

Camila Mika Kamikawa

**PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE *DOT-BLOT* PARA O  
DIAGNÓSTICO RÁPIDO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

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

**Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública**

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dra. Adriana Pardini  
Vicentini

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

Kamikawa, Camila Mika

Padronização da metodologia de dot-blot para o diagnóstico rápido da paracoccidiodomicose / Camila Mika Kamikawa - 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.

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

1. Paracoccidiodomicose/diagnóstico 2. Paracoccidiodomicose/  
imunologia 3. Imunodifusão 4. Estudos de validação

SES/CCD/CD-299/14

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#117D/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 à minha mãe e ao meu irmão, minhas inspirações de acordar todos os dias. Amo muito vocês!***

***Dedico também à querida Dra. Elizabeth de los Santos Fortuna, in memoriam.***

## Agradecimentos

Mesmo que de praxe, primeiramente à **Deus-Parens!** Pela graça de respirar a cada segundo, tendo força, ânimo e esperança para seguir...

À **Adriana Pardini Vicentini**, que além de orientadora, foi mãe, amiga, conselheira e me deu inúmeras oportunidades de aprender tudo o que sei hoje sobre como encarar a vida, lidar com pessoas, liderar pelo exemplo e seguir com a cabeça erguida. Muito obrigada, DE NOVO, por TUDO, do fundo do meu coração, Dri!

À minha mãe, **Julia Mitsuko Kamikawa**, que além de dedicar, agradeço pela paciência de cada dia, pela dedicação de todas as noites e pela força de seu amor! O caminho que sigo hoje é graças à senhora, a pessoa que sou hoje é pela senhora e o futuro que terei é o presente mais valioso que herdarei da senhora! Desculpe se isso não fica muito claro, mas saiba que te amo incondicionalmente!

Ao companheiro e carinhoso **Gustavo Boldo**, toda sua atenção, paciência, longas conversas e amor me fizeram caminhar nessa jornada e seus ensinamentos me deixaram cada dia mais forte para erguer a cabeça nas dificuldades, obrigado amor!!! Te amo muito!

À **Valdelene S. Kohara** e **Luciane Franciscone Silva** pela compreensão e paciência nas situações profissionais, pessoais, humorísticos e principalmente por não me deixarem ficar sem o cafezinho das 10h (rs). Valeu vir trabalhar todos os dias. Muito obrigada!

À **Angela Noronha Passos**, colega que, incansavelmente aconselhou e ajudou sempre que podia, obrigada!!

Às colegas **Juliana Paulino** e **Talita Vilches** pelas risadas, pelos poucos, mas valiosos encontros após o expediente de trabalho que nos fizeram esquecer os problemas, por pelo menos algumas horas!!

Ao **Centro de Imunologia**, seus pesquisadores e colaboradores pelo espaço, convívio e momentos de distração durante as festas e encontros. Fizeram a diferença e me ajudaram a liberar a tensão.

À **Direção Geral do IAL**, especialmente ao Dr. **Hélio Hehl Caiaffa Filho** por toda infra-estrutura e materiais disponibilizados para a pesquisa e desenvolvimento de estudos epidemiológicos e diagnósticos importantíssimos para a Saúde Pública.

À **Carmem Aparecida Freitas de Oliveira**, diretora do Centro de Imunologia, por todo apoio e incentivo oferecido desde que assumiu a Diretoria do Centro de Imunologia.

Aos membros da Banca de Qualificação e Defesa de Dissertação, Dr. **Zoilo Pires de Camargo**, Dr. **Carlos Taborda**, Dr. **Marcos Vinícius da Silva** e Dr. **Gil Benard** pelas valiosas sugestões realizadas.

Aos colegas de pós-graduação e professores, **Patricia, Cláudia, Samira** e aos **professores Pedro e Julia**, que firmemente me apoiaram e ajudaram nas aulas quando necessário.

À Dra. **Maria de Fátima Costa Pires**, representando todo o corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças e às secretárias, **Tirces** e **Carol**, pelo auxílio e orientações oferecidos em relação aos procedimentos e regulamentação da Pós-Graduação.

