliensis</i>	25
2.7 - Meios de Cultura.....	25
2.8 - Antígenos de <i>P. brasiliensis</i>	25
2.9 - Exame micológico direto.....	26

2.10 - Exame citopatológico.....	26
2.11 - Exame histopatológico de fragmentos de tecido.....	27
2.12 - Reação de imunodifusão dupla em gel de ágar.....	27
2.12.1 - Imunodifusão no Laboratório Experimental de Pesquisa de Doenças Tropicais - FMB / UNESP.....	28
2.12.2 - Imunodifusão no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses - IAL.....	29
2.13 - SDS-PAGE.....	29
2.14. - Ensaio de <i>immunoblotting</i>	30
2.15 - Avaliação de acurácia.....	32
2.16 - Aprovação pela Comissão de Ética em Pesquisa.....	33
2.17 - Levantamento bibliográfico.....	33
2.18 - Normas para redação da dissertação.....	34
2.19 - Documentação fotográfica.....	34
2.20 - Análise estatística dos resultados.....	34
CAPÍTULO III - RESULTADOS.....	36
1. Caracterização da casuística estudada.....	37
2. Exame micológico direto.....	41
2.1 Escarro.....	42
3. Exame citopatológico.....	45
3.1. Escarro.....	45
3.2. Linfonodos.....	48
3.3. Pele.....	48
3.4. Lavado bronco-alveolar.....	48
3.5. Líquido ascítico.....	48
4. Exame histopatológico.....	49
5. Exame sorológico.....	51
5.1. Avaliação sorológica segundo forma clínica.....	53
6. Comparação da positividade dos testes diagnósticos.....	58

7. Avaliação dos exames sorológicos em soros negativos frente à reação de imunodifusão dupla em gel de ágar (IDD), realizada no Laboratório Experimental de Pesquisa de Doenças Tropicais.....	59
7.1. Resultados da IDD realizada no mesmo laboratório com diferentes antígenos.....	59
7.1.1. Laboratório Experimental de Pesquisa de Doenças Tropicais (LEPDT) da FMB - UNESP, com diferentes preparações antigênicas.....	59
7.1.2. Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses (LIM) do Instituto Adolfo Lutz (IAL) - SP, com diferentes antígenos.....	60
7.2. Resultados da reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada com o mesmo antígeno em laboratórios diferentes para avaliação da reprodutibilidade interlaboratorial do teste.....	61
7.3. Resultados da reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada com antígenos diferentes em dois laboratórios.....	63
7.4. Avaliação global das comparações de sensibilidade da reação de imunodifusão dupla em gel de ágar apresentadas em 7.1, 7.2 e 7.3.....	64
8. Avaliação do <i>immunoblotting</i> (IB) realizado no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL – SP, em soros negativos à reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, de pacientes com paracoccidiodomicose confirmada e em atividade.....	64
8.1. Comparação dos ensaios de <i>immunoblotting</i> realizados com os antígenos Pb 113 e Pb B-339.....	64
8.2. Comparação da sensibilidade do ensaio de <i>immunoblotting</i> com a reação de imunodifusão dupla em gel de ágar.....	66

8.2.1. Reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada no LEPDT da FMB - UNESP com antígeno Pb 113 de Araraquara (IDDr-FMB) vs <i>immunoblotting</i>	66
8.2.2. Reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada no LEPDT da FMB - UNESP com antígeno Pb 113 do IAL (IDD1-FMB) vs <i>immunoblotting</i>	68
8.2.3. Reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada no LEPDT da FMB - UNESP com antígeno Pb B-339 do IAL (IDD2-FMB) vs <i>immunoblotting</i>	69
8.2.4. Reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL com antígeno Pb 113 de Araraquara (IDDr-IAL) vs <i>immunoblotting</i>	70
8.2.5. Reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL com antígeno Pb 113 do IAL (IDD1-IAL) vs <i>immunoblotting</i>	71
8.2.6. Reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL com antígeno Pb B-339 do IAL (IDD2-IAL) vs <i>immunoblotting</i>	72
8.2.7. Avaliação global da sensibilidade das reações de imunodifusão comparando à dos ensaios de <i>immunoblotting</i>	73
9. Avaliação do ensaio de <i>immunoblotting</i> e da reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizados em doadores de sangue.....	73
9.1. Avaliação dos testes de acurácia do ensaio de <i>immunoblotting</i> realizado em soros de pacientes com paracoccidiodomicose em atividade e de doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu.....	73

9.2. Comparação global dos testes de acurácia do ensaio de <i>immunoblotting</i> realizado em soros de pacientes com paracoccidiodomicose em atividade e de doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu.....	76
9.3. Comparação dos ensaios de <i>immunoblotting</i> entre si e com a reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizados em soros de doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu.....	76
9.4. Avaliação dos testes de acurácia do ensaio de <i>immunoblotting</i> realizado em soros de pacientes com paracoccidiodomicose em atividade e de doadores do Banco de Sangue da Sociedade Portuguesa de Beneficência de Santos.....	79
9.5. Comparação global dos testes de acurácia do ensaio de <i>immunoblotting</i> realizado em soros de pacientes com paracoccidiodomicose em atividade e de doadores de sangue do Banco de Sangue da Sociedade Portuguesa de Beneficência de Santos.....	82
9.6. Comparação dos ensaios de <i>immunoblotting</i> entre si e com a reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizados em soros de doadores de sangue do Banco de Sangue da Sociedade Portuguesa de Beneficência de Santos - 60 indivíduos nativos.....	82
9.7. Comparação dos ensaios de <i>immunoblotting</i> entre si e com a reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizados em soros de doadores de sangue do Banco de Sangue da Sociedade Portuguesa de Beneficência de Santos - 14 indivíduos nativos.....	85
9.7. Comparação do <i>immunoblotting</i> realizado em soros de doadores de Botucatu e Santos.....	87
CAPÍTULO IV - DISCUSSÃO.....	88
CAPÍTULO V - CONCLUSÕES.....	109

CAPÍTULO VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111
CAPÍTULO VII - RESUMO.....	120
CAPÍTULO VIII - ABSTRACT.....	123
ANEXOS.....	125

Lista de Abreviaturas

CSSEPC de Pb	componente solúvel da superfície externa da parede celular de <i>P. brasiliensis</i>
FMB	Faculdade de Medicina de Botucatu
gp	glicoproteína
gp43	glicoproteína de 43 kDa
gp70	glicoproteína de 70 kDa
HC-FMB	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu
IAL	Instituto Adolfo Lutz – São Paulo
IB	<i>Immunoblotting</i>
IB1gp43	reconhecimento da fração de 43 kDa por <i>immunoblotting</i> realizado com antígeno Pb 113. Ensaio conduzido no IAL
IB1gp70	reconhecimento da fração de 70 kDa por <i>immunoblotting</i> realizado com antígeno Pb 113. Ensaio conduzido no IAL
IB2gp43	reconhecimento da fração de 43 kDa por <i>immunoblotting</i> realizado com antígeno Pb B-339. Ensaio conduzido no IAL
IB2gp70	reconhecimento da fração de 70 kDa por <i>immunoblotting</i> realizado com antígeno Pb B-339. Ensaio conduzido no IAL
IDD	reação de imunodifusão dupla em gel de ágar
IDD1-FMB	reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada com antígeno Pb 113. Ensaio conduzido no LEPDT da FMB
IDD1-IAL	reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada com antígeno Pb 113. Ensaio conduzido no LIM do IAL – SP
IDD2-FMB	reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada com antígeno Pb B-339. Ensaio conduzido no LEPDT da FMB
IDD2-IAL	reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada com antígeno Pb B-339. Ensaio conduzido no LIM do IAL – SP
IDDr-FMB	reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada com antígeno Pb 113 (preparado na FCFAR - UNESP / Araraquara). Ensaio conduzido no LEPDT da FMB – UNESP
IDDr-IAL	reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada com antígeno Pb 113 (preparado na FCFAR - UNESP / Araraquara). Ensaio conduzido no LIM do IAL – SP

IL-2	interleucina-2
kDa	kiloDalton
KOH	hidróxido de potássio
LEPDT	Laboratório Experimental de Pesquisa de Doenças Tropicais da FMB – UNESP
LIM	Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL - SP
NGTA	Neoptona-Glicose-Tiamina-Asparagina
<i>P. brasiliensis</i>	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PAAF	punção aspirativa por agulha fina
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
Pb 113	amostra 113 de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
Pb B-339	cepa B-339 de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PCM	Paracoccidioidomicose
SAB	Sabouraud
SDS	sódio duodecil sulfato
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com sódio duodecil sulfato
Temed	N,N, N,' – tetrametil-etilenodiamina
Tris	tris-(hidroxi-metil)-amino-metano

Capítulo I - Introdução

1. Aspectos gerais de *Paracoccidioides brasiliensis* e da paracoccidioidomicose

A paracoccidioidomicose (PCM) é micose sistêmica causada pelo fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*. Confinada à América Latina, é endêmica em área que se estende do México à Argentina¹. Apesar de incompletos, os dados disponíveis indicam maior incidência dessa micose no Brasil, onde é diagnosticada com grande freqüência no Estado de São Paulo².

Foi descrita pela primeira vez por Adolpho Lutz³ em 1908 que, em lesões bucais de dois pacientes de São Paulo, encontrou fungos esféricos, com morfologia diferente da revelada pelo *Coccidioides immitis*. As principais manifestações clínicas dos pacientes incluíam amolecimento dos dentes e comprometimento de mucosa oral, laringe, linfonodos, glândula salivar e traquéia. Lutz registrou que o exame histopatológico desses pacientes revelava reação tuberculóide com fungos, células gigantes, células epitelióides e fungos com exo-esporulação. Esse pesquisador também isolou o fungo em cultivo, demonstrou a existência das fases micelial em cultivo a temperatura ambiente e leveduriforme em pacientes infectados, e reproduziu a doença em cobaias. Deve-se registrar que poucos pesquisadores foram tão completos ao descreverem uma nova doença e seu agente etiológico.

Em 1912, o bacteriologista italiano Alfonso Splendore, classificou o agente etiológico da PCM dentro do gênero *Zymonema* propondo a denominação de *Zymonema brasiliense*⁴. A classificação definitiva foi feita em 1930, por Floriano Paulo de Almeida, que estabeleceu diferenças entre o agente causador da PCM e o *C. immitis*, com o qual era freqüentemente confundido. Esse autor revalidou também a espécie nomeada por Splendore em 1912, e criou um novo gênero, cabendo ao fungo a denominação *Paracoccidioides brasiliensis*.⁵

Essa micose foi inicialmente denominada Blastomicose Sul-Americana (BSA) ou Doença de Lutz, Splendore e Almeida⁶. No entanto, a oficialização do termo paracoccidioidomicose se deu no *First Pan American Symposium on Paracoccidioidomycosis*, realizado em Medellín, Colômbia, única denominação utilizada por Ayello em sua conferência de abertura, na qual abordou aspectos históricos dessa micose sistêmica⁷. Essa denominação

se justifica, pois casos autóctones de PCM já tinham sido descritos na América Central e no México, motivo pelo qual deixava de ser unicamente sul-americana. Além disso, já se iniciava uma nova abordagem na sistemática de fungos, ligando-se o nome da doença ao de seu agente etiológico.

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

Marques et al.² registraram que a área endêmica desse fungo localiza-se entre 22°01' e 23°37' de latitude sul, tem temperatura anual entre 18 e 24°C, pluviosidade anual entre 1187 a 1463mm, altitude entre 400 e 873m, com solos ácidos e pobres. Solos localizadas no litoral parecem não oferecer as condições ideais para o desenvolvimento do *P. brasiliensis*.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 (Grose and Tamsitt⁸; Albornoz⁹), ao longo período de latência da doença (Restrepo¹⁰) e à falta de relatos da doença em animais domésticos ou selvagens (Costa et al.¹¹). Em 1986, Naiff et al.¹² relataram o isolamento de *P. brasiliensis* em 20% dos tatus (*Dasypus novemcinctus*) estudados em Tucuruí - Pará, localizado na Região Amazônica, área considerada não-endêmica para esta doença.

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^{13,14}. O fungo pode, então, se disseminar por via hematogênica e, ou, linfática para qualquer parte do organismo.¹³

A penetração cutânea direta do fungo é muito rara, apesar de ter sido documentada em casos excepcionais, como acidentes com espinhos e em laboratório. A PCM não é doença de notificação compulsória no Brasil, por não existir confirmação de transmissão inter-humana¹⁵. No Estado de São

Paulo, a paracoccidioidomicose passou a ser de notificação obrigatória a partir de junho de 2009.

Ao entrar no organismo, *P. brasiliensis* pode ser destruído imediatamente ou multiplicar-se, produzindo uma lesão de inoculação e se disseminando para linfonodos regionais. Desta forma, constitui-se o complexo primário, formado pelo pólo parenquimatoso, pela linfangite ascendente e pelo pólo ganglionar. 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 ativa¹⁶. Os focos latentes podem apresentar reativação posterior, denominada reinfecção endógena, que pode levar à doença ativa.

As manifestações clínicas da PCM se relacionam, em geral, ao comprometimento de pulmões, pele, mucosa das vias aerodigestivas superiores, adrenais e de órgãos ricos no sistema fagocítico mononuclear, tais como fígado, baço, linfonodos e medula óssea¹³. No entanto, a PCM pode comprometer qualquer órgão, aparelho ou sistema.

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, é 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 apresentar envolvimento predominante do sistema reticuloendotelial, 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 freqüente. Nos tecidos são encontrados muitos fungos em multiplicação e granulomas em geral frouxos. A forma crônica ou do adulto ocorre em cerca de 75% dos casos, em geral acomete indivíduos com idade superior a 30 anos e que apresentam história clínica de longa duração, com freqüência acima de seis meses. As manifestações pulmonares são muito freqüentes 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 seqüelas, são observadas após tratamento e se caracterizam pelas manifestações clínicas ligadas às seqüelas observadas após tratamentos, entre as quais se destacam fibrose e enfisema pulmonar e Síndrome de Addison.^{17,18}

Como não é doença de notificação compulsória no Brasil, a real prevalência da PCM não pode ser calculada. Coutinho et al.¹⁹ estudaram 3181 óbitos por PCM no Brasil, entre 1980 e 1995, e demonstraram a grande magnitude e baixa visibilidade dessa micose, destacando que era a oitava causa de mortalidade 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 infecção é muito mais freqüente que a doença, pois muitos indivíduos se infectam com o fungo, mantêm focos latentes por toda a vida e nunca adoecem. Inquérito realizado em Pratânia (SP), por meio de reações intradérmicas com paracoccidioidina e histoplasmina, no mesmo indivíduo, revelou que 51,2% da população eram, ao mesmo tempo, paracoccidioidino-positivos e histoplasmino-negativos, o que demonstra elevada prevalência de infecção paracoccidióidica, pois os outros fungos que poderiam propiciar reação cruzada com antígenos de *P. brasiliensis* não têm sido identificados na região. Esse mesmo estudo revelou que, entre crianças de cinco a 13 anos de idade, essa prevalência era igual a 32,5%, o que demonstra contato precoce com o fungo.²⁰

A PCM é observada em pacientes que tiveram ou se encontram em contato direto e prolongado com o solo, como os trabalhadores rurais^{2,13,21,22}. Predomina em indivíduos do sexo masculino, com razão de masculinidade de 10:1, e é mais prevalente na faixa etária entre 30 e 49 ou entre 35 e 54 anos^{2,21,22}. 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.^{22,23}

P. brasiliensis induz a formação de granuloma epitelióide, com número variável de células fúngicas e padrão compacto ou frouxo, na dependência do grau de comprometimento da resposta imune celular do hospedeiro. Assim, os pacientes com a forma menos grave da doença apresentam granulomas compactos, densos, associados com pequena quantidade de células fúngicas, e aqueles com a forma grave apresentam granuloma frouxo, com grande quantidade de fungos viáveis.²³

Os doentes com PCM revelam comprometimento imune celular específico, isto é, resposta deficiente a antígenos do *P. brasiliensis*, mas não aos de outros agentes infecciosos²⁴. 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 acompanha 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 Th2.²⁵

A produção de anticorpos específicos se encontra aumentada em pacientes com as formas aguda e crônica da PCM²⁶. No entanto, além de facilitar a opsonização de células fúngicas, não se conhece outra ação dos anticorpos na defesa do hospedeiro.

Além disso, deve-se registrar que a gravidade da doença guarda relação inversa com a resposta imune celular e direta com os níveis séricos de anticorpos específicos.²⁷

A evolução da PCM é em geral progressiva e, se não tratada, pode levar ao óbito. Seu tratamento pode ser feito com derivados sulfamídicos²⁸, cotrimoxazol (associação sulfametoxazol-trimetoprim)²⁹, anfotericina B³⁰ e derivados azólicos, tanto imidazólicos^{31,32} quanto triazólicos³³. Além desses antifúngicos, pode-se utilizar estimulantes imunológicos, que já se revelaram eficientes como tratamento coadjuvante de anti-fúngicos no tratamento de formas graves da PCM.³⁴

2. Diagnóstico da paracoccidioidomicose

O diagnóstico da PCM é feito pela demonstração do *P. brasiliensis*, seu agente etiológico, em materiais clínicos como escarro, lavado bronco-alveolar, material de linfonodos, nasais e oculares, raspado de lesões cutâneas e mucosas, fragmentos de tecidos e por vezes em líquido cefalorraquidiano (LCR) e sangue.¹⁸

A visualização do *P. brasiliensis* ao microscópio óptico possibilita a identificação de formas típicas da fase leveduriforme, com fungos em brotamento por exo-esporulação. Assim, o encontro de formas típicas da fase leveduriforme em materiais clínicos, isto é, em *mickey mouse* ou em roda de leme, confirmam a etiologia paracoccidióidica.³⁵

A pesquisa desse fungo no escarro foi feita inicialmente por simples exame direto e a fresco, entre lâmina e lamínula. A seguir, para melhorar a sensibilidade do exame microscópico, começou-se a utilizar clareadores como potassa ou soda³⁶. A seguir, Lopes³⁷ propôs a técnica de concentração para pesquisa do *P. brasiliensis* no escarro, que contribuiu para aumentar a sensibilidade do método.

No entanto, as formas pequenas desse fungo podem ser confundidas com *Histoplasma capsulatum*³⁸. Nesse caso, impõe-se o cultivo do material examinado ou a realização de imunofluorescência, com soros hiperimunes marcados com fluoresceína.³⁸

P. brasiliensis apresenta crescimento lento, demorando 15 a 20 dias para formar colônias aparentes nos meios de cultura. Para o isolamento de *P. brasiliensis* pode ser utilizado o meio tradicional em micologia, ágar Sabouraud, mas recomenda-se o emprego de meios enriquecidos com 15% de extrato de levedura ou, ainda, ágar infusão de cérebro e coração (BHI). Todos os meios devem conter cloranfenicol (250mg/L) e, preferencialmente, cicloheximida (400mg/L), para inibir, respectivamente, contaminação bacteriana e, ou, crescimento de fungos anemófilos.¹⁸

Para identificação de *P. brasiliensis* em amostras de escarro, métodos moleculares também podem ser utilizados sem a necessidade de semeá-las em meio de cultivo. São métodos de rápida execução, sensíveis e específicos, mas exigem laboratório e técnicos especializados.³⁹

A técnica da citoinclusão foi descrita por Koss⁴⁰. Para identificação de *P. brasiliensis*, essa técnica foi padronizada utilizando-se a coloração pela prata⁴¹, mas o patógeno também pode ser visualizado, em menor freqüência, quando as colorações de Shorr e Giemsa são utilizadas.⁴²

O material obtido para citologia - escarro, lavado e escovado brônquico - é corado pela técnica de Papanicolaou, que revela a presença de células gigantes e de estruturas birrefringentes, sugestivas de fungos. Para melhor visualização do fungo utiliza-se a coloração pela prata, método de Gomori-Grocott, em que o fungo se apresenta na forma esférica, oval, com formato típico de roda de leme, em que a célula-mãe apresenta múltiplas esporulações, e com formas em *mickey mouse*, em que a célula-mãe apresenta dois brotamentos. A observação do fungo em formas típicas multibrotantes nos esfregaços citológicos, tanto nos microabscessos como associado às células gigantes multinucleadas, é suficiente para estabelecer o diagnóstico de paracoccidioidomicose.¹⁸

Em tecidos obtidos por biópsia, as colorações de hematoxilina-eosina (HE) e ácido periódico de Schiff (PAS) permitem a observação do agente etiológico em reações granulomatosas. Observam-se células gigantes multinucleadas e células epitelióides que contêm uma ou mais células fúngicas, leucócitos polimorfonucleares e, nos granulomas compactos, uma coroa de linfócitos¹⁸. A coloração de Gomori-Grocott evidencia os fungos existentes no tecido.

A prova de intradermorreação tem grande valor em estudos epidemiológicos, já que os resultados podem indicar os locais de maior endemicidade do agente etiológico, e na avaliação da imunidade celular do paciente, mas não no diagnóstico.⁴³

Na detecção de anticorpos séricos anti-*P. brasiliensis* foram utilizadas as reações de fixação de complemento^{44,45,46,47}, precipitação em tubos^{46,48}, precipitação em gel de ágar - imunodifusão dupla em gel de ágar (IDD)^{49,50} e contraímunoeletroforese^{26,51}, imunofluorescência indireta⁴⁸ e métodos imunoenzimáticos.^{51,52}

Desde 1949, quando Ouchterlony⁵³ introduziu a difusão em gel de ágar, várias modificações têm sido realizadas na técnica.

Lacaz et al.⁵⁴ foram os primeiros a empregar a técnica de dupla difusão em gel para demonstrar a presença de anticorpos anti-*P. brasiliensis*. O antígeno utilizado foi o sobrenadante de cultura de fungos rompidos por ação mecânica. Os autores demonstraram que, com o mesmo preparado antigênico, os soros se mostraram positivos na reação de imunodifusão e também na de fixação do complemento.

Em 1966, Restrepo⁴⁹ relatou um teste qualitativo de imunodifusão muito prático, sensível e efetivo, realizado com antígeno filtrado de *P. brasiliensis*. A imunodifusão preparada com o antígeno da fase leveduriforme revelou 80% de positividade em pacientes com paracoccidiodomicose. O teste também mostrou aplicabilidade no controle do tratamento ao se mostrar negativo em pacientes com cura clínica.

O número de bandas de precipitação observadas na imunodifusão depende do tipo de antígeno e das condições utilizadas. Quando se utiliza um antígeno de filtrado de cultura obtido a partir de células leveduriformes de *P. brasiliensis* frente a soros de pacientes com suspeita clínica de PCM é possível detectar até três linhas de precipitação: linha 1 (perto do orifício do antígeno), linha 2 (posição intermediária) e linha 3 (perto do orifício do soro). Durante o tratamento, a linha 3 é a primeira a desaparecer, a linha 2 é a segunda enquanto a linha 1 permanece por mais tempo⁴². O número de bandas observadas na reação de imunodifusão mostrou correlação direta com a gravidade da doença.⁵⁵

A reação de imunodifusão apresenta especificidade e valor preditivo positivo elevados. Embora raras, as reações cruzadas podem ocorrer, em especial em infecções causadas pelo *H. capsulatum*, devido a frações antigênicas comuns.^{56,57}

Atualmente, a IDD é o método sorológico utilizado com maior frequência na detecção de anticorpos anti-*P. brasiliensis* e padronizado em manual de vigilância epidemiológica.¹⁸

A contraimuno eletroforese (CIE) é caracterizada por sua elevada sensibilidade, podendo detectar cerca de 1,25 µg de anticorpos por mL de soro. O risco de reação cruzada nesta técnica é semelhante, se não um pouco maior do que na imunodifusão⁵⁵. Quando comparada ao ensaio imunoenzimático de ELISA, devido aos custos e viabilidade para execução

dessa técnica, recomenda-se que a CIE seja realizada no diagnóstico em áreas subdesenvolvidas ou onde o ELISA não possa ser empregado²⁶. A CIE tem sensibilidade igual ou um pouco maior que a IDD. O tempo para realização de ambas as técnicas não difere⁵⁸. Por outro lado, na CIE são necessários reagentes de custo elevado, condição nem sempre acessível a laboratórios de rotina em Serviços públicos de regiões endêmicas para PCM nos países subdesenvolvidos, o que transforma a IDD como técnica de escolha em relação a CIE⁵⁹.

O teste de ELISA tem sido utilizado para a detecção de anticorpos circulantes em quase todas as micoses sistêmicas. Camargo et al.⁵¹ mostraram que esse método imunoenzimático apresentava 95% de sensibilidade e que, quando comparado à contraímunoeletroforese, requeria menor quantidade de soro e antígeno em sua execução. Não houve reação cruzada na técnica de ELISA ao utilizar soros de pacientes com aspergilose e antígeno metabólico de *P. brasiliensis*, mas ocorreu em 5% dos soros de pacientes com candidíase e em 10% dos com histoplasmose.

Botteon et al.⁶⁰ pesquisaram anticorpos anti-*P. brasiliensis* em doadores de sangue utilizando o teste de ELISA. Setecentos indivíduos eram provenientes das áreas rural e urbana de Londrina - PR, área endêmica para PCM, e 350 indivíduos eram de São Paulo - SP. Os antígenos utilizados foram exoantígeno de *P. brasiliensis* e gp43 purificada. Com ambos os antígenos a técnica apresentou 21% de positividade em soros de doadores de Londrina e cerca de 1% nos doadores de São Paulo. Esses achados demonstram que o método empregado não apresenta 100% de especificidade, desejável em um teste sorológico utilizado em diagnóstico.

Outro trabalho que utilizou o teste de ELISA em doadores de sangue foi realizado no noroeste do Paraná. Maluf et al.⁶¹ utilizaram exoantígeno de *P. brasiliensis* em 680 soros de doadores e observaram 27% de positividade. Esse valor achado compromete a especificidade do método e sugere sua utilização como teste de triagem, para diagnóstico da PCM.

Técnicas imunoenzimáticas do tipo *Western blot* ou *immunoblotting* (IB) possuem elevada sensibilidade e foram empregadas originalmente para caracterizar a resposta imune humoral a antígenos de *P. brasiliensis*.⁵⁵

Em 1989, Mendes-Giannini et al.⁶² detectaram, pela técnica de *immunoblotting*, a presença da glicoproteína de 43 kDa em 28 soros de pacientes com PCM, divididos em três grupos. O grupo 1 era constituído por 12 pacientes com a forma juvenil, avaliados em três diferentes períodos - antes do tratamento e 10 e 24 meses depois de sua instituição; no grupo 2 havia cinco pacientes com a forma crônica e que ainda não se encontravam na vigência de tratamento quando as amostras foram coletadas; no grupo 3 havia seis pacientes com cura clínica há mais de um ano. Como controle da reação empregaram-se cinco soros de indivíduos saudáveis. Em relação aos pacientes com PCM juvenil, verificou-se que um *pool* com as amostras obtidas antes do início do tratamento reconheceram de forma específica a fração de 43 kDa, tendo-se observado que a partir do 10º mês de terapêutica sua detecção ocorreu, porém em menor intensidade; após 24 meses de tratamento, o *pool* de amostras não reconheceu a gp43. Verificou-se que o *pool* realizado com os soros de pacientes com PCM crônica reagiram frente à fração de 43 kDa, que não foi detectada nos soros de pacientes com cura clínica há mais de um ano.

Silva et al.⁵² demonstraram que a utilização de um método imunoenzimático, como o *immunoblotting*, melhora significativamente a sensibilidade do imunodiagnóstico na PCM e sugeriram, também, que pelo menos dois testes sorológicos para detecção de anticorpos sejam adotados em casos de diagnósticos duvidosos.

Embora o *immunoblotting* seja um ensaio muito sensível, não é acessível a todos os laboratórios das regiões endêmicas de PCM da América Latina.⁵⁹

Recentemente, o diagnóstico sorológico baseado na identificação de anticorpos passou a contar com a utilização de antígenos muito purificados e bem caracterizados, como a gp43, que é o antígeno dominante do *P. brasiliensis*, que poderiam substituir preparações derivadas de células totais, relativamente crus, ou filtrados de cultura^{63,64}. A utilização desses novos antígenos proporcionou aumento da sensibilidade e da reprodutibilidade dos testes utilizados em pacientes imunocompetentes⁶⁵. No entanto, esses antígenos ainda não se encontram disponíveis no mercado e, por esse motivo, não podem ser incorporados aos métodos utilizados no atendimento de rotina.

A detecção de anticorpos em pacientes imunossuprimidos ainda era um problema, quando Salina et al.⁶⁶ e Mendes-Giannini et al.⁶² demonstraram a possibilidade de detecção da glicoproteína de 43 kDa em urina e soro de pacientes com PCM. Outros trabalhos focalizaram a detecção da gp43 e de um antígeno com 87 kDa no soro de pacientes com PCM^{66,67,68}. No entanto, tais métodos diagnósticos ainda precisam evoluir, inclusive no sentido de maior especificidade⁶⁵. Depois de resolvidos esses problemas, ainda restarão os que se relacionam à implantação do método em Serviços de rotina e a seus custos.

Em 2003, Díez et al.⁶¹ avaliaram a capacidade discriminatória da combinação de duas frações antigênicas purificadas de *P. brasiliensis* no diagnóstico sorológico da PCM: antígeno recombinante de 27 kDa e a proteína de choque térmico (HSP) de 87 kDa, empregando ELISA de inibição. Foram avaliados soros de 37 pacientes com PCM, sete dos quais com a forma aguda/subaguda, 22 com a crônica multifocal e oito com a crônica unifocal, 30 soros de indivíduos com outras micoses, 10 dos quais com histoplasmose, 10 com aspergilose e 10 com criptococose, 10 soros de pacientes com tuberculose e 50 soros de indivíduos saudáveis. Os autores observaram que a combinação de frações antigênicas purificadas propiciou aumento na sensibilidade da técnica (92%) comparado ao emprego destas frações isoladamente, com 49% de sensibilidade para o antígeno recombinante de 27 kDa e 81% para a fração de 87 kDa.

Gomes et al.⁶² relataram o emprego da técnica de PCR para a detecção de DNA de *P. brasiliensis* em espécimes de escarro, usando *primers* baseados na seqüência do gene da gp43. Foram estudadas 11 amostras de escarro obtidas de pacientes com a forma crônica da PCM e que apresentavam envolvimento pulmonar. Todas as amostras foram positivas e produziram uma banda de 0,6 Kb.

Siqueira⁹¹ realizou detecção molecular de *P. brasiliensis* por *Nested-PCR* em fragmentos de biópsia de lesões cutâneas e mucosas de 29 pacientes com PCM em atividade. O exame histopatológico foi positivo em 100% das amostras avaliadas, que revelou granulomas compactos, bem organizados. As amostras analisadas por *Nested-PCR* apresentaram 56% de positividade. Os autores acreditam na possibilidade do uso de ferramentas

moleculares, como *Nested-PCR*, na detecção de *P. brasiliensis* em amostras biológicas de indivíduos afetados, mas não referem o custo elevado da realização da técnica quando comparada a métodos diagnósticos tradicionais.

3. Revisão da literatura

Apesar da extensa literatura publicada sobre PCM e do grande número de trabalhos que focalizam os diferentes métodos diagnósticos, são poucas as publicações que avaliaram a confirmação etiológica de pacientes atendidos em Serviços de rotina.

