

Angela Noronha Passos

Avaliação da aplicabilidade da técnica de *immunoblotting* para a pesquisa de anticorpos circulantes anti-*Paracoccidioides brasiliensis* e anti-*Histoplasma capsulatum* em laboratório de Saúde Pública.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientadora: Prof^a Dr^a Adriana Pardini Vicentini

SÃO PAULO

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Passos, Angela Noronha

Avaliação da aplicabilidade da técnica de immunoblotting para a pesquisa de anticorpos circulantes anti-*Paracoccidioides brasiliensis* e anti-*Histoplasma capsulatum* em laboratório de saúde pública / Angela Noronha Passos, São Paulo, 2012.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública
Orientadora: Adriana Pardini Vicentini

1. Testes imunológicos 2. Paracoccidioidomicose 3. Histoplasmose
4. Imunodifusão 5. Western blotting 6. Estudos de validação

SES/CCD/CD-250/11

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo

Apoio Financeiro:

Instituto Adolfo Lutz de São Paulo –
Coordenadoria de Controle de Doenças – SES/SP (Projetos CTC-IAL#107/97, #06/04 e #97D/09)

Programa de Pós-Graduação em Ciências – Coordenadoria de Controle de Doenças – SES/SP (verba de bancada)

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (bolsa de Mestrado)

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Doralice e Dirceu, e a minha família
que formam o alicerce da minha vida.*

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço a **Deus** por iluminar meu caminho, guiar minhas decisões e me dar sempre a força necessária para enfrentar os percalços do destino. Agradeço ainda mais pelas pessoas que foram colocadas em minha vida, pois foram elas que me ajudaram a trilhar meu caminho.

A minha mãe **Doralice**, meu pai **Dirceu**, minha irmã **Mariana** e ao pequeno **Pietro** por andarem ao meu lado. Cada um, a sua maneira, faz com que eu me sinta muito orgulhosa da família que pertenço.

À Dr.^a **Adriana Pardini Vicentini** por ser uma orientadora completa, que me ensina todos os dias como ser uma pessoa melhor, uma profissional melhor, uma filha melhor. Por ser um exemplo pra mim, uma grande amiga a quem eu vou admirar sempre! Por não me deixar desistir, confiar em mim, mostrar que os outros não podem limitar nossas capacidades e que reconhecer nossas fraquezas é sinal de força.

A minha tia **Daisy**, pelo incentivo à ciência, por ser uma referência profissional na minha vida e por me abrigar nos momentos em que eu procurei isolamento.

Aos meus preciosos amigos (**Marcella, Débora, Diogo, Mari Maringá e toda a nossa turma**) por não permitirem que eu me sinta sozinha nunca e formarem a família que eu escolhi ter por perto de mim.

A equipe do Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses, **Valdelene Sayuri Kohara, Camila Mika Kamikawa e Luciane Regina Franciscone Silva** pelas pessoas maravilhosas que vocês são. Obrigada pelo companheirismo de todos os dias, pela paciência e apoio.

A Dr.^a **Elizabeth de los Santos Fortuna**, pela amizade, carinho e apoio sempre dispensados. Agradeço ainda por contribuir em diversas discussões sobre o trabalho e as sugestões no protocolo de *immunoblotting*.

Ao Dr. **Daniel Wagner de Castro Lima Santos** pelo auxílio na classificação das formas clínicas dos pacientes e, juntamente com o Dr. **Marcos Vinicius da Silva** e a funcionária **Denise**, do **Serviço de Arquivo Médico e**

Estatístico (Same) do **Instituto de Infectologia Emílio Ribas**, pela colaboração do IIER e assistência com o acesso aos prontuários.

Ao Dr. **Rinaldo “Tietê” Poncio Mendes** e Ms. **Talísia Collachiti Moreto** pela colaboração e auxílio com as amostras dos doadores de sangue.

À Dr.^a **Maria Rita Parise Fortes** e Dr. **Silvio Alencar Marques** pela colaboração com as amostras e o levantamento dos prontuários dos pacientes de Botucatu.

À Ms. **Roseli dos Santos Freitas**, pela produção de novos lotes de antígenos de *Histoplasma capsulatum*.

A **Lia Bastos**, Dr.^a **Tânia Andrade** do **Núcleo de Coleção de Culturas do IAL** pela liofilização dos antígenos, e a **Adriano Abbud**, Diretor do Centro de Procedimentos Interdisciplinares e aos funcionários do Biotério de Inoculação pela colaboração com a produção de anti-soros.

Aos membros da Banca de Qualificação, Dr.^a **Tânia Andrade**, Dr.^a **Vera Lucia Chioccola** e Dr. **Gil Benard** pelas sugestões realizadas.

A todos os **Pesquisadores** e **Funcionários** do Centro de Imunologia, especialmente, **Lucia Cupertino Barreto** e **Terezinha Pereira de Araujo** pelo apoio técnico.

À **Danielly, Gisele, Lucia, Terezinha, Marlene, Ana Késia, Dona Edina** e demais colegas de seção pelos agradáveis momentos de convivência.

Ao **Instituto Adolfo Lutz** por fornecer a infra-estrutura necessária ao desenvolvimento deste projeto. À Dr.^a **Carmem Aparecida Freitas de Oliveira**, em nome do **Centro de Imunologia** pelo apoio e incentivo à pesquisa em Saúde Pública.

À Dr.^a **Maria de Fátima Costa Pires**, representando todo o corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças e às secretarias, **Tirces** e **Carol**, pelo suporte administrativo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pela bolsa concedida.

***“Quando você pensa que sabe todas as respostas,
vem a vida e muda todas as perguntas”.***

Luís Fernando Veríssimo

PASSOS, A N - Avaliação da aplicabilidade da técnica de *immunoblotting* para a pesquisa de anticorpos circulantes anti-*Paracoccidioides brasiliensis* e anti-*Histoplasma capsulatum* em laboratório de Saúde Pública.

Resumo

Nos últimos anos, a frequência das infecções fúngicas invasivas tem aumentado substancialmente, tornando-se um problema emergente em Saúde Pública. O emprego de imunoensaios é de vital importância no diagnóstico dos processos infecciosos por *Paracoccidioides sp* e *Histoplasma capsulatum*, visto que o isolamento e identificação bem como a visualização, por exame direto, destes patógenos apresentam limitações metodológicas. O uso simultâneo de mais de uma metodologia é imprescindível para rápida e eficiente elucidação da etiologia da doença, proporcionando um tratamento específico e adequado. Neste estudo padronizou-se o ensaio de *immunoblotting* (IB), visando à pesquisa de anticorpos espécie-específicos, avaliando seu desempenho e aplicabilidade na rotina de Laboratório de Saúde Pública. Desta forma, realizou-se alterações no protocolo de referência, priorizando a otimização da metodologia. Foram analisadas, por imunodifusão dupla (ID) e IB, amostras de soro de pacientes classificados no critério de casos confirmados, prováveis, suspeitos e descartados de paracoccidioidomicose (PCM) e histoplasmose (HP); soros de indivíduos hígidos e de pacientes com aspergilose. Nas diversas avaliações, a sensibilidade do teste de ID para PCM, variou de 69 a 91%; com especificidade de 100% e eficiência entre 90 e 99%. No método de IB a sensibilidade calculada ficou entre 75 e 96%; com especificidade entre 93 e 100% e eficiência de 90 a 99%. Na pesquisa de anticorpos anti-*H. capsulatum*, a ID apresentou sensibilidade entre 56 a 96%, especificidade de 100% e eficiência variando de 92 a 99%. Por sua vez, a sensibilidade do IB foi de 100% em pacientes com HP pulmonar aguda e de 36% naqueles com forma disseminada; a especificidade variou

de 79 a 87% e a eficiência entre 79 a 83%. Apesar das limitações, os imunoensaios são ferramentas fundamentais para o diagnóstico e monitoramento das micoses sistêmicas, principalmente quando métodos mais sensíveis, como o IB, são utilizados em associação a ensaios mais específicos, como a ID. Diante do exposto, sugere-se que o IB deva ser empregado como método auxiliar e/ou confirmatório para PCM e HP pulmonar aguda bem como a ID, utilizada na triagem e seguimento dos pacientes. Estudos adicionais são necessários para aprimorar o diagnóstico laboratorial da HP disseminada e, de forma geral, padronizar os métodos de sorologia das micoses sistêmicas em diferentes laboratórios.

Palavras-Chaves: testes imunológicos, paracoccidiodomicose, histoplasmose, imunodifusão, *western blotting*, estudos de validação.

PASSOS, A N - Evaluation of the immunoblotting assay applicability for the antibodies detection anti-*Paracoccidioides brasiliensis* and anti-*Histoplasma capsulatum* on Public Health Laboratory.

Abstract

In recent years, the invasive fungal infectious frequency has been increasing substantially, becoming an emerging problem in Public Health. The use of immunoassays is of vital importance in the diagnosis of infectious processes by *Paracoccidioides* sp and *Histoplasma capsulatum*, since the isolation and identification as well as viewing by direct examination of these pathogens have methodological limitations. Simultaneous use of more than one methodology is essential for fast and efficient elucidation of the disease etiology, providing a specific and appropriate treatment. In this study we standardized the immunoblotting (IB) assay in order to search for species-specific antibodies, evaluating their performance and applicability in routine Public Health Laboratory. Therefore, changes took place in the reference protocol, prioritizing the methodology optimization. Were analyzed by double immunodiffusion (ID) and IB, serum samples from patients classified on the criterion of confirmed, probable, suspect and dropped of paracoccidioidomycosis (PCM) and histoplasmosis (HP), sera of healthy individuals and patients with aspergillosis. In several evaluations, the ID test sensitivity to PCM, ranged from 69 to 91%, with 100% specificity and efficiency between 90 and 99%. In the IB method sensitivity was calculated between 75 and 96%, with specificity between 93 and 100% and efficiency 90 to 99%. In anti-*H. capsulatum* antibodies search, the ID had a sensitivity between 56 to 96%, 100% specificity and efficiency ranging from 92 to 99%. In turn, the IB sensitivity was 100% in patients with acute pulmonary HP and 36% in those with disseminated form, the specificity ranged from 79 to 87% and efficiency between 79 and 83%. Despite the limitations, immunoassays are essential tools for the diagnosis and monitoring of systemic mycoses, especially when more sensitive methods, such as IB, are used in combination with more specific tests such as the ID. Given the above, it is

suggested that the IB should be used as an auxiliary method and / or confirmation for PCM and acute pulmonary HP as well as ID, used in the patients screening and follow-up. Additional studies are needed to improve the HP disseminated laboratory diagnosis and, in general, to standardize the systemic mycoses serology methods in different laboratories.

Key Words: immunological tests, paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, immunodiffusion, western blotting, validation studies.

Lista de Abreviaturas e Siglas

<i>A. fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
Af	<i>Aspergillus fumigatus</i>
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASP	Aspergilose
at	Antes do tratamento
BALB/c	Camundongos da linhagem BALB/c
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>C. neoformans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
CDC	<i>Center Diseases Control</i>
CFA	<i>Cell-Free Antigen</i>
CIE	Contraímunoeletroforese
CSSEPC113	Componente Solúvel da Superfície Externa da Parede Celular da amostra 113 de <i>P. brasiliensis</i>
Da	Dalton
DI	<i>Double Immunodiffusion</i>
DIRs	Direções Regionais de Saúde
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
E	Especificidade
Ef	Eficiência
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
F	Feminino
f	Fraca reatividade
FA/SA	Forma Aguda/Subaguda
FC	Fixação de Complemento

FCM	Forma Crônica Multifocal
FN	Falso Negativos
FP	Falso Positivos
gp	Glicoproteína
gp43	Glicoproteína de 43 kDa
gp70	Glicoproteína de 70 kDa
H	Fração H de <i>H. capsulatum</i>
<i>H. farciminosum</i>	<i>Histoplasma farciminosum</i>
Hc	<i>Histoplasma capsulatum</i>
Hc 200	Amostra 200 de <i>H. capsulatum</i>
Hc 406	Amostra 406 de <i>H. capsulatum</i>
HCl	Ácido clorídrico
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HP	Histoplasmose
HU-UNICAMP	Hospital Universitário da Universidade de Campinas
IB	<i>Immunoblotting</i>
ICR	Camundongos da linhagem ICR
ID	Imunodifusão Dupla
IDR	Intradermoreação
IgG	Imunoglobulina G
IgG ₂	Imunoglobulina G subclasse 2
IgM	Imunoglobulina M
IIER	Instituto de Infectologia Emílio Ribas
IMT/USP	Instituto de Medicina Tropical, Universidade de São Paulo
kb	Kilobase
kDa	KiloDalton
LIM/CIM/IAL-SP	Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses, Centro de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, SP
M	Fração M de <i>H. capsulatum</i>
M	Masculino
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Micobacterium tuberculosis</i>
MS	Ministério da Saúde
NBR	Norma Brasileira
NGTA	Neoptona-Glicose, Tiamina e Asparagina

NR	Não reagente
<i>P. brasiliensis</i>	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>P. lutzii</i>	<i>Paracoccidioides lutzii</i>
p/v	Peso/volume
pb	Pares de base
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
Pb B-339	Amostra B-339 de <i>P. brasiliensis</i>
Pb 113	Amostra 113 de <i>P. brasiliensis</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBS-L	Tampão PBS contendo leite desnatado
PBS-T	Tampão PBS contendo Tween 20
PCM	Paracoccidioidomicose
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEG	Polietilenoglicol
pl	Ponto isoelétrico
PPM	Padrão de peso molecular
PR	Paraná (Estado)
pt	Pós-tratamento
R	Reagente
RAPD	<i>Randon Amplified Polymorphic DNA</i>
RIA	<i>Radioimmunoassay</i>
RJ	Rio de Janeiro (Estado)
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RNAr	RNA ribossômico
rpm	Rotação por minuto
S	sensibilidade
SciElo	<i>Scientific Electronic Library Online</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SES	Secretaria de Estado da Saúde
sp	<i>Specie</i>
SP	São Paulo (Estado)
spp	<i>Species</i>

Tris	Tris-(hidroxi-metil)-amino-metano
UNESP	Universidade Estadual Paulista
USA	<i>United States of America</i>
v/v	Volume/volume
VN	Verdadeiros Negativos
VP	Verdadeiros Positivos
VPN	Valor Preditivo Negativo
VPP	Valor Preditivo Positivo
YPD	<i>Yeast Peptone Dextrose</i>

Lista de Figuras

- Figura 1:** Número de óbitos por micoses no Brasil, no período de 2000 a 2009..... 28
- Figura 2:** Esquema representativo das alterações avaliadas nos parâmetros da técnica de *immunoblotting* para pesquisa de anticorpos específicos anti-*P. brasiliensis* e anti-*H. capsulatum*. 79
- Figura 3:** Modelo para validação de teste diagnóstico, segundo Ferreira e Ávila (2005). 82
- Figura 4:** Descrição das amostras classificadas como doente e não-doente para avaliação dos parâmetros intrínsecos dos ensaios de imunodifusão dupla e *immunoblotting*. 83
- Figura 5:** Modelo para cálculo do índice *kappa*, segundo Ferreira e Ávila (2005). 86
- Figura 6:** Reação de *immunoblotting* para pesquisa de anticorpos anti-*P. brasiliensis* em amostras de soro utilizando protocolo otimizado. 96
- Figura 7:** Distribuição em número absoluto dos pacientes (n=115) e das amostras de soro (n=147), segundo os critérios para definição de caso de PCM, estabelecidos pelo Manual da Vigilância e Controle da Paracoccidiodomicose do Estado de São Paulo (SES, 2008) e Consenso Brasileiro de Paracoccidiodomicose (Shikanai-Yasuda et al., 2006). 97
- Figura 8:** Distribuição em número absoluto dos pacientes classificados como caso confirmado e provável para paracoccidiodomicose (n=65), de acordo com gênero e faixa etária..... 98

Figura 9: Distribuição em porcentagem dos pacientes classificados como caso confirmado ou provável para paracoccidioomicose (n=56), segundo ocupação profissional. 98

Figura 10: Distribuição em número absoluto dos pacientes classificados como caso confirmado e provável para paracoccidioomicose (n=65), segundo gênero e forma clínica..... 99

Figura 11: Distribuição em número absoluto dos pacientes classificados como caso confirmado e provável para paracoccidioomicose (n=65), segundo forma clínica da doença e local da lesão. 100

Figura 12: Distribuição em número absoluto das amostras de soro de pacientes (caso confirmado e provável) com paracoccidioomicose (n=100), segundo título de anticorpos séricos espécie-específicos, avaliadas por imunodifusão dupla. 102

Figura 13: Perfil de reatividade em porcentagem das amostras reagentes por imunodifusão dupla (n=69), segundo a intensidade dos níveis séricos de anticorpos específicos anti-*P. brasiliensis*. 103

Figura 14: Distribuição em número absoluto de amostras de soro dos pacientes com paracoccidioomicose (confirmado e provável) (n=93), segundo a forma clínica da doença e intensidade dos títulos de anticorpos avaliados por imunodifusão dupla. 104

Figura 15: Percentual de reatividade para *P. brasiliensis* por *immunoblotting*, segundo o número de amostras (A) (n=147) e de pacientes (n=115) (B) avaliados. 104

Figura 16: Distribuição em número absoluto das amostras de pacientes avaliadas (n=147), segundo as definições de caso de paracoccidiodomicose e o perfil de reconhecimento por <i>immunoblotting</i>	105
Figura 17: Distribuição em número absoluto das amostras (n=93), segundo o perfil de reconhecimento por <i>immunoblotting</i> e a forma clínica do paciente.	106
Figura 18: Perfil de reconhecimento, por <i>immunoblotting</i> , das amostras de soro (casos confirmado e provável) frente às glicoproteínas de 43 e 70 kDa (n=83), de acordo com a intensidade dos níveis séricos de anticorpos circulantes obtidos por imunodifusão dupla.	107
Figura 19: Distribuição em número absoluto das amostras de soro (casos confirmado e provável) reagentes por imunodifusão dupla (n=69), de acordo com os níveis séricos de anticorpos circulantes obtidos e a reatividade por <i>immunoblotting</i> frente às glicoproteínas de 43 e 70 kDa.	107
Figura 20: Distribuição em porcentagem das amostras de pacientes com paracoccidiodomicose (n=147), aspergilose (n=20), histoplasbose (n=10), e indivíduos hígidos provenientes de área endêmica (AE) (n=64), e não-endêmica (ANE) (n=76), segundo o reconhecimento por <i>immunoblotting</i> frente ao antígeno Pb 113 de <i>P. brasiliensis</i>	109
Figura 21: Comparação em porcentagem dos parâmetros intrínsecos dos ensaios de imunodifusão dupla e <i>immunoblotting</i>	112
Figura 22: Curva dos valores de sensibilidade dos ensaios de imunodifusão dupla e <i>immunoblotting</i> em relação ao tempo de tratamento recebido pelo paciente no momento da coleta da amostra.	114

Figura 23: Reação de <i>immunoblotting</i> para pesquisa de anticorpos anti- <i>H. capsulatum</i> em amostras de soro utilizando protocolo otimizado.....	120
Figura 24: Distribuição em número absoluto dos pacientes (n=65),e das amostras de soro (n=73), segundo a definição de caso de histoplasmose.	121
Figura 25: Distribuição em número absoluto dos pacientes com histoplasmose confirmada e provável (n=37), de acordo com a forma clínica da doença.	122
Figura 26: Distribuição em número absoluto dos pacientes com histoplasmose confirmada e provável(n=37), segundo gênero e faixa etária.	122
Figura 27: Distribuição em número absoluto dos pacientes com histoplasmose confirmada e provável, de acordo com a faixa etária e forma clínica da doença.	123
Figura 28: Distribuição em número absoluto das amostras de soro, de acordo com a reatividade por imunodifusão dupla frente ao antígeno Hc 200 de <i>H. capsulatum</i>	126
Figura 29: Distribuição em porcentagem das amostras de soro, de acordo com o título de anticorpos circulantes.....	126
Figura 30: Distribuição em número absoluto das amostras de soro (n=73).e de pacientes (n=65), de acordo com a reatividade por <i>immunoblotting</i> (IB) frente ao antígeno Hc 200 de <i>H. capsulatum</i>	127

Figura 31: Distribuição em número absoluto das amostras de soro de pacientes (n=73), de acordo com a reatividade por *immunoblotting* frente ao antígeno Hc 200 de *H. capsulatum*..... 128

Figura 32: Distribuição em número absoluto do padrão de reatividade das amostras de soro dos pacientes com histoplasmose confirmada e provável (n=43), avaliadas por *immunoblotting* em relação aos níveis de anticorpos obtidos por imunodifusão dupla. 129

Figura 33: Distribuição em porcentagem das amostras de soro dos pacientes com histoplasmose (HP) (n=73), paracoccidioidomicose (PCM) (n=15), aspergilose (n=10).e indivíduos hígidos (n=30). segundo a reatividade por *immunoblotting* (IB) frente ao antígeno Hc 200 de *H. capsulatum*..... 130

Figura 34: Comparação em porcentagem dos parâmetros de sensibilidade, especificidade e eficiência entre os ensaios de imunodifusão dupla e *immunoblotting*..... 132

Figura 35: Comparação em porcentagem dos parâmetros intrínsecos do ensaio de imunodifusão dupla, de acordo com a forma clínica da histoplasmose. 134

Figura 36: Comparação em porcentagem dos parâmetros intrínsecos do ensaio de *immunoblotting*, de acordo com a forma clínica da histoplasmose. 134

Lista de Quadro

Quadro 1: Microepidemias de histoplasmose no Brasil: 1958 a 2008. 50

Quadro 2: Classificação do índice *kappa*, segundo Fleiss, A. R*. 86

Lista de Tabelas

Tabela 1: Condições estabelecidas para o desenvolvimento da técnica de *immunoblotting* para pesquisa de anticorpos séricos anti-*P. brasiliensis* no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses. 91

Tabela 2: Comparação do desempenho entre as metodologias de imunodifusão dupla e *immunoblotting* frente a filtrados de cultura das amostras 113 e B-339 de *P. brasiliensis*. 93

Tabela 3: Análise comparativa do desempenho dos protocolos padrão versus otimizado da metodologia de *immunoblotting* para a pesquisa de anticorpos séricos anti-*P. brasiliensis*. 95

Tabela 4: Relação de pacientes classificados como caso descartado de paracoccidiodomicose (n=30). 101

Tabela 5: Avaliação das amostras de soro por imunodifusão dupla, de acordo com a confirmação clínico-laboratorial de paracoccidiodomicose. 110

Tabela 6: Avaliação das amostras de soro por *immunoblotting*, considerando a reatividade frente à gp43, de acordo com a confirmação clínico-laboratorial de paracoccidiodomicose. 110

Tabela 7: Avaliação das amostras de soro por *immunoblotting*, considerando a reatividade simultânea frente às glicoproteínas de 43 e 70 kDa, de acordo com a confirmação clínico-laboratorial de paracoccidiodomicose. 111

Tabela 8: Comparação dos valores de sensibilidade e eficiência dos ensaios de imunodifusão dupla e <i>immunoblotting</i> em relação ao tempo de tratamento recebido pelo paciente no momento da coleta da amostra.	113
Tabela 9: Concordância de resultados entre os métodos de imunodifusão dupla e <i>immunoblotting</i>	115
Tabela 10: Comparação da concordância observada entre as análises de <i>immunoblotting</i> realizadas por diferentes analistas (1, 2 e 3) com as mesmas amostras, em dias distintos e no mesmo laboratório.	116
Tabela 11: Condições estabelecidas para técnica de <i>immunoblotting</i> para pesquisa de anticorpos anti- <i>H. capsulatum</i>	119
Tabela 12: Caracterização clínico-laboratorial dos pacientes que apresentaram co-infecção com <i>H. capsulatum</i>	124
Tabela 13: Caracterização clínico-laboratorial dos pacientes classificados como caso descartado de histoplasmose.	125
Tabela 14: Avaliação das amostras por imunodifusão dupla e <i>immunoblotting</i> , de acordo com a confirmação clínico - laboratorial de histoplasmose.	131
Tabela 15 Comparação dos parâmetros intrínsecos da metodologia de <i>immunoblotting</i> , de acordo com a presença de reatividade frente às frações H e/ou M.	133
Tabela 16: Concordância de resultados entre os métodos de imunodifusão dupla e <i>immunoblotting</i>	136

Índice

1. Introdução	26
1.1. Paracoccidiodomicose	26
1.1.1. Diagnóstico laboratorial da paracoccidiodomicose	35
1.2. Histoplasmose	47
1.2.1. Diagnóstico laboratorial da histoplasmose	54
1.3. Relevância do estudo	63
2. Objetivos	67
2.1. Objetivo Geral	67
2.2. Objetivos Específicos	67
3. Material e Métodos	68
3.1. Casuística	68
3.1.1. Critérios de inclusão e exclusão	69
3.1.2. Revisão dos prontuários e definição de caso de paracoccidiodomicose e histoplasmose	69
3.1.3. Considerações éticas	71
3.2. Soro hiperimune obtido em coelhos	71
3.3. Antígenos	72
3.3.1. Amostras fúngicas	72
3.3.2. Antígeno de <i>P. brasiliensis</i>	73
3.3.3. Antígeno de <i>H. capsulatum</i>	73
3.4. Ensaio de imunodifusão dupla em gel de agarose	74
3.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	75
3.6. <i>Immunoblotting</i>	76
3.6.1. Otimização do ensaio de <i>immunoblotting</i> para pesquisa de anticorpos anti- <i>P. brasiliensis</i> e anti- <i>H. capsulatum</i>	77
3.6.2. <i>Immunoblotting</i> para pesquisa de anticorpos anti- <i>P. brasiliensis</i> ...	80
3.6.3. <i>Immunoblotting</i> para pesquisa de anticorpos anti- <i>H. capsulatum</i> ...	81
3.7. Análise dos resultados	81

3.7.1. Avaliação dos parâmetros intrínsecos dos ensaios de imunodifusão dupla e <i>immunoblotting</i>	81
3.7.2. Teste do Qui-Quadrado	87
4. Resultados	88
4.1. Paracoccidiodomicose	88
4.1.1. Otimização do <i>immunoblotting</i> para pesquisa de anticorpos anti- <i>P. brasiliensis</i>	88
4.1.2. Caracterização dos pacientes com suspeita clínica de paracoccidiodomicose	97
4.1.3. Análise sorológica dos pacientes com suspeita clínica de paracoccidiodomicose.	102
4.1.4. Avaliação sorológica do grupo controle	108
4.1.5. Parâmetros intrínsecos dos ensaios sorológicos	109
4. 2. Histoplasmose	117
4.2.1. Otimização do <i>immunoblotting</i> para pesquisa de anticorpos anti- <i>H. capsulatum</i>	117
4.2.2. Caracterização dos pacientes com suspeita clínica de histoplasmose	121
4.2.3. Análise sorológica dos pacientes com suspeita clínica de histoplasmose	125
4.2.4. Avaliação sorológica do grupo controle	129
4.2.5. Parâmetros intrínsecos dos ensaios de imunodifusão dupla e <i>immunoblotting</i>	130
5. Discussão	137
6. Conclusões	174
7. Referências Bibliográficas	176

1. Introdução

Micoses profundas são infecções causadas por espécies fúngicas capazes de invadir, a partir de um foco ou complexo primário, diversos tecidos do hospedeiro e provocar, muitas vezes, doença sistêmica. Algumas, como a paracoccidioidomicose (PCM), têm potencial incapacitante; outras, como a histoplasmose (HP), estão associadas a aids; promovendo importante impacto em Saúde Pública.

1.1. Paracoccidioidomicose

A paracoccidioidomicose é doença sistêmica e tem como agente etiológico o fungo termo-dimórfico *Paracoccidioides* sp. Até pouco tempo apenas a espécie *P. brasiliensis* era conhecida, contudo, o avanço dos estudos moleculares permitiu a identificação de uma segunda espécie, *P. lutzii*, filogeneticamente distante da anterior (Carrero et al., 2008; Teixeira et al., 2009). Ambas as espécies estão envolvidas com desenvolvimento de doença humana, embora alguns estudos indiquem que diversos isolados tenham diferenças em relação à virulência (Molinari-Madlum et al., 1999; Fraga, 2008), resistência a drogas (Hahn et al., 2003; Abadio et al., 2011) e correlação com origem geográfica (Calcagno et al. 1998; Nino-Veja et al, 2000; Batista Jr., 2010).

Acredita-se, por ser o pulmão o órgão mais acometido, que *Paracoccidioides* sp habite saprofiticamente o solo e/ou vegetais, produzindo estruturas assexuadas na forma de artroconídios; os quais seriam responsáveis pela infecção principalmente no trato respiratório (Bustamante-Simon et al., 1985; McEwen et al., 1987).

Sua relevância em Saúde Pública está diretamente relacionada a um conjunto de fatores, entre os quais se pode citar: a existência de extensas

áreas endêmicas; o frequente comprometimento de indivíduos na fase mais produtiva da vida; a possibilidade de ser considerada uma doença ocupacional, o longo tempo necessário para o tratamento dos doentes; a elevada taxa de recidiva, principalmente devido às falhas e abandono do tratamento, e as importantes sequelas detectadas em grande parte dos pacientes. Todas estas condições determinam um expressivo e elevado custo sócio-econômico para o Estado e/ou Federação (Marques et al., 1983; Blotta et al., 1999, SES, 2008).

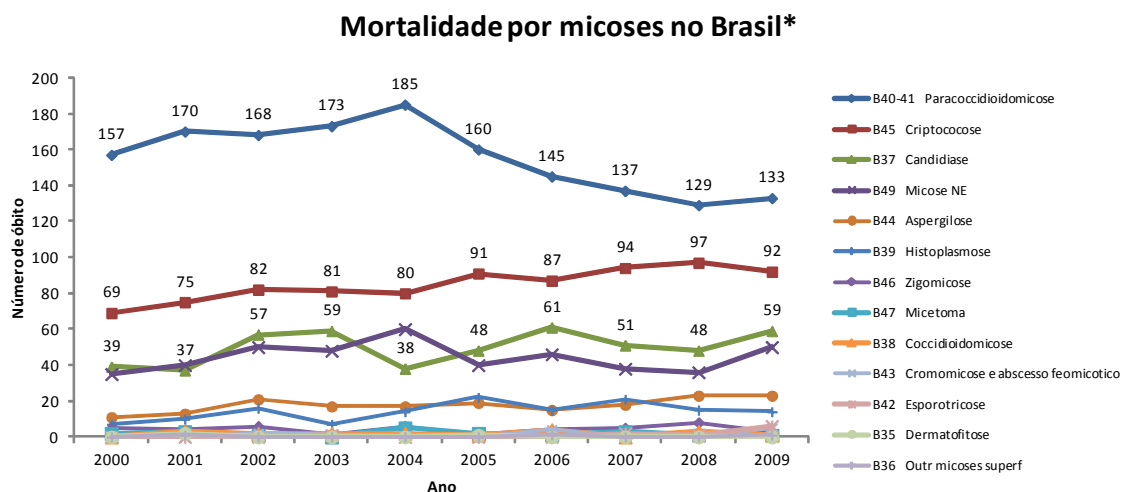
Em 18 de novembro de 1999, o Ministério da Saúde instituiu pela Portaria N^o1339/GM, a Lista de Doenças relacionadas ao Trabalho, a ser adotada como referência dos agravos originados no processo de trabalho no Sistema Único de Saúde, no qual a paracoccidiodomicose se inclui, para uso clínico e epidemiológico (Brasil, 1999).

Hotez et al. (2008) propuseram que a PCM integrasse a relação de doenças tropicais negligenciadas da América Latina e Caribe com impacto econômico em Saúde Pública. Segundo Martinez (2010), as características epidemiológicas, clínicas e sociais da PCM resultam em baixa visibilidade da doença como problema de Saúde Pública, não havendo, assim, programas governamentais direcionados para esta micose, salvo em alguns Estados, como Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rondônia e São Paulo (Bittencourt, 2002; Mato Grosso do Sul, 2005; Minas Gerais, 2008; SES, 2008; Mendes, 2010).

A distribuição geográfica da PCM se restringe aos países da América Latina, ocorrendo desde o México até a Argentina, com maior incidência no Brasil, com aproximadamente 80% dos casos; Colômbia, Venezuela e Argentina (Brummer et al., 1993; Wanke e Londero, 1994; Lacaz et al., 2002; Colombo et al., 2011).

O número de pessoas infectadas por *Paracoccidioides* sp nas regiões endêmicas é estimado em, aproximadamente, 10 milhões. A maioria, no entanto, não apresenta sintomas clínicos evidentes, estima-se que cerca de 1-2% dos indivíduos infectados desenvolvam a doença. A falta de surtos epidêmicos, a grande dificuldade de isolar o micro-organismo na natureza, o prolongado período de latência e as frequentes migrações das populações, tornam praticamente impossível a identificação do local preciso onde a infecção foi adquirida (Restrepo, 1985; Calle et al., 2001; Restrepo et al., 2001; Colombo et al. 2011).

Estima-se que, a cada ano, a taxa de incidência na população brasileira seja de 1-3 casos por 100.000 habitantes e a de mortalidade de 1,4 por milhão de habitantes. Até 2002, a PCM figurava como a oitava causa de morte por doença, entre infecciosas e parasitárias. (Coutinho et al., 2002). Informações registradas durante o período de 2000 a 2009, junto ao Sistema de Informações sobre Mortalidade, do Ministério da Saúde, demonstram que a infecção por *Paracoccidioides* sp ainda é considerada a principal causa de mortalidade entre as micoses no país, apresentando média de 155,7 óbitos/ano (**Figura 1**).



*Dados extraídos da internet. Fonte: Ministério da Saúde. DATASUS. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>. Acesso em: 26/08/2011.

Figura 1: Número de óbitos por micoses no Brasil, no período de 2000 a 2009.

No Brasil, a PCM é encontrada em praticamente todas as regiões: Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Norte, além de casos esporádicos relatados no Nordeste. Entretanto, pelo fato de não ser doença de notificação compulsória, não é possível determinar a real incidência e prevalência desta micose no país (Coutinho et al., 2002; Shikanai-Yasuda et al., 2006; Colombo et al., 2011). Soma-se a não obrigatoriedade de notificação, o fato de que os poucos dados disponíveis baseiam-se, principalmente em inquéritos epidemiológicos bem como na experiência de serviços de referência no atendimento de pacientes com a doença (Lacaz et al., 1959; Londero, 1982; Marques et al., 1983; Wanke e Londero, 1994; Mangiaterra et al., 1996; Fava e Fava Netto, 1998; Silva-Vergara e Martinez, 1998; Blotta et al., 1999; Rodrigues, 2004; Fornajeiro et al., 2005; Kamikawa, 2011).

No Brasil, a região Sudeste é considerada, por diversos autores, como área de grande endemicidade para PCM (Coutinho et al., 2002; Barrozo et al., 2009; Wanke e Aidê, 2009; Barrozo et al., 2010).

Coutinho et al. (2002), avaliando a mortalidade da PCM, observaram o registro de 1.707 óbitos (53,7% entre as micoses sistêmicas), com média de 106,7 óbitos/ano na região Sudeste, demonstrando que a taxa de mortalidade nesta região é estimada em 1,81 habitantes/milhão. Prado et al. (2009) avaliaram a mortalidade por micoses sistêmicas como causa primária de morte ou em associação com aids no Brasil, no período de 1996 a 2006, verificando que as taxas mais elevadas relacionadas à PCM foram encontradas nos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro.

Santo (2008) analisou a tendência da mortalidade relacionada à PCM no Estado de São Paulo pela avaliação das causas múltiplas de morte, considerando todos os óbitos ocorridos entre 1985 e 2005, cujas declarações de *causa-mortis* informassem a micose em qualquer linha ou parte do atestado médico. Segundo o autor, das 24 Direções Regionais de Saúde (DIRs) do Estado de São Paulo, 15 apresentaram, no total de

menções de PCM, coeficientes superiores a 2,66; evidenciando-se valores de 8,73 em Botucatu, 7,74 em São João da Boa Vista e 7,25 em Barretos. Entretanto, as DIRs com maior mortalidade relacionada à doença foram as de Campinas, com 223 óbitos; Capital, com 212; Sorocaba, com 203; Piracicaba, com 119; São José do Rio Preto, com 114; São João da Boa Vista, com 109 e Ribeirão Preto, com 107 mortes.

A região central do Estado de São Paulo é responsável pela maior frequência de relatos da doença (Marques et al., 1983; Blotta et al., 1999; Santo, 2008; Kamikawa, 2011).

Marques et al. (1983) definiram Botucatu e região como importante área endêmica da micose. Avaliando a procedência dos pacientes atendidos nas enfermarias de Dermatologia e de Moléstias Infecciosas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UNESP - Campus de Botucatu, entre 1968 a 1980, verificaram que 80% eram procedentes da região centro-sudoeste do Estado de São Paulo. Destes, 14,2% residiam no município Botucatu, 12,8% em São Manuel e 10,7% em Avaré.

Blotta et al. (1999) realizaram estudo clínico-epidemiológico analisando 584 pacientes atendidos pelo Hospital Universitário da Universidade de Campinas (HU-UNICAMP, Campinas, São Paulo), no período de 1988 a 1996. Segundo a autora, 89,7% dos indivíduos eram provenientes do Estado de São Paulo; destes, 47,9% residiam em Campinas, 11,9% em São João da Boa Vista, 11,5% em Limeira, 8,1% em Jundiaí, 6,1% em Piracicaba, 5,9% em Sorocaba e 8,6% em cidades próximas a Campinas.

Rodrigues (2004) avaliou, por inquérito epidemiológico, municípios de Pratânia, São Paulo, por meio de reações intradérmicas, usando como

antígeno paracoccidioidina. A autora encontrou 51,2% de reatividade, sugerindo elevada prevalência da infecção por *P. brasiliensis* na área estudada. A observação de que, entre crianças de cinco (5) a 13 anos de idade, a taxa de reatividade era igual a 32,5%, representou um forte indicativo da presença do patógeno em Pratânia, sugerindo que a localidade é uma importante área endêmica para PCM.

Entre 1980 e 1999, a incidência da PCM no distrito de Ribeirão Preto, região Nordeste do Estado, foi avaliada em 2,70 casos para cada 100.000 habitantes/ano. Neste estudo de coorte com 1000 pacientes, Martinez (2011) demonstrou que 50% eram munícipes de Ribeirão Preto; 36% eram moradores de cidades vizinhas a Ribeirão Preto e 14% eram do Estado de Minas Gerais.

Kamikawa (2011) demonstrou que 60% dos municípios do Estado apresentam ao menos um paciente com anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis*, detectados por imunodifusão dupla em gel de agarose. A autora observou que a maioria dos pacientes sorologicamente reagentes para *P. brasiliensis* concentram-se nas macro-regiões de Campinas, São Paulo e Grande São Paulo, Sorocaba e São João da Boa Vista. Contudo, as maiores taxas de reatividade foram observadas nos municípios de Piracicaba, Franca, Araçatuba e Presidente Prudente. A autora, por sua vez, ressalta que não foram incluídas no estudo, amostras de pacientes atendidos nos serviços de referência de importantes pólos endêmicos da doença como Botucatu, Ribeirão Preto, Araraquara e Bauru.

A variedade de manifestações clínicas da PCM pauta-se tanto em fatores relacionados ao fungo, como virulência, carga fúngica, patogenicidade e composição antigênica; quanto ao hospedeiro, como susceptibilidade genética, faixa etária, gênero, ocupação profissional, tabagismo, etilismo, desnutrição, raça/etnia, tempo de exposição ao patógeno e deficiência do sistema imunológico (Londero, 1982; Marques et

al., 1983; Franco, 1987; Martinez e Moya, 1992; Brummer et al., 1993; Kurokawa et al., 1998; Blotta et al., 1999; Santos et al., 2003; Verli et al., 2005; Nogueira et al., 2006; Calich et al., 2008; Martinez, 2011).

A doença acomete indivíduos em todas as faixas etárias, na grande maioria das vezes, do sexo masculino, entre 30 e 50 anos de idade. Diversos trabalhos demonstram que, apenas, de 3 a 10% dos pacientes com PCM ativa apresentam faixa etária inferior a 15 anos de idade (Brummer et al., 1993; Marques, 1998; Blotta et al., 1999; Shikanai-Yasuda et al., 2006).

Segundo Stover et al. (1986), a incidência da PCM é 13 a 87 vezes superior em homens que em mulheres. Por sua vez, Rodrigues (2004) demonstrou não existir diferença nas taxas de infecção por *P. brasiliensis* entre indivíduos de ambos os sexos. Além disso, dados da literatura demonstram haver aumento da prevalência/frequência da doença na quinta década de vida de pacientes do sexo feminino e que meninos e meninas pré-púberes são acometidos igualmente pela doença (Aristizabal et al., 1998; Shankar et al., 2011). Este fato pode ser explicado pela ação protetora do hormônio β -estradiol que inibe o processo de transformação das formas micelianas (infectantes) em levedura (parasitária), conferindo proteção às mulheres em fase fértil (Restrepo et al., 1984; Stover et al., 1986; Aristizabal et al., 2002; Shankar et al., 2011).

Os trabalhadores rurais são os mais comumente acometidos pela doença, com prevalência variando de 44,3 a 76,2% nas diversas populações estudadas; atividades ligadas à construção civil também são frequentemente reportadas, em 5 a 20% dos casos (Marques, 1998; Blotta et al., 1999; Bicalho et al., 2001; Godoy e Reichart, 2003; Paniago et al., 2003; Verli et al., 2005).

Botteon et al. (2002) demonstraram a existência de uma proporção expressiva de pessoas residentes em área rural e reagentes frente ao antígeno imunodominante de *P. brasiliensis*, ou seja, a gp43. Segundo os autores, estes dados sugerem fortemente que estes indivíduos encontram-se frequentemente expostos ao agente etiológico da PCM, desenvolvendo primeiramente a forma subclínica da doença. No entanto, há relatos de casos em pessoas que desenvolveram a enfermidade sem nunca saírem de áreas urbanas (Brummer et al., 1993; De Camargo e de Franco, 2000; Shikanai-Yasuda et al., 2006).

A PCM se caracteriza pelo desenvolvimento de lesões granulomatosas com frequente evolução crônica, envolvendo pulmão, pele, membranas mucosas e outros tecidos. Quando não diagnosticada e tratada corretamente, o processo infeccioso causado por *Paracoccidioides* sp pode levar a formas disseminadas graves e letais, com rápido e progressivo envolvimento de diversos órgãos e tecidos (Franco, 1987).

De acordo com as manifestações clínicas e os parâmetros imunológicos da doença, a PCM pode apresentar três formas: PCM-infecção, PCM-doença e PCM-residual (Franco et al., 1987; Franco et al., 1989; Mendes, 1994; Padilha-Gonçalves, 1996; Shikanai-Yasuda et al., 2006).

A PCM-infecção se refere à forma assintomática da doença; é observada em indivíduos que apresentam positividade na intradermoreação (IDR) frente à paracoccidioidina (Franco, 1987).

A PCM-doença pode se apresentar sob a forma aguda (tipo juvenil) e crônica (tipo adulto). A forma aguda apresenta manifestações clínicas mais graves, acometendo jovens de ambos os sexos. Esta forma representa menos de 10% dos casos da micose, que em geral, se origina de uma infecção primária e dissemina-se rapidamente por meio das vias linfáticas

para o sistema monocítico-macrofágico, causando hepatoesplenomegalia e possível disfunção medular. As lesões em mucosas são pouco frequentes e o comprometimento pulmonar é raro (Franco, 1987; Mendes, 1994; SES, 2008).

A forma crônica caracteriza-se por apresentar evolução lenta, progredindo a partir de um único foco quiescente, podendo comprometer um único órgão (unifocal) ou se disseminar para outros órgãos (multifocal). Acomete, principalmente, adultos do sexo masculino em idade produtiva, entre 30 e 50 anos e representa cerca de 90% dos casos da PCM-doença (Franco, 1987; SES, 2008).

A PCM-residual constitui uma forma clínica importante pela frequência com que se manifesta, mesmo após tratamento eficaz. As principais sequelas relacionam-se ao comprometimento pulmonar, adrenal, laríngeo, digestivo, encefálico e tegumentar (SES, 2008).

Em relação ao tratamento da PCM, vários antifúngicos podem ser utilizados, tais como anfotericina B, sulfamídicos e azólicos. Diferente de outras espécies fúngicas patogênicas, *P. brasiliensis* é sensível à maioria das drogas antifúngicas preconizadas, inclusive aos sulfamídicos (Shikanai-Yasuda et al., 2006; SES, 2008). Todos os casos confirmados e prováveis da micose devem ser tratados. A duração do tratamento esta intimamente relacionada à gravidade da doença e ao tipo de droga utilizada. Geralmente, o tratamento é de longa duração, para permitir o controle das manifestações clínicas e evitar as recaídas. O paciente deve permanecer em tratamento e acompanhamento até a obtenção dos critérios de cura, com base nos parâmetros clínicos, radiológicos e sorológicos (Shikanai-Yasuda et al., 2006; SES, 2008).

Além da terapia antifúngica específica, o paciente deverá receber assistência para as condições gerais como desnutrição, tratamento

odontológico, doença de Addison e co-morbidades (tuberculose, aids, enteroparasitoses, infecções bacterianas pulmonares) (Shikanai-Yasuda et al., 2006; SES, 2008). O custo médio do tratamento por paciente é estimado em R\$ 1.258,00¹, entretanto o valor social das complicações acarretadas pela doença não tem sido adequadamente avaliado pela comunidade científica e pelas autoridades de saúde.

1.1.1. Diagnóstico laboratorial da paracoccidioidomicose

O diagnóstico definitivo para a maioria das micoses, incluindo PCM, é a identificação do agente etiológico pelo exame a fresco e/ou por processos histológicos e/ou o isolamento do fungo em cultura, este último, considerado o método padrão-ouro (Lacaz et al., 2002; Shikanai-Yasuda et al., 2006, SES, 2008).

No exame a fresco, especialmente em material de punção ganglionar, formas parasitárias do fungo são geralmente abundantes e apresentam aspectos característicos de células globosas, ovais ou elípticas, com 5 a 25 µm de diâmetro, dupla parede birrefringente, com ou sem gemulações e inclusões citoplasmáticas. Em outros espécimes clínicos, como escarro e/ou raspado de lesões bucais, ocasionalmente, podem ser observadas formas isoladas, diminutas, apresentando brotamento único, com parede espessa e refringente. Neste caso, a distinção com outras espécies fúngicas deve ser realizada, visando o diagnóstico diferencial para *Candida* sp, *Cryptococcus* sp e *H. capsulatum* (Mendes-Gianini e Melhem, 2001; Lacaz et al., 2002; SES, 2008).

¹ Valor apresentado pela Dr.^a Maria Adelaide Mellington do Serviço de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, durante reunião ocorrida em 2007 para planejamento do Sistema de Vigilância e Monitoramento de Micoses Endêmicas no Brasil (SVS-CGLAB-MS, 2007).

O material obtido para citologia (escarro, lavado e escovado brônquico) quando corado pela técnica de Papanicolaou, revela a presença de células gigantes e de estruturas birrefringentes, sugestivas de fungos. Entretanto, para melhor visualização, recomenda-se a utilização da coloração pela prata (método de Gomori-Grocott), pois permite na grande maioria das vezes, a observação do aspecto morfológico típico de *P. brasiliensis*, ou seja, oval, com formato típico de roda de leme, em que a célula-mãe apresenta múltiplas exo-esporulações, ou com aspecto de “roda de leme”, visto que a célula-mãe apresenta dois brotamentos. A presença destas estruturas fúngicas nos esfregaços citológicos, microabscessos ou associado às células gigantes multinucleadas, confere valor patognomônico para estabelecer o diagnóstico de PCM (Mendes-Gianini e Melhem, 2001; Lacaz et al., 2002; SES, 2008).

O exame histopatológico em tecidos, obtidos por biópsia, utilizando colorações especiais como o Gomori-Grocott ou ácido periódico de Schiff (PAS) pode auxiliar no diagnóstico da PCM por meio da observação do agente etiológico no interior dos granulomas. Estes são formados por células gigantes multinucleadas e células epitelióides, cujo centro contém uma ou mais células fúngicas em contato com leucócitos polimorfonucleares. Importante salientar que na coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) o fungo não é corado, observando-se a imagem negativa das células leveduriformes. Neste caso, deve ser considerado o diagnóstico diferencial com *Pneumocystis jiroveci*, que também não é corado pela HE e apresenta formas negativas do mesmo tamanho que *P. brasiliensis*, porém sem brotamento (SES, 2008).

Para o isolamento de *Paracoccidioides* sp em cultura, recomenda-se o emprego de meios enriquecidos com extrato de levedura, contendo antibióticos ou ainda, ágar infusão de cérebro e coração (BHI) (Lacaz 1977; Mendes-Giannini e Melhem, 2001; Lacaz et al., 2002). O material biológico

semeado é incubado a 25-30°C crescendo lentamente (15 a 30 dias) sob a forma de micélio, apresentando colônias brancas ou amarronzadas, cotonosas ou glabras. Contudo, para o diagnóstico definitivo e identificação correta do micro-organismo é necessário realizar a reversão da cultura do estágio filamentososo para leveduriforme. Nesta fase, o fungo pode ser cultivado em meio Kelley à base de ágar-hemoglobina, sendo incubado a temperatura de 35-37°C (Lacaz et al., 1984; Brummer et al., 1993; Lacaz et al., 1998; Mendes-Giannini e Melhem, 2001; Lacaz et al., 2002).

Contudo, em algumas situações o estado físico ou clínico dos pacientes impossibilita o acesso ao local da lesão, impedindo assim a coleta do material biológico. O tempo prolongado (2 a 6 semanas) necessário para o crescimento e identificação dos fungos termo-dimórficos em cultura, também dificulta o diagnóstico, provocando atraso na liberação do resultado e, conseqüentemente, na introdução de medidas terapêuticas específicas (Mendes-Giannini e Melhem, 2001; Lacaz et al., 2002).

A pesquisa de anticorpos circulantes específicos, empregando-se técnicas imunológicas, possui papel fundamental no diagnóstico presuntivo, ou indireto, das micoses sistêmicas; constituindo, na prática, a mais importante ferramenta do diagnóstico laboratorial. Por vezes, o resultado sorológico se traduz na primeira indicação da natureza micótica da doença, principalmente naqueles indivíduos que ainda não apresentam sinais clínicos aparentes. Além disso, a determinação do título de anticorpos circulantes possibilita ao clínico avaliar a progressão e/ou regressão da doença (Mendes-Giannini et al., 1994; Mendes-Gianini e Melhem, 2001; Lacaz et al., 2002; Camargo, 2008).

Ao longo dos anos, diversos estudos têm sido realizados visando à obtenção de antígenos padronizados, específicos, reprodutíveis e estáveis, para serem utilizados no imunodiagnóstico da PCM (Fava Netto et al., 1969; Blumer et al., 1984; Fava Netto, 1984; Burgos et al., 1985; Camargo et al.,

1988; Assis et al., 1989b; Camargo et al., 1991; Blotta e Camargo, 1993; Da Silva et al., 2001; Camargo et al., 2003).

Segundo Yaszábal (1971), *P. brasiliensis* apresenta em sua constituição, uma multiplicidade de componentes antigênicos, alguns próprios da espécie e outros comuns aos demais fungos. Estes antígenos podem ser extraídos da parede celular do patógeno, obtidos do conteúdo citoplasmático (somático ou citoplasmático) ou ainda do filtrado de cultura (metabólicos ou exocelulares) (Restrepo et al, 1985).