Ao **Prof. Dr. Rinaldo Poncio Mendes** pela ajuda imprescindível em cálculos estatísticos (Teste de Cochran e McNemar) para abrilhantar ainda mais a dissertação, sem seu conhecimento nessa área algumas valorizações estariam perdidas.

Aproveito a oportunidade para agradecer à minha família. Meu irmão, **Clóvis Yukio Kamikawa**, que mesmo estando longe, sempre esteve presente nos momentos em que precisava desabafar.

Minhas primas, **Naoko** e **Miwa**... A cada encontro com vocês, minha alegria voltava, minha inspiração crescia e o carinho aumentava! Obrigada pelos relaxamentos, pela confiança e pela amizade!

Não menos importante: à meus tios, tias e outros primos. A paz interior que sinto ao estar com vocês é tão grande que todas as outras coisas são esquecidas!

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

*“A educação deve formar seres aptos para governar a si mesmos e não para ser governado pelos outros”.*

Herbert Spencer (1820-1903)

## **KAMIKAWA, C M – Padronização da metodologia de *Dot-Blot* para o diagnóstico rápido da paracoccidioidomicose.**

### **RESUMO**

A paracoccidioidomicose (PCM), micose profunda de natureza crônica granulomatosa, apresenta maior incidência no Brasil. O diagnóstico de certeza deriva da visualização do agente etiológico, o fungo *Paracoccidioides* spp em amostras biológicas. No entanto, em algumas situações o acesso ao local da lesão impede a coleta do material biológico. Assim, as técnicas imuno-sorológicas permitem inferir diagnóstico com certo grau de certeza, otimizando o tempo utilizado para se obter resultados. A técnica sorológica amplamente utilizada para o imunodiagnóstico da PCM é a imunodifusão dupla em gel de agarose (ID), com especificidade e sensibilidade variando de 65 a 100%; sendo de fácil execução e não necessitando de automação. A técnica de Dot-Blot (DB) tem sido utilizada com sucesso no diagnóstico de inúmeras doenças parasitárias e infecciosas, como a toxoplasmose e a leishmaniose visceral. No diagnóstico da PCM, a metodologia mostrou-se promissora no acompanhamento de pacientes durante o tratamento anti-fúngico e em inquéritos soropidemiológicos. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi padronizar o ensaio de Dot-Blot visando o diagnóstico rápido da PCM, propondo que o mesmo seja uma ferramenta de triagem dos soros com suspeita clínica para a doença. A padronização da técnica de Dot-Blot apresentou melhores resultados quando se utilizou antígeno obtido de filtrado de cultura de *P. brasiliensis* do isolado B-339 para a sensibilização de membranas de nitrocelulose. As diluições de soro e conjugado foram de 1:40 e 1:2000, respectivamente, incubando ambos em solução PBS-L 3%. Para a padronização do ensaio de Dot-Blot, 143 amostras de soro foram utilizadas e chamadas de grupo controle. Destas, 23 amostras de soro foram de pacientes aparentemente saudáveis, 77 amostras de soro de pacientes com PCM confirmada e 43 amostras de soros com outras doenças (tuberculose, aspergilose e histoplasmose). A análise dos resultados possibilitou o cálculo dos valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo, prevalência e acurácia para ambas as técnicas isoladamente, sendo eles: 98,2%, 75,5%, 72,7%, 98,4%, 40% e 84,6% para a ID e 95,9%, 90%, 91%, 95,4%, 51% e 93% para DB, respectivamente. Além do grupo controle, mais 300 amostras de soro de pacientes apenas com a suspeita clínica da doença foram utilizadas para avaliar o desempenho da técnica padronizada. A pesquisa de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis* empregando-se o ensaio de imunodifusão dupla, revelou que 34% apresentaram reatividade e 66% ausência de reatividade para *P. brasiliensis*. Por outro lado, através da metodologia padronizada de *Dot-blot* observou-se o reconhecimento de anticorpos séricos anti-*P. brasiliensis* em 47,3% e ausência de reatividade em 52,7%. Comparando a capacidade discriminatória de ambas as metodologias, pode-se sugerir que o DB apresenta uma tendência de elevar o padrão de reatividade, uma vez que reconheceu 40 (13,3%) soros a mais que a ID. Ao comparar os resultados dos dois testes,