Em 1959, Miranda & Machado Filho⁶⁹ analisaram os métodos diagnósticos utilizados em 261 pacientes com PCM, a grande maioria deles atendidos no Hospital Evandro Chagas – Instituto Oswaldo Cruz e os demais no Hospital Sanatório Torres Homem, Sanatório Santa Tereza e Hospital da Santa Casa de Misericórdia, no período compreendido entre novembro de 1949 e maio de 1959. Os materiais clínicos utilizados foram os seguintes: escarro; raspado de lesões superficiais de pele e de mucosa oral ou nasal; material de linfonodos, obtidas por punção ou drenagem espontânea de fístulas; lavado brônquico; urina; fragmentos de tecidos, obtidos por biópsia de pele, mucosa oral ou nasal, amígdala, glote, cordas vocais, traquéia, brônquios, pulmões, ânus e linfonodos superficiais e abdominais. O diagnóstico foi confirmado pelos autores em 98% dos casos. O exame a fresco foi realizado em escarro de 164 pacientes, material de linfonodos de 22 doentes e em fragmentos de lesão de 112 casos, revelando sensibilidade igual a 62%, 100% e 98%, respectivamente. Os autores, no entanto, não referiram quantas amostras foram avaliadas em cada caso, em especial em relação ao escarro. O exame histopatológico foi feito em 158 pacientes e revelou sensibilidade igual a 99%. Nos 43 pacientes submetidos à pesquisa de fungos no escarro por exame micológico direto e em exame histopatológico de fragmentos de lesão de diferentes órgãos observou-se sensibilidade muito maior deste último ($p < 0,001$). A sensibilidade do cultivo de *P. brasiliensis* foi maior em material de linfonodos ou de abscessos subcutâneos (93%) que de fragmentos de mucosa oral (49%) que, por sua vez, mostrou-se superior à do escarro (9%) [$p < 0,001$].

Em 1970, Restrepo et al.⁷⁰ estudaram 39 pacientes com paracoccidiodomicose, mais de 90% dos quais tinham idade acima de 30 anos. No momento do atendimento, a manifestação dos primeiros sintomas da doença havia ocorrido em menos de seis meses em 17 pacientes, e há mais de seis nos demais. O envolvimento pulmonar era o único responsável por manifestações clínicas em 46% dos casos e 47% dos pacientes revelavam lesões pulmonares e de outros órgãos. A demonstração do fungo em material obtido por biópsia foi possível em 28 (93,3%) dos 30 espécimes estudados. Micológico direto e cultura foram ambos realizados em 36 pacientes, com positividade de 94,4% para o exame direto e 86,1% para a cultura. Dois testes sorológicos foram realizados em todos os pacientes estudados, a reação de fixação do complemento e o teste de imunodifusão dupla em gel de ágar. A fixação do complemento foi positiva em 31 (79,4%) casos e a imunodifusão em 36 (92,3%). A reação intradérmica foi realizada em 36 pacientes, mas o número de resultados positivos variou de acordo com a gravidade da doença e o tipo da fração antigênica empregada, se micelial ou leveduriforme. Testes sorológicos e reação intradérmica foram ambos positivos em 23 pacientes.

Em Belo Horizonte (MG), Azevedo & Lisboa⁷¹ avaliaram o diagnóstico etiológico de 106 pacientes atendidos no Hospital Júlia Kubitschek, no ano de 1980. Os pacientes foram divididos em dois grupos, segundo os sítios de lesão: 40 apresentavam comprometimento pulmonar exclusivo e 66 revelavam acometimento de pelo menos dois órgãos. No grupo dos 40 pacientes com comprometimento pulmonar exclusivo, o diagnóstico foi feito através de micológico direto de escarro em 34 indivíduos, de exame histopatológico de pulmão em cinco e de brônquio em um. Os autores referem que foram feitas repetidas pesquisas de fungos em escarro coletado de vários pacientes, utilizando exame micológico direto, número que chegou até 10 amostras em alguns casos. Nos 66 pacientes com comprometimento de mais de um órgão, a confirmação diagnóstica foi feita pela identificação do fungo em exame micológico direto de escarro em 26 casos, de raspados de lesão cervical em dois, de língua em um e de palato em um; e em exame histopatológico de laringe em 14, de mucosa oral em 13, de faringe em 10, de material de linfonodo periférico em sete, de septo nasal em três, de pele em três, pré-escalênica em dois, de esôfago em dois, de tíbia em um, de linfonodo

mesentérico em um e de cérebro em um. A soma das porcentagens acima referidas permite concluir que, em alguns casos, a identificação do *P. brasiliensis* foi feita em mais de um sítio de lesão no mesmo paciente. Por fim, os autores citaram as técnicas utilizadas no diagnóstico da PCM, mas não registraram a sensibilidade dos métodos com cada espécime clínico analisado.

Blotta et al.⁷², em 1999, estudaram 584 pacientes com paracoccidioidomicose atendidos no Hospital Universitário da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (SP), em um período de oito anos (1988-1996). O diagnóstico foi confirmado por exame histopatológico de lesão tegumentar, ganglionar e pulmonar, e por demonstração do fungo em exame micológico direto de raspado de lesão, material de linfonodos ou escarro. O exame histopatológico foi realizado em 312 pacientes e revelou sensibilidade igual a 77,2%; o exame micológico direto foi realizado em 111 pacientes e a sensibilidade foi 70,2%; e a reação de imunodifusão dupla em gel de ágar foi realizada nos soros dos 584 pacientes, com sensibilidade igual a 80,0%. Houve 114 pacientes (20%) que tiveram apenas o exame sorológico positivo.

No período de janeiro de 1980 a agosto de 1999, Paniago et al.⁷³ avaliaram 422 pacientes com PCM atendidos no Hospital Universitário da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. O exame micológico direto foi realizado em 200 amostras de escarro e a sensibilidade foi igual a 43,5%; em 73 raspados de lesão de pele com sensibilidade de 71,2%; em 36 aspirados de linfonodos com sensibilidade de 97,2%; em 14 amostras de lavado brônquico com sensibilidade de 21,4%; em 11 materiais obtidos por biópsia com sensibilidade de 45,5%; e em outros 31 espécimes clínicos não descritos com sensibilidade de 9,7%. O exame histopatológico foi realizado em 302 pacientes e a visualização do fungo foi possível em 97,4% deles. As três técnicas sorológicas utilizadas - reação de fixação do complemento, de imunodifusão dupla em gel de ágar e a contraímunoeletroforese apresentaram sensibilidade de 74,5%, 77% e 75%, respectivamente, que não diferiram entre si.

Campos et al.⁹⁰ revisaram os dados de 112 pacientes com PCM atendidos no Hospital Universitário de Brasília, no período de 1984 a 2005. O exame histopatológico foi realizado em 65 pacientes, dos quais 58 (89,2%) apresentaram positividade; exame micológico direto foi positivo em 31 (65,9%)

dos 47 pacientes que realizaram esse exame; cultura foi realizada em material de 35 pacientes e 23 (65,7%) foram positivas; exame citopatológico foi realizado em material de 11 pacientes e três (27,3%) foram positivos. No entanto, os autores não referiram os materiais clínicos utilizados em cada exame. Reação de imunodifusão dupla em gel de ágar foi realizada em 26 pacientes e foi positiva em 21 (80,8%) deles.

3.1 Comparação de duas técnicas diagnósticas - imunodifusão e *immunoblotting*

Valle et al.⁷⁴ realizaram dois testes sorológicos, reação de imunodifusão dupla em gel de ágar (IDD) e *immunoblotting* (IB), em 325 soros de pacientes com paracoccidiodomicose confirmada pela demonstração do fungo em exame direto, cultura ou exame histopatológico. Os pacientes foram divididos em dois grupos: no grupo I havia 245 indivíduos que apresentavam sintomas da doença e não se encontravam em tratamento e, no grupo II, 80 pacientes estavam em seguimento após introdução do tratamento. Dos 245 pacientes do grupo I, 221 (90,2%) apresentaram IDD positiva e 24 (9,8%), reação negativa. Dos 24 soros negativos na IDD, 23 foram testados por IB e mostraram-se positivos. No grupo II, dos 80 pacientes estudados, quatro foram positivos tanto na IDD como no IB. Nos demais 76 pacientes, a IDD foi negativa em 54 (71,2%) casos e positiva em 22 (28,8%) casos, enquanto o IB foi positivo em todos os casos (100%). O grupo controle (grupo III) foi constituído por 27 amostras de soro obtidas de pacientes com histoplasmose, coccidiodomicose, aspergilose, cryptococcose, tuberculose e indivíduos saudáveis. A IDD foi negativa em todos os casos e o IB foi positivo em todos. Os autores sugerem que a positividade do grupo controle frente ao IB poderia ser abolida através da diluição dos soros, embora não tenham feito essa avaliação. Esses achados demonstram a baixa especificidade dos testes de *immunoblotting*.

A avaliação dos diferentes métodos diagnósticos utilizados na confirmação diagnóstica da PCM revela uma ampla gama de possibilidades tanto na área micológica como na sorológica. No entanto, também revela

problemas em relação ao valor preditivo positivo de cada método e aos custos para sua implantação em Serviços de rotina de hospitais universitários e de unidades da Secretaria de Saúde. Assim, considerou-se interessante avaliar o diagnóstico da PCM em pacientes atendidos na Disciplina de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

4. Objetivos

4.1. Objetivo geral

Avaliar a confirmação diagnóstica de pacientes com paracoccidioidomicose em Serviços de rotina do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

4.2. Objetivos específicos

- Avaliar a acurácia dos seguintes exames diagnósticos: micológico direto, citopatológico, histopatológico e reação de imunodifusão dupla em gel de ágar;
- Comparar, entre si, a sensibilidade dos exames diagnósticos realizados;
- Comparar a sensibilidade dos testes diagnósticos em função das formas clínicas apresentadas pelos pacientes;
- Avaliar os soros negativos à reação de imunodifusão dupla em gel de ágar utilizando-se outros antígenos, a reprodutibilidade desses resultados em laboratório de referência e o resultado do teste de *immunoblotting*.

*Capítulo II – Casuística
e Métodos*

1. CASUÍSTICA

1.1 - Casuística

Foi realizado o estudo retrospectivo de 401 pacientes com PCM confirmada pela identificação do agente etiológico por exame micológico direto, citopatológico e, ou, pelo exame histopatológico de espécimes clínicos, ou pelo encontro de anticorpos séricos específicos pela reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, atendidos na Enfermaria de Doenças Tropicais Prof. Dr. Domingos Alves Meira e no Ambulatório de blastomicose sul-americana (paracoccidioidomicose), do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB) – UNESP.

1.2. Definição de Caso

Como definição de caso, consideraram-se caso provável e caso confirmado.¹⁸

Definiu-se como caso confirmado aquele em que o paciente apresentava manifestações clínicas compatíveis com PCM e identificação de formas típicas da fase leveduriforme de *P. brasiliensis* em qualquer amostra biológica, por meio de exame micológico direto, histopatológico ou cultura.

O caso foi definido como provável quando o paciente apresentava manifestações clínicas compatíveis com PCM e a presença de anticorpos séricos detectados pela reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, em qualquer diluição.

1.3 - Critérios de inclusão e de exclusão

Identificação de formas típicas da fase leveduriforme de *P. brasiliensis* em exame micológico direto, citopatológico e, ou, histopatológico associada ou não à presença de anticorpos séricos específicos detectados pela reação de imunodifusão dupla em gel de ágar foram os critérios na inclusão de pacientes no presente estudo.

A presença de doenças associadas, exceto alcoolismo e tabagismo, o uso de drogas imunossupressoras e gravidez foram os critérios de exclusão de pacientes deste estudo.

1.4 - Grupos controles

O primeiro grupo controle foi constituído por 200 doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu, instalado na FMB - UNESP, que residem em região considerada hiper-endêmica de PCM. Os doadores pesavam mais de 70Kg e foram pareados segundo sexo com os pacientes incluídos no presente trabalho. Antes da coleta de sangue, os objetivos do presente estudo foram explicados aos doadores que, no caso da concordância, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido **[anexo 1]**, em atenção à resolução 196/96 do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). Procedeu-se, então, à coleta de 8mL de sangue, por punção venosa, para a realização dos exames sorológicos.

Também foram coletadas amostras de 74 doadores do Banco de Sangue do Hospital Beneficência Portuguesa de Santos, que constituíram um segundo grupo controle. Foram incluídos 60 doadores que afirmaram nunca terem residido ou trabalhado fora da região de Santos, que tem a menor incidência de óbitos por PCM, do Estado de São Paulo e 14 que passaram parte da vida fora desta área. Todos os indivíduos que participaram do trabalho, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido **[anexo 1]** antes da coleta de uma amostra de 8mL de sangue.

A distribuição da faixa etária dos pacientes deste trabalho foi comparada à dos doentes do Hospital das Clínicas da FMB - UNESP, no mesmo período estudado.

A distribuição dos pacientes do presente estudo segundo sexo e forma clínica foi comparada à observada em cinco trabalhos da literatura, que estudaram mais de 200 pacientes cada um ^{69,72,73,75,76}, em Serviços de diferentes regiões.

1.5 - Desenho do estudo

Este estudo foi desenhado como se segue:

- 1) Avaliação da sensibilidade do exame micológico direto segundo espécime clínico, com análise de cada amostra e de seu conjunto, segundo forma clínica.
- 2) Avaliação da sensibilidade do exame citopatológico segundo espécime clínico, com análise de cada amostra e de seu conjunto, segundo forma clínica.
- 3) Avaliação da sensibilidade do exame histopatológico segundo espécime examinado e a forma clínica.
- 4) Avaliação da acurácia do exame sorológico semi-quantitativo realizado pela reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, segundo nível sérico e forma clínica.
- 5) Comparação da sensibilidade dos quatro testes diagnósticos acima descritos, realizados na Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.
- 6) Comparação da sensibilidade da reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, realizada no Laboratório Experimental de Pesquisa de Doenças Tropicais, empregando-se diferentes antígenos.
- 7) Avaliação da reprodutibilidade inter-laboratorial, comparando-se a positividade da reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada no Laboratório Experimental de Pesquisa de Doenças Tropicais com a observada no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses, do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, empregando-se três diferentes preparações antigênicas.
- 8) Avaliação, por *immunoblotting*, dos soros negativos à reação de imunodifusão dupla em gel de ágar no Laboratório Experimental de Pesquisa de Doenças Tropicais, comparando-se com soros reagentes do mesmo laboratório e com soros de dois grupos de indivíduos saudáveis.

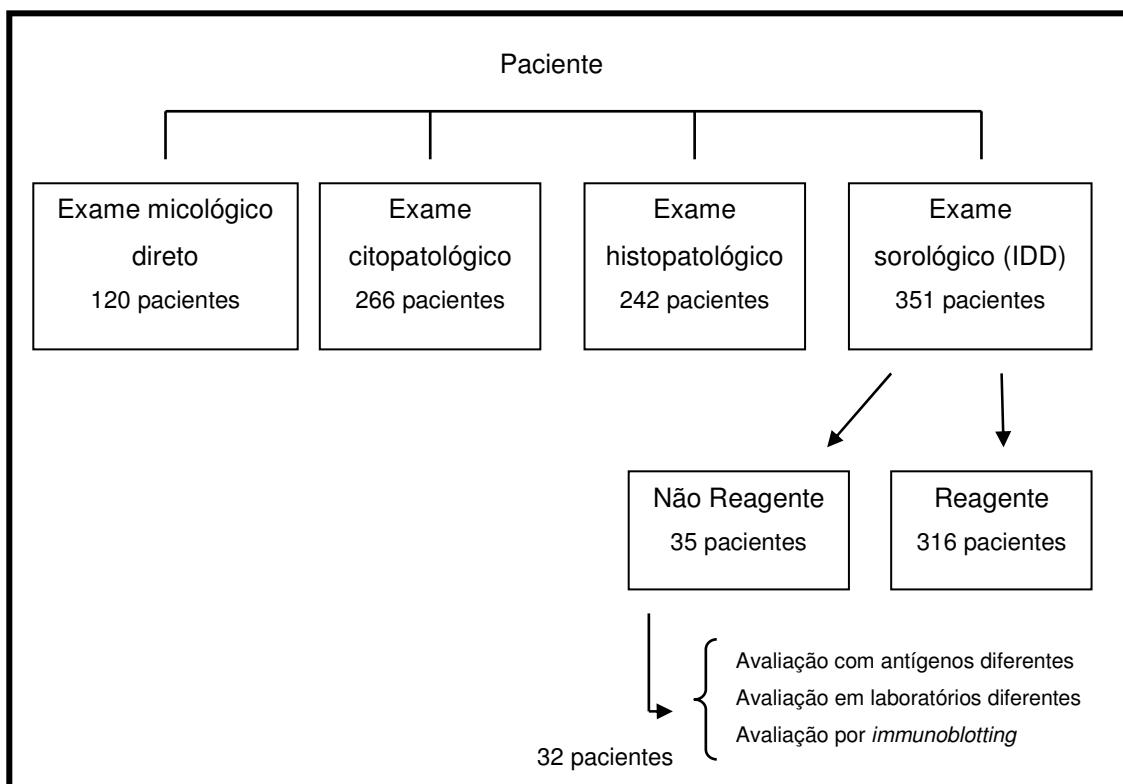


Figura 1 - Desenho do estudo de métodos diagnósticos de 401 pacientes com paracoccidioidomicose, realizados em laboratórios de rotina da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP e do Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses, do Instituto Adolfo Lutz – São Paulo.

2. MÉTODOS

2.1 - Revisão de prontuários

Foi feita a revisão dos prontuários clínicos de 401 pacientes com as formas aguda/subaguda ou crônica da PCM, atendidos entre 1981 e 2006 no Ambulatório de blastomicose sul-americana (paracoccidioidomicose), do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, selecionados pela ordem de liberação para estudo, pela Seção de Arquivo Médico do Hospital das Clínicas desta mesma faculdade.

Para cada paciente foi preenchida uma ficha padronizada contendo nome, sexo, número do registro no Hospital das Clínicas, forma clínica da doença, data de nascimento, data de admissão no Serviço, data do

início do tratamento e resultados dos testes diagnósticos realizados [anexo 2]. Para a sorologia, os resultados considerados para análise foram os das amostras coletadas até 15 dias antes da introdução do tratamento, e após esse período, somente se o resultado do exame ainda estivesse positivo.

A forma clínica de cada paciente foi obtida do prontuário, de acordo com a classificação de Mendes¹⁷. Da mesma maneira, as informações sobre os materiais clínicos coletados de cada paciente foram obtidas nos respectivos prontuários.

2.2 - Revisão dos laudos de exames cito e histopatológicos

Os resultados dos exames cito e histopatológicos foram obtidos dos prontuários dos 401 pacientes com PCM. Contudo, sempre que necessário, informações sobre os exames citopatológicos e histopatológicos foram obtidas nos respectivos livros de registro e arquivos do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

2.3 - Classificação das formas clínicas

A classificação da forma clínica de cada paciente foi feita de acordo com Mendes¹⁷ e com o Manual de Vigilância e Controle da Paracoccidioidomicose.¹⁸

Em resumo, a PCM apresenta-se sob três formas clínicas: aguda/sub-aguda, crônica e residual. A forma aguda/sub-aguda compromete em geral crianças, adolescentes e adultos jovens, apresenta história clínica de curta duração, e exibe manifestações clínicas compatíveis com o comprometimento do sistema fagocítico mononuclear, isto é, adenomegalia, hepato e esplenomegalia. A forma crônica em geral compromete adultos com mais de 30 anos de idade, que apresentam doença de longa duração, com acometimento predominante de pulmões e vias aerodigestivas superiores. A forma residual se caracteriza pela presença de seqüelas, observadas depois do tratamento.

2.4 – Laboratórios

As reações de imunodifusão dupla em gel de ágar foram realizadas em dois laboratórios distintos:

- Laboratório Experimental de Pesquisa de Doenças Tropicais (LEPDT), da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP;
- Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses (LIM) do Instituto Adolfo Lutz - São Paulo.

O ensaio de *immunoblotting* foi realizado apenas neste último laboratório.

2.5 - Soros

2.5.1 - Soros humanos

A presença de anticorpos circulantes dirigidos ao *P. brasiliensis* foi pesquisada em 625 soros, assim distribuídos:

- 351 amostras de sangue de pacientes com PCM confirmada, submetidos à reação de imunodifusão dupla em gel de ágar;
- 200 amostras de soro de indivíduos supostamente saudáveis, doadores de sangue no Hemocentro de Botucatu, instalado na FMB - UNESP.
- 74 amostras de soro de indivíduos supostamente saudáveis, doadores de sangue no Banco de Sangue do Hospital Beneficência Portuguesa de Santos.

2.5.2 - Soros hiperimunes obtidos em coelhos

Os soros hiperimunes constituem-se em anticorpo policlonal anti-antígeno de *P. brasiliensis*, produzido pelo Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL.

Em resumo, coelhos albinos da raça Nova Zelândia foram imunizados por via subcutânea, empregando-se como antígeno o filtrado de

cultura da amostra 113 de *P. brasiliensis*, em quatro sítios, com adjuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA), na proporção 3:1 na primeira imunização e com adjuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA), nas subseqüentes, repetidas a cada semana, durante quatro semanas. A eficácia do processo de imunização foi avaliada empregando-se ensaio de imunodifusão.⁵²

2.6 - Amostras de *P. brasiliensis*

Para a produção de antígenos de *P. brasiliensis* foram utilizadas duas amostras, isoladas de pacientes com PCM, abaixo relacionadas:

- Amostra Pb 113 isolada em Manaus/AM, em 1971, de lesão bucal;
- Cepa Pb B-339 (ATCC 32069TM), isolada em 1967, no Brasil.

2.7 - Meios de Cultura

Para a obtenção dos antígenos de *P. brasiliensis*, no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses - IAL, utilizou-se como caldo de cultura Neopeptona-Glicose-Tiamina-Asparagina (NGTA) [anexo 3.1] e, para obtenção dos mesmos no Laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, utilizaram-se os meios de cultura Fava-Netto [anexo 3.2] e caldo Negrone [anexo 3.3].

2.8 - Antígenos de *P. brasiliensis*

Nas reações de imunodifusão dupla em gel de ágar foram utilizados três antígenos:

- Antígeno de filtrado de cultura da amostra Pb 113, proveniente do Laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP [anexo 3.4.1];
- Antígeno de filtrado de cultura da amostra Pb 113, cedido pela Dra. Adriana Pardini Vicentini Moreira, do Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do Instituto Adolfo Lutz [anexo 3.4.2];

- Antígeno de filtrado de cultura da amostra Pb B-339, cedido pela Dra. Adriana Pardini Vicentini Moreira, do Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do Instituto Adolfo Lutz [**anexo 3.4.2**].

Nos ensaios de *immunoblotting* foram utilizados filtrados de cultura das amostras de Pb 113 e Pb B-339 [**anexo 3.4.2**], preparados no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do Instituto Adolfo Lutz.

2.9 - Exame micológico direto

O exame micológico direto foi realizado no Laboratório Experimental de Pesquisa de Doenças Tropicais, da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, segundo as especificações de Lacaz.³⁶

O escarro foi colhido em frasco estéril de boca larga, tendo-se recomendado 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.

Escolheu-se uma porção purulenta da amostra de escarro, que foi colocada em lâmina e, posteriormente, adicionou-se hidróxido de potássio (KOH) a 30% [**anexo 3.5**], para clarificação do material. O escarro foi, então, examinado entre lâmina e lamínula em microscópio óptico no aumento de 40x.

A amostra foi considerada positiva para *P. brasiliensis* quando houve identificação de células fúngicas com múltiplos brotamentos e parede celular birrefringente.⁶

2.10 - Exame Citopatológico

Para investigação de *P. brasiliensis* foi realizado o exame citopatológico em amostras de escarro, lavado bronco-alveolar e material obtido por punção aspirativa por agulha fina (PAAF). Para amostras de escarro e lavado bronco-alveolar foi preparado esfregaço em lâmina e citoinclusão, e para os materiais obtidos por PAAF, foi preparada apenas a citoinclusão.

O esfregaço em lâmina com amostras de escarro e lavado bronco-alveolar, foi realizado no Laboratório de Citologia do Departamento de Patologia da FMB – UNESP. A coloração pela prata (método de Gomori-

Grocott)⁷⁷ foi realizada no Laboratório de Imunohistoquímica do mesmo Departamento [anexo 3.6.1].

A citoinclusão foi preparada no Laboratório de Histologia do Departamento de Patologia da FMB – UNESP, com amostras de escarro, lavado bronco-alveolar e material obtido por PAAF. Uma porção sólida do material foi separada, envolta em papel de seda e fixada em Bouin modificado, por no mínimo duas horas, para solidificação [anexo 3.6.2]. Em seguida, este material foi lavado em álcool, incluído em bloco de parafina, cortado em pedaços de 6 µm e corado pelos métodos de Hematoxilina-Eosina (HE) e pela prata⁷⁷ [anexo 3.6.1], de acordo com as especificações de Koss⁴⁰, com modificações de Iwama de Mattos⁴¹ e Iwama de Matos et al.⁴²

A amostra foi considerada positiva quando houve detecção de células fúngicas medindo entre 5 e 25 µm, com múltiplos brotamentos e parede celular birrefringente.⁶

2.11 - Exame histopatológico de fragmentos de tecido

Os exames histopatológicos de fragmentos de tecido foram realizados nos Laboratórios do Departamento de Patologia da FMB – UNESP. Os fragmentos de tecido foram fixados em formalina tamponada a 10% e incluídos em parafina. Os cortes histológicos foram obtidos com 4µm de espessura, distendidos em lâminas histológicas e corados pela Hematoxilina-Eosina (HE) e pela prata⁷⁷ [anexo 3.6.1].

2.12 - Reação de imunodifusão dupla em gel de ágar

Os níveis séricos de anticorpos anti-*P. brasiliensis* dos pacientes estudados e dos indivíduos dos grupos controles foram determinados pela reação de imunodifusão dupla em gel de ágar - IDD, realizada segundo as especificações de Restrepo⁴⁹, no Laboratório Experimental de Pesquisa de Doenças Tropicais, da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP e no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses, do Instituto Adolfo Lutz - SP.

A intensidade dos níveis séricos de anticorpos foi classificada como se segue:

- Baixo: soro não diluído a soro diluído a 1/4
- Moderado: soro diluído 1/8 a soro diluído a 1/16
- Elevado: soro diluído 1/32 a soro diluído a 1/1024

Durante o período de execução do presente trabalho, os testes de imunodifusão foram realizados nos dois laboratórios com os antígenos Pb 113 e Pb B-339 do IAL. O antígeno Pb 113 de Araraquara foi utilizado pelo LIM do IAL para preparo da técnica no período de execução deste trabalho, a qual não foi repetida no LEPDT da FMB, pois já havia sido realizada na data de admissão de cada um dos pacientes no Serviço.

2.12.1 - Reação de imunodifusão dupla em gel de ágar no Laboratório Experimental de Pesquisa de Doenças Tropicais - FMB / UNESP

Lâminas de vidro, de 26 x 76mm, foram pré-forradas com 1,0mL de solução de ágar a 1%, previamente fundido. As lâminas ficaram em estufa a 60°C, por no mínimo 24h. Após esse período foram forradas com 3,0mL de gel de segunda camada previamente fundido e deixadas em câmara úmida, a 4°C, para solidificação do ágar. Foram feitos orifícios no ágar, com auxílio de um molde em forma de roseta contendo um orifício central e seis periféricos, cada um deles à mesma distância do orifício central, e o excesso foi retirado com auxílio de bomba à vácuo. O antígeno foi aplicado no orifício central do ágar e os soros nos laterais. A seguir, as lâminas foram incubadas em câmara úmida, em temperatura ambiente, por 48 horas. As lâminas foram então lavadas por 45 minutos em solução de citrato de sódio a 5%, seguindo-se sucessivas lavagens em solução salina, por 24 horas. Ao fim dessa etapa, os orifícios foram recobertos com solução de ágar a 1% e as lâminas levadas para secar em estufa a 60°C. Após secagem, as lâminas foram coradas pelo Amido Schwartz, durante 10 minutos e, em seguida, descoradas duas vezes. A leitura definitiva foi, então, realizada.

As soluções e corantes utilizados na técnica de imunodifusão encontram-se no **anexo 3.7**.

2.12.2 - Reação de imunodifusão dupla em gel de ágar no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses- IAL

Lâminas de vidro (26x75mm) foram primeiramente revestidas com 1,0mL de solução de ágar a 1% (p/v). Estas foram, então, recobertas com 3,0mL de solução de ágar-citrato e deixadas em câmara úmida, até a solidificação da agarose. O gel foi escavado com auxílio de molde em forma de roseta (Bioficina – Indústria e Comércio de Aparelhos Laboratoriais, S. Paulo – Brasil), contendo um orifício central e seis laterais, sendo o excesso do gel retirado empregando-se pipeta Pasteur acoplada à bomba de vácuo (DIA-PUMP Compressor, FANEN, São Paulo, Brasil). Após a aplicação dos soros testes, anticorpo policlonal anti-antígeno de *P. brasiliensis* e antígeno nos orifícios, as lâminas foram incubadas em câmara úmida, à temperatura ambiente, por 48 horas. Após esse período, com o auxílio de negatoscópio, realizou-se a leitura para verificação de linhas de precipitação. As lâminas de vidro foram, então, lavadas por 45 minutos em solução de citrato de sódio a 5% (p/v), seguindo-se de sucessivas lavagens, por 24 horas, em solução salina. Ao fim dessa etapa, os orifícios foram recobertos com solução de ágar a 1% (p/v) e as lâminas levadas para secar em estufa a 60°C (Fanen, S. Paulo – Brasil). Após secagem, as lâminas foram coradas pelo *Coomassie Brilliant Blue R-250* (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA), durante 10 minutos e em seguida descoradas. A leitura definitiva foi então realizada.

As soluções e corantes utilizados na técnica de imunodifusão encontram-se no **anexo 3.8**.

2.13 - SDS-PAGE

Os procedimentos para eletroforese vertical em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA) foram conduzidos segundo metodologia proposta por Laemmli⁷⁸, com gel de separação linear a 12,5% e gel de empilhamento a 3% de acrilamida com espessura de 1,0mm, empregando equipamento Mini-Protean II Electrophoresis Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Califórnia, USA).

As diferentes preparações antigênicas de *P. brasiliensis*, ou seja, filtrado de cultura das amostras 113 e B-339, foram denaturadas por aquecimento a 100°C por três minutos em tampão de ruptura (62mM de Tris-HCl pH 6,8 contendo 0,2% (p/v) de SDS, 50mM de 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA), 0,005% de azul de bromofenol (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA) e 10% (v/v), de glicerol (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA), em água deionizada), sendo aplicados para a transferência (*Western Blotting*), 10,0µg/µL de antígeno em cada *slot*.

A corrida eletroforética foi realizada com diferença de potencial de 100V para percorrer o gel de empilhamento e 120V para percorrer o gel de separação, empregando-se fonte (Hoefer Power Supply, modelo SX 250, Hoefer Pharmacia Biotech Inc., São Francisco, Califórnia, USA).

Para cada corrida eletroforética foi utilizado padrão de baixo peso molecular (PM), composto de MBP-β-galactosidase (175.000 Da), MBPparamiosina (83.000 Da), desidrogenase glutâmica (62.000 Da), aldolase (47.500 Da), triose-fosfato-isomerase (32.500 Da), β-lactoglobulina A (25.000 Da), lisozima (16.500 Da) e aprotinina (6.500 Da) (New England Biolabs Inc., Woburn, Massachusetts, USA).