Dados da literatura demonstram grande heterogeneidade entre as metodologias utilizadas para a produção de antígenos de *P. brasiliensis* em diferentes laboratórios. Entre as modificações encontradas, pode-se citar: a escolha do isolado fúngico, tamanho do inóculo inicial, meio de cultura utilizado, período e forma de incubação (com ou sem agitação), temperatura, entre outros. A variabilidade destes parâmetros, por sua vez, muitas vezes interfere no produto final (Cano e Restrepo, 1997; Camargo et al., 1988; Del Negro et al., 1991; Kloth et al., 2001; Camargo, 2008).

Neste sentido, o principal componente antigênico de *P. brasiliensis* é a glicoproteína de 43 kDa (gp43); considerada desta forma, por ser reconhecida no soro de praticamente todos os pacientes com PCM (Camargo et al. 1989; Giannini et al., 1990; Travassos, 1994; Travassos et al., 1995). Esta molécula encontra-se presente na parede celular do fungo e relaciona-se diretamente com mecanismos de invasão celular no tecido hospedeiro e com a patogênese da doença (Vicentini et al., 1994). A gp43 apresenta várias isoformas, com ponto isoelétrico (pI) básico de 6,85 a 5,8 sendo o principal antígeno específico purificado para utilização em ensaios sorológicos (Puccia et al., 1986; Brummer et al., 1993; Campos et al, 1995; Mattos Grosso et al., 2003).

O outro componente antigênico considerado marcador de infecção por *Paracoccidioides* sp é a glicoproteína de 70 kDa, conhecida como gp70. Esta molécula possui polissacarídeos como componentes predominantes, interferindo, *in vitro*, na inibição da fagocitose e localizando-se principalmente no compartimento intracelular do fungo, embora pequena quantidade possa também ser detectada em filtrados de cultura (sobrenadante) (Unterkircher, 1988; Mattos Grosso et al., 2003). A gp70 é reconhecida por aproximadamente 95,0% dos soros de pacientes com PCM em atividade (Puccia et al., 1986; Camargo et al., 1989; Silva et al., 2008). No entanto, segundo observação de Camargo et al. (1989), a terapia antifúngica pode estar envolvida na redução do reconhecimento desta fração.

Entre os ensaios sorológicos existentes, a imunodifusão dupla (ID) em gel de agarose tem sido o método utilizado com maior frequência na rotina dos laboratórios clínicos para o diagnóstico da PCM. Esta técnica oferece baixo custo operacional, sensibilidade variável (60-100%), especificidade e valor preditivo próximos de 100%, além de permitir a avaliação da eficácia terapêutica através do acompanhamento dos títulos de anticorpos específicos (De Camargo e de Franco, 2000; Elias-Costa et al., 2000; Mendes-Giannini e Melhem, 2001; Camargo, 2008). Segundo Siqueira (1982), os resultados obtidos a partir desta técnica podem variar devido a diferentes parâmetros; entre os quais a preparação antigênica utilizada, a manifestação clínica da doença e o início do tratamento.

Na ID, quando se utiliza como antígeno filtrado de cultura obtido a partir de células leveduriformes de *P. brasiliensis* frente a soros de pacientes com suspeita clínica da doença, é possível detectar até três linhas de precipitação. O aparecimento de uma linha próxima ao orifício do antígeno é observado em aproximadamente 95 a 98% dos soros de pacientes portadores de doença ativa, sendo esta, a última a desaparecer após a instauração da terapia antifúngica. O número de bandas observadas está

intimamente relacionado à severidade da doença (Siqueira, 1982; Mendes-Giannini et al., 1994).

Os testes imunoenzimáticos, como ELISA ou *immunoblotting* (IB), têm sido utilizados para a detecção de anticorpos em quase todas as micoses sistêmicas, senão em todas. Segundo Giannini et al. (1990), a determinação da resposta IgG anti-gp43 é utilizada não apenas para o diagnóstico confirmatório da PCM, mas também como um mecanismo para o acompanhamento da eficácia do tratamento ao qual o paciente foi submetido. Os autores verificaram que empregando provas mais sensíveis, como os ensaios imunoenzimáticos, foi possível detectar a presença de anticorpos anti-gp 43 em todos os pacientes no momento do diagnóstico clínico. Observou-se, ainda, que pacientes com a forma aguda da doença possuíam índices elevados de IgG. Anticorpos da classe IgM anti-gp43 foram detectados em 100% dos pacientes portadores da forma aguda e em apenas 46,6% dos pacientes com a forma crônica. A detecção de anticorpos circulantes anti-gp43 diminuiu com a melhora clínica promovida pelo uso de medicamentos específicos.

O método de ELISA tem sido adotado na prática sorológica devido sua fácil exequibilidade, possibilidade de automatização, alta sensibilidade (95 a 100%) e capacidade de detectar nanogramas de anticorpos por mililitro de soro. Apesar disso, em relação ao imunodiagnóstico da PCM, esta técnica ainda oferece grandes porcentagens de reatividade cruzada entre outras micoses, como histoplasmose, aspergilose, candidíase, doença de Jorge Lobo, coccidioidomicose, eventualmente, com infecções causadas por *Mycobacterium* sp; ou ainda, frente a soros de pessoas aparentemente saudáveis, residentes em áreas endêmicas para PCM (Siqueira, 1982; Camargo et al. 1984; Elias-Costa et al., 2000; Botteon et al., 2002; Maluf et al. 2003; Albuquerque et al., 2005).

O ensaio de ELISA para o sorodiagnóstico da PCM foi utilizado pela primeira vez por Arango et al. (1982) e depois, simultaneamente, por Camargo et al. (1984) e Mendes-Giannini et al. (1984), que comprovaram a existência de reatividade cruzada frente a soros heterólogos. Entretanto, os autores demonstraram que a absorção dos soros de pacientes com PCM com células de *C. albicans* ou *H. capsulatum* tornava a reação um pouco mais específica (Elias-Costa et al., 2000). Camargo et al. (1994) obtiveram alta sensibilidade e especificidade quando empregaram anticorpos monoclonais específicos para pelo menos dois epítomos diferentes da gp43, utilizando ELISA de captura para detectar a presença de anticorpos anti-gp43 no soro de pacientes com PCM.

Botteon et al. (2002) realizaram o primeiro estudo epidemiológico em indivíduos doadores de sangue, residentes em área endêmica, usando o teste de ELISA para detectar anticorpos circulantes anti-gp43 de *P. brasiliensis*, empregando como antígenos gp43 purificada e exoantígeno obtido a partir da amostra B-339. Neste estudo, foram avaliados indivíduos residentes na área rural de Londrina, PR e moradores de uma grande metrópole, São Paulo, SP. A análise dos resultados revelou que 21% das 700 amostras de soros provenientes de indivíduos da zona rural e 0,9% das 350 amostras de soro de indivíduos residentes em São Paulo foram positivas para ambos os antígenos avaliados. Os autores demonstraram que a absorção dos soros com antígeno de *H. capsulatum* reduziu para 12,8% a reatividade do grupo rural, abolindo a reatividade do grupo urbano frente à gp43.

Maluf et al. (2003) detectaram níveis de anticorpos anti-*P. brasiliensis* em 27% das 680 amostras de soros de indivíduos saudáveis, residentes nos municípios de Campo Mourão, Maringá, Cianorte e Umuarama, região Noroeste do Paraná, empregando o ensaio de ELISA clássico, frente a preparação Ag7 (obtido a partir do isolado B-339).

Díez et al. (2003), avaliaram a capacidade discriminatória da combinação de duas frações antigênicas purificadas de *P. brasiliensis*: o antígeno recombinante de 27 kDa e a proteína de choque térmico de 87 kDa, empregando ELISA de inibição, no diagnóstico confirmatório de pacientes com PCM. Foram avaliados soros de 37 pacientes, 40 soros de indivíduos portadores de outras patologias (histoplasmose, aspergilose, criptococose e tuberculose) e 50 soros de indivíduos saudáveis. Os autores verificaram que a combinação de frações antigênicas purificadas propiciou aumento significativo na sensibilidade da técnica (92%) comparado ao emprego destas frações isoladamente: 49% de sensibilidade para o antígeno recombinante de 27 kDa e 81% para a fração de 87 kDa.

Visando minimizar os altos índices de reatividade cruzada e melhorar a especificidade da técnica de ELISA para o diagnóstico da PCM; Albuquerque et al. (2005) empregaram como antígeno a fração de 43 kDa de *P. brasiliensis* tratada com diferentes concentrações de metaperiodato de sódio. Os autores avaliaram também o comportamento de outros parâmetros como a pré-absorção dos soros testes com antígenos de *C. albicans* e/ou *H. capsulatum*, bem como a diluição dos soros de pacientes com PCM na presença de galactose, o principal açúcar entre fungos patogênicos. Entretanto, mesmo após todas essas adaptações, o melhor índice de especificidade obtido foi de 84%, sugerindo que nenhum dos procedimentos adotados foi suficiente na eliminação da reatividade cruzada.

Camargo et al. (1989) e Restrepo (1992) verificaram, por *immunoblotting*, que anticorpos IgG anti-*P. brasiliensis* reagiram contra quatro componentes fúngicos principais com massa molecular de 70, 52, 43 e 20-21 kDa, presentes no antígeno Ag7, obtido a partir do isolado B-339; predominando a glicoproteína de 43 kDa (gp43), reconhecida por 100% dos soros de pacientes com PCM. Apesar desta metodologia ser extremamente sensível, o IB não é, ainda, acessível à rotina diagnóstica da PCM, sendo

mais comumente utilizado para a imuno-caracterização de antígenos de *P. brasiliensis* (Restrepo, 1992 e Elias-Costa et al., 2000).

Mendes-Giannini et al. (1989) avaliaram, por IB, pacientes com PCM juvenil e verificaram que 100% das amostras obtidas antes do início da terapia antifúngica reconheceram de forma específica a fração purificada de 43 kDa. A partir do décimo mês de tratamento, a detecção da mesma foi observada com menor frequência, tornando-se indetectável após 24 meses. Os autores constataram, ainda, que 100% dos soros de pacientes com PCM crônica, que não se encontravam em vigência terapêutica, reagiram frente à gp43 e que nenhuma amostra de paciente considerado clinicamente curado reconheceu esta mesma fração.

Segundo Del Negro et al. (1995) são raros os casos de pacientes que apresentam ausência de reatividade para *P. brasiliensis* pelas provas de imunodifusão dupla e contraímunoeletroforese (CIE). Entretanto, quando os soros não reagentes por estas técnicas, foram avaliados por IB, verificou-se que os mesmos reagem frente às moléculas de 43 e 70 kDa, consideradas marcadores sorológicos da doença.

Blotta e Camargo (1993) ao avaliarem, por IB, 60 soros de pacientes com PCM demonstraram que 100% das amostras reconheciam de forma específica a gp43; utilizando *cell-free antigen* (CFA) obtido a partir do isolado B-339. Recentemente, Moreto et al. (2008) empregando a mesma metodologia para avaliar soros de 64 pacientes com PCM ativa (32 reagentes e 32 não reagentes para *P. brasiliensis* por ID), observaram que todos os soros reagiram frente à gp43, utilizando antígeno metabólico do isolado 113 de *P. brasiliensis*, corroborando com os achados anteriores.

Takahachi et al. (1999) analisaram 78 soros de pacientes com suspeita clínica de PCM, que apresentaram ausência de reatividade pela prova de ID. Neste estudo, os autores empregaram como antígeno filtrado

de cultura do isolado B-339 de *P. brasiliensis*, cultivado durante sete (7) dias em caldo YPD (extrato de levedura, peptona e dextrose), a 35°C, sob agitação constante, e verificaram que, por IB, 51 amostras (65,4%) reagiram de forma específica frente à gp43 de *P. brasiliensis*.

Silva et al. (2008) analisaram 23 amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de PCM e verificaram que 65% apresentavam ausência de reatividade para *P. brasiliensis* por ID. A análise por IB, destes soros não reagentes por ID, revelou 95,4% de reatividade frente à gp43 e 100% frente à gp70, empregando-se antígeno obtido no 5º dia de cultura da amostra 113 de *P. brasiliensis*. Estes resultados demonstraram que o emprego do IB aumenta substancialmente a sensibilidade do imunodiagnóstico da PCM. Os autores sugerem, inclusive, a adoção de, pelo menos, dois (2) ensaios sorológicos para detecção de anticorpos, nos casos de diagnóstico duvidoso.

Vidal et al. (2005) relatam o caso de um paciente com comprometimento pulmonar que apresentou resposta sorológica atípica; ou seja, não reagiu pela técnica de *immunoblotting* frente à molécula de 43 kDa; reagindo, contudo, frente à fração antigênica de 70 kDa, descrita na literatura como sendo reconhecida por aproximadamente 96% dos soros de pacientes com PCM (Camargo et al. 1989). Este fato pode ser explicado pelos achados de Campos et al. (1995) e Souza et al. (1997) que versam sobre as diferentes isoformas da gp43.

A observação de resultados falso-negativos nos ensaios sorológicos que pesquisam anticorpos anti-*P. brasiliensis* podem corresponder de 33 a 66% das amostras avaliadas por ID em pacientes com PCM associada ao HIV/Aids (Marques et al. 1995; Paniago et al., 2005). Bellissimo-Rodrigues et al. (2010) demonstraram que a detecção de anticorpos no soro desses indivíduos é inferior em relação aos portadores de PCM endêmica, mesmo utilizando técnicas mais sensíveis como CIE e ELISA. Neste caso, a

pesquisa de antígenos fúngicos específicos em diferentes fluidos biológicos pode auxiliar o diagnóstico laboratorial (Gomez et al., 1998).

Marques-da-Silva et al. (2003; 2004) avaliaram o desempenho de um ELISA de inibição na pesquisa de antígenos específicos em pacientes com PCM, utilizando anticorpo monoclonal anti-gp43. Os autores demonstraram a presença de gp43 em 96,3% das amostras de soro avaliadas, com média de concentração de antígeno de 9,87 µg/ml; e em 100% das amostras de líquido e lavado bronqueoalveolar (LBA), com concentração média de 19,26 e 16,06 µg/ml, respectivamente. A gp70 foi detectada em 98,8% das amostras de soro e em todas as amostras de líquido e LBA, com médias de concentração inferiores à gp43 (8,19; 6,78 e 7,5 µg/ml). Os autores propõem que a quantificação de gp70 no soro possa ser utilizada na avaliação de pacientes durante o tratamento.

Goldani e Sugar (1998) sugerem que o uso da reação em cadeia pela polimerase (PCR) poderia ser ferramenta útil no diagnóstico precoce da PCM. Por ser um método mais sensível, específico e rápido, tem sido amplamente utilizado na detecção de uma variedade de micro-organismos. Entretanto, até os dias de hoje, não existem protocolos de extração, nem *primers* padronizados para a pesquisa de DNA fúngico em amostras biológicas, ficando cada laboratório com sua própria metodologia².

Bialek et al. (2000) empregaram a técnica de *nested* PCR para detectar fragmentos de DNA de *P. brasiliensis*, utilizando *primers* derivados do gene codificador da gp43 como alvo. As amostras de DNA foram obtidas a partir de homogenato de pulmão de 23 camundongos BALB/c infectados pela via intranasal com conídios de *P. brasiliensis*, de camundongos ICR

² Comentário realizado pela Dr.^a Beatriz L. Gómez do Laboratorio Central de Investigaciones, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia, durante curso "Convencional e Molecular Diagnoses of Endemic and Opportunistic Mycosis", realizado no XI International Meeting on Paracoccidioidomycosis – PCM 2011.

infectados com *H. capsulatum* e de camundongos não infectados. Os autores observaram que em 23 homogenatos de pulmão dos animais infectados por *P. brasiliensis* foi possível a detecção de material genético compatível com o agente etiológico da PCM, ou seja, foram observadas bandas de 196 pares de bases (pb). Dessa forma, os autores sugeriram que, pelo fato de ser a *nested* PCR, uma metodologia sensível e específica, a mesma poderia ser utilizada no diagnóstico da PCM em amostras de tecido.

Gomes et al. (2000) relatam o emprego da técnica de PCR para a detecção de DNA de *P. brasiliensis* em saliva de 11 pacientes portadores da forma crônica da PCM, empregando o *primer* PC2-PC6. Os autores observaram que todas as amostras analisadas foram positivas apresentando uma banda de 0,6 kb. Entretanto, a pesquisa do patógeno em amostras de sangue de pacientes parece não ser recomendada para o diagnóstico molecular da PCM.

Siqueira (2008) observou 56% de positividade por PCR analisando amostras de biópsia de pacientes com PCM ativa; entretanto, não obteve detecção de DNA nas amostras de sangue de pacientes doentes. Esses dados estão de acordo com Charbel et al. (2006) que também não obtiveram êxito na detecção molecular de *P. brasiliensis* em amostras de soro de pacientes. A baixa taxa de detecção relatada pode estar baseada na observação da escassez de fungemia pelo patógeno e de seu isolamento em culturas de sangue de pacientes e animais infectados (Singer-Vermes et al., 1993).

1.2. Histoplasmose

A histoplasmose clássica (HP), ou Doença de Darling, é uma infecção causada por *Histoplasma capsulatum*, um fungo geofílico e termodimórfico (Lacaz et al., 2002; Kasuga et al, 2003). É uma micose sistêmica, cosmopolita, de ampla distribuição geográfica; com detecção de casos autóctones em mais de 60 países, apresentando maior prevalência no continente americano e africano. Nas Américas estende-se desde o sul do Canadá até as regiões centrais da Argentina, sendo que as zonas endêmicas de maior importância se situam em Ohio, Bacia do Rio Prata, Serra do Mar, Vales do Rio Mississipi e Missouri (Zancopé-Oliveira e Wanke, 1987; Wu-Hsieh e Howard, 1989; Silva et al., 1999; Negroni, 2001; Lacaz et al., 2002; Panackal et al., 2002).

H. capsulatum é habitualmente encontrado em regiões de clima tropical ou temperado, com temperatura média anual entre 15 a 22°C, índice pluviométrico anual de 1.000 mm e umidade relativa do ar de 67 a 87% (Negroni, 2001; Lacaz et al., 2002). Esta espécie fúngica, como a grande maioria das espécies pertencentes ao Reino Fungi, é ubíquo, ou seja, apresenta como habitat não apenas o solo das grutas e cavernas, nem somente locais onde há criação de aves. Pode, também, ser encontrada em áreas públicas como parques, praças, bosques e coleções hídricas, bem como chácaras, sítios e fazendas, forros de casas e/ou celeiros habitados por morcegos (Zancopé-Oliveira e Wanke, 1987; Wu-Hsieh e Howard, 1989; Silva et al., 1999; Negroni, 2001).

No Brasil, assim como as demais infecções causadas por fungos patogênicos, o fato da HP não ser doença de notificação compulsória torna extremamente difícil o mapeamento da real distribuição da doença. A incidência desta micose tem sido demonstrada pela observação de casos clínicos autóctones, seja sob a forma de casos isolados ou sob a forma de

microepidemias; bem como pela realização de inquéritos epidemiológicos empregando o teste cutâneo com histoplasmina.

Diversos estudos têm demonstrado variabilidade na endemicidade da HP. Casos de infecção e doença foram relatados nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina, Goiás, Amazonas, Bahia, Pará e Pernambuco (Londero e Ramos, 1978; Lacaz et al., 1984; Zancopé-Oliveira e Wanke, 1987; Silva-Vergara e Martinez, 1998; Severo et al., 2001; Cury et al., 2001, Vicentini-Moreira et al., 2008; Passos, 2009). As regiões Sudeste e Centro-Oeste do país apresentaram, em inquéritos epidemiológicos, as maiores taxas de positividade em teste cutâneo, 3,0-93,2% e 4,4-63,1%, respectivamente (Guimarães et al., 2006).

Segundo Kwon-Chung e Bennett (1992), locais onde existem elevadas concentrações de aves ou morcegos podem dar origem a surtos epidêmicos ou microepidêmicos que diferem em sua magnitude quando da exposição simultânea de pessoas ao agente infectante. Wheat et al. (1982) relataram o que talvez tenha sido a maior epidemia de HP já descrita, em uma pequena cidade de Indianápolis, EUA. Os autores descreveram que após o desmatamento de um bosque, possivelmente, o vento tenha levado, a “poeira criada”, contendo partículas fúngicas infectantes, aos prédios vizinhos da região, resultando em um saldo de 120.000 pessoas presumivelmente infectadas; 488 casos de doença e 60 pacientes com histoplasmosose fatal ou muito grave.

Wanke (1985) determinou a frequência da HP infecção, empregando o teste de hipersensibilidade do tipo tardio, avaliando uma população de 453 indivíduos, residentes em Praia Vermelha (Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ) encontrando 94,6% de positividade. Zancopé-Oliveira e Wanke (1986) realizaram em área periurbana do município do Rio de Janeiro (localidade de

Rio da Prata) inquérito epidemiológico, empregando histoplasmina, em 470 escolares, com faixa etária entre 5 a 14 anos, encontrando 19,6% de positividade.

Zancopé-Oliveira e Wanke (1987) avaliaram o índice de contaminação do solo pelo *H. capsulatum* na localidade de Rio da Prata (RJ), área periurbana com características rurais. A análise de 111 amostras de solo coletadas em diferentes locais revelou positividade em oito (8) (7,2%). Todas as amostras analisadas foram colhidas de galinheiros, sendo que em um destes foi observado a existência de guano de morcegos. Segundo os pesquisadores, o elevado nível de contaminação do solo nesta região pode ser comparado aos níveis observados em áreas endêmicas para HP nos EUA.

Zembruski et al. (1996) demonstraram a endemicidade da HP no Estado do Rio Grande do Sul ao realizar inquérito epidemiológico na região do Vale do Rio Jacuí. Segundo os autores, *H. capsulatum* foi isolado do solo e 89% da população masculina jovem desta região apresenta positividade ao teste cutâneo com histoplasmina.

No Brasil, diversos trabalhos relatam o encontro do agente etiológico da HP em todas as regiões da Federação. Desde 1958, foram relatadas 27 microepidemias em dez Estados (Rio de Janeiro, São Paulo, Distrito Federal, Rio Grande do Sul, Paraíba, Amazonas, Minas Gerais, Bahia, Santa Catarina e Mato Grosso do Sul). O número de casos suspeitos nestes surtos variou de dois (2) a 35 e as principais fontes de infecção foram: visitas a grutas contendo grandes quantidades de fezes de morcego, seguidas por visitas a minas abandonadas e contato com excretas de galinhas confinadas em galinheiros (Unis et al., 2005; Oliveira et al., 2006; Lima et al., 2008; Vicentini-Moreira et al., 2008, Passos, 2009) (**Quadro 1**).

Quadro 1: Microepidemias de histoplasmose no Brasil: 1958 a 2008*.

Ano	Cidade	UF	Fonte de infecção	Casos	Referência
1958	Paraíba do Sul	RJ	Gruta com morcegos	13	Paula, 1959
1959	Santa Teresa	RJ	Caixa d' água	7	Paula, Aidé, 1979
1966	Ubatuba	SP	Forro de casa	8	Fava Netto et al., 1967
1967	Brasília	DF	Gruta com morcegos	14	Schmidt et al., 1973
1971/73	Ubatuba	SP	Gruta com morcegos	10	Fava Netto et al., 1976
1972	Vassouras	RJ	Gruta com morcegos	5	Paula, Aidé, 1979
1975	Rio de Janeiro	RJ	Gruta com morcegos	5	Rêgo et al., 1976
1978	Angra dos Reis	RJ	Gruta	8	Paula, Aidé, 1985
1978	Canoas	RS	Oco de árvore com morcegos	2	Severo et al., 1981
1981	Rio de Ouro	RJ	Gruta	10	Paula, Aidé, 1985
1981	São Gonçalo	RJ	Mina abandonada	10	Wanke, 1985
1981	São Gonçalo	RJ	Mina abandonada	4	Wanke, 1985
1981	Itaipava-Petrópolis	RJ	Minas abandonadas	10	Wanke, 1985
1982	São Gonçalo	RJ	Gruta com morcegos	6	Verbicário et al., 1993
1982	Itaipava-Petrópolis	RJ	Minas abandonadas	5	Wanke, 1985
1982	Niterói	RJ	Mina abandonada	6	Wanke, 1985
1984	PendotibaNiterói	RJ	Galeria de águas	17	Paula, Aidé, 1985
1984	Tinguá	RJ	Galinheiro	12	Paula, Aidé, 1985
1986	Borborema	PB	Chaminé com morcegos	6	Fernandes et al., 1989
1993	Taquari	RS	Galinheiro	2	Severo et al., 1993
1993	Manaus	AM	Gruta com guano	8	Suzaki et al., 1995
1997	Pedro Leopoldo	MG	Caverna com morcegos	4	Cury et al., 2001
2000	Jequié	BA	Porão com morcegos	4	Martins et al., 2000
2003	Niterói	RJ	Forno desativado	5	Martins et al., 2003
2005	Porto Alegre	RS	Adubagem - fezes de galinha	3	Unis et al, 2005
2006*	Blumenau	SC	Forro de casa com guano	2	Oliveira et al., 2006
2007	Cáceres	MS	Caverna com morcegos	34	Lima et al., 2008
2007	Arapeí	SP	Caverna com morcegos	35	Vicentini-Moreira et al., 2008
Total:				255	

NR: Não referido
* Ano da publicação

*Adaptado de Passos (2009).

Interessante comentar, que a ocorrência de microepidemias ou surtos de HP tem aumentado entre indivíduos que buscam no ecoturismo uma nova forma de lazer (Cury et al., 2001; Anjos et al, 2007; Anjos et al., 2008; Vicentini-Moreira et al. 2008, Passos, 2009). Na América do Norte, a HP tem sido considerada por diversos pesquisadores como doença recreacional entre espeleólogos. Panackal et al. (2002) relatam que 60 a 64% dos indivíduos que possuem o hábito de frequentar cavernas e/ou grutas apresentam teste cutâneo positivo à histoplasmina.

Anjos et al. (2007, 2008) avaliaram por IB, soros de profissionais que trabalham como guia do Parque Turístico do Petar e de indivíduos que têm como atividade de lazer o hábito de visitar cavernas, verificando que 100% dos soros analisados reconheceram de forma específica a fração M de *H. capsulatum*. Estes estudos demonstraram que indivíduos que apresentam como atividade profissional, ou *hobby*, a prática de visitar cavernas entram em contato com o fungo, podendo, em conjunto com outros fatores, desenvolver HP-infecção.

Vicentini-Moreira et al. (2008) relataram um surto de histoplasrose pulmonar aguda, ocorrido na cidade de Arapeí, São Paulo, após a visita de um grupo de 35 indivíduos a uma caverna habitada por morcegos e que já havia sido anteriormente interditada após a confirmação do isolamento de *H. capsulatum*. Neste estudo, a confirmação da infecção por esta espécie fúngica foi realizada empregando-se provas imunológicas (imunodifusão dupla e *immunoblotting*) visto não ter ocorrido coleta de material para análise micológica. A análise sorológica das amostras realizadas após a visita a caverna, revelou que apenas um (1) indivíduo apresentou anticorpos séricos específicos por ID, enquanto 62% apresentaram reatividade por IB. Entretanto, a avaliação das amostras coletadas dois (2) meses após a “suposta” exposição ao agente etiológico, demonstrou a presença de anticorpos anti-*H. capsulatum* em 97% das amostras pela prova de imunodifusão e em 100% por *immunoblotting*. A detecção das frações H e M permitiu aos autores, confirmar a infecção aguda dos indivíduos.

Acredita-se que o mecanismo de infecção por *H. capsulatum* se faça pela via aérea superior por meio da inalação de propágulos fúngicos infectantes. Estes se instalariam primeiramente nos alvéolos pulmonares, invadindo posteriormente os linfonodos hilo-mediastinais com consequente disseminação pela corrente sanguínea. A partir daí, a extensão da doença será determinada pela resposta tissular do hospedeiro contra o processo

infeccioso (Wu-Hsieh e Howard, 1989; Eissenberg e Goldman, 1991; Silva et al., 1999; Marques et al., 2000; Lacaz et al., 2002).

As manifestações clínicas da HP incluem desde a forma assintomática, pulmonar aguda, pulmonar crônica à infecção extrapulmonar disseminada (Goodwin et al., 1980; Goodwin et al., 1981; Eissenberg e Goldman, 1991; Alves, 1996; Silva et al., 1999, Ferreira e Borges, 2009). Nos pacientes imunodeprimidos, principalmente nos portadores de HIV/Aids, doenças neoplásicas, transplantados e diabéticos, a infecção por *H. capsulatum* representa doença de alta gravidade ou sério risco de disseminação (Wheat et al., 1991; Wheat et al., 1992; Alves, 1996; Marques et al., 2000).

Estima-se que cerca de 90 a 95% dos indivíduos que se infectam por *H. capsulatum* não desenvolvem a doença ou apresentem sintomatologia clínica leve, evoluindo para cura espontânea. Estas manifestações são conhecidas por HP infecção ou HP pulmonar aguda. A gravidade da doença em indivíduos imunocompetentes parece estar relacionada ao número de microaleuroconídios inalados. Indivíduos hígidos podem apresentar tosse, febre, dispnéia e astenia em uma (1) (reinfeção) a três (3) (infecção primária) semanas após exposição ao fungo (Goodwin e Des Prez, 1978; Wu-Hsieh e Howard, 1989; Eissenberg e Goldman, 1991; Silva et al., 1999; Marques et al., 2000; Lacaz et al., 2002).

A HP disseminada apresenta evolução potencialmente fatal decorrente da deficiência da imunidade celular do hospedeiro, estando intimamente relacionada a infecções oportunistas. Entre os possíveis hospedeiros estão as crianças com imaturidade imunológica, idosos debilitados, imunossuprimidos e indivíduos portadores do HIV (Lacaz et al., 1999; Silva et al., 1999). Importante comentar, que com o advento da aids, em 1981, observou-se aumento do número de casos de HP disseminada associada àquela patologia, apresentando-se como a primeira infecção

oportunista combinada a outras infecções e/ou neoplasias, desencadeada provavelmente pelo despertar de processos pulmonares quiescentes, em pacientes residentes ou procedentes de zonas endêmicas. Este fato levou o CDC (*Center Diseases Control*), em 1985, quando não havia provas sorológicas e moleculares para a identificação do HIV, a incluir a HP disseminada como infecção “definidora” de aids (Wheat et al., 1986).

A HP associada a aids pode apresentar quadro clínico benigno, moderadamente grave ou grave. Alves (1996) evidenciou em pacientes co-infectados, sintomas como febre, perda de peso, dispnéia, lesões cutâneas disseminadas, adenomegalia, hepato e esplenomegalia, bem como infiltrado intersticial difuso dos pulmões. Em geral, este quadro apresenta elevada letalidade, com grande incidência de lesões mucocutâneas, podendo ser semelhante à tuberculose miliar, o que induz os médicos a pensarem nesta última infecção, por ser uma patologia de alta frequência no Brasil. Desta forma, acaba-se não considerando a HP disseminada no diagnóstico diferencial; promovendo, conseqüentemente, prejuízo na instauração de terapia antifúngica adequada (Alves et al., 1994; Lacaz et al., 2002). Em zonas endêmicas, a HP acomete de dois (2) a cinco (5) por cento dos pacientes com aids, podendo atingir 25% nas regiões de alta endemicidade (Alves et al., 1994).

O tratamento específico da HP apenas é indicado em pacientes imunodeprimidos, visando principalmente evitar a progressão da doença. Nestes casos, aplica-se uma série curta de anfotericina B, até completar dose total de 500 mg, ou cetoconazol, em dose de 400 mg/dia, por seis meses, ou itraconazol 100 mg/dia, por igual período. Nos casos associados a aids, é aconselhável profilaxia secundária com 100 mg/dia de itraconazol, durante um ano (Kauffman, 2000, Ferreira e Borges, 2009).

O tratamento da forma aguda sintomática é realizado empregando-se apenas medidas de suporte ventilatório em indivíduos que apresentem

casos mais graves, visto que o processo infeccioso evolui espontaneamente (Kauffman, 2000). Goldman (1994) ressalva que o emprego de terapia antifúngica só se justifica, nestes casos, quando os sintomas não regredem após uma (1) a três (3) semanas de acompanhamento ou quando o paciente necessita de hospitalização.

1.2.1. Diagnóstico laboratorial da histoplasmose

O diagnóstico definitivo da HP é a identificação do agente etiológico por processos histológicos, pelo exame a fresco e/ou o isolamento do fungo em cultura (Kwon-Chung e Bennett, 1992; Lacaz et al., 2002, Yeo e Wong, 2002; Guimarães et al, 2006; Ferreira e Borges, 2009). O exame direto, em microscopia óptica, permite a observação de células leveduriformes de *H. capsulatum* em diferentes materiais biológicos (secreções do trato respiratório, aspirado de medula óssea, esfregaços sanguíneos periféricos, úlceras bucais, raspados cutâneos, líquido, linfonodo e urina) fixados em lâminas, por meio de esfregaços e *imprints*, empregando-se as técnicas de colorações de May-Grünwald-Giemsa, Wright ou Leishman (Lacaz et al., 1984; Rincon, 1989; Kwon-Chung e Bennett, 1992; Lacaz et al., 1998; Sidrim e Oliveira, 1999; Mendes-Giannini e Melhem, 2001; Lacaz et al., 2002; Artal, 2004).

A visualização das formas fúngicas pode também ocorrer em cortes histológicos, geralmente corados pelas técnicas de HE, PAS ou Gomori-Grocott. Em lâminas coradas pela HE, é possível a visualização de formas fúngicas esféricas ou ovais ligeiramente basofílicas, com dois (2) a quatro (4) μ m de diâmetro e halo envolvente, geralmente ocorre no interior das células do sistema retículo endotelial ou liberadas no tecido. Raramente encontram-se brotamentos, mas quando presentes são unipolares (Lacaz et al., 1984; Rincon, 1989; Kwon-Chung e Bennett, 1992; Lacaz et al., 1998; Sidrim e

Oliveira, 1999; Mendes-Giannini e Melhem, 2001; Lacaz et al., 2002; Artal, 2004).

Merece atenção especial o fato de que, em alguns casos, é extremamente difícil diferenciar em tecido, células de *H. capsulatum* e células de *C. glabrata*, *C. neoformans*, *Penicillium marneffeii*, *P. jirovecii*, *H. farciminosum* e formas diminutas de *Blastomices dermatitidis*. Do mesmo modo, é recomendável a realização do diagnóstico diferencial para protozoários como *Leishmania* sp e *Toxoplasma gondii*, que apresentam formas intracelulares semelhantes ao *H. capsulatum* (Mendes-Giannini e Melhem, 2001; Lacaz et al., 2002; Guimarães et al., 2006).

Apesar de fornecer diagnóstico precoce, o exame histopatológico se apresenta menos sensível quando comparado à cultura, devido à dificuldade na observação das leveduras, pois muitas vezes os laboratoristas têm pouca experiência em identificar *H. capsulatum*. Além disto, o estudo morfológico deste patógeno em tecidos não é conclusivo, impedindo, portanto, sua identificação (Almeida e Lacaz, 1947, Pontón, 2002, Artal, 2004).

O crescimento de *H. capsulatum* em cultura é fastidioso, requerendo de seis (6) a 12 semanas de incubação à temperatura ambiente (25-27° C). Observa-se a produção de hifas hialinas, septadas, produtoras de micro e macroconídios em diferentes estágios de desenvolvimento. A reversão da fase de micélio para levedura, cultivando o fungo em ágar BHI suplementado com cinco (5) a 10% de sangue ou soro bovino fetal ou L-cisteína, a 35-37°C, é necessária e imprescindível para confirmação de *H. capsulatum* (Rincon, 1989; Wu-Hsieh e Howard, 1989; Fressatti et al., 1992; Alves, 1996; Lacaz et al., 1998; Sidrim e Oliveira, 1999; Lacaz, et al., 2002; Guimarães et al., 2006).

Assim como na PCM, a pesquisa de anticorpos circulantes anti-*H. capsulatum* atua como ferramenta fundamental no diagnóstico presuntivo da HP. A imunodifusão dupla em gel de agarose é a técnica sorológica mais utilizada para o diagnóstico da HP, por ser de fácil execução e oferecer baixo custo operacional. Apresenta, ainda, alta especificidade (90-100%) e valor preditivo próximos de 100%, enquanto sua sensibilidade fica em torno de 70 a 100% (Elias-Costa et al., 2000; Mendes-Giannini e Melhem, 2001; Guimarães et al. 2006).

Na pesquisa de anticorpos anti-*H. capsulatum* em soros de pacientes com HP por imunodifusão dupla, pode-se observar até seis faixas de precipitação, sendo duas mais frequentes, denominadas H e M. Estas faixas são consideradas suficientes para diagnosticar, com segurança, a patologia. A reatividade do soro de paciente frente ao antígeno M sugere que o indivíduo tenha entrado em contato com o patógeno ou fora imunizado com histoplasmina. A faixa H é detectável junto com a M em vigência de alguma infecção em curso (Heiner, 1958).

Anticorpos precipitantes anti-M são detectados em até 85% dos pacientes que apresentam as formas aguda e crônica de HP e podem ou não estar associados à doença ativa. Indivíduos com reação intradérmica positiva a histoplasmina, ou com infecção remota, podem apresentar anticorpos circulantes contra este antígeno (Hopwood e Evans, 1991; Mendes-Giannini e Melhem, 2001; Yeo e Wong, 2002).

A detecção do antígeno H indica HP ativa, podendo ser observada até dois anos após a cura clínica do paciente; raramente ocorre na ausência de M, sendo detectado pela reação de fixação de complemento (FC), onde os anticorpos fixadores do complemento podem ser demonstrados na maioria dos pacientes com a doença, já a partir da quarta semana após a infecção, sendo, portanto considerada mais sensível do que a ID (Di Salvo et

al., 1980; Mendes-Giannini e Melhem, 2001). O ensaio de FC é realizado tanto com antígenos da fase miceliana como da fase leveduriforme de *H. capsulatum*, apresentando sensibilidade de 90 a 80%, respectivamente (Mendes-Giannini e Melhem, 2001).

Kleger e Kaufman (1973) avaliaram a técnica de contraímunoeletroforese objetivando a identificação rápida e específica das frações H e M de *H. capsulatum*. Os autores demonstraram que esta técnica foi capaz de identificar anticorpos circulantes anti-H e anti-M em 81% das amostras (42 pacientes). No mesmo estudo, os autores também avaliaram as amostras por ID e FC, obtendo reatividade em 83 e 88% dos pacientes, respectivamente.

A aplicação dos ensaios imunoenzimáticos no diagnóstico precoce da HP tem sido demonstrada, principalmente nos casos de forma aguda da doença, devido à demora na detecção da soroconversão, quando se utilizam técnicas menos sensíveis como a ID ou FC (Leimann et al., 2005). Torres et al. (1993) constataram que o ensaio de ELISA, empregando anti-IgG humana, apresentava sensibilidade de 86% e especificidade de 91%, enquanto, com a utilização de anti-IgM humana, obtiveram sensibilidade de 66% e especificidade de 100%. Por *immunoblotting*, foi possível verificar o reconhecimento de quatro frações antigênicas, com massa molecular aparente de 38, 70, 83 e 91 kDa. Os autores concluíram que ambas as técnicas podem ser aplicadas no diagnóstico confirmatório da HP.

Pizzini et al. (1999) avaliando a especificidade do ensaio de *immunoblotting* empregaram como antígeno, as frações H e M de *H. capsulatum*, obtidas por cromatografia de troca iônica a partir de filtrado de cultura (histoplasmina) e deglicosiladas pelo tratamento com metaperiodato de sódio. A análise dos resultados revelou uma maior capacidade discriminatória desta técnica, frente a 20 soros de pacientes com HP pulmonar aguda, quando comparada às reações de ID e FC frequentemente

utilizadas na rotina diagnóstica. Os autores demonstraram, também, que a sensibilidade do ensaio foi de 100% e a especificidade melhorou de 46,1%, quando utilizadas as frações H e M sem tratamento, para 91,2%, após oxidação das porções glicídicas.

Freitas (2005) avaliou por IB, 22 soros de pacientes com HP-doença e sete (7) com HP-infecção. Verificaram que 100% das amostras de pacientes com HP-doença apresentaram reatividade frente às frações H e M de *H. capsulatum*, ao passo que todos os soros do grupo HP-infecção reagiram somente frente à fração M.

Kohara et al. (2007) avaliaram 69 soros de pacientes com confirmação clínica ou micológica de HP pelas técnicas de ID e IB frente a filtrado de cultura obtido da amostra 200 de *H. capsulatum*, cultivada por 33 dias a 27° C, em ágar Sabouraud-dextrose. Os autores observaram por ID, que apenas 10% dos soros apresentaram reatividade, enquanto que 62% reconheceram, por IB, as frações H e M indicando doença ativa e 24%, a fração M revelando o contato prévio com *H. capsulatum*.

Passos et al. (2011) avaliando resultados obtidos a partir de análises realizadas por ID e IB em amostras de pacientes com histoplasmoze aguda, observaram que a concordância entre os métodos utilizados foi satisfatória, variando de ligeira a boa, de acordo com o tempo de infecção do paciente. O teste de IB se apresentou de maneira geral, mais sensível que a ID (80% versus 48%), com a vantagem de ser capaz de identificar precocemente pacientes com infecção recente (67% versus 3%). Segundo os autores, uma vez instaurado o fenômeno de soroconversão, o desempenho dos métodos se torna semelhante (100% versus 97%).

O diagnóstico sorológico baseado na pesquisa de anticorpo circulante anti-*H. capsulatum* apresenta valor limitado em pacientes portadores de aids e HP disseminada, bem como naqueles pacientes com

manifestações pulmonares severas. Nestes casos, a detecção de antígenos fúngicos assume grande importância (Hopwood e Evans, 1991; Kwon-Chung e Bennett, 1992; Hamilton e Gómez, 1998; Mendes-Giannini e Melhem, 2001; Yeo e Wong, 2002; Lacaz et al., 2002).

Gómez et al. (1997) padronizaram um ELISA de inibição para detecção de antígeno circulante de *H. capsulatum*, utilizando anticorpo monoclonal contra a fração antigênica específica de 69-70 kDa. A sensibilidade do ensaio foi de 71,4%, variando de 57,1 a 88,9% de acordo com a forma clínica da doença. A especificidade foi de 98% quando utilizados soros humanos de pacientes normais de áreas endêmicas, diminuindo para 85,4%, quando avaliados soros de pacientes com outras micoses.

Wheat (2003) afirma que a sensibilidade da detecção de antígenos de *H. capsulatum* é maior em amostras de urina do que em soro. Além disso, pacientes com histoplasmose raramente apresentam antigenemia sem antigenúria.

Zimmerman et al. (1989) compararam as técnicas de radioimunoensaio (RIA) e ELISA visando à detecção do antígeno polissacarídico de *H. capsulatum* em amostras de urina de pacientes com HP; indivíduos portadores de outras infecções fúngicas e indivíduos saudáveis. A sensibilidade das técnicas foi similar em pacientes com a doença disseminada (89,5% no teste de ELISA e 94,7% em RIA), o mesmo ocorrendo em relação à especificidade (95%). Os autores concluíram que a técnica de ELISA apresenta menor sensibilidade quando comparada ao RIA podendo apresentar resultados falso-negativos em amostras clínicas que contenham baixos níveis de antígenos circulantes.

Estudos demonstram que antígenos de *H. capsulatum* podem ser detectados na urina de aproximadamente 75-80% dos pacientes com

histoplasmose pulmonar aguda e 80-95% daqueles com histoplasmose disseminada (Wheat, 2003). Segundo Guimarães et al. (2006), os ensaios de ELISA sanduíche e ELISA de inibição não apresentam diferença de resultados na pesquisa de antígenos em soros de pacientes com histoplasmose. Entretanto, o método ELISA sanduíche parece ser mais efetivo na pesquisa de antigenúria nos mesmos pacientes.

O aumento expressivo na incidência de infecções fúngicas principalmente entre pacientes imunocomprometidos, associado ao fato dos métodos sorológicos apresentarem limitações como a existência de reatividade cruzada pela presença de epítomos semelhantes entre as espécies fúngicas, tem reforçado a necessidade da implantação de técnicas diagnósticas, empregando métodos moleculares, de rápida execução e de grande acurácia, visando à elucidação de processos fúngicos invasivos (Yeo e Wong, 2002; Guedes et al., 2003).

Os métodos de amplificação e hibridização do ácido nucléico são de fundamental importância para o diagnóstico molecular (Lacaz et al., 2002; Yeo e Wong, 2002). Métodos moleculares para identificação de DNA espécie-específico em isolados fúngicos têm sido propostos na tentativa de diminuir o tempo consumido pelo processo de reversão da cultura de micélio para levedura, que pode levar de três (3) a quatro (4) semanas. Além disso, são mais seguros limitando a possibilidade de infecção em laboratório (Huffnagle e Gander, 1993; Rickerts et al., 2002; Guedes et al., 2003; Guimarães et al., 2006).

Reações em cadeia da polimerase e de *nested*-PCR vêm sendo desenvolvidas a fim de se detectar DNA de *H. capsulatum*, a partir da amplificação de sequências gênicas específicas, em espécimes clínicos como fragmentos de biópsia, sangue e raspados de pele. A sensibilidade destas técnicas encontrada nos diferentes estudos, utilizando diferentes *primers*, varia de 69 a 100% e a especificidade, de 62 a 100% (Huffnagle e

Gander, 1993; Chemaly et al., 2001; Bialek et al., 2002a; Bialek et al., 2002b; Rickerts et al., 2002; Bracca et al., 2003; Guimarães et al., 2006).

Sandhu et al. (1995) relataram a obtenção de sonda específica (*probe*) de *H. capsulatum*, com eventual possibilidade de emprego em materiais clínicos diversos. Nesse estudo a região do gene 28S do RNAr, de aproximadamente 100 isolados fúngicos, representando cerca de 50 espécies patogênicas e saprofíticas, foram sequenciados a fim de produzir *primers* universais de PCR e *probes* de oligonucleotídeos espécie-específicos para detecção e identificação de fungos de interesse médico. Estes *primers* foram testados em material biológico apresentando elevado nível de especificidade.

Chandrashekar et al. (1997) clonaram e caracterizaram antígeno recombinante de *H. capsulatum* visando sua aplicabilidade no diagnóstico da HP, obtendo um produto (GH17) de 80 pb que codifica um antígeno com potencial uso no imunodiagnóstico. A análise do produto por *Southern blot* indicou que o GH17 encontra-se confinado numa localização simples do DNA genômico de *H. capsulatum*. O autor verificou por *immunoblotting* que os produtos protéicos do GH17 (expresso como uma proteína de fusão para β -galactosidase de 140 kDa) foram reconhecidos pela totalidade de amostras avaliadas (18 soros de pacientes com HP), não observando reatividade cruzada frente a soros de pacientes acometidos por outras doenças fúngicas.

Zancopé-Oliveira et al. (1999) clonaram e caracterizaram o determinante antigênico imunodominante de *H. capsulatum*, o antígeno M. O gene do DNA para o antígeno M consiste de 2.187 pb codificando uma proteína de 80 kDa, e apresenta significativa homologia com a catalase de *A. fumigatus*. A autora demonstrou a imunoreatividade da proteína de fusão recombinante frente a anticorpo monoclonal dirigido contra o antígeno M,

anticorpo policlonal anti-M obtido em camundongo e soro de paciente com HP.

Guedes et al. (2003) utilizou regiões do gene do antígeno M que apresentavam pouca ou nenhuma homologia para construir quatro (4) sequências de oligonucleotídeos para aplicação na técnica de PCR visando à detecção e identificação de *H. capsulatum*. A PCR identificou corretamente 31 amostras de *H. capsulatum* isoladas a partir de material biológico humano, animal e ambiental (solo). A especificidade da técnica de PCR empregando os *primers* derivados do antígeno M foi confirmada pela ausência total de produtos da amplificação quando o DNA genômico de outras espécies fúngicas foram aplicados na reação. Segundo os autores, a rapidez, sensibilidade e especificidade desta técnica permitem que ela seja amplamente utilizada na identificação de amostras típicas e atípicas do *H. capsulatum*.

1.3. Relevância do estudo

Nos últimos anos, a frequência dos processos infecciosos invasivos causados por espécies fúngicas vem aumentando de forma expressiva sendo considerada um problema emergente em Saúde Pública. Postula-se que a incidência de processos infecciosos causados por *Candida sp*, *Aspergillus sp*, *C. neoformans*, *H. capsulatum* e *Paracoccidioides sp*, espécies fúngicas normalmente pouco invasivas para hospedeiros imunocompetentes, vem aumentando concomitantemente ao uso de antibióticos, drogas imunossupressoras, uso prolongado de medicação administrada por via parenteral, diálise peritoneal, uso de cateteres, radioterapia e quimioterapia, sendo observado com maior frequência em indivíduos portadores de doenças debilitantes como no caso das imunodeficiências congênitas ou adquiridas ou ainda entre pacientes transplantados (Marques e Shikanai-Yasuda, 1994; Yeo e Wong, 2002).

Diante do exposto, o diagnóstico precoce e acurado destas infecções assume grande importância, pois permite entre outros fatores, a instituição de terapia anti-fúngica adequada e a diminuição do emprego desnecessário de drogas tóxicas; além de reduzir o uso de terapia empírica, minimizando, por exemplo, o surgimento de linhagens fúngicas multidrogas resistentes. O emprego de ensaios sorológicos é de extrema importância no diagnóstico das infecções por *Paracoccidioides sp* e *H. capsulatum*, visto que a demonstração em exame direto bem como o isolamento e identificação destes fungos muitas vezes apresentam resultados negativos, principalmente em formas autolimitadas da HP.

Outra informação importante que deve ser levada em consideração, diz respeito que em algumas situações entre as quais se pode citar o estado físico ou clínico dos pacientes, torna-se impossível o acesso ao local da lesão, impedindo assim a coleta do material biológico (Ferreira-da-Cruz et al., 1990). As provas sorológicas propiciam a obtenção de resultados em

menor tempo quando comparadas às micológicas e, como já mencionado, consistem, muitas vezes, na única evidência da infecção fúngica. Segundo Kauffman (2007), nos casos de meningite por HP, a presença de anticorpos anti-*H. capsulatum* no líquido é suficiente para confirmação do diagnóstico, mesmo sem a identificação do fungo por cultura.

Como laboratório de Saúde Pública, o Instituto Adolfo Lutz (IAL) atende não apenas os hospitais e demais unidades de saúde da cidade de São Paulo e Grande São Paulo, mas também toda a demanda vinda de 10 dos 12 laboratórios regionais existentes, localizados no interior do Estado de São Paulo. No período compreendido entre dezembro de 1998 a maio de 2010, foram avaliadas, pela reação de imunodifusão dupla em gel de agarose (provas qualitativa e semiquantitativa), amostras biológicas de 10.176 e 3.491 pacientes quanto à presença ou não de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis* e *H. capsulatum*, respectivamente³.

Desde sua implantação, o Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses, Centro de Imunologia, IAL de São Paulo, SP (LIM/CIM/IAL-SP) tem buscado a excelência no atendimento aos pacientes com suspeita clínica de PCM e HP. Neste sentido, já no início de 1999, passou a realizar o ensaio semiquantitativo empregando a técnica de ID; através do qual foi permitido monitorar o nível de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis* e anti- *H. capsulatum*. Esta pequena, porém, não menos importante inovação permitiu que fossem fornecidas aos clínicos, informações não apenas quanto à presença ou ausência de anticorpos circulantes específicos para os dois (2) agravos já mencionados, como, principalmente, mais um subsídio para o monitoramento da eficácia do tratamento antifúngico instaurado, bem como da ocorrência de recidivas.