considerando a ID o teste padrão ouro, foram observados valores de co-positividade e co-negatividade de 68,3% e 96,8%, respectivamente. E obtendo um índice de concordância entre elas de  $\kappa=0,66$ , classificada como boa. A análise da estabilidade das membranas de nitrocelulose dotadas com o antígeno de *P. brasiliensis* demonstrou que membranas armazenadas bloqueadas, independentemente da temperatura de armazenamento, não apresentaram padrão de reatividade como o observado em membranas armazenadas não bloqueadas. Melhores resultados e padrão de reatividade foram visualizados em membranas dotadas e armazenadas à temperatura ambiente, por até 90 dias. A repetitividade intermediária também apresentou resultados satisfatórios, já que apenas três amostras de soro, das 11 escolhidas aleatoriamente para o estudo, obtiveram resultados diferentes entre os quatro analistas distintos que realizaram a técnica de Dot-blot. Os resultados obtidos, além de demonstrarem que a técnica é de fácil execução, menor custo e tempo para a liberação de seu resultado, nos permite sugerir um novo algoritmo para o diagnóstico sorológico da PCM, substituindo a metodologia de ELISA indireto proposta para a realização da triagem sorológica pelo ensaio de Dot-Blot.

**Palavras-chave:** testes imunológicos, Paracoccidioidomicose, *Dot-Immunobinding*, Dot-Elisa, estudos de validação.

## **KAMIKAWA, C M – Metodology standardization of *Dot-Blot* for screening of paracoccidioidomycosis.**

### **ABSTRACT**

The paracoccidioidomycosis (PCM) is the greatest mycosis of chronic granulomatous nature in Brazil. The definitive diagnosis derives from the view of the etiologic agent, *Paracoccidioides* spp in biological samples. However, in some situations, access to the site of injury prevents the collection of biological material. Thus, immuno- serological techniques allow inferring diagnosis with a degree of certainty and optimizing time taken to get results. The serological technique widely used for immunodiagnosis of PCM is double immunodiffusion in agarose gel (DI), with a sensitivity and specificity ranging from 65 to 100%, being easy to perform and not requiring automation. The Dot-blot (DB) technique has been used successfully in the diagnosis of many infectious and parasitic diseases such as visceral leishmaniasis and toxoplasmosis. On the diagnosis of PCM, this methodology showed promise results in monitoring patients during treatment with anti-fungal and seroepidemiological surveys. Given the above, the objective of this study was to standardize the Dot-blot assay targeting the rapid diagnosis of PCM, suggesting that it is a screening tool for sera with clinical suspicion for the disease. The standardization of Dot-Blot showed better results when using antigen obtained from culture filtrate of *P. brasiliensis* isolated from B-339 to sensitize nitrocellulose membranes. The serum and conjugated dilutions were 1:40 and 1:2000, respectively, both incubating in PBS-3% L. For the standardization of the Dot-blot assay, 143 serum samples were used and called, control group. Of these, 23 samples were apparently healthy patients, 77 serum samples from patients with confirmed PCM and 43 serum samples with other diseases (tuberculosis and aspergillosis, histoplasmosis). The results enabled the calculation of sensitivity, specificity, positive and negative predictive values, and accuracy prevalence for both techniques in isolation, as follows: 98.2%, 75.5%, 72.7%, 98.4%, 40% and 84.6% for DI and 95.9%, 90%, 91%, 95.4%, 51% and 93% for DB, respectively. In addition to the control group, 300 serum samples from patients with clinical suspicion of PCM were used to evaluate the performance of the standard technique. The circulating antibodies anti-*P. brasiliensis* employing double immunodiffusion, revealed that 34% were reactive and 66 % no reactivite to *P. brasiliensis*. On the other hand, by Dot-blot methodology, it was observed the serum recognition of anti-*P. brasiliensis* in 47.3% and no reaction in 52.7%. Comparing the discriminatory ability of both methods, it can be suggested that the DB has a tendency to raise the reactivity pattern, as recognized 40 sera higher than the DI. When comparing the results of the two tests, considering the DI the gold standard, it showed co-positivity and co-negativity of 68.3% and 96.8%, respectively. And getting an index of agreement between them for  $\kappa=0.66$ , rated as good. The analysis of the stability of nitrocellulose membranes doted with the antigen of *P. brasiliensis* demonstrated that stored membranes blocked, regardless of the storage temperature showed no reactivity patterns as