A partir da análise da migração destes padrões, as massas moleculares das proteínas fúngicas foram calculadas.

As soluções, tampões e corantes utilizados na técnica de eletroforese em gel de poli(acrilamida encontram-se no **anexo 3.9**.

2.14. - Ensaio de *immunoblotting*

Os soros dos 32 pacientes que, à reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, apresentaram ausência de reatividade e de 32 dos que apresentaram reatividade frente aos antígenos de *P. brasiliensis* foram submetidos ao ensaio de *immunoblotting* no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do Instituto Adolfo Lutz.

A transferência eletroforética de proteínas contidas em géis de poli(acrilamida para membranas de nitrocelulose foi executada conforme metodologia descrita por Towbin et al.⁷⁹, usando-se equipamento Trans-Blot System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Califórnia, USA).

Após a eletroforese, os géis foram apostos sobre membranas de nitrocelulose de 0,22 μ m (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, Mo, USA), recobertos com papel de filtro e comprimidos com esponjas de poliuretano. Todo o material utilizado foi previamente embebido em tampão de transferência constituído por 25mM de Tris-HCl 25, glicina 192mM e metanol 20% (v/v), sendo, em seguida, encaixados em placas acrílicas perfuradas e mergulhadas na cuba de eletroforese contendo o mesmo tampão.

A transferência foi realizada empregando-se amperagem constante de 150mA por três horas, em banho de gelo. Após a transferência, para verificar a eficácia do processo, as membranas foram coradas com Ponceau-S (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, Mo, USA) por dez minutos e descoradas em água bidestilada.

As membranas contendo as proteínas transferidas foram identificadas, cortadas em tiras com cerca de 0,5cm de largura e incubadas por uma hora, a temperatura ambiente, em PBS, pH 7,4 contendo 5% (p/v) de leite desnatado (Molico, Nestlé, São Paulo, BR), para a saturação dos sítios inespecíficos, em plataforma agitadora para *blotting* (Bioficina-Indústria e Comércio de Aparelhos Laboratoriais, São Paulo-Brasil).

Em seguida, as fitas foram depositadas em canaletas e incubadas com soros de pacientes com as formas aguda e crônica de PCM, soros de indivíduos saudáveis e soro hiperimmune obtido em coelho anti-exoantígeno de *P. brasiliensis*. Os soros foram aplicados sobre as membranas no volume final de 2,0mL na diluição de 1:100 em tampão PBS, pH 7,4. Nesta etapa o ensaio foi realizado em temperatura ambiente e sob agitação constante (Plataforma agitadora para *blotting*, Bioficina-Indústria e Comércio de Aparelhos Laboratoriais, São Paulo-Brasil), por 18 horas. Finalizado o período de incubação, as fitas de nitrocelulose foram lavadas por seis vezes de 10 minutos cada, em solução PBS acrescida de 0,1% (p/v) de Tween 20 [PBS-T] (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, Mo, USA).

Após esta etapa, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG, conjugado à peroxidase, espécie-específico (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, Mo, USA), diluído a 1:1000 e mantidas por duas horas sob agitação constante (Plataforma agitadora para *blotting*, Bioficina-Indústria e Comércio de Aparelhos Laboratoriais, São Paulo-Brasil), em temperatura

ambiente e protegidas da luz. A seguir, foram lavadas por seis vezes de dez minutos cada, em solução PBS-T.

O desenvolvimento da cor da reação foi obtido empregando-se solução de 4-cloro-1-naftol (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, Mo, USA). O bloqueio da reação foi feito por lavagens sucessivas em água bidestilada.

As soluções, tampões e corantes utilizados no ensaio de *immunoblotting* encontram-se no **anexo 3.10**.

2.15 - Avaliação de acurácia

A acurácia de cada teste diagnóstico foi determinada de acordo com as especificações de Fletcher & Fletcher.⁸⁰

Sensibilidade de um teste diagnóstico é a probabilidade que o resultado do teste seja positivo quando a doença está presente. Assim, a sensibilidade foi calculada pela proporção de pacientes (indivíduos com a doença) que apresentam teste positivo (alterado). A multiplicação do valor encontrado, por 100, permitiu a apresentação da sensibilidade em porcentagem.

Especificidade de um teste diagnóstico é a probabilidade que o resultado seja negativo quando a doença não se encontra presente. Assim, a especificidade constituiu a proporção de indivíduos saudáveis (não doentes, do grupo controle) que apresentaram teste negativo (normal, não alterado). A especificidade também foi ser expressa em porcentagem, multiplicando-se por 100 o valor encontrado.

Considerou-se valor preditivo positivo a porcentagem de pacientes com a doença entre todos, doentes e controles, os que apresentavam teste diagnóstico positivo. Considerou-se valor preditivo negativo a porcentagem de indivíduos saudáveis entre todos, pacientes e controles, que revelavam teste negativo.

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

Reprodutibilidade inter-laboratorial foi definida como o grau de concordância, medida em porcentagem, entre os resultados positivos e negativos observados com a utilização da mesma metodologia e do mesmo antígeno, por pesquisadores dos laboratórios LEPDT-FMB e LIM-IAL. Esta definição de reprodutibilidade seguiu as especificações registradas em Séries Temáticas, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.⁸¹

Os resultados encontrados foram acompanhados pela avaliação do intervalo de confiança 95%.

2.16 - Aprovação pela Comissão de Ética em Pesquisa

Este projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, através do ofício número 062/08–CEP, de 03 de março de 2008 [**anexo 4**].

O sangue coletado de doadores de sangue no Hemocentro de Botucatu, instalado na FMB - UNESP e do Banco de Sangue do Hospital Beneficência Portuguesa de Santos, foi utilizado nas análises como grupo controle, e foi obtido com o consentimento prévio e esclarecido dos indivíduos, que receberam todas as informações necessárias, tais como, objetivos dos experimentos e modo de coleta.

2.17 - Levantamento bibliográfico

O levantamento bibliográfico referente ao diagnóstico da paracoccidiodomicose foi realizado por meio do MEDLINE, produzido pela National Library of Medicine, de Washington e da Literatura Latino-Americana em Ciências da Saúde (LILACS), produzida pelo Centro Latino-Americano e do Caribe de Informações em Ciências da Saúde (BIREME) de São Paulo. Também foram levantados os trabalhos referidos em cada publicação.

2.18 - Normas para redação da dissertação

Na redação desta dissertação foram seguidas as normas propostas por Meira⁸², aprovadas pelo Conselho do Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais. Os títulos dos periódicos foram apresentados de acordo com o National Library of Medicine (2003). Os títulos de periódicos não indexados foram apresentados obedecendo-se às normas utilizadas pelo National Library of Medicine (2003), de acordo com a proposta feita por especialista da Biblioteca do Campus de Botucatu – UNESP. As referências bibliográficas e suas citações no texto foram feitas de acordo com as normas de Vancouver.

2.19 - Documentação fotográfica

A documentação fotográfica dos materiais citopatológico e histopatológico foi feita utilizando-se o fotomicroscópio Zeiss. A transferência para o computador foi realizada através de cartão memória da câmera Sony.

2.20 - Análise estatística dos resultados

A análise estatística dos resultados foi realizada na Unidade de Processamento de Dados do Instituto de Biociências – Campus de Botucatu – UNESP.

A comparação de duas proporções entre duas populações dependentes ou independentes foi feita pelo teste de Mc Nemar ou binomial, segundo Siegel^{83,84}. O grau de concordância entre dois testes foi avaliado através do Coeficiente Kappa, segundo Arango.⁸⁵

Para comparação de mais de duas populações dependentes foi utilizado o teste de Cochran, segundo Curi.⁸⁶

A comparação de múltiplas proporções para as amostras seriadas foi feita pelo teste de Tukey, segundo Zar⁸⁷ e a comparação de duas proporções foi feita pelo teste de Z.

Para estudo da associação entre variáveis qualitativas foi utilizado o teste do qui-quadrado.

Para as variáveis quantitativas cujo objetivo era comparar grupos foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Para cada teste estatístico aplicado, a rejeição da hipótese de nulidade foi vinculada a um erro tipo I (α) igual ou menor que 0,05.

Para realização dos testes foi utilizado o programa computacional SAS-The Statistical analysis system, versão 6.12.

Capítulo III - Resultados

1. Caracterização da casuística estudada

A análise dos prontuários clínicos de 401 pacientes com paracoccidioidomicose, atendidos de junho de 1974 a março de 2008, revelou que 49 (12,2%) eram do sexo feminino e 352 (87,8%) do masculino ($p < 0,0001$). A distribuição do sexo dos pacientes foi comparada com a observada em cinco trabalhos da literatura, Almeida *et al*⁷⁶, Miranda & Machado Filho⁶⁹, Londero & Ramos⁷⁵, Blotta *et al*⁷² e Paniago *et al*⁷³, como mostram a figura 2 e tabela 1.

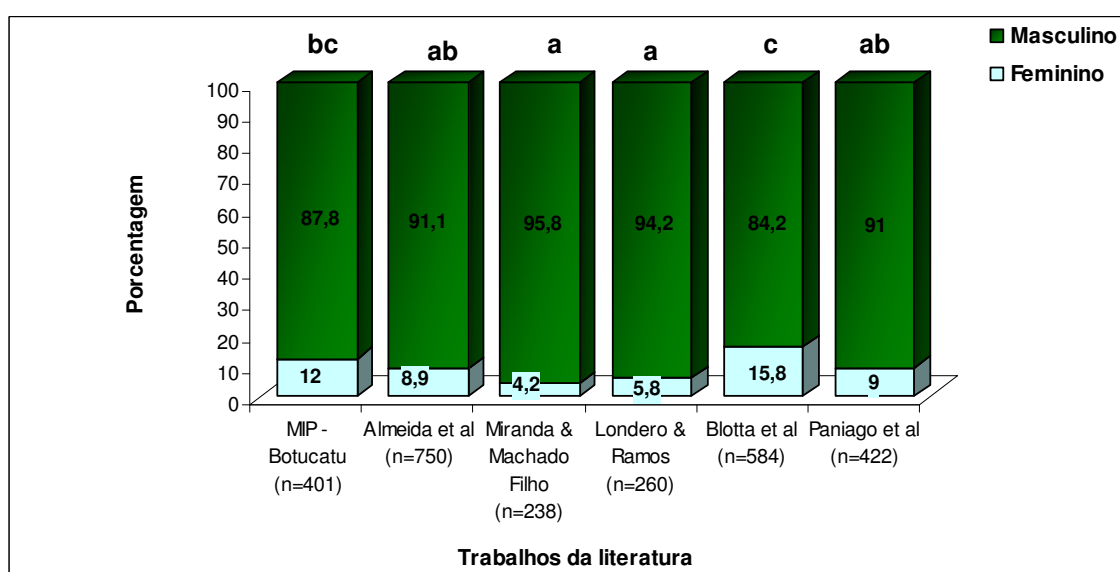


Figura 2 - Distribuição de 401 pacientes com paracoccidioidomicose atendidos na Disciplina de Moléstias Infecciosas e Parasitárias (MIP) da FMB - UNESP, segundo sexo; comparação com dados da literatura. Colunas com a mesma letra não diferiram entre si enquanto as que apresentam letras diferentes diferem entre si.

A distribuição dos pacientes, segundo sexo, não diferiu da observada por Almeida *et al*⁷⁶, Blotta *et al*⁷² e Paniago *et al*⁷³.

Tabela 1 - Razão de masculinidade dos pacientes com paracoccidioomicose atendidos no Serviço de Moléstias Infecciosas e Parasitárias (MIP) da FMB – UNESP; comparação com dados da literatura.

Região	Autores/ Referência bibliográfica	Período de estudo	Razão de masculinidade
Botucatu / Área de MIP	—	1974 - 2008	7,2 : 1 bc
São Paulo	Almeida <i>et al</i> ⁷⁶	até ago/1945	10,2 : 1 ab
Rio de Janeiro	Miranda & Machado F ⁶⁹	1949 - 1959	22,8 : 1 a
Rio Grande do Sul	Londero & Ramos ⁷⁵	1958 - 1987	16,0 : 1 a
Campinas	Blotta <i>et al</i> ⁷²	1988 - 1996	5,4 : 1 c
Mato Grosso do Sul	Paniago <i>et al</i> ⁷³	1980 - 1999	10,0 : 1 ab

Razões seguidas da mesma letra não diferem entre si, enquanto as sucedidas por letras diferentes diferem entre si.

A forma clínica predominante entre os 401 pacientes foi a crônica, com 307 (76,6%) casos, enquanto a aguda/subaguda contou com 94 (23,4%) doentes ($p < 0,0001$). A distribuição dos pacientes, segundo forma clínica, diferiu da observada por Londero & Ramos⁶⁹ e Paniago *et al*⁵⁵, mas não da revelada por Blotta *et al*⁵⁶, como revela a figura 3.

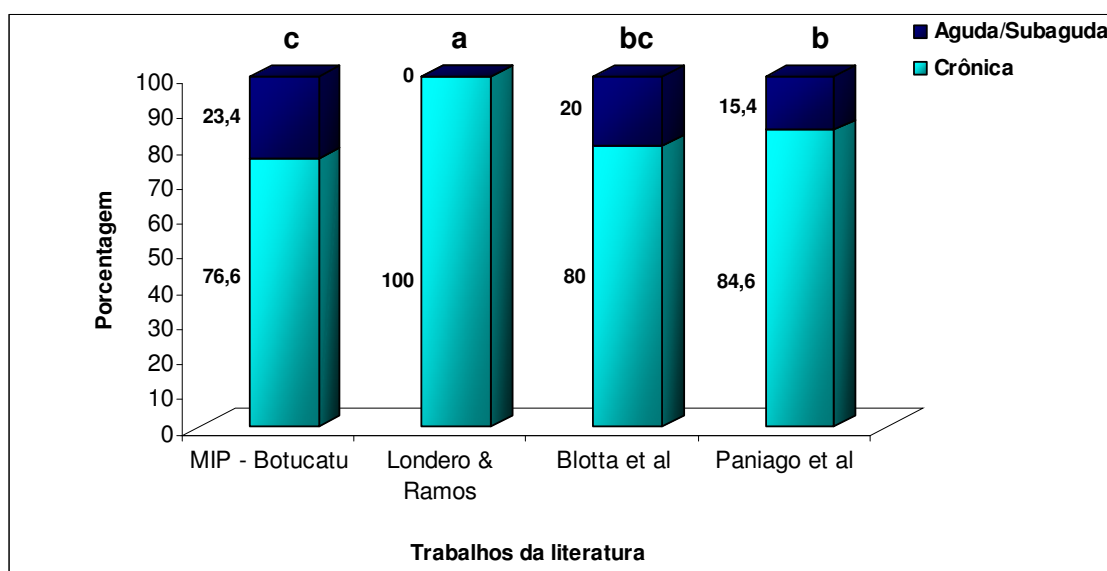


Figura 3 - Distribuição dos 401 pacientes atendidos na Disciplina de Moléstias Infecciosas e Parasitárias (MIP) da FMB - UNESP, segundo forma clínica, comparada à de outros Serviços. Colunas com a mesma letra não diferiram entre si enquanto as que apresentam letras diferentes diferem entre si.

Dos 307 pacientes com a forma crônica, 294 (95,8%) eram do sexo masculino e 13 (4,2%) do feminino, enquanto dos 94 casos com a forma aguda/subaguda, 58 (61,7%) eram do sexo masculino e 36 (38,3%) do feminino. As formas clínicas diferiram muito em relação à distribuição dos pacientes quanto ao sexo, com razão de masculinidade de 22.6:1.0 na forma crônica e 1.6:1.0 na forma aguda/subaguda ($p < 0.001$).

A idade dos pacientes variou de três a 87 anos, com mediana igual a 43 anos. Na forma aguda/subaguda a idade variou de três a 72 anos, com mediana igual a 22 anos e, na crônica, de 17 a 87, com mediana igual a 47 anos. A mediana da idade dos pacientes com a forma crônica foi muito maior que dos com forma aguda/subaguda ($p < 0.001$).

A distribuição da faixa etária dos pacientes foi comparada à dos doentes do Hospital das Clínicas da FMB - UNESP, atendidos no mesmo período estudado e revelou que o maior número de pacientes com PCM se concentrou na faixa etária dos 30 aos 59 anos, com 67.3% dos casos. Quando a distribuição foi comparada à dos demais pacientes do hospital, observou-se que a prevalência da PCM era menor até os 29 anos, não diferia dos 30 aos 39 anos, era maior entre os 40 e os 59 anos e, por fim, tendia a ser menor a partir dos 60 anos (tabela 2).

Tabela 2 - Comparação da faixa etária, no período de 1974 a 2008, entre os pacientes com paracoccidioidomicose e os pacientes atendidos no Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

Faixa etária (anos)	Pacientes PCM (G1)		Pacientes HC (G2)		Nível de significância	Interpretação
	Nº	%	Nº	%		
03 – 09	8	2,0	53577	12,1	$p < 0,0001$	G1 < G2
10 – 19	29	7,2	70029	15,8	$p < 0,0001$	G1 < G2
20 – 29	50	12,5	89214	20,2	$p < 0,0001$	G1 < G2
30 – 39	71	17,7	65989	15,0	$p = 0,05$	G1 = G2
40 – 49	122	30,4	56379	12,8	$p < 0,0001$	G1 > G2
50 – 59	77	19,2	46661	10,5	$p < 0,0001$	G1 > G2
≥ 60	44	11,0	60173	13,6	$0,05 < p < 0,10^*$	G1 ≤ G2
Total	401	100	442022	100,0		

* $p = 0,0836$

A figura 4 revela que a distribuição dos 401 pacientes estudados, de acordo com a faixa etária por ocasião do primeiro atendimento, apresenta distribuição igual à curva de Gauss.

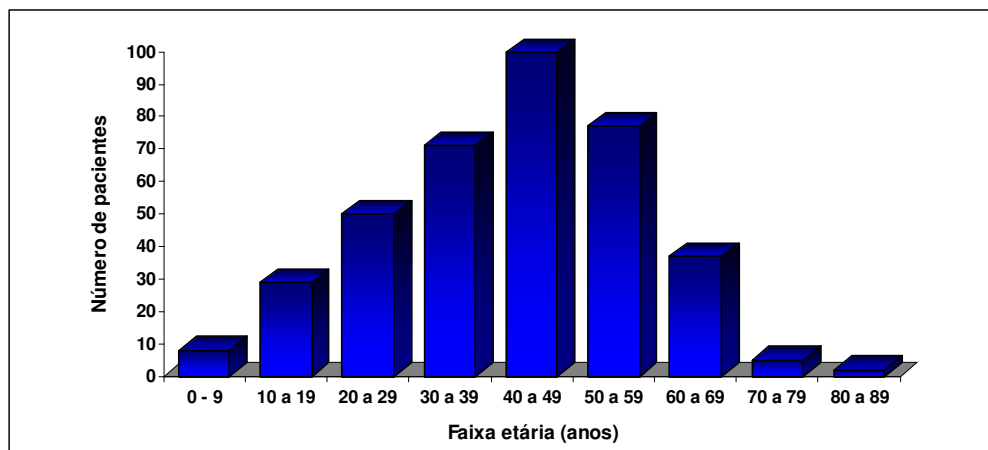


Figura 4 - Distribuição de 401 pacientes com paracoccidiodomicose em atividade, de acordo com a faixa etária por ocasião do primeiro atendimento na Disciplina de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.

A mediana da idade dos pacientes por ocasião do primeiro atendimento no Serviço não variou ($p > 0,05$) no período de 34 anos estudado, como revela a tabela 3.

Tabela 3 - Distribuição da idade por ocasião do primeiro atendimento, de 401 pacientes com paracoccidiodomicose em atividade, segundo período avaliado.

Período	Mediana da idade dos pacientes (anos)
1974-1975	23,0
1976-1980	45,0
1981-1985	42,0
1986-1990	41,0
1991-1995	43,0
1996-2000	43,0
2001-2005	45,0
2006-2008	45,0

Teste de Kruskal-Wallis $p > 0,05$

A figura 5 mostra a distribuição dos 401 pacientes avaliados no período estudado em função do ano do primeiro atendimento no Serviço.

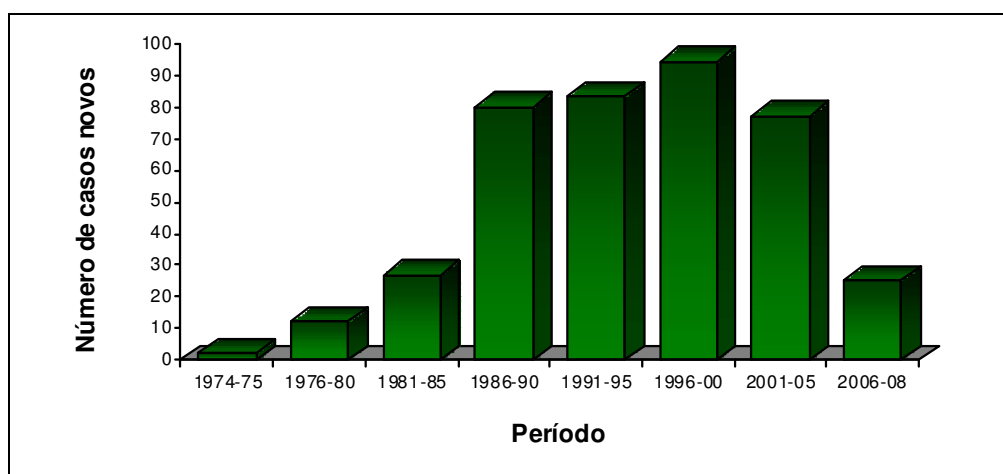


Figura 5 - Distribuição dos 401 pacientes com paracoccidiodomicose em atividade, de acordo com o ano do primeiro atendimento. Disciplina de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.

Os casos de paracoccidiodomicose confirmada, ou seja, pacientes em cujos materiais clínicos foram identificadas formas típicas da fase leveduriforme do *P. brasiliensis*, somaram 345 (86%), enquanto os casos prováveis, em que o paciente possuía apenas anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis* detectados pela reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, totalizaram 56 (14%) casos.

2. Exame micológico direto

O exame micológico direto de espécimes clínicos obtidos de pacientes com PCM em atividade foi realizado em linfonodo, mucosa das vias aerodigestivas superiores, pele, líquido pleural, líquido ascítico, lavado broncoalveolar e escarro, como revela a tabela 4. Com exceção do escarro, apenas uma amostra dos demais espécimes clínicos foi avaliada em cada paciente (tabela 4). No entanto, o número de amostras de escarro variou de um paciente para outro, como se observa na tabela 4.

A sensibilidade do exame micológico direto variou de 71,4% a 82,6% (tabela 4), frequências que não diferiram entre si quando se comparou linfonodo, mucosa das vias aerodigestivas superiores e pele ($p>0,05$)

A presente amostragem revelou predomínio de amostras de pele e menor número de linfonodos ($p<0,02$).

Tabela 4 - Exame micológico direto de material clínico obtido de 51 pacientes com paracoccidioidomicose em atividade, segundo espécime e positividade.

Espécime examinado	Número de exames realizados	Exames positivos	
		Nº	%
linfonodo	7	5	71,4*
mucosa das vias aerodigestivas superiores	18	13	72,2*
língua	2	1	
laringe	1	0	
mucosa oral	15	12	
região jugal	1	1	
palato	1	1	
orofaringe	4	2	
não discriminado	9	8	
pele	23	19	82,6*
nariz	3	3	
região cervical	4	4	
não discriminado	16	12	
líquido pleural	1	0	-
líquido ascítico	1	1	-
lavado bronco-alveolar	1	0	-
Total	51	38	74,5

A porcentagem de exames positivos só foi calculada para espécimes com pelo menos cinco amostras.

* $p>0,05$

2.1 Escarro

Um total de 69 pacientes forneceram 112 amostras de escarro, das quais 15 (13,4%) apresentavam a forma aguda/subaguda e 97 (86,6%) a forma crônica, como revela a tabela 5. A idade desses pacientes variou de 21 a 38 anos na forma aguda/subaguda, com mediana igual a 28, e de 24 a 75 na crônica, com mediana igual a 46 anos.

A sensibilidade do exame micológico direto foi igual a 66,7% nos pacientes com a forma aguda/subaguda e 61,9% naqueles com a forma crônica (tabela 5), freqüências que não diferiram entre si ($p>0,05$).

Tabela 5 - Positividade do exame micológico direto de 112 amostras de escarro obtidas de 69 pacientes com lesão pulmonar causada por paracoccidioidomicose em atividade, segundo forma clínica.

Forma clínica	Número de amostras	Amostras positivas	
		Número	%
Aguda/Subaguda	15	10	66,7
Crônica	97	60	61,9
Total	112	70	62,5

$$\chi^2 = 0,128 \quad p>0,05$$

Amostras colhidas antes ou até 15 dias após introdução do tratamento.

O número de amostras de escarro examinadas variou de um paciente para outro, de uma a cinco, com mediana igual a 1,0. A sensibilidade foi 50,7% na primeira amostra, 25% na segunda e 29,4% na terceira, freqüências que não diferiram entre si ($p>0,05$), como revela a tabela 6.

Tabela 6 - Avaliação do exame micológico direto realizado em 112 amostras de escarro obtidas de 69 pacientes com comprometimento pulmonar por paracoccidioidomicose em atividade, segundo a sensibilidade observada em cada exemplar.

Amostras	Número de pacientes	Casos positivos	
		Nº	%
1ª	69	35	50,7
2ª	20	5	25,0
3ª	17	5	29,4
4ª	5	1	20,0
5ª	1	0	-

Teste de Tukey (1ª vs 2ª vs 3ª) $p>0,05$
 Amostras colhidas antes ou até 15 dias após introdução do tratamento.

A identificação de *P. brasiliensis* em amostras seqüenciais revelou que a avaliação de duas ou de três amostras não alterou a sensibilidade observada com apenas um exemplar ($p>0,05$), como mostra a tabela 6.A.

Tabela 6.A - Avaliação do exame micológico direto realizado em 112 amostras de escarro obtidas de 69 pacientes com comprometimento pulmonar por paracoccidioidomicose em atividade, segundo a sensibilidade observada na avaliação cumulativa de até três amostras seqüenciais.

Amostras	Número de pacientes	Casos positivos	
		Nº	%
1ª	69	35	50,7
1ª + 2ª	20	7	35,0
1ª + 2ª + 3ª	17	7	41,2
Teste de Tukey	1ª vs (1ª + 2ª)	p>0,05	
Teste de Tukey	1ª vs (1ª + 2ª) vs (1ª + 2ª + 3ª)	p>0,05	

Amostras colhidas antes ou até 15 dias após introdução do tratamento.

A sensibilidade observada nas três primeiras amostras não variou quando comparadas entre si, como revela a tabela 6.A, e a avaliação associada de duas amostras não diferiu da de três amostras.

A avaliação de duas amostras de escarro foi feita em 20 pacientes e revelou uma positividade de 35,0%. Além disso, 17 pacientes tiveram três amostras avaliadas que, em seu conjunto, confirmaram paracoccidioidomicose em sete casos (41,2%). Essas freqüências, no entanto, não diferiram entre si ($p>0,05$).

A tabela 6.B representa a positividade das duas primeiras amostras de escarro, coletadas seqüencialmente, de 20 pacientes.

A figura 6 [anexo 5] mostra um exame micológico direto de escarro positivo para *P. brasiliensis*, que revela uma célula-mãe com múltiplas exo-esporulações.

Tabela 6.B - Avaliação do exame micológico direto realizado em 40 amostras seqüenciais de escarro obtidas de 20 pacientes com comprometimento pulmonar por paracoccidioidomicose em atividade, segundo a positividade observada em cada exemplar.

Amostras		Número de pacientes
1 ^a	2 ^a	
+	+	5
+	-	2
-	+	0
-	-	13
Total		20

3. Exame citopatológico

O exame citopatológico de espécimes clínicos, obtidos de pacientes com paracoccidioidomicose em atividade, foi realizado em escarro, material obtido de linfonodos fistulizados ou por punção aspirativa com agulha fina (PAAF), pele, líquido ascítico e lavado bronco-alveolar.

3.1. Escarro

Foram analisadas 524 amostras de escarro obtidas de 192 pacientes, 38 (7,2%) das quais foram consideradas inadequadas pelos técnicos do Laboratório de Citopatologia. Cento e trinta e cinco pacientes tiveram avaliadas pelo menos duas amostras de escarro, como revela a tabela 7.

Tabela 7 - Distribuição de 486 amostras adequadas de escarro obtidas de 182 pacientes com comprometimento pulmonar por paracoccidiodomicose, segundo distribuição ordinal do espécime analisado.

Amostras	Número de pacientes	Casos positivos	
		Nº	%
1 ^a	182	106	58,2
2 ^a	135	72	53,3
3 ^a	109	57	52,3
4 ^a	33	23	69,7
5 ^a	12	6	50,0
6 ^a	9	4	44,4
7 ^a	2	0	0
8 ^a	1	0	0
9 ^a	1	0	0
10 ^a	1	0	0
11 ^a	1	0	0
Total	486	268	55,1

Teste de Tukey (1^a vs 2^a vs 3^a) p>0,05
 Amostras colhidas antes ou até 15 dias após introdução do tratamento.

Tabela 8 - Distribuição de 486 amostras adequadas de escarro obtidas de 182 pacientes com comprometimento pulmonar por paracoccidiodomicose segundo a sensibilidade observada na avaliação cumulativa de até três amostras seqüenciais.

Amostras	Número de pacientes	Casos positivos	
		Nº	%
1 ^a	182	106	58,2
1 ^a +2 ^a	135	85	63,0
1 ^a +2 ^a +3 ^a	109	72	66,1

Teste de Tukey 1^a vs (1^a + 2^a) p>0,05
 Teste de Tukey 1^a vs (1^a + 2^a) vs (1^a + 2^a + 3^a) p>0,05
 Amostras colhidas antes ou até 15 dias após introdução do tratamento.

O número de amostras de escarro coletadas de cada paciente variou de um a 11, com mediana igual a 3,0. Entre as amostras adequadas, a sensibilidade observada no primeiro espécime foi igual a 58,2%, no segundo foi 53,3% e no terceiro foi 52,3%, freqüências que não diferiram entre si ($p>0,05$), como revela a tabela 7. A identificação de *P. brasiliensis* na avaliação cumulativa de espécimes seqüenciais revelou que a avaliação de duas ou de três amostras por paciente não melhorou a sensibilidade observada em apenas uma ($p>0,05$), como mostra a tabela 8.

A distribuição dos 182 pacientes, cujas amostras de escarro sempre foram consideradas adequadas, revela que 20 (11,0%) apresentaram a forma aguda/subaguda e 162 (89,0%) a forma crônica. A idade desses pacientes variou de 18 a 38 anos na forma aguda/subaguda, com mediana igual a 24, e de 24 a 75 na forma crônica, com mediana igual a 45 anos.

A sensibilidade do exame citopatológico de escarro foi igual a 60,0% nos pacientes com a forma aguda/subaguda da doença e 58,0% nos com a forma crônica, freqüências que não diferiram entre si ($p>0,05$) como revela a tabela 9.

Tabela 9 - Positividade do exame citopatológico de 486 amostras de escarro obtidas de 182 pacientes com lesão pulmonar causada por paracoccidioidomicose em atividade, segundo forma clínica.

Forma clínica	Número de pacientes	Pacientes com amostras positivas	
		Número	%
Aguda/Subaguda	20	12	60,0
Crônica	162	94	58,0
Total	182	106	58,2

$$\chi^2 = 0,019$$

$$p>0,05$$

A figura 7 [anexo 5] demonstra um exame citopatológico de escarro positivo para *P. brasiliensis*, que revela uma célula-mãe com múltiplas exo-esporulações.

