

LUCIANE REGINA FRANCISCONE SILVA

Otimização e Validação da Metodologia de ELISA Indireto para o
Imunodiagnóstico da Paracoccidioidomicose causada por
Paracoccidioides brasiliensis

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: Profa. Dra. Adriana Pardini Vicentini

Co-orientadora: Profa. Dra. Elizabeth de los Santos Fortuna (*in memoriam*)

SÃO PAULO

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Silva, Luciane Regina Franciscone.

Otimização e validação da metodologia de ELISA Indireto para o imunodiagnóstico da Paracoccidioomicose causada por *Paracoccidioides brasiliensis*. - São Paulo, 2014.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2014.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientação: Adriana Pardini Vicentini.

Co-orientação: Elizabeth de los Santos Fortuna.

1. Paracoccidioomicose. 2. Paracoccidioides. 3. Imunodiagnóstico. 4. ELISA. 5. Imunodifusão. 6. Estudos de Validação. I. Título

SES/CCD/CD-301/14

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 (Projeto CTC –
IAL#90D/2012)

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 ao meu pai,
José Manoel, a base da minha vida.*

*Dedico também à minha co-orientadora, Beth,
que infelizmente nos deixou no começo dessa caminhada.*

Agradecimentos

Primeiramente à **Espiritualidade** que me guiou e me iluminou nessa longa caminhada...

À minha orientadora, **Dra. Adriana Pardini Vicentini**, pela confiança, pela oportunidade de trabalho e estudo que me foi concedida, pelo aprendizado, e por me acolher em seu laboratório e em sua vida. Graças ao seu enorme coração, a sua humildade e a sua paciência... Muito obrigada Dri!

À minha co-orientadora, **Dra. Elizabeth de los Santos Fortuna**, por todo aprendizado, por me ajudar a desenhar os primeiros protocolos de trabalho deste estudo, e por me acolher de forma carinhosa como uma mãe... Onde quer que você esteja, muito obrigada Beth!

Ao meu pai, **José Manoel da Silva**, meus irmãos, **Reinaldo Franciscone da Silva** e **Randal Rocha Jardim Silva** e à minha cunhada **Galia Lily Arancibia Martinez Silva**, por estarem sempre ao meu lado me apoiando, pela paciência e por todo amor recebido. Saibam que sou muito grata a vocês!

Ao meu namorado e companheiro, **Vinicius Roncon Vanderlei Malta**, pelo carinho e amor me dado todos os dias, por me fazer feliz e me proteger, por me apoiar e não me deixar desistir. Te amo!

À **todos os amigos**, em especial à **Flávia Cristina Aita Bejar**, mais conhecida como **Fró** e à **Thais Gozzi Cazzaro** pelos momentos de descontração e apoio. Obrigada por fazerem parte da minha vida, vocês são de extrema importância para mim!

À equipe do Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses, **Valdelene Sayuri Kohara**, **Camila Mika Kamikawa** e **Angela Noronha Passos** pelas opiniões,

conselhos e críticas em relação ao trabalho, pelos ensinamentos práticos de um laboratório de rotina e, pelos momentos de amizade e descontração. Obrigada.

Aos **funcionários** do Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz em especial à **Dra. Lourdes Rehder de Andrade Vaz de Lima** que, de alguma forma, estiveram me auxiliando nessa jornada.

À diretora do Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, **Ms. Carmem Aparecida de Freitas Oliveira**, por todo o apoio e incentivo oferecido. Obrigada.

À **Direção Geral do Instituto Adolfo Lutz**, especialmente ao **Dr. Helio Hehl Caiaffa Filho**, pela infraestrutura e pelos materiais disponibilizados para a realização de pesquisas importantes em Saúde Pública.

À equipe do **Programa de Pós-Graduação em Ciências** da Coordenadoria de Controle de Doenças pelo suporte administrativo.

Ao **Prof. Dr. Sérgio Dovidauskas**, pelo imprescindível suporte estatístico e toda colaboração que foi prestada ao longo do término do trabalho. Muito obrigada!

Ao **Prof. Dr. Rinaldo Poncio Mendes** e à sua aluna **Ms. Tatiane Fernanda Sylvestre**, pelas amostras de soro concedidas, e pelo trabalho desenvolvido em colaboração.

Aos amigos **Sofia Andreia Martinez Santos** e **Filipe Figueirêdo de Oliveira** pelo auxílio dado em relação ao *abstract* deste trabalho.

Aos membros da Banca de Qualificação, **Dra. Regina Célia Moreira**, **Dra. Gilda Maria Barbaro Del Negro** e **Dr. Bosco Christiano Maciel da Silva**, pelas sugestões realizadas.

À **CAPES**, pela bolsa concedida.

*“Feliz aquele que transfere o que sabe
e aprende o que ensina”.*

Cora Coralina

Silva, LRF - Otimização e Validação da Metodologia de ELISA Indireto para o Imunodiagnóstico da Paracoccidioidomicose causada por *Paracoccidioides brasiliensis*

Resumo

O diagnóstico de certeza de processos infecciosos como na paracoccidioidomicose (PCM) deriva da demonstração e do reconhecimento do agente etiológico em preparados histológicos, exame direto ou em cultivo. No entanto, em algumas situações, a pesquisa de anticorpos e antígenos específicos circulantes no soro de pacientes assume grande importância no diagnóstico indireto da infecção. Historicamente, na PCM, a sorologia, além de importante auxílio diagnóstico, tem a função de monitorar o curso da doença durante e após o tratamento através do acompanhamento dos títulos de anticorpos antifúngicos específicos. O Manual da Vigilância da Paracoccidioidomicose do Estado de São Paulo preconiza, para o imunodiagnóstico de pacientes com suspeita clínica desta patologia, a utilização do teste de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) como triagem. Apesar desta recomendação, esta realidade não é observada na prática laboratorial, a técnica frequentemente utilizada é a imunodifusão dupla em gel de agarose (ID). O teste de ELISA tem sido utilizado para a detecção de anticorpos em quase todas as micoses sistêmicas, senão em todas. Em relação ao imunodiagnóstico da PCM, a técnica de ELISA oferece ainda porcentagens de reatividade cruzada, porém, por ser um ensaio mais rápido, sua utilização como teste de triagem é de grande valia. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi otimizar e validar a metodologia de ELISA indireto para uso como método de triagem dos soros com suspeita clínica para PCM. A concentração proteica de antígeno para a sensibilização das placas foi de 10,0 µg/poço e as diluições de soro e conjugado foram de 1:100 e 1:3.000, respectivamente. O antígeno de escolha foi o filtrado de cultura de *P. brasiliensis* do isolado B-339. Para a validação da técnica foram utilizadas 166 amostras do grupo controle, sendo elas 111 de pacientes aparentemente saudáveis e 55 de pacientes com PCM confirmada. Para avaliar o desempenho da técnica, foram utilizadas 205 amostras de pacientes com suspeita clínica para PCM. A análise dos resultados do

grupo controle demonstrou sensibilidade de 67% e 96% e especificidade de 100% e 95% para a ID e ELISA indireto, respectivamente. A comparação das duas técnicas, sendo ID padrão ouro, resultou em co-positividade de 100% e co-negatividade de 70%. A concordância entre as técnicas foi classificada como boa, segundo índice *kappa*. A análise das amostras de soros de pacientes com outras doenças pulmonares (aspergilose, histoplasrose e tuberculose) demonstrou 50% de reação cruzada. Os resultados demonstram que, a metodologia de ELISA indireto, devido sua alta sensibilidade, pode ser aplicada como teste de triagem sorológica; conferindo assim maior rapidez na liberação dos laudos de pacientes com ausência de reatividade para *P. brasiliensis*.

Palavras-chave: Paracoccidiodomicose, *Paracoccidioides brasiliensis*, Imunodiagnóstico, Imunodifusão Dupla, ELISA.

Silva, LRF - Optimization and Validation Methodology of Indirect ELISA for the immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis caused by *Paracoccidioides brasiliensis*

Abstract

The definitive diagnosis of infectious processes as in paracoccidioidomycosis (PCM) derives from the demonstration and recognition of the etiologic agent in histological preparations, direct examination or culture. However, in some situations, the search for circulating antigens and specific antibodies in the serum of patients is of great importance in the indirect diagnosis of infection. Historically, the PCM, serology, and an important diagnostic aid, has the function of monitoring the course of disease during and after treatment through monitoring of titers of specific antibodies antifungal. The Manual of Surveillance Paracoccidioidomycosis from the State of São Paulo advocates for immunodiagnosis of patients with clinical suspicion of this pathology, the use of ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) as screening. Despite this recommendation, this reality is not observed in laboratory practice, the commonly used technique is the double immunodiffusion in agarose gel (ID). The ELISA method has been used to detect antibodies in nearly all systemic mycoses, if not all. Regarding the immunodiagnosis of PCM, the ELISA technique also provides percentages of cross-reactivity, however, because it is a faster test, its use as a screening test is of great value. Accordingly, the aim of this work was to optimize and validate the methodology of indirect ELISA for use as a screening of sera with clinical suspicion for PCM. The protein antigen concentration for sensitization of the plates was 10.0 mg/well and the dilutions of serum and conjugate were 1:100 and 1:3,000, respectively. The antigen of choice was filtered culture isolate of *P. brasiliensis* B-339. 166 samples from the control group were used for the validation of the technique, they are 111 apparently healthy patients and 55 patients with PCM confirmed. To evaluate the performance of the technique, 205 samples of patients suspected to PCM were used. The results of the control group demonstrated 67% sensitivity and 96% and specificity of 100% and 95% for ID and indirect ELISA, respectively. The comparison of the two techniques, and ID gold standard resulted in co-positivity 100% and co-negativity of 70%. The agreement between the techniques

was rated as good, according to kappa index. The analysis of serum samples from patients with other lung diseases (aspergillosis, histoplasmosis and tuberculosis) showed a 50% cross-reactivity. The results show that the methodology of indirect ELISA, due to its high sensitivity, can be used as serological screening test; there by giving more speed in the release of reports of patients with absence of reactivity to *P. brasiliensis*.

Keywords: Paracoccidioidomycosis, *Paracoccidioides brasiliensis*, Immunodiagnostic, Double Immunodiffusion, ELISA.

Lista de Abreviaturas e Siglas

Ag	antígeno
FN	Fava Netto
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BALB/c	Linhagem de camundongos albinos
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> (ágar infusão de cérebro e coração)
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CIE	Contraímunoeletroforese
CTC	Comissão Técnico-Científica
<i>Cut-off</i>	Ponto de corte
Da	Dalton
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidade Óptica
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
et al.	termo “e outros”
FN	falso negativo
FV	falso positivo
gl	graus de liberdade
gp43	glicoproteína de 43kDa de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
gp70	glicoproteína de 70kDa de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
HCl	ácido clorídrico
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico
IAL	Instituto Adolfo Lutz
<i>inh-ELISA</i>	<i>inhibition-ELISA</i>
IB	<i>Immunoblotting</i>
ID	Imunodifusão Dupla em gel de agarose
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
kDa	kilo Dalton
MBP	parametilbenzidina

M	molar
mM	milimolar
MQ	Média quadrática
N	Normal
NGTA	Neopeptona-Glicose,Tiamina e Asparagina
nm	nanômetro
<i>P. brasiliensis</i>	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
Pb	<i>P. brasiliensis</i>
<i>P. lutzii</i>	<i>Paracoccidioides lutzii</i>
PbB-339	Cepa B-339 de <i>P. brasiliensis</i>
Pb113	Isolado da amostra 113 de <i>P. brasiliensis</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBS-L	tampão PBS contendo leite em pó desnatado
PBS-T	tampão PBS contendo Tween 20
PBS-T-BSA	tampão PBS-T contendo soro albumina bovina
PBS-T-G	tampão PBS-T contendo gelatina
PBS-T-L	tampão PBS-T contendo leite em pó desnatado
PCM	Paracoccidioidomicose
pH	potencial hidrogeniônico
PPM	Padrão de Peso Molecular
PubMed	<i>Public Medline</i>
p/v	peso/volume
rpm	rotações por minuto
SciElo	<i>Scientific Eletronic Library Online</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SES	Secretaria de Estado da Saúde
spp	<i>species</i>
SQ	Soma de quadrados
Temed	N,N,N',N'-tetrametil-etilenodiamina
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina
Tris	(hidroxi-metil)-amino-metano

UNESP	Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
V	Volts
VN	verdadeiro negativo
VP	verdadeiro positivo
v/v	volume/volume

Lista de Figuras

Figura 1: Desenho esquemático do protocolo realizado empregando como preparação antigênica filtrado de cultura obtido a partir da cepa B-339 (AgPbB-339) e da amostra 113 (AgPb113) de *P. brasiliensis*, para a definição do melhor tampão de bloqueio da reação e a sua melhor diluição..... 36

Figura 2: Desenho esquemático do protocolo realizado empregando como preparação antigênica filtrado de cultura obtido a partir da amostra 113 (AgPb113) de *P. brasiliensis*, para a definição da melhor concentração proteica do Ag juntamente com a melhor diluição de soro a serem utilizadas no ensaio de ELISA indireto..... 37

Figura 3: Desenho esquemático do protocolo realizado empregando como preparação antigênica filtrado de cultura obtido a partir da cepa B-339 (AgPbB-339) de *P. brasiliensis*, para a definição da melhor concentração proteica do Ag juntamente com a melhor diluição de soro a serem utilizadas no ensaio de ELISA indireto..... 38

Figura 4: Desenho esquemático do protocolo realizado empregando como preparação antigênica filtrado de cultura obtido a partir da cepa B-339 (AgPbB-339) e da amostra 113 (AgPb113) de *P. brasiliensis*, para a definição da melhor diluição de conjugado a ser utilizada no ensaio de ELISA indireto, após serem estabelecidas a melhor concentração de proteína do Ag e a melhor diluição de soro..... 39

Figura 5: Glicoproteínas imunodominantes, por *immunoblotting*, dos exoantígenos B-339 e 113 de *P. brasiliensis*, cultivado em caldo NGTA, 36° C, por 20 dias. **1** - padrão de peso molecular; **2** - Ag PbB-339; **3** - Ag Pb113..... 45

Figura 6: Valores de DOs obtidos no teste ELISA indireto para a Amostra 1 utilizando-se AgPb113.....	52
Figura 7: Valores das densidades ópticas obtidos de amostras de soro controle negativo (A e B) e positivo (C e D) para paracoccidioidomicose testadas com 10,0 µg/poço de AgPbB-339 e soro diluído a 1:100. Os dois gráficos superiores referem-se ao conjugado diluído a 1:3.000; e os dois gráficos inferiores referem-se ao conjugado diluído a 1:1.000.....	55
Figura 8: Valores das densidades ópticas obtidos de amostras de soro controle negativo (A e B) e positivo (C e D) para paracoccidioidomicose testadas com 10,0 µg/poço de AgPb113 e soro diluído a 1:100. Os dois gráficos superiores referem-se ao conjugado diluído a 1:3.000; e os dois gráficos inferiores referem-se ao conjugado diluído a 1:1.000.....	56
Figura 9: Curva ROC obtida após validação dos parâmetros do ensaio de ELISA indireto. Comparação do desempenho entre os antígenos PbB-339 e Pb113.....	57
Figura 10: Sensibilidade e especificidade: avaliação do desempenho dos filtrados de cultura, AgPbB-339 e AgPb113, através da curva ROC.....	58
Figura 11: Comportamento dos antígenos de PbB-339 e Pb113 em relação à especificidade e sensibilidade.....	58
Figura 12: Número absoluto de amostras de soro do grupo controle reagentes e não reagentes pelas metodologias de ID e de ELISA indireto.....	61
Figura 13: Distribuição em porcentagem dos pacientes com suspeita clínica de PCM, segundo gênero.....	64
Figura 14: Número absoluto de amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de PCM reagentes e não reagentes pelas metodologias de ID e de ELISA indireto	65

Figura 15: Porcentagem de sensibilidade e especificidade relativas e concordância entre as metodologias de ID e de ELISA indireto..... 67

Figura 16: Número absoluto de amostras de soro concordantes e discordantes em relação aos métodos de ID e de ELISA indireto..... 68

Figura 17: Imunorreatividade por *immunoblotting* de amostras de soro de pacientes com resultado discordante entre as metodologias de ID e ELISA indireto..... 68

Lista de Quadros

Quadro 1: Parâmetros mantidos durante a otimização do ensaio de ELISA indireto, segundo propostas de Camargo et al. (1984), Mendes-Giannini et al. (1984) e Cano et al. (1986)..... 35

Quadro 2: Escala de concordância do índice *kappa*..... 44

Quadro 3: Parâmetros otimizados para realização e validação do ensaio de ELISA indireto para o diagnóstico da PCM..... 59

Lista de Tabelas

Tabela 1: Modelo para validação de teste diagnóstico, segundo Ferreira e Ávila (2005).....	42
Tabela 2: Resultado obtido, em valores de DO, através do teste de ELISA indireto, utilizando-se o antígeno PbB-339.....	47
Tabela 3: ANOVA de 2 fatores com repetição realizado a partir do Programa Microsoft Excel 2010 para a Amostra 1.....	48
Tabela 4: ANOVA de 2 fatores com repetição realizado a partir do Programa Microsoft Excel 2010 para a Amostra 2.....	48
Tabela 5: ANOVA de 2 fatores com repetição realizado a partir do Programa Microsoft Excel 2010 para a Amostra 3.....	48
Tabela 6: Resultado obtido, em valores de DO, através do teste de ELISA indireto, utilizando-se o antígeno Pb113.....	50
Tabela 7: ANOVA de 2 fatores com repetição realizado a partir do Programa Microsoft Excel 2010 para a Amostra 1.....	51
Tabela 8: ANOVA de 2 fatores com repetição realizado a partir do Programa Microsoft Excel 2010 para a Amostra 2.....	51
Tabela 9: ANOVA de 2 fatores com repetição realizado a partir do Programa Microsoft Excel 2010 para a Amostra 3.....	51
Tabela 10: Detecção de anticorpos circulantes anti- <i>P. brasiliensis</i> por ID e ELISA indireto em amostras de soro de pacientes com paracoccidiodomicose confirmada e	

em soros de indivíduos aparentemente saudáveis, doadores de banco de sangue..... 62

Tabela 11: Determinação do grau de concordância entre os métodos de ID e ELISA indireto obtidos através do coeficiente *kappa*..... 63

Tabela 12: Determinação do grau de concordância entre os métodos de ID e ELISA indireto obtidos através do coeficiente *kappa*..... 66

Sumário

1. Introdução	1
2. Objetivos	26
2.1. Objetivo Geral	26
2.2. Objetivos Específicos	26
3. Casuística e Métodos	27
3.1. Soros humanos	27
3.1.1. Soros controle negativo (Casos descartados).....	27
3.1.2. Soros controle positivo (Casos confirmados).....	27
3.1.3. Soros de pacientes com outras doenças pulmonares.....	28
3.1.4. Soros de pacientes com suspeita clínica de paracoccidioidomicose (Casos suspeitos).....	28
3.2. Considerações éticas	28
3.3. <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	29
3.3.1. Meios de cultura para obtenção de antígenos.....	29
3.3.2. Manutenção das amostras de <i>P. brasiliensis</i>	29
3.4. Antígenos de <i>P. brasiliensis</i>	29
3.5. Quantificação de proteínas.....	30
3.6. Análise das glicoproteínas imunodominantes dos antígenos por SDS-PAGE e posterior <i>Western blot</i>	31
3.7. Ensaio de <i>Immunoblotting</i> (IB).....	32
3.8. Ensaio de Imudifusão Dupla em Gel de Agarose (ID).....	33
3.9. ELISA (<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>).....	34
3.9.1. Tampões.....	35
3.9.2. Adsorção dos antígenos à placas de poliestireno.....	36
3.9.3. Diluição dos anticorpos primários (soro).....	37
3.9.4. Diluição do anticorpo secundário (Ig G de cabra anti-IgG humana conjugada à peroxidase).....	38
3.9.5. Ensaio de ELISA indireto.....	39
3.9.6. Validação do ensaio de ELISA indireto.....	40

3.10. Avaliação do desempenho do ensaio de ELISA indireto frente a amostras de soros de pacientes com suspeita clínica de PCM.....	40
3.11. Análise estatística.....	41
3.11.1. Validação de um teste diagnóstico.....	41
4. Resultados	45
4.1. Glicoproteínas imunodominantes dos filtrados de cultura PbB-339 e Pb113....	45
4.2. Otimização e validação do ensaio de ELISA indireto.....	46
4.2.1. Quantificação proteica dos filtrados de cultura PbB-339 e Pb113.....	46
4.2.2. Determinação do tampão de bloqueio.....	46
4.2.3. Determinação do tampão de incubação das amostras de soro e do conjugado.....	46
4.2.4. Solução reveladora	47
4.2.5. Solução de parada da reação.....	47
4.2.6. Determinação da concentração de proteína e da diluição dos soros para as duas preparações antigênicas.....	47
4.2.6.1. AgPbB-339.....	47
4.2.6.2. AgPb113.....	50
4.2.7. Determinação da melhor diluição do conjugado.....	54
4.2.8. Escolha do filtrado de cultura para a realização do ensaio de ELISA indireto	56
4.3. Avaliação sorológica do grupo controle.....	60
4.3.1. Cálculo dos parâmetros intrínsecos dos ensaios sorológicos.....	61
4.4. Caracterização dos pacientes com suspeita clínica de PCM.....	63
4.4.1. Detecção de anticorpos circulantes anti- <i>P. brasiliensis</i> em amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de PCM pelo ensaio de imunodifusão dupla.....	64
4.4.2. Detecção de anticorpos circulantes anti- <i>P. brasiliensis</i> em amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de PCM pela metodologia de ELISA indireto.....	65
4.4.3. Determinação do grau de concordância, co-positividade e co-negatividade entre os métodos de imunodifusão dupla e ELISA indireto.....	66
4.5. Análise das amostras discordantes.....	67
5. Discussão.....	70
6. Conclusões.....	95
7. Referências Bibliográficas	96

Anexos.....	121
-------------	-----

1. Introdução

A paracoccidiodomicose (PCM) foi descrita pela primeira vez por Adolpho Lutz em 1908 (Lutz, 1908 a,b), no Instituto Bacteriológico de São Paulo, Brasil, como uma nova doença granulomatosa; ao verificar, em lesões bucais de dois pacientes, a existência de fungos de natureza dimórfica distintas de *Coccidioides immitis*, agente causal da doença de Posadas-Wernicke (Lacaz, 1982; Lacaz, 2002).

Após a descrição das características clínico-patológicas das formas mucocutâneas da enfermidade, seguiu-se longo período de análise e estudo das lesões, frequentemente relatadas pelos pacientes acometidos pela patologia, na tentativa de isolamento do agente causal. Em 1912, Alfonso Splendore classificou o agente etiológico da paracoccidiodomicose dentro do gênero *Zymonema*, propondo a denominação de *Zymonema brasiliensis* (Lacaz, 1982; Lacaz, 2002).

Em 1930, Floriano Paulo de Almeida classificou definitiva e consensualmente o agente etiológico da PCM, criando o gênero *Paracoccidioides* dentro do Reino Fungi, classificando-o como *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*), revalidando a espécie, criada por Splendore (Almeida, 1930; Lacaz, 1982; Lacaz, 2002; Biblioteca Virtual Adolpho Lutz, 2010).

Segundo Lacaz (2002), com a observação e o relato de casos isolados da doença em outros países da América do Sul, a mesma passou a ser chamada de Blastomicose Sul-Americana, Doença de Lutz, Doença de Lutz-Splendore-Almeida. Porém, a oficialização do termo paracoccidiodomicose foi estabelecida em 1971, em Medellín, Colômbia, durante reunião de micologistas do continente americano, sendo mundialmente aceita desde então (Lacaz, 2002).

Os artigos científicos disponíveis nas bases de dados até 2007 descrevem o fungo *P. brasiliensis* como único agente etiológico da paracoccidiodomicose. Entretanto a partir de 2008, estudos têm sugerido que outra espécie, *Paracoccidioides lutzii* (*P. lutzii*), esteja envolvida no desenvolvimento da micose

(Restrepo, 1985; Carrero *et al.*, 2008; Theodoro *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2009; Salgado-Salazar *et al.*, 2010; Teixeira *et al.*, 2013).

A partir da década de 90, iniciaram-se estudos sobre a variabilidade genética de *P. brasiliensis* através de análises de polimorfismos de sequências gênicas por métodos moleculares. Neste sentido, Matute *et al.* (2006) demonstraram a existência de um complexo que compreende pelo menos três (3) espécies crípticas dentro de *P. brasiliensis*: espécie S1 (presente no Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela); espécie PS2 (presente no Brasil e Venezuela) e espécie PS3 (restrita à Colômbia). Estudos recentes de Theodoro *et al.* (2012) e Teixeira *et al.* (2013) sugerem a existência de uma quarta espécie, PS4, aparentemente restrita à Venezuela.

Carrero *et al.* (2008) propuseram a existência de uma nova espécie constituída por isolados que não poderiam ser incluídos nos grupos citados (S1, PS2, PS3), por demonstrar extrema divergência entre os genes codificadores de proteínas, quando comparados aos demais. Fato que, corroborou para que o isolado Pb01, também estudado por Theodoro *et al.* (2008), e seus semelhantes fossem denominados de “Pb01-like”.

Teixeira *et al.* (2009) identificaram 17 novos isolados “Pb01-like” na região Centro-Oeste do Brasil e propuseram que estes fossem considerados uma nova espécie dentro do gênero *Paracoccidioides*, onde o clado “Pb01-like” seria denominado *Paracoccidioides lutzii*.

Salgado-Salazar *et al.* (2010) realizaram análises de genes mitocondriais e apoiaram a descrição formal de *P. lutzii* como uma segunda espécie fúngica pertencente ao gênero *Paracoccidioides*.

Desta forma, com a especiação dentro do gênero associada ao conjunto de informações obtidas através de análises moleculares e/ou filogenéticas ficou clara a

existência de uma segunda espécie: *Paracoccidioides lutzii* sp, descrita por Teixeira *et al.* (2013).

Entretanto, é importante salientar que o significado da ocorrência de espécies crípticas em *Paracoccidioides* necessita de maiores esclarecimentos e estudos, especialmente aqueles relacionados a eco-epidemiologia, características fenotípicas, genotípicas, perfil antigênico, diagnóstico clínico e laboratorial, manifestações clínicas e resposta aos tratamentos antifúngicos (Machado *et al.*, 2013).

P. brasiliensis é um fungo termo-dimórfico, ou seja, em temperatura ambiente (17-28 °C) se encontra em fase miceliana ou infectante. Macroscopicamente, apresenta-se sob a forma de colônias brancas, aderentes ao meio. Microscopicamente, observam-se hifas delgadas, hialinas, septadas, multinucleadas e ramificadas com produção de clamidósporos terminais ou intercalares (Restrepo, 1985). Por outro lado, quando cultivado entre 35-37 °C ou em vida parasitária se encontra em forma de levedura; macroscopicamente, exibe colônias de coloração creme, chamadas de cerebriformes ou leveduriformes e; microscopicamente, demonstra a presença de células arredondadas ou ovais, multinucleadas, com parede celular espessa, birrefringente, rodeada por multibrotamentos (Lacaz, 1994).

A hipótese mais aceita é que a infecção humana causada por espécies fúngicas pertencentes ao gênero *Paracoccidioides* se dê principalmente pela inalação de conídios presentes em solos, coleções hídricas e plantas. Por esse motivo, trabalhadores em contato direto com ambientes propícios para o crescimento do patógeno como agropecuaristas, jardineiros, madeireiros, caminhoneiros que transportam produtos agrícolas, entre outros, estariam mais suscetíveis à exposição, infecção e doença pelo fungo (Colombo *et al.*, 2011; Bocca *et al.*, 2013).

Pouco se sabe ainda sobre o real habitat do fungo. Em 1965, Grose e Tamsitt, na Colômbia, isolaram-o das fezes de um morcego (*Artibeus lituratus*) e, em

1989, Gezuele isolou o microorganismo das fezes de um pinguim oriundo da Antártida.

Naiff *et al.* em 1986 demonstraram *P. brasiliensis* em órgãos de tatu (*Dasypus novemcinctus*). Bagagli em 1998 descreveu alta incidência de PCM-infecção em tatus encontrados na região de Botucatu, São Paulo.

O cão (*Canis lupus familiaris*) tem demonstrado algum tipo de relação com a eco-epidemiologia de *Paracoccidioides* spp. Fagundes *et al.* (2002) encontraram uma positividade de 26,5% em estudo soropidemiológico com 275 cães de áreas rurais da região de Botucatu (SP), utilizando ELISA com exoantígeno de *P. brasiliensis*. Ricci *et al.* (2004) relataram o primeiro caso de PCM-doença em cão. O animal apresentou aumento dos linfonodos cervicais e a confirmação da doença foi feita por meio de exames histopatológico, de imunohistoquímica e de biologia molecular (PCR) embora não tenha ocorrido isolamento do fungo. Recentemente, Farias *et al.* (2011) descreveram um caso de PCM em uma cadela que apresentava linfadenopatia e hepatoesplenomegalia. O diagnóstico foi confirmado por cultura, imunohistoquímica e histopatologia.

O isolamento de *P. brasiliensis* a partir de amostras de solo tem sido apontado como um fenômeno raro. Os primeiros casos descritos ocorreram em 1966 e 1967 por Negroni na Argentina. Recentemente Arantes *et al.* (2012) isolaram *Paracoccidioides* spp do solo de tocas de tatu na cidade de Botucatu, interior de São Paulo, região endêmica para a doença.

Segundo Gonzales Ochoa (1956), o mecanismo de infecção da PCM ocorre pela via aérea superior, por meio da inalação de propágulos fúngicos diminutos denominados de conídios. Uma vez inalados, sob os efeitos da temperatura corpórea do hospedeiro, alguns sistemas enzimáticos do patógeno são ativados permitindo a transformação da forma infectante em parasitária (San-Blas e San-Blas, 1984; Franco, 1986).

Uma vez inalado, o agente etiológico da PCM, pode ser destruído no parênquima pulmonar por células fagocíticas inespecíficas ou multiplicar-se e produzir foco de infecção, o qual é drenado para o linfonodo regional localizado no hilo pulmonar, produzindo uma lesão linfática satélite, caracterizando assim, o complexo primário da doença. No entanto, estas lesões podem regredir espontaneamente em indivíduos imunocompetentes, com destruição total ou parcial do patógeno (López e Restrepo, 1983; Benard, 2008). Importante salientar não ser rara a observação da existência ou detecção de cicatriz imunológica, sendo este um dos fatores que caracterizam a forma subclínica desta micose (Lacaz *et al.*, 1959).

Eventualmente, as células fúngicas contidas no complexo primário podem disseminar-se por via hematogênica e/ou linfática, atingindo órgãos e tecidos adjacentes, causando a forma juvenil ou aguda da doença (Londero e Del Negro, 1986; Benard, 2008). No entanto, muitos indivíduos permanecem com o complexo primário cicatricial, contendo leveduras viáveis, denominados de focos quiescentes, que podem evoluir para PCM crônica anos após a infecção (Franco, 1986; Benard, 2008).

San-Blas e San-Blas (1977, 1994) verificaram que polissacarídeos como α -(1,3) glucana (presente na parede celular da levedura) e β -(1,3) glucana (presente na parede celular do micélio) estão relacionados ao dimorfismo fúngico e à virulência deste patógeno. Os mesmos autores, ao estudarem diferentes isolados de *P. brasiliensis*, sugeriram que a α -(1,3) glucana protege o fungo contra enzimas digestivas produzidas pelos leucócitos e macrófagos do hospedeiro. Segundo San-Blas (1982), o parasitismo por *P. brasiliensis* ocorre quando este se transforma em levedura no início do processo infeccioso, evadindo-se, assim, da ação de enzimas fagocíticas, uma vez que os fagócitos humanos são capazes de produzir apenas β -glucanases, as quais digerem somente a β -(1,3) glucana.

Deve-se ressaltar que *P. brasiliensis* apresenta fatores inerentes envolvidos no aumento de sua virulência. Neste sentido destacam-se moléculas de parede celular como os lipídeos e os polissacarídeos (San-Blas, 1982), além da

glicoproteína de 43 kDa, a gp43, reconhecida por ser o antígeno imunodominante do patógeno, a qual atua como receptor de laminina, facilitando o processo de invasão com consequente disseminação tecidual (Lopes *et al.*, 1994; Vicentini *et al.*, 1994).

Atualmente, além das próprias manifestações clínicas da PCM são levados em consideração também, os parâmetros imunológicos da enfermidade (Franco *et al.*, 1987; Mendes, 1994, Bocca *et al.*, 2013). A classificação proposta por Franco *et al.* (1989) apresenta três diferentes formas de PCM: PCM-infecção, PCM-doença e PCM-residual (sequela).

A PCM-infecção é considerada a forma assintomática desta patologia, pois é observada em indivíduos que apresentam positividade em testes cutâneos frente a paracoccidiodina. Nestes indivíduos observam-se intensas reações intradérmicas e a imunidade celular apresenta-se preservada (Franco, 1986; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006).

A PCM-doença é dividida em duas formas: aguda (juvenil) e crônica (adulta). A forma aguda acomete predominantemente crianças, adolescentes e adultos jovens (menores de 30 anos), de ambos os sexos, apresentando quadros mais severos, manifestações clínicas decorrentes do rápido e progressivo envolvimento do sistema mononuclear fagocitário, e elevados níveis de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis* (Franco, 1986; Del Negro *et al.*, 1994; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006; Bocca *et al.*, 2013).

A forma crônica acomete principalmente adultos do sexo masculino em idade produtiva, 40 a 50 anos. Representa 90% dos casos, e a doença desenvolve-se a partir de um foco quiescente (Del Negro *et al.*, 1994), caracterizando-se por apresentar curso de evolução lento. Acredita-se que a reativação ocorra possivelmente por um *déficit* imunológico, manifestando-se anos após o contato do hospedeiro com o agente etiológico, podendo comprometer um único órgão (unifocal) ou disseminar-se para outros órgãos (multifocal) (Franco, 1986; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006). O pulmão, órgão acometido com maior frequência, dá origem a

manifestações clínicas de maneira insidiosa. Lesões de mucosa oral, faringe e laringe são muito comuns. Podem ocorrer também lesões cutâneas inicialmente papulares que evoluem para ulcerações (Franco *et al.*, 1987, Bocca *et al.*, 2013).