Na condição de Laboratório de Referência Estadual para o imunodiagnóstico das micoses sistêmicas, tendo como atribuição garantir a

³ Dados retirados do Banco de Dados, Microsoft Access – 2000, do Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses, Centro de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

qualidade e acurácia dos resultados sorológicos e, considerando, o fato de que a grande maioria das requisições médicas que chegam não contém nenhum tipo de informação adicional sobre o estado clínico-epidemiológico do paciente ou relacionadas a exames micológicos e/ou histopatológicos, torna-se necessária a implantação de uma técnica mais sensível, como o *immunoblotting*, para complementar e/ou confirmar o imunodiagnóstico da PCM e da HP.

Um ponto que corrobora com a necessidade de melhor avaliação do *immunoblotting*, diz respeito à implantação no Estado de São Paulo do Programa de Vigilância e Controle da Paracoccidiodomicose, o qual propõe, em seu algoritmo, a realização do IB nos casos de indivíduos que apresentarem ausência de reatividade para *P. brasiliensis* pela tradicional técnica de ID. Neste sentido, vale a pena repetir e reforçar o já exposto por Camargo et al. (1989) e Restrepo (1992) que afirmam que apesar da metodologia de IB apresentar sensibilidade superior comparada àquela obtida no emprego da ID, o ensaio ainda é pouco acessível à rotina diagnóstica da PCM nos serviços de saúde, ficando restrita a projetos de pesquisa. Esta observação também se aplica ao imunodiagnóstico da histoplasmose.

Uma abordagem de extrema importância que justifica o desenvolvimento deste trabalho é a falta de padronização e, conseqüentemente, validação dos ensaios utilizados no imunodiagnóstico tanto da paracoccidiodomicose quanto da histoplasmose. O processo de validação de ensaios laboratoriais tem por objetivo demonstrar que o método seja adequado para a finalidade pretendida. Deve garantir, por meio de estudos experimentais, que as exigências do método às aplicações analíticas sejam atendidas e a confiabilidade dos resultados, assegurada (ANVISA, 2003).

Segundo a Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003, da ANVISA, um ensaio validado deve apresentar, dependendo de sua natureza, parâmetros como especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação e exatidão avaliadas, determinadas e adequadas à análise a que se destina. O processo de validação deve ser suficientemente abrangente para atender e respaldar as necessidades de uma determinada aplicação. Além disso, a determinação do desempenho de um ensaio deve incluir análises comparativas com resultados obtidos por outros métodos (ANVISA, 2003; ABNT, 2005).

Devido à grande heterogeneidade dos protocolos descritos na literatura para o desenvolvimento do *immunoblotting*, já supracitados neste texto, tanto para o diagnóstico da paracoccidiodomicose quanto para histoplasmose; neste estudo se buscará, primeiramente, padronizar uma metodologia adequada às condições do laboratório e avaliar o desempenho do IB na casuística atendida pelo LIM/CIM/IAL-SP. Em seguida, pretende-se dar início as primeiras análises referentes aos parâmetros necessários ao processo de validação dos ensaios de imunodifusão dupla e *immunoblotting*.

2. Objetivos:

2.1. Objetivo Geral:

Padronizar o ensaio de *immunoblotting* para pesquisa de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis* e anti-*H. capsulatum*, visando sua implantação no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses, Centro de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz.

2.2. Objetivos Específicos

- Otimizar o ensaio de *immunoblotting* para o diagnóstico de paracoccidiodomicose e histoplasmose;
- Avaliar o desempenho do ensaio de *immunoblotting* empregando-se soros de pacientes com paracoccidiodomicose; histoplasmose, aspergilose e de indivíduos saudáveis;
- Avaliar determinados parâmetros intrínsecos, como sensibilidade, especificidade, valores preditivos, eficiência e reprodutibilidade intralaboratorial das técnicas de imunodifusão dupla e *immunoblotting* no imunodiagnóstico da paracoccidiodomicose e histoplasmose;
- Avaliar a concordância de resultados obtidos nas técnicas de imunodifusão dupla e *immunoblotting*;

3. Material e Métodos

3.1. Casuística

Foram avaliadas, quanto à presença de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis* e anti-*H. capsulatum*, 380 amostras de soro assim distribuídas:

- 100 amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de paracoccidioidomicose, acompanhados ambulatorialmente e/ou internados no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (IIER);
- 50 soros de pacientes com suspeita clínica de histoplasmose, acompanhados ambulatorialmente e/ou internados no IIER;
- 47 soros de pacientes com paracoccidioidomicose confirmada atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu da UNESP (HC/FMB/UNESP), gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Silvio de Alencar Marques do Departamento de Dermatologia e Radiologia do HC/FMB/UNESP;
- 23 soros de pacientes com histoplasmose, adquirida após visita à caverna, enviadas pelo Núcleo de Vigilância Epidemiológica de Areias;
- 20 soros de pacientes com suspeita clínica de aspergilose (ASP), recebidos na rotina do LIM/CIM/IAL–SP, reagentes para *A. fumigatus* e não-reagentes para *P. brasiliensis* e *H. capsulatum* por ID;
- 64 soros de indivíduos, aparentemente saudáveis, doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu, região considerada endêmica para PCM, gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Rinaldo Pôncio Mendes do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do HC/FMB/UNESP;

- 76 soros de indivíduos, aparentemente saudáveis, residentes em Santos, região litorânea do Estado de São Paulo, sem informação sobre a endemicidade para PCM, gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Rinaldo Pôncio Mendes do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do HC/FM/UNESP-Botucatu;

3.1.1. Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos no presente estudo, pacientes cadastrados no Banco de Dados do LIM/CIM/IAL-SP (Microsoft-Access 2000), no período entre junho de 2008 a maio de 2011, que apresentassem suspeita clínica de paracoccidioidomicose e/ou histoplasmose. Não foram estabelecidos neste estudo critérios de exclusão de amostras.

3.1.2. Revisão dos prontuários e definição de caso de paracoccidioidomicose e histoplasmose

Após a realização dos ensaios sorológicos, foi feita a revisão dos prontuários clínicos dos pacientes com paracoccidioidomicose e histoplasmose. Para cada paciente, foi preenchida uma ficha padronizada contendo nome, sexo, data de nascimento, procedência remota, ocupação profissional, fatores de risco para micoses sistêmicas, forma clínica, local da lesão, início do tratamento, presença de co-morbidades e dados laboratoriais (sorologia anterior, exames histopatológico, micológico, de imagem e intradermoreação) [ANEXO A]. As informações referentes aos pacientes atendidos no HC/FM/UNESP-Botucatu foram gentilmente fornecidas pela Dr^a Maria Rita Parise Fortes e pelo Prof. Dr. Silvio Alencar Marques do Departamento de Dermatologia e Radiologia.

Desta forma, os pacientes foram classificados em grupos, de acordo com a definição de caso de doença estabelecida no Manual de Vigilância e

Controle da Paracoccidioidomicose da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (SES, 2008) em consonância com o preconizado pelo Consenso Brasileiro de Paracoccidioidomicose (Shikanai-Yasuda et al., 2006). Devido à falta de critérios bem definidos na literatura, foram seguidos os mesmo critérios para definição de caso de histoplasmose:

- **Caso confirmado:** pacientes que apresentem manifestações clínicas compatíveis com paracoccidioidomicose ou histoplasmose, nos quais tenham sido identificadas estruturas fúngicas características da fase leveduriforme de *P. brasiliensis* ou *H. capsulatum* em qualquer amostra biológica, por meio de exame micológico direto ou exame histopatológico ou cultura.

- a) PCM confirmada: 96 amostras

- b) HP confirmada: 13 amostras

- **Caso provável:** pacientes que apresentem manifestações clínicas compatíveis com paracoccidioidomicose ou histoplasmose e presença de anticorpos séricos detectados por imunodifusão dupla em gel de agarose ou contraímuno eletroforese ou *immunoblotting*.

- a) PCM provável: 4 amostras

- b) HP provável: 30 amostras

- **Caso suspeito:** foram incluídos nesta definição, todos pacientes com manifestações clínicas compatíveis com paracoccidioidomicose ou histoplasmose, nos quais outras hipóteses diagnósticas tenham sido excluídas ou não confirmadas.

- a) PCM suspeita: 15 amostras;

- b) HP suspeita: 9 amostras.

- **Caso descartado:** pacientes que apresentem manifestações clínicas compatíveis com paracoccidioidomicose ou histoplasmose, porém sem confirmação etiológica destas patologias por métodos micológicos,

histopatológicos ou sorológicos, e cujo diagnóstico tenha sido posteriormente descartado (mudança de diagnóstico).

a) PCM descartada: 32 amostras;

b) HP descartada: 21 amostras.

3.1.3. Considerações éticas

A realização deste estudo foi aprovada pelas Comissões Técnico-Científicas do Instituto Adolfo Lutz - Projeto nº 0097D-2009, Protocolo 7760/2008 e do Instituto de Infectologia Emílio Ribas – Projeto nº 48/11; Parecer C.C. nº 169/11.

Também foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto Adolfo Lutz, Protocolo 31/2009 e Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Infectologia Emílio Ribas, Parecer nº 296/2011 [ANEXO B].

3.2. Soro hiperimune obtido em coelhos

Os anticorpos policlonais anti-antígenos de *P. brasiliensis* e *H. capsulatum* utilizados como soros controles-positivos nos ensaios de ID e IB foram os mesmos usados na rotina diagnóstica realizada pelo LIM/CIM/IAL-SP. A purificação das imunoglobulinas foi realizada a partir do soro de animais previamente imunizados, seguindo-se a metodologia proposta por McKinney e Parkinson (1987).

Coelhos albinos foram imunizados por via subcutânea, com antígeno metabólico (filtrado de cultura) produzido a partir das amostras 113 de *P. brasiliensis* (Pb 113) ou 200 de *H. capsulatum* (Hc 200). O antígeno foi aplicado em quatro sítios distintos localizados no dorso do animal, emulsificado em adjuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, Mo, USA) na

proporção 3:1 na primeira imunização. Nas aplicações subsequentes, repetidas a cada semana, foi utilizado antígeno emulsificado em adjuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, Mo, USA), mantendo-se a mesma proporção. A eficácia do processo de imunização foi avaliada empregando-se ensaio de ID.

3.3. Antígenos

3.3.1. Amostras fúngicas

Para a produção de antígenos de *P. brasiliensis* foram utilizadas as amostras 113 isolada de paciente com lesão bucal de PCM, em Manaus/AM, em 1971 e B-339 (ATCC 32069TM), isolada em 1967, no Brasil. Os antígenos de *H. capsulatum* foram obtidos a partir das amostras brasileiras 200 e 406, isoladas primariamente de paciente com lesão cutânea, em 2002; e de líquido de paciente com HIV/Aids, em 1997, respectivamente.

As amostras de *P. brasiliensis* foram mantidas na fase filamentosa em ágar batata, a 27°C, sendo repicada a cada três meses, na Micoteca do LIM/CIM/IAL–SP. Enquanto, as amostras de *H. capsulatum* foram mantidas na Coleção de Culturas Emergentes do Laboratório de Micologia (LIM-53) do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, sob as mesmas condições.

Todas as amostras fúngicas foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Carlos da Silva Lacaz (*in memoriam*), do Laboratório de Micologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo (IMT/USP).

3.3.2. Antígeno de *P. brasiliensis*

A obtenção dos antígenos de *P. brasiliensis* foi realizada segundo metodologia proposta por Garcia et al. (1993) com algumas modificações (Silva, 2005).

Células leveduriformes foram cultivadas em ágar NGTA (neoptona-glicose, tiamina e asparagina), por sete dias a 36°C, sendo transferidas após este período para frascos de 500,0 ml tipo Erlenmeyer, contendo 250,0 ml de caldo NGTA e incubadas em estufa com agitação orbital, por 20 dias, a 36°C, em rotação constante de 50 rpm. Ao fim do período de incubação, o crescimento fúngico foi interrompido pela adição de solução borato-thimerosal (1:5.000), e as culturas mantidas por cinco dias a 4°C, sendo homogeneizadas manualmente três (3) vezes ao dia, durante cinco (5) minutos. Após esta etapa, as leveduras foram separadas por filtração em papel Whatman® nº 03 (Whatman, Brentford, Reino Unido). Os sobrenadantes obtidos a partir das culturas das amostras 113 e B-339, foram aliqüotados e armazenados a 4°C e a -20° C, respectivamente, até o momento do uso.

3.3.3. Antígeno de *H. capsulatum*

A obtenção do antígeno de *H. capsulatum* foi realizada segundo metodologia proposta por Kaufman e Standard (1978), com algumas modificações (Freitas, 2005).

Células micelianas das amostras 200 e 406 de *H. capsulatum*, mantidas em ágar batata a 27°C, foram primeiramente adaptadas em ágar Sabouraud-dextrose, com repiques mensais, mantendo-se esta mesma temperatura, durante quatro meses. Após o período de adaptação, realizou-se a expansão das culturas fúngicas em ágar Sabouraud dextrose, por 33 dias, a temperatura ambiente (25 a 27°C). Após esta etapa, as culturas foram cobertas com solução de borato-thimerosal a 1:5.000 e deixadas em repouso por 24 horas a

temperatura ambiente. Em seguida os sobrenadantes foram coletados, filtrados em papel Whatman® número 03 (Whatman, Brentford, Reino Unido), aliquotados (2,0 ml por frasco), liofilizados e armazenados a -20°C até o momento do uso. Para a realização das técnicas de imunodifusão dupla e *immunoblotting*, o antígeno liofilizado foi reconstituído em água milli-q, obtendo-se antígeno 20 e 10 vezes concentrado, respectivamente.

3.4. Ensaio de imunodifusão dupla em gel de agarose

Utilizou-se a metodologia proposta por Ouchterlony (1949), onde lâminas de vidro (26x75 mm) foram primeiramente revestidas com 1,0 ml de solução de ágar a 1% (p/v). Estas foram então recobertas com 3,0 ml de solução de agarose-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, São Paulo, SP – Brasil), contendo um (1) orifício central e seis (6) 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 das amostras biológicas e do antígeno nos orifícios, as lâminas foram incubadas em câmara úmida, à temperatura ambiente, por 48 horas. Após esse período, realizou-se a leitura para verificação da presença de linhas de precipitação.

As lâminas foram, então, lavadas por 45 minutos em solução citrato de sódio 5% (p/v), seguindo-se de sucessivas lavagens, por 24 horas, em solução salina a 0,85%. Ao fim dessa etapa, os orifícios foram recobertos com solução de ágar 1% (p/v) e as lâminas levadas para secar em estufa a 60°C (FANEN, São Paulo – Brasil). Após secagem, as lâminas foram coradas pelo Coomassie Brilliant Blue R (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA), durante 10 minutos e em seguida descoradas, procedendo-se a leitura definitiva, com auxílio de negatoscópio.

O padrão de reatividade foi determinado de acordo com a presença ou não de linhas de precipitação. A intensidade dos níveis séricos de anticorpos foi classificada segundo Moreto (2010):

Baixo: soro não diluído a soro diluído a 1:4;

Moderado: soro diluído 1:8 a soro diluído a 1:16;

Elevado: soro com diluição maior ou igual a 1:32.

3.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Os procedimentos para eletroforese vertical em gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio (SDS) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA) foram conduzidos segundo metodologia proposta por Laemmli (1970), com gel de separação linear a 10% (para *P. brasiliensis*) e 7,5% (para *H. capsulatum*) e gel de empilhamento a 3% de acrilamida com espessura de 1,0 mm; empregando equipamento Mini-Protean II Electrophoresis Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Califórnia, USA).

Antígenos de *P. brasiliensis* e *H. capsulatum* foram denaturados por aquecimento a 100° C por três (3) minutos em tampão de ruptura (62 mM de Tris-HCl pH 6,8 contendo 0,2% (p/v) de SDS, 50 mM 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 aplicadas 400,0 µl de antígeno em cada mini-gel.

A corrida eletroforética foi realizada com diferença de potencial de 90 V para percorrer o gel de empilhamento e 100 V 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 foi utilizado padrão de baixo peso molecular (PM), composto de: MBP-β-

galactosidase (175.000 Da), MBP-paramiosina (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).

3.6. Immunoblotting

O protocolo do ensaio de *immunoblotting* utilizado como referência-padrão neste estudo foi desenvolvido conforme Vicentini (1997), baseado na metodologia descrita por Towbin et al. (1979).

Após a eletroforese, os géis foram apostos sobre membranas de nitrocelulose de 0,22 μ m (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Califórnia, 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 25 mM de Tris-HCl, glicina 192 mM 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 150 mA por três (3) horas em temperatura de 2 a 4°C usando equipamento Trans-Blot System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Califórnia, USA). Após a transferência, para verificar a eficácia do processo, as membranas foram coradas com Ponceau-S (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, Mo, USA) por 10 minutos e descoradas em água bidestilada.

As membranas contendo as proteínas transferidas foram identificadas, cortadas em tiras, de aproximadamente 0,5 cm, e incubadas por uma (1) hora, a temperatura ambiente, em PBS, pH 7,4 contendo 5% (p/v) de leite desnatado (Molico, Nestlé, São Paulo, BR) [PBS-L 5%] em plataforma agitadora para *blotting* (Bioficina-Indústria e Comércio de Aparelhos Laboratoriais, São Paulo-

Brasil), para a saturação dos sítios inespecíficos. Em seguida, as fitas foram depositadas em canaletas e incubadas com soros testes, aplicados no volume final de 1,0 ml na diluição de 1:40 em tampão PBS pH 7,4, por 18 horas a temperatura ambiente (25-27°C). Finalizado o período de incubação, as fitas de nitrocelulose foram lavadas por seis (6) 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 (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, Mo, USA), diluído a 1:1000 e mantidas por duas (2) horas sob agitação constante (Plataforma agitadora para *blotting*, Bioficina-Indústria e Comércio de Aparelhos Laboratoriais, São Paulo-Brasil), a temperatura ambiente, protegidas da luz; sendo em seguida lavadas por seis (6) vezes de 10 minutos cada, em solução PBS-T. O desenvolvimento da cor da reação foi obtido empregando-se solução reveladora de 4-cloro-1naftol (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, Mo, USA). O bloqueio da reação foi feito por lavagens sucessivas em água bidestilada.

3.6.1. Otimização do ensaio de *immunoblotting* para pesquisa de anticorpos anti-*P. brasiliensis* e anti-*H. capsulatum*

Visando a otimização do ensaio de *immunoblotting* na pesquisa de anticorpos específicos anti-*P. brasiliensis* e anti-*H. capsulatum*, foram realizadas algumas alterações nos parâmetros do protocolo descrito no **item 3.6.**, utilizado como protocolo-padrão para a metodologia.

O primeiro passo foi definir o melhor antígeno a ser utilizado. Foram selecionados os antígenos Pb 113 e Pb B-339 de *P. brasiliensis*, por apresentarem grande quantidade de gp43 (Camargo et al., 1989; Assis, 1990). Entre os antígenos de *H. capsulatum*, Hc 200 e Hc 406 foram sugeridos por Freitas (2005), por apresentarem as frações H e M de *H. capsulatum* e maiores índices de sensibilidade por ID e IB.

Em seguida procurou-se estabelecer as condições consideradas ideais da reação, avaliando-se os parâmetros descritos na **Figura 2**. Os ensaios foram realizados de forma a se repetir o máximo de condições de reação possíveis, alterando os parâmetros a serem avaliados um a um. Os experimentos realizados estão dispostos nos **ANEXOS C e D: Otimização do ensaio de immunoblotting para pesquisa de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis* e anti-*H. capsulatum*.**

Durante os ensaios de otimização, foram utilizadas amostras de soro mantidas no LIM/CIM/IAL-SP, armazenadas a -20°C, por no máximo um (1) ano. Os soros foram escolhidos de forma aleatória, desde que fossem provenientes de pacientes com doença confirmada. Após a realização dos experimentos de otimização do ensaio de *immunoblotting* para pesquisa de anticorpos específicos anti-*P. brasiliensis* e anti-*H. capsulatum*, as amostras selecionadas na casuística do presente estudo foram avaliadas sob as condições de reação estabelecidas.

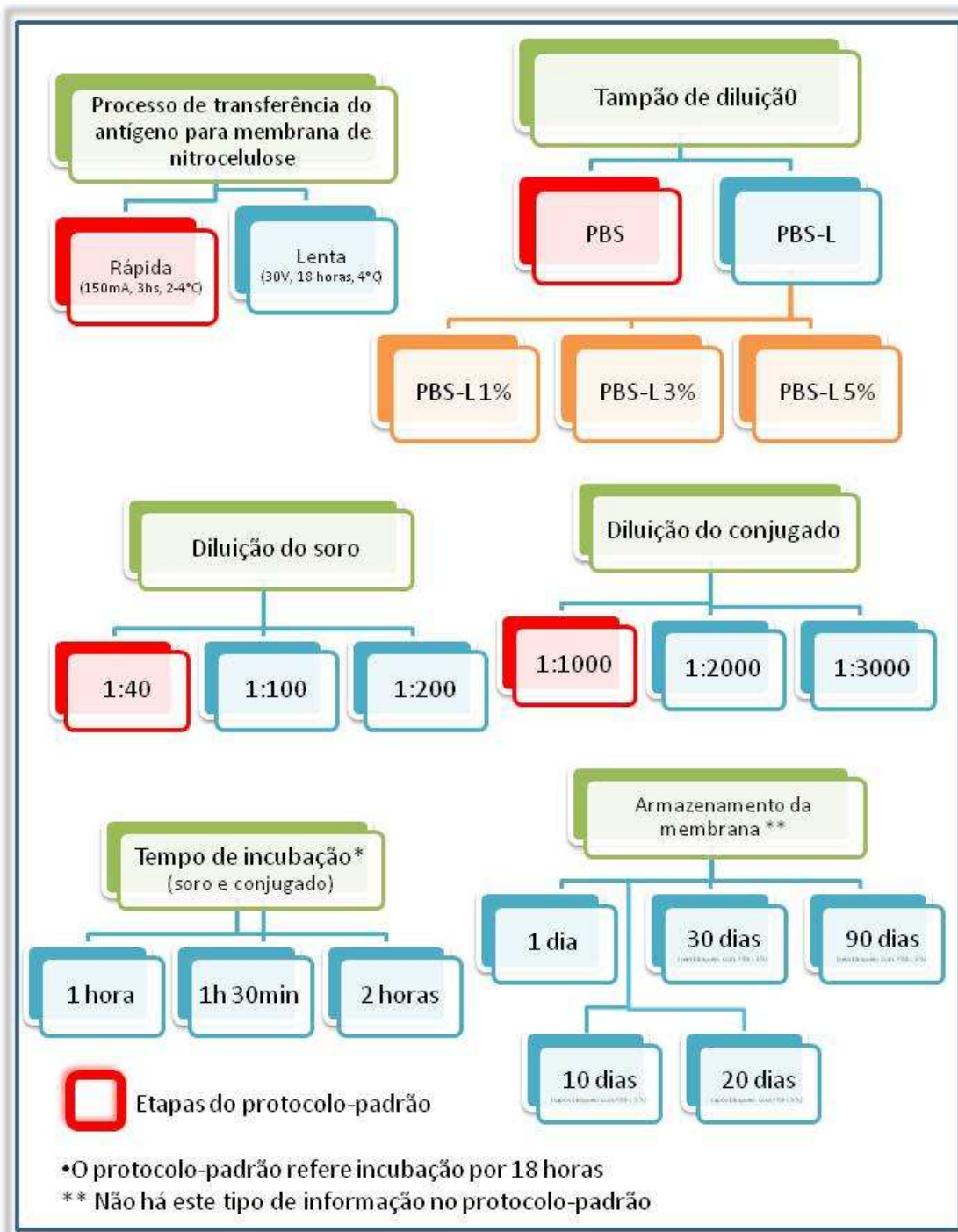


Figura 2: Esquema representativo das alterações avaliadas nos parâmetros da técnica de *immunoblotting* para pesquisa de anticorpos específicos anti-*P. brasiliensis* e anti-*H. capsulatum*.

3.6.2. Immunoblotting para pesquisa de anticorpos anti-*P. brasiliensis*

A transferência do antígeno Pb 113 foi realizada empregando-se voltagem constante de 30 V, por 18 horas, a 4°C. Após a transferência, as membranas de nitrocelulose 0,22 µm (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Califórnia, USA) foram coradas com corante Ponceau-S (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, Mo, USA) por 10 minutos e descoradas em água destilada. Em seguida, foram incubadas por uma (1) hora, a temperatura ambiente, em solução PBS-L 5%, em plataforma agitadora para *blotting*.

As fitas contendo o antígeno Pb 113 foram incubadas com 2,0 ml de amostra de soro teste e soro controle-positivo (soro hiperimune de coelho anti-antígeno de *P. brasiliensis*), ambos diluídos na proporção de 1:100 em tampão PBS-L 3%, a temperatura ambiente, sob agitação constante, por duas (2) horas. Finalizado o período de incubação, as fitas foram lavadas seis (6) vezes, por 10 minutos cada, em solução PBS-T.

Posteriormente, as membranas foram incubadas com 2,0 ml de soro anti-IgG conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, Mo, USA), diluído a 1:3000 em solução PBS-L 3%. Foram mantidas por uma (1) hora e 30 minutos sob agitação constante, a temperatura ambiente, protegidas da luz, e em seguida, foram novamente lavadas por seis (6) vezes, 10 minutos cada, em solução PBS-T.

A reação foi revelada empregando-se solução de 4-cloro-1naftol (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, Mo, USA) e o bloqueio feito por lavagens sucessivas em água bidestilada.

3.6.3. Immunoblotting para pesquisa de anticorpos anti-*H. capsulatum*

O antígeno Hc 200 foi transferido em amperagem constante de 150 mA, por três (3) horas, em temperatura de 2 a 4°C. Após a transferência, as membranas foram coradas com corante Ponceau-S (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, Mo, USA) por 10 minutos e descoradas em água destilada. Em seguida, foram incubadas por uma (1) hora, a temperatura ambiente, em solução bloqueadora PBS-L 5%, em plataforma agitadora para *blotting*.

As fitas contendo o antígeno foram incubadas com 2,0 ml de amostra de soro teste e soro hiperimune de coelho anti-antígeno de *H. capsulatum* (controle-positivo), ambos diluídos na proporção de 1:100 em PBS pH 7,4. Esta etapa do ensaio foi realizada a temperatura ambiente sob agitação constante, por duas (2) horas. Finalizado o período de incubação, as fitas de nitrocelulose foram lavadas por seis (6) vezes, por 10 minutos cada, em solução PBS-T.

Após esta etapa, as membranas foram incubadas com 2,0 ml de anti-IgG conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, Mo, USA), diluído a 1:1000 em solução PBS pH 7,4 e mantidas por duas (2) horas sob agitação constante, a temperatura ambiente, protegidas da luz. Em seguida novamente lavadas por seis (6) vezes, 10 minutos cada, em solução PBS-T. A reação foi revelada empregando-se solução de 4-cloro-1naftol (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, Mo, USA) e o bloqueio feito por lavagens sucessivas em água bidestilada.

3.7. Análise dos resultados

3.7.1. Avaliação dos parâmetros intrínsecos dos ensaios de imunodifusão dupla e *immunoblotting*

Diversos parâmetros devem ser avaliados para a validação de um ensaio sorológico. Por definição, a validade intrínseca, refere-se ao

desempenho do ensaio quando comparado a um ensaio de referência, neste caso, a reação de imunodifusão dupla em gel de agarose (Ferreira e Ávila, 2001).

Para a avaliação dos parâmetros intrínsecos, a seleção da amostragem assume vital importância. Desta forma, seguindo o modelo demonstrado na **Figura 3**, relacionamos a presença ou não da doença e os resultados obtidos nos ensaios de imunodifusão dupla e *immunoblotting*. A seleção das amostras de acordo com a presença ou ausência de doença foi realizada da seguinte forma (**Figura 4**):

- **Doente:** foram considerados pacientes “doentes” todos aqueles definidos como caso confirmado e provável no **item 3.1.2.**;
- **Não-doentes:** indivíduos, aparentemente saudáveis, doadores de banco de sangue. Também foram incluídas amostras heterólogas de pacientes com outras micoses e os casos descartados.

	Doença presente	Doença ausente
Teste positivo	VP <i>Verdadeiro-positivo</i>	FP <i>Falso-positivo</i>
Teste negativo	FN <i>Falso-negativo</i>	VN <i>Verdadeiro-negativo</i>
Total	VP + FN	FP + VN

Figura 3: Modelo para validação de teste diagnóstico, segundo Ferreira e Ávila (2001).

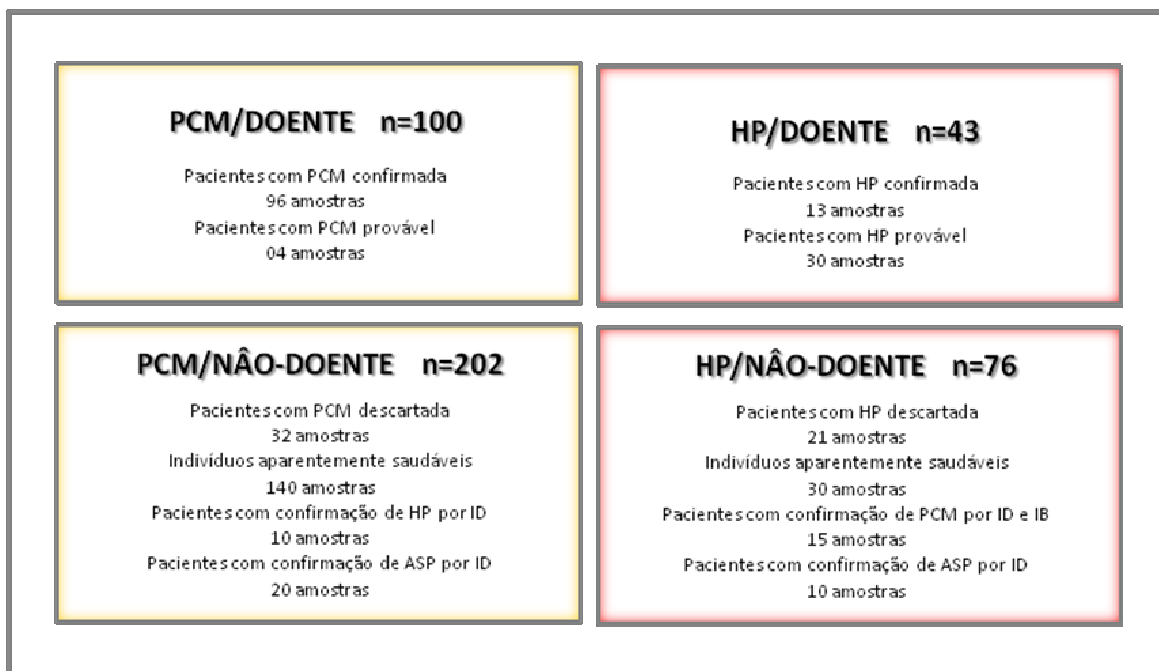


Figura 4: Descrição das amostras classificadas como doente e não-doente para avaliação dos parâmetros intrínsecos dos ensaios de imunodifusão dupla e *immunoblotting*.

3.7.1.1. Sensibilidade

A sensibilidade de um método diagnóstico representa a probabilidade que o resultado do teste seja positivo quando a doença está presente. Assim, a sensibilidade foi calculada pela proporção de amostras que apresentaram teste reagente (positivo) em relação aos pacientes com a doença (doentes). A multiplicação do valor encontrado, por 100, permitiu a apresentação da sensibilidade em porcentagem. Logo:

$$\text{Sensibilidade} = (VP/VP+FN) \times 100$$

Onde:

VP = verdadeiros positivos;

FN = falsos negativos.

3.7.1.2. Especificidade

A especificidade, por sua vez, representa a probabilidade que o resultado seja negativo quando a doença não se encontra presente. Dessa forma, a especificidade constitui na proporção de indivíduos não doentes (indivíduos saudáveis ou com outras doenças, que não a referente ao anticorpo específico utilizado) que apresentaram teste negativo (não reagente). A especificidade também foi expressa em porcentagem, multiplicando-se o valor encontrado por 100. Deste modo:

$$\text{Especificidade} = (VN/VN+FP) \times 100$$

Onde:

VN = verdadeiros negativos;

FP: falsos positivos.

3.7.1.3. Valores Preditivos Positivo e Negativo

Considerou-se valor preditivo positivo a porcentagem de pacientes com a doença entre todos (doentes e não-doentes) os que apresentavam teste diagnóstico positivo (reagente). Logo, por valor preditivo negativo compreende-se a porcentagem de indivíduos sem doença entre todos (doentes e não-doentes) com teste negativo (não reagente). Sendo assim, temos:

$$\text{Valor preditivo positivo} = (VP/VP+FP) \times 100$$

$$\text{Valor preditivo negativo} = (VN/VN+FN) \times 100$$

Onde:

VP = verdadeiros positivos; VN = verdadeiros negativos;

FP = falsos positivos; FN = falsos negativos

Sabe-se que os valores preditivos (positivo e negativo) dependem não só da sensibilidade e da especificidade do teste, como também da prevalência da doença na população de estudo. A prevalência pode ser definida como a porcentagem de indivíduos doentes em uma população, assim sendo, temos:

$$\text{Prevalência} = (VP+FN)/VP+VN+FP+FN$$

Onde:

VP = verdadeiros positivos; VN = verdadeiros negativos;

FP = falsos positivos; FN = falsos negativos

3.7.1.4. Eficiência

A eficiência de um teste revela sua exatidão e foi calculada pela proporção entre resultados verdadeiros (positivos/doentes e negativos/não-doentes) e o total de resultados observados. O resultado foi expresso em porcentagem, multiplicando do valor encontrado por 100. Portanto:

$$\text{Eficiência} = (VP+VN)/VP+VN+FP+FN$$

Onde:

VP = verdadeiros positivos; VN = verdadeiros negativos;

FP = falso positivos; FN = falso negativos

3.7.1.5. Índice Kappa de Cohen

3.7.1.5.1. Concordância entre os métodos de imunodifusão dupla e *immunoblotting*

O estado de concordância entre os métodos de ID e IB foi calculado segundo os índices de co-positividade, co-negatividade e coeficiente *kappa* (κ) (Ferreira e Ávila, 2001) obtidos a partir da **Figura 5**.

		Teste 2		Total
		positivo	negativo	
Teste 1	positivo	A	b	a+b
	negativo	C	d	c+d
	Total	a+c	b+d	N

Figura 5: Modelo para cálculo do índice *kappa*, segundo Ferreira e Ávila (2001).

O índice *Kappa* leva em consideração as proporções das concordâncias observadas e esperadas. Deste modo:

$$\kappa = \frac{Po - Pe}{1 - Pe} \text{ , onde:}$$

$$\text{Proporção de concordâncias observadas} = Po = a+d/N$$

$$\text{Proporção de concordâncias esperadas} = Pe = \frac{[(a+b).(a+c)] + [(c+d).(b+d)]}{N^2}$$

O valor de *kappa* varia de negativo a um (1) e sua representação está disposta no **Quadro 2**.

Quadro 2: Classificação do índice *kappa*, segundo Fleiss, A. R*.

Valor de <i>kappa</i>	Concordância
0,00 – 0,20	Ruim
0,21 – 0,40	Fraca
0,41 – 0,60	Moderada
0,61 – 0,80	Substancial
0,81 – 1,00	quase perfeita

*Fonte: Ferreira e Ávila (2001)

3.7.1.5.2. Reprodutibilidade intralaboratorial do ensaio de *immunoblotting*

A capacidade de um método ser reprodutível intralaboratorialmente refere-se à obtenção de resultados iguais em ensaios realizados com a mesma amostra biológica, por diferentes pessoas, no mesmo local. A variação da reprodutibilidade está associada a fatores relacionados a erros acidentais ou sistemáticos.

A fim de se avaliar a reprodutibilidade intralaboratorial da metodologia de IB desenvolvida neste trabalho, foi medido o grau de concordância *kappa* (κ) entre os resultados de três (3) analistas (Analista 1 / Analista 2 / Analista 3), que realizaram o ensaio com as mesmas amostras, em dias diferentes, no mesmo laboratório.

3.7.2. Teste do Qui-Quadrado

Para comparação das proporções foi utilizado o teste do qui-quadrado, utilizando o programa Epiinfo 6 (*Center for Disease Control and Prevention* - <http://www.cdc.gov>) com valor de significância $p \leq 0,050$.

4. Resultados

4.1. Paracoccidioidomicose

4.1.1. Otimização do *immunoblotting* para pesquisa de anticorpos anti-*P. brasiliensis*

É conhecido que a preparação antigênica utilizada pode interferir na sensibilidade, especificidade e, conseqüentemente, nos resultados obtidos de uma técnica sorológica. Sendo assim, visando otimizar o ensaio de *immunoblotting*, optou-se primeiramente pela avaliação do desempenho dos dois antígenos frequentemente utilizados no laboratório para realização da rotina diagnóstica **[ANEXO C]**.

Desta forma, filtrados de cultura produzidos a partir das amostras 113 ou B-339 de *P. brasiliensis* foram imobilizados em membranas de nitrocelulose, nas mesmas condições. Verificou-se que os ensaios realizados com membranas de nitrocelulose contendo antígeno Pb 113 apresentaram maior capacidade de detecção de anticorpos, contra diferentes frações protéicas, quando comparado aos realizados empregando-se antígeno B-339 **[ANEXO C.1]**.

Observou-se, por outro lado, quando o ensaio de *immunoblotting* foi conduzido empregando-se membranas imobilizadas com antígeno Pb B-339, que nenhuma das amostras de soro avaliadas apresentou reatividade frente à gp70. Face a estes achados, optou-se por eleger o antígeno Pb 113 para a realização dos ensaios de *immunoblotting*, especialmente pelo fato do mesmo permitir o reconhecimento das frações protéicas de massa molecular de 43 e 70 kDa, consideradas por diversos autores como marcadores sorológicos da infecção por *P. brasiliensis* **[ANEXO C.1]**.

Na etapa seguinte do processo de otimização, procurou-se estabelecer as condições consideradas “ideais” para condução da reação. Desta forma, um dos parâmetros avaliados foi o processo adotado para transferência das proteínas contidas no gel de poliacrilamida para a membrana de nitrocelulose. Foi possível verificar que o processo de transferência do antígeno Pb 113 para a membrana de nitrocelulose realizado em voltagem constante de 30 V, por aproximadamente 18 horas, a 4°C foi mais eficiente, conferindo melhor definição visual das frações e uniformidade aos resultados **[ANEXO C.2]**.

Visando abolir ou no mínimo minimizar reações de fundo e/ou cruzadas observadas no protocolo-padrão, diversos parâmetros foram avaliados:

- Diferentes diluições das amostras biológicas - 1:40 e 1:100 **[ANEXO C.3]**;
- Diferentes diluições do anticorpo secundário, ou seja, IgG humana conjugada a peroxidase - 1:1000, 1:2000 e 1:3000 **[ANEXO C.4]**;
- Diferentes soluções para diluição do soro e do anticorpo secundário - PBS; PBS-L 1%; PBS-L 3% e PBS-L 5% **[ANEXO C.5]**;
- Diferentes períodos de incubação do soro e do anticorpo secundário por uma (1) hora, uma (1) hora e 30 minutos e duas (2) horas **[ANEXOS C.6 e C.7]**;

A análise dos resultados demonstrou que soros diluídos 100 vezes (1:100) em solução PBS pH 7,4 acrescido de 3% de leite desnatado apresentou maior nitidez e melhor definição na visualização das frações protéicas em amostras reagentes visto que atenuou substancialmente a intensidade da reação de fundo. Por sua vez, amostras sabidamente não-reagentes para PCM apresentaram pouca ou nenhuma reação inespecífica, revelando um perfil distinto daquele observado quando se empregava o método considerado como referência. Verificou-se que a imunoglobulina G

(IgG) humana conjugada a peroxidase diluída em até 3000 vezes, também em solução PBS-L 3%, manteve a capacidade de amplificação do sinal da reação antígeno-anticorpo.

Demonstrou-se ainda, em relação ao período de incubação dos soros testes, não haver necessidade de incubação por período superior a duas (2) horas, sendo este o tempo mínimo para o desenvolvimento da reação antígeno-anticorpo. Para a amplificação da reação empregando-se como anticorpo secundário, anti-IgG humana conjugada a peroxidase, verificou-se que uma (1) hora e 30 minutos foram suficientes.

Objetivando-se determinar o período que as membranas contendo antígeno de *P. brasiliensis* imobilizado poderiam permanecer estocadas, avaliou-se também a estabilidade (tempo de prateleira) das mesmas. Para tanto, membranas armazenadas a - 20° C por um período de sete (7), 10, 15 e 30 dias, foram avaliadas nas seguintes condições:

- Membrana sem bloqueio (logo após o processo de transferência);
- Membrana bloqueada em PBS-L 5% e lavada com tampão PBS pH 7,4.

A análise dos resultados demonstrou que membranas de nitrocelulose tratadas com PBS-L 5% podem ser armazenadas a -20° C por um período de 10 dias, sem qualquer prejuízo na qualidade da reação. Já aquelas que não foram tratadas com a solução de bloqueio, podem ser estocadas a -20° C por um período de 30 dias, desde que sejam devidamente armazenadas, ou seja, envoltas em papel filme e depois em papel alumínio.

A **Tabela 1** sumariza as condições de reação estabelecidas durante o processo de otimização do *immunoblotting* visando a pesquisa de anticorpos anti-*P. brasiliensis*

Tabela 1: Condições estabelecidas para o desenvolvimento da técnica de *immunoblotting* para pesquisa de anticorpos séricos anti-*P. brasiliensis* no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses.

	Transferência	Diluição do soro	Diluição do conjugado	Tampão de diluição (soro e conjugado)	Tempo de incubação (soro e conjugado)	Armazenamento da membrana, <u>sem</u> bloqueio	Armazenamento da membrana, <u>após</u> bloqueio
Rápida – 150mA, 3hs, 2 a 4°C							
Lenta – 30V, 18hs, 4°C	X						
1:40							
1:100		X					
1:200							
1:1000							
1:2000							
1:3000			X				
PBS							
PBS-L 1%							
PBS-L 3%				X			
PBS-L 5%							
1 hora							
1 h 30 min					X (Conjugado)		
2 horas					X (Soro)		
1 dia							
10 dias						X	
20 dias							
30 dias							X
90 dias							

Antes de iniciar as análises com as amostras de soro dos pacientes selecionados no presente trabalho, foi realizado um ensaio preliminar, a fim de se confirmar o desempenho de todos os parâmetros estabelecidos para a condução do novo protocolo de *immunoblotting* na casuística estudada.

A análise do perfil de reatividade das 20 amostras de pacientes avaliadas, frente às preparações antigênicas Pb B-339 e Pb 113, revelou que não houve diferença entre os resultados obtidos por ID. Em relação ao ensaio de IB, verificou-se que membranas dotadas com antígeno Pb 113 conferiram maior sensibilidade à metodologia, pois foi possível detectar anticorpos específicos em 16 (81,3%) das amostras de pacientes com PCM (confirmada ou suspeita). Do total de amostras reagentes, 68,8% (11/16) reconheceram os marcadores sorológicos da PCM, ou seja, gp 43 e gp 70 e 31,2% (5/16) das amostras apresentaram reatividade, mesmo que de fraca intensidade, apenas frente à gp43. Em contrapartida, a análise da imunoreatividade das amostras de soro empregando-se membranas imobilizadas com antígeno B-339 demonstrou ausência total de reconhecimento frente a fração de 70 kDa de *P. brasiliensis*. Verificou-se, ainda, que 12 (60%) amostras reagiram com a glicoproteína de 43 kDa; destas, 58,3% (7/12) apresentaram forte intensidade de reação **(Tabela 2)**.

Foi possível observar que cinco (5) amostras de soro que reagiram fracamente frente a gp43, quando a membrana continha o antígeno B-339, apresentaram, nas membranas dotadas com antígeno da amostra 113 de *P. brasiliensis*, reatividade frente às frações de 43 e 70 kDa. Destaca-se, ainda, o fato de duas (2) amostras que apresentaram forte padrão de reatividade não serem de pacientes com suspeita clínica de PCM: uma (1) proveniente de um paciente com histoplasrose disseminada e a outra de um indivíduo que apresentava histórico de aspergilose **(Tabela 2)**.

Estes resultados ratificaram a escolha do antígeno Pb 113 para a condução do projeto.

Tabela 2: Comparação do desempenho entre as metodologias de imunodifusão dupla e *immunoblotting* frente a filtrados de cultura das amostras 113 e B-339 de *P. brasiliensis*.

	Amostra	ID B-339	IB B-339	ID 113	IB113	Histórico da amostra
1	9750/09	R	gp43f	R	gp 43 e 70	PCM – FA/SA
2	8872/11	NR	gp43f	NR	gp 43f	PCM – FA/SA
3	13926/11	NR	gp43	NR	gp 43 e 70	PCM – FA/SA
4	1124/11	R	NR	R	gp 43f e 70f	PCM – FC
5	1530/11	R	gp43f	R	gp 43 e 70f	PCM – FC
6	6583/10	R	gp43	R	gp 43 e 70f	PCM – FC
7	8021/11	NR	gp43f	NR	gp 43f e 70	PCM – FC
8	14686/11	R	gp43	R	gp 43 e 70	PCM – FC
9	4696/11	NR	NR	NR	gp 43f	Suspeita PCM
10	7288/11	NR	NR	NR	gp 43f	Suspeita PCM
11	7295/11	NR	gp43f	NR	gp 43 e 70	Suspeita PCM
12	10450/11	R	gp43	R	gp 43 e 70	Suspeita PCM
13	10600/11	NR	gp43	NR	gp 43f e 70	Suspeita PCM
14	15914/11	NR	NR	NR	NR	Suspeita PCM
15	15917/11	NR	NR	NR	NR	Suspeita PCM
16	16508/11	NR	NR	NR	NR	Suspeita PCM
17	47163/10	NR	NR	NR	NR	HP disseminada
18	11623/11	NR	gp43	NR	gp 43f	HP disseminada
19	74892/10	NR	gp43	NR	gp 43	ASP
20	3153/11	NR	NR	NR	gp 43f	Kalazar

ID – imunodifusão dupla; IB – *immunoblotting*; R – reagente; NR – reagente; f – fraca reatividade;

gp – glicoproteína; IIER – Instituto de Infectologia Emílio Ribas;

Pb – *Paracoccidioides brasiliensis*; Hc – *Histoplasma capsulatum*; Af – *Aspergillus fumigatus*

A fim de avaliar a aplicabilidade bem como a sensibilidade e a especificidade da reação de *immunoblotting* empregando o protocolo de referência e o otimizado, 16 amostras de soro foram selecionadas: quatro (4) de pacientes com PCM confirmada; quatro (4) de pacientes com suspeita clínica de PCM, quatro (4) de indivíduos aparentemente saudáveis de área endêmica para a micose e quatro (4) de indivíduos aparentemente saudáveis de área não endêmica para esta patologia. A análise dos

resultados demonstrou que o protocolo otimizado mostrou-se mais eficiente, sensível e específico quando comparado ao protocolo de referência (**Tabela 3**).

Empregando o protocolo otimizado foi possível observar ausência de reatividade para *P. brasiliensis* quando amostras de soro provenientes de indivíduos aparentemente saudáveis (de região endêmica e não endêmica) foram avaliadas. Estes resultados reproduziram aqueles obtidos pelo ensaio de imunodifusão dupla. Por outro lado, ao avaliar este mesmo grupo pelo protocolo de referência, pode-se verificar que 100% das amostras obtidas de indivíduos procedentes de área endêmica reagiram frente a gp43, sendo que duas (2) apresentaram forte padrão de reatividade. Observou-se ainda que 50% (2/4) das amostras de soro de indivíduos procedentes de área não endêmica apresentaram reatividade, mesmo que de fraca intensidade, frente a fração de 43 kDa (**Tabela 3**).

Uma vez estabelecido o novo protocolo para pesquisa de anticorpos anti-*P. brasiliensis* por *immunoblotting*, iniciou-se o estudo das amostras de pacientes com suspeita clínica de paracoccidiodomicose selecionadas na casuística (**Figura 6**).

Tabela 3: Análise comparativa do desempenho dos protocolos padrão versus otimizado da metodologia de *immunoblotting* para a pesquisa de anticorpos séricos anti-*P. brasiliensis*.

	Amostra	Protocolo Novo	Protocolo Antigo	Histórico do paciente
1	13926/11	gp43 e 70	gp43 e 70	PCM – FA/SA *
2	9750/09	gp43 e 70	gp43	PCM – FA/SA *
3	14686/11	gp43 e 70	gp43	PCM – FC *
4	6583/10	gp43	gp43	PCM – FC *
5	7275/09	gp43 e 70	gp43 e 70	Suspeita PCM
6	64570/10	NR	NR	Suspeita PCM
7	9824/11	NR	NR	Suspeita PCM
8	11623/11	gp43	gp43	Suspeita PCM
9	147	NR	gp43f	Hígido - endêmica**
10	146	NR	gp43f	Hígido - endêmica**
11	145	NR	gp43	Hígido - endêmica**
12	121	NR	gp43	Hígido - endêmica**
13	055	NR	NR	Hígido - não-endêmica***
14	056	NR	NR	Hígido - não-endêmica***
15	057	NR	gp43f	Hígido - não-endêmica***
16	058	NR	gp43f	Hígido - não-endêmica***

gp – glicoproteína; NR – não reagente; f – fraca reatividade; HP - histoplasrose

*amostra de soro de paciente com paracoccidiodomicose (PCM): FA/AS – forma aguda/subaguda; FC – forma crônica.