3.2. Linfonodos

Foi coletada apenas uma amostra de cada um dos 62 pacientes, 44 (71,0%) dos quais apresentavam a forma aguda/subaguda e 18 (29,0%) a forma crônica.

A avaliação citopatológica foi realizada em material obtido de linfonodos fistulizados em dois casos e por punção aspirativa com agulha fina, em 60 pacientes.

As duas amostras obtidas de linfonodos fistulizados foram consideradas adequadas e resultaram positivas, como revela a tabela 10. Das 60 amostras coletadas por punção aspirativa com agulha fina, apenas uma (1,6%) revelou-se inadequada. Assim, a identificação de *P. brasiliensis* foi feita em 54 (91,5%) dos 59 casos em que o espécime clínico foi obtido por punção aspirativa com agulha fina, como também revela a tabela 10.

3.3. Pele

Raspado de lesão de pele foi coletado de apenas um paciente, cujo exame citopatológico resultou positivo. Esse paciente tinha 49 anos de idade e apresentava a forma crônica.

3.4. Lavado bronco-alveolar

O lavado bronco-alveolar foi realizado em 10 pacientes, nove dos quais apresentavam a forma crônica e apenas um a aguda/subaguda. De nove pacientes apenas uma amostra foi coletada e em três delas foram identificadas formas típicas da fase leveduriforme de *P. brasiliensis*. Do outro, duas amostras foram avaliadas, mas apenas a primeira resultou positiva.

3.5. Líquido ascítico

Amostra desse material foi coletada de apenas um paciente, com a forma aguda/subaguda, cuja pesquisa de *P. brasiliensis* resultou negativa.

Tabela 10 - Positividade do exame citopatológico de 74 pacientes com paracoccidioidomicose em atividade segundo espécime clínico avaliado.

Espécime	Número de espécimes	Amostras positivas	
		Nº	%
Linfonodo	61	56	91,8
punção aspirativa *	59	54	91,5
material fistulizado	2	2	—
Pele	1	1	—
Lavado bronco-alveolar	11**	4	36,4
Líquido ascítico	1	0	—

* Em 59 pacientes o material obtido foi considerado adequado; em um caso, era inadequado.

** 11 amostras de 10 pacientes.

4. Exame histopatológico

O exame histopatológico de espécimes clínicos obtidos de pacientes com paracoccidioidomicose em atividade foi realizado em cérebro, linfonodo, pele, mama, vesícula biliar, osso, medula óssea, baço, vias aerodigestivas superiores, tubo digestório, vias aéreas baixas e local não especificado, como revela a tabela 11. Apenas uma amostra dos espécimes clínicos foi avaliada em cada paciente (tabela 11). A sensibilidade do exame histopatológico variou de um tecido para outro ($p < 0,001$) e, entre os órgãos com pelo menos cinco exames realizados, variou de 77,8% na medula óssea a 100,0% em linfonodo.

As figuras 8 e 9 [anexo 5] demonstram exame histopatológico positivo para *P. brasiliensis*. A figura 8 revela fungos com exo-esporulações, e na figura 9 observam-se fungos em um granuloma epitelióide.

Tabela 11 - Exame histopatológico de material clínico obtido de 242 pacientes com paracoccidioidomicose em atividade, segundo o espécime analisado.

Espécime examinado	Exames realizados (N°)	Exames positivos	
		N°	%
Vias aerodigestivas superiores	133	132	99,2
Linfonodo	38	38	100,0
Pele	35	34	97,1
Vias aéreas baixas	12	11	91,7
Medula óssea	9	7	77,8
Tubo digestório	7	6	85,7
Cérebro	3	2	66,7
Mama	1	1	-
Vesícula biliar	1	1	-
Baço	1	1	-
Local não especificado	1	1	-
Osso	1	0	-
Total	242	234	96,7

$$\chi^2 = 209,28$$

$$p < 0,001$$

Foram avaliados 242 espécimes clínicos de 242 pacientes com paracoccidioidomicose em atividade. Destes, 62 (25,6%) apresentavam a forma aguda/subaguda e 180 (74,4%) a forma crônica, como revela a tabela 12. A idade desses pacientes variou de 03 a 45 anos na forma aguda/subaguda, com mediana igual a 22 anos e de 17 a 87 na crônica, com mediana igual a 50,5 anos.

Tabela 12 - Exame histopatológico de material clínico obtido de 242 pacientes com paracoccidioidomicose em atividade, segundo forma clínica.

Forma clínica	Número de amostras	Amostras positivas	
		Número	%
Aguda/Subaguda	62	58	93,5
Crônica	180	176	97,8
Total	242	234	96,7

$$\chi^2 = 2,49$$

$$p > 0,05$$

A sensibilidade do exame histopatológico foi igual a 93,5% na forma aguda/subaguda e 97,8% na forma crônica e não variou segundo forma clínica ($p>0,05$), como revela a tabela 12.

5. Exame sorológico

O exame sorológico foi realizado em 351 pacientes através da reação de imunodifusão dupla em gel de ágar (IDD) e revelou-se positiva em 316 casos (90,0%) e negativa em 35 (10,0%). Os títulos dos testes sorológicos apresentaram distribuição semelhante à curva de Gauss, como se observa na figura 10. A tabela 13 e a figura 11 revelam que os níveis séricos de anticorpos foram baixos em 57 (18,1%) pacientes, moderados em 87 (27,5%) e elevados em 172 (54,4%).

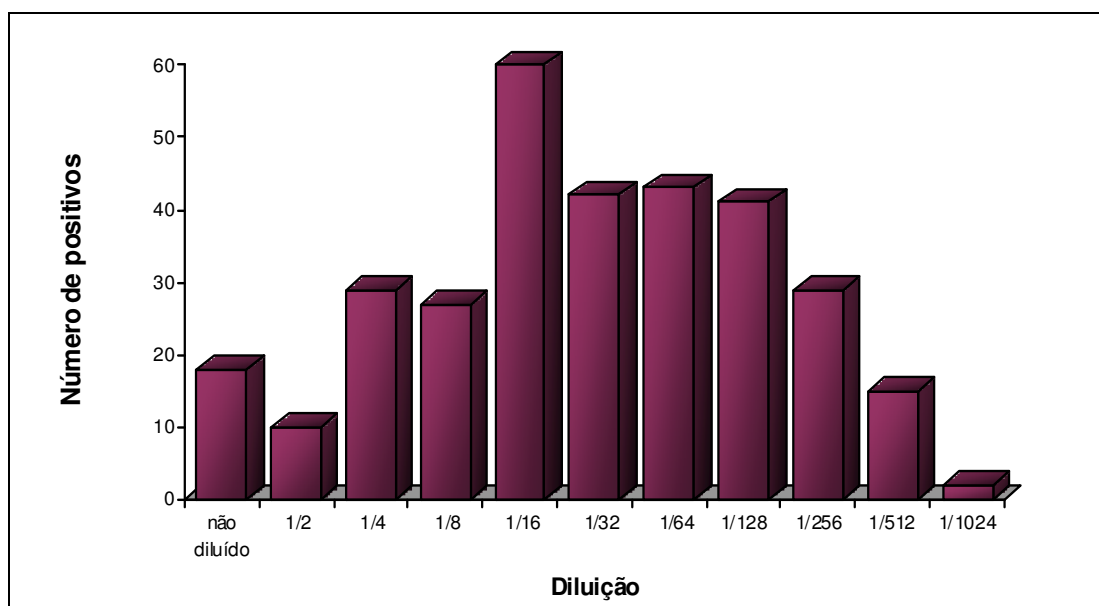


Figura 10 - Distribuição de 316 pacientes com paracoccidiodomicose em atividade e reação de imunodifusão dupla em gel de ágar positiva, segundo diluição.

Tabela 13 - Distribuição de 316 pacientes com paracoccidioidomicose em atividade e reação de imunodifusão dupla em gel de ágar positiva, segundo diluição.

Soro	Pacientes		Porcentagem cumulativa
	Número	%	
não diluído	18	5,7	5,7
diluído (1:)			
2	10	3,2	8,9
4	29	9,2	18,1
8	27	8,5	26,6
16	60	19,0	45,6
32	42	13,3	58,9
64	43	13,6	72,5
128	41	13,0	85,5
256	29	9,2	94,7
512	15	4,7	99,4
1024	2	0,6	100,0
Total	316	100,0	

Exames realizados antes ou até 15 dias após a introdução do tratamento.

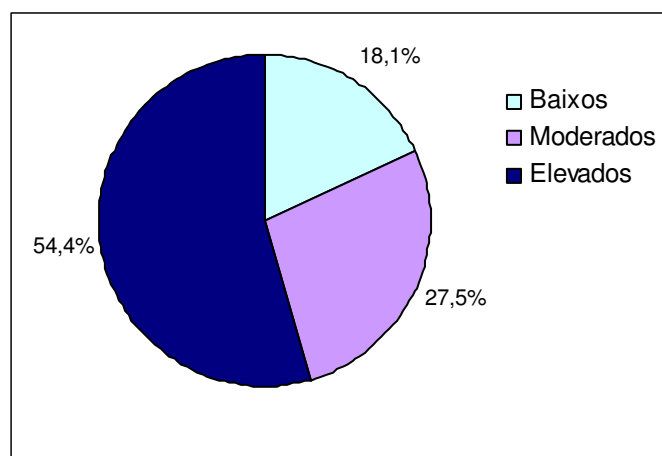


Figura 11 - Distribuição de 316 pacientes com paracoccidioidomicose em atividade, de acordo com a intensidade dos níveis séricos de anticorpos específicos determinados pela reação de imunodifusão dupla em gel de ágar. Exames realizados antes ou até 15 dias após a introdução do tratamento.

Avaliação dos testes de acurácia de reação de imunodifusão dupla em gel de ágar

Os parâmetros de acurácia da reação de imunodifusão dupla em gel de ágar foram calculados em função dos testes realizados em 200 doadores de sangue, como revela a tabela 14. Observou-se sensibilidade de 90,0% [87,5; 92,5], especificidade de 100,0% [100,0; 100,0], valor preditivo positivo de 100,0% [100,0; 100,0], valor preditivo negativo de 85,1% [82,1; 88,1] e acurácia de 93,6% [91,6; 95,6].

Tabela 14 - Resultados da pesquisa de anticorpos séricos pela reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, realizada em 351 pacientes com paracoccidioidomicose em atividade* e 200 doadores de sangue provenientes da mesma região.

		Pacientes	Controles	Total
Reação sorológica	+	316	0	316
	-	35	200	235
Total		351	200	551

* Exames realizados antes ou até 15 dias após a introdução do tratamento.

5.1. Avaliação sorológica segundo forma clínica

Dos 351 pacientes que realizaram a reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, 82 apresentavam a forma aguda/subaguda e 269 a forma crônica, como revela a tabela 15. A idade desses pacientes variou de três a 72 anos na forma aguda/subaguda, com mediana igual a 22, e de 24 a 87 na forma crônica, com mediana igual a 47 anos.

Tabela 15 - Sensibilidade da reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada em 351 amostras obtidas de 351 pacientes com paracoccidiodomicose em atividade, segundo forma clínica.

Forma clínica	Número de amostras	Amostras positivas	
		Número	%
Aguda/Subaguda	82	77	93,9
Crônica	269	239	88,8
Total	351	316	90,0

$$\chi^2 = 0,84$$

$$p > 0,05$$

A sensibilidade da reação de imunodifusão dupla em gel de ágar não variou segundo forma clínica ($p > 0,05$), pois foi igual a 93,9% na forma aguda/subaguda e 88,8% na forma crônica (tabela 15).

A distribuição dos níveis séricos de anticorpos específicos em pacientes com a forma aguda/subaguda, segundo diluição, está representada na figura 12.

A tabela 16 e a figura 13 revelam que apenas um paciente (1,3%) apresentou nível baixo de anticorpos, 11 (14,3%) apresentaram níveis moderados e 65 (84,4%) níveis elevados.

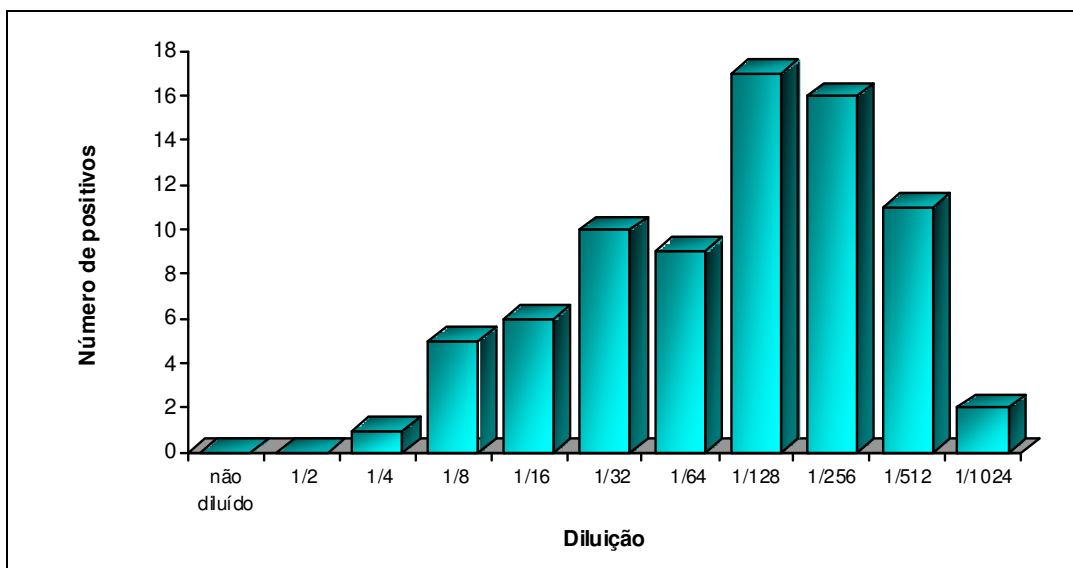


Figura 12 - Distribuição de 77 pacientes com a forma aguda/subaguda da paracoccidiodomicose em atividade e reação de imunodifusão dupla em gel de ágar positiva, segundo diluição. Exames realizados antes ou até 15 dias após a introdução do tratamento.

Tabela 16 - Distribuição de 77 pacientes com a forma aguda/subaguda da paracoccidiodomicose em atividade e reação de imunodifusão dupla em gel de ágar positiva, segundo diluição.

Diluição	Pacientes		Porcentagem cumulativa
	Número	%	
não diluído	0	—	—
diluído (1:)			
2	0	—	—
4	1	1,3	1,3
8	5	6,5	7,8
16	6	7,8	15,6
32	10	13,0	28,6
64	9	11,6	40,2
128	17	22,1	62,3
256	16	20,8	83,1
512	11	14,3	97,4
1024	2	2,6	100,0
Total	77	100,0	100,0

Exames realizados antes ou até 15 dias após a introdução do tratamento.

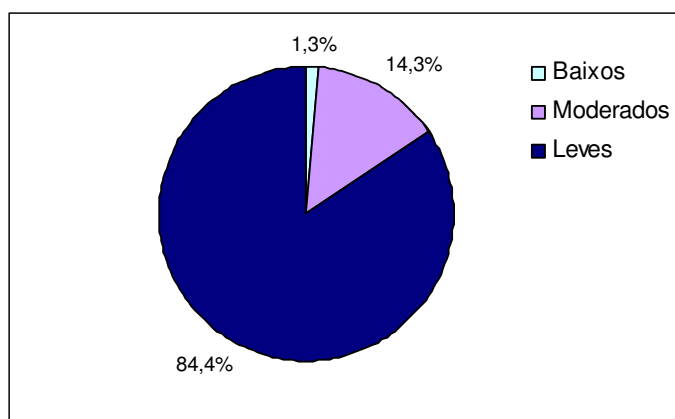


Figura 13 - Distribuição de 77 pacientes com a forma aguda/subaguda da paracoccidiodomicose em atividade e reação de imunodifusão dupla em gel de ágar positiva, segundo a intensidade dos níveis séricos de anticorpos. Exames realizados antes ou até 15 dias após a introdução do tratamento.

A distribuição dos níveis séricos de anticorpos específicos em pacientes com a forma crônica, segundo diluição, apresentou curva semelhante à de Gauss, como revela a figura 14.

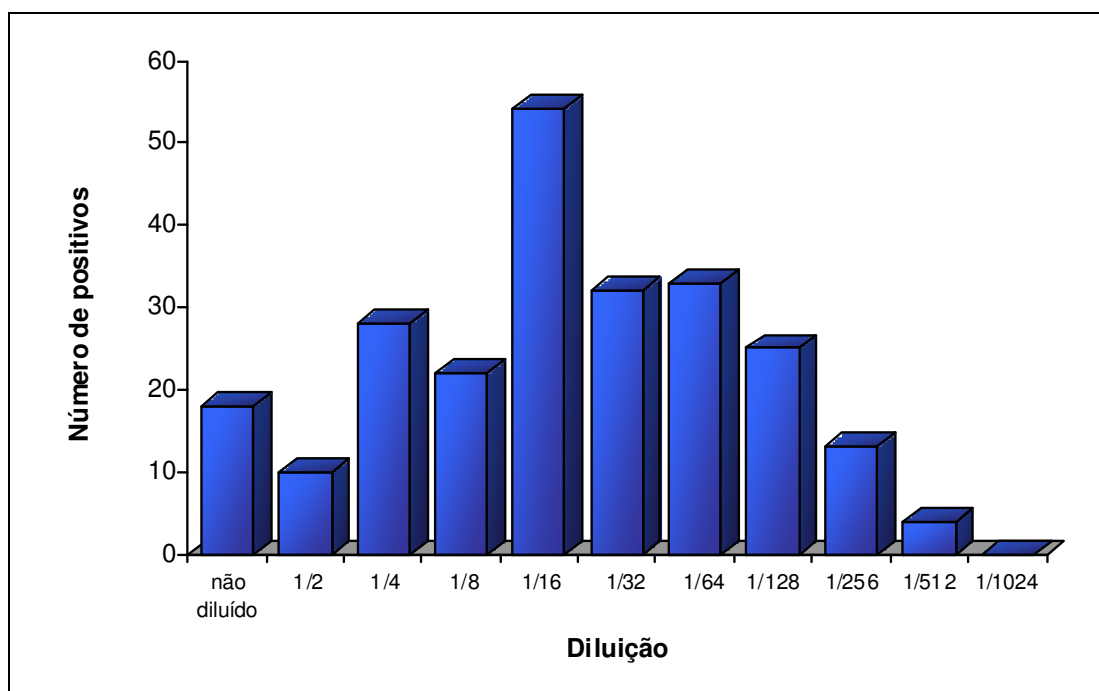


Figura 14 - Distribuição de 239 pacientes com a forma crônica da paracoccidiodomicose em atividade e reação de imunodifusão dupla em gel de ágar positiva, segundo diluição. Exames realizados antes ou até 15 dias após a introdução do tratamento.

A tabela 17 e a figura 15 revelam que 56 pacientes (23,4%) apresentaram níveis baixos de anticorpos, 76 (31,8%) apresentaram níveis moderados e 107 (44,8%) níveis elevados.

Tabela 17 - Distribuição de 239 pacientes com a forma crônica da paracoccidiodomicose em atividade e com reação de imunodifusão dupla em gel de ágar positiva, segundo diluição.

Diluição	Pacientes		Porcentagem cumulativa
	Número	%	
não diluído	18	7,5	7,5
diluído (1:)			
2	10	4,2	11,7
4	28	11,7	23,4
8	22	9,2	32,6
16	54	22,6	55,2
32	32	13,4	68,6
64	33	13,8	82,4
128	25	10,5	92,9
256	13	5,4	98,3
512	4	1,7	100,0
Total	239	100,0	100,0

Exames realizados antes ou até 15 dias após a introdução do tratamento.

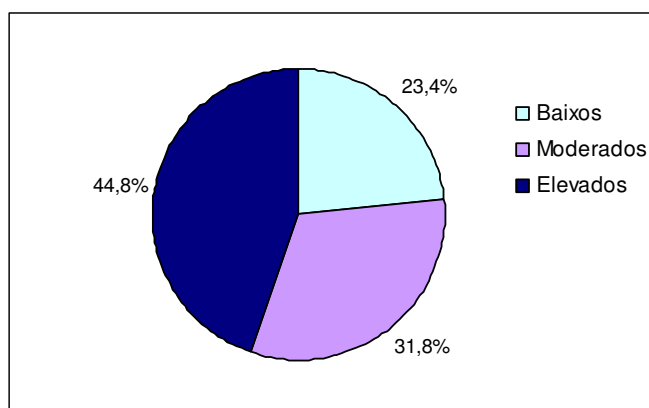


Figura 15 - Distribuição de 239 pacientes com a forma crônica da paracoccidiodomicose em atividade e reação de imunodifusão dupla em gel de ágar positiva, segundo a intensidade dos níveis séricos de anticorpos. Exames realizados antes ou até 15 dias após a introdução do tratamento.

Os níveis séricos de anticorpos específicos anti-*P. brasiliensis* foram mais intensos em pacientes com a forma aguda/subaguda que naqueles com a forma crônica ($p < 0.01$). Observou-se menor frequência de nível baixo e maior proporção de nível elevado na forma aguda/subaguda que na forma crônica ($p < 0.0001$).

6. Comparação da positividade dos testes diagnósticos

Os testes diagnósticos foram comparados dois a dois, como se observa na tabela 18.

Tabela 18 - Comparação da sensibilidade dos quatro exames diagnósticos - micológico direto (MD), citopatológico (CP), histopatológico (HP) e sorológico (SR), realizados em pacientes com paracoccidiodomicose em atividade.

Comparações	Nº de Pacientes	+ / +	- / -	+ / -	- / +	Nível de significância	Interpretação
MD vs HP	64	32	1	2	29	$p < 0,001$	MD < HP
MD vs CP	71	32	10	12	17	$p > 0,05$	MD = CP
MD vs SR	98	54	5	8	31	$p < 0,001$	MD < SR
HP vs CP	95	57	1	35	2	$p < 0,001$	HP > CP
HP vs SR	207	178	1	22	6	$p = 0,005$	HP > SR
SR vs CP	170	101	6	54	9	$p < 0,001$	SR > CP

A seqüência de resultados segue a ordem apresentada na comparação.

Interpretação: HP > SR > (CP = MD)

A comparação entre os quatro testes diagnósticos analisados neste trabalho - exames micológico direto (MD), citopatológico (CP), sorológico (SR) e histopatológico (HP) – mostrou que o exame histopatológico apresentou

maior sensibilidade, a que se seguiram, em ordem decrescente, a sorologia, o exame citopatológico e o micológico direto. As sensibilidades destes dois últimos não diferiram entre si.

7. Avaliação dos exames sorológicos em soros negativos à reação de imunodifusão dupla em gel de ágar (IDD), realizada no Laboratório Experimental de Pesquisa de Doenças Tropicais

A reação de imunodifusão dupla em gel de ágar foi negativa no soro de 35 pacientes, 32 dos quais ainda contavam com amostra congelada, que foram submetidas a novos testes sorológicos. Para comparação dos resultados, as sorologias também foram realizadas em soros de 32 pacientes que apresentavam resultado positivo, e que foram pareados de acordo com a forma clínica e idade.

Nem todas as novas avaliações sorológicas foram realizadas nos 32 soros, devido ao volume disponível de cada amostra.

7.1. Resultados da reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada no mesmo laboratório, com diferentes antígenos

7.1.1. Testes realizados no Laboratório Experimental de Pesquisa de Doenças Tropicais (LEPDT) da FMB - UNESP, com diferentes preparações antigênicas

A reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, realizada no LEPDT, não apresentou diferença na sensibilidade quando realizada com três diferentes preparações antigênicas - Pb 113 de Araraquara, Pb 113 do IAL e Pb B-339 do IAL, como revela a tabela 19.

Tabela 19 - Comparação dos resultados da reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, realizada no Laboratório Experimental de Pesquisa de Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, com diferentes preparações antigênicas, em 64 soros de pacientes com paracoccidioidomicose confirmada.

Comparações	Nº de Pacientes	+ / +	- / -	+ / -	- / +	Nível de significância	Interpretação
IDD1-FMB vs IDD2-FMB	64	31	32	1	0	p>0,05	IDD1-FMB = IDD2-FMB
IDD1-FMB vs IDDr-FMB	64	25	25	7	7	coincidentes	IDD1-FMB = IDDr-FMB
IDD2-FMB vs IDDr-FMB	64	25	26	6	7	p>0,05	IDD2-FMB = IDDr-FMB

A seqüência de resultados segue a ordem apresentada na comparação.

IDD1-FMB: reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada com antígeno Pb 113 preparado no IAL. Técnica feita no Laboratório Experimental de Pesquisa de Doenças Tropicais da FMB - UNESP.

IDD2-FMB: reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada com antígeno Pb B-339 preparado no IAL. Técnica feita no Laboratório Experimental de Pesquisa de Doenças Tropicais da FMB - UNESP.

IDDr-FMB: reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada com antígeno Pb 113 preparado em Araraquara. Técnica feita no Laboratório Experimental de Pesquisa de Doenças Tropicais da FMB - UNESP.

Interpretação: IDDr = IDD1 = IDD2

7.1.2. Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses (LIM) do Instituto Adolfo Lutz (IAL) - SP, com diferentes antígenos

A reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, realizada no LIM - IAL, não apresentou diferença na sensibilidade quando realizada com os antígenos Pb 113 (IDD1) e Pb B-339 (IDD2) do IAL (p>0,05), mas apresentaram maior sensibilidade que o teste realizado com o antígeno Pb 113 de Araraquara (IDDr), como demonstra a tabela 20 (p<0,05).

Tabela 20 - Comparação da reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL - SP, com diferentes preparações antigênicas, em 63 e 64 soros de pacientes com paracoccidioidomicose confirmada.

Comparações	Nº de Pacientes	+ / +	- / -	+ / -	- / +	Nível de significância	Interpretação
IDD1-IAL vs IDD2-IAL	64	33	30	1	0	p>0,05	IDD1-IAL = IDD2-IAL
IDD1-IAL vs IDDr-IAL	63	23	30	10	0	p=0,001	IDD1-IAL > IDDr-IAL
IDD2-IAL vs IDDr-IAL	63	23	31	9	0	p=0,002	IDD2-IAL > IDDr-IAL

A seqüência de resultados segue a ordem apresentada na comparação.

* Em alguns casos a IDD foi realizada em 63 soros devido ao volume da amostra estocada.

IDD1-IAL: reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada com antígeno Pb 113 preparado no IAL. Técnica feita no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL - SP.

IDD2-IAL: reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada com antígeno Pb B-339 preparado no IAL. Técnica feita no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL - SP.

IDDr-IAL: reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada com antígeno Pb 113 preparado em Araraquara. Técnica feita no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL - SP.

Interpretação: (IDD1 = IDD2) > IDDr

7.2. Resultados da reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada com o mesmo antígeno em laboratórios diferentes para avaliação da reprodutibilidade inter-laboratorial do teste

A sensibilidade da reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, realizada com o antígeno Pb 113 do IAL, foi igual a 78,1% e não apresentou diferença quando realizada no LEPDT (IDD1-FMB) e no LIM (IDD1-IAL), o que demonstra a reprodutibilidade do teste, como revela a tabela 21 (p>0,05).

A sensibilidade da reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, realizada com o antígeno Pb B-339 do IAL, foi igual a 75,0% e não apresentou diferença quando realizada no LEPDT (IDD2-FMB) e no LIM (IDD2-IAL), o que demonstra a reprodutibilidade do teste, como revela a tabela 21 (p>0,05).

A reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, realizada com o antígeno Pb 113 de Araraquara, mostrou sensibilidade discretamente maior ($p=0,048$) quando realizada no LEPDT (IDDr-FMB) em comparação à executada no LIM (IDDr-IAL), como revela a tabela 21.

Tabela 21 - Comparação da reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, realizada no Laboratório Experimental de Pesquisa de Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP e no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL - SP, com as preparações antigênicas obtidas do Pb 113 de Araraquara, do Pb 113 do IAL e do Pb B-339 do IAL, em soros de pacientes com paracoccidiodomicose confirmada.

Comparações	Nº de Pacientes	+ / +	- / -	+ / -	- / +	Nível de significância	Interpretação
IDD1-FMB vs IDD1-IAL	64	26	24	6	8	$p>0,05$	IDD1-FMB = IDD1-IAL
IDD2-FMB vs IDD2-IAL	64	24	24	7	9	$p>0,05$	IDD2-FMB = IDD2-IAL
IDDr-FMB vs IDDr-IAL	63	18	27	13	5	$p=0,048$	IDDr-FMB > IDDr-IAL

A seqüência de resultados segue a ordem apresentada na comparação.

* Em alguns casos a IDD foi realizada em 63 soros devido ao volume da amostra estocada.

IDD1-FMB: reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada com antígeno Pb 113 preparado no IAL. Técnica feita no Laboratório Experimental de Pesquisa de Doenças Tropicais da FMB - UNESP.

IDD2-FMB: reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada com antígeno Pb B-339 preparado no IAL. Técnica feita no Laboratório Experimental de Pesquisa de Doenças Tropicais da FMB - UNESP.

IDDr-FMB: reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada com antígeno Pb 113 preparado em Araraquara. Técnica feita no Laboratório Experimental de Pesquisa de Doenças Tropicais da FMB - UNESP.

IDD1-IAL: reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada com antígeno Pb 113 preparado no IAL. Técnica feita no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL - SP.

IDD2-IAL: reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada com antígeno Pb B-339 preparado no IAL. Técnica feita no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL - SP.

IDDr-IAL: reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada com antígeno Pb 113 preparado em Araraquara. Técnica feita no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL - SP.

Interpretação: IDD1-FMB = IDD1-IAL

IDD2-FMB = IDD2-IAL

IDDr-FMB > IDDr-IAL

7.3. Resultados da reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada com antígenos diferentes em dois laboratórios

A reação de imunodifusão dupla em gel ágar realizada no LEPDT com o antígeno Pb 113 de Araraquara (IDDr-FMB) não apresentou diferença de sensibilidade quando comparada com as das realizadas no IAL com o antígeno Pb 113 (IDD1-IAL) e Pb B-339 (IDD2-IAL), mas revelou sensibilidade discretamente maior que a da realizada no IAL com o antígeno Pb 113 de Araraquara (IDDr-IAL), com $p=0,048$, como mostra a tabela 22.

Tabela 22 - Comparação da reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, realizada Laboratório Experimental de Pesquisa de Doenças Tropicais da FMB - UNESP e no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL - SP, com preparações antigênicas obtidas do Pb 113 de Araraquara, Pb 113 do IAL e Pb B-339 do IAL, em soros de pacientes com paracoccidiodomicose confirmada.

Comparações	Nº de Pacientes	+ / +	- / -	+ / -	- / +	Nível de significância	Interpretação
IDDr-FMB vs IDD1-IAL	64	26	24	6	8	$p>0,05$	IDDr-FMB = IDD1-IAL
IDDr-FMB vs IDD2-IAL	64	25	24	7	8	$p>0,05$	IDDr-FMB = IDD2-IAL
IDDr-FMB vs IDDr-IAL	63	18	27	13	5	$p=0,048$	IDDr-FMB > IDDr-IAL

A seqüência de resultados segue a ordem apresentada na comparação.