A PCM-residual é marcada por sequelas, acometendo 60% da população das áreas endêmicas, comprometendo principalmente os tecidos: pulmonar, onde os propágulos fúngicos induzem fibrose (enfisema e dispnéia); adrenal (Síndrome de Addison), laríngeo (estenose e rouquidão), digestivo, encefálico (hipertensão intracraniana), etc (Restrepo, 1992; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006; Mendes *et al.*, 2008).

Diferente de outros fungos patogênicos, *P. brasiliensis* é sensível à maioria das drogas antifúngicas. Desta forma, vários antifúngicos podem ser utilizados para o tratamento desses pacientes, tais como, sulfamídicos (sulfadiazina, associação sulfametoxazol-trimetoprim), anfotericina B e azólicos (cetoconazol, fluconazol, itraconazol) (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006; Mendes *et al.*, 2008).

Segundo o Consenso Brasileiro em Paracoccidioidomicose, todos os casos confirmados e prováveis da doença devem ser tratados. A conduta terapêutica deve obrigatoriamente incluir medidas de suporte às complicações clínicas associadas ao envolvimento de diferentes órgãos pela micose, aporte nutricional adequado, além da terapêutica antifúngica específica. Os pacientes deverão ser acompanhados periodicamente até apresentarem os critérios de cura (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006; Mendes *et al.*, 2008).

A PCM apresenta distribuição geográfica restrita a países da América Latina, com maior incidência e prevalência na Colômbia, Venezuela e Brasil (Wanke e Londero, 1994; Calle *et al.*, 2001; Colombo *et al.*, 2011).

Estima-se que, aproximadamente, 10 milhões de pessoas estejam infectadas por *P. brasiliensis* nas regiões endêmicas da América Latina, no entanto, a maioria

não apresenta sintomas clínicos (Brummer *et al.*, 1993; Restrepo, 2000; Colombo *et al.*, 2011).

O Brasil concentra aproximadamente 80% dos casos registrados na América Latina. As regiões com maior prevalência são: Sul, Sudeste e Centro-Oeste, especialmente os Estados do Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso (Franco *et al.*, 1989; Wanke e Londero, 1994; Calle *et al.*, 2001; Restrepo *et al.*, 2001; Barrozo *et al.*, 2009; Wanke e Aidê, 2009; Barrozo *et al.*, 2010; Colombo *et al.*, 2011). Tem chamado atenção a ocorrência de casos em áreas de colonização mais recente, submetidas a desmatamento, como em partes da Amazônia, atingindo áreas dos estados do Maranhão, Tocantins, Pará, Rondônia, Acre e Amazonas, onde a PCM pode ser considerada uma micose sistêmica emergente (<http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area>).

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).

O Estado de São Paulo configurou por muitos anos, como responsável pela maior frequência de relatos da doença (Marques *et al.*, 1983; Blotta *et al.*, 1999; Santo, 2008; Kamikawa *et al.*, 2012). Contudo, deve-se salientar que o Estado de Rondônia vem consolidando-se como região emergente para o processo infeccioso causado por *Paracoccidioides* spp. Segundo comunicação pessoal de Durlacher e Lima, no período de 1998 a 2005, foram relatados mais de 1170 casos da micose neste Estado.

Kamikawa *et al.* (2012) demonstraram que 60% dos municípios do Estado de São Paulo apresentam ao menos um paciente com anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis*, detectados pela técnica de imunodifusão dupla em gel de agarose (ID). Segundo os autores, a maior parte dos pacientes sorologicamente reagentes para *P. brasiliensis* concentra-se nas macro-regiões de Campinas, São Paulo, Grande São Paulo, Sorocaba e São João da Boa Vista. Os autores chamam a atenção para o fato das maiores taxas de reatividade terem sido observadas nos municípios de Piracicaba, Franca, Araçatuba e Presidente Prudente. Por outro lado, salientam que estes dados não refletem a real magnitude da micose no Estado de São Paulo visto que não foram incluídas no estudo os serviços de referência de Botucatu, Ribeirão Preto, Araraquara e Bauru.

Segundo Pinto *et al.* (2012), no período de 2008 a 2011, 117 casos novos da micose foram “notificados” à Divisão de Tuberculose e outras Pneumopatias do Centro de Vigilância Epidemiológica Prof. Alexandre Vranjac de São Paulo. Entretanto, segundo os autores, estes dados estão subnotificados visto que das doze unidades de referência para atendimento da PCM, apenas quatro notificaram o sistema de vigilância estadual.

O diagnóstico considerado como padrão ouro na PCM é o isolamento do agente etiológico em cultura e/ou a identificação do fungo em exame a fresco (Lacaz *et al.*, 2002; Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006; Mendes *et al.*, 2008). Para o isolamento de *P. brasiliensis*, recomenda-se o emprego de meios de cultura 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 e seu crescimento é lento (15 a 30 dias) sob a forma de micélio aéreo curto apresentando colônias irregulares brancas ou amarronzadas, cotonosas ou glabras. Contudo, para o diagnóstico definitivo e a identificação correta do microrganismo é necessário realizar a reversão da cultura da fase miceliar para leveduriforme. Nesta fase, a levedura pode ser cultivada em meio Kelley à base de ágar-hemoglobina, incubando

a temperatura de 35-37 °C (Lacaz, 1977; Brummer *et al.*, 1993; Lacaz, 1994; Ferreira e Ávila, 2001; Mendes-Giannini e Melhem, 2001; Lacaz *et al.*, 2002).

No exame a fresco, na maioria das vezes, as leveduras de *P. brasiliensis* podem ser visualizadas ao microscópio óptico. Para a pesquisa do agente etiológico da PCM, normalmente empregam-se secreções do trato respiratório, raspado e crostas de lesões ulceradas, fragmento de biópsia, aspirado de linfonodos, urina, líquido cefalorraquidiano (LCR), entre outros. Em material de punção ganglionar, por exemplo, visualizam-se células globosas, ovais ou elípticas com 5 a 25 µm de diâmetro, inclusões citoplasmáticas e multibrotamentos com parede de duplo contorno refringente. Nos casos onde a biópsia é possível, colorações especiais como o Gomori-Grocott ou ácido periódico de Schiff podem auxiliar no diagnóstico por meio da observação no interior dos granulomas de células típicas multibrotantes. As células em múltiplo brotamento são esféricas (10 a 20 µm de diâmetro) e os brotos encontram-se dispostos ao redor da célula mãe (Brummer *et al.*, 1993; Lacaz, 1994, Lacaz *et al.*, 1998; Lacaz *et al.*, 2002).

O diagnóstico micológico e/ou histopatológico da paracoccidioidomicose merece especial atenção, pois em algumas ocasiões formas teciduais de *P. brasiliensis* podem se assemelhar a leveduras de *Histoplasma capsulatum* (Lacaz, 1994), *Coccidioides immitis* (Greer, 1990), *Blastomyces dermatitidis* (Salfeder, 1979; Figueroa *et al.*, 1994), *Candida* spp e *Cryptococcus* spp (Mendes *et al.*, 2008). Desta forma, para evitar a liberação equivocada de resultados, recomenda-se a realização do diagnóstico diferencial.

Outro aspecto que pode interferir de forma significativa no resultado final da análise micológica e/ou histopatológica diz respeito à integridade da amostra. Diante do exposto, a amostra a ser avaliada deve ser cuidadosamente coletada, armazenada e transportada, permitindo que o agente etiológico seja corretamente cultivado, isolado e quando possível identificado (Ferreira-da-Cruz *et al.*, 1990).

Importante salientar que a PCM principalmente em sua forma pulmonar deve ser diferenciada de outras micoses bem como da tuberculose. Os achados clínicos e radiológicos são inespecíficos; no entanto, calcificação extensa, efusão pleural e localização apical são sugestivas de histoplasmose e tuberculose. O diagnóstico diferencial com leishmaniose também assume grande importância, uma vez que as regiões endêmicas para esta patologia coincidem muitas vezes com as da PCM, sendo que as lesões orais, cutâneas e de fossas nasais são bastante semelhantes. O comprometimento do sistema linfático simula Doença de Hodgkin e outras doenças malignas (Mendes-Giannini e Melhem, 2001).

É evidente o fato de que o diagnóstico de certeza de processos infecciosos derive da demonstração e do reconhecimento do agente etiológico em preparados histológicos, exame direto ou em cultivo. Tais procedimentos são entendidos como técnicas diretas de diagnóstico. No entanto, 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), associa-se ainda a esta observação, o longo tempo necessário para o isolamento do fungo.

Nestes casos, a pesquisa de anticorpos e antígenos específicos circulantes no soro de pacientes assume grande importância no diagnóstico indireto da infecção. As técnicas indiretas são aquelas que permitem inferir o diagnóstico com certo grau de certeza, otimizando o tempo utilizado para se obter resultados, aliando sensibilidade à especificidade. Os ensaios imunológicos constituem-se, na prática, na mais importante dessas técnicas auxiliares (Kaufman e Reiss, 1986; Mendes-Giannini *et al.*, 1989; Ferreira-da-Cruz *et al.*, 1990; Freitas-da-Silva e Roque-Barreira, 1992; Figueroa *et al.*, 1994; Hamilton, 1998; Do Valle *et al.*, 2001; Camargo, 2008), sendo que em alguns casos, o resultado sorológico é a primeira indicação da infecção micótica nos pacientes, principalmente naqueles que ainda não apresentam lesões clínicas aparentes (Mendes-Giannini *et al.*, 1984).

Apesar de técnicas sorológicas como imunodifusão dupla em gel de agarose [ID] (Da Silva *et al.*, 1989; Ferreira-da-Cruz *et al.*, 1990; Del Negro *et al.*, 2000; Do Valle *et al.*, 2001; Camargo, 2008), contraímuno-eletoforese [CIE] (Fiorillo e Martinez, 1984; Bueno *et al.*, 1997; Del Negro *et al.*, 2000), *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* [ELISA] (Camargo *et al.*, 1984; Mendes-Giannini *et al.*, 1984; Rodrigues *et al.*, 1984; Cano *et al.*, 1986; Gómez *et al.*, 1998; Hamilton, 1998; Ortiz *et al.*, 1998; Del Negro *et al.*, 2000; De Almeida *et al.*, 2002; Díez *et al.*, 2003; Marques-da-Silva *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2008; Sylvestre *et al.*, 2014) e *immunoblotting* [IB] (Do Valle *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2006; Bertoni *et al.*, 2012; Perenha-Viana *et al.*, 2012; Passos, 2012), serem empregadas para o diagnóstico presuntivo e/ou confirmatório da PCM visando a pesquisa de anticorpos e/ou antígenos circulantes, os índices de resultado falso-positivos e falso-negativos ainda são muito elevados, especialmente nas técnicas de maior sensibilidade como as imunoenzimáticas (ELISA e IB); estando portanto, a especificidade e sensibilidade dos ensaios imunológicos, diretamente relacionados ao antígeno (Ag) ou a preparação antigênica empregada (Puccia e Travassos, 1991; Do Valle *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2006).

Segundo Siqueira (1982) e Mendes-Giannini *et al.* (1994) as técnicas sorológicas utilizadas nos centros especializados podem apresentar em torno de 90%, chegando a 100% de sensibilidade dependendo do ensaio, da preparação antigênica utilizada, da forma clínica da doença e do início do tratamento.

P. brasiliensis apresenta uma multiplicidade de componentes antigênicos em sua constituição (Yarzabal, 1971), alguns próprios da espécie e outros comuns aos demais fungos.

Segundo Restrepo *et al.* (1984), estes antígenos podem ser extraídos da parede celular do fungo, obtidos do conteúdo citoplasmático (somático ou citoplasmático) ou ainda do filtrado de cultura (metabólico ou exocelular). Contudo, dados da literatura demonstram grande variabilidade na metodologia de produção de antígenos de *P. brasiliensis* pelos diferentes centros de pesquisa (Cano e Restrepo,

1987; Camargo *et al.*, 1988; Del Negro *et al.*, 1991; Kloth *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2006; Vicentini-Moreira, 2008). Pode-se dizer, portanto, que a falta de protocolo padronizado para a obtenção de antígenos interfere diretamente na acurácia e na reprodutibilidade dos diferentes ensaios sorológicos (Vicentini-Moreira, 2008).

Historicamente, na paracoccidioidomicose, a sorologia, além de importante auxílio diagnóstico, tem a função de monitorar o curso da doença durante e após o tratamento; a técnica utilizada, portanto, há que aliar sensibilidade à especificidade, para que o valor preditivo seja máximo e reprodutível (Silva *et al.*, 2006; Vicentini-Moreira, 2008; Vicentini *et al.*, 2011). Para tanto, o substrato antigênico é parte fundamental da técnica, e, nesse sentido, o mais importante avanço foi a identificação e purificação da glicoproteína de 43 kDa, gp43, como antígeno exocelular, imunodominante e relatado como específico de *P. brasiliensis* (Puccia *et al.*, 1986).

A gp43, porém, não é uma molécula totalmente específica, na medida em que sua fração glicídica contém epítomos capazes de serem reconhecidos por soros de pacientes portadores de outras doenças fúngicas, principalmente soros contendo anticorpos anti-*Histoplasma capsulatum* (Camargo *et al.*, 1984; Mendes-Giannini *et al.*, 1984; Puccia e Travassos, 1991; Silva *et al.*, 2006; Vicentini-Moreira, 2008).

A técnica sorológica de maior importância utilizada rotineiramente para o diagnóstico da PCM é a imunodifusão dupla em gel de agarose, tendo Ferri (1961) como pioneiro no emprego da mesma. A ID apresenta especificidade e valor preditivo próximos a 100%, sensibilidade variando de 70 a 90%, baixo custo operacional; sendo de fácil execução, não necessitando de automação, além de permitir a avaliação da eficácia terapêutica através do acompanhamento dos títulos de anticorpos antifúngicos específicos (Cano e Restrepo, 1987; De Camargo e De Franco, 2000; Elias Costa *et al.*, 2000; Do Valle *et al.*, 2001; Mendes-Giannini e Melhem, 2001; Camargo, 2008; Teles e Martins, 2011).

O emprego de preparações antigênicas distintas na realização do ensaio de ID é relatado por inúmeros trabalhos da literatura (Silva, 2005; Camargo, 2008; Vicentini-Moreira, 2008). Entretanto, devido à simplicidade na produção aliada a alta estabilidade, a maioria dos grupos tem optado por utilizar exoantígeno bruto obtido a partir de células leveduriformes de *P. brasiliensis*, obtendo índices de sensibilidade e especificidade de 94% e 100%, respectivamente (Cano e Restrepo, 1987; Camargo *et al.*, 1988; Marques-da-Silva *et al.*, 2005; Camargo, 2008).

Quando se utiliza como antígeno o 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 na ID. 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 a mesma, a última a desaparecer após a instauração da terapia antifúngica. O número de linhas observadas está relacionado à severidade da doença (Siqueira, 1982; Mendes-Giannini *et al.*, 1994).

A mistura antigênica chamada Ag7 composta por aproximadamente 90% de gp43, tem fornecido resultados com sensibilidade de 84,3% e especificidade de 98,9% em diferentes centros de diagnóstico, no entanto, apresenta menor valor preditivo na avaliação do acompanhamento sorológico durante e depois do tratamento (Marques, 2003).

Del Negro *et al.* (2000) avaliaram por ID soros de 43 pacientes com PCM ativa frente ao antígeno de filtrado de cultura de *P. brasiliensis*, demonstrando 95,3% de reatividade.

Silva *et al.* (2006) avaliaram por ID, 75 amostras de soros de pacientes com PCM comprovada frente a diferentes preparações antigênicas, demonstrando 90% de reatividade para antígeno somático e componentes solúveis da superfície externa da parede celular de *P. brasiliensis*; 86,6% para *cell-free antigen*; 83,3% para

antígeno metabólico; 80% para antígeno 113 NGTA e 76,6% para antígeno 113 Negróni.

Do Valle *et al.* (2001) avaliaram por ID soros de 245 pacientes na fase de pré-tratamento frente a antígeno de filtrado de cultura de leveduras concentradas e dialisadas a partir de um *pool* de isolados de *P. brasiliensis*, demonstrando 90,2% de sensibilidade.

As técnicas imunoenzimáticas como, por exemplo, ELISA e *immunoblotting* possuem alta sensibilidade e foram usadas inicialmente para caracterizar a resposta humoral geral aos antígenos de *P. brasiliensis* (Blotta e Camargo, 1994; Camargo *et al.*, 1994; Mendes-Giannini *et al.*, 1994).

Segundo Mendes-Giannini *et al.* (1989), 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-gp43 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 Manual da Vigilância da Paracoccidiodomicose do Estado de São Paulo preconiza, para o imunodiagnóstico de pacientes com suspeita clínica desta patologia, a utilização do teste de ELISA, como triagem sorológica, seguida de imunodifusão dupla em amostras reagentes. Em caso de resultados discordantes entre estas metodologias, recomenda-se a realização do *immunoblotting* (Mendes *et al.*, 2008). Apesar desta recomendação, esta realidade não é observada na prática laboratorial, e como já mencionado, na grande maioria dos laboratórios de mico-

sorologia, a técnica frequentemente utilizada é a imunodifusão dupla em gel de agarose.

Por meio da técnica de IB, Camargo *et al.* (1989) e Restrepo (1992) verificaram que anticorpos IgG anti-*P. brasiliensis* reagem com quatro principais componentes fúngicos de 70, 52, 43 e 20-21kDa, presentes no antígeno Ag7, obtido a partir do isolado B-339; predominando a glicoproteína de 43kDa (gp43), reconhecida por 100% dos soros de pacientes com PCM.

Apesar do *immunoblotting* ser uma metodologia extremamente sensível, a mesma permanecia, até pouco tempo, inacessível à rotina diagnóstica da PCM, sendo seu emprego frequentemente relacionado ao estudo de imuno-caracterização de antígenos de *P. brasiliensis* (Restrepo, 1992; Elias Costa *et al.*, 2000; Passos, 2012).

Segundo Del Negro *et al.* (1995), casos de pacientes que não apresentam reatividade para *P. brasiliensis* pelas provas de imunodifusão dupla e contraímuno-eletoforese (CIE), quando avaliados por IB, reagem frente às moléculas de 43 e 70kDa, consideradas marcadores sorológicos da doença.

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 a fração purificada de 43kDa. A partir do décimo mês de tratamento, a detecção da mesma era 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.

Perenha-Viana *et al.* (2012) avaliaram a segurança e sensibilidade sorológica da metodologia de *western blot* (WB) visando o diagnóstico rápido e eficaz da PCM. O desempenho da técnica foi avaliada frente 517 amostras de soro de pacientes

com suspeita clínica da doença, empregando exoantígeno bruto da cepa B-339 de *P. brasiliensis*. Os resultados sorológicos foram comparados àqueles obtidos pela reação de imunodifusão dupla em gel de agarose (ID), considerada o padrão ouro sorológico. Do total de amostras avaliadas, 250 (48,4%) apresentaram reatividade ao patógeno por WB enquanto por ID a reatividade foi de 27%. Dentre as 337 amostras com ausência de reatividade por ID, 29% foram reconhecidas pela preparação antigênica, comprovando uma maior sensibilidade da técnica quando comparada a ID. Neste estudo, a metodologia de *western blot* apresentou uma sensibilidade maior (95,5% para soros diluídos a 1:50 e 91,8% para os diluídos a 1:400) quando comparada à sensibilidade de 80% (soro puro) da imunodifusão dupla. Entretanto, a especificidade do *western blot* foi inferior (54,5% para soros diluídos a 1:50 e 63,5% para os diluídos a 1:400) aquela obtida pelo teste padrão ouro sorológico (93,6%).

Resultados apresentados por Passos (2012) avaliando os parâmetros intrínsecos dos ensaios de ID e IB, frente a 36 amostras de soro de pacientes com PCM ativa e 49 soros de doadores de sangue, demonstraram para ID sensibilidade de 81% e eficiência de 92%. Para o IB, a sensibilidade foi de 94% e eficiência de 98%. Para ambas as técnicas a especificidade foi de 100%. A análise de concordância (índice *kappa* de Cohen) entre ambas foi considerada boa ($k=0,76$). A autora concluiu que as metodologias são complementares para o diagnóstico presuntivo, prognóstico da doença e possível detecção precoce do processo infeccioso.

Importante salientar, que os trabalhos relacionados à utilização da metodologia de ELISA encontrados em bases de dados bibliográficos como *PubMed* e *Scielo*, direcionados a pesquisa de anticorpos circulantes anti-*Paracoccidioides brasiliensis* apresentam falta de padronização, especialmente quanto à preparação antigênica utilizada. Neste sentido, dados da literatura revelam o emprego de misturas de antígeno bruto, parcialmente purificado ou purificado (glicoproteína de 43 kDa ou gp43). Além disso, poucos trabalhos correlacionam informações entre os resultados obtidos e a metodologia empregada.

O teste de ELISA tem sido utilizado para a detecção de anticorpos em quase todas as micoses sistêmicas, senão em todas. Apesar disso, em relação ao imunodiagnóstico da paracoccidioidomicose, a técnica, devido sua elevada sensibilidade e baixa especificidade, ainda oferece grande porcentagem de reatividade cruzada, principalmente frente a soros de pacientes com histoplasmose, candidíase, Doença de Jorge Lobo e, também, frente a soros de pessoas aparentemente saudáveis, residentes em áreas endêmicas para PCM (Maluf *et al.*, 2003; Albuquerque *et al.*, 2005).

Pons *et al.* (1976) foram os pioneiros no emprego da metodologia de ELISA visando a detecção de anticorpos anti-*P. brasiliensis*. Desde então, esta técnica sorológica tem sido o alvo de inúmeras publicações visando a detecção de anticorpos séricos anti-*P. brasiliensis* (Camargo, 2008) bem como de antígenos circulantes (Freitas-da-Silva e Roque-Barreira, 1992; Gómez *et al.*, 1998; Marques-da-Silva *et al.*, 2004 a,b).

Segundo Camargo (2008) o emprego de antígenos distintos tem conferido geralmente alta sensibilidade, mas não necessariamente alta especificidade à reação de ELISA.

Mendes-Giannini *et al.* (1984) contribuíram substancialmente para o desenvolvimento da metodologia de ELISA visando a pesquisa de anticorpos séricos anti-*P. brasiliensis*, os autores padronizaram um ensaio de ELISA de absorção para o imunodiagnóstico da PCM empregando como antígeno filtrado de cultura de três isolados de *P. brasiliensis* (113, 150 e 666), obtendo 100% de sensibilidade e 88% de especificidade. Os autores demonstraram, entretanto, a ocorrência de reatividade cruzada frente a soros de pacientes portadores de micoses como histoplasmose e Doença de Jorge Lobo. Buscando eliminar ou minimizar esses índices de resultados falso-positivos, as amostras de soros foram primeiramente absorvidas com antígeno de *Histoplasma capsulatum*.

Camargo *et al.* (1984) avaliaram a metodologia de ELISA para detecção e quantificação de anticorpos séricos anti-*P. brasiliensis* utilizando antígeno metabólico obtido a partir de células leveduriformes. Segundo os autores, o tratamento prévio com células inativadas de *Candida albicans* diminuiu a reatividade cruzada frente a soros de pacientes portadores de outras doenças fúngicas. Os autores avaliaram o ensaio de ELISA frente a amostras de soro de pacientes com PCM e com outras micoses sistêmicas, e fixando um *cut-off* de 0,150, demonstraram sensibilidade de 95%, sugerindo que o teste poderia fornecer novas perspectivas para o diagnóstico sorológico da paracoccidioidomicose.

Melhores resultados foram obtidos empregando *magnetic*-ELISA utilizando antígeno somático, verificando-se 14,2% de reatividade cruzada com soro de pacientes com histoplasmose, no qual a taxa de densidade óptica (DO) dos soros positivos para PCM esteve entre 0,800 e 2,600 (Camargo *et al.*, 1984b), indicando também melhores resultados no seguimento sorológico dos pacientes quando comparado a outros testes, como fixação de complemento (Campos *et al.*, 1990).

A sensibilidade e a especificidade dos métodos sorológicos está intimamente relacionada ao tipo de preparação antigênica utilizada na condução da reação bem como o *cut-off* adotado e, especificamente para ensaios imunoenzimáticos, como o ELISA (Camargo *et al.*, 1984).

Em 1986, Cano *et al.* avaliaram o desempenho do ensaio de ELISA empregando antígeno citoplasmático de *P. brasiliensis*, demonstrando que 66% dos soros analisados reagiram a títulos maiores ou iguais a 1:128. Apenas 4 a 5% dos soros de doadores normais, pacientes com histoplasmose e outras micoses sistêmicas reagiram a essa diluição, conferindo 95% de especificidade ao teste.

Sene (2001) avaliou o desempenho (sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e eficiência) de três ensaios sorológicos (imunofluorescência indireta, imunodifusão dupla em gel de agarose e ELISA) para a pesquisa de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis* antes e após a introdução do

tratamento de pacientes portadores das formas aguda e crônica da doença, empregando como antígeno uma mistura de filtrado de cultura e antígeno somático, segundo especificações de Silva *et al.* (1991). O autor observou para os soros obtidos de pacientes com as diferentes formas clínicas de PCM tanto na fase pré quanto na fase pós-tratamento que a metodologia de ELISA apresentou índice mais elevado de sensibilidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e eficiência (100%, 95%, 100% e 97,4%) quando comparado aos mesmos parâmetros obtidos por imunofluorescência (92,3%, 87,5%, 92,0%, 88,6%) e imunodifusão (94,9%, 97,4%, 95,0% e 96,2%). A especificidade das três metodologias avaliando-se amostras de soro de indivíduos doadores de sangue foi de 93,3%, 100% e 100%, respectivamente para imunofluorescência, imunodifusão e ELISA. Já frente a amostras de soro de pacientes portadores de outras micoses a especificidade foi de 60%, 90% e 80%, respectivamente. Observou-se ainda, que durante o tratamento a maior correlação foi observada entre imunodifusão e ELISA ($r = 0,61591$, $p < 0,05$).

Segundo Albuquerque *et al.* (2005), o tratamento da proteína de 43 kDa com metaperiodato de sódio ou ainda, a absorção da mesma com células de *Candida albicans* ou *Histoplasma capsulatum*, não são suficientes para elevar a especificidade da metodologia, registrando que a mesma não excedeu 84%, provavelmente devido à maior exposição de epítomos de carboidrato constituintes da gp43 após o acoplamento em placas de poliestireno. Interessante enfatizar que apesar da reatividade cruzada, a reação de ELISA, normalmente, tem apresentado bons resultados especialmente na diferenciação dos níveis de anticorpos produzidos nas diferentes formas clínicas bem como no seguimento sorológico de pacientes com PCM durante o tratamento (Del Negro *et al.*, 2000; Mamoni *et al.*, 2001).

Fernandes *et al.* (2011) avaliaram a capacidade antigênica dos antígenos recombinantes rPb27 e rPb40 de *P. brasiliensis* isoladamente ou associados empregando-se como ensaio sorológico o ELISA frente a 109 amostras de soro de pacientes com PCM, 18 amostras de soro de pacientes com outros tipos de micoses (histoplasmose, criptococose, aspergilose, cromoblastomicose), 62 soros de pacientes com outros tipos de doenças (parasitárias e/ou bacterianas) e 23 amostras

de soro de indivíduos saudáveis. Os resultados obtidos revelaram índices de sensibilidade de 54%, 89% e 96% para rPb40, rPb27 e associação rPb27+ rPb40, respectivamente. Não houve diferença percentual de especificidade (100%) frente a amostras de indivíduos saudáveis para todas as condições avaliadas. Entretanto, o maior índice de especificidade foi observado quando empregou-se a combinação de ambos os antígenos recombinantes frente a soros de pacientes portadores de infecção causadas por outras espécies fúngicas (75% para rPb40, 78% para rPb27 e 100% para rPb40+rPb27).

Pereira (2012) avaliou o desempenho da metodologia de ELISA frente a 145 amostras de soro de 83 pacientes com paracoccidiodomicose confirmada, 13 amostras de soro de pacientes reagentes por imunodifusão dupla para histoplasmose (11) e aspergilose (2) e 49 amostras de soro de indivíduos doadores de sangue, empregando como antígeno filtrado de cultura obtido a partir do isolado 192 de *P. brasiliensis*, cultivado em caldo NGTA a 37 °C, sob agitação constante (100 rpm) durante 30 dias. A autora verificou que a sensibilidade da técnica frente à amostragem avaliada foi de 93,9%, especificidade de 89,7% para as amostras de doadores de sangue e 23,1% para os soros de pacientes com outras micoses pulmonares, valor preditivo positivo de 88,5%, valor preditivo negativo de 90,3% e acurácia de 86,2%.

Recentemente Sylvestre *et al.* (2014) avaliaram a performance do teste de ELISA empregando como preparação antigênica filtrado de cultura obtido a partir da cepa B-339 de *P. brasiliensis* frente a 200 amostras de soro de pacientes com paracoccidiodomicose e 200 amostras de soro de indivíduos sadios, doadores de banco de sangue. Foram avaliados dois *cut-off* distintos, ou seja, 0,710 e 0,850, observando-se valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia de 96%, 95%, 95%, 96% e 95,5% para o primeiro ponto de corte e de 96,9%, 95,1%, 95%, 97% e 96% para o segundo ponto de corte.

Neste mesmo estudo os autores observaram, avaliando soros de pacientes com outras doenças pulmonares, elevada prevalência de resultados falso-positivos,

principalmente quando a densidade óptica de 0,710 foi utilizada como *cut-off*, encontrando 41,4% de reatividade cruzada para tuberculose, 35,8% para histoplasmose e 43,5% para bola fúngica aspergilar.

Camargo *et al.* (1994) avaliaram a aplicabilidade da reação de ELISA de captura empregando anticorpos monoclonais anti-gp43 para detecção de imunoglobulina G anti-gp43. Os autores obtiveram índices de sensibilidade e especificidade superiores aos obtidos por outros ensaios enzimáticos, ou seja, 100% e 96,7%, respectivamente. Contudo, o emprego desta metodologia na rotina laboratorial implica em profissionais especificamente qualificados no preparo dos constituintes do método, como antígeno purificado e anticorpo monoclonal, apesar de pouco tempo requerido para o resultado.

No mesmo estudo, a gp43 foi analisada também por ELISA indireto, utilizando amostras de soro de pacientes com PCM comprovada e soros de pacientes portadores de outras infecções fúngicas, demonstrando que as amostras de soro, principalmente, histoplasmose e Doença de Jorge Lobo reagem na mesma faixa das amostras de pacientes com PCM ativa. Esses resultados contraditórios podem ser explicados pela forma como a gp43 é apresentada para os anticorpos nos diferentes ensaios. Quando a gp43 é fixada em substratos sólidos, em placas de ELISA, por exemplo, ocorrem mudanças conformacionais na molécula, fazendo com que os epítomos sejam reconhecidos por soros de pacientes portadores de outras infecções fúngicas que não paracoccidiodomicose, e quando a molécula está em solução, como no ELISA de captura, a gp43 assume diferentes conformações, apresentando epítomos mais reativos com anticorpos específicos. A deglicosilação da gp43 frequentemente elimina a reação com soros de pacientes com outras doenças fúngicas (Travassos, 1994).

É indiscutível que o ensaio de ELISA de captura representou um avanço na detecção de anticorpos específicos, uma vez que utiliza anticorpos monoclonais específicos contra gp43, no entanto, a dificuldade de obtenção destes imunobiológicos torna o ensaio inviável para muitas instituições. Além disso, deve-se

salientar que o ensaio de ELISA de captura apresenta custo superior quando comparado ao método convencional/clássico. Em contrapartida, o ensaio de ELISA convencional tem-se mostrado uma metodologia excelente para a detecção de anticorpos em resposta à PCM para muitos laboratórios, devido a sua fácil execução, a não necessidade do emprego de anticorpo monoclonal, por fornecer resultados quantitativos, por permitir automação, e ter capacidade de detectar nanogramas de anticorpos por mililitro de soro apresentando alta sensibilidade, variando de 95 a 100% (Camargo *et al.*, 1984; Mendes-Giannini *et al.*, 1994).

A partir do sucesso obtido com metodologias direcionadas à detecção de antígenos circulantes em outras doenças fúngicas, tais como candidíase (Matthews e Burnie, 1988), criptococose (Snow e Dismukes, 1975), aspergilose (Weiner e Coats-Stephens, 1979) e histoplasmose (Wheat *et al.*, 1986), foram conduzidas investigações com o intuito de detectar antígenos circulantes de *P. brasiliensis* nos fluidos biológicos de pacientes com a doença.

Freitas-da-Silva e Roque-Barreira (1992) avaliaram a detecção de antígenos circulantes de *P. brasiliensis* (antigenemia) em pacientes portadores de PCM através de um ELISA de competição, capaz de detectar 6ng de antígeno por mililitro de soro. Vinte e sete (30,68%) das 88 amostras de soro testadas mostraram-se reativas principalmente nos soros de pacientes com a forma aguda da doença. Segundo os autores, o seguimento de um caso mostrou correlação entre os níveis de antígenos detectados no soro e a evolução da doença. Reações falso-positivas foram observadas frente a soros de pacientes com histoplasmose, criptococose e aspergilose.

O emprego de anticorpos monoclonais para o imunodiagnóstico da PCM, foi avaliado inicialmente pela metodologia de ELISA de inibição empregando anticorpos monoclonais da classe IgG de camundongos BALB/c direcionados a uma proteína de 87 kDa, derivada de filtrado de cultura de leveduras de *P. brasiliensis*, revelando sensibilidade de 100% na detecção de antígenos em pacientes portadores da forma aguda e, 83,3% e 60% respectivamente para pacientes portadores das formas

crônica unifocal e multifocal, detectando concentração média de antígenos de 15 µg/mL de soro. Entretanto, a reatividade cruzada foi elevada frente a soros de pacientes acometidos por outras micoses tais como aspergilose e histoplasmoses. Neste trabalho, avaliou-se também a presença deste antígeno na urina de pacientes com a doença ativa, encontrando-se uma concentração média de 8,37 µg/mL (Gómez *et al.*, 1997).