**amostra de soro de indivíduos saudáveis, provenientes de área endêmica para paracoccidiodomicose (Botucatu).

***amostra de soro de indivíduos saudáveis, provenientes de áreas consideradas não-endêmicas para paracoccidiodomicose.

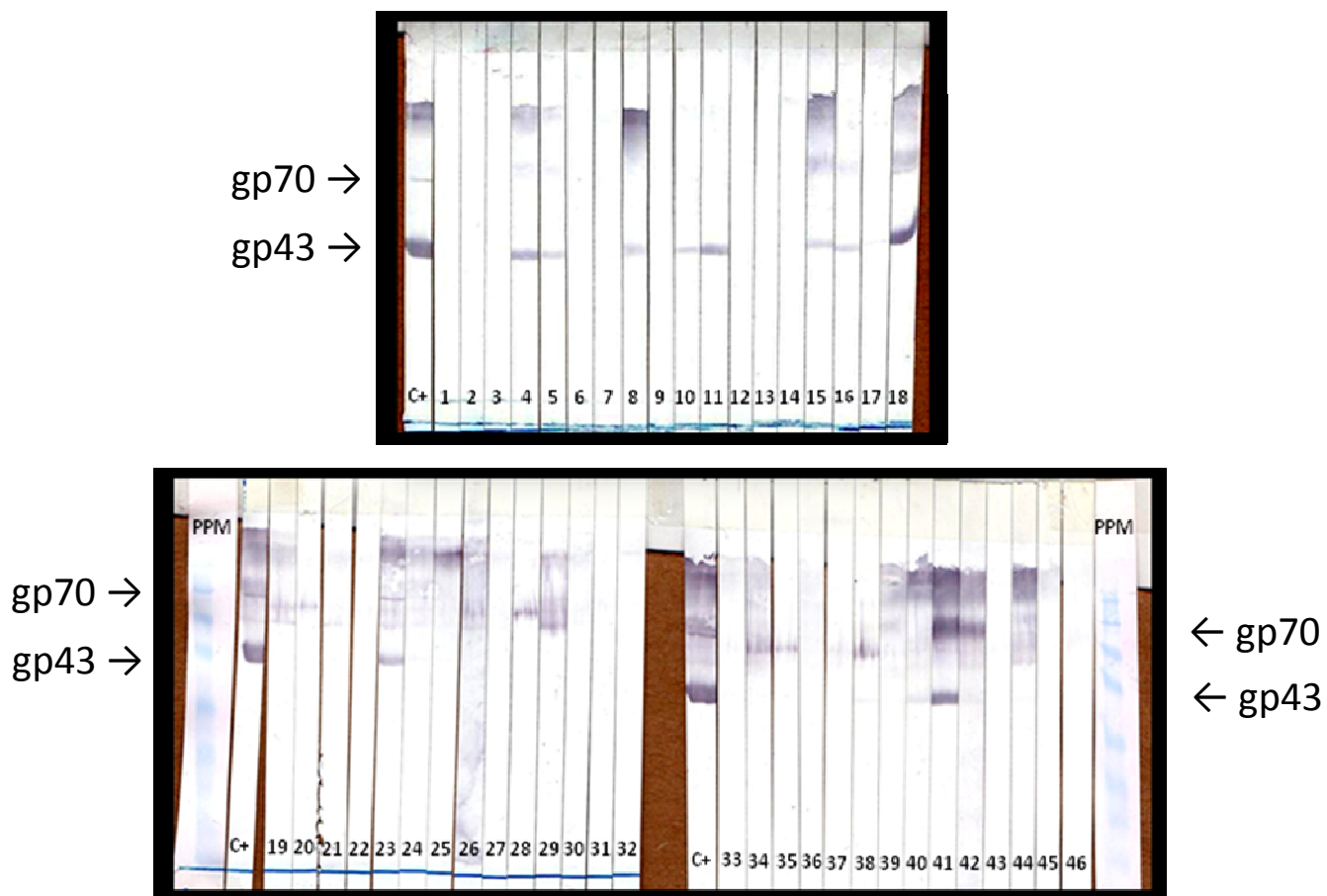


Figura 6: Reação de *immunoblotting* para pesquisa de anticorpos anti-*P. brasiliensis* em amostras de soro utilizando protocolo otimizado. PPM – padrão de peso molecular; C+ - controle positivo; 1 a 46 - amostras de pacientes com suspeita clínica de paracoccidiodomicose.

4.1.2. Caracterização dos pacientes com suspeita clínica de paracoccidiodomicose

Foram avaliadas 100 amostras de soro pertencentes a 76 pacientes com suspeita clínica de paracoccidiodomicose, atendidos ambulatorialmente e/ou internados no Instituto de Infectologia Emílio Ribas (IIER), e 47 amostras provenientes de 39 pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP. Após consulta dos prontuários, os pacientes foram classificados como caso confirmado, provável, suspeito e descartado, segundo os critérios para definição de casos estabelecida pelo Manual da Vigilância e Controle da Paracoccidiodomicose do Estado de São Paulo (SES, 2008) e Consenso Brasileiro de Paracoccidiodomicose (Shikanai-Yasuda et al., 2006) (**Figura 7**).

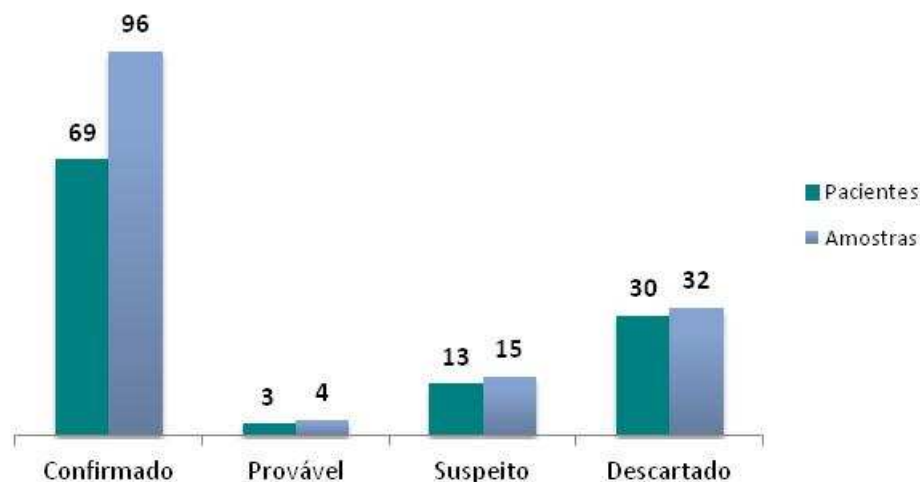


Figura 7: Distribuição em número absoluto dos pacientes (n=115) e das amostras de soro (n=147), segundo os critérios para definição de caso de PCM, estabelecidos pelo Manual da Vigilância e Controle da Paracoccidiodomicose do Estado de São Paulo (SES, 2008) e Consenso Brasileiro de Paracoccidiodomicose (Shikanai-Yasuda et al., 2006).

Dos pacientes classificados nas categorias de caso confirmado e caso provável da doença, 80,6% (n=58) eram do sexo masculino e 19,4% (n=14) do feminino. A idade dos pacientes variou de 17 a 87 anos, com média de 46,8. Foi possível observar nos indivíduos do sexo masculino um predomínio da faixa etária entre 41 e 60 anos (**Figura 8**). Em relação à ocupação profissional, destacaram-se os pacientes que, ao menos uma vez na vida, exerceram atividades relacionadas com manejo de solo (trabalhador rural, tratorista) e à construção civil. Não foi possível obter informação de 16 pacientes (**Figura 9**).

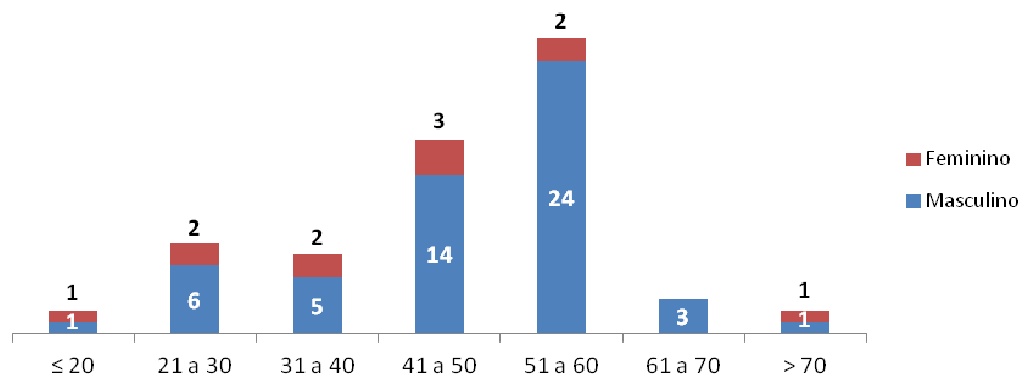


Figura 8: Distribuição em número absoluto dos pacientes classificados como caso confirmado e provável para paracoccidioomicose (n=65), de acordo com gênero e faixa etária.

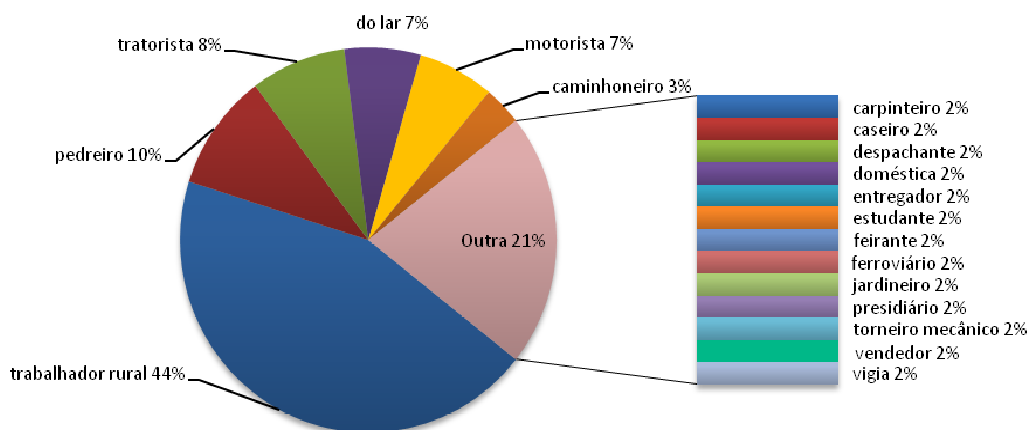


Figura 9: Distribuição em porcentagem dos pacientes classificados como caso confirmado ou provável para paracoccidioomicose (n=56), segundo ocupação profissional.

Baseando-se nas informações obtidas nos prontuários e levando em consideração os sinais clínicos da PCM, verificou-se que 76,9% (50/65) dos pacientes foram classificados como portadores da forma crônica e 23,1% (15/65) da forma aguda/subaguda. Não foi possível obter dados clínicos de sete (7) pacientes (**Figura 10**). Verificou-se que, naqueles com manifestação crônica da doença foram encontradas com maior frequência lesões de mucosa, pulmão e pele, apresentando a seguinte distribuição: 72,0% (36/50), 68,0% (34/50) e 52,0% (26/50), respectivamente. Entre os pacientes com a forma aguda/subaguda destacou-se o comprometimento ganglionar, observado em 93,3% (14/15) dos doentes (**Figura 11**).

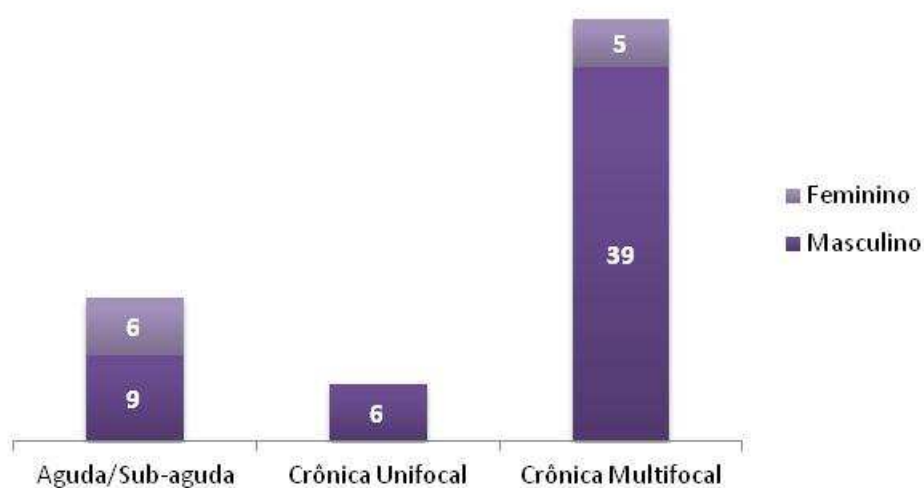


Figura 10: Distribuição em número absoluto dos pacientes classificados como caso confirmado e provável para paracoccidiodomicose (n=65), segundo gênero e forma clínica.

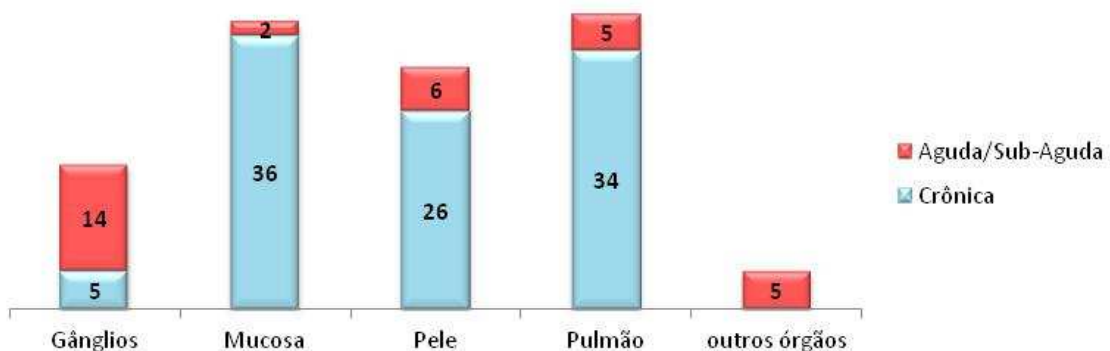


Figura 11: Distribuição em número absoluto dos pacientes classificados como caso confirmado e provável para paracoccidiodomicose (n=65), segundo forma clínica da doença e local da lesão.

Os pacientes que não apresentaram comprovação laboratorial de PCM por métodos micológicos, histopatológicos ou imunológicos; e ainda apresentaram diagnóstico de outra etiologia confirmado clínico-laboratorialmente foram definidos como caso descartado (n=30). Destes, 50,0% (15/30) manifestaram acometimento pulmonar; 23,3% (7/30) lesões cutâneas e/ou mucocutâneas; e 20,0% (6/30) linfadenomegalia. A principal patologia observada foi a tuberculose, sendo encontrada em 30,0% (9/30) dos pacientes, seguida das neoplasias, presente em 20,0% (6/30). Foi possível verificar que onze (36,7%) pacientes possuíam algum tipo de imunodeficiência como doença de base (**Tabela 4**).

Tabela 4: Relação de pacientes classificados como caso descartado de paracoccidiodomicose (n=30).

Paciente	Sexo	idade	Amostra	ID	IB	Imunodeficiência	Tipo de acometimento	Diagnóstico diferencial de PCM	Observação
PD1	M	59	1654/11	NR	NR		pulmonar (em TC) e febre a/e	Tuberculose prévia	Leptospirose + Diabetes mellitus
PD2	M	42	14811/11	NR	NR		pulmonar	Tuberculose	Diabetes mellitus
PD3	M	16	3153/11	NR	gp 43f		hepatoesplênico	Leishmaniose visceral	
PD4	F	59	402/11	NR	NR		pulmonar	Granulomatose linfocitóide	
PD5	M	36	15567/11 16508/11	NR NR	NR NR	Aids	ganglionar e hepático	Tuberculose	
PD6	M	71	59453/10	NR	gp 43f		medula óssea	Doença mieloproliferativa	
PD7	M	48	52094/10	NR	gp 43f	Aids	pulmonar	Tuberculose	co-infecção com CMV
PD8	M	22	22391/11	NR	NR		pulmonar	Tuberculose	
PD9	M	47	56/11	NR	NR	Imunodeficiência não-aids a/e	pulmonar	Tuberculose	
PD10	M	63	18106/11	NR	NR		Sistema Nervoso Central	Meningite asséptica	
PD11	M	17	19409/11	NR	NR	Imunodeficiência primária	pulmonar	Tuberculose miliar	
PD12	M	42	3155/11	NR	NR		pulmonar	Pneumonia por amianto	
PD13	M	38	56334/10	NR	NR	Aids	ganglionar e pulmonar	Micobacteriose não-tuberculosa	Infecção por <i>M. avium</i>
PD14	M	66	17805/11	NR	NR		mucocutâneo	Carcinoma	
PD15	M	37	25873/11	NR	NR		hepático	Esquistossomose	co-infecção com HCV
PD16	F	10	22532/11	NR	NR		cutâneo e ganglionar	Linfoma de célula T	
PD17	F	49	58857/10	NR	NR		Sistema Nervoso Central	Doença meningocócica	
PD18	M	3	15548/11	NR	NR	Doença granulomatosa crônica	pulmonar	Micobacteriose não-tuberculosa	Infecção por <i>M. avium</i>
PD19	F	66	15914/11	NR	NR		Sistema Nervoso Central, pulmonar e ósseo	Linfoma de célula T	
PD20	M	49	9103/11	NR	NR		ganglionar	Doença de Lyme	
PD21	M	49	19678/11	NR	NR	Aids	Sistema Nervoso Central	Demência pelo HIV	
PD22	M	31	19434/10	NR	NR	Aids	cutâneo	Sarcoma de Kaposi	Sífilis
PD23	M	16	15547/11	NR	NR	Aids	ganglionar	Sarcoma de Kaposi	
PD24	M	35	64571/10	NR	NR		intestinal	Colite pseudomembranosa	
PD25	M	49	21910/11	NR	NR		pulmonar	SARA	
PD26	M	22	6730/11	NR	NR		cutâneo e ganglionar	Tuberculose	
PD27	F	44	9824/11 10989/11	NR NR	NR NR		pulmonar	Carcinoma	
PD28	M	46	1528/11	NR	NR		mucocutâneo e pulmonar	Tuberculose	
PD29	M	31	64432/10	NR	NR	Aids	cutâneo	Dermatite	
PD30	M	30	17667/11	NR	NR	Aids	pulmonar	Tuberculose	

NR – não reagente; f – fraca reatividade; a/e – a esclarecer; TC – tomografia computadorizada; SARA - Síndrome da Angústia Respiratória Aguda

4.1.3. Análise sorológica dos pacientes com suspeita clínica de paracoccidioidomicose

A análise dos resultados sorológicos obtidos no ensaio de imunodifusão dupla em gel de agarose visando à pesquisa de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis* demonstrou que 46,9% (69/147) das amostras avaliadas apresentaram reatividade frente ao filtrado de cultura da amostra B-339, com detecção de títulos de anticorpos variando de 1 a 1024. Verificou-se que apenas nas amostras de pacientes classificados como caso confirmado e provável foi possível a detecção de anticorpos espécie-específicos (**Figura 12**).

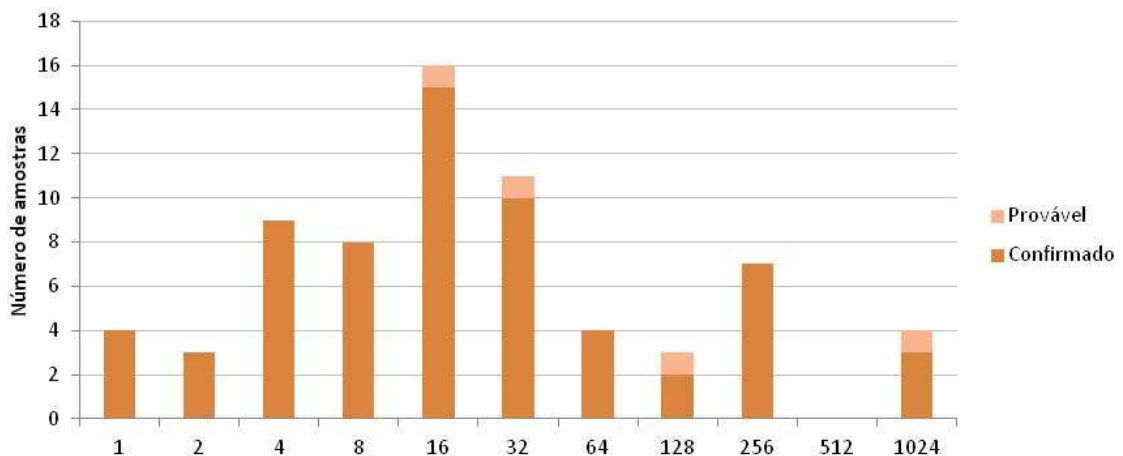


Figura 12: Distribuição em número absoluto das amostras de soro de pacientes (caso confirmado e provável) com paracoccidioidomicose (n=100), segundo título de anticorpos séricos espécie-específicos, avaliadas por imunodifusão dupla.

Os títulos obtidos da diluição das amostras reagentes foram distribuídos de acordo com a intensidade dos níveis séricos de anticorpos específicos, seguindo a classificação empregada por Moreto (2010):

- Baixo: soro não diluído a soro diluído a 1:4;
- Moderado: soro diluído 1:8 a soro diluído a 1:16;
- Elevado: soro com diluição maior ou igual a 1:32.

Dessa forma, observou-se que 29 amostras apresentaram níveis de anticorpos considerados elevados ($\geq 1:32$); em 24 amostras, os títulos foram moderados e em 16, detectou-se baixos títulos de anticorpos circulantes (**Figura 13**).

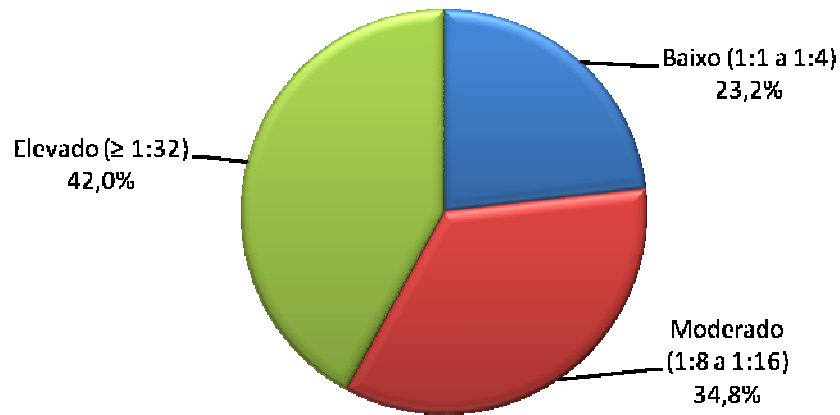


Figura 13: Perfil de reatividade em porcentagem das amostras reagentes por imunodifusão dupla (n=69), segundo a intensidade dos níveis séricos de anticorpos específicos anti-*P. brasiliensis*.

Em relação à forma clínica da doença, foi possível verificar que 45,8% (11/24) das amostras de soro dos pacientes categorizados segundo os sinais clínicos compatíveis com a forma aguda/subaguda apresentaram resultado não reagente por ID, e entre as reagentes, 12,5% (3/24) possuíam títulos moderados e 41,7% (10/24) níveis elevados de anticorpos. Nos pacientes com a forma crônica unifocal observou-se que 33,3% (4/12) das amostras apresentaram ausência de reatividade, 8,3% (1/12) títulos baixos, 16,7% (2/12) moderados e 41,7% (5/12) elevados. A distribuição dos títulos de anticorpos entre as amostras de pacientes com a forma crônica multifocal foi de 19,3% (11/57) com resultado não reagente, 24,6% (14/57) com títulos baixos, 31,8% (18/57) moderados e 24,6% (14/57) elevados (**Figura 14**). Foi possível avaliar que a metodologia de imunodifusão dupla apresentou melhor desempenho na detecção de anticorpos anti-*P. brasiliensis* em pacientes crônicos (72,5%) do que naqueles com a forma aguda (45,8%) ($p=0,018$).

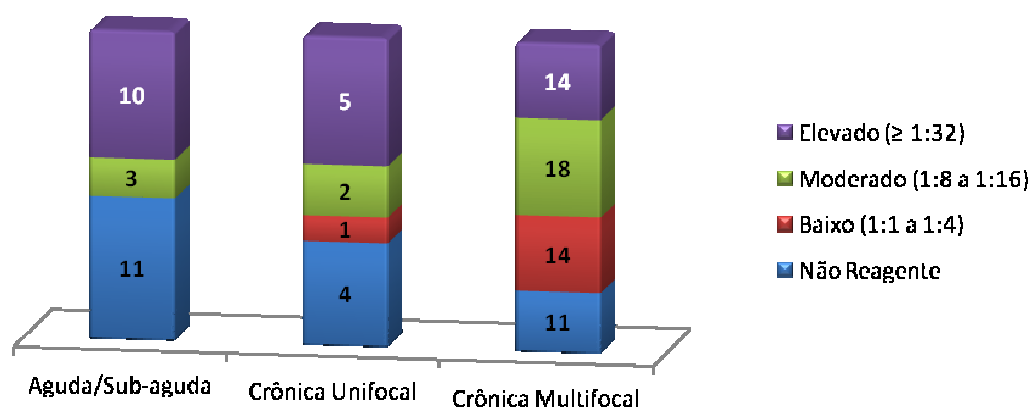


Figura 14: Distribuição em número absoluto de amostras de soro dos pacientes com paracoccidiodomicose (confirmado e provável) (n=93), segundo a forma clínica da doença e intensidade dos títulos de anticorpos avaliados por imunodifusão dupla.

A avaliação dos soros de pacientes por *immunoblotting* demonstrou que 87 das 147 amostras analisadas foram reagentes frente ao antígeno Pb 113 de *P. brasiliensis*. Dos 115 pacientes selecionados, 61 apresentaram reatividade sorológica para paracoccidiodomicose pela mesma técnica (Figura 15).

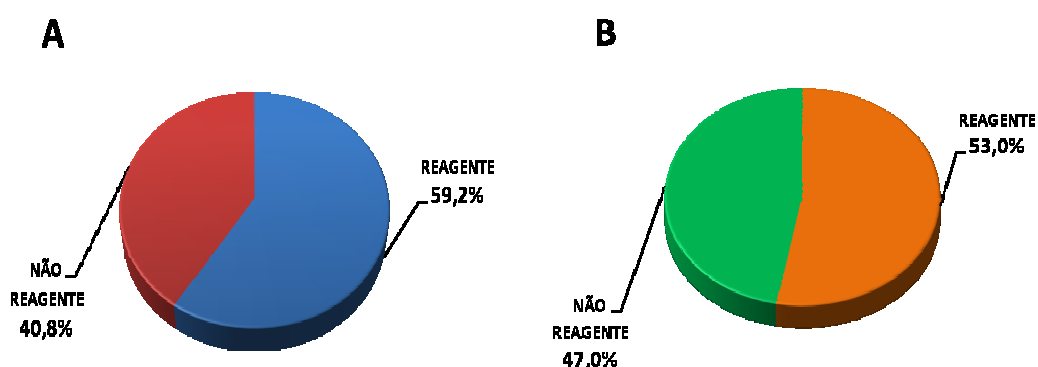


Figura 15: Percentual de reatividade para *P. brasiliensis* por *immunoblotting*, segundo o número de amostras (A) (n=147) e de pacientes (n=115) (B) avaliados.

Foi possível verificar que 52 amostras (59,8%) apresentaram reatividade frente às glicoproteínas de 43 e 70 kDa, concomitantemente; enquanto 35 (40,2%) soros reagiram apenas frente à gp43. A distribuição do padrão de reatividade das amostras reagentes frente à gp43 e gp70 encontra-se representada na **Figura 16**. Demonstrou-se, ainda, que apenas as amostras de pacientes classificados na definição de caso confirmado ou provável de PCM, reconheceram a molécula de 70kDa. Em relação às manifestações clínicas não se observou diferença no percentual de reatividade frente às glicoproteínas de 43 e 70 kDa. Pacientes portadores da forma aguda apresentaram percentual de reatividade equivalente a 87,5% (21/24) e aqueles com a forma crônica, 87,0% (60/69) ($p=0,776$) (**Figura 17**).

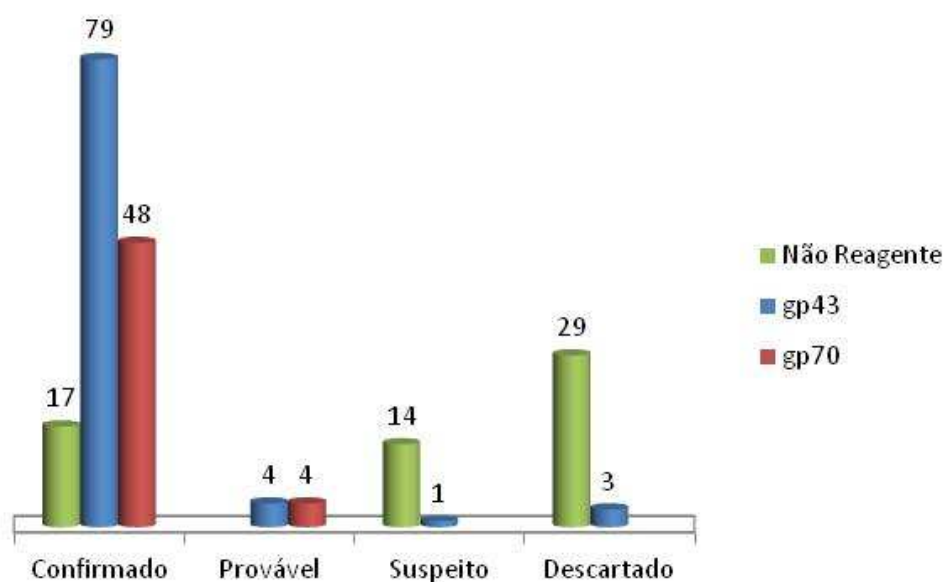


Figura 16: Distribuição em número absoluto das amostras de pacientes avaliadas ($n=147$), segundo as definições de caso de paracoccidiodomicose e o perfil de reconhecimento por *immunoblotting*.

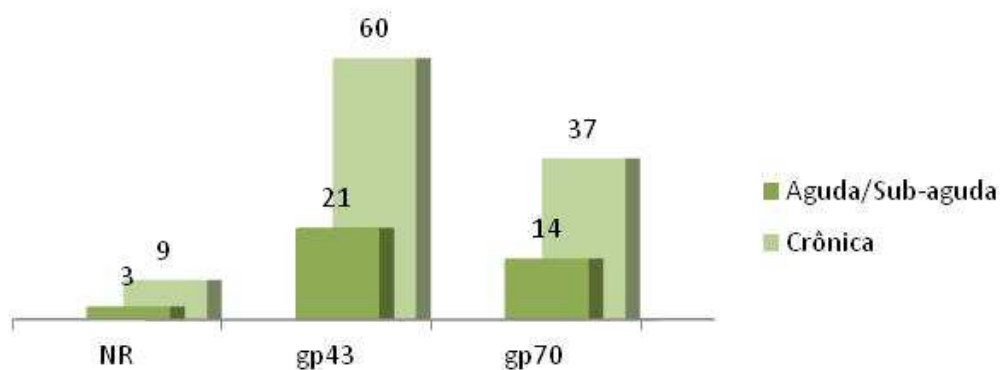


Figura 17: Distribuição em número absoluto das amostras (n=93), segundo o perfil de reconhecimento por *immunoblotting* e a forma clínica do paciente: NR – não reagente.

Comparando os resultados obtidos após a realização dos ensaios de imunodifusão e *immunoblotting*, pode-se observar que o último apresentou maior capacidade de detecção de anticorpos anti-*P. brasiliensis* (59,2%) em relação à ID (46,9%) ($p=0,035$). Demonstrou-se, ainda, uma possível existência de correlação entre os títulos de anticorpos detectados por ID e a intensidade da reação por IB. A fraca reatividade frente à gp43 por IB foi observada em 26,8% (19/71) das amostras de soro que apresentaram níveis moderados e elevados e 91,7% (11/12) daquelas com baixos títulos ou ausência de anticorpos séricos anti-*P. brasiliensis* por ID ($p<0,001$) (**Figura 18**). Além disso, se verificou uma possível associação entre o reconhecimento da fração de 70 kDa e níveis altos de anticorpos específicos (≥ 8); sugerindo que esta fração seja preferencialmente reconhecida por soros de pacientes que apresentam títulos moderados e elevados de anticorpos circulantes espécie-específicos por ID. Considerando-se que a gp70 foi reagente em, respectivamente 33,3% (5/16), 70,8% (17/24) e 72,4% (21/29) das amostras com títulos baixos, moderados e elevados ($p=0,007$) (**Figura 19**).

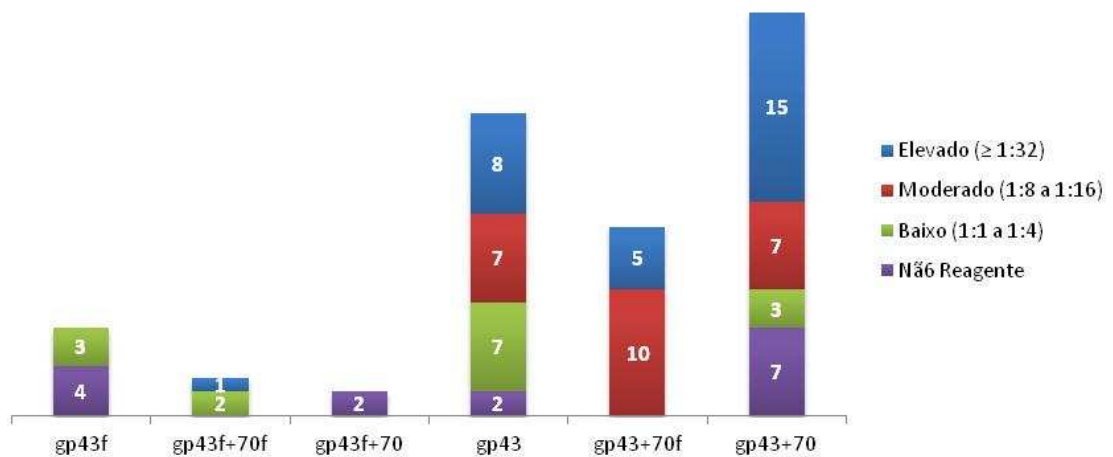


Figura 18: Perfil de reconhecimento, por *immunoblotting*, das amostras de soro (casos confirmado e provável) frente às glicoproteínas de 43 e 70 kDa (n=83), de acordo com a intensidade dos níveis séricos de anticorpos circulantes obtidos por imunodifusão dupla. (f) – fraca reatividade.

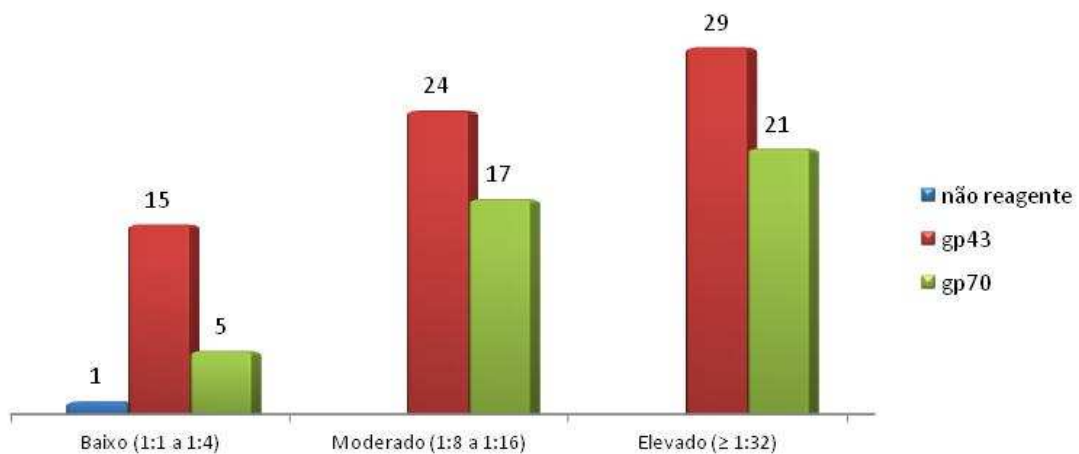


Figura 19: Distribuição em número absoluto das amostras de soro (casos confirmado e provável) reagentes por imunodifusão dupla (n=69), de acordo com os níveis séricos de anticorpos circulantes obtidos e a reatividade por *immunoblotting* frente às glicoproteínas de 43 e 70 kDa.

4.1.4. Avaliação sorológica do grupo controle

As 140 amostras de indivíduos, aparentemente saudáveis, provenientes de áreas endêmicas e não-endêmicas para PCM não apresentaram reatividade frente ao filtrado de cultura do isolado B-339 de *P. brasiliensis* por ID.

Verificou-se, por IB, que nenhuma das amostras dos doadores de sangue do Hemocentro de Botucatu apresentou reatividade frente às frações consideradas marcadores sorológicos da PCM, ou seja, gp43 e/ou 70. Entretanto, quatro (4) amostras (5,3%) dos indivíduos provenientes da região litorânea do Estado de São Paulo foram reagentes frente à gp43, sendo que duas (2) apresentaram reatividade de fraca intensidade.

Observou-se que 23,3% (7/30) das amostras selecionadas de pacientes com histoplasrose (10) e aspergilose (20) apresentaram, no ensaio de IB, reatividade cruzada ao antígeno de *P. brasiliensis*; contudo, nenhuma dessas amostras foi reagente para PCM por ID. Verificou-se que três (3) (30,0%) amostras de pacientes com infecção por *H. capsulatum*, apresentaram fraca reatividade frente à fração 43 kDa de *P. brasiliensis*; entre as amostras reagentes para *A. fumigatus*, 4 (20,0%) foram reagentes para PCM (**Figura 20**).

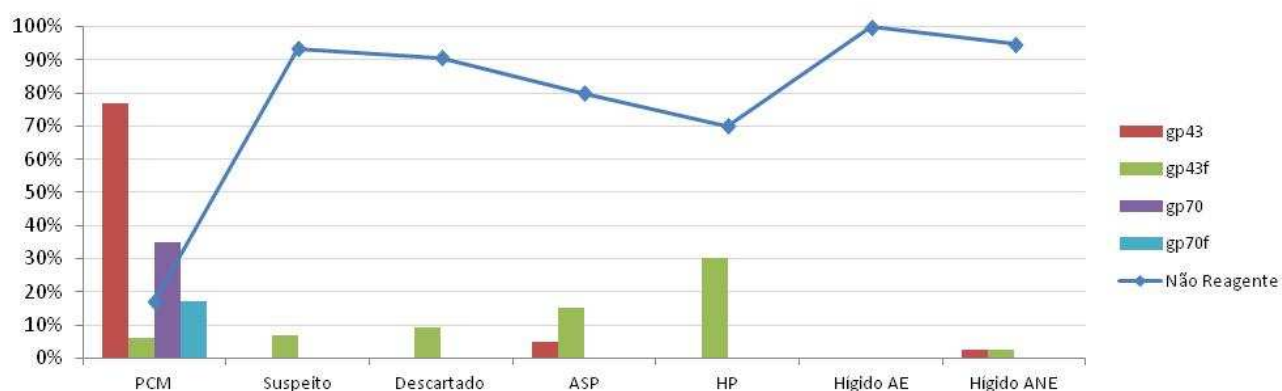


Figura 20: Distribuição em porcentagem das amostras de pacientes com paracoccidioidomicose (n=147), aspergilose (n=20), histoplasmose (n=10), e indivíduos hígidos provenientes de área endêmica (AE) (n=64), e não-endêmica (ANE) (n=76), segundo o reconhecimento por *immunoblotting* frente ao antígeno Pb 113 de *P. brasiliensis*. (f) - fraca reatividade.

4.1.5. Parâmetros intrínsecos dos ensaios sorológicos

Para a determinação dos parâmetros intrínsecos do ensaio de imunodifusão dupla, foram utilizados os valores descritos na **Tabela 5**. Dessa forma, a sensibilidade do teste foi de 69,0% (69/100) e a especificidade de 100,0% (202/202). O valor preditivo positivo (VPP) foi de 100,0% (69/69) e o negativo (VPN) igual a 86,7% (202/233), em uma prevalência de 33,0%. O ensaio de ID apresentou eficiência de 89,7% (271/302).

Tabela 5: Avaliação das amostras de soro por imunodifusão dupla, de acordo com a confirmação clínico-laboratorial de paracoccidiodomicose.

	PCM/DOENTES	PCM/NÃO-DOENTES	Total
ID REAGENTE	69	0	69
ID NÃO-REAGENTE	31	202	233
Total	100	202	302

Na avaliação da metodologia de *immunoblotting*, primeiramente foram consideradas reagentes, as amostras que apresentaram reatividade frente à gp43, incluindo ou não outras frações antigênicas (**Tabela 6**). Dessa forma, o ensaio apresentou sensibilidade de 83,0% (83/100) e especificidade de 93,1% (188/202). O VPP foi equivalente a 85,6% (83/97) e o VPN de 91,7% (188/205). A eficiência do ensaio de IB foi avaliada em 89,7% (271/302).

Tabela 6: Avaliação das amostras de soro por *immunoblotting*, considerando a reatividade frente à gp43, de acordo com a confirmação clínico-laboratorial de paracoccidiodomicose.

	PCM/DOENTES	PCM/NÃO-DOENTES	Total
IB REAGENTE	83	14	97
IB NÃO-REAGENTE	17	188	205
Total	100	202	302

Considerou-se pertinente avaliar os parâmetros previamente descritos apenas no conjunto de amostras que apresentaram reatividade frente às frações de 43 e 70 kDa simultaneamente (**Tabela 7**). Neste caso, as 46 amostras que apresentaram reatividade somente frente à gp43 foram consideradas como resultado sugestivo e, portanto, excluídas da análise. Assim posto, a sensibilidade do método de IB foi de 75,4% (52/69); a especificidade, 100,0% (188/188); o VPP, 100,0% (52/52) e o VPN, 91,7%

(188/205). A eficiência do ensaio de IB, neste caso, foi equivalente a 93,4% (240/257).

Tabela 7: Avaliação das amostras de soro por *immunoblotting*, considerando a reatividade simultânea frente às glicoproteínas de 43 e 70 kDa, de acordo com a confirmação clínico-laboratorial de paracoccidiodomicose.

	PCM/DOENTES	PCM/NÃO-DOENTES	Total
IB REAGENTE	52	0	52
IB NÃO-REAGENTE	17	188	205
Total	69	188	257

Desta forma, comparando os resultados obtidos, utilizando o teste do qui-quadrado, verificou-se que o ensaio de IB, quando se considerou apenas a reatividade da gp43, apresentou sensibilidade superior a observada para a metodologia de ID (83% x 69%, $p=0,020$); entretanto, o percentual de especificidade foi inferior (93,1% x 100%, $p<0,001$), com VPP consequentemente inferior (85,6% x 100%, $p<0,001$) (**Figura 21**).

Quando levou-se em conta, a detecção simultânea das frações de 43 e 70 kDa, verificou-se que a especificidade e o VPP do IB alcançaram valor máximo, de forma semelhante a observada para ID. Não houve diferença estatística entre a sensibilidade da ID e do IB nestas condições, apesar deste último ter apresentado percentual superior (69,0% x 75,4%, $p=0,223$). O mesmo ocorreu na avaliação do VPN, onde o IB apresentou valor de 91,7% e a ID, 86,9% ($p=0,094$) (**Figura 21**).

Comparando a eficiência dos ensaios, que relaciona o número de resultados reagentes entre os doentes e os não reagentes obtidos nos indivíduos sem doença frente ao número total de amostras avaliadas, verificou-se que este parâmetro foi superior no IB quando se tomou por base

a presença simultânea da gp43 e 70 (93,4%). Entretanto, esse resultado apresentou semelhança pelo método estatístico, com a ID (89,7%) (**Figura 21**).

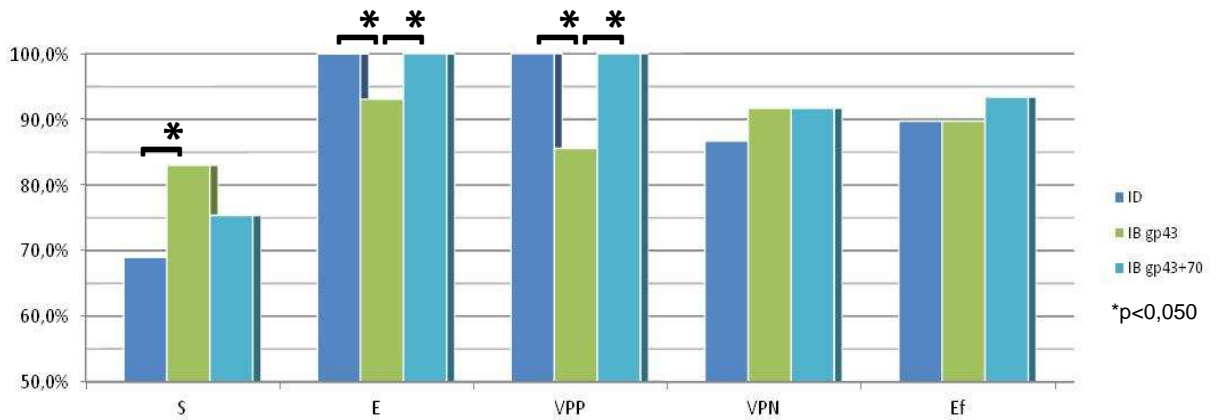


Figura 21: Comparação em porcentagem dos parâmetros intrínsecos dos ensaios de imunodifusão dupla (ID) e *immunoblotting* (IB): S – sensibilidade; E – especificidade; VPP – valor preditivo positivo; VPN – valor preditivo negativo; Ef – eficiência.

4.1.5.1. Interferência do tempo de tratamento dos doentes nos parâmetros de sensibilidade e eficiência dos ensaios

O grupo denominado PCM/doentes (casos confirmados e prováveis) inclui todas as amostras de pacientes com evidência clínica e laboratorial (micológica e/ou sorológica) da doença e, portanto, submetidos à terapia antifúngica. A distribuição das amostras segundo o tempo de tratamento do paciente é a seguinte:

- Pacientes sem tratamento: 22 amostras
- Até 30 dias de tratamento: 12 amostras
- De 31 dias a seis (6) meses: 14 amostras
- De sete (7) a 12 meses: 9 amostras
- De 13 a 24 meses: 9 amostras
- Mais de 25 meses: 19 amostras

- Sem tratamento, por cura aparente⁴: 8 amostras
- Sem informação sobre tratamento: 7 amostras

Durante as análises dos parâmetros intrínsecos obtidos pelos ensaios de ID e IB, foi possível observar que a sensibilidade e eficiência dos métodos apresentaram variabilidade de valores quando se avaliou o tempo de tratamento recebido pelos pacientes do grupo definido como PCM/doentes. A interpretação dos resultados sugere que a metodologia de ID tenha sofrido uma interferência maior nesses parâmetros que o IB (**Tabela 8**).

Tabela 8: Comparação dos valores de sensibilidade e eficiência dos ensaios de imunodifusão dupla (ID) e *immunoblotting* (IB) em relação ao tempo de tratamento recebido pelo paciente no momento da coleta da amostra.

Tempo de tratamento	ID		IB gp 43		IB gp43+70		Total de amostras acumuladas no grupo PCM/DOENTES
	Sensibilidade	Eficiência	Sensibilidade	Eficiência	Sensibilidade	Eficiência	
Sem tratamento	90,9%	99,1%	95,5%	95,1%	94,4%	99,5%	22
Até 1 mês	88,2%	98,3%	97,1%	95,4%	96,0%	99,6%	34
Até 6 meses	85,4%	97,2%	95,8%	95,2%	94,4%	99,2%	48
Até 12 meses	80,7%	95,8%	93,0%	94,6%	90,0%	98,4%	57
Até 24 meses	78,8%	94,8%	90,9%	94,1%	87,2%	97,6%	66
Mais de 24 meses	72,9%	92,0%	89,4%	93,4%	84,5%	96,6%	85
Cura aparente	72,0%	91,2%	87,1%	92,6%	81,0%	95,5%	93

Verificou-se que a sensibilidade do ensaio de ID foi de 90,9% quando se levou em conta apenas amostras de pacientes coletadas antes da introdução da terapia, incluindo pacientes tratados por até 12 meses, este valor apresentou redução de mais de 10%, chegando a ser 18,9% inferior quando se considerou os pacientes com “cura aparente” da doença (**Figura 22**). Ao mesmo tempo, foi possível observar que esta diferença foi menor no

⁴ Segundo o Manual de Vigilância e Controle da Paracoccidiodomicose, a palavra cura não deve ser aplicada a doentes com PCM, que podem sofrer de futuras reativações da doença. Os pacientes devem ser avaliados uma vez por ano, nos dois anos que seguem após a interrupção da terapia antifúngica,

IB, variando entre 8,4 a 13,4% de acordo com a reatividade das glicoproteínas de 43 e 70 kDa. Como demonstrado na representação gráfica, o tratamento antifúngico parece interferir mais na capacidade do método em detectar a gp70 do que a gp43 (**Figura 22**).

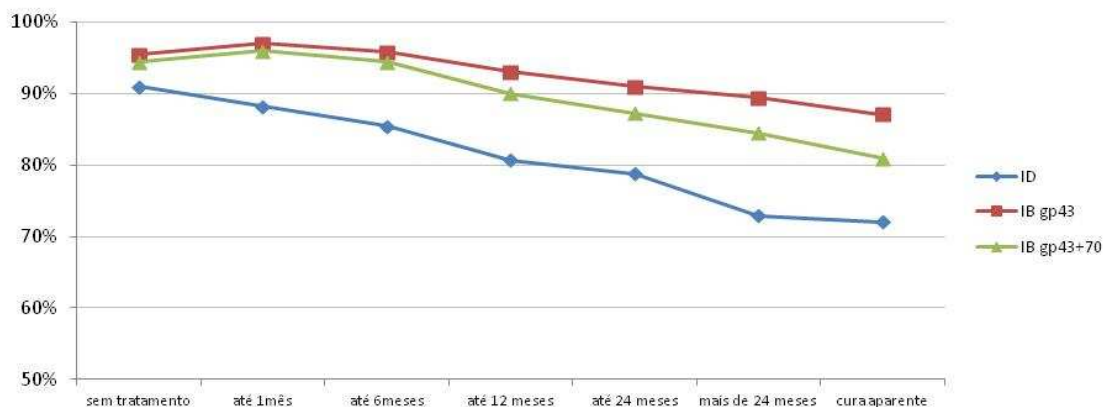


Figura 22: Curva dos valores de sensibilidade dos ensaios de imunodifusão dupla (ID) e *immunoblotting* (IB) em relação ao tempo de tratamento recebido pelo paciente no momento da coleta da amostra.

4.1.5.2. Avaliação da concordância entre os métodos e reprodutibilidade intralaboratorial do *immunoblotting*

Para o cálculo do coeficiente *Kappa* (κ) de concordância entre os métodos de ID e IB foram utilizadas as 317 amostras avaliadas no presente trabalho, ou seja, indivíduos classificados com doentes (n=100), não-doentes (n=202) bem como casos suspeito (n=15).

Foi possível demonstrar que 89,0% (282/317) das análises realizadas apresentaram resultados concordantes entre si. O cálculo do índice *kappa* foi igual a 0,72, equivalente a uma concordância substancial (**Quadro 2**). A concordância entre os resultados obtidos nos métodos de ID e IB podem ser observados na **Tabela 9**.

Tabela 9: Concordância de resultados entre os métodos de imunodifusão dupla e *immunoblotting*.

		IB		Total
ID		REAGENTE	NÃO REAGENTE	
TOTAL DE AMOSTRAS	REAGENTE	68	1	69
	NÃO REAGENTE	34	214	248
	Total	102	215	317
		KAPPA		0,75
DOENTES	REAGENTE	68	1	69
	NÃO REAGENTE	15	16	31
	Total	83	17	100
		KAPPA		0,57
NÃO - DOENTES	REAGENTE	0	0	0
	NÃO REAGENTE	14	188	202
	Total	14	188	202
		KAPPA		Não Calculável

A concordância dos resultados entre as amostras de soro de indivíduos com doença foi de 84,0% (84/100), com índice *kappa* equivalente a 0,57 (concordância moderada). A co-positividade dos pacientes com PCM foi de 68,0% (68/100); além disso, 16 amostras foram duplamente negativas; 15 reagentes apenas no IB e uma (1) reagente somente na ID. As amostras dos indivíduos não-doentes apresentaram co-negatividade de 93,1% (188/202) e não sendo verificado resultado duplamente reagente (**Tabela 9**).

A reprodutibilidade intralaboratorial do *immunoblotting* foi avaliada a partir da realização deste ensaio analisando 20 amostras, por três (3) analistas, em dias diferentes (**Tabela 10**). A concordância alcançada entre

os resultados obtidos pelos analistas 1, 2 e 3 (A1 x A2 x A3) foi de 95%. O coeficiente *Kappa* de concordância entre os analista 1 e 2 (A1 x A2) foi de 0,89; entre os analistas 1 e 3 (A1 x A3) de 1,0 e entre os analistas 2 e 3 (A2 x A3) de 0,89. Estes índices indicam a uma concordância quase perfeita (**Quadro 2**).

Tabela 10: Comparação da concordância observada entre as análises de *immunoblotting* realizadas por diferentes analistas (1, 2 e 3) com as mesmas amostras, em dias distintos e no mesmo laboratório.