observed in membranes stored not blocked. Best results and reactivity patterns were seen in membrane fitted and stored at room temperature, up to 90 days. The intermediate repeatability also showed satisfactory results, since only three serum samples from 11 randomly selected for the study, were different among the four distinct analysts who performed the Dot-blot technique. The results obtained, demonstrate that the technique is easy to perform, less cost and time to its result, allowing us to suggest a new algorithm for the serological diagnosis of PCM, replacing the indirect ELISA methodology proposed for the realization of serological screening by Dot-blot assay.

**Key-Words:** immunological tests, paracoccidioidomycosis, *Dot-Immunobinding*, Dot-Elisa, validation studies.

## LISTA DE ABREVIATURAS

%	Por cento
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CCD	Coordenadoria de Controle de Doenças
CTC	Comissão Técnico-Científica
CVE	Centro de Vigilância Epidemiológica
DB	Dot-Blot
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FC	Fixação de Complemento
FN	Fava-Netto
g	Gramas
Gp	Glicoproteína
gp 43	Glicoproteína de 43kDa
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IB	<i>Immunoblotting</i>
ID	Imunodifusão dupla em gel de agarose
Ig	Imunoglobulina
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
kDa	Kilo Dalton
LAT	Aglutinação em Látex
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
Mg	Miligramas
mL	Mililitros
Mm	Milímetros
mM	Milimolar
MS	Ministério da Saúde
Nm	Nanômetros

NR	Não Reagente
°C	Graus Celsius
p/v	Peso/volume
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PBS – L	Tampão PBS contendo Leite Desnatado
PBS – T	Tampão PBS contendo Tween 20
PCM	Paracoccidioidomicose
R	Reagente
RAPD	<i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
Rpm	Rotações por minuto
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Eletrophoresis</i>
SES	Secretaria de Estado da Saúde
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SP	São Paulo
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
UNESP	Universidade Estadual de São Paulo
USA	<i>United States of America</i>
V	Volts
v/v	Volume/volume
VPN	Valor Preditivo Negativo
VPP	Valor Preditivo Positivo
WB	<i>Western Blotting</i>
β	Beta
κ	Kappa
μg	Microgramas
μL	Microlitros
μm	Micrômetro

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - Organograma proposto pela Vigilância Epidemiológica da PCM.....17
- FIGURA 2** - Esquema ilustrativo da reação de imunodifusão dupla em gel de agarose.....32
- FIGURA 3** - Esquema ilustrativo da reação de *Dot-immunobinding* (Dot-Blot).....34
- FIGURA 4** - Padrão de leitura da técnica de Dot-Blot, onde **a** é reagente, **b** é indeterminado e **c** é não reagente.....47
- FIGURA 5** - Distribuição por gênero dos pacientes do grupo controle.....47
- FIGURA 6** - Distribuição por faixa etária dos indivíduos do grupo controle.....48
- FIGURA 7** - Distribuição do perfil de reatividade das amostras de soro de pacientes com PCM confirmada, avaliadas por ID (Imunodifusão Dupla) e DB (Dot-Blot).....49
- FIGURA 8** - Distribuição por gênero dos pacientes com suspeita clínica de paracoccidiodomicose ou com doença confirmada cujas amostras foram recebidas para pesquisa de anticorpos séricos circulantes anti-*P. brasiliensis*.....51
- FIGURA 9** - Distribuição por faixa etária dos pacientes com suspeita clínica de paracoccidiodomicose ou com doença confirmada cujas amostras foram recebidas para pesquisa de anticorpos séricos circulantes anti-*P. brasiliensis*.....51