O emprego do ELISA de inibição também gerou resultados satisfatórios em relação ao seguimento sorológico dos pacientes, pois se obteve correlação significativa entre o declínio da concentração de antígeno circulante nos fluidos biológicos dos pacientes com PCM, de ambas as formas clínicas, e a melhora ou mesmo cura clínica (Gómez *et al.*, 1998).

Marques-da-Silva *et al.* (2003; 2005; 2006) empregaram o ELISA de inibição para avaliar a antigenemia de pacientes com paracoccidiodomicose, utilizando anticorpos monoclonais direcionados às proteínas consideradas marcadores sorológicos da doença, gp43 e gp70, em espécimes clínicos tais como soro, lavado broncoalveolar e líquido cefalorraquidiano. A gp43 esteve presente em 100% dos soros de pacientes com a forma aguda e crônica unifocal da doença em concentrações médias de 18,23 µg/mL e 7,64 µg/mL, respectivamente. Na forma crônica multifocal 95,31% dos pacientes analisados demonstraram concentração média de gp43 circulante de 8,64 µg/mL. Amostras de líquido cefalorraquidiano e lavado broncoalveolar também foram 100% reativas neste ensaio com concentrações médias de 19,26 µg/mL e 16,06 µg/mL, respectivamente, provando serem espécimes viáveis para o diagnóstico da PCM. Em relação à antigenemia de gp70 avaliada por esta metodologia, níveis mais altos foram observados no soro (11,86 µg/mL), seguido de lavado broncoalveolar (7,5 µg/mL) e líquido cefalorraquidiano (6,78 µg/mL), onde esteve presente em 100% das amostras testadas, com exceção de soros de pacientes com a forma crônica multifocal (98,43%).

A sensibilidade destes ensaios variou de acordo com o espécime clínico utilizado ficando em torno de 90 a 100%. Contudo, a especificidade foi de 100%. O sucesso deste método foi também obtido no seguimento de pacientes em tratamento com itraconazol, nos quais os níveis de antígenos circulantes declinaram de forma correlacionada com a diminuição dos níveis de anticorpos, sendo que após 12 meses de tratamento os níveis de gp43 foram menores que 5,0 µg/mL e os de gp70 indetectáveis (Marques-da-Silva *et al.*, 2004 a,b). Entretanto, apesar dos resultados promissores, tanto no diagnóstico como no seguimento de pacientes após a instituição do tratamento, a viabilidade de uso na rotina clínica é desconhecida (Wheat, 2006).

Importante salientar que a despeito da importância das técnicas sorológicas no imunodiagnóstico da paracoccidiodomicose, seja ele presuntivo e/ou confirmatório, o diagnóstico do processo infeccioso provocado por *P. brasiliensis* deve sempre ser baseado em critérios clínicos, epidemiológicos e laboratoriais como: exames de imagem (raio-X de pulmão e/ou tomografia computadorizada), exames micológicos (direto, isolamento e cultura) e anatomopatológico quando possível.

Como mencionado anteriormente, há uma grande heterogeneidade de protocolos relacionados à metodologia de ELISA visando o imunodiagnóstico da paracoccidiodomicose, descritos na literatura.

Sendo a metodologia de ELISA mais rápida e sensível que a ID (padrão ouro sorológico), podendo ser aplicada segundo algoritmo publicado no Manual de Controle e Vigilância da Paracoccidiodomicose para a triagem de amostras biológicas de indivíduos com suspeita clínica da referida micose, o Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, Laboratório de Referência Estadual para o imunodiagnóstico da paracoccidiodomicose, propõe otimizar e validar a metodologia de ELISA indireto, tornando-a adequada às condições do laboratório, propondo a implantação desta técnica em sua rotina diagnóstica.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Otimizar e validar a metodologia de ELISA indireto para o imunodiagnóstico da paracoccidiodomicose causada por *P. brasiliensis*, em amostras de soro de pacientes com suspeita clínica para a doença, encaminhadas ao Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses, Centro de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz (IAL), São Paulo.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar o desempenho e a aplicabilidade do ensaio de ELISA indireto frente a dois antígenos (Ag) distintos, ou seja, AgPbB-339 e AgPb113 de *P. brasiliensis*;

Avaliar os parâmetros intrínsecos (sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo, eficiência) do ensaio de ELISA indireto;

Avaliar o índice de concordância (índice *kappa* de Cohen) entre a reação de imunodifusão dupla em gel de agarose (ID), método clássico de sorodiagnóstico, e o ensaio de ELISA indireto.

3. Casuística e Métodos

3.1. Soros humanos

Foram avaliadas, quanto à presença de anticorpos circulantes dirigidos a *P. brasiliensis*, um total de 425 amostras de soro de 425 indivíduos assim distribuídas:

3.1.1. Soros controle negativo (Casos descartados):

- 54 amostras de soro de indivíduos aparentemente saudáveis, doadores de banco de sangue e residentes em região endêmica para PCM (Botucatu, SP), gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Rinaldo Pôncio Mendes do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Botucatu, SP;
- 46 amostras de soro de indivíduos aparentemente saudáveis, doadores de banco de sangue e residentes em região não endêmica para PCM (Santos, SP), gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Rinaldo Pôncio Mendes do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Botucatu, SP;
- 11 amostras de soro de indivíduos aparentemente saudáveis, doadores de banco de sangue e residentes em região não endêmica para PCM (São Paulo, SP).

3.1.2. Soros controle positivo (Casos confirmados):

- 55 amostras de soro de pacientes com paracoccidiodomicose confirmada por cultura ou por exame histopatológico, encaminhadas ao Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses, Centro de Imunologia, IAL, São Paulo, para acompanhamento sorológico.

3.1.3. Soros de pacientes com outras doenças pulmonares:

- 38 amostras de soro de pacientes com confirmação sorológica (ID) de histoplasmoze (19) e aspergilose (19), encaminhadas ao Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses, Centro de Imunologia, IAL, São Paulo, para acompanhamento sorológico;
- 16 amostras de soro de pacientes com tuberculose ativa, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Rinaldo Pôncio Mendes do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Botucatu, SP.

Todas as amostras não apresentaram reatividade para *P. brasiliensis* pelo ensaio de imunodifusão dupla.

3.1.4. Soros de pacientes com suspeita clínica de paracoccidiodomicose (Casos suspeitos):

- 205 amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de paracoccidiodomicose, encaminhadas ao Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses, Centro de Imunologia, IAL, São Paulo, para a pesquisa de anticorpos anti-*P. brasiliensis*.

3.2. Considerações éticas

A realização deste estudo foi aprovada pela Comissão Técnico Científica do Instituto Adolfo Lutz - Projeto CTC-IAL#90D/2012 e pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto Adolfo Lutz – Plataforma Brasil – CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética) nº 14035113.6.0000.0059 e parecer nº 277.392 de 20/06/2013.

3.3. *Paracoccidioides brasiliensis*

Para a produção e obtenção de antígenos de *P. brasiliensis* foram utilizadas a cepa B-339 (ATCC 32069) e a amostra 113, ambas isoladas de pacientes com paracoccidioidomicose.

3.3.1. Meio de cultura para obtenção de antígenos

Para a obtenção dos antígenos de *P. brasiliensis*, foi utilizado o meio de cultura NGTA (neopeptona-glicose, tiamina e asparagina).

3.3.2. Manutenção das amostras de *P. brasiliensis*

As amostras fúngicas foram mantidas sob a forma de micélio, em ágar batata, a temperatura ambiente (25 °C).

A fim de garantir a qualidade da preparação antigênica, bem como objetivando minimizar e/ou evitar a ocorrência de alterações fenotípicas, genotípicas e perda da virulência das mesmas, a reversão da fase infectante (micélio) para a parasitária (levedura) se deu apenas no momento de produção dos antígenos.

3.4. Antígenos de *P. brasiliensis*

Para a obtenção dos antígenos, foi utilizada a metodologia proposta por Garcia *et al.* (1993) e modificada por Silva *et al.* (2006).

Desta forma, 16,0 g de neopeptona (Difco Laboratories, Inc., USA) foram dissolvidos em 32,0 mL de água bidestilada aquecida a 45 °C, até a total dissolução do reagente. A solução foi dialisada contra água destilada, durante 5 horas a 70 °C e por uma noite a 4 °C.

Ao conteúdo da membrana foi acrescentado 600,0 mL de água destilada, 10,0 g de glicose (Difco Laboratories, Inc., Baltimore, Maryland, USA), 100,0 mg de cloreto de tiamina (Sigma-Aldrich Co, St Louis, MO, USA) e 200,0 mg de asparagina (Sigma-Aldrich Co, St Louis, MO, USA). O pH foi ajustado entre 6,8-7,0, o volume de água completado para 1.000,0 mL e o meio distribuído em frascos tipo Erlenmayer (500,0 mL), e esterilizado em autoclave a 120 °C por 15 minutos. Para o preparo do exoantígeno, o crescimento fúngico de três (3) a quatro (4) tubos contendo culturas de sete (7) dias, crescidas a 35 °C foram inoculados em frascos tipo Erlenmayer contendo 200,0 mL do meio e colocados em incubadora com plataforma de agitação circular, por 20 dias, a 36 °C, com rotação constante de 50 rpm. Após este período, o crescimento foi interrompido pela adição de thimerosal (Sigma-Aldrich Co, St Louis, MO, USA) diluído 1:5.000 ficando as culturas em repouso por cinco (5) dias a 4 °C. Nesta etapa, foi efetuada a análise da viabilidade das células leveduriformes, inoculando aproximadamente 1,0 mL do sobrenadante em ágar Fava Netto e ágar infusão de cérebro e coração a 25 e 36 °C.

As células leveduriformes foram separadas por filtração em papel de filtro. O perfil eletroforético do sobrenadante foi avaliado por SDS-PAGE e a imunoreatividade dos antígenos avaliada por imunodifusão dupla em gel de agarose. Os sobrenadantes foram alíquotados e armazenados a 4 °C até o momento do uso.

3.5. Quantificação de proteínas

A concentração protéica dos filtrados de cultura PbB-339 e Pb113 foi determinada pelo método de Bradford (1976) através do equipamento Nano Drop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, DE, USA). Foram realizadas três dosagens para cada antígeno e a concentração foi determinada pela média dos valores encontrados. Conhecida a concentração dos antígenos, foi calculado o volume de solução utilizada para sensibilizar a placa.

3.6. Análise das glicoproteínas imunodominantes dos antígenos por SDS-PAGE e posterior *Western blot*

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

As preparações antigênicas dos diferentes antígenos foram denaturadas 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).

Foi aplicado 400 µL de antígeno em cada gel para visualização do padrão proteico de migração dos mesmos.

A corrida eletroforética foi realizada com diferença de potencial de 80 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 eletroforética foi utilizado padrão de baixo peso molecular (PPM) de ampla gama (*broad range*), composto de: MBP-β-galactosidase (175.000 Da), MBPparamiosina (83.000 Da), desidrogenase glutâmica (62.000 Da), aldolase (47.500 Da), triose-fosfato-isomerase (32.500 Da), β-lactoglobulina A (25.000 Da) [New England Biolabs Inc., Woburn, Massachusetts, USA].

Ao término da corrida, foi realizada a transferência eletroforética das proteínas contidas nos géis de poliacrilamida para membranas de nitrocelulose, conforme metodologia descrita por Towbin *et al.* (1979), usando equipamento Trans-Blot System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Califórnia, USA).

3.7. Ensaio de *Immunoblotting* (IB)

O protocolo do ensaio de *immunoblotting* utilizado neste estudo foi otimizado por Passos (2012) a partir dos protocolos desenvolvidos conforme Towbin *et al.* (1979) e Vicentini (1997).

Após a eletroforese, os géis foram apostos sobre membranas de nitrocelulose de 0,22 μm (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, Mo, USA), recobertos com papel de filtro e comprimidos com esponjas de poliuretano. Todo o material utilizado foi previamente embebido em tampão de transferência constituído por 25 mM de Tris-HCl 25, 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 voltagem constante de 30 V por 18 horas, em banho de gelo. Após a transferência, para verificar a eficácia do processo, as membranas foram coradas com Ponceau-S (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, Mo, USA) por um (1) minuto e descoradas em água destilada.

As membranas de nitrocelulose 0,22 μm (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Califórnia, USA) contendo as proteínas transferidas foram identificadas, cortadas em tiras, de aproximadamente 0,5 cm, depositadas em canaletas e incubadas por 1 hora, a temperatura ambiente, em solução PBS-L 5%, em plataforma agitadora para *blotting* (Bioficina Industria e Comércio de Aparelhos Laboratoriais, São Paulo, Brasil).

As fitas contendo as preparações antigênicas de *P. brasiliensis* foram incubadas com 2,0 mL de anticorpo policlonal anti-exoantígeno de *P. brasiliensis*,

diluído na proporção de 1:100 em tampão PBS-L 3%. Esta etapa do ensaio foi realizada a temperatura ambiente sob agitação constante, por 2 horas. Finalizado o período de incubação, as fitas de nitrocelulose foram lavadas seis (6) vezes, por dez (10) minutos cada, em solução PBS-T.

Posteriormente, as membranas foram incubadas com 2,0 mL de anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, Mo, USA), diluído a 1:3.000 em solução PBS-L 3%, sendo mantidas por 1 hora e 30 minutos sob agitação constante, à temperatura ambiente, protegidas da luz, e em seguida, novamente lavadas por seis (6) vezes, dez (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 destilada.

3.8. Ensaio de Imudifusão Dupla em Gel de Agarose (ID)

Para a pesquisa de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis*, o Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses, emprega rotineiramente a reação de imunodifusão dupla em gel de agarose (ID), proposta por Ouchterlony em 1949.

Resumidamente, 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 ágar-citrato e deixadas em câmara úmida, até a solidificação da agarose. O gel foi escavado com auxílio de molde em forma de roseta (Bioficina-Indústria e Comércio de Aparelhos Laboratoriais, São Paulo, 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 dos reagentes [antígeno de *P. brasiliensis*, anticorpo policlonal anti-antígeno de *P. brasiliensis* (controle positivo) e soros de pacientes com suspeita clínica ou com PCM confirmada] nos orifícios, as lâminas foram incubadas em câmara úmida, à temperatura ambiente,

por 48 horas. Após esse período, com o auxílio de negatoscópio, foi realizada a leitura para verificação de linhas de precipitação. As lâminas de vidro foram lavadas por 45 minutos em solução citrato de sódio 5% (p/v), seguindo-se de sucessivas lavagens, por 24 horas, em solução salina. Ao fim dessa etapa, os orifícios foram recobertos com solução de ágar 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 cinco (5) minutos e em seguida descoradas, utilizando-se solução descorante (10% de ácido acético glacial, 45% de álcool etílico, 45% de água destilada). A leitura definitiva foi realizada, por pelo menos dois técnicos e os resultados registrados no livro de registros e banco de dados.

3.9. ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*)

Visando a otimização da metodologia de ELISA indireto empregando as preparações antigênicas validadas e utilizadas desde 1999 pelo Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses, elaborou-se um protocolo de ensaio a partir das metodologias propostas por Camargo *et al.* (1984), por Mendes-Giannini *et al.* (1984) e por Cano *et al.* (1986) com algumas adaptações.

Ao verificar que determinados parâmetros eram comuns aos três protocolos e a outros da literatura, optou-se por mantê-los no protocolo a ser otimizado para as condições analíticas do Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses. O **Quadro 1** sumariza os parâmetros que foram mantidos:

Quadro 1: Parâmetros mantidos durante a otimização do ensaio de ELISA indireto, segundo propostas de Camargo *et al.* (1984), Mendes-Giannini *et al.* (1984) e Cano *et al.* (1986).

Placa	Poliestireno, 96 poços, fundo plano
Tampão de diluição dos antígenos	Carbonato-bicarbonato 0,1M pH 9,6
Tempo e temperatura de sensibilização	Primeira etapa: 2 h a 37 °C
	Segunda etapa: 18 h a 4 °C
Tampão de lavagem	PBS-T 0,1%
Quantidade de lavagens após cada etapa	5 (cinco)
Tempo e temperatura de bloqueio	1 h a 22-23 °C
Tempo e temperatura de incubação do soro	1 h a 37 °C
Conjugado	IgG de cabra anti-IgG humana marcado com peroxidase
Tempo e temperatura de incubação do conjugado	1 h a 37 °C
Tempo e temperatura de incubação da solução reveladora	30 min a 37 °C

3.9.1. Tampões

Três proteínas não relacionadas e em diferentes concentrações foram utilizadas na formulação dos tampões de bloqueio/de diluição das amostras de soro e do conjugado e como o branco da reação. Os mesmos foram avaliados em diferentes concentrações:

- leite em pó desnatado (Elegê, BRF-Brasil Foods S.A.) diluído em solução salina tamponada com fosfatos, pH 7,2 - 7,4, acrescida de Tween 20 (PBS-T-L) nas concentrações de 1%, 3% e 5%;

- gelatina (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) diluída em solução salina tamponada com fosfatos, pH 7,2 - 7,4, acrescida de Tween 20 (PBS-T-G) na concentração de 0,25% e;

- soro albumina bovina (BSA - Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA) diluída em solução salina tamponada com fosfatos, pH 7,2 - 7,4, acrescida de Tween 20 (PBS-T-BSA) nas concentrações de 1% e 4%.

O esquema da placa foi montado conforme a figura abaixo:

	AgPb113						AgB-339					
	PBS-T-L			PBS-T-G	PBS-T-BSA		PBS-T-L			PBS-T-G	PBS-T-BSA	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1%	3%	5%	0,25%	1%	4%	1%	3%	5%	0,25%	1%	4%
B	1%	3%	5%	0,25%	1%	4%	1%	3%	5%	0,25%	1%	4%
C	1%	3%	5%	0,25%	1%	4%	1%	3%	5%	0,25%	1%	4%
D	1%	3%	5%	0,25%	1%	4%	1%	3%	5%	0,25%	1%	4%
E	1%	3%	5%	0,25%	1%	4%	1%	3%	5%	0,25%	1%	4%
F	1%	3%	5%	0,25%	1%	4%	1%	3%	5%	0,25%	1%	4%
G	1%	3%	5%	0,25%	1%	4%	1%	3%	5%	0,25%	1%	4%
H	1%	3%	5%	0,25%	1%	4%	1%	3%	5%	0,25%	1%	4%

PBS-T-L - tampão acrescido de Tween 20 + leite em pó desnatado
 PBS-T-G - tampão acrescido de Tween 20 + gelatina
 PBS-T-BSA - tampão acrescido de Tween 20 + soro albumina bovina

Figura 1: Desenho esquemático do protocolo realizado empregando como preparação antigênica filtrado de cultura obtido a partir da cepa B-339 (AgPbB-339) e da amostra 113 (AgPb113) de *P. brasiliensis*, para a definição do melhor tampão de bloqueio da reação e a sua melhor diluição.

3.9.2. Adsorção dos antígenos às placas de poliestireno

As duas preparações antigênicas de filtrado de cultura de *P. brasiliensis*, Pb B-339 e Pb113, foram avaliadas separadamente nos ensaios de ELISA indireto para determinar qual possuía a melhor capacidade de adesão/adsorção a placa.

Após a determinação das concentrações proteicas, os antígenos foram diluídos em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M pH 9,6 e as placas sensibilizadas com três (3) diluições diferentes de cada antígeno. As concentrações finais de proteína avaliadas foram 2,5, 5,0 e 10,0 µg/poço (**Figuras 2 e 3**).

Para avaliar a imunoreatividade das preparações antigênicas, foram utilizadas amostras de soro de pacientes com paracoccidiodomicose confirmada bem como amostras de soro de indivíduos saudáveis.

3.9.3. Diluição dos anticorpos primários (soro)

Assim como feito com os antígenos, os soros foram analisados em três (3) diferentes diluições, 1:50, 1:100 e 1:200. Neste primeiro momento, o anticorpo secundário, ou seja, Ig G de cabra anti-IgG humana conjugada à peroxidase (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, Mo, USA) foi diluído 3.000 vezes. O esquema da placa foi montado conforme as figuras abaixo:

Concentração de proteína (Ag)		AgPb113											
		2,5 µg/poço				5,0 µg/poço				10,0 µg/poço			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1:50	A	Am1	Am2	Am3	Br	Am2	Am3	Am1	Br	Am3	Am2	Am1	Br
	B	Am1	Am2	Am3	Br	Am2	Am3	Am1	Br	Am3	Am2	Am1	Br
1:100	C	Am1	Am2	Am3	Br	Am2	Am3	Am1	Br	Am3	Am2	Am1	Br
	D	Am1	Am2	Am3	Br	Am2	Am3	Am1	Br	Am3	Am2	Am1	Br
1:200	E	Am1	Am2	Am3	Br	Am2	Am3	Am1	Br	Am3	Am2	Am1	Br
	F	Am1	Am2	Am3	Br	Am2	Am3	Am1	Br	Am3	Am2	Am1	Br
	G												
	H												

Am - Amostra
Br - Branco

Figura 2: Desenho esquemático do protocolo realizado empregando como preparação antigênica filtrado de cultura obtido a partir da amostra 113 (AgPb113) de *P. brasiliensis*, para a definição da melhor concentração proteica do Ag juntamente com a melhor diluição de soro a serem utilizadas no ensaio de ELISA indireto.

AgPbB-339

Concentração de proteína (Ag)		2,5 µg/poço				5,0 µg/poço				10,0 µg/poço				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
Diluição do soro	1:50	A	Am1	Am2	Am3	Br	Am2	Am3	Am1	Br	Am3	Am2	Am1	Br
		B	Am1	Am2	Am3	Br	Am2	Am3	Am1	Br	Am3	Am2	Am1	Br
	1:100	C	Am1	Am2	Am3	Br	Am2	Am3	Am1	Br	Am3	Am2	Am1	Br
		D	Am1	Am2	Am3	Br	Am2	Am3	Am1	Br	Am3	Am2	Am1	Br
	1:200	E	Am1	Am2	Am3	Br	Am2	Am3	Am1	Br	Am3	Am2	Am1	Br
		F	Am1	Am2	Am3	Br	Am2	Am3	Am1	Br	Am3	Am2	Am1	Br
	G													
	H													

Am - Amostra
Br - Branco

Figura 3: Desenho esquemático do protocolo realizado empregando como preparação antigênica filtrado de cultura obtido a partir da cepa B-339 (AgPbB-339) de *P. brasiliensis*, para a definição da melhor concentração proteica do Ag juntamente com a melhor diluição de soro a serem utilizadas no ensaio de ELISA indireto.

3.9.4. Diluição do anticorpo secundário (IgG de cabra anti-IgG humana conjugada à peroxidase)

Uma vez determinada a melhor concentração proteica e a melhor diluição de anticorpo primário (soro), avaliou-se então a melhor diluição de anticorpo secundário. Desta forma, IgG de cabra anti-IgG humana conjugada à peroxidase foi diluída em três (3) diferentes diluições, a saber: 1:1.000, 1:3.000 e 1:6.000. O esquema da placa foi montado conforme a figura abaixo:

Diluição do soro e conc. proteica/poço de Ag já estabelecidas

Diluição do conjugado	AgPb113						AgPbB-339					
	1:1000		1:3000		1:6000		1:1000		1:3000		1:6000	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Am1	C-	Am1	C-	Am1	C-	Am1	C-	Am1	C-	Am1	C-
B	Am1	C-	Am1	C-	Am1	C-	Am1	C-	Am1	C-	Am1	C-
C	Am2	C-	Am2	C-	Am2	C-	Am2	C-	Am2	C-	Am2	C-
D	Am2	C-	Am2	C-	Am2	C-	Am2	C-	Am2	C-	Am2	C-
E	Am3	c-	Am3	c-	Am3	c-	Am3	c-	Am3	c-	Am3	c-
F	Am3	c-	Am3	c-	Am3	c-	Am3	c-	Am3	c-	Am3	c-
G	Br		Br		Br		Br		Br		Br	
H	Br		Br		Br		Br		Br		Br	

Am - Amostra
Br - Branco
C- - Controle negativo

Figura 4: Desenho esquemático do protocolo realizado empregando como preparação antigênica filtrado de cultura obtido a partir da cepa B-339 (AgPbB-339) e da amostra 113 (AgPb113) de *P. brasiliensis*, para a definição da melhor diluição de conjugado a ser utilizada no ensaio de ELISA indireto, após serem estabelecidas a melhor concentração de proteína do Ag e a melhor diluição de soro.

3.9.5. Ensaio de ELISA indireto

Assim, placas de poliestireno, de fundo chato contendo 96 poços (Corning Inc., New York, USA) foram sensibilizadas com 10,0 µg/poço de filtrado de cultura (PbB-339 ou Pb113), diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M, pH 9,6 (100 µL/poço) e incubadas primeiramente por 2 horas a 37 °C e por 18 horas a 4 °C. Após cinco (5) lavagens (300 µL/poço) com PBS-T 0,1% (solução salina tamponada com fosfato acrescida de 0,1% de Tween 20), as placas foram bloqueadas com 100 µL/poço de solução PBS-T-BSA 1% (solução salina tamponada com fosfato acrescida de 0,1% de Tween 20 e 1% de soro albumina bovina [Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA]) e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente (22-23 °C). Após cinco (5) lavagens com PBS-T 0,1%, adicionou-se os soros dos pacientes diluídos a 1:100 em PBS-T-BSA 1% (100 µL/poço) seguindo-se de incubação por 1 hora a 37 °C. Após o período de incubação, as placas foram lavadas cinco (5) vezes com PBS-T 0,1%. Em seguida, adicionou-se anti-IgG humana marcado com

peroxidase (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA) diluída 3.000 vezes em PBS-T-BSA 1% (100 µL/poço), seguido de incubação por 1 hora a 37 °C. Após cinco (5) lavagens com PBS-T 0,1% adicionou-se 100 µL/poço de solução reveladora composta de TMB (3,3',5,5' tetrametilbenzidina, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA) incubando-se por 30 minutos a 37 °C ao abrigo da luz. A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 1N (50 µL/poço). Os valores de densidade óptica (DO) foram determinados, a 450 nm, em leitora de microplacas Tecan Sunrise™ (Tecan, Suíça).

Os meios de cultura utilizados na obtenção e na manutenção das amostras de *P. brasiliensis* e as soluções e tampões utilizados nos ensaios sorológicos estão descritos no **ANEXO F**.

3.9.6. Validação do ensaio de ELISA indireto

Com a otimização finalizada, foram avaliadas, em duplicata para cada preparação antigênica, 111 amostras de soro obtidas de indivíduos saudáveis (controle negativo) e 55 amostras de soro de pacientes com paracoccidiodomicose confirmada (controle positivo).

A partir dos resultados obtidos foi definido o melhor antígeno a ser utilizado no imunodiagnóstico da PCM pela reação de ELISA indireto e foi construída a curva ROC - (*receiver operating characteristic*) para determinação do *cut-off* (ponto de corte) da reação.

3.10. Avaliação do desempenho do ensaio de ELISA indireto frente a amostras de soros de pacientes com suspeita clínica de PCM

Após a definição do *cut-off*, as amostras de soro de indivíduos com suspeita clínica de paracoccidiodomicose foram avaliadas e os resultados comparados aos resultados obtidos pela técnica de imunodifusão dupla em gel de agarose, ensaio padrão ouro sorológico.

3.11. Análise estatística

Para a otimização do ensaio de ELISA indireto, a análise estatística foi realizada nos resultados de experimentos sobre amostras de três (3) pacientes com paracoccidiodomicose confirmada, empregando-se a análise de variância (ANOVA) de dois fatores com repetição, seguida de comparações múltiplas (teste Tukey), considerando-se 0,05 como nível de significância ($\alpha = 0,05$). Empregaram-se os softwares *Microsoft Office Excel 2010* (Microsoft Corporation, Washington, USA) e *OriginPro 9.0* (OriginLab Corporation, MA, USA).

O *cut-off* da reação ELISA indireto foi determinado pela construção da curva ROC. Os pontos de cortes foram determinados pela avaliação da curva.

A validação do ensaio de ELISA indireto foi realizada pela avaliação de parâmetros intrínsecos como sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo, e acurácia.

Para a comparação de dois testes foi realizado o teste de reprodutibilidade a partir do Índice *kappa* de Cohen.

3.11.1. Validação de um teste diagnóstico

Segundo Ferreira e Ávila (2001), para a validação de um ensaio sorológico, há a necessidade de que vários parâmetros sejam avaliados. Por definição, a validade intrínseca refere-se ao desempenho do ensaio quando comparado a um ensaio de referência, neste caso, a reação de ID.

Para a avaliação dos parâmetros intrínsecos como, sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e acurácia, a seleção da amostragem assume vital importância. Desta forma, relacionou-se a presença ou não de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis* obtidos nos ensaios de imunodifusão dupla em gel de agarose e ELISA indireto (**Tabela 1**).

Diante do exposto, foram classificados como doentes pacientes que apresentaram manifestações clínicas compatíveis com PCM, nos quais tenham sido evidenciadas estruturas fúngicas características da forma parasitária de *P. brasiliensis* em qualquer amostra biológica, por meio de exame micológico direto ou histopatológico ou cultura.

O grupo de não doentes foi composto por indivíduos aparentemente saudáveis, doadores de banco de sangue.

Após a validação da reação de ELISA indireto, comparou-se o desempenho da mesma, com a metodologia padrão ouro sorológico, ou seja, ensaio de imunodifusão dupla em gel de agarose.

Assim, os termos co-positividade (sensibilidade relativa) e co-negatividade (especificidade relativa) foram utilizados em substituição, respectivamente, à sensibilidade e especificidade diagnóstica ao comparar-se duas metodologias, sendo uma delas referência, pois considerou-se a porcentagem de coincidência de resultados positivos e negativos entre as metodologias e não os diagnósticos de certeza de presença ou ausência da doença.

Tabela 1: Modelo para validação de teste diagnóstico, segundo Ferreira e Ávila (2001).

		Doente	Não doente	Total
Teste	Reagente	a (VP)	b (FP)	a+b (VP+FP)
	Não reagente	c (FN)	d (VN)	c+d (FN+VN)
Total		a+c (VP+FN)	b+d (FP+VN)	a+b+c+d (VP+FP+FN+VN)

VP: verdadeiro positivo

FP: falso positivo

VN: verdadeiro negativo

FN: falso negativo

Sensibilidade Diagnóstica

É a medida da capacidade do teste em detectar todos os indivíduos com determinada doença. É calculada da seguinte forma:

$$S = a/(a+c) \text{ ou } S = VP/(VP+FN)$$

Especificidade Diagnóstica

É a capacidade do teste em ser negativo quando o indivíduo não possui a doença. É calculada da seguinte forma:

$$E = d/(b+d) \text{ ou } E = VN/(FP+VN)$$

Valores Preditivos Positivo e Negativo

O valor preditivo positivo (VPP) de um teste indica a probabilidade de um indivíduo ter realmente a doença quando o resultado deste teste for positivo. Logo, o valor preditivo negativo (VPN) é a fração de testes normais que significam ausência de doença. Sendo assim, temos:

$$VPP = (VP/VP+FP) \times 100$$

$$VPN = (VN/VN+FN) \times 100$$

Prevalência

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:

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

Acurácia

Refere-se ao grau em que o teste é capaz de determinar o verdadeiro valor do que está sendo medido. Informa se os resultados representam a “verdade” ou o quanto se afastam dela. É calculada da seguinte forma:

$$\text{Acurácia} = (a+d)/(a+b+c+d) \text{ ou } \text{Acurácia} = (VP+VN)/(VP+FP+FN+VN)$$

Índice *kappa* de Cohen

Expressa a confiabilidade de um teste que constitui um avanço em relação à taxa geral de concordância devida à probabilidade. O índice κ informa a proporção de concordância não aleatória entre medidas da mesma variável categórica e seu valor varia de “menos 1” (completo desacordo) a “mais 1” (concordância total). Se a medida concorda mais frequentemente do que seria esperado pela probabilidade, então o índice κ é positivo; se a concordância é completa $\kappa = 1$. Zero indica o mesmo que leituras feitas ao acaso. A classificação pode ser visualizada no quadro a seguir:

Quadro 2: Escala de concordância do índice *kappa*.

Valor de <i>kappa</i>	Concordância
< 0,00	Nenhuma
0,00 – 0,20	Fraca
0,21 – 0,40	Sofrível
0,41 – 0,60	Regular
0,61 – 0,80	Boa
0,81 – 0,99	Ótima
1,00	Perfeita

Adaptado de Landis & Koch, Biometrics, 1977

Repetitividade do ensaio de ELISA indireto

As condições de repetitividade podem ser caracterizadas quando se utiliza o mesmo procedimento de medição, o mesmo observador, o mesmo instrumento usado sob as mesmas condições, o mesmo local e, repetições no menor espaço de tempo possível. O número de replicatas deve expressar a rotina do laboratório (http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf).

Acesso em 09/10/2014. No presente estudo, todas as amostras foram avaliadas em duplicata, simulando assim, as condições da rotina.

4. Resultados

4.1. Glicoproteínas imunodominantes dos filtrados de cultura PbB-339 e Pb113

Após a preparação dos filtrados de cultura obtidos a partir da cepa B-339 e da amostra 113 de *P. brasiliensis*, estes foram submetidos ao processo de separação e transferência eletroforética das frações proteicas contidas no gel de poliacrilamida para membrana de nitrocelulose, pelas metodologias de SDS-PAGE e *western blot*, respectivamente e, de *immunoblotting* para visualização das frações glicoproteicas imunodominantes.

As frações glicoproteicas imunodominantes de ambas as preparações antigênicas podem ser observadas na **Figura 5**.