	A1 x A2			A1 x A3			A2 x A3		
	R	NR	Total	R	NR	Total	R	NR	Total
R	12	0	12	12	0	12	12	1	12
NR	1	7	8	0	8	8	0	7	8
Total	13	7	20	12	8	20	13	7	20
KAPPA	0,89			1,0			0,89		

4. 2. Histoplasmose

4.2.1. Otimização do *immunoblotting* para pesquisa de anticorpos anti-*H. capsulatum*

Para determinação da melhor preparação antigênica a ser utilizada na pesquisa de anticorpos anti-*H. capsulatum* foram imobilizadas, nas mesmas condições, membranas de nitrocelulose com antígeno Hc 200 ou antígeno Hc 406 de *H. capsulatum* [ANEXO D.1].

A interpretação dos resultados revelou que os ensaios realizados com membranas de nitrocelulose contendo antígeno obtido a partir do isolado 200 mostraram-se mais eficientes e sensíveis quando comparado aos realizados com a preparação antigênica obtida a partir da amostra 406, possibilitando o reconhecimento das frações H (entre 108 e 120 kDa) e M (entre 70 e 94 kDa), consideradas marcadores sorológicos da infecção por *H. capsulatum* [ANEXO D.1].

Na etapa seguinte do processo de otimização, procurou-se estabelecer as condições consideradas “ideais” para o desenvolvimento da reação, objetivando principalmente abolir ou ao menos minimizar as reações de fundo, visto que a maioria dos pacientes apresenta imunossupressão causada pela infecção com HIV (Tabela 11).

Outro parâmetro avaliado foi o processo de transferência das proteínas contidas no gel de poliacrilamida para a membrana de nitrocelulose [ANEXO D.2]. Assim, duas (2) condições distintas foram avaliadas:

a) transferência por três horas em temperatura de 2 a 4°C, com amperagem constante de 150 mA e

b) transferência por aproximadamente 18 horas (*overnight*) a 4°C, com voltagem constante de 30 V.

Verificou-se, tanto pela coloração com Ponceau-S, como através da reatividade frente a amostras de soro de pacientes sabidamente reagentes para *H. capsulatum*, que não houve distinção entre os diferentes processos de transferência; entretanto, o método realizado em amperagem constante de 150 mA, por três horas em temperatura de 2 a 4°C foi considerado mais adequado, devido ao menor tempo de execução **[ANEXO D.2]**.

Visando minimizar e/ou retirar a reação de fundo frequentemente observada, diferentes parâmetros foram avaliados:

- Soluções para diluição dos soros e do anticorpo secundário – PBS pH 7,4 e PBS-L (1%, 3% e 5%) **[ANEXO D.3]**;
- Diluição das amostras biológicas - 1:40 e 1:100 **[ANEXO D.4.1]**,
- Diluição do anticorpo secundário - 1:1000 e 1:2000 **[ANEXO D.4.2]**

A análise dos resultados revelou que soros diluídos 100 vezes em solução PBS pH 7,4 acrescido de 3% de leite desnatado (PBS-L 3%) propiciaram melhor visualização e definição das frações H e M de *H. capsulatum* em amostras reagentes.

Ao avaliar a melhor concentração de anticorpo secundário, ou seja, IgG humana conjugada à peroxidase, foi possível observar que diluições superiores a 1000 vezes não foram adequadas, acarretando em prejuízo da eficiência da metodologia. Tendo em vista este resultado, optou-se em manter a mesma diluição (1:1000) já descrita no protocolo de referência.

Tabela 11: Condições estabelecidas para técnica de *immunoblotting* para pesquisa de anticorpos anti-*H. capsulatum*.

	Transferência	Diluição do soro	Diluição do conjugado	Tampão de diluição (soro e conjugado)
Rápida – 150mA, 3hs, 2 a 4°C	X			
Lenta – 30V, 18hs, 4°C				
1:40				
1:100		X		
1:1000			X	
1:2000				
PBS				
PBS-L 1%				
PBS-L 3%				X
PBS-L 5%				

Após a etapa de otimização, realizou-se a avaliação da aplicabilidade da técnica de *immunoblotting* para pesquisa de anticorpos anti-*H. capsulatum* nas amostras de pacientes com suspeita clínica de histoplasmose (**Figura 23**).

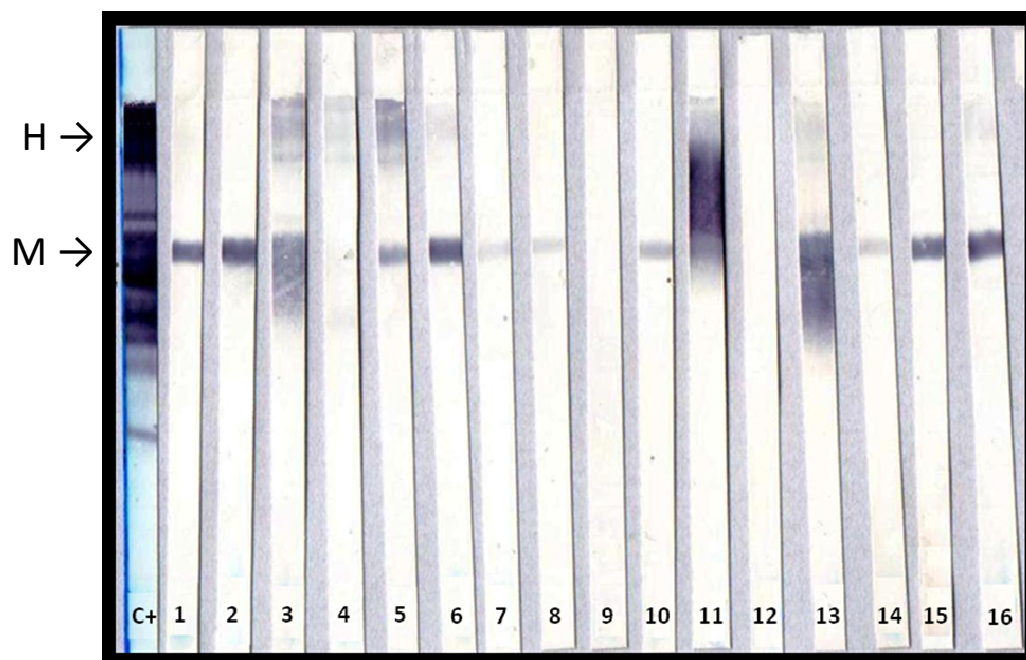


Figura 23: Reação de *immunoblotting* para pesquisa de anticorpos anti-*H. capsulatum* em amostras de soro utilizando protocolo otimizado. C+ - controle positivo; 1 a 16 - amostras de pacientes com suspeita clínica de histoplasmose; fração H – entre 108 e 120 kDa; fração M – entre 70 e 94 kDa.

4.2.2. Caracterização dos pacientes com suspeita clínica de histoplasmose

A pesquisa de anticorpos anti-*H. capsulatum* foi realizada avaliando-se 50 amostras de soro de 42 pacientes atendidos ambulatorialmente e/ou internados no IIER e em 23 amostras de soro de 23 indivíduos envolvidos em um surto de histoplasmose aguda, notificado pelo Núcleo de Vigilância Epidemiológica de Areias, SP. Após consulta dos prontuários, 15,5% (10/65) dos pacientes foram classificados como casos confirmados, 41,5% (27/65) prováveis, 12,3% (8/65) suspeitos e em 30,8% (20/65) o diagnóstico de histoplasmose foi descartado (**Figura 24**).

A histoplasmose pulmonar aguda foi a forma clínica observada com maior frequência, acometendo 64,9% (24/37) dos pacientes com casos confirmados e prováveis, sendo que a forma disseminada da doença foi encontrada em 35,1% (13/37) (**Figura 25**).

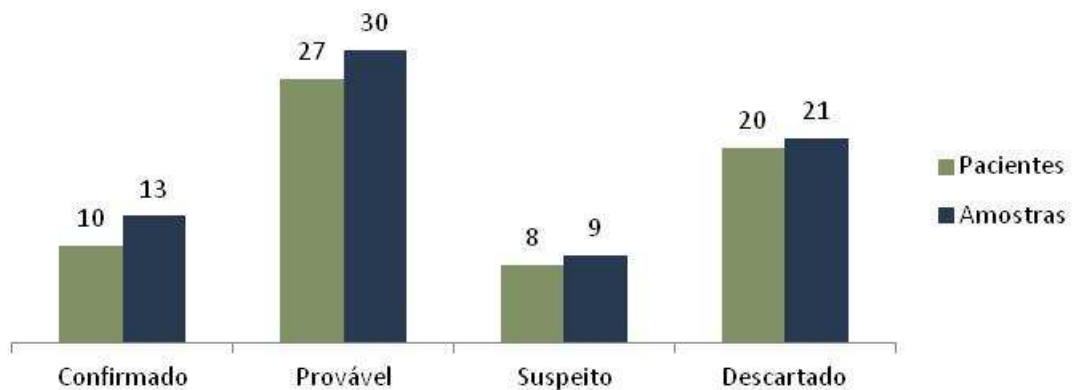


Figura 24: Distribuição em número absoluto dos pacientes (n=65), e das amostras de soro (n=73), segundo a definição de caso de histoplasmose.

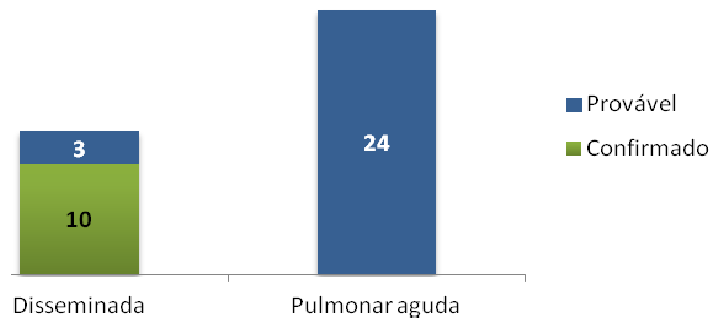


Figura 25: Distribuição em número absoluto dos pacientes com histoplasmose confirmada e provável (n=37), de acordo com a forma clínica da doença.

A média de idade dos pacientes classificados como casos confirmados e prováveis foi de 22,1 anos, sendo 64,9% (24/37) do sexo masculino e 35,1% (13/37) do feminino (**Figura 26**). Entre os pacientes com a forma disseminada, a faixa etária variou de 12 a 57 anos (média de 34,2) (**Figura 27**), demonstrando maior frequência nos pacientes do sexo masculino, 69,2% (9/13), comparado ao feminino, 30,1% (4/13). Os 23 indivíduos envolvidos no surto de histoplasmose pulmonar aguda apresentaram idade entre 14 e 16 anos, sendo 14 do sexo masculino e nove (9) do feminino (**Figura 27**).

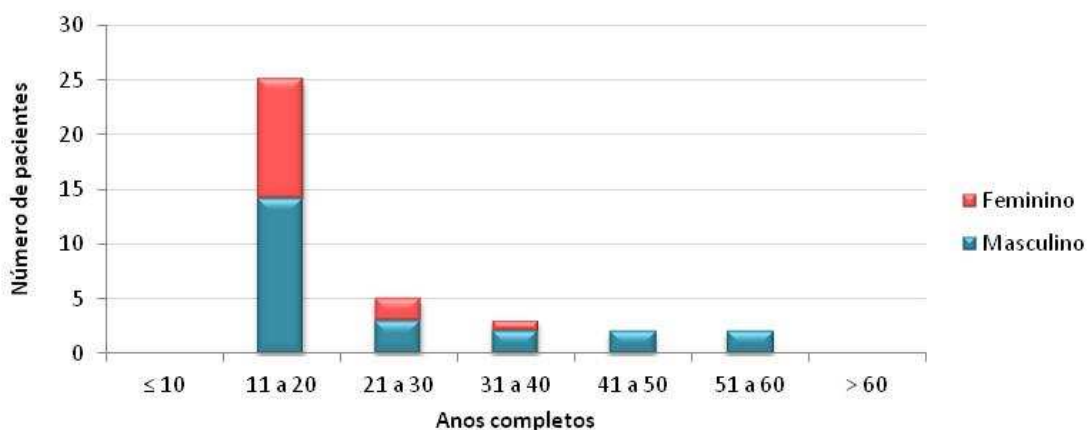


Figura 26: Distribuição em número absoluto dos pacientes com histoplasmose confirmada e provável(n=37), segundo gênero e faixa etária.

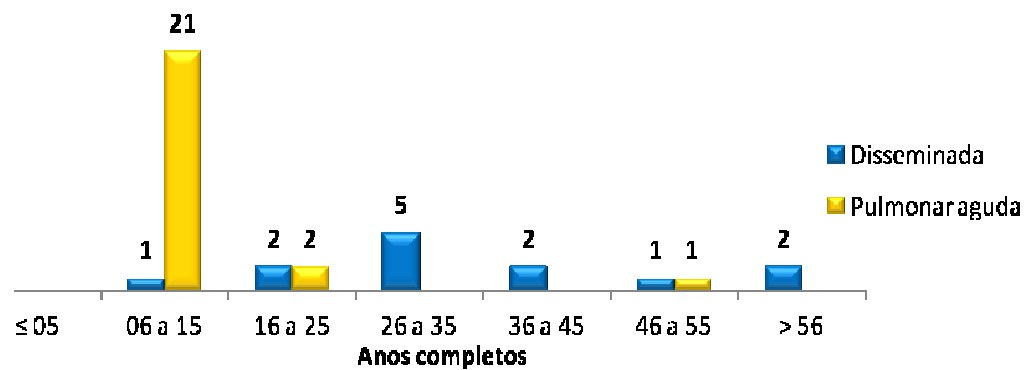


Figura 27: Distribuição em número absoluto dos pacientes com histoplasmosse confirmada e provável (n=37), de acordo com a faixa etária e forma clínica da doença.

Foi possível observar que todos os indivíduos com HP disseminada apresentavam algum tipo de imunodeficiência como doença de base: 12 eram portadores do HIV e um (1) possuía doença do fagócito. Em seis (6) pacientes verificou-se a presença de outras co-morbidades além do HIV: três (3) apresentavam co-infecção por citomegalovírus (CMV), três (3) por *Candida* sp, um (1) por *Micobacterium não-tuberculosis* e um (1) por *Cryptosporidium* sp (**Tabela 12**).

Tabela 12: Caracterização clínico-laboratorial dos pacientes que apresentaram co-infecção com *H. capsulatum*.

Paciente	Sexo	Idade	Forma clínica	Caso	Imunodeficiência	Co-morbidade	CD4
H1	M	29	HP disseminada	C	Aids	HIV; CMV	11
H2	M	38	HP disseminada	C	Aids	HIV; CMV	96
H3	M	20	HP disseminada	C	Doença do fagócito		
H4	F	36	HP disseminada	C	Aids	HIV	
H5	M	57	HP disseminada	C	Aids	HIV; CMV; <i>Cryptosporidium sp</i>	17
H6	F	12	HP disseminada	C	Aids	HIV; <i>Micobacterium ntb</i> ; <i>Candida sp</i>	33
H7	M	30	HP disseminada	C	Aids	HIV	
H8	M	50	HP disseminada	C	Aids	HIV	94
H9	M	32	HP disseminada	C	Aids	HIV; <i>Candida sp</i>	74
H10	M	25	HP disseminada	C	Aids	HIV; <i>Candida sp</i>	
HP1	F	29	HP disseminada	P	Aids	HIV	
HP2	F	30	HP disseminada	P	Aids	HIV	3
HP4	M	56	HP disseminada	P	aids	HIV	

HP – histoplasmose; C – confirmado; P – provável; CMV – citomegalovírus; ntb – não-tuberculosis

Entre os pacientes classificados como caso descartado de histoplasmose, 80% (16/20) apresentavam co-infecção pelo vírus HIV, sendo as co-morbidades mais apresentadas: criptococose (3 pacientes); tuberculose (2) e micobacteriose atípica (2). Os quatro (4) pacientes não-HIV foram diagnosticados com tuberculose, leishmaniose tegumentar, meningite viral e dermatofitose (**Tabela 13**).

Tabela 13: Caracterização clínico-laboratorial dos pacientes classificados como caso descartado de histoplasmoze.

Paciente	Sexo	Idade	Acometimento	Imunodeficiência	Diagnóstico diferencial	CD4
HD1	M	26	Pulmonar	Aids	Pneumonia bacteriana	
HD2	M	17	Pulmonar		TB	
HD3	M	21	Pulmonar	Aids	Pneumonia bacteriana	
HD4	F	24	Lesão de pele		Leishmaniose tegumentar	
HD5	M	14	Quadro sistêmico	Aids	Toxoplasmose	
HD6	M	25	Pulmonar	Aids	Micobacteriose ntb	31
HD7	M	13	Quadro sistêmico	Aids	Criptococose; tuberculose	
HD8	M	44	Quadro sistêmico		Leptospirose; meningite viral	
HD9	F	14	Pulmonar	Aids	CMV; pneumocistose	269
HD10	M	33	Lesão de pele	Aids	Dermatite crônica	346
HD11	M	37	Lesão de pele	Aids	Linfoma de Hodgkin	110
HD12	M	15	Lesão de pele	Aids	Criptococose cutânea	
HD13	M	17	Lesão de pele	Aids	Criptococose disseminada	
HD14	M	29	Lesão de pele	Aids	Tuberculose disseminada	
HD15	M	44	Lesão de pele	Aids	Psoríase	101
HD16	M	36	Lesão de pele	Aids		>300
HD17	M	36	Lesão de pele	Aids	Sarcoma de kaposi; Sífilis	408
HD18	F	60	Pulmonar	Aids	Micobacteriose ntb	315
HD19	M	9	Lesão de pele		Dermatofitose	
HD20	M	44	Lesão de pele	Aids	Doença arterial periférica	

HP – histoplasmoze; CMV – citomegalovírus; ntb – não-tuberculosis

4.2.3. Análise sorológica dos pacientes com suspeita clínica de histoplasmoze

A interpretação dos resultados sorológicos das amostras de soro dos pacientes com suspeita clínica de histoplasmoze demonstrou que 46,5% (34/73) apresentaram reatividade frente ao antígeno Hc 200 pelo ensaio de imunodifusão dupla em gel de agarose. Seguindo os critérios para definição de caso de doença, verificou-se que 38,5% (5/13) dos casos confirmados e 96,7% (29/30) dos prováveis foram reagentes por ID, com títulos de anticorpos variando de 1 a 128. Nenhum dos casos suspeito (n=9) ou descartado (n=21) apresentaram reatividade para *H. capsulatum* (**Figura 28**).

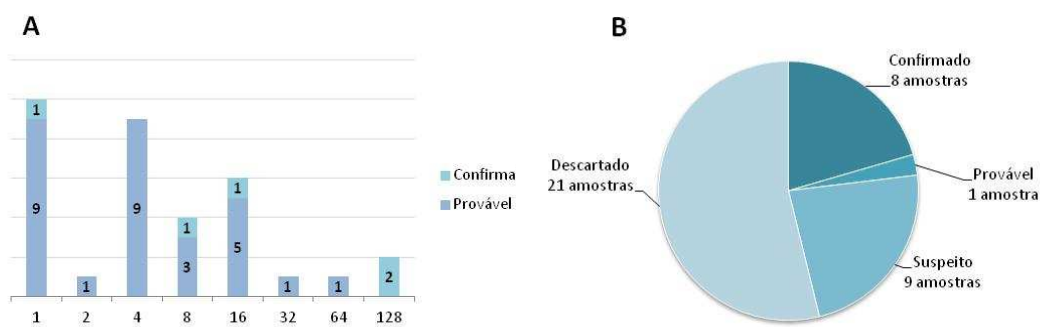


Figura 28: Distribuição em número absoluto das amostras de soro, de acordo com a reatividade por imunodifusão dupla frente ao antígeno Hc 200 de *H. capsulatum*. (A) Reagentes (n=34); (B) Não reagentes (n=39).

Considerando a forma clínica da doença, foi possível observar que 96,0% (24/25) dos pacientes com histoplasmose pulmonar aguda foram reagentes por imunodifusão; destes, 75,0% (18/24) apresentam títulos baixos de anticorpos circulantes, 20,8% (5/24) moderados e 4,2% (1/24) elevados. Entre os pacientes com HP disseminada, verificou-se que 44,4% (8/18) não apresentaram reatividade por ID e 20,0%, 50,0% e 30,0% das amostras clínicas reagentes apresentaram, respectivamente, títulos baixos, moderados e elevados (**Figura 29**).

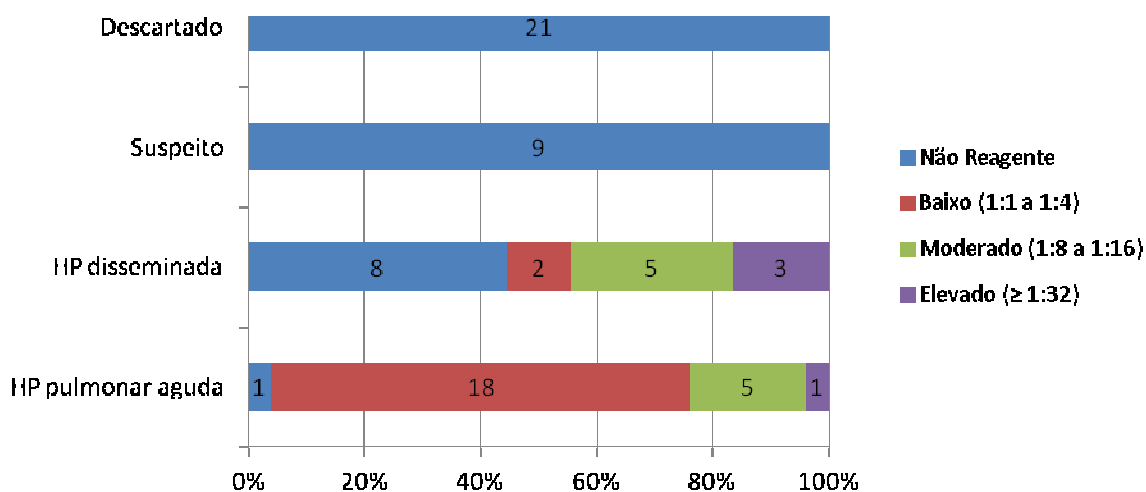


Figura 29: Distribuição em porcentagem das amostras de soro, de acordo com o título de anticorpos circulantes.

Observou-se, por *immunoblotting*, que 46,6% (34/73) das amostras avaliadas reagiram frente a fração antigênica obtida da amostra 200 de *H. capsulatum*, representando 46,2% (30/65) dos pacientes (**Figura 30**). Quatro (4) pacientes apresentaram duas (2) amostras com resultado não reagente; dois (2) pacientes possuíam duas (2) amostras com resultado reagente e um (1) paciente apresentou três (3) amostras com resultado reagente. Não houve diferença estatística entre o percentual de reatividade desta metodologia em relação à ID (46,5%).

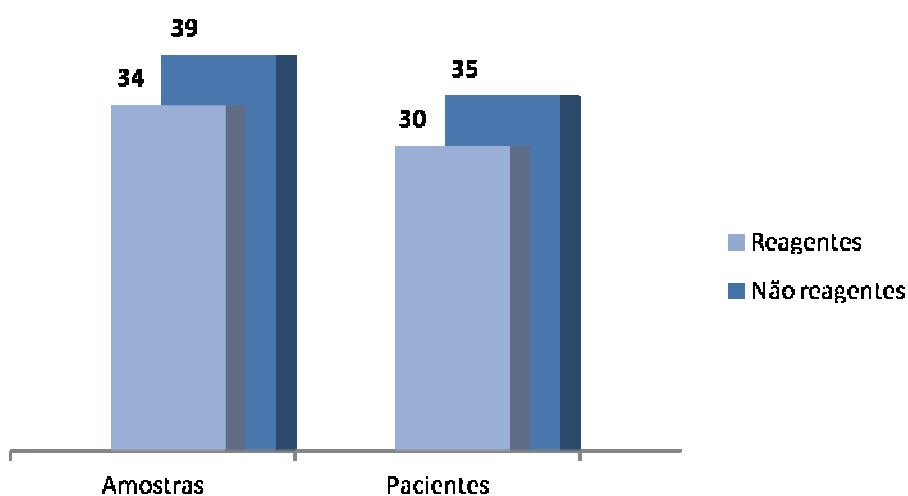


Figura 30 Distribuição em número absoluto das amostras de soro (n=73).e de pacientes (n=65), de acordo com a reatividade por *immunoblotting* (IB) frente ao antígeno Hc 200 de *H. capsulatum*.

A avaliação das amostras de soro de pacientes com histoplasmose pulmonar aguda demonstrou que 96,0% (24/25) apresentaram reatividade simultânea frente às frações H e M, específicas de *H. capsulatum*; apenas uma (1) amostra (4,0%) foi reagente somente frente à fração M. Entre os pacientes com doença disseminada, 27,8% (5/18) das amostras reconheceram as frações H e M, concomitantemente; 22,2% (4/18) somente à fração M e 50,0% não apresentaram reatividade frente às frações específicas de *H. capsulatum*. Todas as amostras (100,0%) de soro dos pacientes com caso suspeito ou descartado apresentaram ausência de reatividade (**Figura 31**).

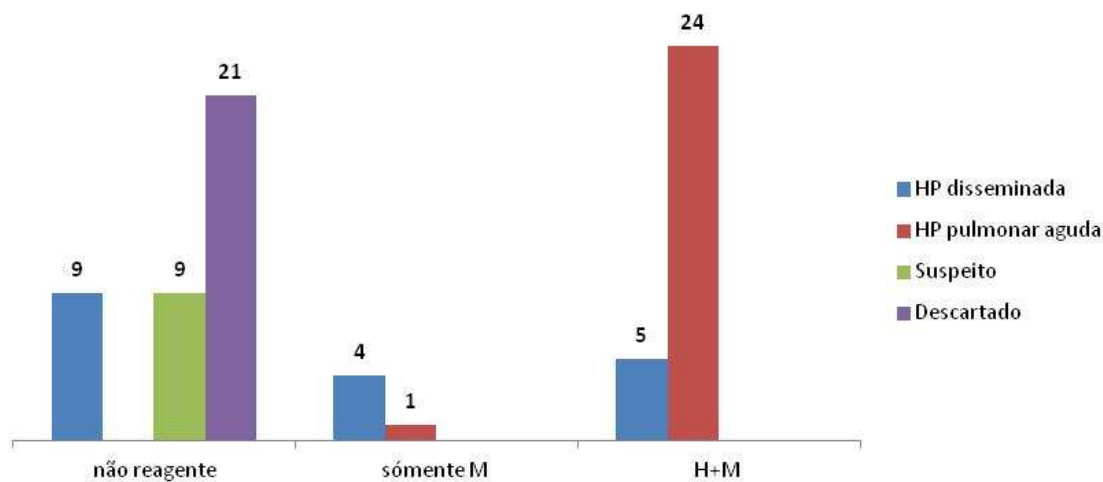


Figura 31 Distribuição em número absoluto das amostras de soro de pacientes (n=73), de acordo com a reatividade por *immunoblotting* frente ao antígeno Hc 200 de *H. capsulatum*.

A análise comparativa dos resultados sorológicos revelou que 65,5% (19/29) das amostras com reatividade frente às frações H e M por IB, apresentaram, por ID, títulos de anticorpos circulantes anti-*H. capsulatum* considerados baixos, 24,1% (7/29) moderados e 6,9% (2/29) elevados. Uma (1) destas amostras (3,5%) apresentou reatividade apenas quando avaliada por IB. Verificou-se, ainda, que as amostras que reconheceram somente a fração M, apresentaram títulos moderados (60,0%) e elevados (40,0%) por ID. Observou-se ainda que uma (1) amostra foi reagente somente por ID, com título igual a 1 (**Figura 32**).

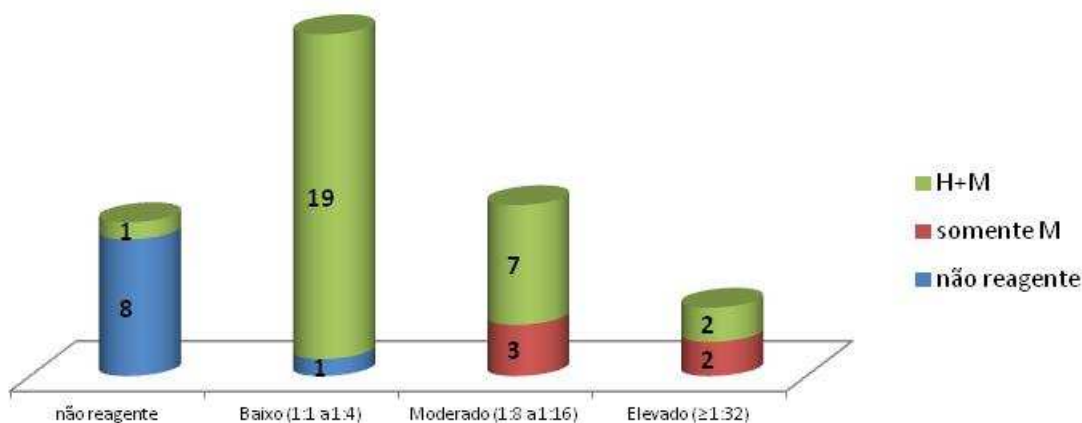


Figura 32 Distribuição em número absoluto do padrão de reatividade das amostras de soro dos pacientes com histoplasmose confirmada e provável (n=43), avaliadas por *immunoblotting* em relação aos níveis de anticorpos obtidos por imunodifusão dupla.

4.2.4. Avaliação sorológica do grupo controle

Para avaliação do grupo controle, foram submetidas aos ensaios de ID e IB para pesquisa de anticorpos anti-*H. capsulatum*, 30 amostras de soro de indivíduos aparentemente saudáveis provenientes da região litorânea do Estado de São Paulo. Avaliou-se, ainda, 15 amostras de soro de pacientes com PCM e 10, com diagnóstico presuntivo de aspergilose.

Verificou-se, por ID, que do total de amostras pertencentes ao grupo controle (n=55), nenhuma reconheceu o antígeno Hc 200 de *H. capsulatum*. Por outro lado, a avaliação das amostras por IB, revelou que 29,1% (16/55) das amostras apresentaram reatividade para o agente etiológico da HP. A maior taxa de reatividade cruzada foi encontrada nas amostras de soro dos pacientes com PCM, sendo que 66,7% (10/15) foram reagentes: sete (7) frente às frações H e M, simultaneamente; duas (2) somente frente à fração M e uma (1) unicamente frente à fração H. Entre os pacientes com aspergilose, verificou-se 30,0% (3/10) de reatividade, sendo uma (1) amostra

reagente frente às frações H e M e duas (2) apenas frente à fração M. Em relação aos indivíduos saudáveis, 10,0% (3/30) apresentaram reatividade frente à fração M de *H. capsulatum* (Figura 33).

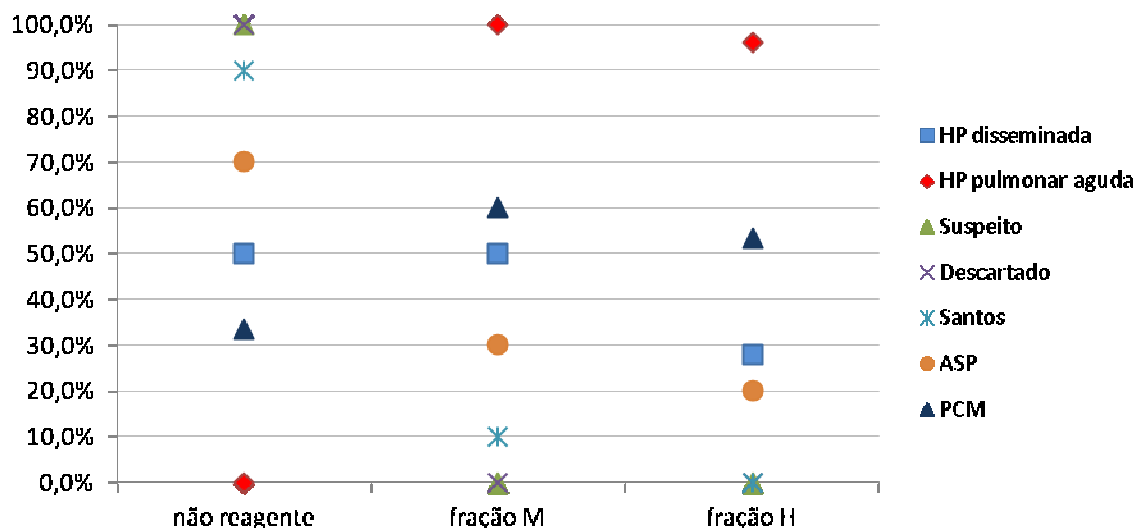


Figura 33 Distribuição em porcentagem das amostras de soro dos pacientes com histoplasmose (HP) (n=73), paracoccidiodomicose (PCM) (n=15), aspergilose (n=10) e indivíduos hígidos (n=30), segundo a reatividade por *immunoblotting* (IB) frente ao antígeno Hc 200 de *H. capsulatum*.

4.2.5. Parâmetros intrínsecos dos ensaios de imunodifusão dupla e *immunoblotting*

Para avaliação dos parâmetros intrínsecos dos ensaios de ID e IB objetivando a pesquisa de anticorpos séricos anti-*H. capsulatum*, as amostras foram distribuídas conforme demonstrado na **Tabela 14**. A prevalência da doença na amostragem avaliada foi de 36,1% (43/119).

Após avaliação dos resultados, verificou-se que a reação de ID apresentou sensibilidade de 79,1% (34/43) e especificidade de 100,0% (76/76); o VPP avaliado foi de 100,0% (34/34), o VPN de 89,4% (76/85) e a eficiência do ensaio foi de 92,4% (110/119). A sensibilidade do IB foi calculada em 79,1% (34/43), semelhante à da ID; entretanto, os outros

parâmetros apresentaram valores inferiores: especificidade de 78,9% (60/76); VPP de 68,0% (34/50), VPN de 87,0% (60/69) e eficiência de 79,0% (94/119) (**Figura 34**).

O estudo comparativo dos métodos, utilizando o teste do qui-quadrado, demonstrou diferença estatística nos parâmetros de especificidade ($p < 0,001$), VPP ($p < 0,001$) e eficiência ($p = 0,003$), sugerindo a ID como metodologia mais específica, de maior valor preditivo positivo e eficiência (**Figura 33**).

Tabela 14: Avaliação das amostras por imunodifusão dupla e *immunoblotting*, de acordo com a confirmação clínico - laboratorial de histoplasrose.

	HP/DOENTES	HP/NÃO-DOENTES	Total
ID REAGENTE	34	0	34
ID NÃO-REAGENTE	9	76	85
Total	43	76	119
IB REAGENTE	34	16	50
IB NÃO-REAGENTE	9	60	69
Total	43	76	119

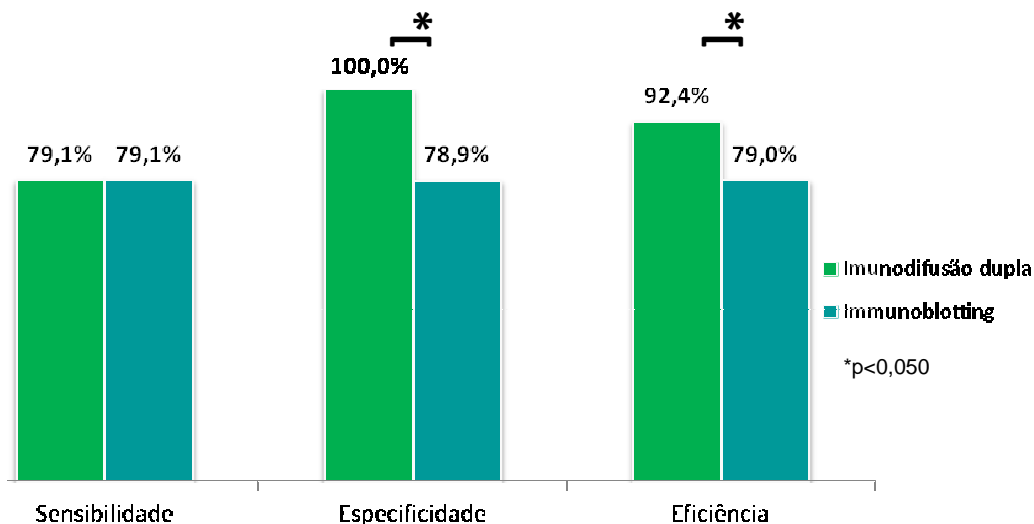


Figura 34: Comparação em porcentagem dos parâmetros de sensibilidade, especificidade e eficiência entre os ensaios de imunodifusão dupla e *immunoblotting*.

Para melhor compreensão do desempenho do ensaio de IB, a reatividade das frações H e M foram avaliadas isoladamente, quando reconhecidas simultaneamente ou alternadamente pelas amostras de soro de pacientes avaliadas (**Tabela 15**). Ao compararmos condições distintas de reatividade por IB, nenhum parâmetro apresentou diferença estatística, pelo teste do qui-quadrado. Contudo, a sensibilidade e o VPN da fração M foram superiores em percentual em relação a fração H ($p=0,223$; $p=0,431$). A fração H, por sua vez, mostrou valor mais elevado de especificidade e VPP que a M ($p=0,273$). A eficiência do método foi idêntica entre as duas frações.

O reconhecimento simultâneo das frações H e M demonstrou maiores índices de especificidade e VPP quando comparado a detecção isolada de uma única fração (H ou M); esta diferença foi encontrada na avaliação estatística ($p<0,001$ e $p=0,008$, respectivamente), entretanto, os valores de sensibilidade e VPN foram semelhantes aos da fração M ($p=0,662$ e $p=0,085$). A eficiência do ensaio de IB considerando a reatividade concomitante de H e M indicou melhor desempenho do que a detecção isolada de qualquer uma das frações (**Tabela 15**).

Tabela 15 Comparação dos parâmetros intrínsecos da metodologia de *immunoblotting*, de acordo com a presença de reatividade frente às frações H e/ou M.

	Fração H	Fração M	Fração H ou M	Frações H + M
Sensibilidade	67,4%	79,1%	79,1%	76,3%
Especificidade	86,8%	80,3%	78,9%	87,0%*
Valor Preditivo Positivo	74,4%	69,4%	68,0%	76,3%*
Valor Preditivo Negativo	82,5%	87,1%	87,0%	87,0%
Eficiência	79,8%	79,8%	79,0%	83,2%

*p<0,050

Foi possível verificar que a forma clínica da doença interferiu diretamente no desempenho dos ensaios; especialmente nos parâmetros de sensibilidade e eficiência. Avaliando-se somente os pacientes com histoplasmosse disseminada, a sensibilidade da ID foi de 55,6% (10/18), a especificidade e o VPP de 100%, VPN de 90,5% (76/84) e eficiência de 91,5% (86/94). Levando-se em conta apenas os indivíduos com a forma pulmonar aguda, a sensibilidade do ensaio foi de 96,0% (24/25), a especificidade e o VPP de 100%, o VPN de 98,7% (76/77) e a eficiência de 99,0% (100/101) (**Figura 35**).

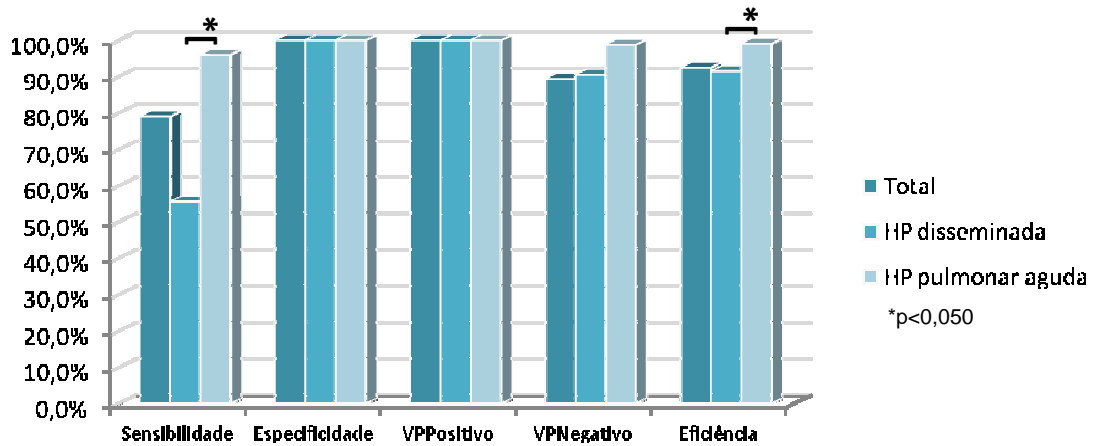


Figura 35: Comparação em porcentagem dos parâmetros intrínsecos do ensaio de imunodifusão dupla, de acordo com a forma clínica da histoplasmosose.

A sensibilidade da metodologia de IB na pesquisa de anticorpos nos pacientes com HP disseminada foi de apenas 35,7% (5/14), a especificidade de 87,0% (60/69); o VPP de 35,7% (5/14), o VPN de 87,0% (60/69) e a eficiência do ensaio para este grupo de pacientes foi de 78,3% (65/83). Já entre os indivíduos com HP pulmonar aguda, o desempenho do IB se mostrou melhor, com 100,0% de sensibilidade (24/24) e VPN (60/60); VPP de 72,7% (24/33) e eficiência de 90,3% (84/93) (**Figura 36**).

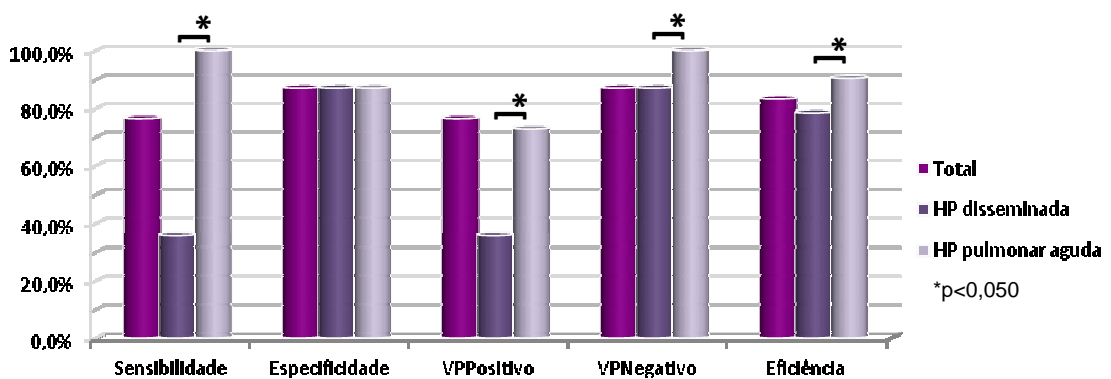


Figura 36: Comparação em porcentagem dos parâmetros intrínsecos do ensaio de *immunoblotting*, de acordo com a forma clínica da histoplasmosose.

Para o cálculo do coeficiente *Kappa* (κ) de concordância entre os métodos de ID e IB foram utilizadas todas as 128 amostras avaliadas, ou seja, indivíduos classificados como doentes (43), não-doentes (76) e casos suspeitos (n=9).

Foi observado que 85,9% (99/128) das análises realizadas apresentaram resultados concordantes entre si. O cálculo do índice *kappa* foi igual a 0,69, equivalente a uma concordância substancial. A concordância dos resultados entre as amostras de soro dos pacientes com doença foi de 95,3% (41/43), com índice *kappa* equivalente a 0,86 (concordância quase perfeita). A co-positividade dos pacientes com HP foi de 76,7% (33/43); foram duplamente reagentes 50,0% (9/18) das amostras de doentes com a forma disseminada e 96,0% (24/25) daquelas com HP pulmonar aguda. As amostras dos indivíduos não-doentes apresentaram co-negatividade de 78,9% (60/76) e não houve resultado duplamente reagente. A concordância entre os resultados obtidos nos métodos de ID e IB pode ser observada na **Tabela 16**.

Tabela 16: Concordância de resultados entre os métodos de imunodifusão dupla e *immunoblotting*.

		IB		
		REAGENTE	NÃO REAGENTE	Total
TOTAL DE AMOSTRAS	ID			
		REAGENTE	33	1
	NÃO REAGENTE	17	77	94
	Total	50	78	128
		KAPPA		0,69
DOENTES	REAGENTE	33	1	34
	NÃO REAGENTE	1	8	9
	Total	34	9	43
		KAPPA		0,86
NÃO - DOENTES	REAGENTE	0	0	0
	NÃO REAGENTE	16	60	76
	Total	16	60	76

5. Discussão

O diagnóstico das micoses sistêmicas deve ser fundamentado, sempre que possível, em critérios epidemiológicos, clínicos, radiológicos e laboratoriais. Apesar do grande avanço da área molecular, o diagnóstico definitivo das infecções fúngicas baseia-se primordialmente na identificação do agente etiológico por processos diretos como exame a fresco, histopatológico e/ou isolamento do patógeno em cultura, este último considerado o método padrão ouro (MS, 2010).

A utilização de métodos indiretos, como a pesquisa de anticorpos circulantes específicos, oferece não apenas o diagnóstico presuntivo bem como o confirmatório, importantes na conduta clínica e seguimento sorológico do paciente. O uso simultâneo de técnicas diretas e indiretas, pautado no emprego, sempre que possível, de diferentes ensaios, é imprescindível para a elucidação rápida, eficiente e precisa da etiologia da doença, propiciando a instauração de tratamento específico e adequado.

Na condição de Referência Estadual para o imunodiagnóstico das micoses sistêmicas, o Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses (LIM/CIM/IAL-SP) tem como atribuições assegurar a excelência no atendimento aos pacientes com suspeita clínica de PCM e HP bem como garantir a qualidade, acurácia e confiabilidade dos resultados sorológicos, aplicando ensaios validados. Dessa forma, o presente estudo objetivou padronizar o ensaio de *immunoblotting* para pesquisa de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis* e anti-*H. capsulatum*, visando sua implantação neste laboratório.

A casuística estudada foi composta por amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de paracoccidioidomicose e/ou histoplasmose; as amostras foram escolhidas de tal forma, esperando-se representar ao máximo a população atendida na rotina do LIM/CIM/IAL-SP.

Foram incluídas na amostragem, soros de pacientes com doença confirmada para que a avaliação dos parâmetros intrínsecos dos métodos fosse realizada de forma mais precisa e representativa, visto que a grande maioria das requisições médicas que chegam ao laboratório não contém nenhum tipo de informação adicional sobre o estado clínico-epidemiológico do paciente ou relacionadas a exames micológicos e/ou histopatológicos. Importante informar que a consulta aos prontuários dos pacientes somente foi efetuada após o término da realização da parte experimental deste estudo.

Na avaliação dos prontuários dos pacientes com suspeita clínica de paracoccidiodomicose, foi possível observar que 89,6% apresentaram confirmação laboratorial, seja por métodos micológicos e/ou histopatológicos, da etiologia da doença. Apenas 4,2% dos casos foram definidos como provável visto apresentarem manifestações clínicas compatíveis e presença de anticorpos séricos anti-*P. brasiliensis*, detectados por imunodifusão dupla em gel de agarose (Shikanai-Yasuda et al., 2006; SES, 2008). Em outros estudos, os percentuais de casos prováveis foram superiores: 20% em Blotta et al. (1999) e 14% em Moreto (2010). Todavia, estes achados eram esperados, visto que um grupo de pacientes com doença confirmada foi inserido na amostragem deste trabalho, conforme explicado anteriormente.

Em relação aos pacientes classificados nas categorias de caso confirmado e caso provável de PCM verificou-se “razão de masculinidade” de 3,9:1,. Este valor se mostrou inferior aos 10:1 e 7,2:1 encontrados, respectivamente, por Paniago et al. (2003) e Moreto (2010). Todavia, foi semelhante à razão de 5,4:1 observada por Blotta et al. (1999); 4,8:1, por Campos et al. (2008); e 2,5:1 por Kamikawa (2011).

Interessante comentar que Kamikawa (2011) ao realizar análise retrospectiva das informações dos 10.176 pacientes com suspeita clínica de PCM, cadastrados no banco de dados do LIM/CIM/IAL-SP, demonstrou que 71% (7.253) dos indivíduos eram do sexo masculino e 29% (2923) do feminino. Contudo, a autora verificou que a razão de masculinidade aumentou para 8:1, ao avaliar os pacientes com presença de anticorpos anti-*P. brasiliensis*.

Acredita-se que a incidência da PCM seja superior em homens que em mulheres, devido à ação do hormônio feminino β -estradiol que inibe o processo de transformação dos conídios infectantes em levedura (Restrepo et al., 1984; Stover et al., 1986; Aristizabal et al., 2002; Shankar et al., 2011).

Moreto (2010) relata que o elevado número de pacientes do sexo masculino também se deva ao fato das mulheres, em geral, por executarem serviços domésticos, estarem, portanto, menos expostas à infecção por *P. brasiliensis* que os homens. Entretanto, ao longo dos anos, têm se observado uma participação cada vez maior do sexo feminino em atividade relacionadas ao manejo do solo, como o trabalho na lavoura. Dessa forma, a baixa razão de masculinidade observada neste trabalho pode ser explicada devido ao fato de se tratar de um retrato mais atual da população; visto que a temporalidade das amostras avaliadas foi menor e mais recente (de 2008 a 2011). Os estudos retrospectivos citados anteriormente avaliaram pacientes atendidos em serviços de referência em décadas passadas e por longos períodos: oito (8) anos (1988-1996) em Blotta et al. (1999); 21 anos (1984-2005) em Campos et al. (2008); 19 anos (1980-1999) em Paniago et al. (2009); 33 anos (1974-2008) em Moreto (2010) e 11 anos (1999-2010) em Kamikawa (2011).

Os pacientes apresentaram média de 46,8 anos de idade similar às encontradas na literatura: 44 por Paniago et al. (2003); 45 por Anastácio et

al. (2007); 42 por Campos et al. (2008) e 43 por Moreto (2010). A distribuição da faixa etária entre os pacientes mostrou que a maioria dos indivíduos do sexo masculino apresentou idade entre 41 a 60 anos. Esta mesma faixa etária foi encontrada por Kamikawa (2011) tanto nos pacientes com suspeita clínica quanto os reagentes para *P. brasiliensis*, em ambos os sexos. Postula-se que, devido ao longo período de latência da PCM, os indivíduos com doença ativa possam infectar-se nas primeiras décadas de vida, manifestando a sintomatologia anos mais tarde (Restrepo, 2000).

Aproximadamente metade dos pacientes com PCM compreendidos neste trabalho, 52%, exercia profissionalmente algum tipo de função ligada a atividades agrícolas. Os trabalhadores rurais representam 45,5 e 54,9% das populações avaliadas, respectivamente, por Paniago et al. (2003) e Campos et al. (2008). Blotta et al. (1999) observaram que muitos indivíduos, em seu estudo, trabalharam inicialmente em áreas rurais e, após migrarem para centros urbanos, tornaram-se pedreiros. Estes profissionais corresponderam a 10% dos pacientes com doença confirmada e provável avaliados no atual estudo.

Ono (2000), ao estudar a eco-epidemiologia de *P. brasiliensis*, sugeriu que o fungo encontra-se em camadas mais profundas no solo, só atingindo a superfície durante escavações para plantio, desmatamentos, terraplanagens e aragens para plantio de pastagem ou agricultura. Dessa forma, indivíduos que exercem estas atividades, por estarem mais expostos ao patógeno, apresentam maior risco de infecção e, conseqüentemente, de desenvolvimento de doença.