* Em alguns casos a IDD foi realizada em 63 soros devido ao volume da amostra estocada.

IDDr-FMB: reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada com antígeno Pb 113 preparado em Araraquara. Técnica feita no Laboratório Experimental de Pesquisa de Doenças Tropicais da FMB - UNESP.

IDD1-IAL: reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada com antígeno Pb 113 preparado no IAL. Técnica feita no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL - SP.

IDD2-IAL: reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada com antígeno Pb B-339 preparado no IAL. Técnica feita no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL - SP.

IDDr-IAL: reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada com antígeno Pb 113 preparado em Araraquara. Técnica feita no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL - SP.

Interpretação: (IDDr-FMB = IDD1-IAL = IDD2-IAL) > IDDr-IAL

7.4. Avaliação global das comparações de sensibilidade da reação de imunodifusão dupla em gel de ágar apresentadas em 7.1, 7.2 e 7.3

A comparação das reações de imunodifusão dupla em gel de ágar, realizadas nos dois laboratórios com diferentes antígenos, demonstrou que não houve diferença na sensibilidade quando o teste foi realizado no LEPDT com o antígeno Pb 113 de Araraquara (IDDr-FMB) e com os antígenos Pb 113 (IDD1-FMB e IDD1-IAL) e Pb B-339 (IDD2-FMB e IDD2-IAL) em ambos os laboratórios ($p > 0,05$), mas que todos esses apresentaram sensibilidade discretamente maior quando comparados ao teste realizado no LIM com o antígeno Pb 113 de Araraquara (IDDr-IAL).

Interpretação: (IDDr-FMB = IDD1-FMB = IDD1-IAL = IDD2-FMB = IDD2-IAL) > IDDr-IAL

8. Avaliação do ensaio de *immunoblotting* (IB), realizado no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do Instituto Adolfo Lutz - SP, em soros negativos à reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, de pacientes com paracoccidioidomicose confirmada e em atividade

8.1. Comparação dos ensaios de *immunoblotting* realizados com os antígenos Pb 113 e Pb B-339

O ensaio de *immunoblotting* foi realizado no LIM do Instituto Adolfo Lutz - SP em soros de 32 pacientes que revelaram reação de imunodifusão dupla em gel de ágar negativa. Para comparação dos resultados, os testes sorológicos também foram realizados em soros de 32 pacientes que apresentaram sorologia positiva, que foram selecionados de acordo com a forma clínica e idade.

Nem todos os testes foram realizados nos 32 soros devido ao volume da amostra armazenada.

A comparação das frequências de reconhecimento das glicoproteínas de 43 kDa e 70 kDa, com preparações antigênicas do Pb 113 e Pb B-339 do IAL, revelou que o reconhecimento da gp43, quando utilizadas as

duas preparações antigênicas, e o reconhecimento da gp70 com a do Pb 113, não diferiram entre si e se mostraram maiores que o reconhecimento da gp70 quando utilizado o Pb B-339, como demonstra a tabela 23.

Tabela 23 - Comparação do reconhecimento da gp43 e gp70 através do ensaio de *immunoblotting*, realizado no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL - SP, com preparações antigênicas obtidas do Pb 113 e Pb B-339 do IAL, em soros de pacientes com paracoccidiodomicose confirmada e em atividade.

Comparações	Nº de Pacientes	+ / +	- / -	+ / -	- / +	Nível de significância	Interpretação
IB1gp43 vs IB1gp70	62	60	2	0	0	coincidentes	IB1gp43 = IB1gp70
IB1gp43 vs IB2gp43	61	55	0	4	2	p>0,05	IB1gp43 = IB2gp43
IB1gp43 vs IB2gp70	61	0	2	59	0	p<0,00001	IB1gp43 > IB2gp70
IB1gp70 vs IB2gp43	61	55	0	4	2	p>0,05	IB1gp70 = IB2gp43
IB1gp70 vs IB2gp70	61	0	2	59	0	p<0,00001	IB1gp70 > IB2gp70
IB2gp43 vs IB2gp70	63	0	5	58	0	p<0,00001	IB2gp43 > IB2gp70

A seqüência de resultados segue a ordem apresentada na comparação.

* O ensaio de *immunoblotting* foi realizado em 61, 62 e 63 soros devido ao volume da amostra estocada.

IB1gp43: reconhecimento da fração de 43 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb 113. Ensaio realizado no IAL.

IB1gp70: reconhecimento da fração de 70 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb 113. Ensaio realizado no IAL.

IB2gp43: reconhecimento da fração de 43 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb B-339. Ensaio realizado no IAL.

IB2gp70: reconhecimento da fração de 70 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb B-339. Ensaio realizado no IAL.

Interpretação: (IB1gp43 = IB1gp70 = IB2gp43) > IB2gp70

8.2. Comparação da sensibilidade do ensaio de *immunoblotting* com a reação de imunodifusão dupla em gel de ágar

8.2.1. Imunodifusão realizada no LEPDT da FMB - UNESP com antígeno Pb 113 de Araraquara (IDDr-FMB) *versus immunoblotting*

A comparação das freqüências de reconhecimento das glicoproteínas de 43 kDa e 70 kDa, com preparações antigênicas do Pb 113 e Pb B-339 do IAL, revelam que o reconhecimento da gp43, quando utilizadas as duas preparações antigênicas, e o reconhecimento da gp70 com o Pb 113, não diferiram e se mostraram maiores que a reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, realizada no LEPDT com Pb 113 de Araraquara (IDDr-FMB), que por sua vez se mostrou maior que o reconhecimento da gp70 quando utilizado o Pb B-339, como revela a tabela 24.

Tabela 24 - Comparação do ensaio de *immunoblotting*, realizado com preparações antigênicas obtidas do Pb 113 e Pb B-339 do IAL, com a reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, realizada no Laboratório Experimental de Pesquisa de Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP com o antígeno Pb 113 de Araraquara, em soros de pacientes com paracoccidiodomicose confirmada e em atividade.

Comparações	Nº de Pacientes	+ / +	- / -	+ / -	- / +	Nível de significância	Interpretação
IDDr-FMB vs IB1gp43	62	30	2	0	30	p<0,00001	IDDr-FMB < IB1gp43
IDDr-FMB vs IB1gp70	62	30	2	0	30	p<0,00001	IDDr-FMB < IB1gp70
IDDr-FMB vs IB2gp43	63	27	0	5	31	p<0,001	IDDr-FMB < IB2gp43
IDDr-FMB vs IB2gp70	63	0	31	32	0	p<0,001	IDDr-FMB > IB2gp70

A seqüência de resultados segue a ordem apresentada na comparação.

* Os testes foram realizados em 62 e 63 soros devido ao volume da amostra estocada.

IDDr-FMB: reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada com antígeno Pb 113 preparado em Araraquara. Técnica feita no Laboratório Experimental de Pesquisa de Doenças Tropicais da FMB - UNESP.

IB1gp43: reconhecimento da fração de 43 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb 113. Ensaio realizado no IAL.

IB1gp70: reconhecimento da fração de 70 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb 113. Ensaio realizado no IAL.

IB2gp43: reconhecimento da fração de 43 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb B-339. Ensaio realizado no IAL.

IB2gp70: reconhecimento da fração de 70 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb B-339. Ensaio realizado no IAL.

Interpretação: (IB1gp43 = IB1gp70 = IB2gp43) > IDDr-FMB > IB2gp70

8.2.2. Imunodifusão realizada no LEPDT da FMB - UNESP com antígeno Pb 113 do IAL (IDD1-FMB) versus immunoblotting

A comparação das freqüências de reconhecimento das glicoproteínas de 43 kDa e 70 kDa, com preparações antigênicas do Pb 113 e Pb B-339 do IAL, revelam que o reconhecimento da gp43, quando utilizadas as duas preparações, e o reconhecimento da gp70 com o Pb 113, não diferiram entre si e se mostraram maior que a reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, realizada no LEPDT com Pb 113 do IAL (IDD1-FMB) que, por sua vez, se mostrou maior que o reconhecimento da gp70 quando utilizado o Pb B-339, como revela a tabela 25.

Tabela 25 - Comparação do ensaio de *immunoblotting*, realizado com preparações antigênicas obtidas do Pb 113 e Pb B-339 do IAL, com a imunodifusão realizada no Laboratório Experimental de Pesquisa de Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP com o antígeno Pb 113 do IAL, em soros de pacientes com paracoccidiodomicose confirmada.

Comparações	Nº de Pacientes	+ / +	- / -	+ / -	- / +	Nível de significância	Interpretação
IDD1-FMB vs IB1gp43	62	32	2	0	28	p<0,0001	IDD1-FMB < IB1gp43
IDD1-FMB vs IB1gp70	62	32	2	0	28	p<0,0001	IDD1-FMB < IB1gp70
IDD1-FMB vs IB2gp43	63	28	1	4	30	p<0,001	IDD1-FMB < IB2gp43
IDD1-FMB vs IB2gp70	63	0	31	32	0	p<0,001	IDD1-FMB > IB2gp70

A seqüência de resultados segue a ordem apresentada na comparação.

* Os testes foram realizados em 62 e 63 soros devido ao volume da amostra estocada.

IDD1-FMB: reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada com antígeno Pb 113 preparado no IAL. Técnica feita no Laboratório Experimental de Pesquisa de Doenças Tropicais da FMB - UNESP.

IB1gp43: reconhecimento da fração de 43 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb 113. Ensaio realizado no IAL.

IB1gp70: reconhecimento da fração de 70 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb 113. Ensaio realizado no IAL.

IB2gp43: reconhecimento da fração de 43 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb B-339. Ensaio realizado no IAL.

IB2gp70: reconhecimento da fração de 70 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb B-339. Ensaio realizado no IAL.

Interpretação: (IB1gp43 = IB1gp70 = IB2gp43) > IDD1-FMB > IB2gp70

8.2.3. Imunodifusão realizada no LEPDT da FMB - UNESP com antígeno Pb B-339 do IAL (IDD2-FMB) versus immunoblotting

A comparação das freqüências de reconhecimento das glicoproteínas de 43 kDa e 70 kDa, com preparações antigênicas do Pb 113 e Pb B-339 do IAL, revelam que o reconhecimento da gp43, quando utilizadas as duas preparações, e o reconhecimento da gp70 com o Pb 113, não diferiram e se mostraram maior que a reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, realizada no LEPDT com Pb B-339 do IAL (IDD2-FMB), que por sua vez se mostrou maior que o reconhecimento da gp70 quando utilizado o Pb B-339, como revela a tabela 26.

Tabela 26 - Comparação do ensaio de *immunoblotting*, realizado com preparações antigênicas obtidas do Pb 113 e Pb B-339 do IAL, com a reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, realizada no Laboratório Experimental de Pesquisa de Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP com o antígeno Pb B-339 do IAL, em soros de pacientes com paracoccidioidomicrose confirmada.

Comparações	Nº de Pacientes	+ / +	- / -	+ / -	- / +	Nível de significância	Interpretação
IDD2-FMB vs IB1gp43	62	31	2	0	29	p<0,0001	IDD2-FMB < IB1gp43
IDD2-FMB vs IB1gp70	62	31	2	0	29	p<0,0001	IDD2-FMB < IB1gp70
IDD2-FMB vs IB2gp43	64	27	1	4	32	p<0,001	IDD2-FMB < IB2gp43
IDD2-FMB vs IB2gp70	63	0	32	31	0	p<0,001	IDD2-FMB > IB2gp70

A seqüência de resultados segue a ordem apresentada na comparação.

* Os testes foram realizados em 62 e 63 soros devido ao volume da amostra estocada.

IDD1-FMB: reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada com antígeno Pb 113 preparado no IAL. Técnica feita no Laboratório Experimental de Pesquisa de Doenças Tropicais da FMB - UNESP.

IB1gp43: reconhecimento da fração de 43 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb 113. Ensaio realizado no IAL.

IB1gp70: reconhecimento da fração de 70 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb 113. Ensaio realizado no IAL.

IB2gp43: reconhecimento da fração de 43 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb B-339. Ensaio realizado no IAL.

IB2gp70: reconhecimento da fração de 70 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb B-339. Ensaio realizado no IAL.

Interpretação: (IB1gp43 = IB1gp70 = IB2gp43) > IDD2-FMB > IB2gp70

8.2.4. Imunodifusão realizada no LIM do Instituto Adolfo Lutz com antígeno Pb 113 de Araraquara (IDDr-IAL) versus immunoblotting

A comparação das freqüências de reconhecimento das glicoproteínas de 43 kDa e 70 kDa, com preparações antigênicas do Pb 113 e Pb B-339 do IAL, revelam que o reconhecimento da gp43, quando utilizadas as duas preparações, e o reconhecimento da gp70 com o Pb 113, não diferiram e se mostraram maior que a reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, realizada no LIM com Pb 113 de Araraquara (IDDr-IAL), que por sua vez se mostrou maior que o reconhecimento da gp70 quando utilizado o Pb B-339, como revela a tabela 27.

Tabela 27 - Comparação do ensaio de *immunoblotting*, realizado com preparações antigênicas obtidas do Pb 113 e Pb B-339 do IAL, com a reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, realizada no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL - SP, com o antígeno Pb 113 de Araraquara, em soros de pacientes com paracoccidiodomicose confirmada.

Comparações	Nº de Pacientes	+ / +	- / -	+ / -	- / +	Nível de significância	Interpretação
IDDr-IAL vs IB1gp43	62	22	2	0	38	p<0,00001	IDDr-IAL < IB1gp43
IDDr- IAL vs IB1gp70	62	22	2	0	38	p<0,00001	IDDr- IAL < IB1gp70
IDDr- IAL vs IB2gp43	62	20	2	3	37	p<0,001	IDDr- IAL < IB2gp43
IDDr- IAL vs IB2gp70	62	0	39	23	0	p<0,001	IDDr- IAL > IB2gp70

A seqüência de resultados segue a ordem apresentada na comparação.

* Os testes foram realizados em 62 soros devido ao volume da amostra estocada.

IDDr-IAL: reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada com antígeno Pb 113 preparado em Araraquara. Técnica feita no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL - SP.

IB1gp43: reconhecimento da fração de 43 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb 113. Ensaio realizado no IAL.

IB1gp70: reconhecimento da fração de 70 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb 113. Ensaio realizado no IAL.

IB2gp43: reconhecimento da fração de 43 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb B-339. Ensaio realizado no IAL.

IB2gp70: reconhecimento da fração de 70 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb B-339. Ensaio realizado no IAL.

Interpretação: (IB1gp43 = IB1gp70 = IB2gp43) > IDDr-IAL > IB2gp70

8.2.5. Imunodifusão realizada no LIM do Instituto Adolfo Lutz com antígeno Pb 113 do IAL (IDD1-IAL) versus immunoblotting

A comparação das freqüências de reconhecimento das glicoproteínas de 43 kDa e 70 kDa, com preparações antigênicas do Pb 113 e Pb B-339 do IAL, revelam que o reconhecimento da gp43, quando utilizadas as duas preparações, e o reconhecimento da gp70 com o Pb 113, não diferiram e se mostraram maior que a reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, realizada no LIM com Pb 113 do IAL (IDD1-IAL), que por sua vez se mostrou maior que o reconhecimento da gp70 quando utilizado o Pb B-339, como revela a tabela 28.

Tabela 28 - Comparação do ensaio de *immunoblotting*, realizado com preparações antigênicas obtidas do Pb 113 e Pb B-339 do IAL, com a reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, realizada no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL - SP, com o antígeno Pb 113 do IAL, em soros de pacientes com paracoccidiodomicose confirmada.

Comparações	Nº de Pacientes	+ / +	- / -	+ / -	- / +	Nível de significância	Interpretação
IDD1-IAL vs IB1gp43	62	32	2	0	28	p<0,0001	IDD1-IAL < IB1gp43
IDD1- IAL vs IB1gp70	62	32	2	0	28	p<0,0001	IDD1-IAL < IB1gp70
IDD1- IAL vs IB2gp43	63	30	2	3	28	p<0,001	IDD1-IAL < IB2gp43
IDD1- IAL vs IB2gp70	63	0	30	33	0	p<0,001	IDD1-IAL > IB2gp70

A seqüência de resultados segue a ordem apresentada na comparação.

* Os testes foram realizados em 62 e 63 soros devido ao volume da amostra estocada.

IDD1-IAL: reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada com antígeno Pb 113 preparado no IAL. Técnica feita no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL - SP.

IB1gp43: reconhecimento da fração de 43 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb 113. Ensaio realizado no IAL.

IB1gp70: reconhecimento da fração de 70 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb 113. Ensaio realizado no IAL.

IB2gp43: reconhecimento da fração de 43 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb B-339. Ensaio realizado no IAL.

IB2gp70: reconhecimento da fração de 70 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb B-339. Ensaio realizado no IAL.

Interpretação: (IB1gp43 = IB1gp70 = IB2gp43) > IDD1-IAL > IB2gp70

8.2.6. Imunodifusão realizada no LIM do Instituto Adolfo Lutz com antígeno Pb B-339 do IAL (IDD2-IAL) versus immunoblotting

A comparação das freqüências de reconhecimento das glicoproteínas de 43 kDa e 70 kDa, com preparações antigênicas do Pb 113 e Pb B-339 do IAL, revelam que o reconhecimento da gp43, quando utilizadas as duas preparações, e o reconhecimento da gp70 com o Pb 113, não diferiram e se mostraram maior que a reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, realizada no LIM com Pb B-339 do IAL (IDD2-IAL), que por sua vez se mostrou maior que o reconhecimento da gp70 quando utilizado o Pb B-339, como revela a tabela 29.

Tabela 29 - Comparação do ensaio de *immunoblotting*, realizado com preparações antigênicas obtidas do Pb 113 e Pb B-339 do IAL, com a reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, realizada no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL - SP, com o antígeno Pb B-339 do IAL, em soros de pacientes com paracoccidioidomicose confirmada.

Comparações	Nº de Pacientes	+ / +	- / -	+ / -	- / +	Nível de significância	Interpretação
IDD2-IAL vs IB1gp43	62	31	2	0	29	p<0,0001	IDD2-IAL < IB1gp43
IDD2- IAL vs IB1gp70	62	31	2	0	29	p<0,0001	IDD2-IAL < IB1gp70
IDD2- IAL vs IB2gp43	63	29	2	3	29	p<0,001	IDD2-IAL < IB2gp43
IDD2- IAL vs IB2gp70	63	0	31	32	0	p<0,001	IDD2-IAL > IB2gp70

A seqüência de resultados segue a ordem apresentada na comparação.

* Os testes foram realizados em 62 e 63 soros devido ao volume da amostra estocada.

IDD1-IAL: reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada com antígeno Pb 113 preparado no IAL. Técnica feita no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL - SP.

IB1gp43: reconhecimento da fração de 43 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb 113. Ensaio realizado no IAL.

IB1gp70: reconhecimento da fração de 70 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb 113. Ensaio realizado no IAL.

IB2gp43: reconhecimento da fração de 43 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb B-339. Ensaio realizado no IAL.

IB2gp70: reconhecimento da fração de 70 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb B-339. Ensaio realizado no IAL.

Interpretação: (IB1gp43 = IB1gp70 = IB2gp43) > IDD2-IAL > IB2gp70

8.2.7. Avaliação global da sensibilidade das reações de imunodifusão comparando à dos ensaios de *immunoblotting*

De acordo com o observado nas tabelas 24 a 29, notou-se que o ensaio de *immunoblotting* apresentou elevada sensibilidade quando realizado com o antígeno Pb 113, a qual foi maior que os valores encontrados nas reações de imunodifusão, que por sua vez tiveram sensibilidade maior que o reconhecimento da gp70 quando o ensaio foi feito com o antígeno Pb B-339.

9. Avaliação do ensaio de *immunoblotting* e da reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizados em doadores de sangue

9.1. Avaliação dos testes de acurácia do ensaio de *immunoblotting* realizado em soros de pacientes com paracoccidiodomicose em atividade e de doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu

Os parâmetros de acurácia do ensaio de *immunoblotting*, quando avaliado o reconhecimento da gp43 com a preparação antigênica do Pb 113 do IAL, foram calculados em função dos testes realizados em soros de doadores do Hemocentro de Botucatu, como revela a tabela 30. Observou-se sensibilidade de 96,8%, especificidade de 50,0%, valor preditivo positivo de 65,2%, valor preditivo negativo de 94,1% e acurácia de 73,0%.

Tabela 30 – Reconhecimento da gp43 por ensaio de *immunoblotting*, realizado no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL - SP, com antígeno Pb 113 do IAL, em soros pacientes com paracoccidiodomicose confirmada e em atividade, e em doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu.

		Pacientes	Controles	Total
<i>Immunoblotting</i>	Positivo	60	32	92
	Negativo	2	32	34
Total		62	64	126

Os parâmetros de acurácia do ensaio de *immunoblotting*, quando avaliado o reconhecimento da gp70 com a preparação antigênica do Pb 113 do IAL, foram calculados em função dos testes realizados em soros de doadores do Hemocentro de Botucatu, como revela a tabela 31. Observou-se sensibilidade de 96,8%, especificidade de 100,0%, valor preditivo positivo de 100,0%, valor preditivo negativo de 97,0% e acurácia de 98,4%.

Tabela 31 - Reconhecimento da gp70 por ensaio de *immunoblotting*, realizado no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL - SP, com o antígeno Pb 113 do IAL, em soros pacientes com paracoccidioidomicose confirmada e em atividade, e em doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu.

		Pacientes	Controles	Total
<i>Immunoblotting</i>	Positivo	60	0	60
	Negativo	2	64	66
Total		62	64	126

Os parâmetros de acurácia do ensaio de *immunoblotting*, quando avaliado o reconhecimento da gp43 com a preparação antigênica do Pb B-339 do IAL, foram calculados em função dos testes realizados em soros de doadores do Hemocentro de Botucatu, como revela a tabela 32. Observou-se sensibilidade de 92,1%, especificidade de 11,5%, valor preditivo positivo de 51,8%, valor preditivo negativo de 58,3% e acurácia de 52,4%.

Tabela 32 - Reconhecimento da gp43 por ensaio de *immunoblotting*, realizado no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL - SP, com o antígeno Pb B-339 do IAL, em soros pacientes com paracoccidioidomicose confirmada e em atividade, e em doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu.

		Pacientes	Controles	Total
<i>Immunoblotting</i>	Positivo	58	54	112
	Negativo	5	7	12
Total		63	61	124

Os parâmetros de acurácia do ensaio de *immunoblotting*, quando avaliado o reconhecimento da gp70 com a preparação antigênica do Pb B-339 do IAL, foram calculados em função dos testes realizados em soros de doadores do Hemocentro de Botucatu, como revela a tabela 33. Observou-se sensibilidade de 0%, especificidade de 90,2%, valor preditivo positivo de 0%, valor preditivo negativo de 46,6% e acurácia de 44,3%.

Tabela 33 - Reconhecimento da gp70 por ensaio de *immunoblotting*, realizado no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL - SP, com o antígeno Pb B-339 do IAL, em soros pacientes com paracoccidiodomicose confirmada e em atividade, e em doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu.

		Pacientes	Controles	Total
<i>Immunoblotting</i>	Positivo	0	6	6
	Negativo	63	55	118
Total		63	61	124

Os resultados do estudo da acurácia do reconhecimento da gp43 e da gp70 no *immunoblotting* realizado com as preparações antigênicas Pb 113 e Pb B-339, se encontram na tabela 34.

Tabela 34 - Valores de acurácia do ensaio de *immunoblotting*, realizado com os antígenos Pb 113 e Pb B-339, em soros de doadores sangue de Botucatu.

Valores de Acurácia	Ag Pb 113		Ag Pb B-339	
	gp43	gp70	gp43	gp70
S	96,8% ± 4,4%	96,8% ± 4,4%	92,1% ± 6,7%	0%
E	50,0% ± 12,2%	100,0% ± 0%	11,5% ± 8,0%	90,2% ± 7,5%
VPP	65,2% ± 9,7%	100,0% ± 0%	51,8% ± 9,2%	0%
VPN	94,1% ± 7,9%	97,0% ± 4,1%	58,3% ± 27,9%	46,6% ± 9,0%
A	73,0% ± 7,7%	98,4% ± 2,2%	52,4% ± 8,8%	44,3% ± 8,7%

S: sensibilidade
E: especificidade

VPP: valor preditivo positivo
VPN: valor preditivo negativo

A: acurácia

9.2. Comparação global dos testes de acurácia do ensaio de *immunoblotting* realizado em soros de pacientes com paracoccidiodomicose em atividade e de doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu

A comparação dos testes de acurácia do ensaio de *immunoblotting* mostrou os maiores valores de sensibilidade quando o teste foi realizado com o antígeno Pb 113, e também a mais elevada especificidade no reconhecimento da gp70 com este mesmo antígeno, enquanto a menor sensibilidade ocorreu no reconhecimento da gp70 no ensaio preparado com o antígeno Pb B-339, como revela a tabela 34.

9.3. Comparação dos ensaios de *immunoblotting* entre si e com a reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizados em soros de doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu

O reconhecimento da gp43 sempre foi mais freqüente que o da gp70, independente das frações antigênicas utilizadas. O reconhecimento da mesma glicoproteína sempre foi mais freqüente com a preparação antigênica do Pb B-339 do que do Pb 113, como revela a tabela 35.

Tabela 35 - Comparação do ensaio de *immunoblotting*, realizado Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL - SP, com preparações antigênicas obtidas do Pb 113 e Pb B-339 do IAL, em soros de doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu.

Comparações	Nº de Pacientes	+ / +	- / -	+ / -	- / +	Nível de significância	Interpretação
IB1gp43 vs IB1gp70	64	0	32	32	0	p<0,00001	IB1gp43 > IB1gp70
IB1gp43 vs IB2gp43	61	28	5	2	26	p<0,00001	IB1gp43 < IB2gp43
IB1gp43 vs IB2gp70	61	4	29	26	2	p<0,00001	IB1gp43 > IB2gp70
IB1gp70 vs IB2gp43	61	0	7	0	54	p<0,00001	IB1gp70 < IB2gp43
IB1gp70 vs IB2gp70	61	0	55	0	6	p=0,014	IB1gp70 < IB2gp70
IB2gp43 vs IB2gp70	61	6	7	48	0	p<0,00001	IB2gp43 > IB2gp70

A seqüência de resultados segue a ordem apresentada na comparação.

* Por vezes os testes foram realizados em 61 soros devido ao volume da amostra estocada.

IB1gp43: reconhecimento da fração de 43 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb 113. Ensaio realizado no IAL.

IB1gp70: reconhecimento da fração de 70 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb 113. Ensaio realizado no IAL.

IB2gp43: reconhecimento da fração de 43 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb B-339. Ensaio realizado no IAL.

IB2gp70: reconhecimento da fração de 70 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb B-339. Ensaio realizado no IAL.

Interpretação: IB2gp43 > IB1gp43 > IB2gp70 > IB1gp70

O reconhecimento da gp70 pelo ensaio de *immunoblotting*, com a preparação antigênica obtida do Pb 113, não mostrou vantagem sobre a reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, como revela a tabela 36.

Tabela 36 - Comparação da reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, realizada no Laboratório Experimental de Pesquisa de Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP e no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL - SP, com o ensaio de *immunoblotting* realizado no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL - SP, com preparação antigênica obtida do Pb 113 do IAL, em 64 soros de doadores de sangue do Hemocentro da FMB - UNESP.

Comparações	Nº de Pacientes	+ / +	- / -	+ / -	- / +	Nível de significância	Interpretação
IB1gp70 vs IDDr-FMB	64	0	64	0	0	coincidentes	IB1gp70 = IDDr-FMB
IB1gp70 vs IDD1-IAL	64	0	64	0	0	coincidentes	IB1gp70 = IDD1-IAL
IB1gp70 vs IDD2-IAL	64	0	64	0	0	coincidentes	IB1gp70 = IDD2-IAL

A seqüência de resultados segue a ordem apresentada na comparação.

IDDr-FMB: reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada com antígeno Pb 113 preparado em Araraquara. Técnica feita no Laboratório Experimental de Pesquisa de Doenças Tropicais da FMB - UNESP.

IDD1-IAL: reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada com antígeno Pb 113 preparado no IAL. Técnica feita no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL - SP.

IDD2-IAL: reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada com antígeno Pb B-339 preparado no IAL. Técnica feita no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL - SP.

IB1gp43: reconhecimento da fração de 43 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb 113. Ensaio realizado no IAL.

IB1gp70: reconhecimento da fração de 70 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb 113. Ensaio realizado no IAL.

IB2gp43: reconhecimento da fração de 43 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb B-339. Ensaio realizado no IAL.

IB2gp70: reconhecimento da fração de 70 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb B-339. Ensaio realizado no IAL.

Interpretação: IB1gp70 = IDDr-FMB = IDD1-IAL = IDD2-IAL

9.4. Avaliação dos testes de acurácia do ensaio de *immunoblotting* realizado em soros de pacientes com paracoccidiodomicose em atividade e de doadores do Banco de Sangue da Sociedade Portuguesa de Beneficência de Santos

Os parâmetros de acurácia do ensaio de *immunoblotting*, quando avaliado o reconhecimento da gp43 com a preparação antigênica do Pb 113 do IAL, foram calculados em função dos testes realizados em soros de doadores do Banco de Sangue da Sociedade Portuguesa de Beneficência de Santos, como revela a tabela 37. Observou-se sensibilidade de 96,8%, especificidade de 60%, valor preditivo positivo de 71,4%, valor preditivo negativo de 94,7% e acurácia de 78,7%.

Tabela 37 - Reconhecimento da gp43 por ensaio de *immunoblotting*, realizado no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL - SP, com a preparação antigênica do Pb 113 do IAL, em soros pacientes com paracoccidiodomicose confirmada e em atividade, e em doadores de sangue do Banco de Sangue da Sociedade Portuguesa de Beneficência de Santos.

		Pacientes	Controles	Total
<i>Immunoblotting</i>	Positivo	60	24	84
	Negativo	2	36	38
Total		62	60	122

Os parâmetros de acurácia do ensaio de *immunoblotting*, quando avaliado o reconhecimento da gp70 com a preparação antigênica do Pb 113 do IAL, foram calculados em função dos testes realizados em soros de doadores do Banco de Sangue da Sociedade Portuguesa de Beneficência de Santos, como revela a tabela 38. Observou-se sensibilidade de 96,8%, especificidade de 100,0%, valor preditivo positivo de 100,0%, valor preditivo negativo de 96,8% e acurácia de 98,4%.

Tabela 38 - Reconhecimento da gp70 por ensaio de *immunoblotting*, realizado no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL - SP, com a preparação antigênica do Pb 113 do IAL, em soros pacientes com paracoccidiodomicose confirmada e em atividade, e em doadores de sangue do Banco de Sangue da Sociedade Portuguesa de Beneficência de Santos.

		Pacientes	Controles	Total
<i>Immunoblotting</i>	Positivo	60	0	60
	Negativo	2	60	62
Total		62	60	122

Os parâmetros de acurácia do ensaio de *immunoblotting*, quando avaliado o reconhecimento da gp43 com a preparação antigênica do Pb B-339 do IAL, foram calculados em função dos testes realizados em soros de doadores do Banco de Sangue da Sociedade Portuguesa de Beneficência de Santos, como revela a tabela 39. Observou-se sensibilidade de 92,1%, especificidade de 40,0%, valor preditivo positivo de 61,7%, valor preditivo negativo de 82,8% e acurácia de 66,7%.