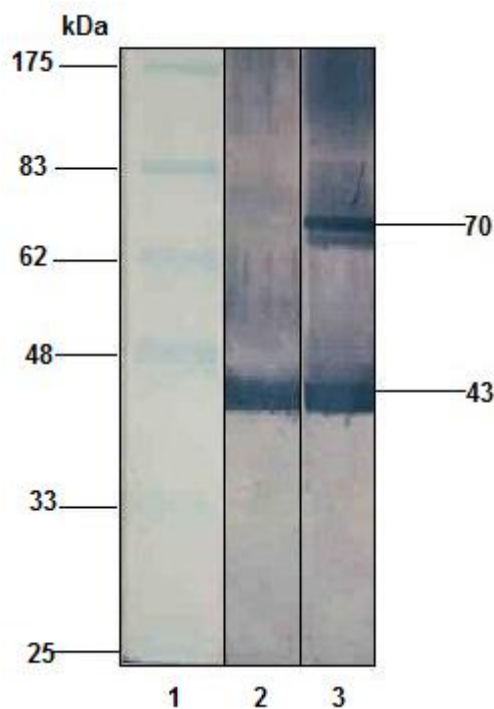


Figura 5: Glicoproteínas imunodominantes, por *immunoblotting*, dos exoantígenos B-339 e 113 de *P. brasiliensis*, cultivado em caldo NGTA, 36 °C, por 20 dias. **1** - padrão de peso molecular; **2** - Ag PbB-339; **3** - Ag Pb113.

Nota-se que o filtrado de cultura obtido a partir da cepa B-339 de *P. brasiliensis* é constituído predominantemente pela glicoproteína de 43 kDa; por outro lado, o filtrado de cultura obtido da amostra 113 de *P. brasiliensis* demonstra a presença das frações de 43 e 70 kDa.

4.2. Otimização e validação do ensaio de ELISA indireto

4.2.1. Quantificação proteica dos filtrados de cultura PbB-339 e Pb113

O AgPbB-339 apresentou concentração proteica de 7,04 µg/µL e o AgPb113 apresentou concentração proteica de 18,12 µg/µL.

4.2.2. Determinação do tampão de bloqueio

A comparação dos resultados obtidos com os diferentes tampões de bloqueio demonstrou ser o tampão PBS-T-BSA o mais indicado para a condução da metodologia, pois foi o tampão o qual demonstrou menor coloração de fundo (*background*) e conseqüentemente, menores valores de DO. Demonstrou-se também que as concentrações de 1% e 4% reproduziram valores de DOs semelhantes, portanto, optou-se por utilizar o tampão PBS-T-BSA 1%.

4.2.3. Determinação do tampão de incubação das amostras de soro e do conjugado

A análise dos resultados demonstrou que o tampão PBS-T-BSA 1% escolhido como tampão de bloqueio da reação, poderia ser utilizado também tanto na diluição dos anticorpos primários (soros) bem como para a diluição do anticorpo secundário (Ig G de cabra anti-Ig G humana conjugada a peroxidase).

4.2.4. Solução reveladora

A solução reveladora de escolha foi a solução composta por 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) [Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA], tampão citrato-acetato 0,1M pH 5,5, Dimetilsulfoxido (DMSO) [Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA] e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30% [Merck, Darmstadt, Germany].

4.2.5. Solução de parada da reação

A solução de parada da reação utilizada foi a solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1N.

4.2.6. Determinação da concentração de proteína e da diluição dos soros para ambas as preparações antigênicas

Para a otimização do teste de ELISA indireto, foram avaliadas separadamente três (03) amostras de soro (Amostra 1, Amostra 2 e Amostra 3) de pacientes com paracoccidiodomicose confirmada. Os resultados podem ser visualizados a seguir.

4.2.6.1. AgPbB-339

Tabela 2: Resultado obtido, em valores de DO, através do teste de ELISA indireto, utilizando-se o antígeno PbB-339.

AgPbB-339									
Conc. de Ag	2,5 µg/poço			5,0 µg/poço			10,0 µg/poço		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Soro 1:50	1,261	0,987	1,159	1,297	1,101	1,279	1,382	1,148	1,295
	1,337	1,085	1,134	1,404	1,261	1,273	1,425	1,334	1,355
Soro 1:100	1,204	0,923	1,185	1,392	1,133	1,391	1,405	1,276	1,440
	1,283	0,904	1,062	1,442	1,153	1,297	1,481	1,345	1,412
Soro 1:200	0,846	0,602	0,757	0,945	0,737	0,875	1,040	0,906	0,987
	0,806	0,636	0,745	0,933	0,881	0,939	1,156	1,057	1,037

A ANOVA de 2 fatores com repetição foi aplicado para cada amostra (Amostras 1, 2 e 3) e estão indicados nas **Tabelas 3, 4 e 5**.

Tabela 3: ANOVA de 2 fatores com repetição realizado a partir do Programa Microsoft Excel 2010 para a Amostra 1.

ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Amostra	0,65722	2	0,32861	121,231	3,1E-07	4,256495
Colunas	0,111703	2	0,055852	20,60478	0,000437	4,256495
Interações	0,02096	4	0,00524	1,933102	0,189045	3,633089
Dentro	0,024396	9	0,002711			
Total	0,814278	17				

SQ: soma de quadrados; gl: graus de liberdade; MQ: média quadrática

Tabela 4: ANOVA de 2 fatores com repetição realizado a partir do Programa Microsoft Excel 2010 para a Amostra 2.

ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Amostra	0,449875	2	0,224938	33,73644	6,58E-05	4,256495
Colunas	0,313093	2	0,156547	23,47907	0,000268	4,256495
Interações	0,021739	4	0,005435	0,815094	0,5465	3,633089
Dentro	0,060008	9	0,006668			
Total	0,844715	17				

Tabela 5: ANOVA de 2 fatores com repetição realizado a partir do Programa Microsoft Excel 2010 para a Amostra 3.

ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Amostra	0,595394	2	0,297697	149,8895	1,23E-07	4,256495
Colunas	0,191621	2	0,095811	48,24034	1,55E-05	4,256495
Interações	0,009289	4	0,002322	1,169287	0,386144	3,633089
Dentro	0,017875	9	0,001986			
Total	0,81418	17				

A ANOVA revelou não existir interação significativa entre os 2 fatores (diluição do soro e concentração proteica) nas três amostras analisadas, pois $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$, o que implica que os fatores podem ser otimizados de forma independente.

Ao analisar as diluições de soro (campo “amostra” das **Tabelas 3, 4 e 5**) constatou-se que a diluição influencia o valor de DO, pois $F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$.

Para a Amostra 1 $F_{\text{calculado}}$ foi igual a 121,231 enquanto que $F_{\text{crítico}}$ foi igual a 4,256495, para a Amostra 2 $F_{\text{calculado}}$ foi igual a 33,73644 enquanto que $F_{\text{crítico}}$ foi igual a 4,256495 e, para a Amostra 3 $F_{\text{calculado}}$ foi igual a 149,8895 enquanto que $F_{\text{crítico}}$ foi igual a 4,256495.

Observou-se que para as três Amostras as diluições de soro 1:50 e 1:100 produziram os maiores valores de DOs (**Tabela 2**). Realizou-se, então, o teste Tukey para comparações múltiplas de modo a verificar se as diferenças observadas nos valores de DOs eram estatisticamente significativas.

Os resultados revelaram que para as três Amostras as diluições de soro 1:50 e 1:100 não apresentaram diferença significativa (**ANEXO A**). A partir desta observação, optou-se por utilizar a diluição de 1:100, diluição esta que utiliza menor quantidade de soro.

Ao observar a fonte de variação das **Tabelas 3, 4 e 5** relacionada às colunas (antígenos), verificou-se que a variação da concentração proteica do antígeno não poderia ser atribuída simplesmente à aleatoriedade uma vez que $F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$.

Para a Amostra 1 $F_{\text{calculado}}$ foi igual a 20,60478 enquanto que $F_{\text{crítico}}$ foi igual a 4,256495, para a Amostra 2 $F_{\text{calculado}}$ foi igual a 23,47907 enquanto que $F_{\text{crítico}}$ foi igual a 4,256495 e, para a Amostra 3 $F_{\text{calculado}}$ foi igual a 48,24034 enquanto que $F_{\text{crítico}}$ foi igual a 4,256495.

Em relação à concentração antigênica, observou-se que para as três Amostras as concentrações proteicas de Ag de 5,0 e 10,0 µg apresentaram os maiores valores de DOs (**Tabela 2**). Realizou-se, então, o teste Tukey para comparações múltiplas.

Os resultados revelaram que para a Amostra 1 as concentrações proteicas de Ag de 5,0 e 10,0 µg não apresentaram diferença significativa, diferentemente das Amostras 2 e 3, as quais apresentaram essa diferença (**ANEXO B**). A partir destes dados, concluiu-se que a utilização de 10,0 µg de Ag/poço seria ideal.

Desta forma, as condições otimizadas e estabelecidas para a condução do ensaio de ELISA indireto empregando-se como antígeno filtrado de cultura da amostra B-339 de *P. brasiliensis* foram: soro diluído 100 vezes em tampão PBS-T-BSA 1% e concentração antigênica de 10µg/poço.

4.2.6.2. AgPb113

Tabela 6: Resultado obtido, em valores de DO, através do teste de ELISA indireto, utilizando-se o antígeno Pb113.

AgPb113									
Conc. de Ag	2,5 µg/poço			5,0 µg/poço			10,0 µg/poço		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Soro 1:50	1,445	1,029	1,238	1,490	1,174	1,311	1,485	1,259	1,386
	1,572	1,253	1,340	1,540	1,331	1,385	1,548	1,412	1,386
Soro 1:100	1,533	1,099	1,414	1,627	1,296	1,540	1,584	1,413	1,602
	1,668	1,151	1,342	1,687	1,381	1,466	1,703	1,454	1,471
Soro 1:200	1,211	0,668	0,904	1,374	0,853	1,040	1,349	1,038	1,165
	1,340	0,729	0,968	1,374	0,913	1,081	1,434	1,116	1,200

A ANOVA de 2 fatores com repetição foi aplicado para cada amostra (Amostras 1, 2 e 3) e estão indicados nas **Tabelas 7, 8 e 9**.

Tabela 7: ANOVA de 2 fatores com repetição realizado a partir do Programa Microsoft Excel 2010 para a Amostra 1.

ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Amostra	0,248649333	2	0,124325	27,14183	0,000154	4,256495
Colunas	0,012000333	2	0,006	1,309921	0,316731	4,256495
Interações	0,007197333	4	0,001799	0,39282	0,808981	3,633089
Dentro	0,041225	9	0,004581			
Total	0,309072	17				

Tabela 8: ANOVA de 2 fatores com repetição realizado a partir do Programa Microsoft Excel 2010 para a Amostra 2.

ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Amostra	0,601795	2	0,300897	43,9448	2,27E-05	4,256495
Colunas	0,261115	2	0,130557	19,06736	0,000581	4,256495
Interações	0,020132	4	0,005033	0,735032	0,590795	3,633089
Dentro	0,061625	9	0,006847			
Total	0,944666	17				

Tabela 9: ANOVA de 2 fatores com repetição realizado a partir do Programa Microsoft Excel 2010 para a Amostra 3.

ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Amostra	0,533744	2	0,266872	94,74187	9E-07	4,256495
Colunas	0,085471	2	0,042735	15,17143	0,00131	4,256495
Interações	0,012763	4	0,003191	1,132704	0,400183	3,633089
Dentro	0,025352	9	0,002817			
Total	0,657329	17				

A ANOVA revelou não existir interação significativa entre os 2 fatores (diluição do soro e concentração proteica) nas três amostras analisadas, pois $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$, o que implica que os fatores podem ser otimizados de forma independente.

Ao analisar as diluições de soro (campo “amostra” das **Tabelas 7, 8 e 9**) constatou-se que a diluição influencia o valor de DO, pois $F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$.

Para a Amostra 1 $F_{\text{calculado}}$ foi igual a 27,14183 enquanto que $F_{\text{crítico}}$ foi igual a 4,256495, para a Amostra 2 $F_{\text{calculado}}$ foi igual a 43,9448 enquanto que $F_{\text{crítico}}$ foi igual a 4,256495 e, para a Amostra 3 $F_{\text{calculado}}$ foi igual a 94,74187 enquanto que $F_{\text{crítico}}$ foi igual a 4,256495.

Observou-se que para a Amostra 2 as diluições de soro 1:50 e 1:100 produziram os maiores valores de DOs e menor variabilidade entre os mesmos, já para as Amostras 1 e 3 as diluições de soro 1:50, 1:100 e 1:200 produziram valores de DOs semelhantes (**Tabela 6**). Realizou-se, então, o teste Tukey para comparações múltiplas de modo a verificar se as diferenças observadas nos valores de DOs eram estatisticamente significativas.

Os resultados revelaram que para a Amostra 2 as diluições de soro 1:50 e 1:100 não apresentaram diferença significativa, podendo-se utilizar uma ou outra. Já para as Amostras 1 e 3 as três diluições apresentaram diferença entre si (**ANEXO C**).

A partir desta observação, optou-se por utilizar a diluição de 1:100 pois, ainda assim, essa foi a diluição a qual apresentou os maiores valores de DOs para as três (3) Amostras, segue como ilustração a **Figura 6**, valores obtidos para a Amostra 1.

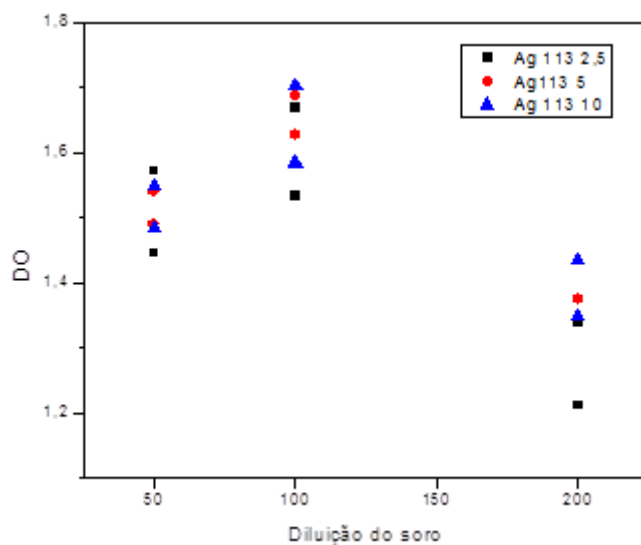


Figura 6: Valores de DOs obtidos no teste ELISA indireto para a Amostra 1 utilizando-se AgPb113.

Ao observar a fonte de variação das **Tabelas 7, 8 e 9** relacionada às colunas (antígenos), verificou-se que para as Amostras 2 e 3 a variação da concentração proteica do antígeno não poderia ser atribuída simplesmente à aleatoriedade uma vez que $F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$.

Para a Amostra 2 $F_{\text{calculado}}$ foi igual a 19,06736 enquanto que $F_{\text{crítico}}$ foi igual a 4,256495, para a Amostra 3 $F_{\text{calculado}}$ foi igual a 15,17143 enquanto que $F_{\text{crítico}}$ foi igual a 4,256495.

Já para a Amostra 1 a variação da concentração proteica do Ag não influencia nos valores de DOs pois, para a Amostra 1 $F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$ (1,309921 < 4,256495).

Observou-se que para as Amostras 2 e 3 as concentrações proteicas de Ag de 5,0 e 10,0 µg apresentaram os maiores valores de DOs (**Tabela 6**). Realizou-se, então, o teste Tukey para comparações múltiplas.

Os resultados revelaram que para a Amostra 1 as concentrações proteicas de Ag de 2,5, 5,0 e 10,0 µg não apresentaram diferença significativa, podendo assim utilizar-se qualquer uma das concentrações. Já para as Amostras 2 e 3, as concentrações proteicas de Ag que não apresentaram diferença foram as de 5,0 e 10,0 µg (**ANEXO D**). A partir destes dados, optou-se por utilizar a concentração de 10,0 µg a fim extrapolar e contemplar um número maior de amostras que por ventura pudessem não apresentar reatividade com uma menor concentração de proteína.

Para o AgPb113 concluiu-se que a melhor diluição do soro seria de 1:100 e a melhor concentração proteica de Ag de 10,0 µg/poço, condições idênticas as estabelecidas para o antígeno PbB-339.

4.2.7. Determinação da melhor diluição do conjugado

A melhor diluição do anticorpo secundário, ou seja, IgG de cabra anti-IgG humana conjugada a peroxidase, foi determinada de modo semelhante ao realizado para a diluição do soro e concentração proteica dos filtrados de cultura, diluindo-se a 1.000, 3.000 e 6.000 vezes em PBS-T-BSA 1%. O tempo de incubação estabelecido foi de uma hora, 37 °C, ao abrigo da luz.

Após a realização dos ensaios ELISA indireto, os valores de DOs determinados foram analisados a partir do teste de Tukey para comparações múltiplas de modo a verificar se as diferenças observadas nas DOs eram estatisticamente significativas.

Os resultados revelaram que para a Amostra 1 avaliada com o AgPb113 as diluições de conjugado 1:1.000 e 1:3.000 não apresentaram diferença estatística, $p = 1$, enquanto que para todas as outras Amostras, independente da preparação antigênica utilizada, as três diluições de conjugado, 1:1.000, 1:3.000 e 1:6.000, apresentaram diferença significativa, $p < 0,05$ (**ANEXO E**).

Tendo em vista que para uma amostra a diluição do conjugado poderia ser 1:1.000 ou 1:3.000, realizaram-se ensaios com as amostras de banco de sangue e amostras de pacientes com paracoccidiodomicose confirmada (controles negativo e positivo) com estas duas diluições e a análise estatística pode ser visualizada nas **Figuras 7 e 8**.

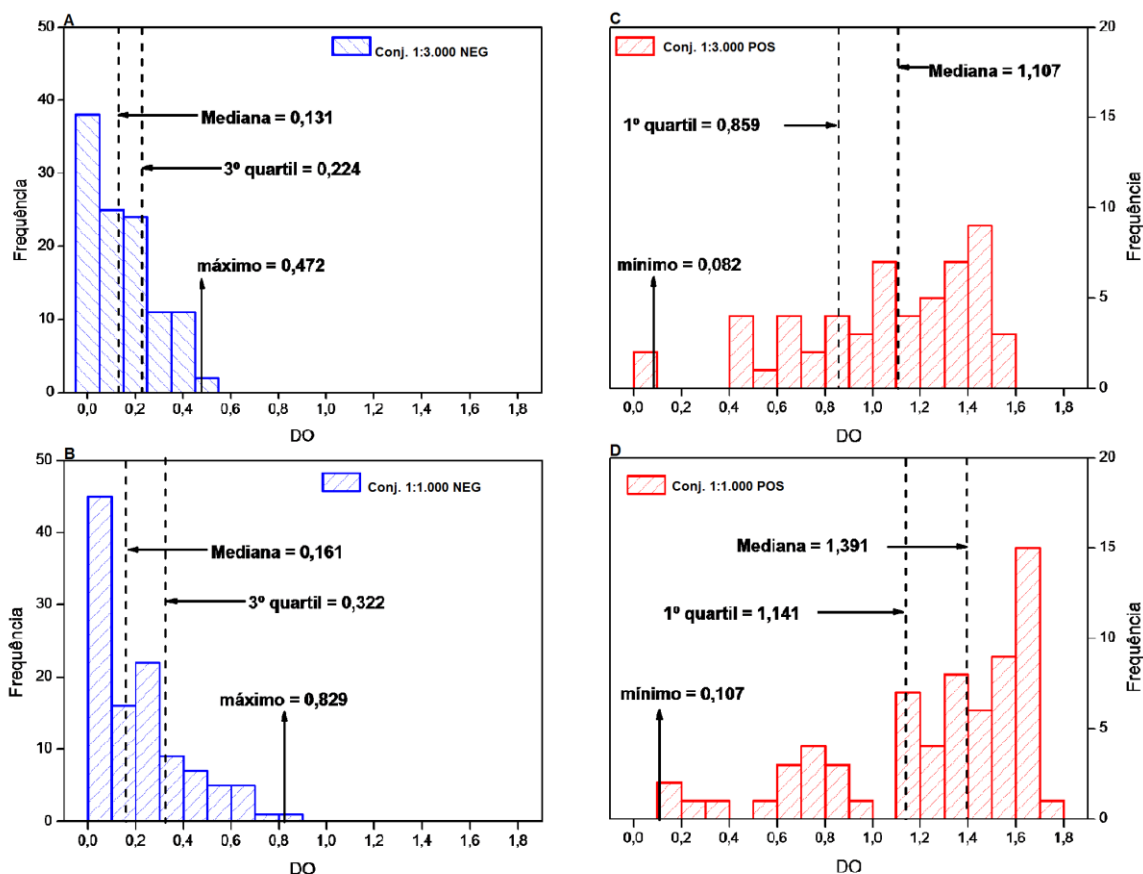


Figura 7: Valores das densidades ópticas obtidos de amostras de soro controle negativo (A e B) e positivo (C e D) para paracoccidiodomicose testadas com 10,0 µg/poço de AgPbB-339 e soro diluído a 1:100. Os dois gráficos superiores referem-se ao conjugado diluído a 1:3.000; e os dois gráficos inferiores referem-se ao conjugado diluído a 1:1.000.

Observou-se que a mediana da distribuição obtida quando se usou o conjugado diluído a 1:1.000 para os controles positivos encontrava-se significativamente aumentada quando comparada ao conjugado diluído a 1:3.000, assim como as DOs do 1º quartil. Quanto às medianas dos controles negativos, um aumento expressivo foi observado para o 3º quartil, de 0,472 para 0,829 podendo sugerir prejuízo em especificidade do método quando se utilizou o conjugado diluído a 1:1.000.

O mesmo comportamento pode ser observado com o antígeno Pb113, aumento de 0,574 para 0,815 (**Figura 8**).

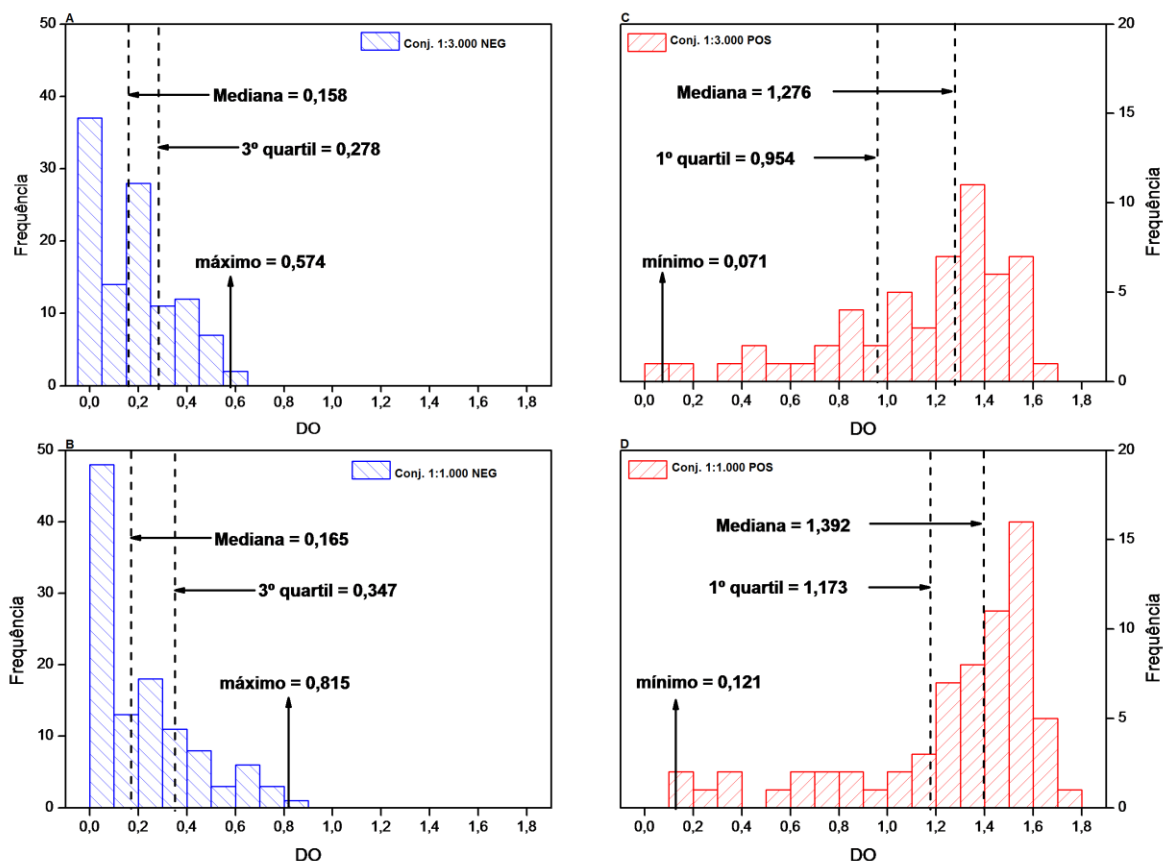


Figura 8: Valores das densidades ópticas obtidos de amostras de soro controle negativo (A e B) e positivo (C e D) para paracoccidiodomicose testadas com 10,0 µg/poço de AgPb113 e soro diluído a 1:100. Os dois gráficos superiores referem-se ao conjugado diluído a 1:3.000; e os dois gráficos inferiores referem-se ao conjugado diluído a 1:1.000.

A interpretação dos resultados demonstrou que o conjugado diluído 3.000 vezes apresentou melhor desempenho, independente da preparação antigênica utilizada.

4.2.8. Escolha do filtrado de cultura para a realização do ensaio de ELISA indireto

A **Figura 9** demonstra que, aparentemente, as duas preparações antigênicas de *P. brasiliensis*, ou seja, filtrado de cultura de PbB-339 e Pb113 apresentaram desempenho semelhante.

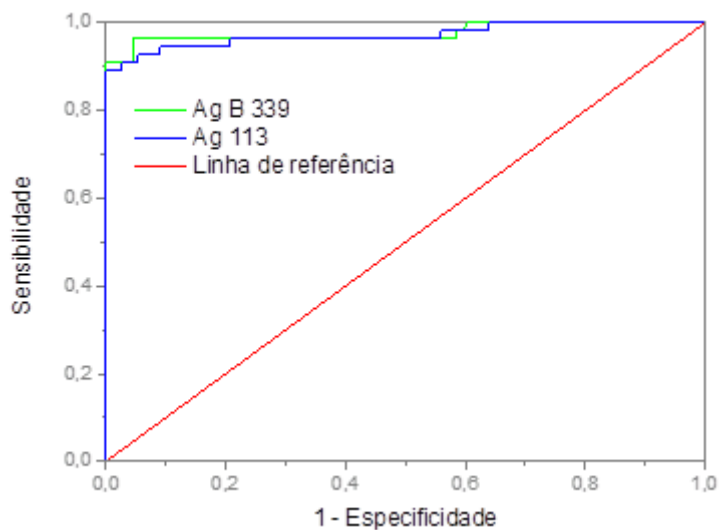


Figura 9: Curva ROC obtida após validação dos parâmetros do ensaio de ELISA indireto. Comparação do desempenho entre os antígenos PbB-339 e Pb113.

Contudo, pode-se observar no canto superior esquerdo (expandido na **Figura 10**), que o AgPbB-339 atinge em menores valores de DOs o grau de sensibilidade igual a 96%, mantendo-se assim até a especificidade alcançar 95%. Por outro lado, observa-se também que o AgPb113 irá manter 96% de sensibilidade somente até quando a especificidade estiver aumentada a 79%.

Desta forma, afim de não comprometer o desempenho da metodologia, estabeleceu-se os valores de DO de 0,410 para o AgPbB-339 e 0,475 para o AgPb113 como ponto de corte (*cut-off*) do ensaio de ELISA indireto. Assumindo assim, 95% de especificidade e 96% de sensibilidade para o AgPbB-339 e 95% de especificidade e 93% de sensibilidade para o AgPb113.

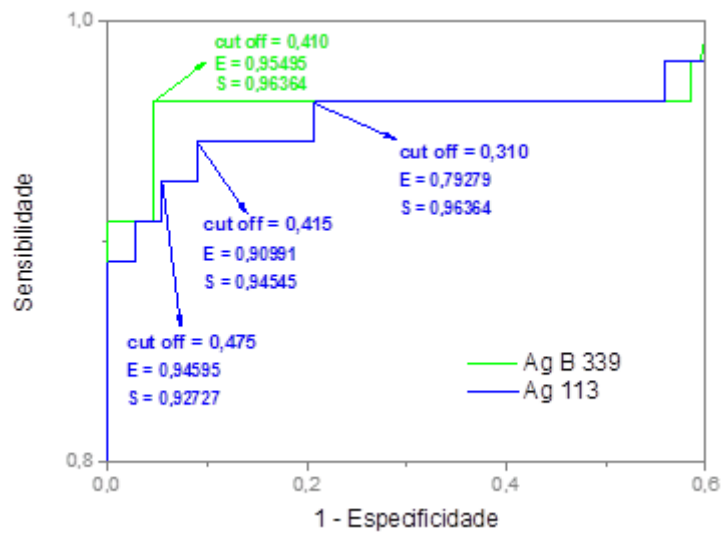


Figura 10: Sensibilidade e especificidade: avaliação do desempenho dos filtrados de cultura, AgPbB-339 e AgPb113, através da curva ROC.

A fim de se obter maiores informações a respeito do comportamento dos dois antígenos e, devido ambos apresentarem grau de especificidade semelhante (95%), construiu-se outro gráfico (**Figura 11**) ampliando a região de interesse (0,90 a 0,95 de sensibilidade e especificidade).

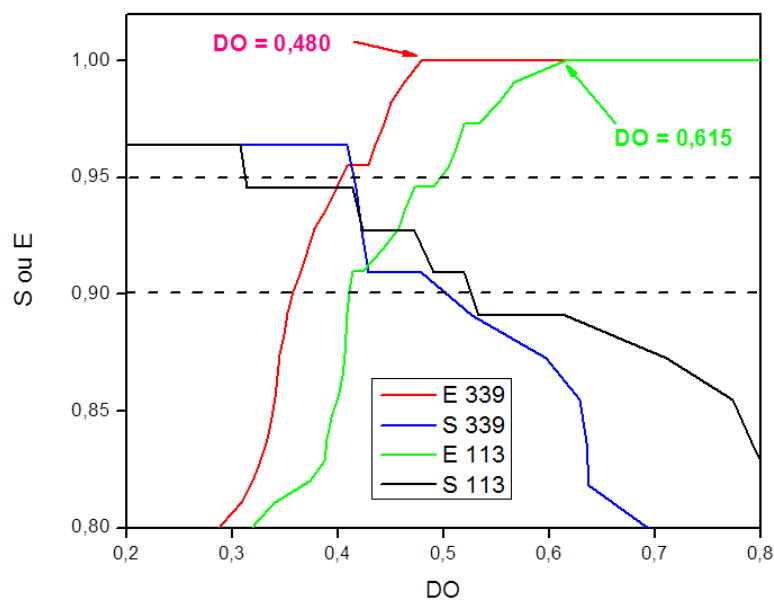


Figura 11: Comportamento dos antígenos de PbB-339 e Pb113 em relação à especificidade e sensibilidade.

A **Figura 11** demonstra que a preparação antigênica obtida a partir da cepa B-339 de *P. brasiliensis* confere à metodologia de ELISA indireto especificidade sistematicamente superior que aquela observada quando emprega-se a preparação antigênica obtida a partir da amostra 113.

A **Figura 11** revela ainda que, o emprego do filtrado de cultura da cepa B-339 propicia especificidade máxima (100%) à referida técnica com um valor de DO menor que aquele observado para o filtrado de cultura da amostra 113 de *P. brasiliensis* (0,480 x 0,615, respectivamente).

Desta forma, de acordo com a proposta inicial de implementação e implantação desta técnica na rotina diagnóstica do Laboratório para ser utilizada segundo o algoritmo proposto no Manual da Vigilância da Paracoccidiodomicose do Estado de São Paulo, ou seja, para a triagem sorológica do material biológico a ser avaliado, optou-se, a partir dos resultados obtidos, escolher o antígeno PbB-339.

O **Quadro 3** sumariza os diferentes parâmetros otimizados e estabelecidos para a realização e validação do ensaio de ELISA indireto pelo Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses.

Quadro 3: Parâmetros otimizados para realização e validação do ensaio de ELISA indireto para o diagnóstico da PCM.

Antígeno	PbB-339
Concentração proteica/poço	10,0 µg/poço
Tampão de bloqueio e de incubação do soro e conjugado	PBS-T-BSA 1%
Diluição do soro	1:100
Diluição do conjugado	1:3.000
Substrato da solução reveladora	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB)
Solução de parada	H ₂ SO ₄ 1N
Comprimento de onda	450 nm
Cut-off (ponto de corte) da reação	0,410

4.3. Avaliação sorológica do grupo controle

Todas as amostras utilizadas para compor o grupo controle foram analisadas por ID e por ELISA indireto (**Figura 12**).

Verificou-se que as 111 amostras (100%) de soro de indivíduos aparentemente saudáveis, doadores de banco de sangue, provenientes de áreas endêmica e não-endêmica para PCM avaliadas pela técnica de ID, não apresentaram reatividade frente ao exoantígeno de filtrado de cultura do isolado B-339 de *P. brasiliensis*.

Por outro lado, a avaliação das mesmas amostras pela metodologia de ELISA indireto, empregando-se a mesma preparação antigênica, foi capaz de detectar a presença de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis* em cinco (05) amostras (4,5%).

Avaliou-se também 54 amostras de soros de pacientes portadores de outras doenças pulmonares que não paracoccidiodomicose. Assim foram analisadas 19 amostras de soro de pacientes com histoplasmose, 19 soros de pacientes com aspergilose e 16 amostras de soro de pacientes com tuberculose.

A avaliação destas amostras por imunodifusão dupla em gel de agarose, padrão ouro sorológico para o diagnóstico da paracoccidiodomicose, frente a filtrado de cultura de *P. brasiliensis* (AgPbB-339) revelou ausência de reatividade frente as amostras analisadas, confirmando assim a alta especificidade da metodologia de imunodifusão e sua eficácia e segurança como metodologia diagnóstica. Entretanto, a avaliação destas amostras, empregando a mesma preparação antigênica, pela metodologia de ELISA indireto, demonstrou que 50% (27/54) das amostras selecionadas de pacientes com as três doenças (histoplasmose, aspergilose e tuberculose) apresentaram reatividade cruzada frente ao exoantígeno de *P. brasiliensis*, confirmando que apesar da alta sensibilidade, ensaios imunoenzimáticos são menos específicos que os ensaios de precipitação.

Das 55 amostras de pacientes com paracoccidiodomicose confirmada, 37 amostras (67%) reagiram frente à preparação antigênica obtida a partir da cepa B-339 de *P. brasiliensis* pela técnica de ID. Empregando-se a mesma preparação antigênica detectou-se, pela metodologia de ELISA indireto, em 53 amostras (96%) a presença de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis*.