Em relação às formas clínicas, o número expressivo de pacientes portadores de PCM crônica (80%), em relação àqueles com doença aguda/subaguda (30%) foi semelhante à encontrada na literatura. Dentre os pacientes avaliados, a forma crônica foi observada em 80% por Blotta et al

(1999); 84,6% por Paniago et al. (2003); 77,5% por Campos et al (2008) e 76,6% por Moreto (2010). Anastácio et al. (2007) verificaram que 100% dos pacientes avaliados em seu estudo apresentaram a forma crônica.

Neste estudo, houve predomínio do comprometimento ganglionar em pacientes com a forma aguda/subaguda da PCM (93%), similar ao descrito por Paniago et al. (2003), 95,4% e Campos et al. (2008), 81,3%. No entanto, os percentuais de indivíduos com a forma crônica com acometimento pulmonar (56,7%) e de mucosas (60,0%), foram levemente inferiores aos achados de outros autores. Anastácio et al. (2007), relataram que a doença acometeu, neste mesmo grupo de pacientes, de forma prioritária, os pulmões (70,4%) e as mucosas (64,8%). Campos et al. (2008) verificou que o acometimento destes mesmos órgãos foi frequente em, respectivamente, 67,3 e 70,9%. Paniago et al. (2003), encontrou alterações na radiografia torácica de 59,5% e lesões em orofaringe de 66,4% destes pacientes.

A frequência de acometimento cutâneo entre indivíduos portadores de PCM crônica, por sua vez, foi mais elevada no presente estudo (43,3%) do que em Paniago et al. (2003), 23,2% e Campos et al. (2008), 16,4%. Estes achados, possivelmente, justificam-se porque, cerca da metade, das amostras de soro de pacientes com doença confirmada, incluídos neste estudo tenham sido encaminhadas pelo Departamento de Dermatologia e Radiologia do HC/FMB/UNESP.

A paracoccidioidomicose foi descartada em 30 pacientes estudados (39%), que apresentaram diagnóstico confirmado clínico-laboratorialmente de outra etiologia e ausência de comprovação laboratorial de infecção por *P. brasiliensis* por métodos micológicos, histopatológicos ou imunológicos. Neste grupo, observou-se, principalmente, a tuberculose e neoplasias, especialmente carcinomas e linfomas. Estas patologias são comumente

confundidas com a forma crônica da PCM, especialmente a tuberculose que, ainda, pode apresentar sobreposições clínicas, radiológicas e epidemiológicas (Blotta et al., 1999; Bittencourt et al., 2005; Quagliato Jr et al., 2007; Bertoni et al., 2010). Além disso, entre 4,7 a 7,9% dos pacientes podem apresentar co-infecção por *P. brasiliensis* e *M. tuberculosis* (Paniago et al., 2003; Quagliato Jr et al., 2007; Campos et al., 2008), tornando o diagnóstico diferencial ainda mais difícil.

O Manual de Vigilância da Paracoccidioidomicose do Estado de São Paulo preconiza, para o diagnóstico sorológico de pacientes com suspeita clínica da doença, a utilização do teste de ELISA, como *screening*, seguida de imunodifusão dupla em amostras positivas. Em caso de resultados discordantes entre estes dois ensaios, recomenda-se a realização do *immunoblotting* (SES, 2008).

Apesar de ser extremamente sensível, o *immunoblotting* permanece inacessível para o diagnóstico sorológico complementar da micose na rotina da grande maioria dos laboratórios de mico-sorologia (Restrepo, 1992; Elias Costa et al., 2000). Ao longo dos anos, observa-se que a utilização desta metodologia tem sido frequentemente direcionada para estudos de imunocaracterização de antígenos fúngicos. Poucos trabalhos relatam o emprego do IB na pesquisa de anticorpos específicos anti-*P. brasiliensis* com fins diagnósticos. Soma-se a esta constatação a falta de padronização nos protocolos existentes para execução desta metodologia (Camargo et al., 1989; Mendes-Gianini et al., 1989; Giannini et al., 1990; Ortega et al., 1992; Blotta e Camargo, 1993; do Valle et al., 2001; Vidal et al., 2005; Silva et al., 2008).

Camargo et al. (1989) padronizaram a técnica de *immunoblotting* a fim de demonstrar quais componentes antigênicos, além da gp43, eram reconhecidos em soros de pacientes com PCM. Avaliando filtrado de cultura

liofilizado, produzido a partir da amostra B-339, demonstraram que as principais frações reconhecidas foram gp43 e gp70, reagentes em, respectivamente, 100 e 96% das amostras de soro testadas. Este achado permitiu aos autores sugerir estas moléculas como marcadoras sorológicas da PCM humana.

Giannini et al. (1990) utilizando filtrado de cultura da amostra 113 de *P. brasiliensis*, verificaram, por IB, que todos os pacientes avaliados apresentaram anticorpos séricos reagentes frente a fração glicoprotéica de 43 kDa. Os autores observaram que a maioria dos pacientes também reagiu frente à outra fração com massa molecular aparente de 68 kDa.

Silva et al. (2008) avaliando por IB a performance de diferentes preparações antigênicas obtidas a partir do isolado 113 de *P. brasiliensis*, frente a amostras de soro de pacientes com doença ativa, verificaram que 95,6% das amostras reconheceram a fração de 43 kDa e 100% a de 70 kDa.

Moreto (2010) ao avaliar 64 amostras de soro de pacientes com PCM comprovada não verificou diferença no padrão de reatividade, por ID, frente a filtrados de cultura obtidos de duas amostras distintas de *P. brasiliensis*, ou seja, B-339 e 113. No presente estudo encontrou-se resultado semelhante, não sendo observada diferença nos resultados obtidos quando amostras de soro de pacientes com doença ativa foram avaliadas sorologicamente por este método.

Diferentemente dos achados de Camargo et al. (1989) e de Blotta e Camargo (1993); não foi observada reatividade frente a glicoproteína de 70 kDa quando os soros dos pacientes foram avaliados por IB, utilizando-se membranas de nitrocelulose dotadas com antígeno B-339. Os resultados do presente estudo sugerem que, esta preparação antigênica não seja indicada para ser utilizada neste tipo de ensaio imunoenzimático.

A grande heterogeneidade observada nos parâmetros envolvidos na produção de antígenos muitas vezes interfere no produto final, ou seja, na obtenção de insumos que apresentam diferenças de especificidade, estabilidade e reprodutibilidade, características de vital importância no imunodiagnóstico não apenas da PCM, como de outras micoses (Cano et al., 1987; Camargo et al., 1988; Del Negro et al., 1991; Kloth et al., 2001; Camargo, 2008).

Camargo et al. (1988) propuseram a produção e padronização de uma preparação antigênica obtida a partir da amostra B-339 de *P. brasiliensis*. Devido ao fato deste antígeno ser constituído por, aproximadamente, 90% de glicoproteína de 43 kDa, os autores recomendaram que o mesmo pudesse ser utilizado como padrão nos diversos países da América Latina que apresentassem casos da micose. Entretanto, muitos laboratórios declinaram da produção e, conseqüente, utilização desta preparação antigênica, relatando dificuldades em reproduzir o protocolo original. Estas incluíam: a contagem do número de células viáveis para serem utilizados como inóculo inicial, o preparo de grandes volumes do meio de cultura, e a realização do processo de diálise e liofilização (Camargo et al., 2003).

Desta forma, o protocolo inicialmente sugerido por Camargo et al (1988) foi sofrendo diferentes tipos de adaptações, entre as quais pode-se citar: o meio de cultura utilizado, tamanho do inóculo, tempo e temperatura de incubação, forma de extração dos componentes antigênicos e amostra fúngica utilizada para a produção da preparação antigênica.

Anos mais tarde, Camargo et al.(2003) apresentaram uma variação do protocolo anteriormente descrito, denominado-o: "Método simplificado para a produção de exoantígenos de *P. brasiliensis* para utilização em testes

de imunodifusão⁵. Os autores, ao avaliarem 15 diferentes lotes do “antígeno simplificado” por SDS-PAGE, relataram que 100% destes demonstraram grandes quantidades de gp43, sendo observada, ainda, a existência de quantidades extremamente inferiores de outras frações antigênicas.

Nas décadas de 80 e 90, Assis (1990, 1997) e Assis et al (1989a, 1989b, 1990, 1993), buscando alternativas para a produção de um antígeno que pudesse substituir o proposto por Camargo et al. (1988) e assegurasse sensibilidade e especificidade aos ensaios imunológicos, avaliaram a aplicabilidade da amostra 113 de *P. brasiliensis*. Os estudos realizados evidenciaram que as culturas desta amostra, em relação a outros isolados de *P. brasiliensis*, transformam-se da forma de micélio para levedura mais rapidamente, apresentam maior viabilidade de células (96%), melhor crescimento e suas colônias macias e úmidas são mais fáceis de manipular. Estas características, de vital importância na seleção de um isolado fúngico, demonstraram o potencial da amostra 113 como candidata a produtora de antígenos.

Os resultados divergentes encontrados quando comparamos o desempenho do IB utilizando membranas dotadas com filtrados de cultura obtidos de duas (2) amostras distintas de *P. brasiliensis*, ou seja, 113 e B-339 justificam-se por Siqueira (1982) e Elias-Costa et al. (2000) que propõem que a acurácia dos imunoenaios visando o diagnóstico sorológico de micoses sistêmicas esta intimamente relacionada, entre outros fatores, à qualidade da preparação antigênica empregada.

É possível que alguns componentes protéicos do antígeno B-339 utilizado neste estudo tenham sido degradados, visto que esta preparação foi mantida congelada a -20°C, enquanto que o antígeno 113, preparado na mesma época (1999), foi mantido refrigerado, a 4°C. A estabilidade de

⁵ Traduzido do inglês: “Simplified method for producing *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for use in immunodiffusion tests.”

antígenos de *P. brasiliensis* tem sido descrita por alguns autores (Fava Netto, 1984; Cano et al., 1986; Stambuk et al., 1988; Camargo et al., 1998; Silva, 2005). O tempo de produção e estocagem, bem como a forma de armazenamento (*in natura*, liofilizado), das preparações antigênicas varia de grupo para grupo, dependendo das suas características (por exemplo, composição protéica, formas de extração/produção e amostra fúngica de origem).

Fava Netto (1984) relatou que antígenos polissacarídicos mantêm-se estáveis e funcionais mesmo após 23 anos de armazenamento em refrigerador comum (2 a 4°C). Por outro lado, Cano et al. (1986), descrevem que antígenos somáticos que encontravam-se liofilizados permaneceram estáveis por um período máximo de 60 dias após sua reconstituição. Embora, exoantígenos produzidos por Camargo et al. (1998), obtido a partir da amostra B-339, mantenham sua atividade por vários anos quando conservado sob liofilização.

Silva (2005) comparou a estabilidade de antígenos produzidos a partir do filtrado de cultura da amostra 113 em caldo NGTA e mantidos refrigerados a 4° C por 15 anos com preparações recém-obtidas, nas mesmas condições. O autor verificou que não houve diferença expressiva no perfil de reatividade, por ID, em amostras de soro de pacientes com PCM aguda. Este trabalho demonstrou que as preparações antigênicas obtidas por Assis (1990) e mantidas em refrigerador (2-4° C) continuaram estáveis mesmo sem a adição de inibidores de protease.

Outra informação relevante diz respeito ao fato das preparações antigênicas poderem ser armazenadas e utilizadas na forma *in natura*, bem como concentradas pelo emprego de polietileno-glicol (PEG), rotovaporizador ou ainda por liofilização.

Estudos conduzidos no LIM/CIM/IAL-SP no final da década de 90 compararam o desempenho de preparações antigênicas *in natura* obtidas a partir das amostras B-339 e 113 de *P. brasiliensis* e concentradas por liofilização, empregando como antígeno de referência, filtrado de cultura adquirido comercialmente do Laboratório de Mico-Sorologia do Instituto de Medicina Tropical (IMT/USP) dialisados e concentrados com PEG⁶. A avaliação de amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de paracoccidiodomicose por ID não mostrou diferença no padrão de reatividade frente aos três (3) antígenos. Baseando-se nestes resultados, a etapa de concentração foi excluída do protocolo de produção de antígenos utilizado nesse laboratório.

Diante do exposto, uma hipótese a ser levada em consideração é que para a reação de imunodifusão realmente seja dispensável à concentração da preparação antigênica B-339; entretanto, para a metodologia de *immunoblotting* este procedimento seja necessário. Importante ressaltar, que as duas (2) preparações antigênicas utilizadas neste estudo, ou seja, B-339 e 113, foram avaliadas por SDS-PAGE e em ambas foi possível visualizar as frações de 43 e 70 kDa.

A imobilização de antígenos em membranas de nitrocelulose, na metodologia *in house*, por se tratar de um processo não-automatizado, é extremamente complexo e laborioso, visto que requer a execução de duas etapas distintas: SDS-PAGE, para a separação das frações antigênicas, e *western blot*, para a transferência das proteínas. Desta forma, no intuito de “agilizar” a liberação dos resultados obtidos pelo IB, optou-se por avaliar o comportamento do antígeno, após a transferência deste para a membrana. Infelizmente, não foi possível discutir os resultados, pois não existem, na literatura, publicações que abordem estes aspectos. Uma vez que os achados mostraram-se promissores, outro estudo foi desenvolvido em 2011

⁶Comunicação pessoal da Dr.^a Adriana Pardini Vicentini.

no LIM/CIM/IAL-SP⁷ ampliando o período de avaliação do “tempo de prateleira” das membranas, mantendo-se as mesmas condições de armazenamento.

A avaliação dos soros dos pacientes demonstrou que o IB foi capaz de detectar a presença de anticorpos específicos anti-*P. brasiliensis* em 59,2% das amostras. Por sua vez, observou-se que o índice de reatividade por ID foi de 46,9%; assim sendo, houve um aumento de 12,3% na reatividade quando a metodologia de *immunoblotting* foi utilizada, possibilitando o reconhecimento sorológico em 18 amostras, que haviam apresentado resultado falso-negativo pela prova de imunodifusão. Entre os indivíduos com doença confirmada, verificou-se que por ID, 69% das amostras de pacientes com doença (confirmada e provável) foram reagentes, enquanto, por IB, 83% das amostras apresentaram reatividade frente à gp43 e 52,0% frente à gp70. Neste caso, a detecção de anticorpos específicos anti-*P. brasiliensis* foi possível, apenas através da técnica de IB, em 12 pacientes e 14% das amostras.

A glicoproteína de 43 kDa, conhecida por gp 43, é considerada, por muitos autores, como principal componente antigênico de *P. brasiliensis*, por ser reconhecida no soro de praticamente todos os pacientes com PCM, na dependência da metodologia empregada (Camargo et al. 1989; Giannini et al., 1990; Travassos, 1994; Travassos et al., 1995, Vicentini-Moreira, 2008). O outro componente antigênico de *P. brasiliensis* considerado marcador de infecção é a glicoproteína de 70 kDa, conhecida como gp70. Esta molécula é reconhecida por 95-100% dos soros de pacientes com PCM em atividade (Puccia et al., 1986; Camargo et al., 1989; Silva et al., 2008).

Moreto (2010) ao avaliar soros de pacientes, com doença em atividade e não reagentes por ID, verificou que das 32 amostras avaliadas,

⁷“Comparação das metodologias de imunodifusão dupla em gel de agarose e *immunoblotting* no diagnóstico da paracoccidiodomicose”, monografia desenvolvida por Luciane Regina Franciscone Silva, para conclusão do Programa de Aprimoramento Profissional.

29 apresentaram reatividade por IB. Silva et al. (2008) verificaram que foi possível detectar anticorpos séricos específicos em 23 amostras com histórico de ausência de reatividade por ID, frente a antígeno B-339. O autor destaca o reconhecimento da glicoproteínas de 43 e 70 kDa na maioria dos soros testados, empregando-se a preparação antigênica obtida a partir da amostra 113 de *P. brasiliensis*.

A discordância de resultados dos testes de ID e IB, inclusive em uma mesma amostra, pode ser explicada, entre outros fatores, por diferenças nos princípios em que estes ensaios imunológicos se baseiam.

A imunodifusão dupla é um método de precipitação, onde o antígeno está presente como estrutura íntegra e a reação com o anticorpo ocorre em solução, formando imunocomplexos precipitantes. Por outro lado, no *immunoblotting* as frações antigênicas são separadas eletroforicamente segundo seu peso molecular, expondo desta forma os epítomos imobilizados na membrana de nitrocelulose, favorecendo, portanto, a ligação com o anticorpo específico (Towbin et al., 1979). Além disso, deve-se salientar que a reação antígeno-anticorpo é amplificada empregando-se anticorpos secundários conjugado a enzimas; permitindo inclusive a detecção de baixos níveis de imunoglobulinas. A maior sensibilidade do IB, em relação a ID, permite que esta técnica reconheça anticorpos mesmo em casos de infecção e/ou soroconversão recente por *P. brasiliensis*.

Segundo Camargo (2008), a depressão do sistema imune do paciente causada por doença severa pode provocar resultado falso-negativo na reação de imunodifusão. Neves et al. (2003), sugerem que pacientes com PCM possam apresentar resultado não reagente para ID em consequência da baixa avidéz da IgG₂, anticorpo dirigido a epítomos constituídos por carboidratos; enfatizando-se também que imunoglobulinas da classe IgG₂ não são precipitantes.

Do Valle et al. (2001), avaliando amostras de indivíduos com ausência de reatividade por ID, demonstraram que aquelas não reagentes para *P. brasiliensis* foram detectadas com maior frequência em pacientes com a forma juvenil (28,5%) em relação à forma crônica (7,4%). Da mesma forma em nosso estudo, o percentual de amostras de pacientes com forma aguda/subaguda que não apresentaram reatividade por ID foi superior aos dos doentes com as formas crônicas unifocal e multifocal (45,8% x 33,3% x 19,3%). Este fato pode ser explicado, pois nos casos mais graves da doença, geralmente pacientes com forma aguda, a carga fúngica no organismo tende a ser maior, e, portanto, espera-se uma grande concentração de antígenos circulantes. Estes antígenos acabam por “consumir” os anticorpos específicos produzidos pelos indivíduos, formando imunocomplexos. Dessa forma, a quantidade de anticorpos presentes nas amostras de soros não é suficiente para ser detectada pela ID. Já em infecções crônicas, a concentração de anticorpos circulantes predomina em relação à de antígenos.

Moreto (2010) discordou dos resultados descritos acima ao observar maior reatividade (93,9%), por ID, em amostras de soro de pacientes com PCM aguda/subaguda do que naqueles com a forma crônica (88,8%). No entanto, a autora corroborou com os dados do presente estudo, ao demonstrar que pacientes com a forma aguda apresentam principalmente níveis elevados de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis* por ID; e, que aqueles com doença crônica, demonstram uma distribuição mais uniforme dos títulos de anticorpos. Nos achados de Paniago et al (2003) os resultados foram semelhantes em pacientes com PCM aguda, todavia, foram observados níveis de anticorpos séricos mais baixos nos doentes com a forma crônica.

Mamoni et al. (2002) e Neves et al. (2003) descrevem as diferenças encontradas entre os perfis de anticorpos produzidos por pacientes com a

forma aguda/subaguda (juvenil) e crônica (adulta) da PCM. A capacidade de detecção destes anticorpos, por sua vez, parece estar relacionada às características da metodologia de ID; pois, assim como nos ensaios de Do Valle et al. (2001), a reatividade das amostras avaliadas por IB foi semelhante em pacientes com diferentes formas clínicas. Os autores sugerem como hipóteses para os achados no ensaio de ID: a) o efeito pró-zona, devido ao excesso de antígenos decorrentes da disseminação/gravidade da doença; b) a formação de imunocomplexos com oclusão de epítomos; c) a presença de anticorpos assimétricos que inibiriam a ligação secundária em reações de precipitação; e d) níveis de anticorpos abaixo do limite de detecção da técnica.

A presença de reatividade cruzada na detecção de anticorpos por ensaios imunoenzimáticos é frequentemente encontrada entre diferentes micoses, especialmente, paracoccidioidomicose e histoplasmose, visto que os patógenos causadores destas enfermidades compartilham componentes antigênicos comuns (Kaufman e Standard, 1988). Puccia e Travassos (1991) avaliaram, imunoquimicamente, a reatividade de soros de pacientes com PCM, HP e doença de Jorge Lobo frente à glicoproteína de 43 kDa, específica de *P. brasiliensis*. Os autores concluíram que as amostras de pacientes com PCM apresentaram reatividade frente aos epítomos peptídicos da molécula, enquanto, os anticorpos presentes nos soros de indivíduos com micoses heterólogas ligaram-se, preferencialmente, aos epítomos ricos em carboidratos, contendo galactose.

Alguns autores sugerem que modificações simples nos protocolos de execução da metodologia de IB, incluindo a maior diluição das amostras podem minimizar a inespecificidade da reação. Camargo et al. (1989) sugerem, em seu protocolo, que deve-se diluir as amostras de soro em 200 vezes. Do Valle et al. (2001) demonstraram que, a diluição das amostras em 400 vezes, aboliu a reatividade cruzada com soros heterólogos, sem afetar a resposta sorológica das amostras de pacientes com PCM. Neste trabalho,

optou-se pela diluição do soro em 1:100, pois verificou-se que nas diluições 1:200 e 1:500, a reatividade das amostras, por IB, de pacientes com PCM que apresentavam baixos títulos de anticorpos anti-*P. brasiliensis* por ID, era diminuída (dados não apresentados). A divergência encontrada entre estes protocolos provavelmente ocorra devido às diferentes soluções de diluição utilizadas no desenvolvimento dos ensaios, que podem conter, ou não, diferentes tipos e concentrações de substâncias protéicas não correlacionadas.

Alguns autores sugerem, ainda, que o tratamento prévio dos soros de pacientes, com adsorção em antígenos heterólogos e/ou dos antígenos fúngicos, especialmente através da oxidação das frações glicídicas, contribui com o aumento da capacidade discriminatória dos imunoenaios na pesquisa de anticorpos específicos anti-*P. brasiliensis* (Camargo et al., 1984; Mendes-Giannini et al., 1984; Giannini et al., 1990; Puccia e Travassos, 1991; Taborda e Camargo, 1994; Botteon et al., 2002; Albuquerque et al., 2005). Entretanto, além de onerar o custo da reação, estas medidas não se mostraram eficientes para a eliminação da reatividade cruzada, apesar de diminuir consideravelmente a inespecificidade da reação. (Elias Costa et al., 2000; Albuquerque et al., 2005). A alternativa, encontrada, neste estudo, visando minimizar ao máximo a reatividade cruzada, foi de utilizar um tampão de diluição com maior concentração em proteínas inertes, para bloqueio de sítios inespecíficos.

Camargo et al. (1989) realizaram a leitura das fitas de nitrocelulose utilizando *scanning* densiométrico e demonstraram que amostras de pacientes em tratamento para PCM e de pacientes com outras micoses (histoplasmose e aspergilose) apresentaram fraca reatividade frente às gp 43 e 70, em relação às amostras de pacientes com PCM antes do tratamento. Do Valle et al. (2001) também verificaram, por IB, reações menos intensas nas amostras heterólogas que reagiram cruzadamente com o antígeno de *P. brasiliensis*. Este fato também foi observado neste estudo,

onde 20% das amostras heterólogas e 10% dos pacientes com PCM descartada reconheceram com fraca intensidade a glicoproteína de 43 kDa.

Moreto (2010), em sua dissertação de mestrado, observou que, por IB, 50 e 40,5% das amostras de soro de doadores de sangue de Botucatu e Santos, respectivamente, apresentaram reatividade frente à glicoproteína de 43 kDa, empregando antígeno Pb 113. Importante ressaltar que estes ensaios foram realizados em colaboração com o LIM/CIM/IAL-SP, utilizando o protocolo anteriormente empregado neste laboratório (protocolo de referência deste estudo). Os altos índices de reatividade em indivíduos hígidos encontrados no trabalho de Moreto (2010) apontaram a premente necessidade de melhorar a metodologia de IB, por exemplo, substituindo a solução de diluição PBS pH 7,4, por PBS acrescido de 3% de leite desnatado, a fim de minimizar reações inespecíficas. Avaliando no atual estudo, estas mesmas amostras, empregando-se o protocolo otimizado, verificou-se que 5,3% das amostras de soro dos indivíduos provenientes da região litorânea do Estado de São Paulo, apresentaram, por IB, reatividade frente a gp43.

Estes achados não surpreendem se levarmos em consideração, que alguns indivíduos podem ter visitado, em algum momento de sua vida, regiões com potencial endêmico para *P. brasiliensis*. Kamikawa (2011) demonstrou que 0,8% dos pacientes do Estado de São Paulo, que apresentaram presença de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis* por ID eram procedentes dos municípios da Baixada Santista. Além disso, a região litorânea apresenta características geo-climáticas que contribuem para o crescimento e desenvolvimento de várias espécies de fungos e parasitas. Suzuki et al. (1997) e Botteon et al. (2002) destacam que os carboidratos presentes na estrutura molecular da gp43 podem, ainda, reagir cruzadamente com epítomos de *Leishmania* sp e *Trypanosoma cruzi*.

Nos indivíduos hígidos, provenientes de área conhecida como endêmica para PCM, não se observou reatividade nos ensaios de ID e IB, corroborando com os achados de Camargo et al (1989), onde as amostras de soros foram diluídos em PBS acrescido de 1% de gelatina. Importante ressaltar que estes resultados não corresponderam às expectativas, visto que foi observada reatividade em indivíduos de área não-endêmica para PCM. Possíveis explicações pautam-se na probabilidade destes indivíduos apresentarem sistema imunológico eficiente na resolução do processo infeccioso por *P. brasiliensis*, sem a formação de anticorpos circulantes em níveis detectáveis; ou; apesar de viverem em área hiperendêmica, não tenham sido expostos ao fungo. É conhecido que atividades relacionadas ao manejo do solo, como por exemplo, práticas agrícolas, terraplenagem, preparo de solo, jardinagem, transporte de produtos vegetais, estão entre os fatores de risco para aquisição da infecção (Ono, 2000. Shikanai-Yasuda et al., 2006) Talvez a avaliação da imunidade celular destes indivíduos, utilizando teste intradérmico pudesse comprovar se os mesmos entraram em contato com o agente etiológico da PCM, em algum momento da vida. Estudos adicionais sobre a resposta imune na infecção por *P. brasiliensis*, são necessários para que estes achados sejam melhor interpretados.

A sensibilidade da imunodifusão dupla obtida no presente trabalho foi de 69%, relativamente baixa em relação aos valores encontrados por outros grupos, que realizaram estudos retrospectivos: 90,0% em Moreto (2010); 80,8% em Campos et al. (2008); 80,0% em Blotta et al. (1999) e 77,0% em Paniago et al. (2003). Deve-se levar em conta, que neste estudo foram avaliadas amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de PCM, incluindo aqueles casos que posteriormente, foram classificados como suspeitos ou descartados. Além disso, os pacientes com doença confirmada e provável estavam em diferentes etapas da terapia antifúngica.

Considerando apenas as amostras de indivíduos com doença ativa, coletadas antes destes receberem tratamento antifúngico, foi possível observar um aumento expressivo da sensibilidade do ensaio de ID para 90,9%, semelhante aos achados de 91,3% por Del Negro et al. (1991) e 90,2% por Do Valle et al. (2001), que avaliaram pacientes nestas mesmas condições. Restrepo (1966) incluiu, em sua amostragem, pacientes tratados por até oito (8) meses e encontrou 88,9% de sensibilidade para a ID. Este valor foi próximo aos 85,4% obtidos no presente estudo e aos 70% observados por Cano e Restrepo (1987) em pacientes com até seis (6) meses de terapia antifúngica. Ferreira-da-Cruz et al (1990) relataram que a sensibilidade da ID apresentou redução de 22,6% em até 24 meses de tratamento dos pacientes, corroborando com o atual trabalho, onde a sensibilidade do método diminuiu em 12,1%.

A sensibilidade do *immunoblotting* na casuística geral foi de 83,0%, considerando a reatividade frente à fração glicoprotéica de 43 kDa e de 75,4% frente à fração de 70 kDa. No estudo de Silva et al. (2008), 95,4% das amostras de soro foram reagentes frente à gp43 e 100% frente à gp70. Moreto (2010) verificou 96,8% de reatividade frente às frações de 43 e 70 kDa em 62 amostras de pacientes com PCM ativa. As preparações antigênicas empregadas em todos estes trabalhos foram obtidas a partir da amostra 113 de *P. brasiliensis*.

Blotta e Camargo (1993) verificaram que 100% das amostras de pacientes virgens de tratamento reconheceram por IB a gp43 e 50% a gp70. Estes dados discordam dos encontrados no presente estudo, uma vez que a reatividade das frações de 43 e 70 kDa foi semelhante neste grupo de pacientes, 95,5% e 94,4% respectivamente. Camargo et al. (1989), avaliando a reatividade por IB frente à gp43, encontrou 100% de sensibilidade em pacientes não tratados e em vigência de terapia antifúngica; e em relação à gp70, observou, respectivamente, 96% e 93%.

Novamente, as características dos antígenos empregados podem justificar as divergências observadas entre os resultados.

Mendes-Giannini et al. (1989) verificaram que a reatividade frente à gp43 diminui após 10 meses de tratamento e concluíram que após dois (2) anos de terapia antifúngica, os anticorpos anti-gp43 seriam possivelmente dificilmente detectados. Por outro lado, Martins et al. (1997) observaram que a reatividade das amostras de soro de pacientes tratados por 12-24 meses, frente a gp43 tende a persistir, enquanto anticorpos IgG específicos para outras frações de *P. brasiliensis* são detectados com menor frequência. No atual estudo, o reconhecimento da gp43 foi 17,7% menor em pacientes tratados por até 12 meses, entretanto, foi possível detectar anticorpos anti-*P. brasiliensis* em mais de 70% dos pacientes tratados por períodos superiores há 24 meses pela metodologia de ID e em mais de 80%, por IB.

Conforme discutido anteriormente, o tratamento antifúngico parece interferir de forma mais acentuada na capacidade do método em detectar a gp70 do que a gp43. Estes resultados podem ser justificados por Campos et al. (1995) e Do Valle et al. (2001) que sugerem como hipóteses para a persistência da detecção, por ensaios sorológicos, de anticorpos anti-*P. brasiliensis* em pacientes tratados ou após a cura: a presença de algumas isoformas da gp43 que persistem no organismo, manutenção de infecção sub-clínica persistente; e/ou re-expostos ao fungo. Além disso, os achados corroboram com Camargo et al. (1989), que observou que a terapia antifúngica pode estar envolvida na redução do reconhecimento da fração de 70 kDa.

A análise dos parâmetros intrínsecos do ensaio de imunodifusão demonstrou que este método apresentou especificidade (E) e valor preditivo positivo (VPP) de 100%; e valor preditivo negativo (VPN) de 86,7%. Estes valores são muito próximos ao obtidos por Restrepo (1966) que observou,

na mesma sequência, E=100%; VPP=100% e VPN=96,0%; por Del Negro et al. (1991) que verificou E=100%, VPP=100% e VPN=92,1%; e por Moreto (2010) que encontrou E=100%; VPP=100% e VPN=85,1%.

A avaliação da técnica de *immunoblotting* frente a gp 43 mostrou E=95%; VPP=89,2% e VPN=91,9%. Foi possível somente comparar estes dados com Moreto (2010) que observou valores inferiores de especificidade: $50,0 \pm 12,2\%$ e VPP $65,2 \pm 9,7\%$, respectivamente e semelhante de VPN: $94,1 \pm 7,9\%$. Em relação à presença da gp70, os valores encontrados foram equivalentes entre os dois trabalhos, com 100% de especificidade e VPP, diferindo apenas no VPN que foi de 92,2% no atual estudo e de $97,0 \pm 4,1\%$ em Moreto (2010).

A eficiência do ensaio de ID foi de 89,7%, com valor próximo aos 97,0% encontrados por Restrepo (1966); 95,7% por Del Negro et al. (1991) e 93,6% por Moreto (2010). Avaliando-se isoladamente a presença da gp43, a eficiência do IB foi de 91,1%, sendo superior aos $73,0 \pm 7,7\%$ encontrados por Moreto (2010). Por sua vez, a eficiência da reatividade da gp70, avaliada de forma independente, foi de 93,7%, inferior ao achado de Moreto (2010) que encontrou $98,4 \pm 2,2\%$.

A concordância substancial encontrada entre os métodos de ID e IB aliada ao percentual de amostras de soro de pacientes com doença confirmada que apresentaram reatividade apenas em um dos ensaios reforçam o proposto por Do Valle et al. (2001), Martins et al. (1997) e Silva et al. (2008). Estes autores recomendam a adoção de pelo menos dois (2) ensaios sorológicos para detecção de anticorpos em caso de diagnóstico duvidoso de PCM. Além disso, o alto índice de resultados duplamente negativos em amostras de pacientes sem a doença confere alta probabilidade de diagnóstico descartado, ou cura aparente, nestes casos.

A reprodutibilidade intralaboratorial do ensaio de *immunoblotting* foi avaliada por três (3) analistas distintos e apresentou resultados bastante satisfatórios; visto que, foram selecionadas para execução desta avaliação, laboratoristas com diferentes tempos de experiência e treinamento na execução do ensaio de IB: um (1) analista com tempo de treinamento superior a cinco (5) anos; um (1) com tempo médio de quatro (4) anos e o último, com menos de um (1) ano de experiência. Estes achados sugerem que esta técnica possa ser executada por qualquer profissional, desde que, treinados adequadamente em laboratórios devidamente equipados.

Baseado nos resultados obtidos foi possível concluir que o ensaio de IB pode ser utilizado como um teste sorológico confirmatório para os casos de pacientes com PCM. A capacidade de detectar anticorpos séricos frente a gp43, confere alta sensibilidade à metodologia, aliada a especificidade da presença concomitante das glicoproteínas de 43 e 70 kDa, ratificam a eficiência deste método.

Neste caso, segundo o critério de definição de caso estabelecido no Manual de Vigilância e Controle da Paracoccidiodomicose da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (SES, 2008) e no Consenso Brasileiro de Paracoccidiodomicose (Shikanai-Yasuda et al., 2006), pode-se sugerir que pacientes com sintomatologia característica e ausência de reatividade para *P. brasiliensis* pelo ensaio de ID (caso suspeito), mas que apresentem reconhecimento simultâneo das frações de 43 e 70 kDa por IB, possam ser classificados como casos prováveis da doença. Já aqueles com ausência de reatividade por IB, ou com reconhecimento de gp 43 ou 70 isoladamente, devem ser mantidos como caso suspeito, quando não há reatividade por ID.

A exemplo das demais micoses, o diagnóstico definitivo da histoplasmose pauta-se no isolamento de *H. capsulatum* em meios de cultura específicos ou na visualização das leveduras através de exame

direto de espécimes clínicas, utilizando colorações específicas para fungos. Entretanto, o tempo necessário para o crescimento fúngico em cultura, a presença de contaminantes no material processado e a dificuldade de distinção das estruturas microscópicas de *H. capsulatum* e outros fungos patogênicos acabam dificultando a confirmação laboratorial desta enfermidade (Guimarães et al., 2006).

Na casuística avaliada, apenas 27% dos indivíduos portadores de histoplasmoze apresentaram confirmação micológica da doença (exame direto e/ou cultura); 73% dos pacientes foram categorizados seguindo a definição de caso em casos prováveis. Estes dados se aproximaram do percentual encontrado por Martins et al (2005), que estudando frequência de HP em uma clínica médica privada no Estado do Rio de Janeiro, verificou que 83,3% dos pacientes apresentavam resultados sorológicos “positivos” sendo, estas, as únicas evidências laboratoriais da doença encontradas. Por outro lado, os trabalhos de Severo et al. (2001) e Leimann et al. (2005) demonstraram que o isolamento e a identificação de estruturas características de *H. capsulatum* em cultura e/ou exames histopatológicos foi possível em mais de 60% dos pacientes.

Os achados acima podem ser justificados, principalmente, pelas diferenças na disponibilidade de exames laboratoriais nos diferentes serviços estudados e nas formas clínicas dos pacientes que compõe as amostragens. Segundo Wheat (2006), a cultura é mais eficiente naquelas situações em que a carga fúngica encontra-se elevada, como a frequentemente descrita em indivíduos com HP disseminada. Em contrapartida, os testes sorológicos são especialmente úteis como métodos auxiliares de diagnóstico nos pacientes com quadros leves e moderados da doença.

Martins et al. (2005) destacam que apenas a sorologia foi realizada em todos os pacientes. A forma pulmonar aguda da HP, foi observada em 88,8% dos pacientes e não houve casos de HP disseminada bem como de co-infectados com HIV. O oposto ocorreu no trabalho de Severo et al. (2001), onde os autores incluíram como critérios diagnósticos da HP apenas a investigação laboratorial por métodos diretos. Na população avaliada neste estudo, 67% dos pacientes apresentaram HP disseminada (71% co-infectados com HIV) e, 14% a HP pulmonar aguda. Leimann et al. (2005) encontraram percentuais semelhantes a Severo et al. (2001), observando a forma disseminada em 62% dos indivíduos avaliados, 78% destes co-infectados pelo HIV; e, pulmonar aguda em 14% dos pacientes

No presente estudo, 64,9% dos pacientes apresentaram a forma pulmonar aguda de histoplasmose e 35,1%, a forma disseminada da doença; destes últimos, 92% eram portadores do HIV. Conforme discutido anteriormente, a casuística deste trabalho foi composta a fim de representar a população atendida na rotina do LIM/CIM/IAL-SP. Deste modo, foram incluídas amostras encaminhadas de duas (2) unidades de saúde com características distintas; o Instituto de Infectologia Emílio Ribas, referência internacional em doenças infecciosas, especialmente no atendimento de pacientes HIV/Aids; e o Núcleo de Vigilância Epidemiológica de Areias, que realiza investigações epidemiológicas de doenças e agravos no município.

A doença foi mais frequente em indivíduos do sexo masculino corroborando com Severo et al. (2001), Leimann et al. (2005) e Chang et al. (2007). Martins et al. (2005) observou que 55,5% dos pacientes avaliados eram do sexo feminino. Ao que parece, o predomínio de homens com HP pode estar associado, a maior exposição ao patógeno e prevalência do vírus HIV nesta população. Rodrigues (2004), realizando inquérito epidemiológico com histoplasmina, não encontrou diferenças entre os sexos nas taxas de infecção por *H. capsulatum*

A média de idade dos pacientes classificados como casos confirmados e prováveis foi de 22,1; inferior aos 37 anos encontrados por Severo et al. (2001); 36 por Leimann et al., (2005); e 33 por Chang et al. (2007) porém, estes achados assemelham-se ao valor médio observado entre os pacientes com a forma disseminada (34,2). Os indivíduos com a forma pulmonar aguda apresentaram faixa etária entre 14 e 16 anos, fazendo com que a média de idade da população geral fosse diminuída.

Nos casos em que a HP foi descartada, não se observou o predomínio de uma patologia associada, sendo possível verificar diagnóstico diferencial com criptococose disseminada, tuberculose, micobacteriose não-tuberculosa e leishmaniose. Estas enfermidades são comumente descritas na literatura por apresentarem semelhança clínica com forma de HP (Kauffman, 2007; Ferreira e Borges, 2009).

De forma semelhante ao discutido em relação ao imunodiagnóstico da paracoccidioidomicose, pode-se afirmar que a heterogeneidade observada nas preparações antigênicas de *H. capsulatum* exerce forte influência no desempenho dos ensaios sorológicos.

Neste sentido, pode-se citar como exemplo as pesquisas desenvolvidas nos Estados Unidos, país com vasta experiência e tradição no estudo da HP, devido a existência de grandes e importantes áreas endêmicas e inúmeras descrições de surtos epidêmicos. Apesar de alguns estudos relatarem o emprego de filtrados de cultura, ou histoplasmina, obtidos a partir de cultura de células micelianas de *H. capsulatum*, um número substancial de artigos relata o uso de leveduras para a produção de antígenos com fins diagnósticos (Pine et al., 1966; Reeves et al., 1972; Bradley et al., 1974; Gross et al., 1975; Kwon-Chung e Bennett, 1992).

No Brasil, os poucos grupos que se dedicam à caracterização e produção de antígenos de *H. capsulatum*, enfocando a avaliação dos mesmos na prática diagnóstica, empregam preparações obtidas a partir de filtrado de cultura de células filamentosas, também conhecidas como histoplasmina. A diferença com os estudos norte-americanos relaciona-se a morfologia do patógeno, impondo grande dificuldade na comparação dos resultados obtidos nestes grupos de pesquisa.

Além disso, a exemplo do que ocorre na produção de antígenos para *P. brasiliensis*, observa-se também diferenças relacionadas à escolha da amostra fúngica, tipo de meio de cultura utilizado, tamanho do inóculo, tempo de incubação, forma de incubação (em fase estacionária ou com agitação), forma de extração do antígeno (Freitas, 2005).

Segundo Ehrhard e Pine (1972a,b), o sucesso da utilização da histoplasmina na prova de imunodifusão, visando o diagnóstico confirmatório da HP está intimamente relacionado ao conteúdo qualitativo e quantitativo dos antígenos H e M presentes na mesma.

Wiggins e Schubert (1965) *apud* Ehrhard e Pine (1972a) verificaram, em estudo comparativo, que apenas filtrados de cultura que apresentavam em sua composição as frações H e M, eram capazes de reagir pela prova de fixação de complemento (FC) frente à totalidade de soros de pacientes com HP avaliada. Os autores demonstraram que preparações antigênicas (histoplasmina) constituídas apenas pelo antígeno H reagem somente frente a alguns soros destes pacientes.

Ehrhard e Pine (1972 a,b) demonstraram que a relação entre o crescimento de *H. capsulatum*, a produção de exoantígenos e a liberação de carboidratos, proteínas e ácidos nucléicos sugere que a expressão dos

antígenos H e M resultam da autólise celular e sua produção pode ser diferenciada controlando-se condições como: a correta escolha da amostra, composição do meio de cultura, além de fatores como agitação, temperatura e pH. Os autores observaram que o pico da produção destas frações antigênicas (H e M) ocorreu antes do rendimento celular alcançar seu máximo. Verificaram, ainda, que em geral, a produção de antígeno permanece constante ou aumenta durante o declínio da massa miceliana, concluindo que no processo de autólise celular há liberação de antígenos H e M.

Gross et al. (1975), concluíram que a escolha da amostra de *H. capsulatum* bem como a quantidade e fase (micélio ou levedura) do inóculo estão relacionadas à composição das frações H e M, durante a produção de histoplasmina. Ainda segundo os autores, culturas sob agitação, são preferidas por acelerarem a produção. Na indisponibilidade ou falta de volume necessário, pode se utilizar culturas estacionárias similarmente inoculadas com leveduras, que fornecem resultados consistentes e de confiança, contudo requerem longos períodos de incubação, que podem variar de cinco a seis meses.

Apesar da literatura relacionada a produção de antígenos de *H. capsulatum* ser relativamente vasta, mesmo não sendo atual (a maioria das publicações são das décadas de 40 a 60), raramente os autores informam qual amostra fúngica foi utilizada para obtenção da preparação antigênica bem como a origem da mesma, ou seja, se foi obtida a partir de pacientes imunocompetentes ou imunodeprimidos.

É importante comentar que o isolamento de *H. capsulatum* de indivíduos imunocompetentes não é comum, visto que o quadro clínico da histoplasmose, nestes indivíduos, é geralmente agudo, subclínico e auto resolutivo (Wheat, 2003). A grande maioria das amostras de *H. capsulatum* é isolada de pacientes com graus variados de imunossupressão. Além disso,

deve-se salientar que não foram encontrados na literatura, artigos que comentem a possível interferência ou efeito do arsenal de drogas imunossupressoras, utilizadas por estes pacientes, sobre o isolado fúngico.

Freitas (2005), em sua dissertação de mestrado, relata que uma amostra isolada do líquido de um paciente com aids apresentava padrão fenotípico (macro e micro morfológico) totalmente distinto daquele observado nas demais, mesmo aquelas isoladas de outros pacientes portadores de HIV. Esta amostra totalmente pleomórfica demonstrou, na avaliação do perfil protéico, a presença das frações H e M. Entretanto, o antígeno obtido não propiciou índices adequados de sensibilidade pela reação de imunodifusão dupla: apenas 4,5%, em pacientes com histoplasmose. Apesar de ter sido descartada, quanto ao potencial para aplicabilidade na produção de antígeno de *H. capsulatum*, a autora, continuou mantendo repiques sucessivos da cultura; tendo observado, após mais de 10 anos de seu isolamento primário, que a amostra voltou a apresentar padrão morfológico compatível com outros isolados de *H. capsulatum*. Os achados permitiram sugerir que, possivelmente o tempo de armazenamento associado à manutenção da amostra, por meio de repiques, contribuiu com a “depuração” das drogas ingeridas pelo paciente que, supostamente, ficaram presentes na cultura.

Diante do exposto, pode-se reforçar que a escolha da amostra fúngica é etapa fundamental para o sucesso no processo de produção e, subsequente caracterização de antígenos de *H. capsulatum*, permitindo a obtenção de reagentes biológicos que propiciem índices de sensibilidade e especificidade adequados aos ensaios imunológicos (Freitas, 2005; Freitas et al., 2009).

No presente trabalho, foram avaliados antígenos produzidos a partir do filtrado de cultura dos isolados 200 e 406 de *H. capsulatum*, apontados como bons antígenos por Freitas (2005). A autora, após avaliar e

caracterizar 14 preparações antigênicas obtidas de amostras distintas de *H. capsulatum*, verificou que estas apresentaram grandes quantidades das frações H e M e melhores índices de reatividade frente a soros de pacientes. Neste estudo, observou-se que o antígeno Hc 200 apresentou melhor desempenho quando avaliado frente às amostras de pacientes com HP em comparação aquele obtido a partir da amostra 406 de *H. capsulatum*.

A avaliação sorológica dos pacientes demonstrou que 79% das amostras foram reagentes por ID, de forma semelhante aos 73% de “positividade” descritos por Leimann et al (2005). Entre os indivíduos com a forma pulmonar aguda observou-se 96% de reatividade, valor superior aos 86,8 e 83,3% verificados, respectivamente, por Leimann et al. (2005) e Martins et al. (2005). O percentual de pacientes com a forma disseminada com amostras reagentes, por ID, (56%) foi semelhante aos 57% observados por Leimann et al. (2005) e maior em relação aos 45% encontrados por Arechavala et al (1993); 38% por Tobon et al (2005); e 25% por Casotti et al. (2006). Nenhum destes trabalhos, por sua vez, discorre sobre a relação entre as formas clínicas da doença e os títulos de anticorpos circulantes obtidos por ID, dificultando a comparação com os resultados encontrados.

Em um artigo de revisão sobre histoplasmose, Aidé (2009) relata que 25% dos doentes com doença aguda e crônica são fracamente positivos pelo teste FC; e títulos maiores ocorrem em 37% dos pacientes. Em nosso estudo, os percentuais de níveis baixos e elevados de anticorpos foram detectados, respectivamente, 47% e 9% em pacientes com doença confirmada e provável. Entretanto, a metodologia utilizada foi diferente e os resultados não podem ser equiparados.

A análise das amostras por *immunoblotting* demonstrou que 79% dos pacientes apresentaram reconhecimento da fração M; resultado idêntico ao percentual de reatividade observado na avaliação por ID e inferior aos 100%

encontrados por Zancopé-Oliveira et al (1994) e Freitas (2005). Por outro lado, a reatividade frente a fração H foi 67%, superior aos 57% de Freitas (2005). No entanto, os autores não classificam os pacientes em doença aguda ou disseminada, o que poderia justificar a diferença destes resultados.

O antígeno M foi caracterizado como uma glicoproteína com massa molecular de aproximadamente 70 a 94 kDa e ponto isoelétrico de 4,7 (Green e Pine, 1985; Harris e Deepe Jr, 1988). Este conjunto de três (3) frações antigênicas é considerado imunodominante em pacientes com histoplasmose (Bradley et al., 1974; Reiss et al., 1986; Hamilton et al., 1990; Torres et al., 1993; Zancopé-Oliveira et al., 1993; Zancopé-Oliveira et al., 1994). O antígeno H é um complexo formado por, pelo menos, cinco (5) frações glicoproteicas, constituído por 10 a 30% de carboidratos, apresentando massa molecular de 108 a 120 kDa e ponto isoelétrico de 4,5 (Bradley et al., 1974; Green e Pine, 1985; Harris e Deepe Jr, 1988). A faixa H é detectável simultaneamente com a M na vigência de infecção em curso, ocorrendo raramente na ausência desta. A reatividade da fração H indica HP ativa, podendo ser observada a partir da quarta semana após a infecção até dois anos após a cura clínica do paciente (Di Salvo et al., 1980; Hopwood e Evans, 1991; Yeo e Wong, 2002).

Em pacientes com histoplasmose pulmonar aguda, verificou-se que 100% das amostras apresentaram reatividade por IB. Este resultado foi equivalente aos de Pizzini et al. (1999) e Freitas (2005), sendo superior aos 65% encontrados por Bachi (2004) e os 77,8%, por Lima et al.(2008). A utilização do teste de IB apresenta a vantagem de identificação prévia em alguns casos de infecção, devido a possibilidade de detecção da soroconversão anteriormente à FC ou ID (Leimann et al., 2005). Entretanto, os percentuais de reatividade por ID e IB, neste grupo de pacientes foram semelhantes; sugerindo a vantagem dos ensaios sorológicos em indivíduos

com doença aguda. Importante destacar que praticamente todas as amostras foram reagentes frente às frações H e M.

Avaliando pacientes com doença disseminada, 28% das amostras reconheceram as frações H e M, simultaneamente, representando infecção ativa e 22,2% somente à fração M, sugerindo infecção por *H. capsulatum*. Freitas (2005) verificou valores maiores neste grupo de indivíduos, encontrado 38% de reatividade frente às frações H e M e 62% frente a M, apenas.

Os baixos percentuais observados em pacientes com HP disseminada, nos ensaios de ID e IB, podem ser explicados tendo em vista que o diagnóstico sorológico baseado na pesquisa de anticorpos circulantes, de forma geral, apresenta valor limitado em pacientes portadores de aids e doença severa. Este fato deve-se, especialmente, às deficiências do sistema imunológico em montar resposta adequada e a grande quantidade de antígenos circulantes no organismo. Nestes casos, a avaliação de antigenemia e/ou antigenúria, bem como o emprego de métodos moleculares para identificação de DNA em amostras biológicas pode contribuir para a confirmação da etiologia da doença (Hopwood e Evans, 1991; Kwon-Chung e Bennett, 1992; Hamilton e Gomes, 1998; Mendes-Giannini e Melhem, 2001; Lacaz et al., 2002; Yeo e Wong, 2002; Guedes et al., 2003).

Neste estudo não foi observada reatividade cruzada por ID quando se avaliou amostras de pacientes com HP descartada, nem com micoses heterólogas ou indivíduos saudáveis; demonstrando à alta especificidade da técnica. Entretanto, por IB, pode-se verificar que 29,1% das amostras do grupo controle apresentaram reatividade frente ao antígeno Hc 200 de *H. capsulatum*. A maior taxa de reatividade, ou seja, 66,7% foi encontrada nos pacientes com PCM, seguida dos pacientes com aspergilose (30%) e dos

indivíduos doadores de sangue (10%). Em todos os casos de reatividade cruzada, demonstrou-se que a principal fração envolvida foi a M. A reatividade frente à fração H foi observada apenas em pacientes com PCM e aspergilose.