Tabela 39 - Reconhecimento da gp43 por ensaio de *immunoblotting*, realizado no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL - SP, com a preparação antigênica do Pb B-339 do IAL, em soros pacientes com paracoccidiodomicose confirmada e em atividade, e em doadores de sangue do Banco de Sangue da Sociedade Portuguesa de Beneficência de Santos.

		Pacientes	Controles	Total
<i>Immunoblotting</i>	Positivo	58	36	94
	Negativo	5	24	29
Total		63	60	123

Os parâmetros de acurácia do ensaio de *immunoblotting*, quando avaliado o reconhecimento da gp70 com a preparação antigênica do Pb B-339 do IAL, foram calculados em função dos testes realizados em soros de doadores do Banco de Sangue da Sociedade Portuguesa de Beneficência de Santos, como revela a tabela 40. Observou-se sensibilidade de 0%, especificidade de 100,0%, valor preditivo positivo de 0%, valor preditivo negativo de 48,8% e acurácia de 48,8%.

Tabela 40 - Reconhecimento da gp70 por ensaio de *immunoblotting*, realizado no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL - SP, com a preparação antigênica do Pb B-339 do IAL, em soros pacientes com paracoccidiodomicose confirmada e em atividade, e em doadores de sangue do Banco de Sangue da Sociedade Portuguesa de Beneficência de Santos.

		Pacientes	Controles	Total
<i>Immunoblotting</i>	Positivo	0	0	0
	Negativo	63	60	123
Total		63	60	123

Os resultados do estudo da acurácia do reconhecimento da gp43 e da gp70 no *immunoblotting* realizado com as preparações antigênicas Pb 113 e Pb B-339, se encontram na tabela 41.

Tabela 41 - Valores de acurácia do ensaio de *immunoblotting*, realizado com os antígenos Pb 113 e Pb B-339, em soros de doadores sangue de Santos

Valores de Acurácia	Ag Pb 113		Ag Pb B-339	
	gp43	gp70	gp43	gp70
S	96,8% ± 4,4%	96,8% ± 4,4%	92,1% ± 6,7%	0%
E	60,0% ± 12,4%	100,0% ± 0%	40,0% ± 12,4%	100,0% ± 0%
VPP	71,4% ± 9,7%	100,0% ± 0%	61,7% ± 9,8%	0%
VPN	94,7% ± 7,1%	96,8% ± 4,4%	82,8% ± 13,7%	48,8% ± 8,8%
A	78,7% ± 7,3%	98,4% ± 2,2%	66,7% ± 8,3%	48,8% ± 8,8%

S: sensibilidade
E: especificidade

VPP: valor preditivo positivo
VPN: valor preditivo negativo

A: acurácia

9.5. Comparação global dos testes de acurácia do ensaio de *immunoblotting* realizado em soros de pacientes com paracoccidiodomicose em atividade e de doadores de sangue do Banco de Sangue da Sociedade Portuguesa de Beneficência de Santos

A comparação dos testes de acurácia do ensaio de *immunoblotting* mostrou os maiores valores de sensibilidade quando o teste foi realizado com o antígeno Pb 113, e também a mais elevada especificidade no reconhecimento da gp70 com este mesmo antígeno, enquanto a menor sensibilidade ocorreu no reconhecimento da gp70 no ensaio preparado com o antígeno Pb B-339, como revela a tabela 41.

9.6. Comparação dos ensaios de *immunoblotting* entre si e com a reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizados em soros de doadores de sangue do Banco de Sangue da Sociedade Portuguesa de Beneficência de Santos - 60 indivíduos nativos

O reconhecimento da gp43 sempre foi mais freqüente que o da gp70, independente das frações antigênicas utilizadas. No reconhecimento da gp43, a preparação antigênica do Pb B-339 foi mais freqüente que a do Pb 113. O reconhecimento da gp70 não diferiu, independente da fração antigênica utilizada, como revela a tabela 42.

Tabela 42 - Comparação do ensaio de *immunoblotting*, realizado Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL - SP, com preparações antigênicas obtidas do Pb 113 e Pb B-339 do IAL, em 60 soros de doadores de sangue do Banco de Sangue da Sociedade Portuguesa de Beneficência de Santos. (Doadores nativos)

Comparações	Nº de Pacientes	+ / +	- / -	+ / -	- / +	Nível de significância	Interpretação
IB1gp43 vs IB1gp70	60	0	36	24	0	p<0,00001	IB1gp43 > IB1gp70
IB1gp43 vs IB2gp43	60	20	20	4	16	p=0,0073	IB1gp43 < IB2gp43
IB1gp43 vs IB2gp70	60	0	36	24	0	p<0,00001	IB1gp43 > IB2gp70
IB1gp70 vs IB2gp43	60	0	24	0	36	p<0,00001	IB1gp70 < IB2gp43
IB1gp70 vs IB2gp70	60	0	60	0	0	coincidentes	IB1gp70 = IB2gp70
IB2gp43 vs IB2gp70	60	0	24	36	0	p<0,00001	IB2gp43 > IB2gp70

A seqüência de resultados segue a ordem apresentada na comparação.

IB1gp43: reconhecimento da fração de 43 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb 113. Ensaio realizado no IAL.

IB1gp70: reconhecimento da fração de 70 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb 113. Ensaio realizado no IAL.

IB2gp43: reconhecimento da fração de 43 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb B-339. Ensaio realizado no IAL.

IB2gp70: reconhecimento da fração de 70 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb B-339. Ensaio realizado no IAL.

Interpretação: IB2gp43 > IB1gp43 > (IB1gp70 = IB2gp70)

O reconhecimento da gp70 pelo ensaio de *immunoblotting*, com as preparações antigênicas obtidas do Pb 113 e do Pb B-339, não mostrou vantagem sobre a reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, como revela a tabela 43.

Tabela 43 - Comparação da reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, realizada no Laboratório Experimental de Pesquisa de Doenças Tropicais da FMB - UNESP e no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL - SP, com o ensaio de *immunoblotting* realizado no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL - SP, com preparação antigênica obtida do Pb 113 do IAL, em 60 soros de doadores de sangue do Banco de Sangue da Sociedade Portuguesa de Beneficência de Santos. **(Doadores nativos)**

Comparações	Nº de Pacientes	+ / +	- / -	+ / -	- / +	Nível de significância	Interpretação
IB1gp70 vs IDDr-FMB	60	0	60	0	0	coincidentes	IB1gp70 = IDDr-FMB
IB1gp70 vs IDD1-IAL	60	0	60	0	0	coincidentes	IB1gp70 = IDD1-IAL
IB1gp70 vs IDD2-IAL	60	0	60	0	0	coincidentes	IB1gp70 = IDD2-IAL

A seqüência de resultados segue a ordem apresentada na comparação.

IDDr-FMB: reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada com antígeno Pb 113 preparado em Araraquara. Técnica feita no Laboratório Experimental de Pesquisa de Doenças Tropicais da FMB - UNESP.

IDD1-IAL: reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada com antígeno Pb 113 preparado no IAL. Técnica feita no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL - SP.

IDD2-IAL: reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada com antígeno Pb B-339 preparado no IAL. Técnica feita no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL - SP.

IB1gp43: reconhecimento da fração de 43 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb 113. Ensaio realizado no IAL.

IB1gp70: reconhecimento da fração de 70 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb 113. Ensaio realizado no IAL.

IB2gp43: reconhecimento da fração de 43 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb B-339. Ensaio realizado no IAL.

IB2gp70: reconhecimento da fração de 70 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb B-339. Ensaio realizado no IAL.

Interpretação: IB1gp70 = IB2gp70 = IDDr-FMB = IDD1-IAL = IDD2-IAL

9.7. Comparação dos ensaios de *immunoblotting* entre si e com a reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizados em soros de doadores de sangue do Banco de Sangue da Sociedade Portuguesa de Beneficência de Santos - 14 indivíduos nativos

O reconhecimento da gp43 sempre foi mais freqüente que o da gp70, independente das frações antigênicas utilizadas. O reconhecimento da gp43 não apresentou diferença, independente da preparação antigênica utilizada. O reconhecimento da gp70 também não diferiu, independente da fração antigênica utilizada, como revela a tabela 44.

Tabela 44 - Comparação do ensaio de *immunoblotting*, realizado Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL - SP, com preparações antigênicas obtidas do Pb 113 e Pb B-339 do IAL, em 14 soros de doadores de sangue do Banco de Sangue da Sociedade Portuguesa de Beneficência de Santos. **(Doadores não nativos)**

Comparações	Nº de Pacientes	+ / +	- / -	+ / -	- / +	Nível de significância	Interpretação
IB1gp43 vs IB1gp70	14	0	8	6	0	p=0,014	IB1gp43 > IB1gp70
IB1gp43 vs IB2gp43	14	6	7	0	1	p>0,05	IB1gp43 = IB2gp43
IB1gp43 vs IB2gp70	14	0	8	6	0	p=0,014	IB1gp43 > IB2gp70
IB1gp70 vs IB2gp43	14	0	7	0	7	p=0,0008	IB1gp70 < IB2gp43
IB1gp70 vs IB2gp70	14	0	14	0	0	coincidentes	IB1gp70 = IB2gp70
IB2gp43 vs IB2gp70	14	0	7	7	0	p=0,0008	IB2gp43 > IB2gp70

A seqüência de resultados segue a ordem apresentada na comparação.

IB1gp43: reconhecimento da fração de 43 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb 113. Ensaio realizado no IAL.

IB1gp70: reconhecimento da fração de 70 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb 113. Ensaio realizado no IAL.

IB2gp43: reconhecimento da fração de 43 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb B-339. Ensaio realizado no IAL.

IB2gp70: reconhecimento da fração de 70 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb B-339. Ensaio realizado no IAL.

Interpretação: (IB1gp43 = IB2gp43) > (IB1gp70 = IB2gp70)

O reconhecimento da gp70 pelo ensaio de *immunoblotting*, com as preparações antigênicas obtidas do Pb 113 e do Pb B-339, não mostrou vantagem sobre a reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, como revela a tabela 45.

Tabela 45 - Comparação da reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, realizada no Laboratório Experimental de Pesquisa de Doenças Tropicais da FMB - UNESP e no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL - SP, com o ensaio de *immunoblotting* realizado no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL - SP, com preparação antigênica obtida do Pb 113 do IAL, em 14 soros de doadores de sangue do Banco de Sangue da Sociedade Portuguesa de Beneficência de Santos. **(Doadores não nativos)**

Comparações	Nº de Pacientes	+ / +	- / -	+ / -	- / +	Nível de significância	Interpretação
IB1gp70 vs IDDr-FMB	14	0	14	0	0	coincidentes	IB1gp70 = IDDr-FMB
IB1gp70 vs IDD1-IAL	14	0	14	0	0	coincidentes	IB1gp70 = IDD1-IAL
IB1gp70 vs IDD2-IAL	14	0	14	0	0	coincidentes	IB1gp70 = IDD2-IAL

A seqüência de resultados segue a ordem apresentada na comparação.

IDDr-FMB: reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada com antígeno Pb 113 preparado em Araraquara. Técnica feita no Laboratório Experimental de Pesquisa de Doenças Tropicais da FMB - UNESP.

IDD1-IAL: reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada com antígeno Pb 113 preparado no IAL. Técnica feita no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL - SP.

IDD2-IAL: reação de imunodifusão dupla em gel de ágar realizada com antígeno Pb B-339 preparado no IAL. Técnica feita no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL - SP.

IB1gp43: reconhecimento da fração de 43 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb 113. Ensaio realizado no IAL.

IB1gp70: reconhecimento da fração de 70 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb 113. Ensaio realizado no IAL.

IB2gp43: reconhecimento da fração de 43 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb B-339. Ensaio realizado no IAL.

IB2gp70: reconhecimento da fração de 70 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb B-339. Ensaio realizado no IAL.

Interpretação: IB1gp70 = IB2gp70 = IDDr-FMB = IDD1-IAL = IDD2-IAL

9.7. Comparação do *immunoblotting* realizado em soros de doadores de Botucatu e Santos

O reconhecimento de glicoproteínas pelo soro de três grupos de doadores de sangue revelou diferença apenas quando se avaliou gp43 proveniente do Pb B-339. A positividade foi maior no soro de doadores de Botucatu (88,5%) do que nos grupos de Santos, que não diferiram entre si, como revela a tabela 46.

Tabela 46 - Comparação do ensaio de *immunoblotting* realizado no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do IAL - SP, com preparações antigênicas obtidas do Pb 113 e Pb B-339 do IAL, em soros de doadores do Hemocentro de Botucatu e do Banco de Sangue da Sociedade Portuguesa de Beneficência de Santos.

<i>Immunoblotting</i>	BOTUCATU	SANTOS	SANTOS	Nível de significância
	n=64	n=60 nativos	n=14 não nativos	
	% de positivos	% de positivos	% de positivos	
IB1gp43	50,0	40,0	42,8	p>0,05
IB2gp43	88,5 a	60,0 b	50,0 b	p<0,05
IB1gp70	0	0	0	p>0,05
IB2gp70	9,8	0	0	p>0,05

Porcentagens seguidas por letras iguais não diferem entre si, e seguidas por letras diferentes diferem entre si.

IB1gp43: reconhecimento da fração de 43 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb 113. Ensaio realizado no IAL.

IB1gp70: reconhecimento da fração de 70 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb 113. Ensaio realizado no IAL.

IB2gp43: reconhecimento da fração de 43 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb B-339. Ensaio realizado no IAL.

IB2gp70: reconhecimento da fração de 70 kDa, por ensaio de *immunoblotting*, preparado com antígeno Pb B-339. Ensaio realizado no IAL.

A figura 16 [anexo 5] demonstra ensaio de *immunoblotting*, no qual observa-se reconhecimento da gp43 e gp70, realizado em soros de pacientes com PCM em atividade.

Capítulo IV - Discussão

A identificação de exames laboratoriais adequados para confirmação da hipótese clínica é importante em serviços de rotina para pacientes com paracoccidiodomicose e foi o objetivo deste estudo.

Assim como no presente trabalho, em vários estudos se fez o levantamento dos dados de pacientes com paracoccidiodomicose, em Serviços de determinadas regiões. A revisão da literatura permitiu a seleção de cinco trabalhos em que os autores relataram dados clínicos e diagnósticos de no mínimo 200 pacientes, em diferentes regiões do país.^{69,72,73,75,76}

Dos 401 prontuários clínicos de pacientes com paracoccidiodomicose analisados no presente estudo, foi observada uma freqüência de 87,8% de indivíduos do sexo masculino com razão de masculinidade de 7,2:1, resultado que confirma o relatado por alguns autores, com razão de 5,4:1, 10,0:1 e 10,2:1,^{72,73,76} mas que foi menor do que em outros dois trabalhos, com razão de 22,8:1 e 16,0:1,^{69,75}. A diferença observada em relação ao trabalho de Miranda & Machado Filho⁶⁹ pode ter sido devida ao local de realização da pesquisa, pois dos três hospitais escolhidos pelos autores, dois só tinham disponibilidade de leitos para homens adultos.

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.^{22,23}

Acredita-se também que o elevado número de pacientes do sexo masculino se deva ao predomínio de homens no trabalho da lavoura, agricultura, enquanto as mulheres em geral executam trabalhos domésticos e, portanto, têm menor exposição ao nicho ecológico do fungo do que os homens.

Dentre as formas clínicas, a predominante entre os pacientes do presente estudo foi a crônica, com 76,6% dos casos, achado que concorda com os 80,0% relatados por Blotta et al.⁷², mas apresentou-se menor que os 100,0% e 84,6% observados por Londero & Ramos⁷⁵ e Paniago et al.⁷³ respectivamente. Os achados de Londero & Ramos⁷⁵ talvez se devam ao predomínio de doentes entre 50 e 59 anos de idade, faixa etária em que predomina a forma crônica. Os trabalhos de Miranda & Machado Filho⁶⁹ e

Almeida et al.⁷⁶ não referiram a forma clínica de seus pacientes, o que não permitiu a comparação dos resultados.

Dos 307 pacientes com a forma crônica estudados, 95,8% eram do sexo masculino, porcentagem semelhante à observada por Paniago et al.⁷³ (93,8%), mas um pouco maior que a revelada por Blotta et al.⁷² (88,6%). Na forma aguda/subaguda, 61,7% dos doentes eram do sexo masculino e 38,3% do feminino, proporção que não diferiu da relatada em outros dois trabalhos.^{72,73}

A mediana da idade dos pacientes foi igual de 43 anos. A distribuição da faixa etária dos pacientes deste estudo foi comparada à dos pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da FMB - UNESP no mesmo período, 1974 - 2008, e de acordo com as mesmas faixas etárias. Observou-se que cerca de dois terços dos pacientes do presente trabalho se encontram entre 30 e 59 anos de idade, o que demonstra que a PCM compromete indivíduos em sua fase mais produtiva, e que a proporção de doentes na faixa etária entre os 40 e os 59 anos é maior entre os com PCM.

No presente estudo, em 86,0% dos casos a doença foi confirmada pela identificação de estruturas típicas da fase leveduriforme do *P. brasiliensis* em materiais clínicos, achado semelhante ao de outros estudos^{69,72,73}. No entanto, Londero & Ramos⁷⁵ registraram a dificuldade da confirmação diagnóstica por meio de técnicas micológicas, enquanto Almeida et al.⁷⁶ não relataram como foi confirmada a PCM.

A doença foi considerada provável em 14% dos pacientes estudados, porcentagem um pouco menor que o observado por Blotta et al.⁷² (20,0%).

O exame micológico direto foi realizado em amostras de secreção de linfonodos, mucosa das vias aerodigestivas superiores, fragmento de pele, líquido pleural, líquido ascítico, lavado bronco-alveolar e escarro. O escarro foi analisado separadamente dos outros espécimes clínicos. O exame a fresco dos diferentes materiais clínicos, exceto escarro, revelou sensibilidade igual a 74,5% no presente estudo, em concordância com os 70,1% observados

por Blotta et al.⁷², que realizaram o exame em fragmento de lesão cutânea, material de linfonodos e escarro.

Miranda & Machado Filho⁶⁹ realizaram exame a fresco em material de linfonodo, fragmento de lesão e escarro registrando sensibilidade de 100,0% em material de linfonodo, de 98,5% em fragmentos de lesão e de 62,0% em escarro.

Paniago et al.⁷³ realizaram exame micológico direto em raspado de lesão, aspirado de linfonodo, lavado brônquico e fragmentos de tecido obtidos por biópsia, com sensibilidade de 71,2%, 97,2%, 21,4% e 45,5% respectivamente.

Almeida et al.⁷⁶ não relataram os materiais nem os métodos utilizados no diagnóstico, o que não permite comparação com o presente estudo. Londero & Ramos⁷⁵ afirmaram terem realizado exame micológico para diagnóstico da PCM, mas não registraram quais amostras foram utilizadas e nem a proporção de exames positivos em cada uma delas.

No diagnóstico da PCM, quando há lesão acessível - cutânea, mucosa ou linfonodo superficial - o exame micológico direto de material obtido das lesões deve ser o preferido para pesquisa do agente etiológico, por sua simplicidade e acurácia.⁷³

A sensibilidade do exame micológico realizado em escarro, no presente estudo, foi igual a 62,5%, que não difere dos 62,2% observados por Miranda & Machado Filho⁶⁹, mas é maior que os 43,4% relatados por Paniago et al.⁷³

Miranda & Machado Filho⁶⁹ sugeriram que essa baixa positividade do exame tenha sido devida ao tratamento com sulfa, ao qual 23 dos 164 pacientes já estavam submetidos.

No exame direto de escarro de 19 pacientes com paracoccidiodomicose em atividade, Lopes³⁷ obteve uma positividade de 63,4% que se elevou a 100,0% após realização da técnica de concentração do escarro. O autor destacou a importância do método por ele utilizado, mas referiu que o pequeno número de pacientes estudados não possibilitou conclusões mais seguras.

Das 112 amostras de escarro avaliadas por exame micológico direto no presente estudo, 15 foram coletadas de pacientes com a forma aguda/subaguda da doença e 97 de pacientes com a crônica. Apesar do diferente número de exames realizados em cada forma clínica, a sensibilidade desse método foi de 61,9 e 66,7%, proporções que não diferem entre si.

O número de amostras de escarro examinadas variou de um paciente para outro, de um a cinco, com positividade de 50,7% na primeira, 25,0% na segunda e 29,4% na terceira, freqüências que não diferiram entre si.

A análise de amostras seqüenciais, realizada em dias consecutivos, revelou que a avaliação de uma segunda ou terceira amostra não aumentou a sensibilidade do exame. Este achado sugere que se aguarde o resultado do primeiro exame para que se envie nova amostra ao laboratório, de forma a não congestioná-lo e a reduzir os custos do atendimento de cada paciente.

Miranda & Machado Filho⁶⁹ referiram que a sensibilidade do exame de escarro aumentava substancialmente quando realizado em três dias consecutivos, mas não demonstraram esse dado. Londero & Ramos⁷⁵ também afirmaram terem realizado a repetição do exame direto de escarro em dias consecutivos, mas não relataram o número de amostras avaliadas por paciente.

Não foram encontrados outros trabalhos com o mesmo enfoque para comparação com os do presente estudo.

De um total de 524 amostras de escarro coletadas para o exame citopatológico, apenas 7,3% foram inadequadas, o que demonstra o bom trabalho da equipe de enfermagem, responsável pela coleta do material, e que foi pequeno o adicional de custos pelo processamento dessas amostras.

A sensibilidade do exame citopatológico, analisado em 486 amostras de escarro, foi igual a 42,5% em pacientes com a forma aguda/subaguda e 56,0% nos com a forma crônica, freqüências que não diferiram entre si. Iwama de Mattos et al.⁴² estudaram 50 pacientes, 49 dos quais apresentavam a forma crônica, registrando uma sensibilidade muito maior deste método, igual a 81,0%. No entanto, essa casuística foi avaliada

durante um período relativamente curto e a avaliação de cada exame citopatológico foi feita pela autora principal do trabalho.

O número de amostras de escarro examinadas no presente estudo variou de um paciente para outro, de um a 11, com positividade de 58,2% na primeira, 53,3% na segunda e 52,3% na terceira, as quais não diferiram entre si.

A análise de amostras seqüenciais, realizada em dias consecutivos, revelou que a avaliação de mais de uma ou duas amostras por paciente não aumentou a sensibilidade do exame. Estes achados também sugerem que só se envie nova amostra ao laboratório em caso de resultado prévio negativo, para não sobrecarregá-lo e para evitar despesas desnecessárias.

Em seu estudo, Iwama de Mattos et al.⁴² observaram que esfregaço e citoinclusão corados pela prata apresentavam sensibilidades comparáveis, iguais a 83,0 e 81,0% respectivamente. Os autores coletaram no máximo três amostras de escarro por paciente, em dias consecutivos e observaram que não houve diferença na sensibilidade quando analisada a porcentagem cumulativa de positividade de duas ou três amostras seriadas de escarro, achado que concorda com os resultados obtidos no presente estudo.

A citoinclusão de escarro tem a vantagem de permitir o estudo de diferentes cortes do bloco de parafina, os quais podem ser submetidos a colorações específicas para identificação de fungos (Gomori)⁴¹, células neoplásicas (Shorr) e *Mycobacterium tuberculosis* (Ziehl-Neelsen). Portanto essa técnica permite, a partir de um mesmo bloco de inclusão, estudo do diagnóstico diferencial entre paracoccidioidomicose, tuberculose e neoplasia, doenças que se constituem em diagnósticos diferenciais e, ou, que podem estar associadas.⁴²

O exame citopatológico também foi realizado em material obtido de linfonodos fistulizados, em dois casos, ou por punção aspirativa com agulha fina, em 60 casos. A sensibilidade do método em material de linfonodos fistulizados foi igual a 100,0%, e quando obtido por PAAF, foi igual a 91,5%.

Gerhard & Basso⁸⁸ relataram três casos de paracoccidiodomicose diagnosticados em material obtido por PAAF, em linfonodos cervicais e sugerem que os poucos casos publicados utilizando-se esta metodologia seja devido às limitações de indicação do procedimento por médicos.⁸⁸

O raspado de lesão de pele foi coletado de apenas um paciente para realização de exame citopatológico, o qual resultou positivo. Por ter sido realizado em apenas uma amostra, não se pode tirar conclusões em relação à sensibilidade desse método.

O exame citopatológico de lavado bronco-alveolar foi realizado em 10 pacientes. De nove deles foi coletada uma única amostra e três resultaram positivas, e de um paciente foram avaliadas duas amostras, mas apenas a primeira foi positiva. A sensibilidade desse método foi igual a 36,4%. Não se identificou outro trabalho com exame citopatológico de lavado bronco-alveolar para comparação de resultados. A baixa sensibilidade deste método talvez possa ser explicada pela diluição do material alveolar, já escasso nos casos em que o lavado bronco-alveolar foi indicado, na solução fisiológica injetada durante o procedimento.

No exame histopatológico foi avaliado um espécime clínico coletado de cada um dos 242 pacientes estudados. Desses pacientes, 62 apresentavam a forma aguda/subaguda da PCM, nos quais a sensibilidade do exame foi de 93,5%, e 180 pacientes a forma crônica, 97,8% dos quais revelaram exames positivos, freqüências que não diferiram entre si.

O exame histopatológico avaliado no presente estudo, em diferentes espécimes clínicos, revelou 96,7% de sensibilidade, que está de acordo com os achados de Miranda & Machado Filho⁶⁹ (98,8%), de Paniago et al.⁷³ (97,4%), mas foi maior que os de Blotta et al.⁷² (76,5%).

No presente estudo o exame histopatológico foi realizado em diferentes materiais clínicos, cujas sensibilidades não diferiram entre si: linfonodos (100,0%), pele (97,1%), vias aerodigestivas superiores (99,2%), tubo digestório (85,7%) e vias aéreas baixas (91,7%). A medula óssea foi o material que apresentou a menor positividade, igual a 77,8%. O exame histopatológico de cérebro, mama, vesícula biliar, osso e baço, foi feito em pequeno número de espécimes, o que não permite a avaliação da sensibilidade.

Miranda & Machado Filho⁶⁹ realizaram exame histopatológico de espécimes de lesão de mucosa oral (constituindo a maioria), amígdala, narina, ânus, glote, corda vocal, traquéia, brônquio e pulmões, laringe, pele, linfonodos superficiais e profundos (mesentéricos), mas não informaram a positividade do exame em cada espécime, o que não possibilitou a comparação com o presente estudo.

Os estudos de Blotta et al.⁷², Londero & Ramos⁷⁵, Almeida et al.⁷⁶ e Paniago et al.⁷³ não permitem que se avalie a sensibilidade do exame histopatológico no diagnóstico da PCM e a comparações com os achados do presente estudo.

Blotta et al.⁷² realizaram o exame histopatológico em tecidos obtidos por biópsias tegumentar, ganglionar e pulmonar, mas também não registraram a sensibilidade do exame para cada espécime. Londero & Ramos⁷⁵ afirmaram terem realizado técnicas micológicas de rotina no diagnóstico da PCM e, inclusive, registraram a importância da coloração de Gomori em cortes histopatológicos para identificação do fungo, mas não relataram quais amostras foram utilizadas na realização desse exame. Almeida et al.⁷⁶ não relataram os materiais nem os métodos utilizados no diagnóstico da PCM, o que impede comparação com o presente estudo. Paniago et al.⁷³ realizaram este exame em 302 pacientes com PCM e obtiveram sensibilidade de 97,4%, mas não relataram os espécimes clínicos utilizados. No entanto, a avaliação da sensibilidade do exame histopatológico, no conjunto de espécimes clínicos avaliados, não difere do que se observou em nosso estudo.

Nos casos suspeitos de PCM em que for realizado exame histopatológico, é recomendável que, além do material a ser enviado ao patologista e que habitualmente é colocado em formol a 10,0%, um outro fragmento seja colocado em solução fisiológica para que seja submetido a

exame micológico e cultura⁶⁹. Devido à sua simplicidade e eficácia, exame micológico direto e cultivo de tecidos biopsiados sempre deverão ser executados.

O cultivo de materiais clínicos provenientes de pacientes para identificação de *P. brasiliensis* costuma demorar mais de um mês, tempo muito superior ao exigido pelos exames micológico direto, citopatológico, histopatológico e sorológico, motivo pelo qual pode não ser útil no diagnóstico. No entanto, são de vital importância para o estudo de diferentes regiões endêmicas.

A imunodifusão dupla em gel de ágar, exame sorológico realizado no diagnóstico dos pacientes com PCM, apresentou sensibilidade igual a 90,0% no presente estudo, resultado que concorda com os 92,3% observados por Restrepo et al.⁷⁰ e com os 90,2% relatados por Valle et al.⁷⁴, mas se mostrou maior que os 80,0% observados por Blotta et al.⁷², os 77,0% observados por Paniago et al.⁷³, e os 80,8% observados por Campos et al.⁹⁰

Os demais parâmetros de acurácia, avaliados no presente estudo e calculados em função de testes realizados em 200 doadores de sangue, revelaram especificidade de 100,0%, valor preditivo positivo de 100,0%, valor preditivo negativo de 85% e acurácia de 94,0%.

Restrepo⁴⁹ observou valores de acurácia muito semelhantes aos do presente estudo: sensibilidade igual a 88,9%, especificidade igual a 100,0%, valor preditivo positivo igual a 100,0% e acurácia igual a 97,0%. Apenas o valor preditivo negativo mostrou-se um pouco maior que do presente estudo, revelando-se igual a 96,0%, que poderia ser explicado devido ao pequeno número de pacientes estudados, apenas 18 pacientes com PCM, entre 15 dias e oito meses de evolução.

Cano & Restrepo⁸⁹ estudaram a reação de imunodifusão em 43 pacientes com PCM e observaram sensibilidade igual a 91,3% e especificidade igual a 100%, valores estes que mostraram concordância com os do presente estudo.

O presente estudo mostrou concordância também com os dados de Del Negro et al.⁵⁸, que avaliaram 46 pacientes com PCM e

observaram 91,3% de sensibilidade, 100,0% de especificidade, 100,0% de valor preditivo positivo, 92,1% de valor preditivo negativo e 95,7% de acurácia.

Diferenças na sensibilidade da reação de imunodifusão entre os diversos trabalhos podem ocorrer devido às preparações antigênicas utilizadas, condição clínica do paciente, tempo decorrido desde a infecção e tratamento.⁵⁵

Silva⁵² sugeriu que especificidade e sensibilidade da técnica de imunodifusão estão intimamente relacionadas com o tipo de preparação antigênica empregada.

No presente estudo, 10,0% dos pacientes apresentaram reação de imunodifusão negativa, com PCM confirmada pela visualização de estruturas reprodutivas da fase leveduriforme. Algumas explicações foram propostas para justificar esses resultados falso-negativos. A primeira hipótese é que a preparação antigênica utilizada no teste seria diferente da que apresenta o *P. brasiliensis* causador da doença, ou seja, o paciente pode estar infectado com uma cepa diferente da usada na realização da reação de imunodifusão. A diversidade genotípica de *P. brasiliensis* de onde se extraiu o antígeno de *P. brasiliensis* apóia esta idéia⁹⁴. Outra explicação seria que o excesso de antígeno no organismo do paciente utilizaria os anticorpos existentes para formação de imunocomplexos, assim, faltariam anticorpos para positivar a reação. Após um período de tratamento, a quantidade de antígenos diminuiria, havendo anticorpos livres e positividade da reação (observação pessoal). Outra hipótese foi sugerida por Camargo⁵⁹ que relatou resultados falso-negativos em 2,0 a 3,0% dos pacientes na reação de imunodifusão, e sugere que a depressão do sistema imune seja responsável por esse achado. Após um a dois meses de tratamento a imunidade seria restabelecida e a reação de imunodifusão passaria a ser positiva.