Diante do exposto, pode-se afirmar a importância do emprego de mais de uma metodologia sorológica para o diagnóstico da paracoccidiodomicose, especialmente naqueles casos em que o paciente não apresenta histórico sorológico ou micológico conhecido.

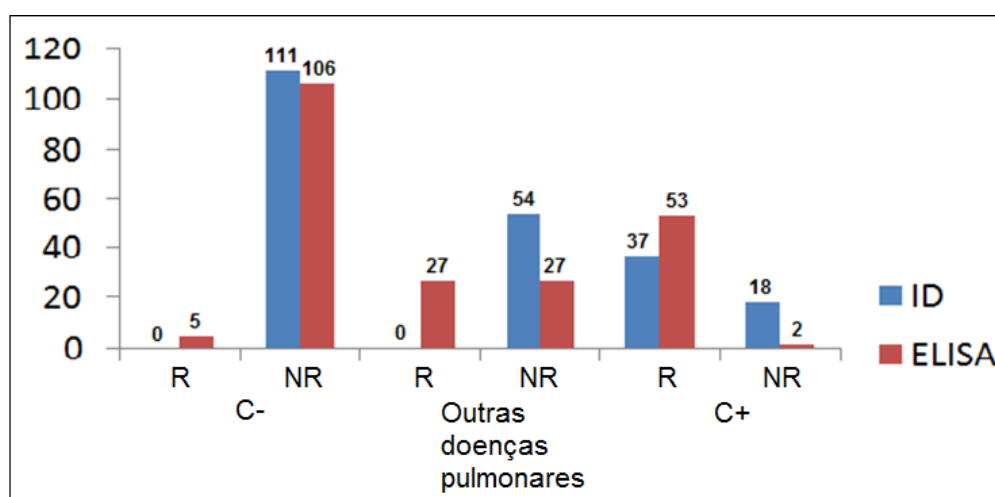


Figura 12: Número absoluto de amostras de soro do grupo controle reagentes e não reagentes pelas metodologias de ID e de ELISA indireto.

4.3.1. Cálculo dos parâmetros intrínsecos dos ensaios sorológicos

Para o cálculo dos parâmetros intrínsecos como sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e acurácia dos testes de ID e ELISA indireto, foi utilizada a definição descrita no item 3.11.1.. Para a determinação dos valores intrínsecos foram utilizadas as 166 amostras dos controles negativo (111) e positivo (55), apresentados na **Tabela 10**.

Tabela 10: Detecção de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis* por ID e ELISA indireto em amostras de soro de pacientes com paracoccidiodomicose confirmada e em soros de indivíduos aparentemente saudáveis, doadores de banco de sangue.

	Doentes	Não doentes	Total
ID REAGENTE	37 (67%)	0	37
ID NÃO REAGENTE	18 (33%)	111 (100%)	129
Total	55	111	166
ELISA REAGENTE	53 (96%)	5 (5%)	58
ELISA NÃO REAGENTE	2 (4%)	106 (95%)	108
Total	55	111	166

Na amostragem estudada os valores intrínsecos, para o ensaio de imunodifusão dupla em gel de agarose, padrão ouro sorológico, calculados foram: sensibilidade de 67% (37/55), especificidade de 100% (111/111), valor preditivo positivo de 100% (37/37), valor preditivo negativo de 86% (111/129), acurácia de 89%, em uma prevalência de 33%.

O método de ELISA indireto apresentou sensibilidade de 96% (53/55), superior aquela encontrada na ID; todavia, a especificidade foi menor aquela encontrada na ID, sendo calculada em 95% (106/111). Os valores preditivos positivo e negativo calculados foram de 91% (53/58) e 98% (106/108), respectivamente em uma prevalência de 33%. A acurácia da metodologia otimizada de ELISA indireto foi de 95%.

Paralelamente à determinação dos valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo, e acurácia calculou-se também o grau de concordância entre ambas as metodologias.

Através do Coeficiente *Kappa* (κ) observou-se que 87,3% das análises realizadas apresentaram concordância entre os métodos. O cálculo do índice *kappa* foi igual a 0,70, indicando uma concordância boa (**Quadro 1**). A concordância entre os resultados obtidos nos métodos de ID e ELISA indireto podem ser observados na **Tabela 11**.

Tabela 11: Determinação do grau de concordância entre os métodos de ID e ELISA indireto obtidos através do coeficiente *kappa*.

ELISA \ ID	ID	REAGENTE	NÃO REAGENTE	Total
REAGENTE		37	21	58
NÃO REAGENTE		0	108	108
Total		37	129	166
<i>KAPPA</i>			0,70	

4.4. Caracterização dos pacientes com suspeita clínica de PCM

Foram avaliadas 205 amostras de soro de 205 pacientes com suspeita clínica para PCM. Do total de pacientes avaliados, 157 (76,6%) eram do sexo masculino e 48 (23,4%) do feminino (**Figura 13**). A razão de masculinidade (masculino/feminino) observada foi de 3,3:1. A faixa etária dos pacientes variou de cinco (05) a 86 anos de idade.

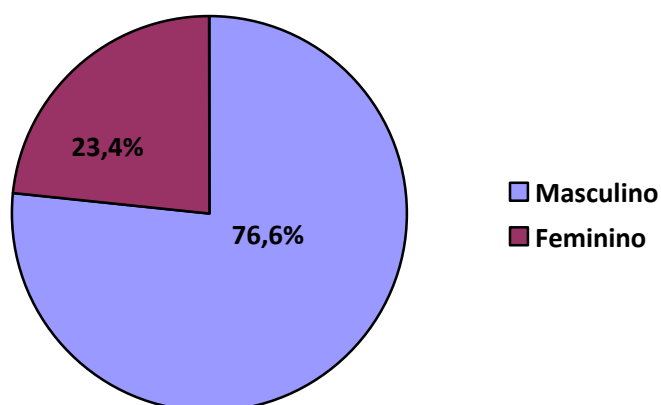


Figura 13: Distribuição em porcentagem dos pacientes com suspeita clínica de PCM, segundo gênero.

4.4.1. Detecção de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis* em amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de PCM pelo ensaio de imunodifusão dupla

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 das 205 amostras avaliadas, 72 (35,1%) apresentaram reatividade frente ao filtrado de cultura do isolado B-339 de *P. brasiliensis*, com detecção de títulos de anticorpos circulantes variando de 1 a 1024. Do total de amostras avaliadas, observou-se que 133 (64,9%) não apresentaram reatividade (**Figura 14**).

Verificou-se que das 72 amostras reagentes, 64 (88,9%) eram do sexo masculino e oito (11,1%), do feminino. A razão de masculinidade (masculino/feminino) observada entre os pacientes reagentes foi de 8:1. A média de idade dos pacientes reagentes, no momento da coleta da amostra, foi de 50 anos (06 a 77 anos).

4.4.2. Detecção de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis* em amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de PCM pela metodologia de ELISA indireto

A avaliação dos soros de pacientes com suspeita clínica de paracoccidiodomicose, por ELISA indireto, demonstrou que das 205 amostras de soro avaliadas, 112 (54,6%) apresentaram reatividade frente ao filtrado de cultura da amostra PbB-339 de *P. brasiliensis* e, 93 (45,4%) apresentaram ausência de reatividade (**Figura 14**).

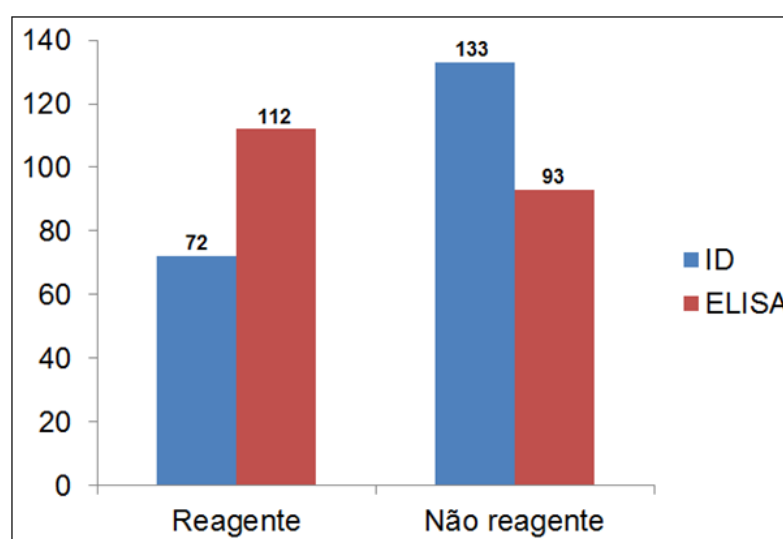


Figura 14: Número absoluto de amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de PCM reagentes e não reagentes pelas metodologias de ID e de ELISA indireto.

Estes resultados corroboram com dados da literatura, comprovando a maior sensibilidade das metodologias imunoenzimáticas. No estudo em questão, a reação de ELISA indireto foi capaz de discriminar 40 amostras de soro a mais que a reação de imunodifusão dupla.

Das 112 amostras reagentes, 96 (85,7%) eram do sexo masculino e 16 (14,3%), do feminino. A razão de masculinidade (masculino/feminino) observada entre os pacientes reagentes foi de 6:1. A faixa etária dos pacientes com sorologia reagente, no momento da coleta da amostra, variou de seis (06) a 84 anos de idade.

4.4.3. Determinação do grau de concordância, co-positividade e co-negatividade entre os métodos de imunodifusão dupla e ELISA indireto

Para o cálculo do coeficiente *Kappa* (κ) de concordância entre os métodos de ID e ELISA indireto e o cálculo de co-positividade (sensibilidade relativa) e co-negatividade (especificidade relativa) dos testes foram utilizados o número total de amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de paracoccidiodomicose, totalizando 205 amostras.

Foi observado que 80,5% das análises realizadas apresentaram resultados concordantes entre os métodos, ou seja, 72 amostras foram reagentes para ambas as metodologias e 93 não reagentes. O cálculo do índice *kappa* foi igual a 0,62, equivalente a uma concordância boa (**Quadro 1**). A concordância entre os resultados obtidos nos métodos de ID e ELISA indireto podem ser observados na **Tabela 12**.

Tabela 12: Determinação do grau de concordância entre os métodos de ID e ELISA indireto obtidos através do coeficiente *kappa*.

ELISA \ ID	REAGENTE	NÃO REAGENTE	Total
	REAGENTE	72	40
NÃO REAGENTE	0	93	93
Total	72	133	205
KAPPA		0,62	

Desta forma, a relação de co-positividade e co-negatividade (ID/ELISA indireto) foi de 100% e 70%, respectivamente (**Figura 15**).

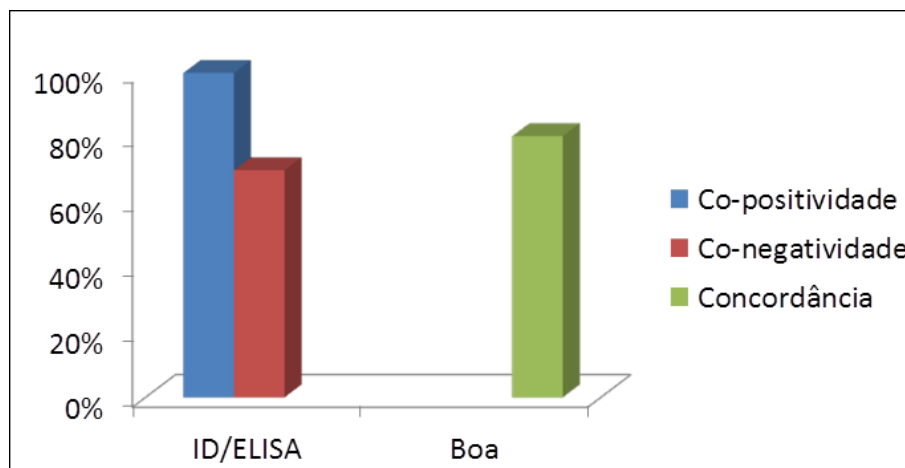


Figura 15: Porcentagem de sensibilidade e especificidade relativas e concordância entre as metodologias de ID e de ELISA indireto.

4.5. Análise das amostras discordantes

Das 205 amostras analisadas, observou-se que 40 (19,5%) apresentaram resultados discordantes entre ambas as metodologias. Pode-se observar que as 40 amostras que apresentaram reatividade frente ao filtrado de cultura da amostra B-339 de *P. brasiliensis* por ELISA indireto apresentaram ausência de reatividade quando avaliadas pelo ensaio de imunodifusão dupla (**Figura 16**). Este resultado, de certa forma, era esperado devido a maior sensibilidade inerente aos ensaios imunoenzimáticos quando comparado aos ensaios de precipitação.

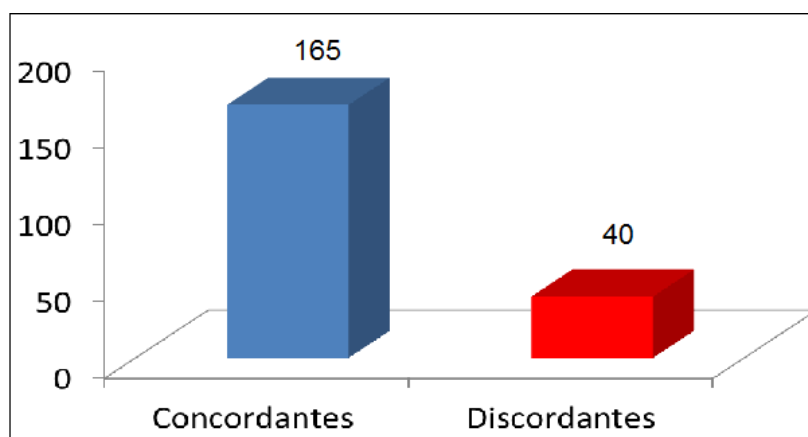


Figura 16: Número absoluto de amostras de soro concordantes e discordantes em relação aos métodos de ID e de ELISA indireto.

Seguindo o algoritmo proposto pelo Manual da Paracoccidiodomicose do Estado de São Paulo, das 40 amostras discordantes entre as duas metodologias (ELISA indireto e ID), 33 amostras foram avaliadas pela metodologia de IB. As outras sete (07) amostras não puderam ser avaliadas, pois não havia volume suficiente de amostra para a realização da técnica.

Das 33 amostras avaliadas por IB, 29 (88%) apresentaram ausência de reatividade frente às frações de 43 e 70kDa de *P. brasiliensis* e quatro (12%) amostras apresentaram reatividade frente a fração de 43kDa (**Figura 17**).

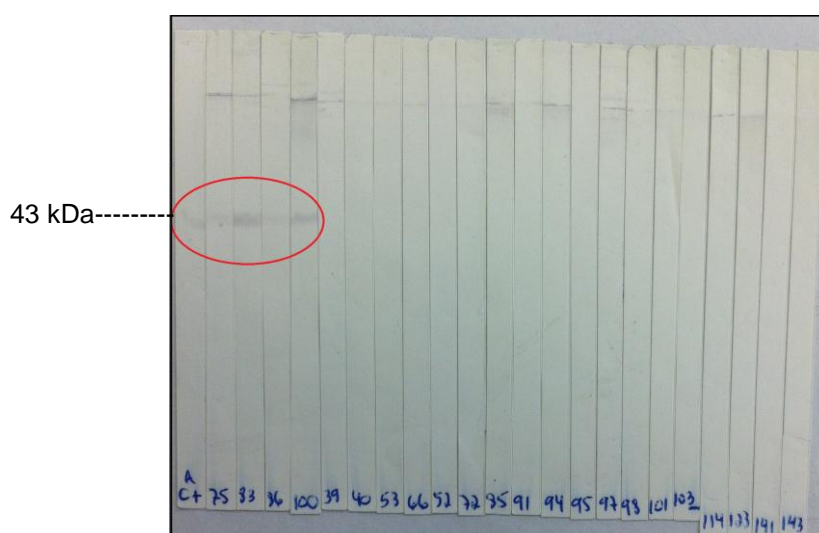


Figura 17: Imunorreatividade por *immunoblotting* de amostras de soro de pacientes com resultado discordante entre as metodologias de ID e ELISA indireto.

Em relação às quatro amostras com resultado reagente por IB:

- duas amostras deram entrada no laboratório pela primeira vez em 2011 e os pacientes não realizaram mais exames até o presente momento (outubro/2014);

- duas amostras com histórico não reagente pela técnica de ID em 2011, 2012 e 2013 mas que apresentaram reatividade pela mesma técnica quando deram entrada no laboratório em 2014, com títulos de 1/1 e 1/4.

Da amostragem total do trabalho, ou seja, 425 amostras, todas as amostras que apresentaram resultado não reagente no ensaio de ELISA indireto também apresentaram resultado não reagente frente ao exoantígeno de *P. brasiliensis* no ensaio de ID. Não obtivemos amostras com resultado não reagente no ensaio de ELISA indireto e reagente no ensaio de ID. Esta observação demonstra que a metodologia de ELISA indireto otimizada e validada para as condições do Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses possui especificidade semelhante ao da metodologia de ID (padrão-ouro).

A alta especificidade (95%) obtida na metodologia de ELISA indireto garante, com segurança, a liberação dos laudos que apresentam resultado não reagente para a detecção de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis* nas amostras de soro em tempo significativamente inferior quando comparado ao ensaio de ID.

5. Discussão

A paracoccidiodomicose apresenta índices expressivos de letalidade e mortalidade. Nos casos graves, a letalidade é estimada entre 2 a 23%, podendo alcançar 30% quando associada a AIDS (Souza *et al.*, 2010).

Segundo Coutinho *et al.* (2002) o coeficiente médio de mortalidade por paracoccidiodomicose como causa básica de morte no Brasil, entre 1980 e 1995, foi de 1,45 óbitos por 1.000.000 de habitantes. Neste mesmo trabalho, os autores, demonstraram que a maior proporção de óbitos (30%) ocorreu no Estado de São Paulo. Santo (2008) demonstrou que no período compreendido entre 1985 e 2005, ocorreram 1.950 óbitos no Estado de São Paulo e o coeficiente médio de mortalidade foi de 2,73 óbitos por 1.000.000 de habitantes.

Apesar de configurar como um grave problema de Saúde Pública, pela quantidade de mortes prematuras que provoca, especialmente em segmentos específicos, como trabalhadores rurais, infelizmente, o processo infeccioso causado por *P. brasiliensis* integra a relação de doenças negligenciadas (Hotez *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2010).

Diante do exposto, pode-se afirmar que o diagnóstico precoce da paracoccidiodomicose é extremamente importante, uma vez que quando não diagnosticada e tratada corretamente, a mesma pode causar importantes sequelas que podem tornar os indivíduos acometidos incapacitados para o trabalho, além de levá-los a óbito.

O diagnóstico da paracoccidiodomicose baseia-se em critérios clínicos, radiológicos, epidemiológicos e laboratoriais através de exames específicos como o micológico, pela visualização de células fúngicas multibrotantes, por meio da realização de exame direto, isolamento e identificação do agente etiológico após a cultura, esta última considerada a metodologia padrão ouro ou ainda por avaliações histopatológicas. Entretanto, o isolamento e cultura não são processos fáceis e

rápidos, necessitando muitas vezes da coleta seriada de amostras biológicas, fato este que contribui para o atraso na instauração de tratamento antifúngico adequado; soma-se também a estas observações, a baixa sensibilidade dos métodos micológicos.

Neste sentido, os testes sorológicos caracterizados pela pesquisa de anticorpos ou antígenos circulantes específicos, têm assumido grande importância no diagnóstico presuntivo e/ou confirmatório e/ou na avaliação da gravidade bem como no acompanhamento da eficácia do tratamento antifúngico; traduzindo-se muitas vezes na única evidência micológica da doença (Mendes *et al.*, 2008).

Deve-se salientar, entretanto, que apesar da disponibilidade de inúmeros testes sorológicos para o imunodiagnóstico desta importante micose, entre os quais se destacam as provas de precipitação (imunodifusão dupla em gel de agarose e contraímunoeletroforese), provas de aglutinação (látex) e ensaios imunoenzimáticos (ELISA, *immunoblotting* e *Dot-ELISA*), muitos não apresentam índices adequados de sensibilidade, especificidade, acurácia, reprodutibilidade e repetitividade, seja pela falta de padronização das preparações antigênicas utilizadas e/ou pela falta de padronização dos protocolos dos ensaios sorológicos (Vicentini-Moreira, 2008; Vicentini *et al.*, 2011; Vidal *et al.*, submetido).

Dentre os testes sorológicos, a imunodifusão dupla em gel de agarose, mantém-se, desde 1961, como método de escolha para o diagnóstico presuntivo e/ou confirmatório, bem como para o acompanhamento da eficácia do tratamento dos pacientes. Entre as vantagens da metodologia destacam-se: a avaliação qualitativa e/ou semi-quantitativa de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis*; alta especificidade (100%); fácil execução técnica, sem a necessidade de automação e; baixo custo operacional (Vicentini-Moreira, 2008; Vicentini *et al.*, 2011). Se por um lado, o ensaio de imunodifusão é altamente específico, por outro sua sensibilidade deixa a desejar, daí o número expressivo de resultados falsos negativos que têm sido relatados (Neves *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2008; Camargo, 2008; Moreto, 2010; Passos, 2012). Outra importante desvantagem da metodologia, pensando-se

especialmente na liberação rápida de resultados diz respeito ao tempo prolongado necessário para a execução da técnica. Para que ocorra a reação antígeno-anticorpo são necessárias 48 horas de incubação das lâminas contendo os soros testes e o antígeno para que possa haver um processo de difusão adequado e eficiente. Após esta etapa, segue-se um período de incubação de 45 minutos; logo após um período de lavagem de 24 horas e posteriormente um período de aproximadamente 18 horas para secagem das lâminas antes do processo de visualização definitiva das linhas de precipitação através do emprego do corante. Ao todo a reação de imunodifusão dupla leva aproximadamente 120 horas, entre a aplicação da amostra e a liberação do resultado.

Na condição de Laboratório de Referência Estadual (Lei nº 8080/1990) para o imunodiagnóstico da paracoccidiodomicose o Instituto Adolfo Lutz, tem como atribuições assegurar a excelência no atendimento dos pacientes com doença confirmada e daqueles com suspeita clínica de infecção por *P. brasiliensis*, bem como garantir a qualidade, acurácia e confiabilidade dos resultados sorológicos. Assim, buscando a excelência no atendimento aos pacientes com suspeita clínica e a qualidade dos resultados sorológicos, o Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses vem se dedicando ao aprimoramento de seus ensaios diagnósticos, seja pela caracterização e avaliação de antígenos fúngicos, seja pela produção de anticorpos policlonais anti-antígenos e mais recentemente pela otimização e padronização de técnicas sorológicas como o *immunoblotting* (Passos, 2012) e o *Dot-Blot* (Kamikawa, 2014).

Visando atender o algoritmo preconizado pelo Manual de Vigilância e Controle da Paracoccidiodomicose, publicado pela Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo em 2008, o objetivo central deste trabalho foi a otimização e validação da metodologia de ELISA indireto visando a triagem sorológica das amostras de pacientes com suspeita clínica de paracoccidiodomicose ou com doença confirmada.

O método de ELISA indireto consiste na adsorção ou ligação do antígeno solúvel a um substrato sólido, no caso uma placa de poliestireno, seguido de sucessivas lavagens a fim de remover o antígeno não adsorvido ou ligado à placa e, posterior incubação com os soros testes, controles positivo, negativo e branco. A detecção de anticorpos específicos a partir da formação do complexo antígeno-anticorpo acontece a partir da adição de um anticorpo secundário, ou seja, uma solução de imunoglobulina anti-espécie conjugada a uma enzima. Após incubação e novas lavagens o substrato específico da enzima é adicionado. A reação se processa e o grau de hidrólise do substrato é proporcional à quantidade de anticorpos ligados. Após a adição da solução de parada da reação, a determinação das densidades ópticas é realizada por espectrofotometria, em um determinado comprimento de onda.

A metodologia de ELISA, devido a sua fácil exequibilidade, possibilidade de automação, alta sensibilidade (95 a 100%) e capacidade de detectar nanogramas de anticorpos por mililitro de soro, para a detecção de anticorpos e antígenos circulantes, tem sido utilizada para o imunodiagnóstico em quase todas as micoses sistêmicas, senão em todas (Peterson, 1981; Richardson e Warnock, 1983; Guimarães *et al.*, 2010; Kappe e Rimek, 2010; Teles e Martins, 2011; Bagut *et al.*, 2013).

No imunodiagnóstico da paracoccidiodomicose, o ensaio de ELISA foi utilizado pela primeira vez por Arango *et al.* (1982) e depois, simultaneamente, por Camargo *et al.* (1984) e Mendes-Giannini *et al.* (1984). Vários outros e importantes trabalhos seguiram-se a estes, contudo em todos se observa falta de padronização da metodologia, especialmente relacionada ao tipo de preparação antigênica utilizada, o que dificulta ou até mesmo impossibilita a comparação dos resultados obtidos entre laboratórios distintos (Cano *et al.*, 1986; Puccia e Travassos, 1991; Camargo *et al.*, 1994; McEwen *et al.*, 1996; Díez *et al.*, 2003; Albuquerque *et al.*, 2005; Reis *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2011; Pereira, 2012; Santos *et al.*, 2012; Rigobello *et al.*, 2013; Sylvestre *et al.*, 2014).

Em relação à preparação antigênica tem-se observado o emprego desde filtrados de cultura (Mendes-Giannini *et al.*, 1984; Camargo *et al.*, 1984; Pereira, 2012; Sylvestre *et al.*, 2014), antígeno citoplasmático ou somático (Cano *et al.*, 1986; Rigobello *et al.*, 2013), preparações polissacarídicas (Mendes-Giannini, 1982), antígenos de membrana e exocelular-Mexo (Reis *et al.*, 2005), moléculas purificadas (Puccia e Travassos, 1991; Camargo *et al.*, 1994; Díez *et al.*, 2003; Albuquerque *et al.*, 2005) e antígenos recombinantes (McEwen *et al.*, 1996; Fernandes *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2012).

Dados da literatura indicam que a preparação antigênica adequada e com aplicabilidade no sorodiagnóstico deve conter, em sua composição, a molécula de 43.000 daltons (Camargo, 2008). Neste sentido, há necessidade de escolher adequadamente a amostra a ser utilizada para este propósito, pois conforme demonstrado por Campos *et al.* (1995), existem amostras de *P. brasiliensis* que não secretam/expressam a gp43. Deve-se salientar, entretanto, que gp43, não é uma molécula totalmente específica, na medida em que sua fração glicídica contém epítomos capazes de serem reconhecidos por soro de pacientes com outras doenças, principalmente soros contendo anticorpos anti-*Histoplasma capsulatum* (Camargo *et al.*, 1984; Mendes-Giannini *et al.*, 1984; Puccia e Travassos, 1991).

Para a condução deste trabalho, optou-se por empregar como antígeno, filtrados de cultura obtidos a partir da cepa B-339 (ATCC 32069) e da amostra 113 de *P. brasiliensis*. A escolha deste tipo de preparação antigênica pautou-se principalmente no fato destas serem as preparações antigênicas utilizadas, desde 1999, pelo Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses para a condução do ensaio de imunodifusão dupla em gel de agarose, e mais recentemente, do ensaio de *immunoblotting*.

O filtrado de cultura obtido a partir da cepa B-339 de *P. brasiliensis* apresenta grandes quantidades da glicoproteína de 43kDa, gp43, conhecida por ser o antígeno imunodominante desta espécie fúngica, estando também envolvida em outras

importantes funções biológicas (Puccia *et al.*, 1986; Vicentini *et al.*, 1994; Mendes-Giannini *et al.*, 2006).

A gp43 é sintetizada e armazenada no interior de vesículas densas que parecem migrar para a borda externa da parede celular, sendo secretadas para o espaço celular sob a forma de gotas densas (Straus *et al.*, 1996). A cinética de liberação da gp43 em cultura foi avaliada, sendo observada que ela é continuamente secretada por leveduras na fase exponencial de crescimento com pico máximo de liberação detectado no sétimo dia de cultura, caindo de forma expressiva no vigésimo quinto dia e apresentando níveis quase indetectáveis no trigésimo dia, o que indica a degradação dos epítomos reconhecidos pelos anticorpos usados na sua detecção (Stambuk *et al.*, 1988).

Segundo Puccia *et al.* (1986), Puccia e Travassos (1991) e Camargo *et al.* (1994) a gp43 é marcadora sorológica da doença e reconhecida por 100% dos pacientes infectados.

Diferentemente ao observado para o filtrado de cultura da cepa B-339, o filtrado de cultura obtido da amostra 113 de *P. brasiliensis* apresenta grandes quantidades não apenas de gp43, mas também de uma glicoproteína de massa molecular aparente de 70kDa, ou, gp70. A gp70, na fase de levedura, tem sido identificada principalmente no compartimento intracelular, mais especificamente no citoplasma de *P. brasiliensis*, contudo, pode ser detectada também no sobrenadante de cultura (Mattos Grosso *et al.*, 2003).

Salina *et al.* (1998) demonstraram que 96% dos soros de pacientes com paracoccidiodomicose reagem frente à gp70. Segundo Camargo *et al.* (1989) e Silva *et al.* (2004) pacientes submetidos à terapia antimicótica, apresentaram diminuição expressiva nos títulos de anticorpos anti-gp70, sugerindo que a gp70 possa também ser considerada um marcador para a doença.

A fim de determinar-se a preparação antigênica que seria utilizada no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses para o desenvolvimento do ensaio de ELISA indireto foi avaliado o desempenho de ambas as preparações antigênicas pelo próprio ensaio de ELISA indireto e seus resultados foram comparados aos resultados do ensaio sorológico padrão ouro, ou seja, imunodifusão dupla em gel de agarose.

Antes da condução desta avaliação propriamente dita, avaliações preliminares foram realizadas a fim de determinar o melhor tampão de bloqueio/diluição e as melhores diluições dos anticorpos primários (soros) e anticorpo secundário (IgG de cabra anti-IgG humana conjugada a peroxidase) bem como a concentração proteica ideal dos filtrados de cultura.

Para o tampão de bloqueio, optou-se por avaliar três dos mais citados nas publicações específicas (Ortiz *et al.*, 1998; Puccia e Travassos, 1991; Sene, 2001; Díez *et al.*, 2003; Maluf *et al.*, 2003; Neves *et al.*, 2003; Albuquerque *et al.*, 2005; Pereira, 2012). Desta forma, foram avaliados tampões acrescidos de leite em pó desnatado, gelatina e, soro albumina bovina.

Verificou-se que o melhor resultado, ou seja, menor coloração de fundo (*background*) e menores valores de DO foi obtido quando se empregou tampão PBS-T-BSA, corroborando com os dados de Ortiz *et al.* (1998); Díez *et al.* (2003) e Marques-da-Silva *et al.* (2003). Vários grupos têm utilizado leite em pó desnatado como proteína não “relacionada” para o preparo do tampão de bloqueio (Sene, 2001; Maluf *et al.*, 2003; Neves *et al.*, 2003; Albuquerque *et al.*, 2005; Pereira, 2012). Neste trabalho, os resultados obtidos empregando-se leite em pó desnatado como proteína não correlacionada não foram adequados, uma vez que causaram forte reação de fundo ou *background* e altos valores de DO. Uma possível explicação para esta observação possa talvez estar pautada na adição de diferentes tipos de vitaminas como suplemento alimentar nas diferentes marcas de leite em pó. Ao contrário de Puccia e Travassos (1991), não se observou bons resultados quando

empregou-se gelatina como proteína inerte, pois os valores de densidade óptica foram maiores que os valores gerados quando se utilizou soro albumina bovina.

Em relação ao tampão de diluição, a análise dos resultados revelou que o tampão PBS-T-BSA 1% poderia ser utilizado também como tampão de diluição tanto dos anticorpos primário como secundário. Além disso, a avaliação dos diferentes trabalhos demonstrou que muitos autores utilizam o mesmo tampão de bloqueio para a diluição tanto dos soros testes como do conjugado (Ortiz *et al.*, 1998; Sene, 2001; Díez *et al.*, 2003; Neves *et al.*, 2003).

Quanto à diluição das amostras testes, observa-se enorme heterogeneidade na literatura específica. Desta forma, a avaliação das três amostras de soro de pacientes com paracoccidiodomicose confirmada demonstrou que, independente da preparação antigênica utilizada, a diluição do soro mais indicada foi a de 100 vezes.

Sene (2001) cita utilizar inicialmente soros diluídos 100 vezes em tampão PBS-Molico 5%, seguida de diluições na razão dois (2) frente a uma mistura de filtrado de cultura e antígeno somático para a determinação do nível de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis*. Assunção (2012) avaliou a presença de anticorpos específicos no soro de pacientes com paracoccidiodomicose, diluídos 100 vezes em PBS-L 1% frente à gp43 recombinante (gp43ΔNt). Albuquerque *et al.* (2005) avaliaram o desempenho da glicoproteína de 43kDa de *P. brasiliensis* tratada com metaperiodato de sódio, sendo a diluição de 1:100 o ponto de partida na diluição das amostras de soro dos pacientes com paracoccidiodomicose confirmada. Em contrapartida, Pereira (2012) iniciou a avaliação de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis* diluindo as amostras de soro 50 vezes frente a filtrado de cultura da amostra 192 de *P. brasiliensis*; enquanto Ortiz *et al.* (1998) e Díez *et al.* (2003), empregando antígenos recombinantes (proteína de 27kDa) diluíram as amostras 1.000 vezes.

Em relação ao anticorpo secundário, também existe grande heterogeneidade relacionada à diluição do mesmo. Desta forma, neste trabalho, a melhor diluição do

anticorpo secundário, ou seja, IgG de cabra anti-IgG humana conjugada a peroxidase, foi determinada de modo semelhante ao realizado para a diluição do soro e concentração proteica das preparações antigênicas, sendo o anticorpo secundário, diluído 1.000, 3.000 e 6.000 vezes em tampão PBS-T-BSA 1%. Após a realização dos ensaios de ELISA indireto, as densidades ópticas obtidas foram avaliadas empregando-se novamente a ANOVA e o Teste de Tukey. A interpretação dos resultados revelou que o conjugado diluído 3.000 vezes apresentou melhor desempenho, independente da preparação antigênica utilizada.