A existência de resultados “falso-positivos”, ou reatividade inespecífica, pode ser atribuída ao carboidrato C, uma galactomanana termoestável, presente nos antígenos H e M, compartilhada pela maioria dos fungos dimórficos sistêmicos (Zancopé-Oliveira et al 1994).

Bachi (2004) demonstrou em seu trabalho que 30% das amostras de soros de indivíduos saudáveis foram reagentes frente à fração de 94 kDa (M) e 10% frente à fração de 120 kDa (H). Zancopé-Oliveira et al (1994) verificaram que 13 de 16 (81,3%) amostras de soro de pacientes com PCM e 11 de 15 (73,3%) pacientes com aspergilose foram reagente frente ao antígeno M. Os autores relatam que o processo de deglicosilação do antígeno pode reduzir esta reatividade cruzada, sem, no entanto, eliminá-la em soros de pacientes com micoses heterólogas. Pizzini et al (1999) encontrou 8% de reatividade em indivíduos moradores de área endêmica para histoplasmose utilizando antígeno bruto. No entanto, nenhuma das amostras foi reagente após tratamento do antígeno com metaperiodato de sódio.

Estes achados, contudo, merecem destaque, visto que os percentuais de reatividade cruzada foram semelhantes, ou até mesmo inferiores, aqueles descritos na literatura e empregaram o processo de oxidação das frações glicídicas do antígeno 200 de *H. capsulatum*. Dessa forma, pode-se sugerir que a introdução de procedimentos simples, menos laborioso e menos oneroso como a alteração da solução utilizada para diluir as amostras de soro, auxiliou a minimizar o índice de inespecificidade da reação de IB.

Do mesmo modo, alguns autores afirmam que anticorpos precipitantes anti-M não estão, necessariamente, associados à doença ativa. Indivíduos com reação intradérmica positiva a histoplasmina, ou com infecção remota, podem apresentar anticorpos circulantes contra este antígeno (Hopwood e Evans, 1991; Yeo e Wong, 2002). A possibilidade de infecção subclínica ou remota por *H. capsulatum* não deve ser descartada, visto que esta espécie fúngica é ubíqua, além de compartilhar nichos ecológicos com *P. brasiliensis* e *A. fumigatus*.

A avaliação dos parâmetros intrínsecos das metodologias de ID e IB visando à pesquisa de anticorpos circulantes anti-*H. capsulatum* em amostras de pacientes com histoplasmose confirmada ou provável revelou não existir diferença nos valores de sensibilidade (79,1%) entre ambos os testes. Ambas as metodologias apresentaram sensibilidade elevada entre os pacientes com a forma pulmonar aguda da doença, 96% para a ID e 100% para o IB. Todavia, é importante salientar que, alguns autores relatam que o ensaio de IB antecipa-se, em relação aos testes de ID e FC, na detecção da soroconversão (Leimann et al., 2009; Vicentini et al.2008; Passos, 2009), devido a suas propriedades metodológicas (Towbin et al., 1979). Segundo Wheat (2001a,b), a presença de precipitinas surgem de 4 a 8 semanas após exposição ao patógeno.

A sensibilidade da ID em pacientes com HP disseminada foi de 55,6%, sendo superior a do IB de 35,7%. Estes parâmetros foram semelhantes aos encontrados na literatura. Segundo, Wheat (2003) a sensibilidade da ID em pacientes com aids varia de 58 a 60% e em pacientes não imunossuprimidos de 71 a 100%. Pizzini et al (1999) encontrou 100% de sensibilidade nos ensaios de ID e IB em indivíduos procedentes de um surto de histoplasmose pulmonar aguda.

O método de ID é considerado altamente específico para o imunodiagnóstico da HP, apresentando especificidade de 100% no atual trabalho e em diversos outros estudos (Pizzini et al 1999; Kauffman, 2007).

No presente estudo, a especificidade do ensaio de IB foi inferior á ID (78,9%), mas igual ao valor observado, inicialmente, por Pizzini et al (1999). Todavia, após a utilização de antígeno deglicosilado, a autora observou que este parâmetro aumenta para 100%. A especificidade da fração M foi de 80,3% e da fração H de 86,8%, avaliando a presença concomitante destas duas frações, a especificidade da técnica passa a ser de 87,0%,. Estes percentuais foram mais próximos dos encontrados por Zancopé-Oliveira et al (1994) em antígeno deglicosilados (91,2%) do que, antes do tratamento, (46,1%).

Ainda comparando a aplicabilidade dos métodos de ID e IB no imunodiagnóstico da histoplasmose, os resultados demonstraram que além de mais específica, a metodologia de ID foi mais eficiente, principalmente em pacientes com a forma disseminada da doença. Torres et al (1993) demonstraram que a reação de *western blott* mostrou-se mais eficiente que a de ELISA e fixação de complemento, avaliando índices de reconhecimento em amostras de soro pacientes infectados pelo patógeno. Entretanto, o autor não avaliou o desempenho da ID, impossibilitando a comparação de resultados.

Na avaliação da concordância entre os métodos, destacou-se os 50% encontrados no pacientes com HP disseminada. Estes achados sugerem a adoção de pelo menos dois (2) ensaios sorológicos em casos duvidosos de HP. Além disso, deve-se salientar que os resultados dos testes sorológicos devem ser sempre interpretados à luz dos sintomas e dos sinais clínicos (Wanke et al. 2001; Wheat, 2001a; Wheat, 2001b; Aidé, 2009)

O desenvolvimento do presente estudo tem mostrado, até o momento, as dificuldades e desafios enfrentados na avaliação dos métodos sorológicos existentes para o imunodiagnóstico da paracoccidiodomicose e histoplasmose. Estes achados sugerem que estudos adicionais sobre a presença de gp43 e gp70 em indivíduos com infecção subclínica e em pacientes com PCM são necessários, para que a detecção em termos de presença e intensidade destes componentes antigênicos possa ser interpretada de forma apropriada (Camargo et al., 1989; Cunha et al., 1992; Do Valle et al., 2001; Moreto, 2010). No caso de pacientes com histoplasmose, especialmente àqueles com a forma disseminada e/ou imunodeficientes torna-se necessário e urgente o desenvolvimento e a disponibilidade de métodos diagnósticos alternativos nos centros de referências brasileiros.

Apesar de suas limitações, os métodos sorológicos são importantes no diagnóstico e monitoramento da PCM e da HP, principalmente quando, métodos mais sensíveis, como o IB, são utilizados em associação a ensaios mais específicos, como a ID. Desta forma, o IB pode ser aplicado no diagnóstico inicial destas micoses e a ID, no seguimento de pacientes (Do Valle et al. 2001; Vicentini-Moreira et al., 2008; Passos et al., 2011).

Nos últimos anos, a medicina laboratorial tem passado por intensas mudanças, as quais se referem à garantia da qualidade dos produtos ofertados, com exigências crescentes, tanto do ponto de vista do cliente interno como externo. Oliveira e Mendes (2010) destacam o fato do número expressivo de publicações que apontam as falhas laboratoriais, estimando em 14% a possibilidade destas ocorrerem na fase analítica. Particularmente, considera-se uma questão de tempo para que o conjunto de indicadores adotados na garantia da qualidade na área diagnóstica seja incorporado no campo da pesquisa científica. Desta forma, imagina-se que será recomendada a utilização de materiais certificados e métodos validados,

consequentemente, submetidos a ensaios de proficiência e que garantam à confiabilidade dos resultados obtidos.

Não se pode garantir que este trabalho seja inédito, mesmo porque a literatura apresenta, ainda que de forma escassa, alguns protocolos para execução da metodologia de *Immunoblotting*. Entretanto, a descrição detalhada das avaliações nestes processos assegura o ineditismo do mesmo, subsidiando, não apenas as análises de robustez, como a estimativa de custo-benefício do método. Este estudo abre perspectivas para que novos trabalhos sejam desenvolvidos no LIM/CIM/IAL-SP, aprimorando parâmetros, como por exemplo, a análise do tempo de prateleira das membranas de nitrocelulose em outras circunstâncias.

Após a extensa revisão da literatura, para a redação deste trabalho, e a experiência adquirida na vivência em laboratório de referencia estadual, permite-se afirmar que se faz eminente a necessidade de fóruns de discussão entre *experts* (pesquisadores) de diferentes laboratórios ao menos no Estado de São Paulo. Estes teriam por finalidade, a padronização e validação das metodologias empregadas no imunodiagnóstico das micoses sistêmicas, assim como a produção de materiais de referências, no que diz respeito aos tipos de preparações antigênicas a serem utilizadas.

Este trabalho finaliza com nossa proposta que a metodologia de *immunoblotting* deva ser implantada na rotina do LIM/CIM/IAL-SP, tornando-se disponível na Rede Pública de Saúde. Pensando especificamente na paracoccidiodomicose, este ensaio poderia ser utilizado em pacientes com ausência de reatividade por imunodifusão seguindo o algoritmo proposto no Manual de Vigilância e Controle da Paracoccidiodomicose (SES, 2008). No caso da histoplasmose, não existe até o momento nenhum consenso publicado no âmbito estadual ou nacional que orientem na conduta laboratorial para o diagnóstico. Dessa forma, a metodologia de IB torna-se

disponível aos serviços de vigilância, como ferramenta complementar em suspeitas de microepidemias por *H. capsulatum*.

Este trabalho vislumbra a composição de grupos de pesquisa, envolvendo serviços de excelência tanto no Brasil como na América Latina, que proponham e efetivem a avaliação interlaboratorial das metodologias de *immunoblotting* e imunodifusão dupla. A condução destes estudos permitirá uma melhor análise de custo-efetividade, visando fortalecer a tomada de decisão sobre a implantação destes métodos nos serviços de mico-sorologia da Rede Pública de Saúde.

6. Conclusões

- Após padronização do ensaio de *immunoblotting*, verificou-se que o mesmo demonstrou ser uma importante ferramenta auxiliar no imunodiagnóstico presuntivo da paracoccidiodomicose, devendo ser utilizado de forma complementar à imunodifusão.
- Os resultados obtidos pela técnica de *immunoblotting* nos permitem recomendar que os critérios propostos para definição de caso provável e suspeito, contidos no Manual de Vigilância e Controle da Paracoccidiodomicose da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (SES, 2008), sejam revistos.
- Em relação ao imunodiagnóstico da histoplasmose, os testes de imunodifusão e *immunoblotting* apresentaram desempenho semelhante. Desta forma, sugere-se que a metodologia de *immunoblotting* deva ser utilizada como ferramenta auxiliar, para a elucidação precoce do processo infeccioso por *H. capsulatum* durante a ocorrência de surtos e/ou microepidemias, especialmente nos casos com ausência de informações micológicas.
- No caso de pacientes com quadro de histoplasmose disseminada e/ou imunodeficientes torna-se necessário e urgente o desenvolvimento, padronização e disponibilização de métodos diagnósticos alternativos, nos laboratórios de centros de referência estadual ou nacional.
- O conjunto dos resultados reforça que o desempenho satisfatório ou insatisfatório da metodologia de *immunoblotting* não deve ser atribuído exclusivamente ao tipo da preparação antigênica utilizada, mas também pelas demais etapas envolvidas no desenvolvimento da mesma.

- Em resumo, neste trabalho demonstrou-se que ambas as metodologias são de fundamental importância para o imunodiagnóstico da paracoccidiodomicose e histoplasmose. Entretanto, é necessário que seja estabelecido um consenso sorológico, permitindo a uniformização na produção de antígenos e nos protocolos de realização dos imunoenaios em todos os laboratórios voltados para o imunodiagnóstico das micoses sistêmicas.

7. Referências Bibliográficas

Abadio AK, Kioshima ES, Teixeira MM, Martins NF, Maigret B, Felipe MS. Comparative genomics allowed the identification of drug targets against human fungal pathogens. *BMC Genomics*. 2011; 12: 75.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determinação da publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. *Diário Oficial da União*, Brasília, 02 jun. 2003.

Aidé MA. Histoplasmose. *J Bras Pneumol*. 2009; 35(11): 1145-1151.

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

Almeida F, Lacaz CS. Notas a propósito de dois casos de histoplasmose. *An Fac Med Univ São Paulo*. 1947; 23: 155-163.

Alves KS, Araujo Filho OF, Araujo MF, Canzian M, Dias MD, Lindoso JA, Lacaz CS. Histoplasmose disseminada em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). Relato de 34 casos. In. 8º Congresso Brasileiro de Infectologia. 3º Congresso de Infectologia Mercosul; 1994; Porto Alegre. p.113.

Alves K S. Histoplasmose disseminada e síndrome de imunodeficiência adquirida. Estudo clínico-laboratorial de 28 casos. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo; 1996.

Anastácio VM, Passeto MPA, Góngora DVN, Soares MMCN, Almeida MTG. Paracoccidioidomicose: Correlação entre achados clínicos e laboratoriais na região de São José do Rio Preto. Arq Cienc Saude. 2007; 14(3): 181-184.

Anjos DT, Souza MC, Takahashi JP, Kohara VS, Barreto LC, Freitas RS, et al. Exposição ao *Histoplasma capsulatum* em um grupo de espeleólogos detectada por provas sorológicas. In: VII Encontro do Instituto Adolfo Lutz; 2007; São Paulo, Brasil.

Anjos DT, Takahashi JP, Kohara VS, Barreto LC, Freitas RS, Souza MC, et al. Espeleologia como fator de risco para histoplasmose. Mito ou verdade? In: VII INFOCUS América Latina/2008 – Fórum de Infecções Fúngicas na Prática Clínica; 2008 Set 25-27; Campinas, Brasil. São Paulo: Office Editora e Publicidade Ltda; 2008. p.13.

Arango M, Oropeza F, Anderson O, Contrás C, Bianco N, Yarzabal L. Circulating immune complexes and in vitro cell reactivity in paracoccidioidomycosis. Mycopathologia. 1982; 79(3): 153-158.

Arechavala AI, Robles AM, Negroni R, Bianchi MH, Taborda A. Valor de los métodos directos e indirectos de diagnóstico em las micosis sistémicas asociadas al SIDA. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1993; 35(2): 163-169.

Aristizabal BH, Clemons KV, Stevens DA, Restrepo A. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: in vivo inhibition in females. Infect Immun. 1998, 66(11): 5587-5591.

Artal EM. Diagnóstico histopatológico de las micosis. Rev Iberoam Micol. 2004; 21: 1-9.

Assis CM. Antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis* solúveis em NaCl 0,85%. [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1990.

Assis CM. Estudo morfofisiológico de amostras de *Paracoccidioides*. [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1997.

Assis CM, Mendes-Giannini MJM, Del Negro GMB, Gambale W. Estudo dos componentes solúveis da parede celular de *P. brasiliensis* em solução de NaCl 0,85%. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1989a; 31 (supl.7): 99.

Assis CM, Mendes-Giannini MJM, Gambale W. Isolation and morphology of an immunoreactive outer cell wall proteins produced by *P. brasiliensis* 113. Pan American Association of Biochemical Societies. 1990; 6: 163.

Assis CM, Mendes-Giannini MJM, Del Negro GMB, Gambale W. *Paracoccidioides brasiliensis* cell wall antigens soluble in NaCl 0,85%. 1989b. Arq Biol Tecol. 32: 101.

Assis CM, Mendes-Giannini MJM, Del Negro GMB, Gambale W, Lacaz CS. Isolation of immunoreactive outer cell wall proteins produced by *P. brasiliensis*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1993; 35 (supl. 10): 72.

Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). NBR ISSO/IEC 17025. Requisitos gerais para a competência de ensaio e calibração. Rio de Janeiro; 2005.

Bachi ALL. Sorologia da histoplasnose: avaliação de reações imunoenzimáticas para diagnóstico utilizando exoantígeno bruto e antígenos purificados. [dissertação]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2004.

Barrozo LV, Benard G, Silva MES, Bagagli E, Marques SA, Mendes RP. First description of a cluster of acute/subacute paracoccidioidomycosis cases and its association with a climatic anomaly. PLoS Negl Trop Dis [periódico na

internet]. 2010; 4(3): e643. [acesso em 03 fev 2011]. Disponível em <http://www.plosntds.org>.

Barrozo LV, Mendes RP, Marques SA, Benard G, Silva ME, Bagagli E. Climate and acute/subacute paracoccidioidomycosis in a hyper-endemic area in Brazil. *Int J Epidemiol*. 2009; 38(6): 1642-1649.

Batista Jr J, de Camargo ZP, Fernandes GF, Vicentini AP, Fontes GJ, Hahn RC. Is the geographical origin of a *Paracoccidioides brasiliensis* isolate important for antigen production for regional diagnosis of paracoccidioidomycosis? *Mycoses*. 2010; 53(2): 176-180.

Bellissimo-Rodrigues F, Vitali LH, Martinez R. Serological diagnosis of paracoccidioidomycosis in HIV-coinfected patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010; 105 (7): 904-907.

Bertoni TA, Takao EKH, Dias JRC, Svidzinski TIE. Paracoccidioidomicose e tuberculose: diagnóstico diferencial. *J Bras Patol Med Lab*. 2010; 46(1): 17-21.

Berzaghi R, da Silva SH, de Camargo ZP. Variable gp43 secretion by *Paracoccidioides brasiliensis* clones obtained by two different culture methods. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(1): 491-493.

Bialek R, Ernst F, Dietz K, Najvar LK, Knobloch J, Graybill JR, et al. Comparison of staining methods and a nested PCR assay to detect *Histoplasma capsulatum* in tissue sections. *Am. J. Clin. Pathol*. 2002a; 117(4): 597-603.

Bialek R, Feucht A, Aepinus C, Just-Nubling G, Robertson VJ, Knobloch J, et al. Evaluation of two nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue. *J Clin Microbiol*. 2002b; 40(5): 1644-1647.

Bialek R, Ibricevic A, Aepinus C, Najvar LK, Fothergill AW, Knobloch J, et al. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in Tissue Samples by a Nested PCR Assay. J Clin Microbiol. 2000; 38(8): 2940-2942.

Bicalho RN, Santo MF, de Aguiar MC, Santos VR. Oral paracoccidioidomycosis: a retrospective study of 62 Brazilian patients. Oral Dis. 2001; 7(1): 56-60.

Bittencourt JIM. Mortalidade por paracoccidioidomicose no Estado do Paraná, Brasil (1980-1998). [dissertação]. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2002.

Bittencourt JIM, Oliveira RM, Coutinho ZF. Paracoccidioidomycosis mortality in the State of Paraná, Brazil, 1980/1998. Cad. Saúde Pública. 2005; 21(6): 1856-1864.

Blotta MHSL, Mamoni RL, Oliveira SJ, Nouér SA, Papaiordanou PMO, Gouveia 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): 390-394.

Blotta MHSL, Camargo ZP. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis. J Clin Microbiol. 1993; 31(3): 671-676.

Blumer SO, Jalbert M, Kaufman L. Rapid and reliable method for production of a specific *Paracoccidioides brasiliensis* immunodiffusion test antigen. J Clin Microbiol. 1984; 19(3): 404-407.

Botteon FAG, Camargo ZP, Benard G; Coelho RF, Chamone DAF, Itano EN. *Paracoccidioides brasiliensis*-reactive antibodies in brazilian blood donors. *Med Mycol.* 2002; 40(4): 387-391.

Bracca A, Tosello ME, Girardini JE, Amigot SL, Gomez C, Serra E. Molecular detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* in human clinical samples. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(4): 1753-1755.

Bradley G, Pine L, Reeves MW, Moss CW. Purification, composition, and serological characterization of histoplasmin-H and M antigens. *Infect and Immun.* 1974; 9(5): 870-880.

Brasil. Ministério de Estado da Saúde. Portaria n. 1.339, de 18 de novembro de 1999. Recomenda ao Ministério da Saúde a publicação da Lista de Doenças relacionadas ao Trabalho e salienta a importância da definição do perfil nosológico da população trabalhadora para o estabelecimento de políticas públicas no campo da saúde do trabalhador. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 18 nov. 1999.

Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an Update. *Clin Microbiol Rev.* 1993; 6(2): 89-117.

Burgos LC, Cano LE, Restrepo A. Purification of somatic antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*. Preliminary study. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1985; 27(2): 76-81.

Bustamante-Simon B, McEwen JG, Tabares AM, Arango M, Restrepo-Moreno A. Characteristics of the conidia produced by the mycelial form of *paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia.* 1985; 23(6): 407-414.

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): 1733-1736.

Calich VL, da Costa TA, Felonato M, Arruda C, Bernardino S, Loures FV, et al. Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. Mycopathologia. 2008; 165(4-5): 223-236.

Calle D, Rosero DS, Orozco LC, Camargo D, Castañeda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis in Colombia: an ecological study. Epidemiol Infect. 2001; 126(2): 309-315.

Camargo ZP. Serology of paracoccidioidomycosis. Mycopathologia. 2008; 165(4-5): 289-302.

Camargo ZP, Berzaghi R, Amaral CC, Silva SH. Simplified method for producing *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for use in immunodiffusion tests. Med Mycol. 2003; 41(6): 539-542.

Camargo ZP, Guesdon JL, Drouhet E, Improvisi L. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the paracoccidioidomycosis. Comparison with counterimmunoelectrophoresis and erythro-immunoassay. Mycopathol. 1984; 88(1): 31-37.

Camargo ZP, Gesztesi JL, Saraiva ECO, Taborda CP, Vicentini AP, Lopes JD. Monoclonal antibody capture enzyme immunoassay for detection of *Paracoccidioides brasiliensis* antibodies in paracoccidioidomycosis. J Clin Microbiol. 1994; 32(10): 2377-2381.

Camargo ZP, Taborda CP, Rodrigues EG, Travassos LR. The use of cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests. J Med Vet Mycol. 1991; 29(1): 31-38.

Camargo ZP, Unterkircher C, Campoy SP, Travassos LR. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. J Clin Microbiol. 1988; 26(10): 2147-2151.

Camargo ZP, Unterkircher C, Travassos LR. Identification of antigenic polypeptides of *Paracoccidioides brasiliensis* by immunoblotting. J Med Vet Mycol. 1989; 27(6): 407-12.

Campos MC, Gesztesi JL, Vicentini AP, Lopes JD, Camargo ZP. Expression and isoforms of gp43 in different strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. J Med Vet Mycol. 1995; 33(4): 223-227.

Campos MVS, Penna GO, Castro CN, Moraes MAP, Ferreira MS, Santos JB. Paracoccidioidomycose no Hospital Universitário de Brasília. Rev Soc Bras Med Trop. 2008; 41(2): 169-172.

Cano LE, Brummer E, Stevens DA, Restrepo A. An evaluation of the enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) for quantitation of antibodies to *Paracoccidioides brasiliensis*. J Med Vet Mycol. 1986; 24(6): 467-475.

Cano LE, Restrepo A. Predictive value of serologic tests in the diagnosis and follow-up of patients with paracoccidioidomycosis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1987; 29(5): 276-283.

Carrero LL, Niño-Vega G, Teixeira MM, Carvalho MJA, Soares CMA, Pereira M, et al. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. Fungal Genet Biol. 2008; 45(5): 605-612.

Casotti JAS, Motta TQR, Ferreira Jr CUG, Cerutti Jr C. Disseminated histoplasmosis in HIV positive patients in Espírito Santo State, Brazil: a

clinical-laboratory study of 12 cases (1999-2001). *Bras J Inf Dis*. 2006; 10(5): 327-330.

Chandrashekar R, Curtis KC, Rawot BW, Kobayashi GJ, Weil GS. Molecular cloning and characterization of a recombinant *Histoplasma capsulatum* antigen for antibody-based diagnosis of human histoplasmosis. *J Clin Microbiol*. 1997; 35(5): 1071-1076.

Chang MR, Taira CL, Paniago AMM, Taira DL, Cunha RV, Wanke B. Study of 30 cases of histoplasmosis observed in Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2007; 49(1): 37-39.

Charbel CE, Levi JE, Martins JEC. Evaluation of polymerase chain reaction for the detection of *Paracoccidioides brasiliensis* DNA on serum samples from patients with paracoccidioidomycosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006; 101(2): 219-221.

Chemaly RF, Tomford JW, Hall GS, Sholtis M, Chua JD, Procop GW. Rapid diagnosis of *Histoplasma capsulatum* endocarditis using the AccuProbe on an excised valve. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(7): 2640-2641.

Colombo AL, Tobón A, Restrepo A, Queiroz-Telles F, Nucci M. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. *Med Mycol*. [artigo na internet]. 2011; Early Online: 1-14. [acesso em: 26 mai 2011]. Disponível em: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/13693786.2011.577821>

Coutinho ZF, Silva D, Lazera M, Petri V, Oliveira RM, Sabroza PC, et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saude Publica*. 2002; 18(5): 1441-1454.

Cunha MA, Marques SA, Mendes RP, et al. Resposta de anticorpos avaliada por *Western-Blott* na paracoccidioidomicose antes e após a terapia. In:

Encuentro Internacional Sobre Paracoccidioidomicosis, Buenos Aires, 1992.
Rev Arg Micol. 1992; 15: 58.

Cury GC, Diniz Filho A, Cruz AGC, Hobaika ABS. Outbreak of histoplasmosis in Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2001; 34(5): 483-486.

Da Silva DF, Assis CM, Zamboni IM, Kloth VR, Vicentini AP. Estudo da estabilidade antigênica de *Paracoccidioides brasiliensis*. Rev Inst Adolfo Lutz, 2001; 60: 138.

De Camargo ZP, de Franco MF. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. Rev Iberoam Micol. 2000; 17(2): 41-48.

Del Negro GM, Benard G, de Assis CM, Vidal MS, Garcia NM, Otani C, et al. Lack of reactivity of Paracoccidioidomycosis sera in the double immunodiffusion test with the gp43 antigen: report of two cases. J Med Vet Mycol. 1995; 33(2): 113-116.

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 Sao Paulo. 1991; 33(4): 277-280.

Di Salvo AF, Sekhon A S, Land G A, Fleming WH. Evaluation of the exoantigen test for identification of *Histoplasma* species and *Coccidioides immitis* cultures. J Clin Microbiol. 1980,11(3): 238-41.

Diez 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): 1536-1542.

Do 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. 2001; 39(4): 373-377.

Ehrhard HB, Pine L. Factor influencing the production of H and M antigens by *Histoplasma capsulatum*: development and evaluation of shake culture. Appl Microbiol. 1972a, 23(2): 236-249.

Ehrhard HB, Pine L. Factor influencing the production of H and M antigens by *Histoplasma capsulatum*: effect of physical factors and composition of medium. Appl Microbiol. 1972b; 23(2): 250-261.

Eissenberg LG, Goldman WE. *Histoplasma* variation and adaptive strategies for parasitism: new perspectives on histoplasmosis. Clin Microbiol Rev. 1991; 4(4): 411-421.

Elias-Costa MR, da Silva Lacaz C, Kawasaki M, de Camargo ZP. Conventional versus molecular diagnostic tests. Med Mycol. 2000; 38 (suppl.1): 139-145.

Fava SDC, Fava Netto C. Epidemiologic surveys of histoplasmin and paracoccidioidin sensitivity in Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1998; 40(3): 155-164.

Fava Netto C. Durabilidade do antígeno polissacarídeo de *Paracoccidioides brasiliensis*. Rev Microbiol. 1984; 15(1): 27-32.

Fava Netto C, Vegas VS, Sciannamèa IM, Guarnieri DB. Antígeno polissacarídeo do *Paracoccidioides brasiliensis*. Estudo do tempo de cultivo

do *Paracoccidoides brasiliensis*, necessário ao preparo do antígeno. Rev Inst Adolfo Lutz. 1969; 11: 177-181.

Ferreira MS, Borges AS. Histoplasmose. Rev Soc Bras Med Trop. 2009; 42(2): 192-198.

Ferreira AW, Ávila SLM. Sorologia: Importância e Parâmetros. In: Ferreira AW, Ávila SLM. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2001. p.1-8

Ferreira-da-Cruz MF, Francesconi-do-Vale AC, Espinera MC, Wanke B, Galvao-Castro B. Study of antibodies in paracoccidioidomycosis: follow-up of patients during and after treatment. J Med Vet Mycol. 1990; 28(2):151-157.

Fornajeiro N, Maluf MLF, Takahachi G, Svidzinski, TIE. Inquérito epidemiológico sobre a paracoccidioidomicose utilizando a gp43 em dois municípios do noroeste do Paraná, Brasil. Rev Soc Bras Med Trop. 2005; 38(2): 191-193.

Fraga CLV. Análise comparativa das variações morfológicas entre dois diferentes isolados (Pb01 e Pb18) do fungo *P. brasiliensis* e da sua interação com o sistema imune do hospedeiro. [dissertação]. Brasília: Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília; 2008.

Franco M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. J Med Vet Mycol. 1987;25(1): 5-18.

Franco M, Mendes RP, Moscardi-Bacchi M, Rezkallah-Iwasso M, Montenegro MRG. Paracoccidioidomycosis. Bailliere's Clinical Tropical Medicine and Communicable Diseases. 1989.

Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques SA, Dillon NL, Mota NG. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of this clinical forms. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1987; 20(2): 129-132.

Freitas RS. Caracterização fenotípica e padronização de antígenos de *H. capsulatum* var. *capsulatum* para o diagnóstico da histoplasmose. [dissertação]. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 2005.

Freitas RS, Carvalho-Vivi JO, Zamboni IM, Assis CM, Costa-Martins JE, Vicentini-Moreira AP. The importance of serological assays in diagnosing acute pulmonary histoplasmosis. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2009; 15(2): 278-288.

Fressatti R, Dias-Siqueira VL, Svidzinski TI, Herrero F, Kimmelmeier C. A medium for inducing conversion of *Histoplasma capsulatum* var *capsulatum* into its yeast-like form. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1992, 87(1): 53-58.

Garcia NM, Assis CM, Del Negro GMB, Aguiar MSMV, Lacaz CS. Análises imunológica de antígeno metabólico de *P. brasiliensis*. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1993; 35(10 supl): 70.

Giannini MJ, Bueno JP, Shikanai-Yasuda MA, Stolf AM, Masuda A, Amato Neto V, et al. Antibody response to the 43kDa glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* as a marker for the evaluation of patients under treatment. *Am J Trop Med Hyg*. 1990; 43(2): 200–206.

Godoy H, Reichart PA. Oral manifestations of paracoccidioidomycosis. Report of 21 cases from Argentina. *Mycoses*. 2003; 46(9-10): 412-417.

Goldani LZ, Sugar AM. Short report: use of the polymerase chain reaction to detect *Paracoccidioides brasiliensis* in murine paracoccidioidomycosis. Am J Trop Med Hyg. 1998; 58(2): 152-153.

Goldman M. Histoplasmosis: a treatment update. Curr Opin Infect Dis. 1994; 7(6): 667-669.

Gomes GM, Cisalpino PS, Taborda CP, de Camargo ZP. PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. J Clin Microbiol. 2000; 38(9): 3478-3480.

Gomez BL, Figueroa JI, Hamilton AJ, Diez S, Rojas KM, Tobon AM, et al. Antigenemia in patients with paracoccidioidomycosis detection of the 87-kilodalton determinant during and after antifungal therapy. J Clin Microbiol. 1998; 36(11): 3309-3316.

Gomez BL, Figueroa JI, Hamilton AJ, Ortiz B, Robledo MA, Restrepo A, et al. Development of a novel antigen detection test for histoplasmosis. J Clin Microbiol. 1997; 35(10): 2618-2622.

Goodwin RA, Loyd JE, Des Prez RM. Histoplasmosis in normal hosts. Medicine (Baltimore). 1981; 60(4): 231-266.

Goodwin RA Jr, Des Prez RM. State of the art: histoplasmosis. Am Rev Respir Dis. 1978; 117(5): 929-956.

Goodwin RA Jr, Shapiro JL, Thurman GH, Thurman SS, Des Prez RM. Disseminated histoplasmosis: clinical and pathologic correlation. Medicine (Baltimore). 1980; 59(1): 1-33.

Green JH, Pine L. Preparation of H and M antigens of *Histoplasma capsulatum* free of heterologous antigens. Curr Microbiol. 1985; 12(4): 209-215.

Gross H; Bradley G; Pine L; Gray S; Green JH, Harrell WK. Evaluation of histoplasmin for the presence of H and M antigens: some difficulties encountered in the production and evaluation of a product suitable for the immunodiffusion test. J Clin Microbiol. 1975; 1(3): 330-334.

Guedes HL, Guimarães AJ, Muniz MM, Pizzini CV, Hamilton AJ, Peralta JM, et al. PCR assay for identification of *Histoplasma capsulatum* based on the nucleotide sequence of the M antigen. J Clin Microbiol. 2003, 41(2): 535-539.

Guimarães AJ, Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira RM. Diagnosis of histoplasmosis. Braz J Microbiol. 2006; 37(1): 1-13.

Hahn RC, Macedo AM, Fontes CJF, Batista RD, Santos NL, Hamdan JS. Randomly amplified polymorphic DNA as a valuable tool for epidemiological studies of *Paracoccidioides brasiliensis*. J Clin Microbiol. 2003; 41(7): 2849-2854.

Hamilton AJ, Bartholomew MA, Figueroa J, Fenelon LE, Hay RJ. Evidence that the M antigen of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* is a catalase, which exhibits cross-reactivity with other dimorphic fungi. J Med Vet Mycol. 1990; 28(6): 479-485.

Hamilton AJ, Gómez BL. The application of monoclonal antibodies to the diagnosis of disseminated mycoses. Rev Iberoam Micol. 1998; 15: 118-124.

Harris JE, Deepe Jr GS. Characterization of antigenic determinants in histoplasmin that stimulate *Histoplasma capsulatum* reactive T cells in vitro. Infect Immun. 1988, 56(9): 2343-2349.

Heiner DC. Diagnosis of histoplasmosis using precipitin reaction in agar gel. Pediatric. 1958; 22(4 Part 1): 616-627.

Hopwood V, Evans EG. Serological tests in the diagnosis and prognosis of fungal infection in the compromised patient. In: Warnock DW, Richardson MD.eds. Fungal Infection in the Compromised Patient. 1991. p. 312-340.

Hotez PJ, Bottazzi ME, Franco-Paredes C, Ault SK, Periago MR. The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. PLoS Negl Trop Dis [periódico na internet]. 2008; 2(9): e300. [acesso em 03 fev 2011]. Disponível em <http://www.plosntds.org>.

Huffnagle KE, Gander RM. Evaluation of Gen-Probe's *Histoplasma capsulatum* and *Cryptococcus neoformans* AccuProbes. J Clin Microbiol. 1993; 31(2): 419-421.

Kamikawa CM. Distribuição da paracoccidioidomicose no Estado de São Paulo pela avaliação sorológica das amostras enviadas ao Instituto Adolfo Lutz. [monografia]. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz – Secretaria de Estado da Saúde; 2011.

Kasuga T, White TJ, Koenig G, McEwen J, Restrepo A, Castañeda E, et al. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. Mol Ecol. 2003; 12(12): 3383-3401.

Kauffman CA. Histoplasmosis. Curr Treat Op Infect Dis. 2000; 2: 487-491.

Kauffmann CA. Histoplasmosis: a Clinical and Laboratory Update. Clin Microbiol Rev. 2007; 20(1): 115-132.

Kaufman ED, Standard P. Fungal exoantigens. In Drouhet E, Cole GT, Repentigny L, Latge JP, Dupont B. eds. Fungal antigens. Isolation,

purification and detection. New York and London: Plenum Press; 1988. p.111-112.

Kaufman L, Standard P. Improved version of the exoantigen test for identification of *Coccidioides immitis* and *Histoplasma capsulatum* cultures. J Clin Microbiol. 1978; 8(1): 42-45.

Kleger B, Kaufman L. Detection and identification of diagnostic *Histoplasma capsulatum* precipitates by counterelectrophoresis. Appl Microbiol. 1973; 26(3): 231-238.

Kloth VR, Matano G, Zamboni IM, da Silva DF, Fazioli RA, Vicentini AP. Aplicação de antígenos solúveis (Ags S) de *Paracoccidioides brasiliensis* na rotina diagnóstica da paracoccidioidomicose. Rev Inst Adolfo Lutz. 2001; 60 (suppl. 1): 139.

Kohara VS, Barreto LC, Freitas RS, Anjos DT, Assis CM, Vicentini-Moreira AP. Emprego da técnica de immunoblotting para detecção de anticorpos circulantes anti *Histoplasma capsulatum*. In: VII Encontro do Instituto Adolfo Lutz; 2007; São Paulo, Brasil.

Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Histoplasmosis. Medical Micology. Philadelphia: Lea & Febiger; 1992.

Kurokawa CS, Sugizaki MF, Peraçoli MT. Virulence factors in fungi of systemic mycoses. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1998; 40(3): 125-135.

Lacaz CS, Del Negro GMB, Vidal MSM, Heins-Vaccari EM, Santos RF, Martins MA, et al. Atypical disseminated cutaneous histoplasmosis in an immunocompetent child, caused by an "aberrant" variant of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1999; 41(3): 195-202.

Lacaz CS, Passos Filho MCR, Fava-Netti C, Macarron R. Contribuição para o estudo da blastomicose-infecção: inquérito com paracoccidioidina. Estudo sorológico e clínico radiológico dos paracoccidioidino-positivos. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1959; 1(4): 245-259.

Lacaz CS, Porto E, Heins-Vaccari EM, Melo NT. Guia de Identificação: fungos, algas, actinomicetos de interesse médico. São Paulo: Savier e FAPESP; 1998.

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari E, Melo NT. Tratado de Micologia Médica Lacaz. São Paulo: Sarvier; 2002.

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC. Micologia Médica. 7. ed. São Paulo: Sarvier; 1984.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227(5259): 680-685.

Leimann BCQ, Pizzini CV, Muniz MM, Albuquerque PC, Monteiro PCF, Reis RS, et al. Histoplasmosis in a Brazilian center: clinical forms and laboratory tests. Rev Iberoam Micol. 2005; 22(3): 141-146.

Lima HCAV, Barrado JCS, Rocha S, Muniz MV, Braga FF, Millington A, et al. Investigação de surto de histoplasmosse após curso de captura de morcegos hematófagos, Cáceres - Mato Grosso, 2007. In: Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. 8ª Expoepi: mostra nacional de experiências bem-sucedidas em epidemiologia, prevenção e controle de doenças: anais / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2008. 144 p. – (Série D. Reuniões e Conferências). p.141.

Londero AT. Epidemiologia. In: Del Negro G, Lacaz CS, Fiorillo A. Paracoccidioidomicose (Blastomicose sul-americana). São Paulo: Sarvier-Edusp; 1982.

Londero AT, Ramos CD. The status of histoplasmosis in Brazil. *Mycopathologia*. 1978; 64(3): 153-156.

Maluf MLF, Pereira SRC, Takahachi G, Svidzinski 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.

Mamoni RL, Nouer SA, Oliveira SJ, Musatti CC, Rossi CL, Camargo ZP, et al. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF- β in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. *Med. Mycol*. 2002; 40(2): 153–159.

Mangiaterra M, Alonso J, Galvan M, Giusiano G, Gorodner J. Histoplasmin and paracoccidioidin skin reactivity infantile population of northern Argentina. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1996; 38(5): 349-353.

Marques SA, Conterno LO, Sgarbi LP, Villagra AM, Sabongi VP, Bagatin F, et al. Paracoccidioidomycosis associated with acquired immunodeficiency syndrome. Report of seven cases. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1995; 37(3): 261-265.

Marques SA. Paracoccidioidomicose: estudo e aspectos clínicos no Departamento de Dermatologia da Escola de Medicina de Botucatu (São Paulo – Brasil). *An Bras Dermatol*. 1998; 73(5): 455-469.

Marques SA, Franco MF, Mendes RP, Silva NC, Baccili C, Curcelli ED, et al. Epidemiologic aspects of paracoccidioidomycosis in the endemic area of

Botucatu (São Paulo - Brazil). Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1983; 25(2): 87-92.

Marques SA, Robles AM, Tortorano AM, Tuculet MA, Negroni R, Mendes RP. Mycoses associated with AIDS in the Third World. Med Mycol. 2000; 38 (suppl 1): 269-279.

Marques SA, Shikanai-Yasuda MA. Paracoccidioidomycosis associated with immunosuppression, AIDS and cancer. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, editores. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton, Flórida, USA: CRC Press; 1994. p. 393-405.

Marques-da-Silva SH, Colombo AL, Blotta MHSL, Lopes JD, Queiroz-Telles F, Camargo ZP. Detection of circulating gp43 antigen in serum, cerebrospinal fluid, and bronchoalveolar lavage fluid of patients with paracoccidioidomycosis. J Clin Microbiol. 2003; 41(8): 3675-3680.

Marques-da-Silva SH, Mattos Grosso D, Lopes JD, Colombo AL, Blotta MHSL, Queiroz-Telles F, et al. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* gp70 circulating antigen and follow-up of patients undergoing antimycotic therapy. J Clin Microbiol. 2004; 42(10): 4480-4486.

Martins R, Marques S, Alves M, Fecchio D, Franco MF. Serological follow-up of patients with paracoccidioidomycosis treated with itraconazole using Dot-blot, ELISA and western-blot. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1997; 39(5): 261–269.

Martinez R. Paracoccidioidomycosis: the dimension of the problem of a neglected disease. [carta ao editor]. Rev Soc Bras Med Trop. 2010; 43(4): 480.

Martinez R. The clinical and epidemiological features of paracoccidioidomycosis in the southeast of Brazil: report of a cohort of 1000 patients. In: Program & abstract Book of PCM 2011 – XI International Meeting on Paracoccidioidomycosis; 03 May 2011; Taubaté, Sao Paulo. Brazil; 2011. p.33.

Martinez R, Moya MJ. Associação entre paracoccidioidomicose e alcoolismo. Rev. Saude Pública 1992; 26(1): 12-16.

Mato Grosso do Sul. Secretaria Estadual da Saúde. Resolução n° 693/SES/MS de 12 de dezembro de 2005. Dispõe sobre a obrigatoriedade de Notificação Compulsória de Doenças e Agravos. SESMS [documento na internet], Campo Grande, 2005. [acesso em 3 nov 2009]. Disponível em: <http://www.saude.ms.gov.br>.

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): 6534-6542.

McEwen JG, Bedoya V, Patiño MM, Salazar ME, Restrepo A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. J Med Vet Mycol. 1987; 25(3): 165-175.

McKinney MM, Parkinson A. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid. J Immunol Methods. 1987; 96(2): 271-278.

Mendes RP. Paracoccidioidomycosis surveillance and control. J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis. 2010; 16(2): 194-197.

Mendes RP. The Gamut of clinical manifestation. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo A. Del Negro G. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton, Flórida, USA: CRC Press; 1994.

Mendes-Giannini MJS, Bueno JP, Shikanai-Yasuda MA, Ferreira AW, Masuda A. Detection of the 43,000-molecular-weight glycoprotein in sera of patients with paracoccidioidomycosis. J Clin Microbiol. 1989; 27(12): 2842-2845.

Mendes-Giannini MJS, Camargo ME, Lacaz CS, Ferreira AW. Immunoenzymatic absorption test for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. J Clin Microbiol. 1984; 20(1): 103-108.

Mendes-Giannini MJS, Del Negro GB, Siqueira AM. Serodiagnosis. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo A. Del Negro G. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton, Flórida, USA: CRC Press; 1994.

Mendes-Giannini MJS, Melhem MSC. Infecções fúngicas. In: Ferreira AW, Ávila SLM. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2001. p.334-403.

Minas Gerais. Secretaria de Estado de Saúde. Resolução SES nº 1481 de 16 de maio de 2008. Acrescenta agravos estaduais a Lista Nacional de Doenças de Notificação Compulsória e dá outras providências. [documento na internet], 2008. [acesso em 13 dez 2010]. Disponível em: http://www.saude.mg.gov.br/atos_normativos/resolucoes/2008/resolucao_1481.pdf/view

Ministério da Saúde (MS). Textos básicos de saúde – Doenças infecciosas e parasitárias. Guia de Bolso. Brasília, 2010.

Molinari-Madlum EE, Felipe MS, Soares CM. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates can be correlated to groups defined by random amplified polymorphic DNA analysis. *Med Mycol.* 1999; 37(4): 269–276.

Moreto TC. Diagnóstico da paracoccidioidomicose em pacientes atendidos em serviços de rotina de hospital universitário [dissertação]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Medicina de Botucatu; 2010.

Moreto TC, Vicentini-Moreira AP, Passos AN, Kohara VS, Carvalho LR, Mendes RP. Serological diagnosis of paracoccidioidomycosis: Evaluation of negative serum samples on immunodiffusion test from patients with confirmed disease. In: Proceedings of the X International Congress on Paracoccidioidomycosis. A Centennial Celebration; 2008 aug 7-10; Medellín, Colombia. Bogotá: Biomédica Rev Inst Nac Salud; 2008; 28(supl.1): 155.

Negrón R. Micoses associadas a SIDA (parte 2). *Academia Biom. Digital.* 2001.

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-affinity immunoglobulin G2 antibodies directed against carbohydrate epitopes. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003; 10(5): 802-807.

Niño-Vega GA, Calcagno AM, San-Blas G, San-Blas F, Gooday GW, Gow NA. RFLP analysis reveals marked geographical isolation between strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol.* 2000; 38(6): 437-441.

Nogueira MGS, Andrade GMQ, Tonelli E. Clinical evolution of paracoccidioidomycosis in 38 children and teenagers. *Mycopathologia.* 2006; 161(2): 73-81.

Oliveira CA, Mendes ME, org. Gestão da fase analítica do laboratório: como assegurar a qualidade na prática. 1ed. Rio de Janeiro: ControlLab, 2010.

Oliveira FM, Unis G, Severo LC. Microepidemia de histoplasmose em Blumenau, Santa Catarina. [relato de caso] J Bras Pneumol. 2006; 32(4): 375-378.

Ono MA. Contribuição ao estudo da eco-epidemiologia do *Paracoccidioides brasiliensis*. [dissertação]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2000.

Ortega G, Villanueva E, Pereira J, Salma N, de Albornoz MB. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* antigens. Serological immunodiagnosis using western blotting. Acta Cient Venez. 1992; 43(6): 355-359.

Ouchterlony, O. Antigen-antibody reactions in gels. Acta Pathol Microbiol Scand. 1949; 26(4): 507-515.

Padilha-Gonçalves A. Paracoccidioidomicose: quadro clínico como expressão da imunopatologia. An Bras Dermatol. 1996; 71: 437-440.

Panackal AA, Hajjeh RA, Cetron MS, Warnock DW. Fungal infections among returning travelers. Clin Infect Dis. 2002; 35(9): 1088-1095.

Paniago AMM, Aguiar JIA, Aguiar ES, Cunha RV, Pereira GROL, Londero AT, et al. Paracoccidioidomicose: estudo clínico e epidemiológico de 422 casos observados no Estado de Mato Grosso do Sul. Rev Soc Bras Med Trop. 2003; 36(4): 455-459.

Paniago AMM, de Freitas AC, Aguiar ES, Aguiar JIA, da Cunha RV, Castro AR, et al. Paracoccidioidomycosis in patients with human immunodeficiency

vírus: review of 12 cases observed in na endemic regions in Brazil. J Infect. 2005; 51(3): 248-252.

Passos AN. Histoplasmose pulmonar aguda: relato de uma microepidemia diagnosticada por métodos imunológicos. [monografia]. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz – Secretaria de Estado da Saúde; 2009.

Passos AN, Kohara VS, Kamikawa CM, Barreto LC, Vicentini AP. Performance evaluation of two immunological assays for the diagnosis of acute pulmonary histoplasmosis. In: PCM 2011 – XI International Meeting on Paracoccidioidomycosis; May 1-4 2011; Taubaté, Sao Paulo. Brazil; 2011.

Pine L, Boone CJ, McLaughlin D. Antigenic properties of the wall and other fractions of the yeast form of *Histoplasma capsulatum*. J Bacteriol. 1966; 91(6): 2158-2168.

Pizzini CV, Zancopé-Oliveira RM, Reiss E, Hajjeh R, Kaufman L, Peralta JM. Evaluation of a western blot test in an outbreak of acute pulmonary histoplasmosis. Clin Diagn Lab Immunol. 1999; 6(1): 20-23.

Pontón J. Diagnóstico microbiológico de las micosis. Rev Iberoam Micol. 2002; 19: 25-29.

Prado M, Silva MB, Laurenti R, Travassos LR, Taborda CP. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009; 104(3): 513-521.

Puccia R, Schenkman S, Gorin PAJ, Travassos LR. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. Infect Immun. 1986; 53(1): 199-206.

Puccia R, Travassos LR. 43-kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, or Jorge Lobo's disease. J Clin Microbiol. 1991; 29(8): 1610-1615.

Quagliato Jr R, Grangeia TAG, Massucio RAC, de Capitani EM, Rezende SM, Balthazar AB. Associação entre paracoccidioidomicose e tuberculose: realidade e erro diagnóstico. J Bras Pneumol. 2007; 33(3): 295-300.

Reeves MW, Pine L, Kaufman L, McLaughlin D. Isolation of a new soluble antigen from the yeast phase of *Histoplasma capsulatum*. Appl Microbiol. 1972; 24(5): 841-843.

Reiss E, Knowles JB, Bragg SL, Kaufman L. Monoclonal antibodies against the M-protein and carbohydrate antigens of histoplasmin characterized by the enzyme-linked immunotransfer blot. Infect Immun. 1986, 53(3): 540-546.

Restrepo A. La prueba de inmunodifusión en el diagnóstico de la paracoccidioidomycosis. Sabouraudia. 1966; 4(4): 223-230.

Restrepo A. Morphological aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* in lymph nodes: implications for the prolonged latency of paracoccidioidomycosis? Med Mycol. 2000; 38(4): 317-322.

Restrepo A. Report of activities of the committee on paracoccidioidomycosis serodiagnosis. ISHAM Myc Newsletter. 1992; 59: 4.

Restrepo A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: A puzzle still unsolved. Sabouraudia. 1985; 23(5): 323-334.

Restrepo A, Cano LE, Ochoa MT. A yeast – derived antigen from *Paracoccidioides brasiliensis* useful for serological testing. *Sabouraudia*. 1985; 23(1): 23-29.

Restrepo A, McEwen JG, Castañeda E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol*. 2001; 39(3): 233-241.

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.

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. *Infect Immun*. 1984; 46(2): 346-353.

Rickerts V, Bialek R, Tintelnot K, Jacobi V, Just-Nubling G. Rapid PCR-based diagnosis of disseminated histoplasmosis in an AIDS patient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2002; 21(11): 821-823.

Ríncon GC. *Micología General*. Universidad Central de Venezuela. Edición de la Biblioteca. Caracas, 1989.

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), SP. [tese]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Medicina de Botucatu; 2004.

Sandhu GS, Kline BC, Stockman L, Roberts GD. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *J Clin Microbiol*. 1995; 33(11): 2913-2919.

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): 313-324.

Santos WA, Silva BM, Passos ED, Zandonade E, Falqueto A. Associação entre tabagismo e paracoccidioidomicose: um estudo de caso-controle no Estado do Espírito Santo, Brasil. Cad. Saude Pública. 2003; 19(1): 245-253.

Secretaria de Estado da Saúde (SES). Coordenadoria de Controle de Doenças. Centro de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância Epidemiológica da Paracoccidioidomicose. São Paulo, 2008.

Severo LC, Oliveira FM, Irion K, Porto NS, Londero AT. Histoplasmosis in Rio Grande do Sul, Brazil: a 21-year experience. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2001; 43(4): 183-187.

Shankar J, Restrepo A, Clemons KV, Stevens DA. Hormones and the resistance of women to paracoccidioidomycosis. Clin Microbiol Rev. 2011; 24(2): 296-313.

Shikanai-Yasuda MA, Queiroz-Telles F, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML et al. Consenso em paracoccidioidomicose. [relatório técnico]. Rev Soc Bras Med Trop. 2006; 39(3): 297-310.