Por outro lado, há autores que sugerem que a baixa avidéz da IgG2, dirigida a epítomos constituídos por carboidratos, seria responsável pelos resultados falso-negativos.⁹⁵

O diagnóstico sorológico desses casos poderia ser possível com o uso de preparações antigênicas obtidas de diferentes cepas de *P. brasiliensis* e pela utilização de novas técnicas imunológicas.⁷²

Dos 351 pacientes que realizaram a reação de imunodifusão no presente estudo, 23,4% apresentavam a forma aguda/subaguda e 76,6% a crônica.

A maioria dos pacientes com a forma aguda/subaguda (84,4%) apresentou nível elevado de anticorpos na diluição da reação de imunodifusão, dado que concorda com o observado por Paniago et al.⁷³.

Os pacientes com a forma crônica apresentaram níveis baixos de anticorpos na reação de imunodifusão em 23,4% dos casos, níveis moderados em 31,8% e níveis elevados em 44,8%, frequências que praticamente não apresentaram diferença entre si, mas não concordou com o observado por Paniago et al.⁷³, que demonstraram os títulos mais baixos nos pacientes com a forma crônica, com mediana igual a 1/4. Isso poderia ser devido ao fato de que os autores não demonstraram quais foram as diluições consideradas como baixa, moderada e elevada.

A comparação da sensibilidade das quatro técnicas utilizadas no diagnóstico da PCM foi realizada duas a duas, observando-se que o exame histopatológico obteve maior positividade que o teste sorológico que, por sua vez, foi maior que o exame citopatológico e o micológico direto, que não diferiram entre si.

Miranda & Machado Filho⁶⁹ realizaram apenas o exame micológico direto e o histopatológico, cujas sensibilidades eram iguais a 98,8% e 79,9%, respectivamente. Esses achados foram confirmados pelo presente estudo.

Blotta et al.⁷² avaliaram os testes diagnósticos realizados em 584 pacientes e observaram sensibilidade igual a 80,0% para reação de imunodifusão, 76,5% para o exame histopatológico e 70,1% para o exame micológico direto. No entanto, não se compararam, duas a duas, a sensibilidade de testes realizados no mesmo paciente. A comparação da sensibilidade observada por Blotta et al.⁷² se revelou menor na reação de imunodifusão que a observada no presente estudo, com 80,0% e 90,0% respectivamente, devido talvez a diferente preparação antigênica utilizada pelos autores, que foi um liofilizado de Pb B-339. O exame histopatológico

também apresentou menor sensibilidade no trabalho de Blotta et al.⁷² do que em nosso estudo, com 77,2% e 96,5%, enquanto o exame micológico direto não revelou diferença de sensibilidade entre os dois estudos, com 70,2% e 66,3%, respectivamente.

Restrepo et al.⁷⁰ estudaram a sensibilidade dos exames histopatológicos em 30 pacientes, do exame micológico direto em 36 e da reação de imunodifusão em 39, que foram iguais a 93,3%, 94,4% e 92,3%, respectivamente. Chama a atenção os melhores resultados observados no exame micológico direto, mais sensível que o observado no presente estudo. Deve-se destacar, no entanto, que a casuística estudada na Colômbia foi muito menor que a do presente estudo.

Campos et al.⁹⁰ avaliaram os testes diagnósticos utilizados em 112 pacientes com PCM, que revelaram que a ordem decrescente de sensibilidade era o exame histopatológico, a reação de imunodifusão, o exame micológico direto e o exame citopatológico. Os resultados são bastante superponíveis aos do presente estudo.

O presente estudo demonstra que os métodos diagnósticos caracterizados pela identificação de *P. brasiliensis* sempre devem ser indicados, pois oferecem um diagnóstico confirmado, apresentam elevada sensibilidade, são bem tolerados pelos pacientes e, no caso do exame histopatológico, oferecem informação sobre a interação parasita-hospedeiro, pelo padrão da resposta granulomatosa.

Dos 35 pacientes do presente estudo, que apresentaram a primeira IDD negativa, novos testes sorológicos foram realizados nos soros de 32 deles, que contavam com amostras estocadas.

Para comparação dos resultados os exames sorológicos também foram realizados em soros de 32 pacientes que apresentaram sorologia positiva, e que foram pareados de acordo com a forma clínica e idade.

Foi proposta novamente a realização de imunodifusão, mas com antígenos diferentes ao utilizado na primeira sorologia. Também foi realizada a mesma técnica, com os mesmos antígenos, em laboratório diferente -

Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses, do Instituto Adolfo Lutz - para avaliação da reprodutibilidade do teste.

Assim, a IDD foi realizada com a utilização de outros dois antígenos, padronizados em outro laboratório, avaliou-se a reprodutibilidade dos resultados e, por fim, a avaliação do teste de *immunoblotting*.

A IDD, realizada no LEPDT, não apresentou diferença de sensibilidade quando realizada com os três diferentes antígenos, Pb 113 de Araraquara (IDDr), Pb 113 do IAL (IDD1) e Pb B-339 do IAL (IDD2). O mesmo resultado foi observado por Silva⁵² que utilizou quatro diferentes preparações antigênicas (CSSPECs das amostras 113, 18, 265 e B-339).

A mesma comparação foi feita no LIM do Instituto Adolfo Lutz, que revelou sensibilidade apenas um pouco menor com o antígeno preparado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP / Araraquara que com os outros dois.

Os ensaios realizados nos dois laboratórios revelam a reprodutibilidade dos resultados, com dois dos três antígenos. Esses achados sugerem que os testes foram realizados de forma adequada no LEPDT - UNESP.

Com o antígeno produzido pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP / Araraquara, a sensibilidade foi discretamente mais elevada no LEPDT - UNESP do que no Instituto Adolfo Lutz, diferença que, apesar de significativa, foi muito pequena.

A avaliação de todas essas comparações, em seu conjunto, demonstra que todos os testes sorológicos apresentavam a mesma sensibilidade, exceto o realizado com o antígeno preparado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP / Araraquara e executado no Instituto Adolfo Lutz, que foi levemente menor. Esses resultados poderiam ser representados pela fórmula (IDD1-FMB = IDD2-FMB = IDD1-IAL = IDD2-IAL = IDDr-FMB) > IDDr-IAL.

Os ensaios de *immunoblotting* foram feitos nos soros com IDD negativa porque tanto o Consenso em Paracoccidiodomicose quanto o Manual de Vigilância e Controle da Paracoccidiodomicose sugerem esta alternativa para o diagnóstico sorológico desta micose. Esse método proporcionou o reconhecimento de duas glicoproteínas, a gp43 e a gp70.

No sobrenadante da cultura de *P. brasiliensis* observa-se uma complexa estrutura de proteínas e glicoproteínas, cujos pesos moleculares variam de 13 a 148kDa.

A gp43 é considerada principal componente antigênico por ser reconhecido pelo soro de todos os pacientes com PCM^{96,97}. Ela se liga à laminina, componente protéico da matriz extra-celular de tecidos de mamíferos. Assim, células leveduriformes do *P. brasiliensis* revestidas pela laminina apresentam maior facilidade para invadir e destruir tecidos⁹⁸. A gp43 também deprime a resposta linfoproliferativa e a atividade macrofágica, como fagocitose através de receptores de manose e liberação de radicais livres e, como consequência, a atividade fungicida.⁹⁹

Essa glicoproteína é o principal antígeno específico purificado para diagnóstico, quando utilizado em testes sorológicos em fase líquida¹⁰⁰. A gp43 apresenta várias isoformas mas com pl básico de 6,85 a 5,8.⁹²

A gp70 é reconhecida por 96,0% dos soros de pacientes com PCM em atividade¹⁰¹. O tratamento anti-fúngico reduz o reconhecimento dessa fração. A gp70, assim como a gp43, foi reconhecida na urina de pacientes com PCM⁶⁶. No entanto, a gp70 foi reconhecida no soro de indivíduos saudáveis infectados pelo *H. capsulatum*.¹⁰²

A gp70 se localiza principalmente no compartimento intra-celular do *P. brasiliensis*, embora pequena quantidade também seja detectada na cultura do sobrenadante. Essa molécula tem polissacarídeos como componentes predominantes¹⁰³. A gp70 purificada inibe a atividade macrofágica através de receptores de manose e de receptores Fc, e inibe a liberação de NO e de H₂O₂ por macrófagos peritoneais, *in vitro*⁹². Essa glicoproteína apresenta apenas uma isoforma, com pl ácido de 3,4.⁹²

A detecção de gp70 no sangue circulante revelou-se um método sensível para o diagnóstico de PCM e útil no seguimento após introdução do

tratamento⁹³. No entanto, essa fração de *P. brasiliensis* ainda não está bem estudada.

Os ensaios de *immunoblotting* do presente estudo revelaram grande sensibilidade no reconhecimento da gp43 com os antígenos obtidos tanto do Pb 113 quanto do Pb B-339. No entanto, a especificidade foi muito baixa pela elevada frequência de reações positivas em controles da região de origem dos pacientes, que é hiper-endêmica para a PCM^{104,105}. Além disso, o reconhecimento da gp70 em ensaio realizado com preparação antigênica obtida de Pb B-339, revelou sensibilidade e valor preditivo positivo iguais a 0%, dados que contra-indicam sua utilização como método diagnóstico da PCM. Por outro lado, o reconhecimento da gp70 em ensaios que utilizam antígeno do Pb 113 revelam sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia perto de 100,0%, dados que sugerem sua utilização no diagnóstico da PCM em pacientes soro-negativos à reação de imunodifusão.

Esses achados sugerem a persistência de anticorpos anti-gp43 no soro de indivíduos saudáveis apenas infectados pelo *P. brasiliensis*, em níveis detectáveis pelo ensaio de *immunoblotting*.

Para avaliar o que ocorreria em região litorânea do Estado de São Paulo, que apresenta baixa mortalidade por PCM¹⁰⁵, soros de indivíduos saudáveis, doadores de sangue da cidade de Santos (SP), foram avaliados. Também se observou elevada taxa de reconhecimento da gp43, inclusive em indivíduos que informaram nunca terem vivido fora da região litorânea.

Outros testes com elevada sensibilidade também detectaram anticorpos na população saudável de áreas em que a PCM é endêmica, tais como Maluf et al.⁶⁰, que realizaram ELISA com antígeno de Pb B-339 no noroeste do Estado do Paraná; Botteon et al.⁶¹ também realizaram ELISA com exoantígeno e gp43 de Pb B-339 em doadores de sangue de Londrina (PR) e São Paulo (SP); e Fornajeiro et al.¹⁰⁶. realizaram teste intradérmico com gp43 em trabalhadores de indústria de álcool no noroeste do Estado do Paraná.

Como a gp43 apresenta várias isoformas⁹², talvez algumas delas persistam em indivíduos apenas infectados por longo tempo ou por toda a vida e sejam identificados pelo ensaio de *immunoblotting*. Estudos sobre a cinética da gp43 e da gp70 em indivíduos saudáveis e em pacientes com PCM,

são necessários para que se possa interpretar de forma adequada os achados deste estudo e indicar o uso clínico desses testes.

Deve-se registrar que, s.m.j., é a primeira vez que se avaliam ensaios de *immunoblotting* para o reconhecimento da gp43 e da gp70 na população saudável da mesma área de que se originam os pacientes com PCM.

Como consequência deste estudo, deve-se sugerir que soros negativos à IDD, de pacientes com hipótese diagnóstica de PCM, sejam submetidos ao ensaio de *immunoblotting* com antígeno obtido de Pb 113 e avaliação do reconhecimento da gp70.

Capítulo V - Conclusões

Os resultados do presente estudo, com base nos métodos utilizados, permitiram as conclusões que se seguem:

1. A reação de imunodifusão dupla em gel de ágar demonstrou elevada sensibilidade e valor preditivo negativo e altíssima especificidade e valor preditivo positivo;

2. O exame histopatológico apresentou elevadíssima sensibilidade;

3. Entre os quatro exames diagnósticos avaliados, o histopatológico foi o mais sensível, a que se seguiram, em ordem decrescente, a reação de imunodifusão dupla em gel de ágar e, com igual freqüência, o micológico direto e o citopatológico;

4. A sensibilidade dos quatro exames avaliados não apresentou diferença em função da forma clínica, mas os níveis séricos de anticorpos foram mais elevados na forma aguda/subaguda.

5. A utilização de diferentes preparações antigênicas não aumentou a sensibilidade da reação de imunodifusão dupla em gel de ágar, que também revelou boa reprodutibilidade inter-laboratorial;

6. O reconhecimento da gp43 demonstrou elevada sensibilidade mas baixa especificidade no ensaio de *immunoblotting*, realizado com as preparações antigênicas obtidas do Pb 113 e Pb B-339;

7. Com finalidade de diagnóstico da paracoccidioidomicose, os melhores resultados no ensaio de *immunoblotting* foram observados com a utilização de preparação antigênica obtida do Pb 113, para reconhecimento da gp70.

Capítulo VI –
Referências Bibliográficas *

* National Library of Medicine. List of journals indexed in Index Medicus. Washington, 2003. 240p.

1. Restrepo A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology*. 1985; 23: 323-34.
2. 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.
3. Lutz A. Uma mycose pseudococcidica localizada na boca e observada no Brazil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomycoses americanas. *Brazil-Med*. 1908; 13: 121-24, 15:141-4.
4. Splendore A. Zymonematosi con localizzazione nella cavità della bocca, osservata in Brasile. *Bull Soc Path Exotique*. 1912; 5: 313-8.
5. Almeida F. Estudos comparativos do granuloma coccidioidico nos Estados Unidos e no Brasil. Novo genero para o parasita brasileiro. *An Fac Med Sao Paulo*. 1930; 5: 125-41.
6. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC. Micologia Médica. In: *Paracoccidioidomicose*. 8ª ed. São Paulo, Brasil: Editora Sarvier, 1991; p. 248-61.
7. Ajello L. Paracoccidioidomycosis: a historical review. In: *Paracoccidioidomycosis*. PAHO Sci. Publ.; 1972. p.254.
8. 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.
9. Albornoz MB. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. *Sabouraudia*. 1971; 9: 248-53.
10. Restrepo A. Morphological aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* in lymph nodes: implications for the prolonged latency of paracoccidioidomycosis? *Med Mycol*. 2000; 38: 317-22.
11. 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.
12. Naiff RD, Ferreira LCL, Barrett TV, Naiff MF, Arias JR. Paracoccidioidomicose enzoótica em tatus (*Dasypus novemcinctus*) no estado do Pará. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1986; 28(1): 19-27.
13. Franco M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. *J Med Vet Mycol*. 1986; 25:5-18.

14. Camargo ZP, Franco MF. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev Iberoam Micol.* 2000; 17:41-48.
15. Franco M, Bagagli E, Scapolio S, Lacaz CS. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. *Med Mycol.* 2000; 38: 185-91.
16. 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.
17. 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.
18. Manual de Vigilância e Controle da Paracoccidioidomicose. Secretaria de Estado da Saúde - Coordenadoria de Controle de Doenças - Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". São Paulo, 2008.
19. 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.
20. Rodrigues CC. Avaliação da infecção por *Histoplasma capsulatum* por meio de reações intradérmicas em moradores da zona urbana e rural do Município de Pratânia (SP) [tese]. Pós Graduação em Doenças Tropicais: Faculdade de Medicina de Botucatu / UNESP; 2004.
21. Giraldo R, Restrepo A, Gutiérrez F, Robledo M, Londoño F, Hernández H, *et al.* Pathogenesis of paracoccidioidomycosis: a model based on the study of 46 patients. *Mycopathologia.* 1976; 58(2): 63-70.
22. 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.
23. Borges-Walmsley MI, Chen D, Shu X, Walmsley AR. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbiologia* 2002; 10(2): 80-7.
24. 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.
25. 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.

26. Bueno JP, Mendes-Giannini MJS, Del Negro GMB, Assis CM, Takiguti CK, Shikanai-Yasuda MA. 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: 213-17.
27. Mota NGS, Rezkallah-Iwasso MT, Peraçoli MTS, Audi RC, Mendes RP, Marcondes J, *et al.* Correlation between cell-mediated immunity and clinical forms of paracoccidioidomycosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1985; 79: 765-72.
28. Ribeiro DO. Nova terapêutica para a blastomicose. *Publ Med (São Paulo).* 1940; 12: 36-54.
29. Barbosa W & Vasconcelos WMP. Associação do sulfametoxazol associado ao trimetoprim na terapêutica da blastomicose sul-americana. *Rev Pat Trop.* 1973; 2: 329-39.
30. Lacaz CS & Sampaio SAP. Tratamento da blastomicose sul-americana com anfotericina B. Resultados preliminares. *Rev Paul Med.* 1958; 52: 443-50.
31. Negroni R, Robles AM, Arechavala A, Tuculet MA, Galimberti R. Ketoconazole in the treatment of paracoccidioidomycosis and histoplasmosis. *Rev Infect Dis.* 1980; 2(4): 643-9.
32. Marcondes J, Meira DA, Mendes RP, Pereira PC, Barraviera B, Mota NGS, *et al.* Avaliação do tratamento da paracoccidioidomicose com o ketoconazole. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1984; 26(2): 113-21.
33. Naranjo MS, Trujillo M, Munera MI, Restrepo P, Gomez I, Restrepo A. Treatment of paracoccidioidomycosis with itraconazole. *J Med Vet Mycol.* 1990; 28(1): 67-76.
34. Meira DA, Pereira PCM, Marcondes-Machado J, Mendes RP, Barraviera B, Pellegrino Jr. J, *et al.* The use of glucan as immunostimulant in the treatment of paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg.* 1996; 55(5): 496-503.
35. Lauand F. Contribuição para o estudo da morfologia do *Paracoccidioides brasiliensis* nos tecidos orais. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1966; 8: 69-78.
36. 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.

37. Lopes OSS. Descrição de uma técnica de concentração para pesquisa do "Paracoccidioides brasiliensis" no escarro. Hospital (Rio de J.). 1955; 47(5): 69-79.
38. Londero AT, Severo LC, Ramos CD. Small forms and hyphae of *Paracoccidioides brasiliensis* in human tissue. Mycopathologia. 1980; 72: 17-19.
39. San-Blas G, Niño-Vega G, Barreto L, Hebler-Barbosa F, Bagagli E, Briceño RO, *et al.* Primers for clinical detection of *Paracoccidioides brasiliensis*. J Clin Microbiol. 2005; 43(8): 4255-57.
40. Koss LG. Diagnostic cytology and its histopathologic bases. 2^a ed. Philadelphia/Montreal: J. B. Lippincott Company; 1961. p. 322-38.
41. Iwama de Mattos MC. Cell-block preparation for cytodiagnosis of pulmonary paracoccidioidomycosis. Chest. 1979; 75(2): 212.
42. Iwama de Mattos MCF, Mendes RP, Marcondes-Machado J, Meira DA, Morceli J, Pereira PCM, *et al.* Sputum cytology in the diagnosis of pulmonary paracoccidioidomycosis. Mycopathologia. 1991; 114: 187-91.
43. Albornoz MB, Cabral NA. Paracoccidioidomycosis. Estudio clinico e inmunologico en 40 pacientes. Arch Hosp Vargas. 1976; 18(5-6): 5-22.
44. Fava Netto C. Estudos quantitativos sobre a fixação do complemento na blastomicose sul-americana, com antígeno polissacarídico. Arq Cirurg Clin Exp. 1955; 18: 197-254.
45. Fava Netto C, Guerra MAG, Costa EO, Yasuda PH. Contribuição à sorologia da paracoccidioidomycose. 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 agar. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1987; 18: 349-56.
46. Fava Netto C. Contribuição para o estudo imunológico da blastomicose de Lutz (blastomicose sul-americana). Rev Inst A Lutz. 1961; 21: 182-89.
47. Singer LM & Fava Netto C. Reação de fixação de complemento conglutinante na blastomicose sul-americana. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1971; 13: 272-78.
48. Mistreta T, Souza MJ, Chamma LG, Pinho SZ, Franco M. Serology of paracoccidioidomycosis. I. Evaluation of the indirect immunofluorescent test. Mycopathology. 1985; 89: 13-17.
49. Restrepo A. La prueba de inmunodiffusion en el diagnostico de la paracoccidioidomycosis. Sabouraudia. 1966; 4: 223-30.

50. Restrepo A & Moncada LH. Characterization of the precipitin bands detected in the immunodiffusion test for paracoccidioidomycosis. *Appl Microbiol.* 1974; 28(1): 138-44.
51. Camargo ZP, Guesdon JL, Drouhet E, Improvisi L. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the paracoccidioidomycosis. Comparison with counterimmunoelectrophoresis and erythro-immunoassay. *Mycopathologia.* 1984; 88: 31-37.
52. Silva DF. Análise da estabilidade de exoantígenos de *Paracoccidioides brasiliensis* [dissertação]. São Paulo: Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 2005.
53. Ouchterlony O. Antigen - Antibody reactions in gels. *Acta Path Microbiol Scand.* 1949; 26(4): 507-15.
54. Lacaz CS, Ferri RG, Fava Netto C, Belfort E. Aspectos imunoquímicos na blastomicose sul-americana e blastomicose queloidiana (Doença de Jorge Lôbo). *Med Cir Farm.* 1962; 298: 63-74.
55. Mendes-Giannini MJS, Del Negro GB, Siqueira AM. Serodiagnosis. *In:* Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. *Paracoccidioidomycosis.* Boca Raton, FL: CRC Press; 1994. p. 345-63.
56. Negroni R. Estudio de las reacciones inmunológicas cruzadas em algunas micosis profundas por medio de la micro-inmunodifusion. *Rev Asoc Argent Microbiol.* 1970; 2: 274-76.
57. Negroni R, De Flores CI, Robles AM. Estudio de las reacciones serologicas cruzadas entre antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis* y *Histoplasma capsulatum*. *Rev Asoc Argent Microbiol.* 1976; 14: 265-73.
58. Del Negro GMB, Garcia NM, Rodrigues EG, Cano MIN, Aguiar MSMV, Lírio VS, *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(4): 277-80.
59. Camargo ZP. Serology of paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia.* 2008; 165: 289-302.
60. Botteon FAG, Camargo ZP, Benard G, Coelho RF, Chamone DAF, Itano EN. *Paracoccidioides brasiliensis*-reactive antibodies in Brazilian blood donors. *Med Mycol.* 2002; 40: 387-91.
61. Maluf ML, Pereira SRC, Takahachi G, Svidizinski TIE. Prevalência de paracoccidioidomicose-infecção determinada através de teste sorológico em doadores de sangue na região Noroeste do Paraná, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003; 36(1): 11-16.

62. Mendes-Giannini MJS, Bueno JP, Shikanai-Yasuda MA, et al. Detection of the 43,000-molecular-weight glycoprotein in sera of patients with paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol.* 1989; 27(12): 2842-45.
61. Díez S, Gómez BL, McEwen JG, Restrepo A, Hay RJ, Hamilton AJ. Combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* recombinant 27-kilodalton and purified 87-kilodalton antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(4): 1536-42.
62. Gomes GM, Cisalpino PS, Tabora CP, Camargo ZP. PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(9): 3478-80.
63. Camargo ZP, Unterkircher C, Campoy SP, Travassos LR. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. *J Clin Microbiol.* 1988; 26(10): 2147-51.
64. Puccia R, Takaoka DT, Travassos LR. Purification of the 43 kDa glycoprotein from exocellular components excreted by *Paracoccidioides brasiliensis* in liquid culture (TOM medium). *J Med Vet Mycol.* 1991; 29(1): 57-60.
65. Hamilton AJ. Serodiagnosis of histoplasmosis, paracoccidioidomycosis and penicilliosis marneffeii; current status and future trends. *Med Mycol.* 1998; 36(6): 351-64.
66. Salina MA, Shikanai-Yasuda MA, Mendes RP, Barraviera B, Mendes-Giannini MJS. Detection of circulating *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in urine of paracoccidioidomycosis patients before and during treatment. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(6): 1723-8.
67. Freitas-da-Silva G & Roque-Barreira MC. Antigenemia in paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol.* 1992; 30(2): 381-85.
68. Gómez BL, Figueroa JI, Hamilton AJ, Ortiz B, Robledo MA, Hay RJ, et al. Use of monoclonal antibodies in diagnosis of paracoccidioidomycosis: new strategies for detection of circulating antigens. *J Clin Microbiol.* 1997; 35(12): 3278-83.
69. Miranda JB & Machado Filho J. Considerações relativas à blastomicose sul-americana. *Hospital (Rio de J.).* 1959; 56(4): 579-93.
70. Restrepo A, Robledo M, Gutiérrez F, Sanclemente M, Castañeda E, Calle G. Paracoccidioidomycosis (South American Blastomycosis). A study of 39 cases observed in Medellín, Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 1970; 19(1): 68-76.
71. Azevedo JF & Lisboa CDSG. Paracoccidioidomycose – estudo de 106 casos. *J Pneumol.* 1980; 6: 30-33.

72. Blotta MH, Mamoni RL, Oliveira SJ, Nouér SA, Papaiordanou PM, Goveia A, *et al.* Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 61(3): 390-94.
73. Paniago AMM, Aguiar JIA, Aguiar ES, Cunha RV, Pereira GROL, Londero AT, *et al.* Paracoccidioidomycosis: a clinical epidemiological study of 422 cases observed in Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003; 36(4): 455-59.
74. Valle ACF, Costa RLB, Fialho Monteiro PC, Von Helder J, Muniz MM, Zancopé-Oliveira RM. Interpretation and clinical correlation of serological tests in paracoccidioidomycosis. *Med Mycol.* 2000; 39: 373-77.
75. Londero AT, Ramos CD. Paracoccidioidomicose. Estudo clínico e micológico de 260 casos observados no interior do Estado do Rio Grande do Sul. *J Pneumol.* 1990; 16(3): 129-32.
76. Almeida F, Lacaz CS, Cunha AC. Dados estatísticos sobre a granulomatose paracoccidióidica (blastomicose sul-americana ou paracoccidioidomicose). *Rev Bras Med.* 1946; 3(2): 91-94.
77. Grocott RG. A stain for fungi in tissue sections and smears. Using Gomori's methenamine-silver nitrate technic. *Am J Clin Pathol.* 1955; 25: 975-79.
78. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227: 680-85.
79. Towbin H, Stachelin T, Gordon J. Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci.* 1979; 76(9): 4350-54.
80. Fletcher RH & Fletcher SW. Diagnóstico. *In: Fletcher RH & Fletcher SW. Epidemiologia clínica. Elementos essenciais.* 4 ed. São Paulo: Artmed; 2006. p. 56-81.
81. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Habilitação para laboratórios de microbiologia. Brasília: Ministério da Saúde; 2006. Série Habilitação, 3.
82. Meira DA. Normas para elaboração de dissertações e teses. Curso de Pós-Graduação de Doenças Tropicais Botucatu: Faculdade de Medicina - Unesp; 2003.
83. Siegel S. A prova binomial. *In: Siegel S. Estatística não-paramétrica para as ciências do comportamento.* 1 ed. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil; 1975. p. 39-46.

84. Siegel S. A prova de McNemar para a significância das mudanças. *In*: Siegel S. Estatística não-paramétrica para as ciências do comportamento. 1 ed. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil; 1975. p. 69-74.
85. Arango HG. Probabilidade e propriedades epidemiológicas. *In*: Arango HG. Estatística teórica e computacional. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. p. 93-113.
86. Curi. Mais de duas amostras, com variável classificatória. *In*: Curi PR. 1 ed. Botucatu: Tipomic; 1997. p. 186-97.
87. Zar JH. Biostatistical Analysis. Prentice Hall, 4 ed. New Jersey, 1999, 663p.
88. Gerhard R, Basso MC. Diagnosis of three cases of paracoccidioidomycosis by fine needle aspiration cytology. *Cytopathology*. 2007; 18(2): 125-7.
89. Cano LE, Restrepo A. Predictive value of serologic tests in the diagnosis and follow-up of patients with paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1987; 29(5): 276-83.
90. Campos MVS, Penna GO, Castro CN, Moraes MAP, Ferreira MS, Santos JB. Paracoccidioidomicose no Hospital Universitário de Brasília. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008; 41(2): 169-72.
91. Siqueira KZ. Detecção molecular de *Paracoccidioides brasiliensis* em amostras de tecido e sangue periférico de pacientes portadores de Paracoccidioidomicose. Correlação com perfis histopatológico, sorológico e produção de TNF- α [tese]. Pós Graduação em Patologia: Faculdade de Medicina de Botucatu / UNESP; 2008.
92. Mattos Grosso D, Almeida SR, Mariano M, Lopes JD. Characterization of gp70 and anti-gp70 monoclonal antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* pathogenesis. *Infect Immun*. 2003; 71(11): 6534-42.
93. Marques da Silva SH, Mattos Grosso D, Lopes JD, Colombo AL, Blotta MHSL, Queiroz-Telles F, Camargo ZP. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* gp70 circulating antigen and follow-up of patients undergoing antimycotic therapy. *J Clin Microbiol*. 2004; 42(10): 4480-86.
94. Calcagno AM, Niño-Vega G, San-Blas F, San-Blas G. Geographic Discrimination of *Paracoccidioides brasiliensis* Strains by Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis. *J Clin Microbiol*. 1998; 36(6):1733-6.
95. Neves AR, Mamoni RL, Rossi CL, Camargo ZP, Blotta MHSL. Negative Immunodiffusion Test Results Obtained with Sera of Paracoccidioidomycosis Patients May Be Related to Low-Avidity Immunoglobulin G2 Antibodies Directed against Carbohydrate Epitopes. *Clin Diag Lab Immunol*. 2003; 10(5): 802-7.

96. Travassos LR. Immunochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis* antigens. In Franco M, Lacaz CS, Restrepo AM, Del Negro G. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton: CRC Press; 1994. p. 67-86.
97. Travassos LR, Puccia R, Cisalpino P, Taborda C, Rodrigues EG, Rodrigues M, et al. Biochemistry and molecular biology of the main diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. Arch Med Res. 1995; 26:297-304.
98. Vicentini AP, Gesztesi JL, Franco MF, Souza W, Moraes JZ, Travassos LR, et al. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. Infect Immun. 1994; 62:1465-9.
99. Flavi Popi AF, Lopes JD, Mariano M. GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of the fungus. Cell Immunol. 2002; 218:87-94.
100. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. Clin Microbiol. 1993; 6:89-117.
101. Puccia R, Schenkman S, Gorin PA, Travassos LR. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. Infect Immun. 1986; 53:199-206.
102. Camargo ZP, Unterkircher C, Travassos LR. Identification of antigenic polypeptides of *Paracoccidioides brasiliensis* by immunoblotting. J Med Vet Mycol. 1989; 27:407-12.
103. Unterkircher CS. Antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis* e sua aplicação no diagnóstico sorológico da Paracoccidioidomicose [tese]. Universidade Federal de São Paulo, São Paulo - Brasil.
104. Rodrigues CC. Avaliação da infecção por *Histoplasma capsulatum* por meio de reações intradérmicas em moradores da zona urbana e rural do município de Pratânia (SP) [tese]. Pós Graduação em Doenças Tropicais: Faculdade de Medicina de Botucatu / UNESP; 2004.
105. Santo AH. Tendência da mortalidade relacionada à paracoccidioidomicose, Estado de São Paulo, Brasil, 1985 a 2005: estudo usando causas múltiplas de morte. Rev Panam Salud Publica. 2008; 23(5): 313-24.