Sylvestre *et al.* (2014) também utilizaram IgG de cabra anti-IgG humana conjugada a peroxidase diluída 3.000 vezes. Pereira (2012) empregou IgG de cabra anti-IgG humana marcada com peroxidase diluída 1.000 vezes em PBS-T. Ortiz *et al.* (1998), Sene (2001) e Díez *et al.* (2003) utilizaram 100 µL do anticorpo IgG anti-humano conjugado à peroxidase diluído em PBS-Molico-5% e Assunção (2012) empregou conjugado anti-IgG humano-peroxidase diluído 60.000 vezes em PBS-leite desnatado 1%.

A análise dos resultados empregando-se 2,5, 5,0 e 10,0 µg de proteína de cada preparação antigênica/poço diluídas em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M (pH 9,6), demonstrou que as maiores densidades ópticas foram obtidas com a utilização de 10,0 µg de antígeno/poço.

Nota-se que a concentração proteica das preparações antigênicas varia muito entre os diferentes trabalhos existentes na literatura. Ortiz *et al.* (1998), sensibilizaram placas de poliestireno com antígeno recombinante de 27kDa em concentração que variou de 0,5 a 4,0 µg/poço. Sene (2001), empregou 2,6 µg/poço de uma mistura antigênica composta por antígeno somático e filtrado de cultura diluída em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6) para a sensibilização das placas de ELISA. Díez *et al.* (2003) avaliaram a capacidade discriminatória do antígeno recombinante purificado de 27 kDa e a fração de 87 kDa (individualmente ou misturados) em concentrações variando entre 0,032 e 4,0 µg/poço diluídos em tampão carbonato 0.06 M (pH 9,6). Neves *et al.* (2003) utilizaram 2,0 µg/mL de gp43

para a detecção de anticorpos da classe IgG anti-*P. brasiliensis*. Albuquerque *et al.* (2005), sensibilizaram as placas de ELISA com 2,5 µg/mL de gp43. Reis *et al.* (2005) utilizaram 100 µL de uma solução de 10,0 µg/mL de antígeno Mexo diluído em tampão carbonato 0.5 M (pH 9,6). Silveira *et al.* (2006) empregaram 2,5 µg/mL de gp43 para avaliar a co-infecção *P. brasiliensis* x *Leishmania* spp em cães. Fernandes *et al.* (2011) utilizaram 1,0 µg/100 µL de antígeno recombinante purificado rPb40 ou rPb27 por poço diluído em tampão carbonato 0,5 M (pH 9,6) ou 0,5 µg/100 µL da mistura de ambos. Para a avaliação da reatividade da proteína de 43 kDa recombinante (gp43ΔNt), Assunção (2012), sensibilizou as placas de ELISA com 2,5 µg/mL de gp43 nativa ou 2,5 µg/mL de gp43ΔNt.

Em relação ao substrato utilizado para o preparo da solução reveladora, em nosso trabalho, optou-se por utilizar o 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) levando em consideração que alguns autores propõem a utilização deste mesmo substrato por ser altamente estável e não mutagênico e/ou carcinogênico (Bos *et al.*, 1981), possuir baixo custo em relação aos fluorógenos, ser de fácil manipulação (Blais *et al.*, 2004), possuir disponibilidade comercial sob a forma de kits (Frey *et al.*, 2000; Blais *et al.*, 2004), além de ser mais sensível que a ortofenilenodiamina (OPD) cujas propriedades mutagênicas foram demonstradas no teste de Ames (que detecta a citotoxicidade e mutagenicidade causadas por compostos químicos) (Voogd *et al.*, 1980; Porstmann e Kiessig, 1992).

Associado a estes pontos é importante enfatizar que o TMB é o cromógeno mais utilizado nos ensaios imunoenzimáticos, onde a enzima catalisadora da reação é a HRP (*horseradish peroxidase* - peroxidase de raiz forte). Sua oxidação produz um composto de cor azul que com a acidificação torna-se amarelo e que se correlaciona com o nível do analito cuja absorbância é obtida a 450 nm (Josephy *et al.*, 1982; Frey *et al.*, 2000; Mendes, 2010).

Apesar destas recomendações, a pesquisa realizada na literatura especializada, mostra que são poucos os trabalhos relacionados ao imunodiagnóstico das micoses que empregam o TMB como sistema revelador. Além

deste encontramos apenas o de Silveira *et al.* (2006) que avaliaram, pelas metodologias de imunodifusão dupla e ELISA, a presença de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis* em cães soropositivos e soronegativos para *Leishmania*; o de Assunção (2012) que relata o emprego de TMB como sistema revelador do ensaio de ELISA para avaliar o desempenho da gp43 recombinante (gp43 Δ Nt) solúvel para o diagnóstico da paracoccidiodomicose humana e mais recentemente o de Sylvestre *et al.* (2014) que avaliaram a capacidade do ELISA na detecção de anticorpos anti-*Paracoccidioides brasiliensis* em pacientes com recaída.

Entretanto, deve-se salientar que ao contrário do que se observa para o diagnóstico da paracoccidiodomicose, onde a maioria dos testes sorológicos é realizada de forma artesanal e caseira, ou seja, *in house*, existe para o diagnóstico de outras micoses como a aspergilose, por exemplo, ensaios imunoenzimáticos comerciais. Tendo em vista o aumento expressivo dos casos de aspergilose em pacientes imunossuprimidos, empresas como IBL International, Hamburg, Germany e Bio-Rad Inc, Hercules, CA, USA, desenvolveram kits para a determinação qualitativa e quantitativa de anticorpos da classe IgM dirigidos ao *Aspergillus fumigatus* (*Aspergillus fumigatus* IgM ELISA[®], IBL International, Hamburg, Germany) e para a detecção do antígeno galactomanana (Platelia[™] *Aspergillus* EIA, Bio-Rad Inc, Hercules, CA, USA). Ambos são ensaios imunoenzimáticos de fase sólida baseados na técnica de *sandwich*, sendo o TMB o cromógeno utilizado como sistema revelador.

A outra substância reveladora bastante utilizada, no imunodiagnóstico não apenas da paracoccidiodomicose (Ortiz *et al.*, 1998; Díez *et al.*, 2003; Neves *et al.*, 2003; Albuquerque *et al.*, 2005; Reis *et al.*, 2005; Marques-da-Silva *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 2011; Pereira, 2012; Gegembauer *et al.*, 2014) bem como de outras espécies fúngicas, quando se emprega anti-IgG humana marcado com peroxidase é a ortofenilenodiamina (OPD). Vidal *et al.* (2003) avaliaram a performance da metodologia de ELISA indireto na pesquisa de anticorpos-circulantes anti-*Fonsecaea pedrosoi*, empregando como anticorpo secundário anti-IgG humana marcada com peroxidase e como sistema revelador da reação OPD.

Este mesmo sistema revelador foi utilizado por Polese (2009) ao desenvolver um ensaio de ELISA visando à detecção de anticorpos contra *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*, por Santurio *et al.* (2006) ao padronizarem um ensaio de ELISA indireto para o diagnóstico sorológico da pitíose e por Bernardes-Engemann (2004) ao validar o teste de ELISA para o imunodiagnóstico da esporotricose.

Trata-se de um cromógeno cuja oxidação pela HRP-H₂O₂ produz 2,3-diaminofenazina um composto solúvel cuja cor varia de laranja a marrom, e após a adição de ácido sulfúrico ou clorídrico sua intensidade pode ser medida em espectrofotômetro a 492 nm (Bovaird *et al.*, 1982; Nascimento, 2007).

Nascimento (2007) comparou a acurácia e confiabilidade de três sistemas reveladores de ensaios imunoenzimáticos na detecção de anticorpos IgG específicos para o diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Nos ensaios imunoenzimáticos foram empregados antígenos parcialmente solúveis obtidos de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* e na revelação, dois cromógenos, 1,2-ortofenilenodiamino (OPD) e 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) e um fluorógeno, 4-metilumbeliferilfosfato (MUP). O desempenho de cada sistema revelador foi comparado através dos seus parâmetros de acurácia, Coeficiente de Correlação Intraclasse (ICC) e as áreas sob a curva ROC. A sensibilidade foi idêntica (97,4%) para todos os sistemas. A confiabilidade foi excelente (ICC = 98,61%; 98,74% e 99,11%) e a especificidade variou de 93,7%, 95,8% a 97,4% para OPD, MUP e TMB, respectivamente, sem significância estatística. Segundo a autora, a não diferença entre as excelentes performances dos três reveladores sugere que se utilize o TMB por possuir vantagens de ordem operacionais como baixo custo referente ao equipamento de leitura, fácil manipulação, estabilidade e menor toxicidade.

Desconhece-se este tipo de abordagem comparando a acurácia e confiabilidade de sistemas reveladores de ensaios imunoenzimáticos na detecção de anticorpos IgG específicos anti-*P. brasiliensis*.

A avaliação do desempenho das preparações antigênicas foi determinada através da análise da curva ROC, onde definiu-se o ponto de corte para cada preparação antigênica avaliada, estabelecendo-se *cut-off* de 0,410 para o filtrado de cultura PbB-339 e 0,475 para o filtrado de cultura Pb113, assumindo assim sensibilidade de 96% e especificidade de 95% para o filtrado de cultura PbB-339 e sensibilidade de 93% e especificidade de 95% para o filtrado de cultura Pb113.

Verificou-se em um primeiro momento, que ambos os antígenos apresentaram desempenho semelhante. Contudo, a avaliação da curva ROC demonstrou que o filtrado de cultura obtido da cepa B-339 de *P. brasiliensis* atinge com menores valores de densidade óptica grau de sensibilidade igual a 96%, mantendo-se assim até a especificidade chegar a 95%, por outro lado, observou-se que o filtrado de cultura obtido da amostra 113 manteve sensibilidade de 96% apenas quando a especificidade chegou a 79%.

Uma vez que ambas as preparações antigênicas apresentaram o mesmo índice de especificidade, optou-se em avaliar mais detalhadamente o comportamento de ambas. Assim, novo gráfico foi construído ampliando a região de interesse, ou seja, 0,90 a 0,95 de sensibilidade e especificidade. Observou-se que o filtrado de cultura obtido a partir da cepa B-339 de *P. brasiliensis* conferiu a metodologia de ELISA indireto especificidade máxima (100%) com um valor de DO inferior ao observado para o filtrado de cultura da amostra 113, demonstrando que o AgPbB-339 apresenta uma especificidade sistematicamente superior aquela obtida para o AgPb113. Desta forma, a partir dos resultados obtidos, optou-se por eleger o filtrado de cultura AgPbB-339 como antígeno para o desenvolvimento da metodologia de ELISA indireto visando a triagem sorológica das amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de paracoccidiodomicose ou com doença confirmada.

A variabilidade de interpretação dos resultados e de definição do ponto de corte da reação também é muito observada nos trabalhos publicados, variáveis estas de extrema importância, pois interpretações distintas de um mesmo resultado geram resultados distintos.

Neste estudo, optou-se por calcular o ponto de corte da reação através da curva ROC. Sylvestre *et al.* (2014) também empregaram a curva ROC para determinar os pontos de corte do teste ELISA avaliados para intervalos de confiança iguais a 95% e 99% obtendo densidades ópticas de 0,710 e 0,850, respectivamente.

Entretanto, muitos autores optam por empregar a média da absorbância obtida a partir de soros de indivíduos aparentemente saudáveis somada a duas vezes o valor do desvio-padrão, para o estabelecimento do *cut-off* da reação (Del Negro *et al.*, 2000; Sene, 2001; Reis *et al.*, 2005; Bellissimo-Rodrigues *et al.*, 2010; Fernandes *et al.*, 2011; Pereira, 2012).

Del Negro *et al.* (2000) calcularam o valor do ponto de corte da reação a partir da média dos valores de DO de 65 amostras de soro de pacientes de banco de sangue somada a duas vezes o desvio-padrão. Sene (2001) utilizou a média da absorbância obtida com soros diluídos à 1:100, de indivíduos clinicamente saudáveis (controles negativos), somada a duas vezes o valor do desvio-padrão, e Bellissimo-Rodrigues *et al.* (2010) também calcularam o valor do ponto de corte da reação a partir da média dos valores de DO de amostras de soro de indivíduos saudáveis acrescida de duas vezes o desvio-padrão.

Segundo Ferreira e Ávila (2001), para a validação de um ensaio sorológico, é extremamente importante que vários parâmetros entre os quais se pode citar: sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e acurácia sejam avaliados. Por definição, a validade intrínseca refere-se ao desempenho do ensaio, neste estudo o ensaio de ELISA comparado a um ensaio de referência, no caso, a reação de ID.

Na amostragem avaliada, os parâmetros intrínsecos, para o ensaio de imunodifusão dupla em gel de agarose, padrão ouro sorológico, calculados foram: sensibilidade de 67% (37/55), especificidade de 100% (111/111), valor preditivo positivo de 100% (37/37), valor preditivo negativo de 86% (111/129) e acurácia de 89%.

O ensaio de ELISA indireto apresentou sensibilidade de 96% (53/55), especificidade de 95% (106/111), valor preditivo positivo de 91% (53/58), valor preditivo negativo de 98% (106/108) e acurácia de 95%.

Pode-se observar que o ensaio de ELISA indireto apresentou sensibilidade superior ao método padrão ouro sorológico, ou seja, 96% x 67%. Esta reatividade pode ser explicada pela maior sensibilidade dos ensaios imunoenzimáticos em relação aos ensaios de precipitação. Este achado deve-se ao fato de que no grupo de indivíduos aparentemente saudáveis, os cinco indivíduos em algum momento da vida entraram em contato com o agente causal da paracoccidiodomicose, ou seja, com *P. brasiliensis* ou; que os mesmos realizaram avaliação da imunidade celular por meio da inoculação de paracoccidiodina (intra-dermoreação/reacção de hipersensibilidade do tipo tardio) ou ainda; que esta reatividade seja inespecífica, uma vez que a preparação antigênica utilizada é rica em gp43 e esta glicoproteína pode reagir de forma inespecífica com outros epítomos semelhantes.

E quanto aos pacientes com paracoccidiodomicose confirmada, provavelmente existiam alguns que se encontravam em cura sorológica ou cura clínica, não apresentando, portanto doença ativa. Estes pacientes apresentam nível de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis* abaixo do limite de detecção da técnica padrão ouro. Por outro lado, a capacidade da metodologia de ELISA indireto em detectar nanogramas de anticorpos por mililitro de soro permitiu que o antígeno de *P. brasiliensis* fosse reconhecido pelos anticorpos circulantes presentes nestes soros.

Avaliando o índice de sensibilidade, pode-se observar que neste trabalho, empregando como antígeno filtrado de cultura da cepa B-339 de *P. brasiliensis*, houve concordância de resultados com os trabalhos de outros autores que também empregaram filtrados de cultura ou uma mistura de antígeno somático e filtrado de cultura (Sene, 2001; Pereira, 2012; Sylvestre, 2013; Sylvestre *et al.*, 2014).

Sene (2001) avaliou o desempenho do teste de ELISA comparando a metodologia com o ensaio de imunofluorescência indireta (IFI) e a metodologia de micro-imunodifusão dupla em gel de agarose antes e após introdução do tratamento de pacientes com a forma aguda/subaguda e a forma crônica da paracoccidiodomicose. Para cada teste, os seguintes parâmetros foram avaliados: sensibilidade (SE), especificidade (EP), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e eficiência (EF). No período pré-tratamento a IFI apresentou SE= 92,3%, VPP= 87,5%, VPN= 92% e EF= 88,6%. Os valores de SE, VPP, VPN e EF calculados para a imunodifusão dupla foram de 93%, 97,4%, 95% e 96,2%, respectivamente. Para a metodologia de ELISA observou-se SE= 100%, VPP= 95%, VPN= 100% e EF= 97,4%. No grupo de doadores de sangue, a eficiência da IFI, ID e ELISA foram, respectivamente, de 93,3%, 100% e 100%. Em soros de pacientes com outras micoses sistêmicas, as EP para os testes foram de 60%, 90% e 80%, respectivamente. Durante o tratamento, maior correlação foi obtida entre a ID e o ELISA ($r= 0,61591$, $p<0,05$), obtendo-se baixas correlações com a IFI. O tempo necessário para negativar o ELISA (Md= 20,0 meses) foi maior do que a ID (Md= 13,5 meses). O ensaio de ELISA se negativou em geral nove meses após a ID, o que sugere que este teste passe a ser um referencial para suspensão do tratamento de manutenção.

Pereira (2012) comparou a reação de imunodifusão dupla e o ensaio de ELISA para o imunodiagnóstico da paracoccidiodomicose. A metodologia foi estabelecida comparando-se títulos de anticorpos obtidos de três grupos de pacientes: 145 amostras de soros de 83 pacientes com paracoccidiodomicose (Grupo I), 49 doadores saudáveis (Grupo II) e 13 pacientes com sorologia reagente por imunodifusão dupla para outras micoses pulmonares: 11 com histoplasmose e 2

com aspergilose (Grupo III). Os resultados demonstraram que oito (9,6%) e cinco (6,0%) dos pacientes com paracoccidioidomicose apresentaram resultado falso-negativo ao teste de ID e ELISA, respectivamente. Dentro do grupo de pacientes saudáveis, não houve casos de falso positivo na imunodifusão, porém, cinco (10,2%) amostras apresentaram baixos títulos de anticorpos frente ao filtrado de cultura da amostra 182 de *P. brasiliensis* no ELISA. Segundo a autora, a sensibilidade do ELISA (93,9%) foi um pouco superior ao da ID (90,3%) e a especificidade do ELISA calculada como base no controle saudável e dos pacientes com outras micoses foi 89,7% e 23,1%, respectivamente. A imunodifusão mostrou uma especificidade de 100% para ambos os casos. Os valores preditivos positivos e negativos foram de 100% e 83,8% para imunodifusão e de 88,5% e 90,3% para ELISA, respectivamente. A acurácia dos testes foi de 94,4% para a imunodifusão e 86,2% para o ELISA.

Sylvestre (2013) avaliou a acurácia do ensaio de ELISA avaliando 200 amostras de soro de pacientes com paracoccidioidomicose e 200 amostras de soro de indivíduos saudáveis doadores de banco de sangue, empregando como antígeno, filtrado de cultura da amostra 113 de *P. brasiliensis*. A autora estabeleceu dois pontos de corte distintos: 0,710 e 0,850. Para o *cut-off* de 0,710 os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia foram de 96,0%; 95,0%; 95,0%; 96,0% e 95,5%, e para o *cut-off* de 0,850 os valores calculados foram de 96,9%; 95,1%; 95,0%; 97,0% e 96,0%, respectivamente.

Ao comparar-se o índice de sensibilidade (96%) do presente estudo frente àqueles que empregaram frações purificadas ou antígenos recombinantes de *P. brasiliensis*, verificou-se não existir diferença entre os valores obtidos por Fernandes *et al.* (2011) ao empregar uma mistura de antígeno recombinante rPb27 + rPb40, uma vez que os autores obtiveram sensibilidade de 96%. Por outro lado, quando os autores avaliaram isoladamente ambos os antígenos recombinantes encontraram sensibilidade de 54% para rPb40 e 89% para rPb27.

Entretanto, a sensibilidade obtida neste trabalho foi superior a sensibilidade encontrada por Díez *et al.* (2003) ao empregarem na condução da metodologia de ELISA uma mistura composta pelo antígeno recombinante de 27kDa e pela proteína de choque térmico de 87kDa bem como as preparações antigênicas isoladamente. Os valores calculados foram de 92% para a mistura de ambos os antígenos, 49% para a proteína de 27kDa e 81% para a proteína de 87kDa.

Sensibilidade inferior à obtida neste trabalho foi observada por Ortiz *et al.* (1998) ao empregarem o antígeno recombinante de 27kDa (p27). O índice global de sensibilidade foi de 73,4% e o índice de sensibilidade estratificando-se os pacientes segundo a forma clínica da paracoccidiodomicose foi de: 71,4% para a forma aguda, 66,7% para a forma crônica unifocal e 75,6 % para a forma crônica multifocal.

Em relação ao índice de especificidade (95%) do presente estudo frente àqueles que empregaram frações purificadas ou antígenos recombinantes de *P. brasiliensis*, verificou-se especificidade normalmente superior. Díez *et al.* (2003) obtiveram 86% de especificidade para a preparação antigênica p27 (0,125 mg/poço), 74% para p87 (0,125 mg/poço), 88% para p27 (0,125 mg/poço) + p87 (0,06 mg/poço) p27 e 86% quando utilizaram p27 (0,06 mg/poço) + p87 (0,125 mg/poço) frente a soros de indivíduos normais e especificidade de 90%, 82,5%, 90% e 88%, respectivamente frente a soros de pacientes portadores de outras micoses sistêmicas.

Ortiz *et al.* (1998) ao empregarem o antígeno recombinante de 27kDa (p27) obtiveram índice global de especificidade de 87,5% e o índice estratificando-se os pacientes segundo a forma clínica da paracoccidiodomicose foi de: 87,5% para a forma aguda, 83,3% para a forma crônica unifocal e 84,4 % para a forma crônica multifocal. Já Fernandes *et al.* (2011) obtiveram especificidade de 100% frente a soros humanos normais e frente a soros de pacientes portadores de outras micoses sistêmicas e de 93,5% frente a soros de pacientes com outros tipos de doenças infecciosas.

Avaliando a sensibilidade e especificidade de outros trabalhos que relatam o emprego de tipos distintos de preparação antigênica, verificou-se que Reis *et al.* (2005) ao empregarem antígenos Mexo, preparação antigênica obtida de proteínas fúngicas de membrana e exocelulares, obteve sensibilidade de 100% e especificidade de 96,6%.

Entre as desvantagens da metodologia pode-se citar a reatividade cruzada, especialmente frente a soros de pacientes com histoplasmose e Doença de Jorge Lobo, devido à presença de antígenos comuns entre as diferentes espécies fúngicas (Brummer *et al.*, 1993) ou ainda frente a soros de indivíduos aparentemente saudáveis residentes em áreas endêmicas para paracoccidiodomicose (Maluf *et al.*, 2003). A reatividade cruzada deve ser avaliada também entre pacientes com tuberculose visto que se trata de uma doença comum entre os pacientes infectados por *P. brasiliensis*. Segundo Londero (1982) a tuberculose pulmonar foi relatada em 10% dos pacientes com paracoccidiodomicose disseminada, seja antes, depois ou concomitantemente ao tratamento.

A fim de sanar este problema, alguns grupos recomendam a absorção das amostras de soro de pacientes com paracoccidiodomicose com células leveduriformes de *Candida albicans* (Camargo *et al.*, 1984) ou de *Histoplasma capsulatum* (Mendes-Giannini *et al.*, 1984) ou ainda tratar a preparação antigênica com metaperiodato de sódio a fim de oxidar a porção glicídica responsável pela reatividade cruzada (Albuquerque *et al.*, 2005).

Outra estratégia que vem sendo empregada na tentativa de minimizar a ocorrência de reatividade cruzada reside na utilização de determinantes antigênicos purificados como a gp43 e a gp70 (Camargo *et al.*, 1984; Albuquerque *et al.*, 2005) ou ainda o uso de antígenos recombinantes (McEwen *et al.*, 1996; Ortiz *et al.*, 1998; Díez *et al.*, 2003; Fernandes *et al.*, 2011).

Neste estudo, avaliou-se também, 54 amostras de soro de pacientes portadores de outras doenças pulmonares que não paracoccidiodomicose. Assim,

foram analisadas 19 amostras de soro de pacientes com histoplasmose, 19 amostras de soro de pacientes com aspergilose e 16 amostras de soro com tuberculose. Observou-se que nenhuma amostra apresentou reatividade frente ao filtrado de cultura da cepa B-339 de *P. brasiliensis* pelo ensaio de imunodifusão, confirmando assim a alta especificidade da metodologia bem como sua eficácia e segurança como metodologia diagnóstica. Em contra partida, a avaliação destas mesmas amostras frente à mesma preparação antigênica por ELISA indireto, revelou que 50% (27/54) das amostras apresentaram reatividade cruzada frente ao filtrado de cultura da cepa B-339.

Sene (2001) utilizando uma mistura antigênica composta por filtrado de cultura e antígeno somático obtida a partir das amostras 18, 113, 192, 265, BT2 e 339 de *P. brasiliensis* verificou reatividade cruzada de 80% frente a amostras de soro de pacientes portadores de outras micoses (6 dos quais com histoplasmose, 1 com actinomicose, 1 com criptococose, 1 com aspergilose e 1 com adiaspiromicose).

Pereira (2012) verificou entre os 13 pacientes com outras micoses, que dez (77,0%) foram reagentes por ELISA enquanto por imunodifusão dupla, todos foram não reagentes.

Sylvestre (2013) avaliou soros de pacientes com histoplasmose, bola fúngica aspergilar e tuberculose pelo teste ELISA indireto para avaliação da prevalência de resultados falsos positivos. Segundo a autora, foram observadas elevadas prevalências, principalmente quando a densidade óptica de 0,710 foi utilizada como *cut-off*. A prevalência de testes falsos positivos não variou segundo doença (tuberculose = histoplasmose = bola fúngica aspergilar; $p > 0,05$), independentemente do *cut-off* utilizado. No entanto, essa prevalência variou em função do *cut-off* para soros de pacientes com tuberculose (ELISA 0,710 > ELISA 0,850; $p = 0,016$), mas não para os de histoplasmose ($p > 0,05$) e bola fúngica aspergilar ($p > 0,05$). Todas as IDs utilizando o antígeno de Pb113 foram não reagentes para os soros de pacientes com tuberculose, histoplasmose e bola fúngica aspergilar.

Albuquerque *et al.* (2005) avaliaram a metodologia de ELISA como teste específico para o imunodiagnóstico da paracoccidioomicose, empregando como antígeno a glicoproteína de 43kDa tratada e não tratada com metaperiodato de sódio frente a 25 amostras de soro de pacientes com paracoccidioomicose e 14 amostras de soro de pacientes com histoplasmose. Neste mesmo estudo, os autores absorveram os soros de pacientes com histoplasmose com células leveduriformes de *C. albicans* e *H. capsulatum* bem como realizaram a diluição dos soros com galactose. Os autores concluíram que nenhuma das estratégias adotadas foi totalmente eficiente quanto à eliminação da reatividade cruzada.

Ortiz *et al.* (1998) ao utilizarem antígeno recombinante de 27kDa de *P. brasiliensis* na metodologia de ELISA revelaram importante reatividade cruzada frente a soros de pacientes com aspergilose (73%) e frente a soros de pacientes com histoplasmose (40%). Díez *et al.* (2003) também observaram a presença de reatividade cruzada, mesmo usando uma mistura de antígenos recombinantes. Os autores obtiveram reatividade de 88% quando empregaram p27 (0,06 µg/poço) + p87 (0,125 µg/poço) e de 90% quando empregaram (0,125 µg/poço) + p87 (0,06 µg/poço).

Paralelamente a determinação dos valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e acurácia, calculou-se também o índice de concordância entre o ensaio de imunodifusão dupla em gel de agarose e ELISA indireto. O cálculo do coeficiente *Kappa* (k) foi igual a 0,70 indicando um bom índice de concordância entre as metodologias.

Sylvestre (2013) ao empregar filtrado de cultura da amostra 113 de *P. brasiliensis* verificou que o índice de concordância entre a reação de imunodifusão dupla em gel de agarose e o ensaio de ELISA indireto foi de 0,61 sugerindo um bom índice de concordância. Entretanto, o índice de concordância *Kappa*, obtido por Pereira (2012), empregando filtrado de cultura da amostra 182 foi de 0,40, o que representa uma concordância baixa entre os dois testes.

A otimização e validação da metodologia de ELISA indireto foi realizada frente a amostras de conveniência, ou seja, amostras de pacientes com paracoccidiodomicose confirmada pela visualização das formas típicas de *P. brasiliensis* por exame micológico direto ou avaliação histopatológica, associado a detecção de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis* em algum momento do curso da doença; amostras de soro de pacientes com outras doenças pulmonares que não paracoccidiodomicose (aspergilose, histoplasmose e tuberculose) confirmados por exame micológico direto e/ou sorológico no caso das micoses e por reação de BAAR para tuberculose; e soro de indivíduos aparentemente saudáveis, doadores de banco de sangue, e com ausência de reatividade pela reação de imunodifusão dupla em gel de agarose frente a antígeno de *Histoplasma capsulatum* e *Aspergillus fumigatus*.

Entretanto, julgou-se de vital importância avaliar a performance do ensaio de ELISA indireto frente às amostras recebidas diariamente para a realização do diagnóstico presuntivo e/ou confirmatório para paracoccidiodomicose pelo Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses.

Neste sentido, é importante informar que para esta etapa do trabalho não foi possível o acesso a nenhuma informação adicional (antecedentes epidemiológicos, realização ou não de avaliação micológica ou sorológica prévia) dos pacientes, além daquelas (número de matrícula, nome, sexo, idade, hipótese diagnóstica, data da coleta, tipo de amostra, unidade requisitante, nome e CRM do médico) contidas nas requisições de exames.

Desta forma, devido à falta de informações importantes especialmente pela impossibilidade de classificar os pacientes avaliados no critério de paracoccidiodomicose doença, avaliou-se parâmetros como co-sensibilidade ou sensibilidade relativa e co-especificidade ou especificidade relativa e também o índice de concordância entre os métodos de ID e ELISA, o qual foi calculado segundo os índices de co-positividade e co-negatividade.

Desta forma, foram avaliadas 205 amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de paracoccidiodomicose que deram entrada ao Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses para a realização da pesquisa de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis* pela reação de imunodifusão dupla em gel de agarose.

A razão de masculinidade obtida neste trabalho foi de 3,3:1, corroborando com os dados da literatura. Kamikawa *et al.* (2012) encontrou razão de masculinidade de 2,5:1, Passos (2012) encontrou de 3,9:1 e Blotta *et al.* (1999) encontrou de 5,4:1.

Em relação à faixa etária dos pacientes, a idade variou de cinco (05) a 86 anos. Mais uma vez estes achados corroboram com os da literatura. Entre indivíduos com doença ativa, sabe-se que aqueles residentes ou que residiram em áreas endêmicas para *P. brasiliensis*, possivelmente infectaram-se na primeira década de vida, entretanto, devido ao longo período de latência da doença a mesma manifesta-se geralmente após a quarta década de vida. Importante salientar que além da atividade profissional deve-se levar em consideração o estado imunológico do paciente, seu estado nutricional, a susceptibilidade genética, e hábitos como tabagismo, etilismo (Franco, 1986; Brummer, *et al.*, 1993; De Camargo e De Franco, 2000; Colombo *et al.*, 2011).

A pesquisa de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis* frente a filtrado de cultura da cepa B-339, por imunodifusão dupla, revelou que das 205 amostras de soro avaliadas, 72 (35,1%) apresentaram reatividade e 133 (65,0%) ausência de reatividade para esta espécie fúngica. Por outro lado, quando estas amostras foram avaliadas, empregando-se a mesma preparação antigênica, pelo ensaio de ELISA indireto, verificou-se que em 112 (54,6%) detectou-se anticorpos circulantes e em 93 (45,4%) não se detectou anticorpos circulantes espécie-específicos. Estes resultados corroboram, não apenas os resultados obtidos na etapa de otimização e validação da metodologia de ELISA indireto deste trabalho, mas também os dados da literatura, comprovando a maior sensibilidade dos ensaios imunoenzimáticos.

Observa-se que o ELISA indireto quando comparado ao ensaio de imunodifusão dupla foi capaz de detectar a presença de anticorpos circulantes em 20% a mais das amostras avaliadas.

A relação de co-positividade ID/ELISA indireto foi de 100% e a co-negatividade ID/ELISA indireto foi de 70%; a co-positividade ELISA indireto/ID foi de 64% e a co-negatividade ELISA indireto/ID foi de 100%. O valor de concordância bruta, calculada segundo Távora *et al.* (2007) foi de 80%, considerada boa.

A baixa taxa de reatividade (64%) observada para as amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de paracoccidiodomicose, pela reação de imunodifusão dupla em gel de agarose, não desqualifica o emprego desta metodologia no imunodiagnóstico desta importante micose, mesmo porque dados deste trabalho e da literatura demonstram que ensaios de precipitação como a imunodifusão dupla, são mais específicos que os ensaios imunoenzimáticos, portanto, excelentes e indicados para o diagnóstico.

A capacidade de detecção de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis* parece estar relacionada às características da metodologia de ID (Do Valle *et al.*, 2001; Mamoni *et al.*, 2001; Neves *et al.*, 2003). Segundo Do Valle *et al.* (2001), algumas hipóteses podem explicar a não detecção de anticorpos séricos circulantes espécie-específicos: o efeito prózona, devido ao excesso de antígenos decorrentes da disseminação/gravidade da doença; a formação de imunocomplexos com oclusão de epítomos; a presença de anticorpos assimétricos que inibiriam a ligação secundária em reações de precipitação; e níveis de anticorpos abaixo do limite de detecção da técnica. Fica claro, portanto, que a reação de imunodifusão dupla em gel de agarose é inadequada para a realização do *screening* sorológico devendo a triagem ser realizada utilizando-se metodologias mais sensíveis, como o ELISA indireto, *immunoblotting* (Passos, 2012) ou *Dot-blot* (Kamikawa, 2014).

A metodologia de ELISA indireto, otimizada e validada neste estudo, empregando-se como antígeno, filtrado de cultura da cepa B-339 de *P. brasiliensis*,

apresentou sensibilidade de 96%, especificidade de 95% e bons índices de repetitividade podendo, portanto, ser implantada, atendendo a recomendação do Manual de Controle e Vigilância da Paracoccidiodomicose do Estado de São Paulo, no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de São Paulo e Referência Estadual para o imunodiagnóstico deste agravo.

Diante do exposto, espera-se que a implantação da metodologia de ELISA indireto elimine ou minimamente minimize a liberação de resultados falsos negativos, causados pelas limitações do ensaio de imunodifusão dupla em gel de agarose, contribuindo assim para o diagnóstico precoce da paracoccidiodomicose, especialmente nos casos de pacientes com ausência de confirmação micológica da doença, bem como para a instauração precoce do tratamento antifúngico.