Sidrim JJC, Oliveira FGM. Micoses profundas. In: Sidrim JJC, Moreira JLB. Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. p. 161-162.

Silva DF. Análise da estabilidade de exoantígenos de *Paracoccidioides brasiliensis*. [dissertação]. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 2005.

Silva DF, Assis CM, Zamboni IM, Barreto LC, Kohara VS, Vicentini-Moreira AP. Use of immunoblotting assay improves the sensitivity of paracoccidioidomycosis diagnosis. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2008; 14(2): 313-321.

Silva RT, Teixeira AA, Falcão SNRS, Ravache LAT, Liberatori Filho AW, Sawicki WC, et al. Histoplasmosse disseminada. *Rev Bras Clin Terap*. 1999; 25: 244-247.

Silva-Vergara ML, Martinez R. Inquérito epidemiológico com paracoccidioidina e histoplasmina em área agrícola de café em Ibiá, Minas Gerais, Brasil. *Rev Iberoam Micol*. 1998; 15(4): 294-297.

Singer-Vermes LM, Caldeira CB, Burger E, Calich VLG. Experimental murine paracoccidioidomycosis: relationship among the dissemination of the infection, humoral and cellular immune responses. *Clin Exp Immunol*. 1993; 94(1): 75-79.

Siqueira AM. Avaliação da sensibilidade e especificidade de algumas provas sorológicas no diagnóstico, prognóstico e controle de cura da paracoccidioidomicose. Caracterização do antígeno E2 de *Paracoccidioides brasiliensis*. [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1982.

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]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Medicina de Botucatu, 2008.

Souza MC, Gesztesi JL, Souza AR, Moraes JZ, Lopes JD, Camargo ZP. Differences in reactivity of paracoccidioidomycosis sera with gp43 isoforms. *J Med Vet Mycol.* 1997; 35: 13-18.

Stambuk BU, Puccia R, de Almeida ML, Travassos LR, Schenkman S. Secretion of the 43 kDa glycoprotein antigen by *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol.* 1988; 26(6): 367-373.

Stover EP, Schar G, Clemons KV, Stevens DA, Feldman D. Estradiol-binding proteins from mycelial and yeast-form cultures of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect Immun.* 1986; 51(1): 199-203.

Suzuki E, Toledo MS, Takahashi HK, Straus AH. A monoclonal antibody directed to terminal residue of beta-galactofuranose of a glycolipid antigen isolated from *Paracoccidioides brasiliensis*: cross-reactivity with *Leishmania major* and *Trypanosoma cruzi*. *Glycobiology.* 1997; 7(4): 463–468.

Taborda CP, Camargo ZP. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by dot immunobinding assay for antibody detection using the purified and specific antigen gp43. *J Clin Microbiol* 1994; 32(2): 554–556.

Takahachi G, Guilhermetti E, Silva JA, Svidzinski TIE. Importância do western blott no diagnóstico seguro da Paracoccidioidomicose. In: VII Encontro Internacional sobre Paracoccidioidomicose; Campos do Jordão, São Paulo; 1999. p. 87.

Teixeira MM, Theodoro RC, Carvalho MJA, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol.* 2009; 52(2): 273-283.

Tobon AM, Agudelo CA, Rosero DS, Ochoa JE, De Bedout C, Zuluaga A, et al. Disseminated histoplasmosis: a comparative study between patients with

acquired immunodeficiency syndrome and non-human immunodeficiency virus–infected individuals. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2005; 73(3): 576–582.

Torres M, Diaz H, Herrera T, Sada E. Evaluation of enzyme linked immunosorbent-assay and western blot for diagnosis of histoplasmosis. *Rev Invest Clin.* 1993; 45(2): 155-160.

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.

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(3): 297-304.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979; 76(9): 4350-4354.

Unis G, Roesch EW, Severo LC. Histoplasmose pulmonar aguda no Rio Grande do Sul. *J Bras Pneumol.* 2005; 31(1): 52-59.

Unterkircher CS. Antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis* e sua aplicação no diagnóstico sorológico da paracoccidioidomicose [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 1988.

Verli FD, Marinho SA, Souza SC, Figueiredo MAS, Yurgel LS. Perfil clínico-epidemiológico dos pacientes portadores de paracoccidioidomicose no Serviço de Estomatologia do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005, 38(3): 234-237.

Vicentini, AP. Caracterização da glicoproteína de 43kDa de *Paracoccidioides brasiliensis* como proteína ligante de laminina e seu papel na patogenicidade fúngica. [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina; 1997.

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(4): 1465-1469.

Vicentini-Moreira AP. Paracoccidioidomicose: histórico, etiologia, epidemiologia, patogênese, formas clínicas, diagnóstico laboratorial e antígenos. 2008; 5(51): 11-24.

Vicentini-Moreira AP, Kohara VS, Passos AN, Feliciano RS, Barreto LC, Freitas RS, et al. Microepidemia de histoplasmose no município de Arapeí, São Paulo. *Bepa*. 2008; 5(58): 8-11.

Vidal MSM, Benard G, Brito T, Dantas KC, Pereira CN, França FOS, et al. Atypical serological response marked by a lack of detectable anti-gp43 antibodies in a patient with disseminated paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol*. 2005; 43(6): 3014-3016.

Wanke B. Histoplasmose. Estudo epidemiológico, clínico e experimental. [tese]. Rio de Janeiro: Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro; 1985.

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

Wanke B, Lazera MS, Capone D. Histoplasmose. In: Aidé MA, Cardoso AP, Rufino R, David F, Carvalho SR, Lucas VS, et al., editores. Pneumologia: aspectos práticos e atuais. Rio de Janeiro: Revinter; 2001. p. 152-157.

Wanke B, Londero AT. Epidemiology and Paracoccidioidomycosis Infection. In: Franco MF, Lacaz CS, Restrepo A, Del Negro G. editores. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton, Flórida, USA: CRC Press; 1994.

Wheat LJ. Current diagnosis of histoplasmosis. Trends Microbiol. 2003; 11(10): 488-494.

Wheat LJ. Diagnóstico Sorológico da Doença Fúngica. In: Sarosi GA, Davies SF, editors. Doenças Fúngicas do Pulmão. Rio de Janeiro: Revinter; 2001a. p.17-23.

Wheat LJ. Histoplasmosis: a review for clinicians from non-endemic areas. Mycoses. 2006; 49(4): 274–282

Wheat LJ. Laboratory diagnosis of histoplasmosis: update 2000. Semin Respir Infect. 2001b; 16(2): 131-140.

Wheat LJ, Connolly-Stringfield P, Blair R, Connolly K, Garringer T, Katz BP. Histoplasmosis relapse in patients with AIDS: detection using *Histoplasma capsulatum* variety *capsulatum* antigen levels. Ann Intern Med. 1991; 115(12): 936-941.

Wheat LJ, Connolly-Stringfield P, Williams B, Connolly K, Blair R, Bartlett M, et al. Diagnosis of histoplasmosis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome by detection of *Histoplasma capsulatum* polysaccharide antigen in bronchoalveolar lavage fluid. Am Rev Respir Dis. 1992; 145(6): 1421-1424.

Wheat LJ, Kohler RB, Tewari RP. Diagnosis of disseminated histoplasmosis by detection of *Histoplasma capsulatum* antigen in serum and urine specimens. N Engl J Med. 1986; 314(2): 83-88.

Wheat LJ, Slama TG, Norton JA, Kohler RB, Eitzen HE, French ML, et al. Risk factors for disseminated or fatal histoplasmosis. Analysis of a large urban outbreak. Ann Intern Med. 1982; 96(2):159–163.

Wu-Hsieh B, Howard DH. Histoplasmosis. In: Cox R A, editor. Immunology of the fungal diseases. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press; 1989. p.200-205.

Yarzabal LA. Anticuerpos precipitantes específicos de la blastomycosis sudamericana revelados por inmunolectroforesis. Rev Med Trop Sao Paulo. 1971; 13(5): 320-327.

Yeo SF, Wong B. Current status of nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. Clin Microbiol Rev. 2002; 15(3): 465-484.

Zancopé-Oliveira RM, Bragg SL, Hurst SF, Peralta JM, Reiss E. Evaluation of cation exchange chromatography for the isolation of M glycoprotein from histoplasmin. J Med Vet Mycol. 1993; 31(1): 29-41.

Zancopé-Oliveira RM, Bragg SA, Reiss E, Wanke B, Peralta JM. Effects of histoplasmin M antigen chemical and enzymatic deglycosylation on cross-reactivity in the enzyme-linked Immunolectrotransfer blot method. Clin Diag Lab Immunol. 1994; 1(4): 390-393.

Zancopé-Oliveira RM, Reiss E, Lott TJ, Mayer LW, Deepe Jr GS. Molecular cloning, characterization, and expression of the M antigen of *Histoplasma capsulatum*. Infect Immun. 1999; 67(4): 1947-1953.

Zancopé-Oliveira RM, Wanke B. Distribuição das fontes de infecção do *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* em Rio Prata – Município do Rio de Janeiro (RJ). Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1987; 29(4): 243-250.

Zancopé-Oliveira RM, Wanke B. Histoplasmose em escolares de área periurbana do Município do Rio de Janeiro. Rev Soc Bras Med Trop. 1986; 19 (supl): 100.

Zembruski MM, Bassanesi MC, Wagner LC, Severo LC. Inquérito intradérmico com histoplasmina e paracoccidioidina em duas regiões do Rio Grande do Sul. Rev Soc Bras Med Trop. 1996; 29(1): 1-3.

Zimmerman SE, Stringfield PC, Wheat LJ, French ML, Koller RB. Comparison of sandwich solid-phase radioimmunoassay and two enzyme-linked immunosorbent assays for detection of *Histoplasma capsulatum* polysaccharide antigen. J Infect Dis. 1989; 160: 678-685.

ANEXOS

ANEXO A - Ficha de dados de prontuários dos pacientes

DADOS GERAIS

NOME: _____ PRONTUÁRIO Nº: _____

SEXO: () M () F DATA DE NASCIMENTO: ____/____/____

ANTECEDENTES EPIDEMIOLÓGICOS

NATURAL DE: _____

RESIDÊNCIA ATUAL: _____

PROCEDÊNCIA REMOTA: _____

OCUPAÇÃO PROFISSIONAL: _____

HÁBITOS: () TABAGISMO () ETILISMO () OUTROS: _____

RISCO DE EXPOSIÇÃO (VISITA A CAVERNAS, RESIDÊNCIA/TRABALHO EM SÍTIOS, FAZENDAS, ETC). ESPECIFICAR: _____

INFORMAÇÕES CLÍNICAS

MICOSE: () PCM () HISTOPLASMOSE () OUTRAS: _____

FORMA CLÍNICA: () PCM AGUDA () PCM CRÔNICA () OUTRA: _____

() HP DISSEMINADA () HP PULMONAR AGUDA () HP CRÔNICA () OUTRA: _____

LOCAL DA LESÃO: _____

INÍCIO DOS SINTOMAS: _____

TRATAMENTO: _____

DURAÇÃO DO TRATAMENTO: _____

CO-MORBIDADE: () HIV () TB () OUTRAS: _____

DADOS LABORATORIAIS

() SOROLOGIA: _____

() ANÁTOMO-PATOLÓGICO: _____

() MICOLÓGICO: _____

() IMAGEM (RX/TC): _____

() INTRADERMOREAÇÃO: _____

OUTRAS INFORMAÇÕES RELEVANTES: _____

ANEXO B – Aprovações do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto Adolfo Lutz e Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Infectologia Emílio Ribas.



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ



Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos - CEPIAL
Av. Dr. Arnaldo, 355 – Sala 83 - Cerqueira César - 01246-902
Fone: 3068-2859

São Paulo, 07 de agosto de 2009.

Protocolo: 31/2009

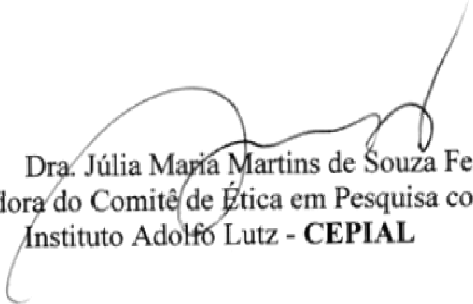
Projeto de Pesquisa n°: CCD-BM 27/2009 – Avaliação da aplicabilidade da técnica de Immunoblotting para a pesquisa de anticorpos circulantes anti-Paracoccidioides brasiliensis e anti-Histoplasma capsulatum em laboratório de Saúde Pública.

Pesquisador Responsável: Adriana Pardini Vicentini Moreira

Prezado Pesquisador:

O Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do Instituto Adolfo Lutz – CEPIAL analisou e deliberou em sua reunião ordinária de **03 de abril de 2009**, em concordância com a Resolução CNS 196/96 e suas resoluções complementares, o projeto acima apresentado e deliberou na condição de **APROVADO**.

Cabe lembrar que em conformidade à Resolução 196/96 são deveres de(a) pesquisador(a): **a)** comunicar de imediato, qualquer alteração do projeto e só prosseguir com essa alteração, depois da manifestação do CEPIAL; **b)** manter sob sua guarda e em local seguro, pelo prazo de 5 anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEPIAL, no caso de eventual auditoria; **c)** comunicar formalmente a este Comitê, quando do encerramento deste projeto; **d)** elaborar e apresentar relatórios parciais e finais; **e)** justificar perante o CEPIAL, a interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.


Dra. Júlia Maria Martins de Souza Felippe
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
Instituto Adolfo Lutz - CEPIAL

ANEXO B – Aprovações do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto Adolfo Lutz e Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Infectologia Emílio Ribas.



**COORDENADORIA DOS SERVIÇOS DE SAÚDE
INSTITUTO DE INFECTOLOGIA "EMILIO RIBAS"**

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Av. Dr. Arnaldo, 165 - Cerqueira César - São Paulo - SP

CEP: 01246-900 – TEL: 3896-1406

E-mail: comitedeetica-lier@ig.com.br

PARECER

PROTOCOLO DE PESQUISA N.º 48/11

PARECER N.º 296/2011

Data: 06/10/2011

Título da Pesquisa: "Avaliação da aplicabilidade da técnica de immublotting para pesquisa de anticorpos anti-Paracoccidioides brasiliensis e anti-Hitoplasma capsulatum em laboratório de Saúde Pública"

Investigador Principal: Marcos Vinícius da Silva

Autor Principal: Angela Noronha Passos

CONSIDERAÇÕES: O Comitê de Ética em Pesquisa considera respondidas as pendências do parecer anterior e Aprova o estudo.

APROVADO

REPROVADO

COM PENDÊNCIAS- OBS.: a ausência de resposta em 60 dias, acarretará em arquivamento do processo por falta de interesse do pesquisador.

TEMÁTICA ESPECIAL

SIM NÃO

CONEP

SIM NÃO

SVS (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA) SIM NÃO


- Dra. Anna Christina Nunes D'Ambrosio
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisas - I.I.E.R

ANEXO C - Otimização do ensaio de *immunoblotting* para pesquisa de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis*

O protocolo de otimização do ensaio de *immunoblotting* visando o imunodiagnóstico da PCM foi desenvolvido de tal forma que cada parâmetro fosse individualmente avaliado e modificado, quando necessário, a partir do protocolo de referência descrito no **capítulo 3.6** deste estudo. Após a avaliação dos parâmetros modificados, as alterações foram incorporadas ao protocolo otimizado para execução da técnica.

C.1 – Determinação da preparação antigênica

Para a seleção da preparação antigênica, utilizou-se primeiramente, 15 amostras de soro de pacientes com confirmação sorológica de PCM com títulos de anticorpos séricos variando de 1 a 512, empregando-se membranas dotadas com antígenos Pb B-339 e Pb 113. Os resultados podem ser visualizados na **Tabela 1C**.

Verificou-se que 100% das amostras avaliadas reconheceram a fração de 43.000 Daltons, ou seja, a gp43. Entretanto, o reconhecimento concomitante das frações de 43 e 70 kDa de *P. brasiliensis*, consideradas marcadores sorológicos da doença, foi observado por 40% das amostras na presença da preparação antigênica obtida a partir da amostra Pb 113. Face a estes achados, optou-se por dar continuidade ao processo de otimização da metodologia empregando este antígeno.

Tabela 1C: Comparação do perfil de reatividade dos soros de pacientes com paracoccidiodomicose frente a filtrados de cultura obtidos a partir das amostras B-339 e 113 de *P. brasiliensis*.

Amostra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Pb B-339	gp 43	gp 43f	gp 43	gp 43	gp 43	gp 43	gp 43	gp 43	gp 43	gp 43	gp 43	gp 43	gp 43	gp 43	gp 43f
Pb 113	gp 43	gp 43f	gp 43	gp 43	gp 43	gp 43/70	gp 43	gp 43/70	gp 43/70	gp 43/70	gp 43/70	gp 43/70	gp 43	gp 43	gp 43

Pb – *Paracoccidoides brasiliensis*; gp - glicoproteína

C.2 – Avaliação da eficácia do processo de transferência das proteínas antigênicas contidas no gel de poliacrilamida para a membrana de nitrocelulose.

Uma vez estabelecida a melhor preparação antigênica, procurou-se avaliar o procedimento mais adequado para a realização da transferência do antígeno Pb 113 contido na matriz de poliacrilamida para a membrana de nitrocelulose.

Esta avaliação foi realizada visando a busca de um procedimento que assegurasse o mínimo de perda na passagem das proteínas fúngicas contidas no gel de poliacrilamida para a membrana de nitrocelulose. Desta forma, duas condições distintas foram avaliadas:

- a) processo de transferência por três (3) horas em temperatura de 2 a 4° C, com amperagem constante de 150 mA (transferência rápida) e
- b) processo de transferência por aproximadamente 18 horas (*overnight*) a 4° C, com voltagem constante de 30 V (transferência lenta).

Observou-se pela coloração com Ponceau-S que “aparentemente” ambos procedimentos mostraram-se eficientes, visto ter sido possível observar a presença das proteínas de 43 e 70 kDa na membrana de nitrocelulose. Entretanto, a real eficácia do processo de transferência de ambos procedimentos, ou seja, transferência rápida e lenta, só pode ser comprovada mediante a avaliação da imunoreatividade frente a soros de pacientes.

Para tanto, cinco (5) amostras de soro sabidamente reagentes foram testadas e os resultados revelaram que o processo de transferência do antígeno para a membrana de nitrocelulose realizado em voltagem constante de 30 V, por aproximadamente 18 horas, a 4°C foi mais eficiente, conferindo maior nitidez e uniformidade na visualização das bandas (**Tabela 2C**).

Tabela 2C: Comparação do perfil reatividade dos soros de pacientes com paracoccidiodomicose frente do filtrado de cultura da amostra 113 de *P. brasiliensis*, submetido a procedimentos distintos de transferência.

Amostra	Tipo de transferência	
	Rápida – 3h	Lenta – 18h
C+ (SHC)	gp 43	gp 43
1 (ID 1:8)	gp 43	gp 43
2 (ID 1:16)	gp 43	gp 43 e 70f
3 (ID 1:32)	gp 43 e 70f	gp 43 e 70
4 (ID 1:64)	gp 43 e 70	gp 43 e 70
5 (ID 1:128)	gp 43 e 70	gp 43 e 70

C+ - Controle positivo; SHC – soro hiperimune de coelho.

ID – imunodifusão dupla; gp – glicoproteína; f – fraca reatividade;

C.3 – Diluição dos Anticorpos

C.3.1 - Diluição dos Anticorpos Primários (amostras de soro)

Outra preocupação em relação ao protocolo original (Vicentini, 1997) relacionava-se a busca de uma reação mais “limpa”, ou seja, sem reações de fundo ou *background*. Importante salientar, que na grande maioria das vezes, esta reação é provocada pelas características do próprio soro teste, que podem estar relacionadas ao uso de determinada medicação pelo paciente ou então pela presença de proteínas/anticorpos associadas a uma eventual co-infecção. Logo, procurando minimizar e/ou eliminar as reações de fundo que podem interferir na visualização das bandas, diferentes diluições das amostras biológicas foram avaliadas.

Sete (7) amostras de soro de pacientes com PCM (reagentes e não reagentes por ID) foram diluídas em solução tampão PBS pH 7,4 nas proporções 1:40 e 1:100. Verificou-se que quando as amostras testes foram diluídas 100 vezes, a reação (reconhecimento antígeno/anticorpo) apresentou-se mais “limpa”, permitindo melhor visualização das frações protéicas; entretanto, uma (1) amostra reagiu de forma mais fraca (**Figura 1C**). Por esta razão, não foram realizadas diluições maiores, estabelecendo-se 1:100 como a diluição mais adequada.

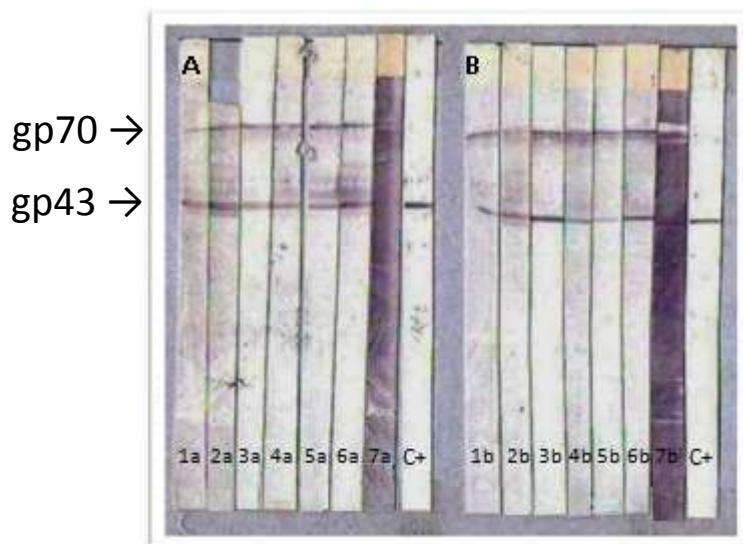


Figura 1C: Reação de *immunoblotting* para a pesquisa de anticorpos séricos anti-*P. brasiliensis* em soros diluídos em solução PBS pH 7,4: **A** – soros diluídos na proporção 1:40; **B** – soros diluídos a 1:100; **C+** - controle-positivo (soro hiperimune de coelho); **1 a 7** – amostras de soro de pacientes com PCM.

C.3.2 – Diluição do Anticorpo Secundário

A mesma avaliação realizada para a diluição dos anticorpos primários, ou seja, das amostras biológicas, foi desenvolvida para a determinação da quantidade ideal de anticorpos secundários (IgG humana conjugada à peroxidase), que deveria ser diluída.

Primeiramente os anticorpos secundários foram diluídos 1.000 e 2.000 vezes em solução PBS pH 7,4 e avaliados frente a sete (7) soros de pacientes sabidamente reagentes para *P. brasiliensis*. Como não houve diferença no padrão de reatividade, optou-se por aumentar a diluição do anticorpo secundário, desta forma, a anti-IgG humana foi diluída 3.000 vezes e as amostras foram novamente avaliadas. Conforme demonstrado na **Figura 2C**, observou-se diminuição nas reações de fundo quando o anticorpo secundário foi diluído 3.000 vezes.

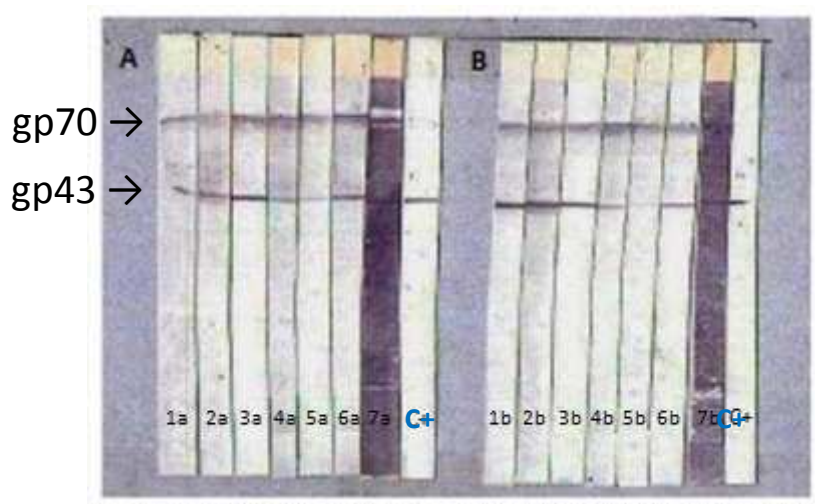


Figura 2C: Reação de *immunoblotting* para pesquisa de anticorpos anti-*P. brasiliensis*, empregando anticorpo secundário anti-IgG humano conjugado a peroxidase diluído em solução PBS pH 7,4: **A** – conjugado diluído em 1:2000; **B** – conjugado diluído em 1:3000; **C+** - controle-positivo (soro hiperimune de coelho); **1 a 7** – amostras de soro de pacientes com PCM.

C.4 – Determinação do tampão de diluição

Nesta etapa da otimização da reação de *immunoblotting*, avaliou-se também o comportamento de diferentes soluções de diluição com a finalidade principal de eliminar ou minimizar reações inespecíficas especialmente nas amostras de soro de indivíduos saudáveis, doadores de sangue, utilizados neste estudo como controle negativo. Assim, foram utilizadas solução salina tamponada com fosfato (PBS pH 7,4) na forma pura, acrescida de 0,1% (v/v) de Tween 20 [PBS-T] (Sigma -Aldrich Co. St. Louis, Mo, USA) ou 5% (p/v) de leite desnatado [PBS-L 5%] (Molico, Nestlé, São Paulo, BR). A análise dos resultados demonstrou que quatro (4) amostras apresentaram reatividade frente ao filtrado de cultura da amostra 113 de *P. brasiliensis* apenas quando diluídas nos tampões PBS puro e PBS-T; além disso, verificou-se que a utilização desta última solução provocou forte reação de fundo nas membranas (**Figura 3C**).

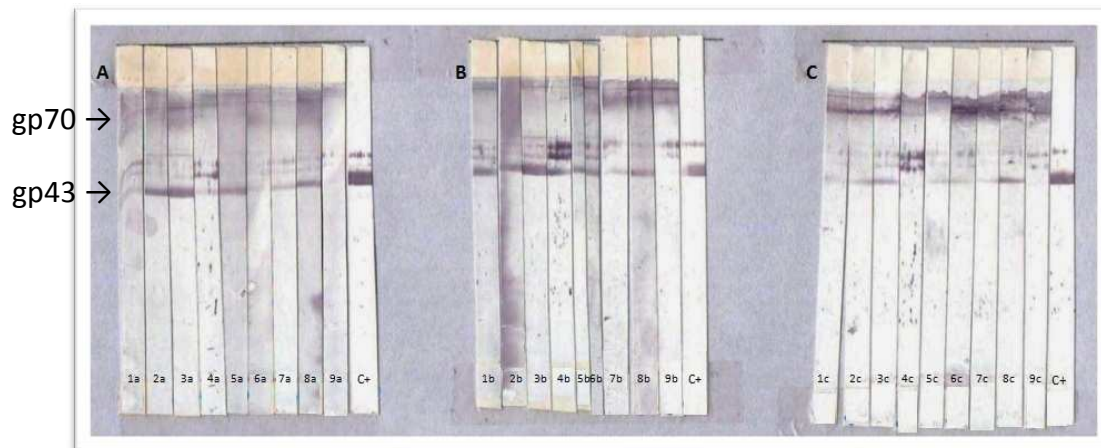


Figura 3C: Reação de *immunoblotting* para pesquisa de anticorpos anti-*P. brasiliensis*, empregando diferentes soluções de diluição: **A** – tampão PBS pH 7,4; **B** – tampão PBS-T 0,1%; **C** – tampão PBS-L 5%; **1 a 9** – amostras de soro indivíduos saudáveis, doadores de sangue.

Verificou-se que a adição de 5% de leite desnatado a solução de PBS, não acarretou alteração no padrão de reatividade das sete (7) amostras de soro de pacientes com confirmação sorológica para paracoccidiodomicose e que apresentavam diferentes títulos de anticorpos séricos anti-*P. brasiliensis* e cinco (5) amostras de indivíduos considerados saudáveis provenientes da região hiper endêmica de Botucatu. Importante ressaltar, que das cinco (5) amostras de pacientes considerados hígidos, duas (40%) haviam apresentado reação inespecífica quando diluídos em solução PBS pH 7,4 pura. Quando estes mesmos soros foram diluídos em tampão PBS acrescido de 5% de proteína inerte, ou seja, leite desnatado, não se observou nenhum tipo de reação inespecífica (**Tabela 3C**).

Tabela 3C: Comparação do perfil de reatividade de acordo com a solução diluente empregada no ensaio de *immunoblotting*.

Amostra	Tampão de diluição		OBS:
	PBS	PBS-L 5%	
C+	gp 43	gp 43	Coelho Pb 339
54915/08	NR	gp 43f	PCM – ID 1:1
71092/09	NR	gp 43f	PCM – ID 1:2
31153/09	gp 43 e 70	gp 43 e 70	PCM – ID 1:4
(03)5773/09	gp 43	gp 43 e 70f	PCM – ID 1:32
(03) 8813/09	gp 43 e 70	gp 43 e 70	PCM – ID 1:64
26322/10	gp 43	gp 43	PCM – ID 1:64
7127/09	gp 43 e 70	gp 43 e 70f	PCM – ID 1:256
163	NR	NR	Banco de Sangue
164	NR	NR	Banco de Sangue
154	gp 43f e 70f	NR	Banco de Sangue
149	gp 43f e 70f	NR	Banco de Sangue
152	NR	NR	Banco de Sangue

PBS – tampão PBS pH 7,4; C+ - Controle positivo

PBS L 5% - tampão PBS pH 7,4 acrescido de 5% de leite desnatado

gp – glicoproteína; NR – reagente; f – fraca reatividade;

PCM –paracoccidiodomicose; ID – imunodifusão dupla

Buscando ratificar se a adição de leite desnatado ao tampão de diluição não prejudicaria o perfil de reatividade das amostras com baixos títulos de anticorpos, optou-se por avaliar o comportamento de concentrações baixa (1%) e intermediária (3%) de leite desnatado, comparando-as com a solução diluente preparada com 5% de leite desnatado. Desta maneira, duas (2) amostras com títulos de anticorpos de 1 e 2, e uma (1) com título de 64 foram utilizadas. A análise dos resultados demonstrou que não houve prejuízo no padrão de reatividade das amostras com baixos títulos de anticorpos séricos, além disso, foi possível verificar que a reação de fundo foi atenuada com o emprego de solução PBS acrescida de 3% de leite desnatado. Diante destas observações, para a condução dos ensaios de *immunoblotting* tanto as amostras de soro quanto o anticorpo secundário conjugado à peroxidase foram diluídos em solução PBS-L 3% (**Figura 4C**).

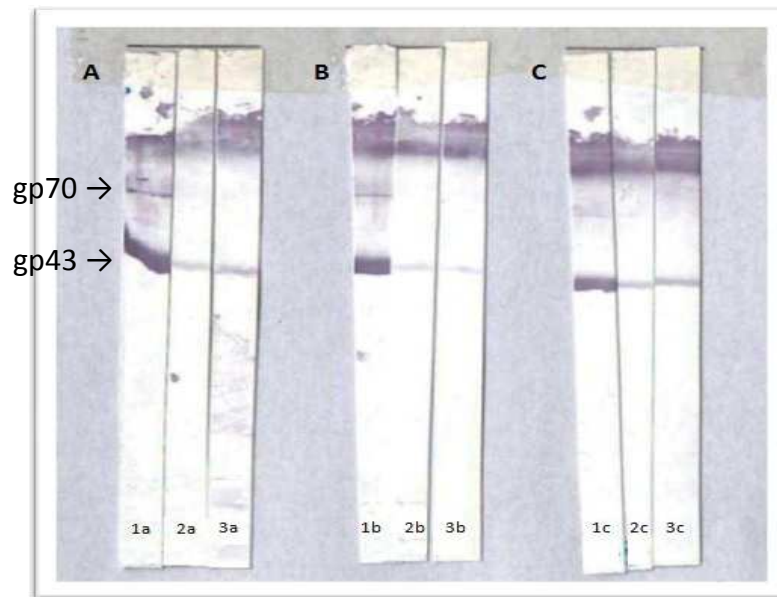


Figura 4C: Reação de *immunoblotting* para pesquisa de anticorpos anti-*P. brasiliensis* em amostras de soro de pacientes, empregando solução PBS pH 7,4 acrescida de diferentes concentrações de leite desnatado **A** – PBS-L 1%; **B** – PBS-L 5%; **C** – PBS-L 3%; **1** e **3** – amostras de soro de pacientes com PCM.

C.5 – Determinação do Tempo de Incubação

Outro parâmetro avaliado durante o processo de otimização da técnica de *immunoblotting* se referiu ao tempo mínimo necessário para incubação das amostras de soro (anticorpo primário) e do anticorpo secundário. Para realização dos ensaios, foram selecionadas aleatoriamente três (3) amostras sabidamente reagentes.

Primeiramente foi avaliado o tempo de incubação das amostras de soro. Foram realizados 4 (quatro) ensaios, com diferentes tempos de incubação (4 horas, 2 horas, 1 hora e 30 minutos e 1 hora); mantendo-se constante o tempo de incubação do anticorpo secundário (2 horas). A interpretação das alterações realizadas neste parâmetro demonstrou que as amostras de soro quando incubadas por um período inferior a duas (2) horas apresentaram padrão de reatividade de fraca intensidade. Não se observou diferença no padrão de reatividade entre as amostras incubadas por duas (2) e quatro (4) horas

(Tabela 4C). Desta forma, estabeleceu-se o tempo de duas (2) horas como período mínimo para incubação das amostras de soro e suficiente para o estabelecimento da reação antígeno-anticorpo.

Em seguida, foram realizados três (3) ensaios, com as mesmas amostras, para verificação do menor tempo de incubação dos anticorpos conjugados. Verificou-se que não houve alteração dos resultados com incubação mínima a uma (1) hora e 30 minutos (Tabela 4C).

Tabela 4C: Comparação do perfil de reatividade das amostras de soro no ensaio de *immunoblotting*, utilizando diferentes tempos de incubação para os anticorpos primários e secundários.

Amostra	Tempo de incubação do soro				Tempo de incubação do conjugado		
	4 horas	2 horas	1 h 30 min	1 hora	2 horas	1 h 30 min	1 hora
149	Rf	Rf	Rf	Rf	Rf	Rf	Rf
33205/09	R	R	Rf	Rf	R	R	Rf
(03)5773/09	R	R	R	Rf	R	R	Rf

R – reagente; f – fraca reatividade; PCM – paracoccidiodomicose; ID – imunodifusão dupla

C.6 – Avaliação da estabilidade das membranas de nitrocelulose

O processo de obtenção das membranas contendo antígenos imobilizados é extremamente laborioso, visto que requer a execução de duas etapas distintas: SDS-PAGE, para a separação das frações antigênicas e *western blot*, para a transferência das proteínas separadas eletroforeticamente em matriz de poliacrilamida para a membrana de nitrocelulose. Associado ao fato da metodologia de *immunoblotting* para a detecção de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis* ser um ensaio *in house*, avaliou-se neste estudo, o tempo passível de armazenamento das membranas de nitrocelulose contendo antígeno dotado, tendo em vista a implantação desta metodologia no serviço de rotina diagnóstica do laboratório.

Diante do exposto, optou-se por avaliar a estabilidade das membranas, especialmente no que diz respeito ao tempo de armazenamento avaliando-se

duas condições distintas: armazenamento de membranas sem bloqueio prévio e armazenamento de membranas bloqueadas com solução PBS-L 5%. Desta forma, após o processo de transferência do antígeno, as membranas de nitrocelulose foram lavadas com solução tampão PBS pH 7,4, e tanto o lote de membranas sem bloqueio como o lote de membranas bloqueadas, foram envoltas em papel tipo “filme” e papel alumínio, e mantidas em caixas plásticas, em freezer, a -20°C, e avaliadas após um (1), 10, 20, 30 e 90 dias de armazenamento.

Nas reações de *immunoblotting* realizadas com membranas sem bloqueio prévio, pode-se observar que não houve prejuízo no padrão de reconhecimento tanto para aquelas com um dia de armazenamento a - 20° C como para aquelas armazenadas, a mesma temperatura, durante 30 dias. Em contra partida, todas as oito (8) amostras avaliadas após 90 dias apresentaram padrão de intensidade da reação mais fraco quando comparado aos anteriores (**Figura 5C**).

Avaliando-se as reações de *immunoblotting* empregando membranas previamente bloqueadas, observou-se que apenas uma amostra apresentou, em relação a membrana de um (1) dia, reatividade mais fraca quando utilizada a membrana de 10 dias; enquanto seis (6) apresentaram diferença de resultado na membrana de 20 dias, sendo que 2 (duas) amostras foram não reagentes. Dessa forma, se concluiu que membranas “bloqueadas” podem ser armazenadas por até 10 dias (**Tabela 5C**).

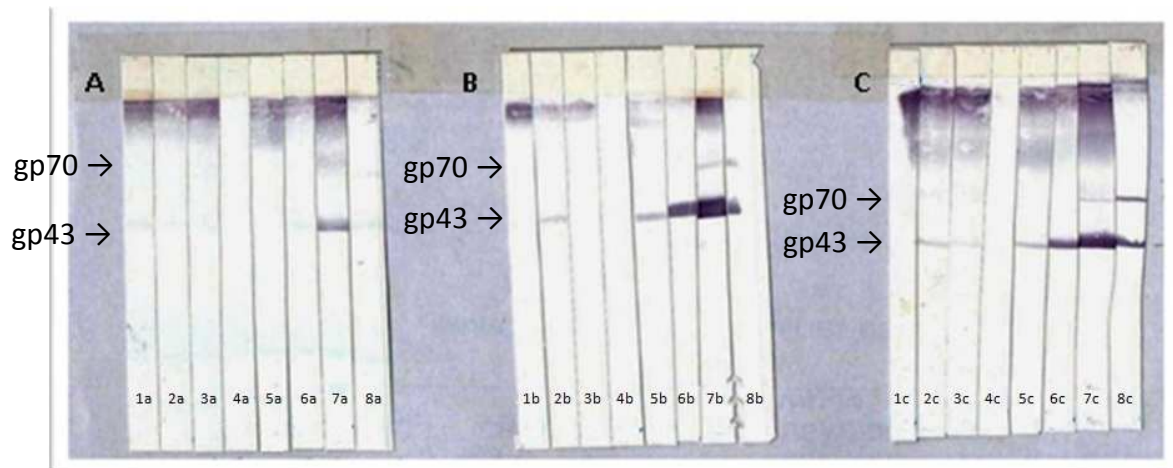


Figura 5C: Reação de *immunoblotting* realizada em membranas mantidas a -20°C por diferentes períodos: **A** – 90 dias; **B** – 30 dias; **C** – 1 dia; **1** e **8** – amostras de soro de pacientes com PCM.

Tabela 5C: Comparação do perfil de reatividade das amostras no ensaio de *immunoblotting* utilizando membranas previamente bloqueadas, mantidas a -20°C por diferentes períodos.

Amostra	Tempo de armazenamento			OBS:
	20 dias	10 dias	1 dia	
92416/09	NR	Rf	R	PCM – ID 1:1
84089/09	Rf	R	R	PCM – ID 1:2
82673/09	Rf	R	R	PCM – ID 1:4
88353/09	NR	R	R	PCM – ID 1:8
33205/09	Rf	R	R	PCM – ID 1:16
(03)5773/09	Rf	R	R	PCM – ID 1:32
(03)8813/09	R	R	R	PCM – ID 1:64
36432/10	R	R	R	PCM – ID 1:128

C+ - Controle positivo; ID – imunodifusão dupla; PCM – paracoccidiodomicose;
R – reagente; NR – reagente; f – fraca reatividade;

ANEXO D - Otimização do ensaio de *immunoblotting* para pesquisa de anticorpos circulantes anti-*H. capsulatum*

O protocolo de otimização do ensaio de *immunoblotting* visando o imunodiagnóstico da HP foi desenvolvido de tal maneira que cada parâmetro fosse individualmente avaliado e alterado, conforme necessário, a partir do protocolo de referência descrito no **capítulo 3.6** deste estudo. Após a avaliação dos parâmetros modificados, as alterações foram incorporadas ao protocolo otimizado a fim de possibilitar uma análise mais detalhada quanto a aplicabilidade do mesmo para execução da técnica de IB.

D.1 – Determinação da preparação antigênica

A partir do estudo de Freitas (2005), duas preparações antigênicas de *H. capsulatum*, Hc 200 e Hc 406, foram avaliadas neste estudo pelas metodologias de SDS-PAGE e *immunoblotting*. Três (3) amostras de soros de pacientes com suspeita clínica de histoplasmose foram avaliadas: duas (2) com confirmação sorológica de histoplasmose com diferentes títulos de anticorpos circulantes anti-*H. capsulatum* por ID (amostra 1= 1:16; amostra 2= 1:1) e uma (1) amostra não reagente por ID (amostra 3).

A análise da imunoreatividade demonstrou que as amostras 1 e 2 foram reagentes frente as frações H e M de *H. capsulatum*, enquanto a amostra 3 reconheceu apenas a fração M, quando avaliadas frente a preparação antigênica obtida a partir do isolado 200 de *H. capsulatum*. A avaliação do perfil de reatividade destas amostras frente ao antígeno 406 revelou que a primeira reconheceu a fração M; a segunda, apresentou fraca reatividade frente às frações H e M e a terceira, não apresentou reatividade para *H. capsulatum* (**Tabela 1D**). Diante dos resultados observados e considerando que a preparação antigênica obtida a partir da amostra 200 do patógeno apresentou melhor capacidade discriminatória, comparado ao antígeno Hc 406, optou-se por utilizar o primeiro em todas as etapas do processo de otimização do ensaio de *immunoblotting*.

Tabela 1D: Comparação do perfil de reatividade dos soros de pacientes com histoplasmose frente às preparações antigênicas, obtidas a partir das amostras 200 e 406 de *H. capsulatum*.

Antígeno	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Hc 200	M/Hf	M/H	M
Hc 406	M	Mf/Hf	NR

Hc – *Histoplasma capsulatum*; f – fraca reatividade; NR – não reagente

M – frações protéicas com peso molecular entre 70 e 94 kDa.

H – frações protéicas com peso molecular entre 108 e 120 kDa.

D.2 – Avaliação da eficácia do processo de transferência das proteínas antigênicas contidas no gel de poliacrilamida para a membrana de nitrocelulose.

Tendo estabelecido qual a melhor preparação antigênica, procurou-se avaliar o procedimento mais adequado para a realização da transferência do antígeno Hc 200 contido na matriz de poliacrilamida, visando a garantir a transferência máxima das proteínas fúngicas do gel para a membrana de nitrocelulose.

Após a coloração com Ponceau-S foi possível observar que as frações H e M foram transferidas com sucesso para a membrana de nitrocelulose de forma semelhante nas duas condições distintas avaliadas:

a) processo de transferência por três horas em temperatura de 2 a 4°C, com amperagem constante de 150 mA (transferência rápida) e

b) processo de transferência por aproximadamente 18 horas (*overnight*) a 4°C, com voltagem constante de 30 V (transferência lenta).

A avaliação da imunoreatividade de cinco (5) amostras de soro de pacientes com HP revelou que ambos os processos de transferência do antígeno para a membrana de nitrocelulose foram eficientes, não acarretando dificuldade e diferença na interpretação dos resultados (**Figura 1D**). Desta forma, o método de transferência rápida foi selecionado para ser utilizado no

seguimento do trabalho, por apresentar menor tempo para execução do procedimento.

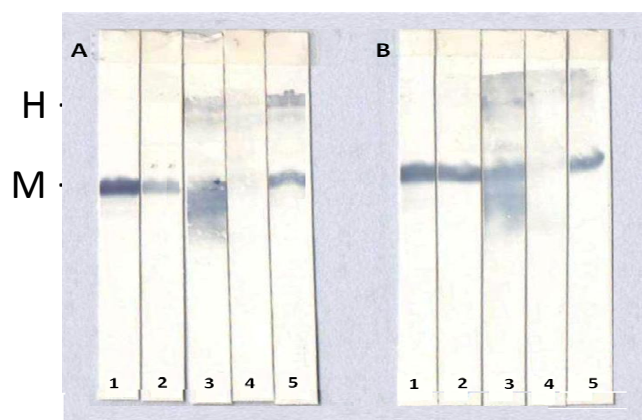


Figura 1D: Reação de *immunoblotting* para a pesquisa de anticorpos séricos anti-*H. capsulatum* utilizando antígeno Hc 200 submetido a procedimentos distintos de transferência: **A** – transferência lenta – 18h; **B** – transferência rápida – 4h; **1 a 5** – amostras de soro de pacientes com HP; fração H – entre 108 e 120 kDa; fração M – entre 70 e 94 kDa.

D.3 – Determinação do tampão de diluição

A etapa seguinte consistiu na avaliação de diferentes soluções de diluição, em concentrações distintas. Para tanto, foram utilizadas: solução tamponada PBS pH 7,4 na forma pura e acrescida de 1%, 3% e 5% de leite desnatado [PBS-L] (Molico, Nestlé, São Paulo, BR). A partir da interpretação dos resultados foi possível observar intensa reação de fundo nas membranas quando utilizou-se solução PBS na forma pura, sendo estas reações minimizadas quando se empregou solução acrescida de leite desnatado. Também se pode verificar que três (3) amostras apresentaram reatividade de fraca intensidade quando diluídas em tampão PBS-L 5%. (**Tabela 2D**). Desta forma, a solução PBS-L 3% foi escolhida como diluente para as amostras de soro e anticorpo secundário conjugado à peroxidase (**Figura 2C**).

Tabela 2D: Comparação do perfil de reatividade de acordo com a solução diluente empregada no ensaio de *immunoblotting*.

Amostra	Tampão de diluição				Observação
	PBS	PBS-L 1%	PBS-L 3%	PBS-L 5%	
11623/11	M e H	M e H	M e H	M e H	HP - ID 1:32
14016/11	M e Hf	M e Hf	M e Hf	M e H	HP - ID 1:16
24085/11	M e H	M e H	M e H	M e Hf	HP - ID 1:8
79215/10	M e H	M e H	M e H	Mf e Hf	HP - ID 1:1
47352/11	M e H	M e H	M e H	M e Hf	HP - ID 1:16

PBS – tampão PBS pH 7,4; f – fraca reatividade;

HP – histoplasose; ID – imunodifusão dupla;

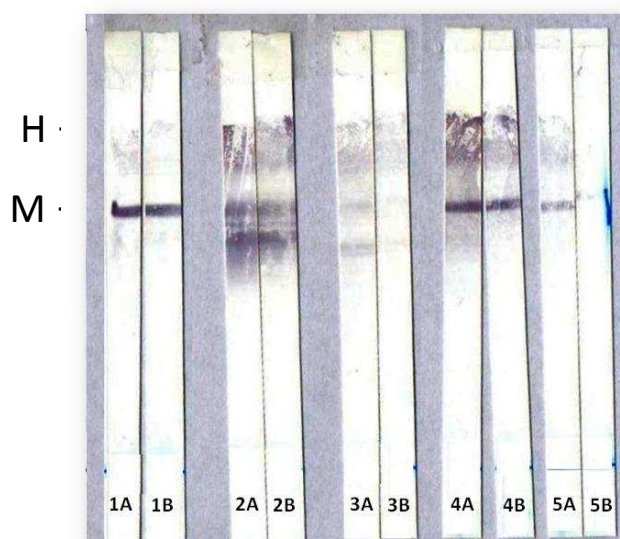


Figura 2D: Reação de *immunoblotting* para pesquisa de anticorpos anti-*H. capsulatum*, empregando diferentes soluções de diluição: **A** – tampão PBS-L 3%; **B** – tampão PBS-L 5%; **1 a 5** – amostras de soro de pacientes com HP; fração H – entre 108 e 120 kDa; fração M – entre 70 e 94 kDa.

D.4 – Diluição dos Anticorpos

D.4.1 – Diluição dos Anticorpos Primários (amostras de soro)

Na etapa seguinte do processo de otimização do ensaio de *immunoblotting* foram avaliadas diferentes diluições das amostras de soro. Para tanto, sete (7) soros de pacientes com HP (reagentes por ID) foram diluídos em solução tampão PBS pH 7,4 nas proporções 1:40 e 1:100.

Foi possível observar que as amostras diluídas 100 vezes, apresentaram reação (reconhecimento antígeno/anticorpo) mais “limpa”, permitindo melhor visualização das bandas. Além disso, duas (2) amostras quando diluídas em 1:100 reagiram de forma levemente mais fraca em relação a diluição de 40 (mas não o suficiente para interferir no resultado final) (**Tabela 3D**). Por esta razão, não foram realizadas diluições maiores, estabelecendo-se 1:100 como mais adequada.

Tabela 3D: Comparação do perfil de reatividade das amostras de soro de pacientes com histoplasmosose em diferentes diluições, utilizando tampão PBS pH 7,4.

Amostra	Diluição da amostra	
	1:40	1:100
1 (ID 1:1)	M e H	Mf e Hf
2 (ID 1:1)	M	M e Hf
3 (ID 1:8)	M e H	M e Hf
4 (ID 1:16)	M e H	M e H
5 (ID 1:32)	M e Hf	M e Hf
6 (ID 1:64)	M e Hf	M e Hf
7 (ID 1:128)	M e H	M e H

ID – imunodifusão duplas; f – fraca reatividade

D.4.2 – Diluição do Anticorpo Secundário

A mesma avaliação realizada para a diluição das amostras biológicas, foi desenvolvida para a determinação da quantidade ideal de anticorpos secundários (IgG humana conjugada à peroxidase), que deveria ser diluída.

Primeiramente os anticorpos secundários foram diluídos 1.000 e 2.000 vezes em solução PBS pH 7,4 e avaliados frente a quatro (4) soros de pacientes sabidamente reagentes. Conforme demonstrado na **Figura 3D**, as amostras apresentaram reatividade mais forte quando utilizado anticorpos anti-IgG diluídos 1:1000.

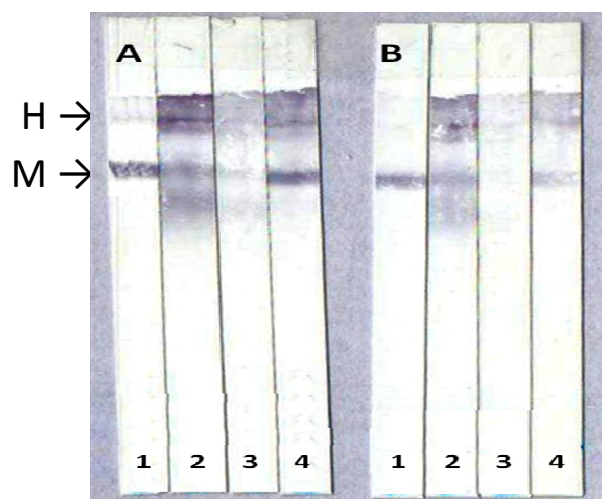


Figura 3D: Reação de *immunoblotting* para pesquisa de anticorpos anti-*H. capsulatum*, empregando anticorpo secundário anti-IgG humano conjugado a peroxidase diluído em solução PBS pH 7,4, acrescido de 3% de leite desnatado: **A** – conjugado diluído em 1:1000; **B** – conjugado diluído em 1:2000; **C+** - controle-positivo (soro hiperimune de coelho); **1 a 5** – amostras de soro de pacientes com HP; fração H – entre 108 e 120 kDa; fração M – entre 70 e 94 kDa.