106. Fornajeiro N, Maluf MLF, Takahachi G, Svidzinski TIE. Inquérito epidemiológico sobre a paracoccidiodomicose utilizando a gp43 em dois municípios do noroeste do Paraná, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 2005; 38(2): 191-3.

VII – Resumo

A identificação de exames laboratoriais adequados para a confirmação da hipótese clínica é importante em serviços de rotina para pacientes com paracoccidiodomicose (PCM) e foi o objetivo deste estudo. Realizou-se estudo retrospectivo de 401 pacientes com PCM atendidos de 1974 a 2008, na Área de Doenças Tropicais do Hospital das Clínicas – Faculdade de Medicina de Botucatu / UNESP. Foram analisadas, antes do tratamento, quatro técnicas diagnósticas - exame micológico direto (MD), citopatológico (CP), histopatológico (HP) e reação de imunodifusão dupla em gel de ágar (ID) para avaliação dos níveis de anticorpos séricos específicos. A comparação de duas proporções entre populações dependentes ou independentes foi feita pelo teste de Mc Nemar ou binomial. O grau de concordância entre dois testes foi avaliado através do Coeficiente Kappa. Para comparação de mais de duas populações dependentes foi utilizado o teste de Cochran. A comparação de múltiplas proporções para amostras seriadas foi feita pelo teste de Tukey e a comparação de duas proporções foi feita pelo teste Z. Para estudo da associação entre variáveis qualitativas foi utilizado o teste do qui-quadrado. Para as variáveis quantitativas, cujo objetivo era comparar grupos, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. A rejeição da hipótese de nulidade foi vinculada a um erro tipo I (α) igual ou menor que 0,05. Para a realização dos testes foi utilizado o programa computacional SAS-The Statistical Analysis System, versão 6.12. Homens (88,0%) e forma crônica (76,8%) predominaram. A distribuição de pacientes de acordo com o primeiro atendimento não apresentou diferença. Identificação da fase leveduriforme típica de *P. brasiliensis* foi possível em 86% dos pacientes enquanto 14% deles apresentaram apenas a sorologia positiva. O exame micológico direto foi realizado em 51 diferentes espécimes clínicos e apresentou 74,5% de sensibilidade. A sensibilidade foi 62,5% em 112 amostras de escarro. O exame citopatológico foi realizado em 483 amostras de escarro e mostrou 55,3% de sensibilidade. O exame histopatológico, realizado em 239 espécimes de diferentes tecidos, revelou 96,7% de sensibilidade. O teste sorológico, realizado em 351 pacientes e 200 indivíduos controles, pareados de acordo com sexo, mostrou 90,0% [87,5; 92,5] de sensibilidade, 100,0% [100,0; 100,0] de especificidade, 100,0% [100,0; 100,0] de valor preditivo positivo, 85,1% [82,1; 88,1] de valor preditivo negativo e 93,6% [91,6; 95,6] de acurácia.

A comparação entre os quatro testes diagnósticos analisados neste trabalho mostrou que o exame histopatológico apresentou maior sensibilidade, a que se seguiram, em ordem decrescente, o teste sorológico, o exame citopatológico e o micológico direto. As sensibilidades destes dois últimos não diferiram entre si. Soros de 32 pacientes com paracoccidioidomicose confirmada, mas negativos à imunodifusão, foram avaliados. Como controle, soros positivos de outros 32 pacientes com PCM confirmada pela identificação do fungo também foram analisados. Os exames foram realizados no Laboratório Experimental de Pesquisa de Doenças Tropicais – Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP e no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses – Instituto Adolfo Lutz – SP. ID foi realizada com antígenos de filtrado de cultura de Pb 113 preparado no Laboratório de Micologia Clínica – UNESP/Araraquara (IDr); e de Pb 113 (ID₁) e Pb B-339 (ID₂) preparados no Instituto Adolfo Lutz. *Immunoblotting* também foi realizado utilizando Pb 113 (IB₁) e Pb B-339 (IB₂). Os resultados mostraram que a sensibilidade da ID realizada no Laboratório Experimental de Pesquisa de Doenças Tropicais não apresentou diferença em relação ao antígeno utilizado. A ID realizada no Instituto Adolfo Lutz não apresentou diferença de sensibilidade entre ID₁ e ID₂, que foram maiores que a observada na IDr. Reprodutibilidade entre laboratórios foi observado com ID₁ e ID₂, mas IDr apresentou sensibilidade discretamente mais elevada no Laboratório Experimental de Pesquisa de Doenças Tropicais. Não houve diferença na sensibilidade de IB₁-gp43, IB₂-gp70 e IB₂-gp43, que foi mais elevada do que a de IB₂-gp70. Sensibilidade da ID foi menor que o reconhecimento de IB₁-gp43, IB₂-gp43 and IB₂-gp43, mas maior que a de IB₂-gp70. Este estudo demonstrou que *P. brasiliensis* pode ser identificado em quase todos os casos, principalmente pelo exame histopatológico e a importância da reação de imunodifusão dupla em gel de ágar em Serviços de rotina, mesmo por longos períodos, com diferentes técnicos, biólogos e patologistas. Estes achados também mostram que soros negativos na ID devem ser submetidos ao ensaio de *immunoblotting* utilizando preparação antigênica de Pb 113, para o reconhecimento da gp70, devido a elevados valores de sensibilidade (96,8%), especificidade (100,0%), valor preditivo positivo (100,0%), valor preditivo negativo de (97,0%) e acurácia (98,4%).

VIII - Summary

Identification of appropriate laboratory measurements to confirm a clinical hypothesis is important in a routine service for paracoccidioidomycosis patients and constituted the objective of this study. Clinical records and laboratory cards of 401 paracoccidioidomycosis patients seen at the Tropical Diseases Area – Botucatu Medical School (São Paulo, Brazil) from 1974 to 2008 were reviewed. Direct mycological examination (DM), cell block preparation (CB), histopathological examination (HP), and specific antibodies serum levels evaluated through double agar gel immunodiffusion test (ID) were evaluated before treatment. Statistical analysis: the comparison between proportions for dependent or independent populations was made by the McNemar test or Binomial. The agreement between methods was evaluated using the Kappa Coefficient. The comparison of more than two dependent populations was made by the Cochran Test. The comparison of multiple proportions was done by Tukey test and for two proportions by Z test. In order to study the association between qualitative variables the chi-square test was used. For quantitative variables, whose objective was to compare groups, the nonparametric Kruskal-Wallis test was used. The software SAS – The Statistical Analysis System, version 6.12, was used. The significance was set up at $p < 0.05$. Males (88.0%) and chronic form (76.8%) predominated. Patients distribution according to period of assistance presented no differences. Typical *P. brasiliensis* yeast forms were identified in clinical specimens in 86% of the patients while 14% of them showed only a positive serological test. Direct mycological examination carried out in 51 different tissue specimens showed 74.5% of sensitivity. The sensitivity was 62.5% in 112 sputum samples. Cell block preparation carried out in 483 sputum samples showed 55.3% of sensitivity. Histopathological examination carried out in 239 tissues from different organs revealed 96.7% of sensitivity. Serological tests carried out in 351 patients and 200 healthy controls paired according to gender showed 90% of sensitivity, 100% of specificity, 100% of positive predictive value, 85% of negative predictive value and 94% of accuracy. Comparisons 2x2 of laboratory measurements carried out in the same patient showed that sensitivity decreases from HP to serology to CB and DM; the last two assays showed no differences in sensitivity. Serum samples from 32 patients with confirmed paracoccidioidomycosis but negative immunodiffusion before treatment were

evaluated. As controls, positive sera from 32 additional confirmed patients were analyzed. These assays were carried out at the Research Laboratory of Tropical Diseases – Botucatu Medical School - UNESP and at the Adolfo Lutz Institute - SP. ID was performed using culture filtrate antigens from Pb-113 prepared at the Laboratory of Clinical Mycology – UNESP/Araraquara (IDr); and from Pb-113 (ID₁) and Pb-B-339 (ID₂) prepared at the Adolfo Lutz Institute. Immunoblotting was also carried out using strains Pb-113 (IB₁) and PbB-339 (IB₂). Our findings showed that ID performed at Research Laboratory of Tropical Diseases presented no difference in sensitivity among the three antigens. ID performed at Adolfo Lutz Institute presented no difference in sensitivity between ID₁ and ID₂, but results were higher than in IDr. Reproducibility between laboratories was observed with ID₁ and ID₂, but IDr presented a somewhat higher sensitivity at Research Laboratory of Tropical Diseases. There was no difference in sensitivity for IB₁-gp43, IB₂-gp70 and IB₂-gp43. However, it was higher than that found for IB₂-gp70. ID sensitivity was lower than IB₁-gp43, IB₂-gp43 and IB₂-gp43 recognition, but higher than IB₂-gp70. This study shows that *P. brasiliensis* can be identified in almost all the cases, mainly by histopathological examination, and the importance of the double agar gel immunodiffusion test in a routine service, including for long periods, with different technicians, biologists and pathologists. Our findings also show that negative ID serum should be submitted to immunoblotting using Pb-113 to evaluate the gp70 because of its high sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values.

Anexos

ANEXO 1



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA - BOTUCATU

Departamento de Doenças Tropicais e

Diagnóstico por Imagem

Botucatu-SP Distrito Rubião Jr. CEP18618-000 PBX (14) 3811-6212

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Grupo controle

O projeto de pesquisa “Diagnóstico da paracoccidiodomicose em pacientes atendidos em Serviços de rotina de hospital universitário” tem como objetivo avaliar os métodos utilizados no diagnóstico da doença denominada paracoccidiodomicose ou blastomicose sul-americana, também popularmente conhecida como “blasto”, “tuberculose do capim” e “micose do capim”, que acomete em especial trabalhadores rurais.

Entre os métodos utilizados no diagnóstico da paracoccidiodomicose encontra-se um teste realizado no soro dos pacientes. Para a avaliação da qualidade desse teste, deve-se realizá-lo no sangue de indivíduos saudáveis, que moram na mesma região em que vivem os doentes, para comparar os resultados com aqueles observados nos pacientes.

Uma única amostra de 8 mL de sangue será colhida da veia, com agulha e seringa específicas para isso, por pessoa bastante experiente em fazer essa coleta. A seguir, o sangue será enviado ao laboratório, onde será realizado o teste acima mencionado. O resultado do exame estará à disposição do doador que, em caso de um resultado positivo, será notificado pelo responsável por este projeto.

Tendo sido satisfatoriamente informado sobre o projeto “Diagnóstico da paracoccidiodomicose em pacientes atendidos em Serviços de rotina de hospital universitário”, sob responsabilidade da bióloga Talísia Collachiti Moreto e do Prof. Dr. Rinaldo Poncio Mendes, orientador do Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, concordo em permitir a coleta de sangue. Estou ciente de que os responsáveis por esta pesquisa estarão disponíveis para responder a quaisquer perguntas ou dúvidas que eu possa ter.

Assinatura do doador ou do responsável

Talísia Collachiti Moreto

Dr. Rinaldo Poncio Mendes

Talísia Collachiti Moreto - R. Agenor Nogueira, 502/casa A - CEP 18603-198-Botucatu-SP Tel: (14) 3813.7162; e-mail: tamoreto@yahoo.com.br

Rinaldo Poncio Mendes - Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP - Rubião Junior, s/n - Botucatu/SP - CEP 18618-970 - Tel: (14) 3811.6212

ANEXO 3

3.1 - Caldo NGTA - Meio para obtenção de antígenos no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses - IAL

Neopeptona (Difco)	16,0 g
Glicose (Difco)	10,0 g
Cloreto de tiamina	100,0 mg
L-asparagina	200,0 mg
Água destilada	1000,0 mL

Dissolver 16,0 g de neopeptona em 32,0 mL de água deionizada aquecida a 45°C. Colocar a solução de neopeptona em membrana de diálise e dialisar contra água destilada (cerca de 1000,0 mL), durante cinco horas a 70°C e por uma noite a 4°C. Retirar o conteúdo da membrana de diálise, completar o volume com água destilada até 1000,0 mL, adicionar a glicose, tiamina e asparagina e homogeneizar. Ajustar o pH para 6,8-7,0. Distribuir e esterilizar a 120°C durante 15 minutos.

3.2 - Meio de Fava Netto - Meio de manutenção da amostra de *P. brasiliensis* no Laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP

Proteose peptona	3,0 g
Peptona bacteriológica	10,0 g
Extrato de carne	5,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Extrato de levedura	5,0 g
Dextrose	40,0 g
Ágar bacto	18,0 g
Água destilada (q.s.p.)	1000,0 mL

3.3 - Meio de cultivo para o preparo de antígenos no Laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP

Meio de Negroni

Neopeptona	15,00 g
Dextrose	9,00 g
Tiamina	0,05 g
Asparagina	0,18 g
Água destilada (q.s.p.)	500,00 mL

3.4 - Obtenção de antígenos

3.4.1 - Antígeno Pb 113 no Laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP

O antígeno preparado no Laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP foi obtido a partir do filtrado de cultura da amostra de Pb 113. Em resumo, *P. brasiliensis* cultivado em meio de Fava Netto a 35°C por cinco dias foi inoculado em meio de Negroni modificado segundo Siqueira (1982) e incubado em estufa agitadora a 35°C por 15 dias. A seguir, acrescentou-se timerosal na concentração final de 0,2 g/mL e incubou-se nas mesmas condições por mais quatro dias. O antígeno foi, então, filtrado, concentrado 10 vezes com polietilenoglicol (Sigma P-2263) e dialisado contra solução fisiológica tamponada com fosfatos (PBS) em membrana de diálise (Sigma D-9377). O extrato concentrado foi avaliado quanto ao teor protéico, analisado por SDS-PAGE, separado em pequenas alíquotas e congelado a 70°C negativos.

3.4.2 – Antígeno Pb 113 e B-339 no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses - IAL

Para a obtenção destes antígenos de *P. brasiliensis*, foram empregadas as amostras 113 e B-339, utilizando-se o caldo NGTA [Anexo 3.1], segundo metodologia descrita por Garcia *et al*, 1993.

Desta forma, 16,0 g de neopeptona foram dissolvidas em 32,0 mL de água bidestilada aquecida a 45°C, até a total dissolução do reagente. A solução foi dialisada contra água destilada, durante 5 horas a 70°C e por uma noite a 4°C. O conteúdo da membrana foi completado para 1000,0 mL de água Milli-q® acrescido de 10,0 g de glicose e 100,0 mg de cloreto de tiamina e 200,0 mg de asparagina. O pH foi ajustado entre 6,8-7,0 e o meio distribuído em frascos tipo Erlenmayer (500,0 mL), e esterilizado em autoclave a 120°C, por 15 minutos.

Para o preparo do exoantígeno, o crescimento fúngico de aproximadamente três a quatro tubos contendo culturas de sete dias, crescidas em ágar Fava Netto, a 35°C, foram inoculados nos frascos tipo Erlenmayer contendo 200,0 mL do meio e colocados em incubadora com plataforma de agitação circular, por 20 dias, a 36°C, com rotação constante de 50 rpm. Após este período, o crescimento foi interrompido pela adição de mertiolate de sódio, na proporção de 1:5000, ficando as culturas em repouso por 5 dias a 4°C. Nesta etapa, fez-se a análise da viabilidade das células leveduriformes, inoculando aproximadamente 1,0 mL do sobrenadante em ágar Fava Netto e ágar BHI a 25 e 36°C, respectivamente. As células foram separadas por filtração em papel de filtro. O sobrenadante obtido (filtrado de cultura) resultante do processo de filtração foi alíquotado, avaliado imunoquimicamente e armazenado a 4°C até o momento do uso.

3.5 - Clarificante utilizado no exame micológico direto

Hidróxido de potássio (30%)

Hidróxido de potássio	30,0 g
Água destilada	100,0 mL

3.6 - Coloração e fixação dos exames citopatológico e histopatológico

3.6.1 - Nitrato de prata – Método de Gomori-Grocott

Nitrato de prata	10 g
Água destilada	100 mL

3.6.2 - Bouin modificado

Álcool absoluto	850 mL
Ácido acético	100 mL
Formol tamponado 40%	50 mL

3.7 - Soluções utilizadas na reação de imunodifusão dupla em gel de ágar - Laboratório Experimental de Pesquisa de Doenças Tropicais / FMB - UNESP

3.7.1 - Gel de primeira camada para pré-forragem das lâminas (1%)

Ágar purificado	1,0 g
Água destilada	100,0 mL

Pesar o ágar, colocá-lo em erlenmeyer de 200 mL e adicionar 100 mL de água destilada. Homogeneizar e fundir em banho-maria fervente ou em forno de microondas, tomando-se o cuidado para não levantar fervura. Após fusão, distribuir em tubos de ensaio devidamente identificados com o nome da solução, a data do preparo e o prazo de validade (15 dias). Estocar a 4°C.

3.7.2 - Gel de segunda camada para forragem das lâminas

Ágar purificado	1,00 g
Cloreto de Sódio	0,90 g
Citrato de Sódio	0,40 g
Glicina	7,50 g
Thimerosal (mertiolato)	0,01 g
Água milli-q	100,00 mL

Pesar o cloreto de sódio, o citrato de sódio, a glicina e o mertiolato, dissolver em aproximadamente 80,0 mL de água milli-q, homogeneizar até completa dissolução dos reagentes. Acertar o pH da solução entre 6,7 – 6,9, completar o volume para 100,0 mL com água milli-q. Acrescentar o ágar purificado e homogeneizar. Fundir em banho-maria fervente ou em forno de microondas, tomando cuidado para não levantar fervura. Após fusão, distribuir em tubos de ensaio devidamente identificados com o nome da solução, a data do preparo e o prazo de validade (7 dias). Estocar a 4°C.

3.7.3 - Solução de Citrato de Sódio a 5%

Citrato de sódio	5,0 g
Água milli-q	1000,0 mL

Distribuir em frascos âmbar e estocar a 4° C.

3.7.4 - Solução Salina a 0,85%

Cloreto de Sódio	34,0 g
Água milli-q	4000,0 mL

3.7.5 - Solução corante com amido de Schuvartz

Amido de Schuvartz 10B (Merck)	4,0 g
Ácido acético glacial	100,0 mL
Água milli-q	1000,0 mL

Distribuir em frascos âmbar e guardar ao abrigo da luz em temperatura ambiente.

3.7.6 - Solução Descorante

Ácido acético glacial	50,0 mL
Água milli-q	950,0 mL

Distribuir em frascos âmbar e guardar ao abrigo da luz em temperatura ambiente.

3.8 - Soluções utilizadas na reação de imunodifusão dupla em gel de ágar – Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses / IAL

3.8.1 - Solução de ágar a 1%

Agar purificado (Oxoid)	1,0 g
Água bidestilada	100,0 mL

Pesar o ágar e colocá-lo em erlenmeyer contendo 100,0 mL de água bidestilada. Homogeneizar e levar ao forno de microondas para fundir, tomando cuidado para não levantar fervura. Após fusão distribuir 10,0 mL da solução em tubos de ensaio 16x160 e estocar a 4°C.

3.8.2 - Solução de Agar Citrato

Cloreto de sódio (Synth)	0,90 g
Citrato de sódio (Synth)	0,40 g
Glicina (Synth)	7,50 g
Agarose tipo II EEO (Sigma)	1,00 g
Thimerosal (Sigma)	0,01 g
Água bidestilada (qsp)	100,0 mL

Dissolver em aproximadamente 80,0 mL de água bidestilada, o cloreto de sódio, o citrato de sódio e a glicina. Ajustar o pH da solução entre 6,7- 6,9. Acrescentar a agarose e levar ao microondas para fundir. Deve-se prestar muita atenção para que a solução não entre em fervura, a mesma estará fundida quando ficar transparente. Após a etapa de fusão, adicionar o thimerosal. Distribuir 10,0 mL da solução em tubos de 16x160 e estocar a 4°C.

3.8.3 - Solução de Citrato de Sódio a 5%

Citrato de sódio (Synth)	5,0 g
Água bidestilada	1000,0 mL

Distribuir em frascos âmbar e estocar a 4° C.

3.8.4 - Solução Salina a 0,85%

Cloreto de Sódio (Synth)	34,0 g
Água bidestilada	4000,0 mL

3.8.5 - Solução Corante Coomassie Brilliant Blue R-250

Coomassie brilliant blue R250	4,0 g
Ácido acético glacial (CAAL)	100,0 mL
Etanol (CAAL)	450,0 mL
Água bidestilada (qsp)	1000,0 mL

Em um balão volumétrico adicionar o ácido acético e o etanol, completar o volume para 1000,0 mL de água. Adicionar o corante. Homogeneizar lentamente em agitador magnético até completa dissolução do corante. Filtrar e estocar em frasco âmbar a temperatura ambiente.

3.8.6 - Solução Descorante

Ácido acético glacial (CAAL)	100,0 mL
Etanol (CAAL)	450,0 mL
Água bidestilada	450,0 mL

Esta solução pode ser reaproveitada, para tanto basta filtrá-la em carvão ativado.

3.9 - Soluções utilizadas no SDS-PAGE

3.9.1 - Solução Estoque de bis – acrilamida

Acrilamida 30% (Sigma)	30,0 g
Bis - Acrilamida (Sigma)	0,8 g
Água bidestilada qsp	100,0 mL

Homogeneizar a acrilamida e bis-acrilamida em 50,0 mL de água bidestilada em becker envolto com papel alumínio. Acertar o volume para

100,0 mL, filtrar em funil com papel de filtro. Estocar a 4°C em frasco âmbar envolto em papel alumínio. Esta solução pode ser conservada por um período de 3 a 4 meses.

3.9.2 - Lower Gel Buffer

Trizma base (Sigma)	18,2 g
SDS (Sigma)	0,4 g
Água bidestilada qsp	100,0 mL

Adicionar 50,0 mL de água bidestilada ao trizma base, homogeneizar e acertar o pH da solução para 8,8. Acrescentar o SDS, completar o volume e filtrar a solução. Estocar a 4°C em frasco âmbar envolto em papel alumínio. Esta solução pode ser conservada por um período de 3 a 4 meses.

3.9.3 - Upper Gel Buffer

Trizma base (Sigma)	3,0 g
SDS (Sigma)	0,2 g
Água bidestilada qsp	50,0 mL

Adicionar 25,0 mL de água bidestilada ao trizma base, homogeneizar e acertar o pH da solução para 6,8. Acrescentar o SDS, completar o volume e filtrar a solução. Estocar a 4°C em frasco âmbar envolto em papel alumínio. Esta solução pode ser conservada por um período de 3 a 4 meses.

3.9.4 - Solução de Persulfato de Amônia a 10%

Persulfato de sódio	0,5 g
Água bidestilada	5,0 mL

Distribuir em alíquotas e manter congelado a -20°C.

3.9.5 - Solução de Duodecil Sulfato de Sódio (SDS) a 20%

SDS (Sigma)	10,0 g
Água bidestilada	50,0 mL

3.9.6 - Tampão de Amostra Redutor 5 vezes Concentrado

Tris Ph 6.8	0,6 mL
Glicerol	2,5 mL
SDS 20%	1,0 mL
2-Mercaptoetanol	0,5 mL
H ₂ O bidestilada	4,4 mL

Distribuir em alíquotas e manter congelado a -20°C.

3.9.7 - Tampão de Corrida 10 vezes Concentrado

Glicina (Sigma)	144,0 g
Trizma (Sigma)	30,3 g
SDS (Sigma)	10,0 g
Água bidestilada qsp	1000,0 mL

Dissolver em 600.0 ml de água destilada a glicina e o trizma, homogenizar e acertar o pH da solução para 8,3. Adicionar as 10,0 g de SDS, homogenizar até completa dissolução. Completar para 1000,0 mL.

Para uso, diluir na seguinte proporção:

Tampão de transferência 10	100,0 mL
Água bidestilada	1000,0 mL

3.9.8 - Gel de separação na concentração de 10% de acrilamida

Água bidestilada	6,7 mL
Tampão Lower	4,0 mL
Solução de acrilamida	3,0 mL
Persulfato de amônia	25,0 µL
Temed (Sigma)	5,0 µL

3.9.9 - Gel de empilhamento na concentração de 3% de acrilamida

Água bidestilada	2,95 mL
Tampão Upper	1,25 mL
Solução de acrilamida	0,80 mL
Persulfato de amônia	15,0 µL
Temed (Sigma)	5,0 µL

3.9.10 - Coloração pelo Brilhante Blue

Coomassie Brilhante Blue R-250	4,0 g
Ácido Acético Glacial (Merck)	100,0 mL
Etanol (Merck)	450,0 mL
Água bidestilada qsp	1000,0 mL

Em um balão volumétrico adicionar o ácido acético glacial e o etanol, completar para 1000,0 mL de água bidestilada. Adicionar o corante. Homogeneizar lentamente em agitador magnético até completa dissolução do corante. Filtrar e estocar em frasco âmbar a temperatura ambiente.

3.9.11 - Solução descorante

Ácido Acético Glacial (Merck)	100,0 mL
Etanol (Merck)	450,0 mL
Água bidestilada qsp	450,0 mL

3.10 - Soluções utilizadas no ensaio de *immunoblotting*

3.10.1 - Tampão de Transferência 10 vezes concentrado

Tris (Sigma)	15,15 g
Glicina (Sigma)	72,00 g
Água bidestilada qsp	500,00 mL

Para uso, diluir na seguinte proporção:

Tampão de transferência 10	100,0 mL
Metanol	100,0 mL
Água bidestilada	800,0 mL

3.10.2 - Solução Corante utilizada para controle da transferência

Ponceau-S (Sigma)	1,0 g
Ácido Acético Glacial (Merck)	2,0 mL
Água bidestilada qsp	200,0 mL

3.10.3 - Solução Salina Tamponada com Fosfatos (PBS) pH 7,4 (10 vezes concentrado)

Cloreto de Sódio	82,0 g
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	3,6 g
NaHPO ₄	14,2 g
Água bidestilada qsp	1000,0 mL

Para uso, diluir na seguinte proporção:

Tampão de transferência 10	100,0 mL
Água bidestilada	1000,0mL

3.10.4 - Solução Bloqueadora (5%)

Leite desnatado (Molico, Nestlé)	5,0 g
PBS (pH 7,4)	100,0 mL

3.10.5 - Solução PBS-Tween 20 (0.1%)

Tween 20 (Sigma)	500,0 µL
PBS (pH 7,4)	500,0 mL

3.10.6 - Tampão Tris-salina (pH 7,5)

Tris (Sigma)	1,2 g
Cloreto de Sódio (CAAL)	9,0 g
Água bidestilada qsp	1000,0 mL

3.10.7 - Solução cromógena para anti-imunoglobulina conjugado à peroxidase

4-cloro 1-naftol (Sigma)	15,0 mg
Tris-salina (pH7,5)	20,0 mL
Metanol (Merck)	5,0 mL
Peroxido de hidrogênio	20,0 µL

Preparo da solução reveladora:

Dissolver o 4 cloro 1-naftol no metanol frio, acrescentar a solução Tris-salina e por último o peróxido de hidrogênio.

ANEXO 4



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde em 30 de
abril de 1997

Botucatu, 03 de março de 2008

Of. 062/08-CEP


Ilustríssimo Senhor
Prof. Dr. Rinaldo Poncio Mendes
Departamento de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem
Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezado Dr. Rinaldo,

De ordem da Senhora Coordenadora deste CEP informo que o Projeto de Pesquisa, "**Diagnóstico da paracoccidioidomicose em pacientes atendidos em serviços de rotina de hospital universitário**", a ser conduzido por Talisia Collachiti Moreto, orientada por V.Sª, com a participação da Profª. Drª. Mariângela Esther Alencar Marques e Drª. Maria Luiza Sartor Cotrin de Oliveira, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 03/03/2008.

Situação do Projeto: **APROVADO**. Ao final da execução deste Projeto, apresentar ao CEP "**Relatório Final de Atividades**".

Atenciosamente,


Sueli Aparecida Garcia
Secretário CEP/subst.

ANEXO 5



Figura 6 - Forma multigemulante em "roda de leme" de *Paracoccidioides brasiliensis* em escarro. Micológico direto com KOH (400x).



Figura 7 - Forma multigemulante de *P. brasiliensis* em escarro. Citopatológico com prata methanamina (100x).

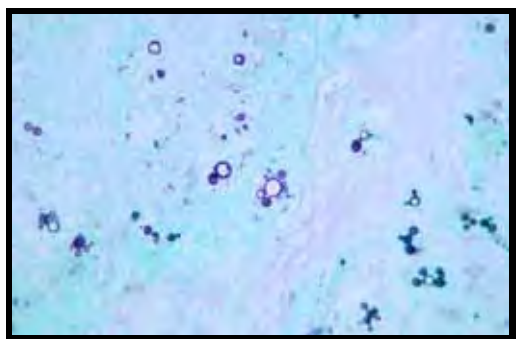


Figura 8 - Formas multigemulantes de *P. brasiliensis*. Histopatológico com prata methanamina (100x).

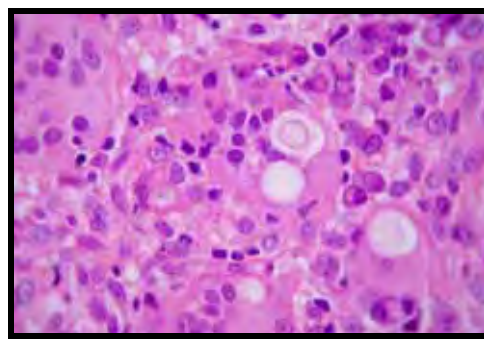


Figura 9 - Granuloma epitelióide com presença de *P. brasiliensis*. Histopatológico com HE (Imersão).

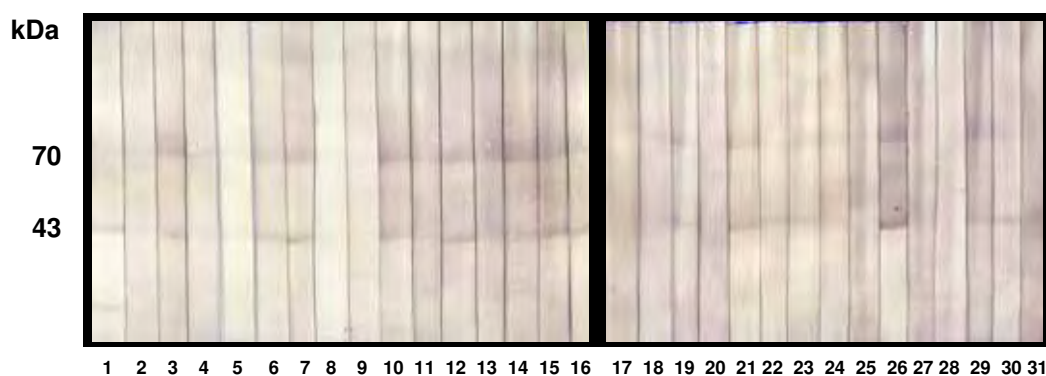


Figura 16 – Fitas de *immunoblotting* realizado em soros de pacientes com paracoccidioidomicose em atividade. Reconhecimento da gp43 e gp70.

Imagem do citopatológico gentilmente cedida pela Dra. Maria Luiza S. C. Oliveira e imagens dos histopatológicos gentilmente cedidas pela Dra. Mariangela E. A. Marques, do Departamento de Patologia - FMB / UNESP.

Imagem do *immunoblotting* gentilmente cedida pela Dra. Adriana P. V. Moreira, do Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses - IAL / SP.