Por último, é importante salientar, que o algoritmo sorológico do Manual de Controle e Vigilância da Paracoccidiodomicose do Estado de São Paulo, determina que os soros com ausência de reatividade para o agente etiológico da doença sejam reavaliados após 30 dias, a partir da coleta de nova amostra. Uma vez repetido o resultado, é descartada a suspeita clínica da doença. No caso de amostras reagentes na triagem sorológica, o manual determina a realização da técnica de imunodifusão dupla em gel de agarose ou contraímuno eletroforese realizando avaliação qualitativa. No caso de discordância entre os resultados dos dois ensaios, determina-se a realização do ensaio de *immunoblotting* como teste confirmatório.

6. Conclusões

Devido sua alta sensibilidade a metodologia de ELISA indireto mostrou-se uma excelente ferramenta para a triagem sorológica das amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de paracoccidioomicose e/ou com paracoccidioomicose confirmada.

O ensaio de ELISA indireto apresentou especificidade inferior (95%) àquela calculada para o teste de imunodifusão dupla em gel de agarose (100%), comprovando a aplicabilidade do ensaio de imunodifusão dupla como teste para fins diagnóstico.

A acurácia do ensaio de ELISA indireto foi superior àquela calculada para a metodologia de imunodifusão dupla em gel de agarose, 95% x 88%, respectivamente.

A metodologia de ELISA indireto apresentou alta porcentagem de reatividade cruzada (50%) quando amostras de soro de pacientes com outras infecções pulmonares como aspergilose, histoplasmose e tuberculose foram avaliadas. Este resultado confirma a necessidade do emprego de uma metodologia mais específica para o caso de pacientes que apresentem como hipótese diagnóstica “infecção pulmonar causada por fungos ou por *Mycobacterium tuberculosis*”.

O filtrado de cultura obtido a partir da cepa B-339 de *P. brasiliensis* mostrou-se excelente para ser utilizado como antígeno na condução do ELISA indireto uma vez que garantiu à técnica sensibilidade (96%) e especificidade (95%) semelhante ou muitas vezes superior às frações antigênicas purificadas ou antígenos recombinantes.

7. Referências Bibliográficas

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 FP. Estudos comparativos do granuloma coccidiótico nos Estados Unidos e no Brasil: novo gênero para o parasito brasileiro. *An Fac Med Univ Sao Paulo.* 1930; 23(5): 125-141.

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

Arantes TD, Theodoro RC, Da Graca Macoris AS, Bagagli E. Detection of *Paracoccidioides* spp in environmental aerosol samples. *Med Mycol.* 2012; 50: 1-10.

Assunção TRS. Desenvolvimento de método diagnóstico da paracoccidioidomicose humana utilizando antígeno recombinante de *Paracoccidioides brasiliensis*. [dissertação]. Londrina; 2012.

Bagagli E. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*) captured in an area of paracoccidioidomycosis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 1998; 58: 505-512.

Bagut ET, Cambier L, Heinen MP, Cozma V, Monod M, Mignon B. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of ringworm infection in cattle. *Clin Vaccine Immunol.* 2013; 20(8): 1150-1154.

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.* 2010; 4(3): 643.

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.

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

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

Bernardes-Engemann, A.R. Validação clínica de teste sorológico aplicado ao diagnóstico da esporotricose. [dissertação]. 2004.

Bertoni TA, Perenha-Viana MC, Patussi EV, Cardoso RF, Svidzinski TI. Western blotting is an efficient tool for differential diagnosis of paracoccidioidomycosis and pulmonary tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol.* 2012; 19(11): 1887-1888.

Biblioteca Virtual Adolpho Lutz, Rio de Janeiro, out. 2010. Disponível em: <http://www.bvsalutz.coc.fiocruz.br>. Acesso em 21 jul. 2012.

Blais BW, Leggate J, Bosley J, Martinez-Perez A. Comparison of fluorogenic and chromogenic assay systems in the detection of *Escherichia coli* O157 by a novel polymyxin-based ELISA. *Lett Appl Microbiol.* 2004; 39(6): 516-522.

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. 1994; 31(3): 671-676.

Bocca AL, Amaral AC, Teixeira MM, Sato PK, Shikanai-Yasuda MA, Felipe MSS. Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. Future Microbiol. 2013.; 8(9): 1177–1191.

Bos ES, Van der Doelen AA, Van Rooy N, Schuurs AH. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine as an ames test negative chromogen for horseradish peroxidase in enzyme-immunoassay. J Immunoassay. 1981; 2(3-4): 187-204.

Bovaird JH, Ngo TT, Lenhoff HM. Optimizing the ophenylenediamine assay for horseradish peroxidase: effects of phosphate and pH, substrate and enzyme concentrations and stopping reagents. Clin Chem. 1982; 28(12): 2423-2426.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976; 72: 248-254.

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

Bueno JP, Mendes-Giannini MJS, Del Negro GMB, Assis CM, Takiguti CK, Shikanai-Yasuda MA. IgG, IgM and IgA antibody response for the diagnosis and follow-up of paracoccidioidomycosis: comparison of conterimmuno-electrophoresis and complement fixation. J Med Vet Mycol. 1997; 35(3): 213-217.

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: 289-302.

Camargo ZP, Cano LE. Humoral immunity. 1994. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, eds. *Paracoccidioidomycosis*. London: Boca Raton, 187-197.

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

Camargo ZP, Guesdon JL, Drouhet E, Improvisi L. Magnetic enzyme-Linked immunosorbent assay (Melisa) for determination of specific IgG in paracoccidioidomycosis. *Sabouraudia*. 1984b; 22: 291-299.

Camargo ZP, Unterkircher C, Campoy SP, Travassos LR. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. *J Clin Microbiol*. 1988; 26(10): 247-251.

Camargo ZP, Unterkircher C, Travassos LR. Identification of antigenic polypeptides of *Paracoccidioides brasiliensis* by immunoblotting. *J Med Vet Mycol*. 1989; 27(6): 407-412.

Campos EP, Dib Neto J, Unterkircher C, Camargo ZP. Serological evaluation in follow-up of the paracoccidioidomycosis patients. *Rev Microbiol Sao Paulo*. 1990; 21(1): 11-17.

Campos MC, Gesztesi JL, Vincentini 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.

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.

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.

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

Colombo A, 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 On-line: 1-14. [acesso em: 26 mai 2012]. 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. Saúde Pública. 2002; 18(5): 1441-1454.

Da Silva MI, Chamma LG, Franco M. Agar gel microdiffusion reaction in the serologic diagnosis of paracoccidioidomycosis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1989; 31(1): 40-43.

De Almeida SM, Queiroz-Telles F, Doi EM, Ono M, Werneck LC. Anti-gp43 antibodies in the cerebrospinal fluid of patients with central nervous system involvement by paracoccidioidomycosis. Am J Clin Pathol. 2002; 118: 864-868.

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

De Mattos Grosso D, De 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.

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.

Del Negro G, Lacaz CS, Zamith VA, Siqueira AM. General clinical aspects: polar forms of paracoccidioidomycosis, the disease in childhood. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. *Paracoccidioidomycosis.* Boca Raton, Flórida, USA. CRC Press. 1994; 225-231.

Del Negro GMB, Pereira CN, Andrade HF, Palacios SA, Vidal MMS, Charbel CE, *et al.* Evaluation of tests for antibody response in the follow-up of patients with acute and chronic forms of paracoccidioidomycosis. *J Med Microbiol.* 2000; 49(1): 37-46.

Del Negro GMB, Benard G, Assis CM, Vidal MSM, 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.

Díez S, Gómez BL, McEwen JG, Restrepo A, Hay RJ, Hamilton AJ. Combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* recombinant 27-kilodalton and purified 87-kilodalton antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(4): 1536-1542.

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.

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

Fagundes RQ, Araújo Júnior JP, Modolo R, Bagagli E. Serological detection of Paracoccidioidomycosis in dogs from the endemic area of Botucatu-SP, Brazil. 2002; Pirenópolis-GO: ARBS.

Farias MR, Condas LA, Ribeiro MG, Bosco S de M, Muro MD, Werner J, *et al.* Paracoccidioidomycosis in a dog: case report of generalized lymphadenomegaly. *Mycopathologia.* 2011; 172(2): 147-152.

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.

Fernandes VC, Coitinho JB, Veloso JM, Araújo SA, Pedroso EP, Goes AM. Combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* recombinant rPb27 and rPb40 antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Immunol Methods.* 2011; 367(1-2): 78-84.

Ferreira AW, Ávila SLM. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001; 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.

Ferri RG. Estudo imunoquímico de antígenos intracelulares. Hospital. 1961; 59: 917-924.

Figueroa JI, Hamilton A, Allen M, Hay R. Immunohistochemical detection of a novel 22- to 25-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* in biopsy material and partial characterization by using species-specific monoclonal antibodies. J Clin Microbiol. 1994; 32(6): 1566-1574.

Fiorillo AM, Martinez R. Nature of precipitating specific antibodies of paracoccidioidomycosis (South American Blastomycosis) detected by counterimmunoelectrophoresis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1984; 26(1): 25-30.

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.

Franco M. Host-parasite relationships in paracoccidioidomycosis. Jour Med Vet Mycol. 1986; 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-da-Silva G, Roque-Barreira MC. Antigenemia in paracoccidioidomycosis. J Clin Microbiol. 1992; 30(2): 381-385.

Frey A, Meckelein B, Externest DMA. A stable and highly sensitive 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine-based substrate reagent for enzyme-linked immunosorbent assays. *J Immunol Methods*. 2000; 233(1-2): 47-56.

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

Gegembauer G, Araujo LM, Pereira EF, Rodrigues AM, Paniago AM, Hahn RC, *et al*. Serology of paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides lutzii*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8(7): e2986.

Gezuele E. Aislamiento de *Paracoccidioides* sp de heces de pinguino de la Antártida. IV Encuentro Internacional Sobre Paracoccidioidomycosis. Caracas, Venezuela. Abstract B2. 1989.

Gómez BL, Figueroa JI, Hamilton AJ, Ortiz B, Robledo MA, Hay RJ, *et al*. Use of monoclonal antibodies in diagnosis of paracoccidioidomycosis: new strategies for detection of circulating antigens. *J Clin Microbiol*. 1997; 35(12): 3278-3283.

Gómez BL, Figueroa JI, Hamilton AJ, Diez S, Rojas M, Tobón 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.

Gonzales Ochoa A. Clasificación clínica de las micosis. *Rev Inst Salubr Enferm Trop*. 1956; 1-8.

Greer DL. Paracoccidioidomycosis. In: Warren KS, Mahmoud AF. *Tropical and geographical medicine*. McGraw Hill Book company. New York, USA. 1990; 942-946.

Grose E e Tamsitt JR. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia, S.A. *Sabouraudia*. 1965; 4(2):124-125.

Guimarães AJ, Pizzini CV, De Abreu Almeida M, Peralta JM, Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira RM. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay using purified, deglycosylated histoplasmin for different clinical manifestations of histoplasmosis. *Microbiol Res (Pavia)*. 2010; 2(1): 17.

Hamilton AJ. Serodiagnosis of histoplasmosis, paracoccidioidomycosis and penicilliosis marneffeii; current status and future trends. *Med Mycol*. 1998; 36(6): 351-364.

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 30 jun 2014]. Disponível em <http://www.plosntds.org>.

INMETRO. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf. Acesso em 09 de Out. de 2014.

Joseph PD, Eling T, Mason RP. The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine. *J Biol Chemistry*. 1982; 257(7): 3669-3675.

Kamikawa CM, Kohara VS, Passos, AN, Vicentini AP. Retrospective seroepidemiological analysis of patients with suspicion of paracoccidioidomycosis in São Paulo State, Brazil. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2012; 18(3): 264-271.

Kamikawa CM. Padronização da metodologia de Dot-blot para o diagnóstico rápido da paracoccidiodomicose. [dissertação]. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 2014.

Kappe R, Rimek D. Mycoserology-did we move on? *Aspergillus*. *Mycoses*. 2010; 53(Suppl 1):26-29.

Kaufman L, Reiss E. Serodiagnosis of fungal diseases. In: Rose NR, Friedman H, Fahey LL. Manual of clinical Laboratory Immunology. American Society for Microbiology, Washington DC. 1986; 446-466.

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 paracoccidiodomicose. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2001; 60(Suppl 1): 139.

Lacaz CS. Evolução dos conhecimentos sobre a paracoccidiodomicose. Um pouco de sua história. In: Del Negro G, Lacaz CS, Fiorillo AM. Paracoccidiodomicose-Blastomicose Sul-Americana. São Paulo: Sarvier-Edusp. 1982.

Lacaz CS. Fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. In: Compêndio de micologia médica. 6ed. São Paulo: Sarvier. 1977; 229-271.

Lacaz CS. *Paracoccidioides brasiliensis*: morphology; evolutionary cycle; maintenance during saprophytic life; biology, virulence; taxonomy. In: Paracoccidiodomycosis, Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. Boca Raton, Flórida, USA. CRC Press. 1994; 13-22.

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

Lacaz CS, Passos Filho MCR, Fava-Netto C, Macarron R. Contribuição para o estudo da blastomicose-infecção: inquérito com paracoccidiodina. Estudo sorológico

e clínico radiológico dos paracoccidioidinos-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 EM, Melo NT. Tratado de micologia médica. 9ed. São Paulo: Sarvier. 2002.

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

Londero AT. Epidemiologia. In: Del Negro G, Lacaz CS, Fiorillo A. Paracoccidioidomicose (Blastomicose sul-americana). São Paulo: Sarvier-Edusp. 1982; 85-90.

Londero AT. Paracoccidioidomicose. J Pneumol. 1986; 12(1): 41-57.

Lopes JD, Moura-Campos MC, Vicentini AP, Gesztesi JL, Souza W, Camargo ZP. Characterization of glycoprotein gp43, the major laminin-binding protein of *Paracoccidioides brasiliensis*. Braz J Med Biol Res. 1994; 27(9): 2309-2313.

López RC, Restrepo A. Spontaneous regression of pulmonary paracoccidioidomycosis. Mycopathol. 1983; 83: 187-189.

Lutz A. Uma mycose pseudococcidica localisada na bocca e observada no Brazil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomicoses americanas. Brazil Médico. 1908a; 13: 121-124.

Lutz A. Uma mycose pseudococcidica localisada na bocca e observada no Brazil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomicoses americanas. Brazil Médico. 1908b; 15: 141-144.

Machado GC, Moris DV, Arantes TD, Silva LRF, Theodoro RC, Mendes RP, *et al.* Cryptic species of *Paracoccidioides brasiliensis*: impact on paracoccidioidomycosis immunodiagnosis. *Mem Inst Osw Cruz.* 2013; 108(5): 637-643.

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, Rossi CL, Camargo ZP, Blotta MH. Capture enzyme-linked immunosorbent assay to detect specific immunoglobulin E in sera of patients with paracoccidioidomycosis. *Am J Trop Med Hyg.* 2001; 65(3): 237-241.

Mangiaterra B, 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. Paracoccidioidomicose: atualização epidemiológica, clínica e terapêutica. *An Bras Dermatol.* 2003; 78(2): 135-146.

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-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, Queiroz-Telles F, Colombo AL, Blotta MHSL, Lopes JD, Camargo ZP. Monitoring gp43 antigenemia in paracoccidioidomycosis patients during therapy. *J Clin Microbiol.* 2004a; 42(6): 2419-2424.

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. 2004b; 42(10): 4480-4486.

Marques-da-Silva SH, Colombo AL, Blotta MHSL, Queiroz-Telles F, Lopes JD, Camargo ZP. Diagnosis of neuroparacoccidioidomycosis by detection of circulating antigen and antibody in cerebrospinal fluid. J Clin Microbiol. 2005; 43(9): 4680-4683.

Marques-da-Silva SH, Colombo AL, Blotta MHSL, Queiroz-Tellez F, Balthazar AB, Lopes JD, *et al.* Diagnosis of paracoccidioidomycosis by detection of antigen and antibody in bronchoalveolar lavage fluids. Clin Vac Immun. 2006; 13(12): 1363-1366.

Mathews R, Burnie J. Diagnosis of systemic candidiasis by an enzyme-linked dot immunobinding assay for a circulating immunodominant 47-kilodalton antigen. J Clin Microbiol. 1988; 26(3): 459-463.

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.

Matute DR, McEwen JG, Puccia R, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, *et al.* Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. Mol Biol Evol. 2006; 23(1): 65-73.

McEwen JG, Ortiz BL, García AM, Florez AM, Botero S, Restrepo A. Molecular cloning, nucleotide sequencing, and characterization of a 27-kDa antigenic protein from *Paracoccidioides brasiliensis*. Fungal Genet Biol. 1996; 20(2): 125-131.

Mendes-Giannini MLS. Padronização de testes imunoenzimáticos para o diagnóstico sorológico da paracoccidioidomicose. Teste “ELISA” – abs. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1982.

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, 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, Ricci LC, Uemura MA, Toscano E, Arns CW. Infection and apparent invasion of vero cells by *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Mycol.* 1994; 32(3): 189-197.

Mendes-Giannini MJS, Melhem MC. Infecções fúngicas. In: Ferreira AW, Ávila SLM. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001; 334-403.

Mendes-Giannini MJ, Andreotti PF, Vincenzi LR, Da Silva JL, Lenzi HL, Benard G, *et al.* Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Microbes Infect.* 2006; 8(6): 1550-1559.

Mendes RP. The gamut of clinical manifestation. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton, Flórida, USA. CRC Press. 1994; 233-252.

Mendes RP, Vicentini AP, Carvalhanas TRMP (Coord.). Manual de Vigilância Epidemiológica da Paracoccidioidomicose. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde. 2008.

Mendes EP. Propostas de metodologias para o controle de matérias-primas a serem utilizadas na produção de conjugados de anticorpos policlonais de cabra com peroxidase de raiz forte. [trabalho de conclusão de curso]. Rio de Janeiro; 2010.

Ministério da saúde. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1662. Acesso em Fev. de 2014.

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

Naiff RD, Ferreira LCL, Barrett TV, Naiff MF, Arias JR. Paracoccidiodomicose enzootica em tatus (*Dasypus novemcinctus*) no estado do Pará. Rev Inst Med Trop de São Paulo. 1986; 28(1): 19-27.

Nascimento LD. Estudo comparativo de sistemas reveladores em ensaios imunoenzimáticos para detecção de anticorpos específicos no diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana. [dissertação]. Rio de Janeiro; 2007.

Negróni P. El *Paracoccidioides brasiliensis* vive saprofiticamente en el suelo argentino. Prensa Med Argent. 1966; 53: 2381-2382.

Negróni P. Aislamiento del *Paracoccidioides brasiliensis* de una muestra de tierra Del Chaco Argentino. Bol Acad Nac Med Buenos Aires. 1967; 45: 513–516.

Neves AR, Mamoni RL, Rossi CL, Camargo ZP, Blotta MHSL. Negative immunodiffusion test results obtained with sera of paracoccidiodomycosis patients may be related to low-avidity immunoglobulin G2 antibodies directed against carbohydrate epitopes. Clin Diagn Lab Immunol. 2003; 10(5): 802–807.

Ortiz BL, Díez S, Urán ME, Rivas JM, Romero M, Caicedo V, *et al.* Use of the 27-kilodalton recombinant protein from *Paracoccidioides brasiliensis* in serodiagnosis of paracoccidiodomycosis. Clin Diagn Lab Immunol. 1998; 5(6): 826-830.

Ouchterlony O. Antigen – Antibody reactions in gels. *Acta Path Microbiol Scand.* 1949; 26(4): 507-515.

Passos AN. 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]. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 2012.

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 Internacional Meeting on Paracoccidioidomycosis; May 1-4 2011; Taubaté, São Paulo. Brazil; 2011.

Pereira AL. Diagnóstico Sorológico da paracoccidioidomicose: comparação entre os testes de Imunodifusão Dupla (IDD) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA). [dissertação]. Espírito Santo: Universidade Federal do Espírito Santo; 2012.

Perenha-Viana MCZ, Gonzales IAA, Brockelt SR, Machado LNC, Svidzinski TIE. Serological Diagnosis of Paracoccidioidomycosis through a Western Blot Technique. *Clin Vac Immun.* 2012; 19(4): 616-619.

Peterson EM. ELISA: a tool for the clinical microbiologist. *Am J Med Technol.* 1981; 47(11): 905-908.

Pinto VS, Galesi VMN, Fukusava S, Vicentini AP. Vigilância epidemiológica da Paracoccidioidomicose no Estado de São Paulo, 2008 a 2011. *BEPA.* 2012; 9(103): 4-15.

Polese M. Identificação de proteínas antigênicas para o diagnóstico da criptococose humana. [dissertação]. Porto Alegre: Rio Grande do Sul; 2009.

Pons L, Gimenez M, Guilleron C, Szaefman A. La técnica de la inmunoperoxidasa en la detección de anticuerpos específicos en la infección humana por *Paracoccidioides brasiliensis*. Medicina, Buenos Aires. 1976; 36(5): 510-512.

Porstmann T, Kiessig ST. Enzyme immunoassay techniques. An overview. J Immunol Methods. 1992; 150(1-2): 5-21.

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 reaction with the sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis or Jorge Lobo's Disease. J Clin Microbiol. 1991; 29(8): 1610-1615.

Reis BS, Bozzi A, Prado FL, Pereira MC, Ferreira FE, Godoy P, *et al.* Membrane and extracellular antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* (Mexo): identification of a 28-kDa protein suitable for immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. J Immunol Methods. 2005; 307(1-2): 118-126.

Restrepo A, Salazar ME, Cano LE, Stover EP, Feldman D, Stevens DA. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. Infect Immun. 1984; 46(2): 346-353.

Restrepo A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. Sabouraudia. 1985; 23(5): 323-334.

Restrepo A. Report of activities of the committee on paracoccidioidomycosis serodiagnosis. ISHAM Myc Newsletter. 1992; 59: 4.

Restrepo A. *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R. Principles and practice of infectious diseases. 5ed. Churchill Livingstone, Philadelphia. 2000; 2768-2777.

Restrepo A, McEwen JG, Castañeda E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol*. 2001; 39(3): 233-241.

Ricci G, Mota FT, Wakamatsu A, Serafim RC, Franco M. Canine paracoccidioidomycosis. *Medical Mycology*. 2004; 42: 379-383.

Richardson MD, Warnock DW. Enzyme-linked immunosorbent assay and its application to the serological diagnosis of fungal infection. *Sabouraudia*. 1983; 21(1): 1-14.

Rigobello FF, Marquez AS, Lopes JD, Nakanishi-Ito FA, Itano EN. Patients with chronic-form paracoccidioidomycosis present high serum levels of IgE anti-paracoccidioides brasiliensis Gp70. *Mycopathologia*. 2013; 175(3-4): 307-313.

Rodrigues MC, Cassaguerra CM, Lacaz CS. Antigenemia in paracoccidioidomycosis. Probable demonstration of circulating antigen by counterimmunoelectrophoresis test. Preliminary report. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1984; 26(5): 285-287.

Rodrigues CC. Avaliação da infecção por *Histoplasma capsulatum* por meio de reações intradérmicas em moradores da zona urbana e rural do município de Pratânia, São Paulo. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina de Botucatu; 2004.

Salfeder K. Paracoccidioidomycosis. In: Salfeder K. Atlas en color. Micosis profundas en el hombre. HARLA, México. 1979; 33-38.

Salina MA, Shikanai-Yasuda MA, Mendes RP, Barraviera B, Mendes Giannini MJ. Detection of circulating *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in urine of

paracoccidioidomycosis patients before and during treatment. J Clin Microbiol. 1998; 36(6): 1723-1728.

Salgado-Salazar C, Jones LR, Restrepo A, McEwen JG. The human fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* (Onygenales: Ajellomycetaceae) is a complex of two species: phylogenetic evidence from five mitochondrial markers. Cladistics. 2010; 26: 613-624.

San-Blas G. The cell wall of fungal human pathogens: its possible role in host-parasite relationship. Mycopathol. 1982; 79(3): 159-184.

San-Blas G, San-Blas F. Molecular aspects of dimorphism. Crit Rev Microbiol. 1984; 11(2): 101-127.

San-Blas G, San-Blas F. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence. Mycopathol. 1977; 62(2): 77-86.

San-Blas G, San-Blas F. Biochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis* dimorphism. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton, Flórida, USA. CRC Press. 1994; 49-63.

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 LS, Fernandes VC, Cruz SG, Siqueira WC, Goes AM, Pedroso ER. Profile of total IgG, IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4 levels in sera of patients with paracoccidioidomycosis: treatment follow-up using Mexo and rPb27 as antigens in an ELISA. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012; 107(1): 1-10.

Santurio JM, Leal AT, Leal ABM, Alves SH, Lübeck I, Griebeler J, *et al.* Teste de ELISA indireto para o diagnóstico sorológico de pitiose. *Pesq. Vet. Bras.* 2006; 26(1): 47-50.

Sene MG. Avaliação do teste ELISA durante o tratamento de pacientes com paracoccidiodomicose: Comparação com a imunofluorescência indireta e a micro-imunodifusão dupla em gel de agar. [dissertação]. São Paulo: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Unesp Campus de Botucatu; 2001.

Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho FQ, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML, *et al.* Consenso em paracoccidiodomicose. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006; 39(3): 297-310.

Silva DF, Assis CM, Vicentini AP. Analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens stability. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2006; 12(4): 657.

Silva DF, Assis CM, Zamboni IM, Barreto LC, Kohara VS, Vicentini-Moreira AP. Use of immunoblotting assay improves the sensitivity of paracoccidiodomycosis diagnosis. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2008; 14(2): 313-321.

Silva MIC, Carvalho IM, Franco T, *et al.* The use of a mixture of somatic and culture filtrate antigens in the evaluation of the immune response to *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol.* 1991; 29: 331-334.

Silva SHM, Grosso DM, Lopes JD, Colombo AL, Blotta MH, 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: 4480-4486.

Silva-Vergara ML, Martinez R. Inquérito epidemiológico com paracoccidiodina e histoplasmina em área agrícola de café em Ibiá, Minas Gerais, Brasil. *Rev Iberoam Micol.* 1998; 15(4): 294-297.

Silveira LH, Domingos IH, Kouchi K, Itano EN, Silva EA, Landgraf VO, *et al.* Serological detection of antibodies against *Paracoccidioides brasiliensis* in dogs with leishmaniasis. *Mycopathologia*. 2006; 162(5): 325-329.

Siqueira AM. Avaliação da sensibilidade e especificidade de algumas provas sorológicas no diagnóstico, prognóstico e controle de cura da paracoccidioidomicose. Caracterização imunológica do antígeno E₂ de *Paracoccidioides brasiliensis*. [tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 1982.

Snow RM, Dismukes WE. Diagnostic value of cryptococcal antigen in cerebrospinal fluid. *Arch Intern Med*. 1975; 135(9): 1155-1157.

Souza W. Doenças negligenciadas. Academia Brasileira de Ciências, 2010. Rio de Janeiro, 56.

Splendore A. Un' affezione micotica con localizzazione nella mucosa della bocca, osservata in Brasile, determinata da funghi appartenenti alla tribù degli Exoasci (*Zymonema brasiliensis*). In: Volume in Onore Del Prof. Angelo Celli Nel 25° Anno di Insegnamento. Roma, G. Bertero. 1912.

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.

Straus AH, Freymüller E, Travassos LR, Takahashi HK. Immunochemical and subcellular localization of the 43 kDa glycoprotein antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* with monoclonal antibodies. *J Med Vet Mycol*. 1996; 34(3): 181-186.

Sylvestre TF. Avaliação da acurácia do teste imunoenzimático e de sua contribuição no seguimento de pacientes com paracoccidioidomicose em tratamento e no

diagnóstico de doença reativada. [dissertação]. São Paulo: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Unesp Campus de Botucatu; 2013.

Sylvestre TF, Silva LRF, Cavalcante RS, Moris DV, Venturini J, Vicentini AP, *et al.* Prevalence and serological diagnosis of relapse in paracoccidioidomycosis patients. PLoS Neglec Trop Diseases. 2014; 8(5): 1-7.

Távora MPF, Pereira MAVC, Silva VL, Vita GF. Estudo de validação comparativo entre as técnicas Elisa e RIFI para diagnosticar *Leishmania sp* em cães errantes apreendidos no município de Campos dos Goytacazes, Estado do Rio de Janeiro. Rev Soc Bras Med Trop. 2007; 40(4): 482-483.

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: 273-283.

Teixeira MM, Theodoro RC, Oliveira FFM, Machado GC, Hahn RC, Bagagli E, *et al.* *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. Med Mycol. [artigo na internet]. 2013; Early On-line: 1-10. [acesso em: 03 jul 2013]. Disponível em: <http://informahealthcare.com>

Teles FR, Martins ML. Laboratorial diagnosis of paracoccidioidomycosis and new insights for the future of fungal diagnosis. Talanta. 2011; 85(5): 2254-2264.

Theodoro RC, Bagagli E, Oliveira C. Phylogenetic analysis of PRP8 intein in *Paracoccidioides brasiliensis* species complex. Fungal Genet Biol. 2008; 45(9): 1284-1291.

Theodoro RC, Teixeira MdM, Felipe MSS, Paduan KdS, Ribolla PM, *et al.* Genus *Paracoccidioides*: Species Recognition and Biogeographic Aspects. PLoS ONE. 2012; 7(5): e37694.

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.

Travassos LR. Immunochemistry of *Paracoccidioides brasiliensis* antigens. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. Paracoccidioiodomycosis. Boca Raton, Flórida, USA. CRC Press. 1994; 67-82.

Vicentini AP. Caracterização da glicoproteína de 43kDa de *Paracoccidioides brasiliensis* como proteína ligante de lamininae 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 AP, Passos AN, Kamikawa CM, Silva LRF, Kohara VS. Imunodiagnóstico da paracoccidioidomicose. Microbiologia in foco. In press. 2011; 4(17): 18-24.

Vicentini-Moreira AP. Paracoccidioidomicose: histórico, etiologia, epidemiologia, patogênese, formas clínicas, diagnóstico laboratorial e antígenos. São Paulo. BEPA. 2008; 5(51): 11-24.

Vidal MSM, Castro LGM, Cavalcante SC, Lacaz CS. Immunoprecipitation techniques and ELISA in the detection of anti-*Fonsecaea pedrosoi* antibodies in chromoblastomycosis. Rev Inst Med trop S Paulo. 2003; 45(6): 315-318.

Voogd CE, Van der Stel JJ, Jacobs JJ. On the mutagenic action of some enzyme immunoassay substrates. J Immunol Methods. 1980; 36(1): 55-61.

Wanke B, Aidê MA. Paracoccidioidomycosis. J Bras Pneumol. 2009; 35(12): 1245-1249.

Wanke B, Londero AT. Epidemiology and paracoccidioidomycoses infection. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. Paracoccidioidomycosis. Boca Raton, Flórida, USA. CRC Press. 1994; 109-117.

Weiner MH, Coats-Stephen M. Immunodiagnosis of systemic aspergillosis. Antigenemia detected by radioimmunoassay in experimental infection. J Lab Clin Med. 1979; 93(1): 111-119.

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. Histoplasmosis: a review for clinicians from non-endemic areas. Mycosis. 2006; 49(4): 274-282.

Yarzabal LA. Anticuerpos precipitantes específicos de la blastomycosis sudamericana revelados por inmunolectroforesis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1971; 13(5): 320-327.

ANEXOS

ANEXO A

Considerar a legenda abaixo para todas as tabelas do Anexo A ao Anexo E a seguir:

Sig equals 1 indicates that the difference of the means is significant at the 0,05 level.
Sig equals 0 indicates that the difference of the means is not significant at the 0,05 level.

AgPbB-339

Amostra 1

Tukey Test
soro

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
soro 100 soro 50	0,01683	0,03006	0,79198	0,84406	0,05	0	-0,06709	0,10076
soro 200 soro 50	-0,39667	0,03006	18,66241	8,7212E-7	0,05	1	-0,48059	-0,31274
soro 200 soro 100	-0,4135	0,03006	19,45439	5,93502E-7	0,05	1	-0,49742	-0,32958

Amostra 2

Tukey Test
soro

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
soro 100 soro 50	-0,03033	0,04714	0,90994	0,80057	0,05	0	-0,16196	0,10129
soro 200 soro 50	-0,3495	0,04714	10,48434	1,07075E-4	0,05	1	-0,48112	-0,21788
soro 200 soro 100	-0,31917	0,04714	9,5744	2,15673E-4	0,05	1	-0,45079	-0,18754

Amostra 3

Tukey Test
soro

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
soro 100 soro 50	0,04867	0,02573	2,67489	0,19649	0,05	0	-0,02317	0,12051
soro 200 soro 50	-0,35917	0,02573	19,74103	5,18202E-7	0,05	1	-0,43101	-0,28733
soro 200 soro 100	-0,40783	0,02573	22,41592	1,54427E-7	0,05	1	-0,47967	-0,33599

ANEXO B

Amostra 1

Ag

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
Ag 5 Ag 2,5	0,11267	0,03006	5,30075	0,01145	0,05	1	0,02874	0,19659
Ag 10 Ag 2,5	0,192	0,03006	9,03323	3,34387E-4	0,05	1	0,10808	0,27592
Ag 10 Ag 5	0,07933	0,03006	3,73248	0,06343	0,05	0	-0,00459	0,16326

Amostra 2

Ag

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
Ag 5 Ag 2,5	0,18817	0,04714	5,64465	0,00796	0,05	1	0,05654	0,31979
Ag 10 Ag 2,5	0,3215	0,04714	9,6444	2,04033E-4	0,05	1	0,18988	0,45312
Ag 10 Ag 5	0,13333	0,04714	3,99975	0,04725	0,05	1	0,00171	0,26496

Amostra 3

Ag

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
Ag 5 Ag 2,5	0,16867	0,02573	9,2705	2,75315E-4	0,05	1	0,09683	0,24051
Ag 10 Ag 2,5	0,24733	0,02573	13,59429	1,32248E-5	0,05	1	0,17549	0,31917
Ag 10 Ag 5	0,07867	0,02573	4,32379	0,03306	0,05	1	0,00683	0,15051

ANEXO C

AgPb113

Amostra 1

Tukey Test
soro

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
soro 100 soro 50	0,12033	0,03907	4,35514	0,03194	0,05	1	0,01124	0,22943
soro 200 soro 50	-0,16633	0,03907	6,01999	0,0054	0,05	1	-0,27543	-0,05724
soro 200 soro 100	-0,28667	0,03907	10,37513	1,1619E-4	0,05	1	-0,39576	-0,17757

Amostra 2

Tukey Test
soro

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
soro 100 soro 50	0,056	0,04777	1,65771	0,49748	0,05	0	-0,07739	0,18939
soro 200 soro 50	-0,35683	0,04777	10,56296	1,00998E-4	0,05	1	-0,49022	-0,22345
soro 200 soro 100	-0,41283	0,04777	12,22067	3,17177E-5	0,05	1	-0,54622	-0,27945

Amostra 3

Tukey Test
soro

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
soro 100 soro 50	0,1315	0,03064	6,06905	0,00514	0,05	1	0,04595	0,21705
soro 200 soro 50	-0,28133	0,03064	12,98423	1,93061E-5	0,05	1	-0,36689	-0,19578
soro 200 soro 100	-0,41283	0,03064	19,05328	7,18636E-7	0,05	1	-0,49839	-0,32728

ANEXO D

Amostra 1

Ag

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
Ag 5 Ag 2,5	0,05383	0,03907	1,94835	0,39158	0,05	0	-0,05526	0,16293
Ag 10 Ag 2,5	0,05567	0,03907	2,01471	0,36949	0,05	0	-0,05343	0,16476
Ag 10 Ag 5	0,00183	0,03907	0,06635	0,99879	0,05	0	-0,10726	0,11093

Amostra 2

Ag

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
Ag 5 Ag 2,5	0,16983	0,04777	5,0274	0,01534	0,05	1	0,03645	0,30322
Ag 10 Ag 2,5	0,29383	0,04777	8,69804	4,42614E-4	0,05	1	0,16045	0,42722
Ag 10 Ag 5	0,124	0,04777	3,67064	0,06789	0,05	0	-0,00939	0,25739

Amostra 3

Ag

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
Ag 5 Ag 2,5	0,10283	0,03064	4,74601	0,02081	0,05	1	0,01728	0,18839
Ag 10 Ag 2,5	0,16733	0,03064	7,72285	0,00104	0,05	1	0,08178	0,25289
Ag 10 Ag 5	0,0645	0,03064	2,97684	0,14368	0,05	0	-0,02105	0,15005

ANEXO E

Amostra 1 – AgPb113

conjugado

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
conjugado 3000 conjugado 1000	-0,01538	0,03392	0,64112	0,89387	0,05	0	-0,10586	0,07511
conjugado 6000 conjugado 1000	-0,17138	0,03392	7,14609	7,64145E-4	0,05	1	-0,26186	-0,08089
conjugado 6000 conjugado 3000	-0,156	0,03392	6,50497	0,00163	0,05	1	-0,24648	-0,06552

Amostra 2 – AgPb113

conjugado

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
conjugado 3000 conjugado 1000	-0,26025	0,02648	13,89792	1,14413E-6	0,05	1	-0,3309	-0,1896
conjugado 6000 conjugado 1000	-0,46225	0,02648	24,68517	0	0,05	1	-0,5329	-0,3916
conjugado 6000 conjugado 3000	-0,202	0,02648	10,78725	1,68627E-5	0,05	1	-0,27265	-0,13135

Amostra 3 – AgPb113

conjugado

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
conjugado 3000 conjugado 1000	-0,18388	0,02415	10,76729	1,71802E-5	0,05	1	-0,24831	-0,11944
conjugado 6000 conjugado 1000	-0,3825	0,02415	22,39831	0	0,05	1	-0,44693	-0,31807
conjugado 6000 conjugado 3000	-0,19862	0,02415	11,63102	7,79783E-6	0,05	1	-0,26306	-0,13419

Amostra 1 – AgPbB-339

conjugado

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
conjugado 3000 conjugado 1000	-0,159	0,01615	13,92627	1,11802E-6	0,05	1	-0,20208	-0,11592
conjugado 6000 conjugado 1000	-0,3845	0,01615	33,67704	0	0,05	1	-0,42758	-0,34142
conjugado 6000 conjugado 3000	-0,2255	0,01615	19,75077	0	0,05	1	-0,26858	-0,18242

Amostra 2 – AgPbB-339

conjugado

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
conjugado 3000 conjugado 1000	-0,19712	0,01284	21,71715	0	0,05	1	-0,23137	-0,16288
conjugado 6000 conjugado 1000	-0,40425	0,01284	44,53599	0	0,05	1	-0,4385	-0,37
conjugado 6000 conjugado 3000	-0,20713	0,01284	22,81884	0	0,05	1	-0,24137	-0,17288

Amostra 3 – AgPbB-339

conjugado

	MeanDiff	SEM	q Value	Prob	Alpha	Sig	LCL	UCL
conjugado 3000 conjugado 1000	-0,19975	0,01868	15,12085	4,23768E-7	0,05	1	-0,24959	-0,14991
conjugado 6000 conjugado 1000	-0,4485	0,01868	33,95094	0	0,05	1	-0,49834	-0,39866
conjugado 6000 conjugado 3000	-0,24875	0,01868	18,83009	0	0,05	1	-0,29859	-0,19891

ANEXO F

A - Meios de Cultura

Para o preparo dos meios de cultura, as substâncias foram dissolvidas em água destilada, ajustado o pH e, autoclavado a 120 °C durante 15 minutos.

A – 1. Caldo NGTA

Neopeptona (Difco)	16,0 g
Glicose (Difco)	10,0 g
Cloreto de Tiamina (Sigma)	100,0 mg
Asparagina (Sigma)	200,0 mg
Água destilada	1000,0 mL

A – 2. Ágar Fava Netto

Protease peptona nº3 (Difco)	3,0 g
Peptona (Synth)	10,0 g
Extrato de carne (Difco)	5,0 g
Cloreto de Sódio (Synth)	5,0 g
Extrato de levedura (Difco)	5,0 g
Dextrose	40,0 g
Ágar (Oxoid)	18,0 g
Água destilada	1000,0 mL

A – 3. Ágar Batata

Infusão de batata	500,0 mL
Dextrose (Oxoid)	10,0 g
Ágar (Oxoid)	15,0 g
Água destilada	500,0 mL

A – 4. Ágar Infusão de Cérebro e Coração - *Brain Heart Infusion Agar*

<i>Brain Heart Infusion</i> (Difco)	37,0 g
-------------------------------------	--------

Ágar (Oxoid)	20,0 g
Água destilada	1000,0 mL

B - Soluções, Tampões

B – 1. Imunodifusão Dupla em Gel de Agarose

B – 1.1. Solução de Ágar a 1%

Ágar purificado (Oxoid)	1,0 g
Água destilada	100,0 mL

Pesar o ágar e colocá-lo em erlenmeyer de 200,0 mL. Acrescentar a água destilada e homogeneizar, levar ao forno de micro-ondas para fundir, tomando cuidado para não levantar fervura. Após fusão distribuir 10,0 mL da solução em tubos de ensaio 16X160 e armazenar a 4 °C por três meses.

B – 1.2. Solução de Ágar Citrato

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

Dissolver em aproximadamente 80,0 mL de água destilada o cloreto de sódio, o citrato de sódio e a glicina. Ajustar o pH da solução entre 6,7-6,9. Acrescentar a agarose e levar ao forno micro-ondas para fundir. Deve-se prestar atenção para que a solução não entre em fervura, a mesma estará fundida quando ficar transparente. Após a etapa de fusão distribuir 10,0 mL da solução em tubos de 16X160 e armazenar a 4 °C por três meses.

B – 1.3. Solução de Citrato de Sódio a 5%

Citrato de sódio (Synth)	50,0 g
Água destilada	1000,0 mL

Distribuir em frascos âmbar e armazenar a 4 °C por três meses.

B – 1.4. Solução Salina a 0,85%

Cloreto de Sódio (Synth)	85,0 g
Água destilada	10000,0 mL

Armazenar em temperatura ambiente por 3 meses.

B – 1.5. Solução Corante Coomassie Brilliant Blue R-250

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

Em um balão volumétrico adicionar o ácido acético e o etanol, completar o volume para 1000,0 mL com água destilada. Adicionar o corante e homogeneizar lentamente em agitador magnético até completa dissolução. Filtrar e armazenar em frasco âmbar a temperatura ambiente por 6 meses.

B – 1.6. Solução Descorante

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

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

B – 2. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida – SDS-PAGE

B – 2.1. Solução Estoque de bis - acrilamida

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

Homogenizar a acrilamida e a bis-acrilamida em 50,0 mL de água destilada em recipiente envolto com papel alumínio. Acertar o volume para 100,0 mL e filtrar em funil com papel de filtro. Estocar a 4 °C em frasco âmbar envolto em papel alumínio. Esta solução pode ser conservada por 4 meses.

B – 2.2. Lower Gel Buffer

Trizma base 1,5 M (Sigma)	18,2 g
SDS (Sigma)	0,4 g
Água destilada (qsp)	100,0 mL

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

B – 2.3. Upper Gel Buffer

Trizma base 0,5 M (Sigma)	3,0 g
SDS (Sigma)	0,2 g
Água destilada (qsp)	50,0 mL

Adicionar 25,0 mL de água destilada ao trizma base, homogenizar e acertar o pH da solução para 6,8. Acrescentar o SDS, completar o volume e filtrar a solução.

Armazenar a 4 °C em frasco âmbar envolto em papel alumínio. Esta solução pode ser conservada por 4 meses.

B – 2.4. Solução de Persulfato de Amônio a 10% (APS)

Persulfato de amônio (Synth)	0,5 g
Água destilada	5,0 mL

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

B – 2.5. Solução de Duodecil Sulfato de Sódio (SDS) a 20%

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

B – 2.6. Tampão de Amostra Redutor 5 x Concentrado

Tris HCl 1 M pH 6,8 (Sigma)	0,6 mL
Glicerol (Vetec)	2,5 mL
SDS 20%	1,0 mL
2-Mercaptoetanol (Merck)	0,5 mL
Água destilada	4,4 mL

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

B – 2.7. Tampão de Corrida 10 x Concentrado

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

Dissolver em 600,0 mL de água destilada a glicina e o trizma, homogenizar e acertar o pH da solução para 8,3. Adicionar o SDS, homogenizar até completa dissolução. Completar para 1000,0 mL. Armazenar a 4 °C.

Para uso (1 x concentrado), diluir na seguinte proporção:

Tampão de transferência 10 x conc.	100,0 mL
Água destilada	900,0 mL

B – 2.8. Gel de separação (10%)

Água destilada	6,7 mL
Tampão Lower	4,0 mL
Solução de acrilamida	5,3 mL
Persulfato de amônio (Synth)	25,0 µL
Temed (Serva)	12,5 µL

B – 2.9. Gel de empilhamento (3%)

Água destilada	2,95 mL
Tampão Upper	1,25 mL
Solução de acrilamida	0,8 mL
Persulfato de amônio (Synth)	15,0 µL
Temed (Serva)	5,0 µL

B – 3. Immunoblotting

B – 3.1. Tampão de Transferência 10 x Concentrado

Tris (Sigma)	15,15 g
Glicina (Sigma)	72,0 g
Água destilada (qsp)	500,0 mL

Para uso (1 x concentrado), diluir na seguinte proporção:

Tampão de transferência 10 x conc.	100,0 mL
Metanol (CAAL)	100,0 mL
Água destilada	800,0 mL

Armazenar a 4 °C.

B – 3.2. Solução Corante utilizada para controle da transferência

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

Armazenar a temperatura ambiente em frasco âmbar.

B – 3.3. Solução Salina Tamponada com Fosfatos (PBS) pH 7,2–7,4 (10 x conc.)

Cloreto de Sódio (Synth)	80,0 g
Fosfato monopotássico (Sigma)	2,4 g
Fosfato dissódico (Sigma)	14,4 g
Água destilada (qsp)	1000,0 mL

Para uso (1 x concentrado), diluir na seguinte proporção:

Tampão de transferência 10 x conc.	100,0 mL
Água destilada	900,0 mL

Armazenar a 4 °C.

B – 3.4. Solução PBS-Tween 20 (0,1%)

Tween 20 (Becto)	1000,0 µL
PBS (pH 7,2 - 7,4)	1000,0 mL

Armazenar a 4 °C.

B – 3.5. Solução Bloqueadora (5%)

Leite em pó desnatado (Elegê)	5,0 g
PBS (pH 7,2 – 7,4)	100,0 mL

B – 3.6. Solução de Incubação (3%)

Leite em pó desnatado (Elegê)	3,0 g
PBS (pH 7,2 – 7,4)	100,0 mL

B – 3.7. Solução Cromógena para anti-imunoglobulina conjugada à peroxidase

4-cloro 1-naftol (Sigma)	15,0 mg
PBS (pH 7,2 - 7,4)	20,0 mL
Metanol (Merck)	5,0 mL
Peroxido de hidrogênio	30,0 µL

Dissolver o 4-cloro 1-naftol no metanol frio, acrescentar o PBS e por último o peróxido de hidrogênio.

B – 4. ELISA Indireto**B – 4.1. Tampão Carbonato-Bicarbonato 0,1 M pH 9,6**

Carbonato de sódio (Sigma)	1,59 g
Bicarbonato de sódio (Sigma)	2,93 g
Azida de sódio (Sigma)	0,2 g
Água destilada	1000,0 mL

Armazenar a 4 °C em frasco âmbar por 6 meses.

B – 4.2. PBS-T 0,1%

Idem ao B – 3.4.

B – 4.3. PBS-T-BSA 1%

BSA (Sigma)	0,5 g
-------------	-------

PBS-T 50,0 mL

B – 4.4. Solução de Ácido Cítrico 1M

Ácido Cítrico (Sigma) 48,03 g
Água desilada (qsp) 250, 0 mL

Armazenar em frasco âmbar a 4 °C por 6 meses.

B – 4.5. Tampão Citrato-Acetato

Acetato de sódio (Sigma) 8,2 g
Água destilada 800,0 mL

Ajustar o tampão para pH 5,5 com a solução de ácido cítrico. Aliquotar e armazenar congelado a -20 °C.

B – 4.6. Solução “Mãe” TMB

DMSO (Sigma) 1,0 mL
TMB (Sigma) 5,0 mg

Armazenar em frasco âmbar a 4 °C por 6 meses.

B – 4.7. Solução Reveladora

Tampão Citrato-Acetato 10,0 mL
Solução “Mãe” TMB 200,0 µL
Peróxido de hidrogênio 30% (Merck) 2,0 µL

ANEXO G

INSTITUTO ADOLFO LUTZ/SES



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Otimização e padronização da metodologia de Elisa para o imunodiagnóstico da paracoccidiodomicose

Pesquisador: Adriana Pardini Vicentini

Área Temática: Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações.

Versão: 2

CAAE: 14035113.6.0000.0059

Instituição Proponente: Instituto Adolfo Lutz

Patrocinador Principal: Instituto Adolfo Lutz

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 277.392

Data da Relatoria: 20/06/2013

Apresentação do Projeto:

A paracoccidiodomicose (PCM) foi descrita pela primeira vez por Adolpho Lutz em 1908 (LUTZ, 1908 a,b), no Instituto Bacteriológico de São Paulo, Brasil, como uma nova doença granulomatosa; ao verificar, em lesões bucais de dois pacientes a existência de fungos de natureza dimórfica distintas do *Coccidioides immitis*, agente causal da doença de Posadas-Wernicke (LACAZ, 1982; LACAZ, 2002). Após a descrição das características clínico-patológicas das formas mucocutâneas da enfermidade, seguiu-se longo período de análise e estudo das lesões, frequentemente relatadas pelos pacientes acometidos pela patologia, na tentativa de isolamento do agente causal. Em 1912, Alfonso Splendore classificou o agente etiológico da paracoccidiodomicose dentro do gênero *Zymonema*, propondo a denominação de *Zymonema brasiliensis* (LACAZ, 1982; LACAZ, 2002). Em 1930, Floriano Paulo de Almeida classificou definitiva e consensualmente o agente etiológico da PCM, criando o gênero *Paracoccidioides* dentro do Reino Fungi, classificando-o como *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*), revalidando a espécie, criada por Splendore (ALMEIDA, 1930; LACAZ, 1982; LACAZ, 2002; BIBLIOTECA VIRTUAL ADOLPHO LUTZ, 2010). Segundo Lacaz (2002), com a observação e o relato de casos isolados da doença em outros países

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90
Bairro: Cerqueira César CEP: 01.246-902
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3068-2859 Fax: (11)3085-3505 E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

da América do Sul, a mesma passou a ser chamada de Blastomicose Sul-Americana, doença de Lutz, doença de Lutz-Splendore-Almeida. Porém, a oficialização do termo paracoccidioidomicose foi estabelecida em 1971, em Medellín, Colômbia, durante reunião de micologistas do continente americano, sendo mundialmente aceita desde então (LACAZ, 2002). Os artigos científicos disponíveis nas bases de dados até 2007 descrevem o fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (RESTREPO, 1985) como único agente etiológico da paracoccidioidomicose. Entretanto a partir de 2008, estudos têm sugerido que outra espécie, *Paracoccidioides lutzii*, esteja envolvida no desenvolvimento da micose (CARRERO et al., 2008; THEODORO et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2009; SALGADO-SALAZAR et al., 2010). A partir da década de 90, iniciaram-se estudos sobre a variabilidade genética de *P. brasiliensis* através de análises de polimorfismos de sequências gênicas por métodos moleculares. Neste sentido, Matute et al. (2006) demonstraram a existência de um complexo que compreende pelo menos três (3) espécies crípticas dentro de *P. brasiliensis*: espécie S1 (presente no Brasil, Argentina, Paraguai, Peru e Venezuela); espécie PS2 (presente no Brasil e Venezuela) e espécie PS3 (restrita à Colômbia). Carrero et al. (2008) propuseram a existência de uma nova espécie constituída por isolados que não poderiam ser incluídos nos grupos citados (S1, PS2, PS3), por demonstrar extrema divergência entre os genes codificadores de proteínas, quando comparados aos demais. Fato que, corroborou para que o isolado Pb 01, também estudado por Theodoro et al. (2008), e seus semelhantes fossem denominados de ζ Pb01-like ζ . Teixeira et al. (2009) identificaram 17 novos isolados ζ Pb01-like ζ na região Centro-Oeste do Brasil e propuseram que estes sejam considerados a nova espécie dentro do gênero *Paracoccidioides*, onde o clado ζ Pb01-like ζ seria denominado *Paracoccidioides lutzii*. Salgado-Salazar et al. (2010) realizaram análises de genes mitocondriais e apoiaram a descrição formal de *Paracoccidioides lutzii* como uma segunda espécie fúngica pertencente ao gênero *Paracoccidioides*. Desta forma, com a especiação dentro do gênero associada ao conjunto de informações obtidas através de análises moleculares e/ou filogenéticas fica clara a existência da segunda espécie, a qual está em vias de ser formalmente descrita. Entretanto, é importante salientar que o significado da ocorrência de espécies crípticas em *Paracoccidioides* necessita de maiores esclarecimentos e estudos, especialmente aqueles relacionados à ecoepidemiologia, características fenotípicas, genotípicas, perfil antigênico, diagnóstico clínico e laboratorial, manifestações clínicas e resposta aos tratamentos anti-fúngicos (Machado, 2011). A PCM apresenta distribuição geográfica restrita a países da América Latina, com maior incidência e prevalência na Colômbia, Venezuela e Brasil (WANKE e LONDERO, 1994; CALLE et al., 2001; COLOMBO et al., 2011). Estima-se que, aproximadamente, 10 milhões de pessoas estejam

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

infectadas por *P. brasiliensis* nas regiões endêmicas da América Latina, no entanto, a maioria não apresenta sintomas clínicos (BRUMMER et al., 1993; RESTREPO, 2000; COLOMBO et al., 2011). O Brasil concentra aproximadamente 80% dos casos registrados na América Latina. As regiões com maior prevalência são: Sul, Sudeste e Centro-Oeste, especialmente os Estados do Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (FRANCO et al., 1989; WANKE e LONDERO, 1994; CALLE et al., 2001; RESTREPO et al., 2001; BARROZO et al., 2009; WANKE e AIDÉ, 2009; BARROZO et al., 2010; COLOMBO et al., 2011). 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-Neto, 1998; Silva-Vergara e Martinez, 1998; Blotta et al., 1999; Rodrigues, 2004; Fornajeiro et al., 2005). O 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). Kamikawa (2011) demonstrou que 60% dos municípios do Estado apresentam ao menos um paciente com anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis*, detectados pela técnica de imunodifusão dupla em gel de agarose. Segundo a autora, a maior parte 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, as maiores taxas de reatividade foram observadas nos municípios de Piracicaba, Franca, Araçatuba e Presidente Prudente, e com a ressalva que não foram incluídas no estudo os serviços de referência de Botucatu, Ribeirão Preto, Araraquara e Bauru. Em algumas situações entre as quais pode-se 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), associasse ainda a esta observação, o longo tempo necessário para o isolamento do fungo. Nestes casos, a pesquisa de anticorpos e antígenos específicos circulantes no soro de pacientes assume grande importância no diagnóstico indireto da infecção. As técnicas indiretas são aquelas que permitem inferir o diagnóstico com certo grau de certeza, otimizando o tempo utilizado para se obter resultados, aliando sensibilidade à especificidade. Os ensaios imunológicos constituem-se, na prática, na mais importante dessas técnicas auxiliares (Kaufman e Reiss, 1986; Mendes-Giannini et al., 1989; Ferreira-da-Cruz et al., 1990; Freitas-da-Silva e ROQUE-BARREIRA, 1992; Figueroa et al., 1994; Hamilton, 1998; Do Valle et al., 2001; CAMARGO, 2008), sendo que em alguns casos, o resultado

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 277.392

sorológico é a primeira indicação de infecção micótica dos pacientes, principalmente naqueles que ainda não apresentam lesões clínicas aparentes (MENDES-GIANNINI et al., 1984). Apesar de técnicas sorológicas como imunodifusão dupla em gel de agarose [ID] (DA SILVA, 1989; FERREIRA-DA-CRUZ et al., 1990; DEL NEGRO et al., 2000; DO VALLE et al., 2001; CAMARGO, 2008), contraímunoeletroforese [CIE] (FIORILLO e MARTINEZ, 1984; BUENO et al., 1997; DEL NEGRO et al., 2000), ELISA (CAMARGO et al., 1984; MENDES-GIANNINI et al., 1984; RODRIGUES et al., 1984; CANO et al., 1986; GOMEZ et al., 1998; HAMILTON, 1998; ORTIZ et al., 1998; DEL NEGRO et al., 2000; DE ALMEIDA et al., 2002; DIEZ et al., 2003; MARQUES-DA-SILVA et al., 2003; SILVA et al., 2004) e imunoblotting [IB] (DO VALLE et al., 2001; SILVA et al., 2002; SILVA et al., 2003), serem empregadas para o diagnóstico confirmatório da PCM visando a pesquisa de anticorpos e antígenos circulantes, os índices de resultado falso-positivos e falso-negativos ainda são muito elevados, especialmente nas técnicas mais sensíveis como as imunoenzimáticas (ELISA e IB); estando portanto, a especificidade e sensibilidade dos ensaios imunológicos, diretamente relacionados ao antígeno ou a preparação antigênica empregada (PUCCIA e TRAVASSOS, 1991; DO Valle et al., 2001; SILVA, 2005). Segundo Siqueira (1982) e Mendes-Giannini et al. (1994) as técnicas sorológicas utilizadas nos centros especializados podem apresentar em torno de 90%, chegando a 100% de sensibilidade dependendo do ensaio utilizado, da preparação antigênica, da forma clínica da doença e do início do tratamento. *P. brasiliensis* apresenta uma multiplicidade de componentes antigênicos em sua constituição (YARZÁBAL, 1971), alguns próprios da espécie e outros comuns aos demais fungos. Segundo Restrepo et al. (1984), estes antígenos podem ser extraídos da parede celular do fungo, obtidos do conteúdo citoplasmático (somático ou citoplasmático) ou ainda do filtrado de cultura (metabólico ou exocelular). Contudo, dados da literatura demonstram variabilidade na metodologia de produção de antígenos de *P. brasiliensis* utilizada pelos diferentes centros de pesquisa (CANO e RESTREPO, 1987; CAMARGO et al., 1988; DEL NEGRO et al., 1991; KLOTH et al., 2001; SILVA, 2005; VICENTINI-MOREIRA, 2008) e também, grande variabilidade nas metodologias dos ensaios imunológicos, sem uma padronização na realização das técnicas. Historicamente, na paracoccidiodomicose, a sorologia, além de importante auxílio diagnóstico, tem a função de monitorar o curso da doença durante e após o tratamento; a técnica utilizada, portanto, há que aliar sensibilidade à especificidade, para que o valor preditivo seja máximo e reprodutível (SILVA, 2005; VICENTINI-MOREIRA, 2008; VICENTINI et al., 2011). A técnica sorológica de maior importância utilizada rotineiramente para o diagnóstico da PCM é a imunodifusão dupla em gel de agarose (ID), tendo Ferri (1961) como pioneiro no emprego da mesma. Do Valle et al. (2001) avaliaram por ID soros de 245 pacientes na fase de pré-tratamento

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 277.392

frente a antígeno de filtrado de cultura de leveduras concentrado e dialisado a partir de um pool de isolados de *P. brasiliensis*, demonstrando 90,2% de sensibilidade. As técnicas imunoenzimáticas como por exemplo, ELISA e immunoblotting (IB) possuem alta sensibilidade e foram usadas inicialmente para caracterizar a resposta humoral geral aos antígenos de *P. brasiliensis* (BLOTTA e CAMARGO, 1994; CAMARGO et al., 1994; MENDES-GIANNINI et al., 1994). O Manual da Vigilância da Paracoccidiodomicose do Estado de São Paulo preconiza, para o imunodiagnóstico de pacientes com suspeita clínica desta patologia, a utilização do teste de ELISA, como triagem, seguida de imunodifusão dupla em amostras primeiramente positivas. O emprego do ELISA de inibição também gerou resultados satisfatórios em relação ao seguimento sorológico dos pacientes, pois se obteve correlação significativa ($p < 0,001$) entre o declínio da concentração de antígeno circulante nos fluidos biológicos dos pacientes com PCM, de ambas as formas clínicas, e a melhora ou mesmo cura clínica (GOMEZ et al., 1998). Marques-da-Silva et al., (2003; 2005; 2006), empregaram o ELISA de inibição para avaliar a antigenemia de pacientes com paracoccidiodomicose, utilizando anticorpos monoclonais direcionados às proteínas consideradas marcadores sorológicos da doença, gp43 e gp70, em espécimes clínicos tais como soro, lavado broncoalveolar e líquido cefalorraquidiano. Entretanto, apesar dos resultados promissores, tanto no diagnóstico como no seguimento de pacientes após a instituição do tratamento, a viabilidade de uso na rotina clínica é desconhecida (WHEAT, 2006). Importante salientar que a despeito da importância das técnicas sorológicas no imunodiagnóstico da paracoccidiodomicose, seja ele presuntivo e/ou confirmatório, o diagnóstico do processo infeccioso provocado por *P. brasiliensis* deve sempre ser baseado em critérios clínicos, epidemiológicos e laboratoriais como: exames de imagem (raio X de pulmão e/ou tomografia computadorizada), exames micológicos (direto, isolamento e cultura) e anatomopatológico quando possível. Com a finalização da otimização e padronização da técnica de immunoblotting e sendo a técnica de ELISA um teste o qual pode ser aplicado em larga escala e apresentar bons resultados de sensibilidade e especificidade, o Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses, responsável por grande parte do diagnóstico sorológico do Estado de São Paulo e sendo Laboratório de Referência Estadual, vem propor a otimização e padronização da técnica de ELISA para ser utilizada segundo o algoritmo proposto no Manual da Vigilância da Paracoccidiodomicose do Estado de São Paulo, ou seja, para a triagem do material biológico a ser avaliado.

Os testes de ELISA serão realizados de acordo com as metodologias propostas por Camargo et al. (1984) e por Mendes-Giannini et al. (1984) com algumas adaptações. Placas de poliestireno de fundo chato serão sensibilizadas com o antígeno, (antígenos propostos no item 3.5), diluído em

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90**Bairro:** Cerqueira César**CEP:** 01.246-902**UF:** SP**Município:** SAO PAULO**Telefone:** (11)3068-2859**Fax:** (11)3085-3505**E-mail:** cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 277.392

tampão carbonato 0,06 M, pH 9,6 e serão incubadas por 2 horas a 37°C e por 18 horas a 4°C. Após cinco (5) lavagens com PBS (Phosphate Buffered Saline) acrescido de 0,1% de Tween 20 (PBS-T), as placas serão bloqueadas com PBS-T acrescido de 5% de leite em pó desnatado (PBS-T-L) e incubadas por 1 hora em temperatura ambiente. Após cinco (5) lavagens com PBS-T, serão adicionados os soros dos pacientes diluídos a 1:100 em PBS-T-L e serão incubados por 1 hora a 37°C. Após a incubação, as placas serão lavadas cinco (5) vezes com PBS-T e será adicionado o conjugado anti-IgG humana marcado com peroxidase (Sigma) diluído a 1:2000 em PBS-T-L, seguido de incubação por 1 hora a 37°C. Após cinco (5) lavagens com PBS-T será adicionado o substrato da peroxidase (TMB) e incubado por 30 minutos a 37°C no escuro. A reação será interrompida pela adição de ácido sulfúrico. As reações serão lidas em leitor de placas de ELISA Labsystems Multiskan MS e em leitora de microplacas Tecan Sunrise a 450 nm. Avaliação da estabilidade das placas de ELISA sensibilizadas com antígenos de Paracoccidídeos spp. Placas de poliestireno de fundo chato serão sensibilizadas com os antígenos propostos acima diluídos em tampão carbonato 0,06 M, pH 9,6 e incubadas por 2 horas a 37°C e por 18 horas a 4°C. Após cinco (5) lavagens com PBS (Phosphate Buffered Saline) acrescido de 0,1% de Tween 20 (PBS-T), as placas previamente sensibilizadas serão divididas em dois grupos: a) placas bloqueadas com PBS-T acrescido de 5% de leite em pó desnatado (PBS-T-L) e incubadas por 1 hora em temperatura ambiente e; b) placas sem bloqueio prévio.

Grupos de estudo/Nº de indivíduos/Intervenções.

G1: Soros de indivíduos saudáveis/40/Avaliação sorológica.

G2: Soros de indivíduos com PCM comprovada/90/Avaliação sorológica.

G3: Soros de indivíduos com suspeita clínica (PCM)/170/Avaliação sorológica.

G4: Soros de indivíduos com outras micoses/50/Avaliação sorológica.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Principal

Otimizar e padronizar a metodologia de ELISA indireto para o imunodiagnóstico da Paracoccidíose.

Objetivo Secundário:

Avaliar a sensibilidade e especificidade do ensaio de ELISA indireto frente a duas preparações antigênicas distintas, ou seja, filtrado de cultura e componentes solúveis da superfície externa da parede celular de Paracoccidídeos spp;

Avaliar os parâmetros intrínsecos (sensibilidade, especificidade, eficiência, valor preditivo positivo)

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 277.392

e valor preditivo negativo) do ensaio de ELISA indireto;

Avaliar a estabilidade das placas de ELISA indireto sensibilizadas com antígenos de *Paracoccidioides* spp;

Avaliar o índice de concordância (índice kappa de Cohen) entre a reação de imunodifusão dupla em gel de agarose (método clássico de sorodiagnóstico) e o ensaio de ELISA indireto;

Avaliar o índice de concordância (índice kappa de Cohen) entre a reação de imunoblotting e o ensaio de ELISA indireto.

Avaliar por meio de ensaios intra e interlaboratoriais a reprodutibilidade do ensaio padronizado.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

A pesquisadora informa que do ponto de vista do paciente, o risco é mínimo principalmente se a coleta de sangue for realizada por um profissional devidamente capacitado. Do ponto de vista laboratorial, ou seja, manipulação e análise da amostra biológica, o risco é praticamente inexistente, desde que se siga as recomendações de boas práticas laboratoriais, biossegurança e os procedimentos operacionais padrões de manipulação de material biológico.

Benefícios:

A padronização e posterior avaliação da performance do ensaio de Elisa, possibilitará no caso de obtenção de índices de sensibilidade e especificidade adequados, a disponibilização da referida metodologia como teste de triagem sorológica para pacientes com suspeita clínica de paracoccidioidomicose.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O Projeto de pesquisa submetido a este Comitê é de importância em Saúde Pública e tem como desfecho primário a implantação da metodologia de Elisa como ensaio de triagem sorológica para o diagnóstico da paracoccidioidomicose.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A Folha de rosto está de acordo com a Resolução CNS 196/96 mas observando que no caso desta pesquisa não se trata de área temática 3. Quanto o TCLE a pesquisadora em documentos anexados esclareceu a dispensa do termo de consentimento livre. Informa ainda que estas amostras foram originalmente obtidas de outro Projeto CTC-IAL 97/2007. A pesquisadora responsável informa ainda que no TCLE do primeiro projeto estava a solicitação de autorização da utilização das

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César CEP: 01.246-902

UF: SP Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859 Fax: (11)3085-3505 E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 277.392

amostras em projetos posteriores que envolvessem estudos de aperfeiçoamento de diagnóstico como é o caso desse projeto. A Pesquisadora também incluiu o termo de responsabilidade e sigilo das amostras e a Portaria DG IAL 16, de 22/12/2010 sobre Normas de temporalidade das amostras biológicas e dos produtos armazenados no Instituto Adolfo Lutz,.

Recomendações:

O presente estudo não se trata da Área 3. Fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos novos (fases I, II e III) ou não registrados no país (ainda que fase IV), ou quando a pesquisa for referente a seu uso com modalidades, indicações, doses ou vias de administração diferentes daquelas estabelecidas, incluindo seu emprego em combinações. Esta área está relacionada à pesquisa clínica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram encontradas pendências na presente pesquisa.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com o item IX. 2 da Resolução CNS nº 196/1996 - cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo, sob sua guarda, por 5 anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao

SAO PAULO, 20 de Maio de 2013

Assinador por:
Maria de Fátima Costa Pires
(Coordenador)

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

E-mail: cepial@ial.sp.gov.br