**FIGURA 10** - Distribuição por títulos de diluição das amostras de soro reagentes para ID dos pacientes com suspeita clínica para PCM.....52

**FIGURA 11** - Distribuição do perfil de reatividade das amostras de soro com suspeita clínica para PCM, avaliadas por ID (Imunodifusão Dupla) e DB (Dot-Blot).....53

**FIGURA 12** - Esquema da aplicação das amostras de soro em placa de Dot-Blot. Os números representam a ordem em que foram aplicadas as cores o local de aplicação das mesmas amostras em duplicata.....54

**FIGURA 13** - Avaliação da estabilidade das membranas de nitrocelulose à -20°C. a, b: membranas após 7 dias de adsorção do antígeno; c, d) 15 dias de antígeno dotado e e, f) 30 dias de antígeno dotado.....55

**FIGURA 14** - Avaliação da estabilidade das membranas de nitrocelulose à 8°C. a, b: membranas após 15 dias de adsorção do antígeno; c, d) 30 dias de antígeno dotado e e, f) 90 dias de antígeno dotado.....55

**FIGURA 15** - Avaliação da estabilidade das membranas de nitrocelulose à temperatura ambiente nos tempo de sete (7), 30 e 90 dias após adsorção do antígeno. a) amostra de soro de paciente com suspeita clínica para PCM com alta titulação para Imudifusão Dupla; b) amostra de soro de paciente com suspeita clínica para PCM, não reagente para ID e, c) amostra de soro de paciente com suspeita clínica para PCM com baixa titulação para ID.....56

**FIGURA 16** - *Immunoblotting* (IB) das amostras de soro dos pacientes com suspeita clínica de paracoccidiodomicose com resultados discordantes entre ID e DB. Foram reagentes frente à glicoproteína de 43kDa, as fitas 2, 4, 7 e 9 e a fita controle positivo (C+); as demais apresentaram ausência de reatividade.....57

**FIGURA 17** - Comparação em porcentagem dos parâmetros intrínsecos dos ensaios de Imunodifusão Dupla e Dot-Blot.....59

**FIGURA 18** - Comparação em porcentagem dos valores de sensibilidade e especificidade relativas da técnica de DB, no primeiro momento (1) e após repetição das amostras discordantes (2).....60

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> – Modelo para validação de teste diagnóstico, segundo Ferreira e Àvila (2001).....	38
<b>TABELA 2</b> - Condições estabelecidas para a realização da técnica de Dot-Blot no diagnóstico da PCM.....	46
<b>TABELA 3</b> - Comparação dos resultados observados entre as análises de Dot-blot realizadas por diferentes analistas (1, 2, 3 e 4) com as mesmas amostras, em dias distintos e no mesmo laboratório.....	54
<b>TABELA 4</b> - Avaliação das amostras de soro por ID, de acordo com a confirmação clínico-laboratorial da micose.....	58
<b>TABELA 5</b> - Avaliação das amostras de soro por DB, de acordo com a confirmação clínico-laboratorial da micose.....	59
<b>TABELA 6</b> - Comparação das amostras de soro avaliadas por ID e DB.....	60
<b>TABELA 7</b> - Comparação das amostras de soro avaliadas por ID e DB no momento 2.....	60

## LISTA DE QUADROS

**QUADRO 1** - Escala de concordância do índice *Kappa*.....41

**QUADRO 2** – Distribuição dos resultados discordantes das amostras de soro de pacientes com paracoccidiodomicose doença quando avaliados pelos ensaios de imunodifusão dupla e Dot-blot.....50

**QUADRO 3** - Amostras discordantes entre ID e DB analisadas por IB. Resultados concordantes com o ensaio de DB.....57

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO</b> .....	24
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	28
3.1. Objetivo geral.....	28
3.2. Objetivos específicos.....	28
<b>4. CASUÍSTICA E MÉTODOS</b> .....	29
4.1. Soros humanos.....	29
4.2. Considerações éticas.....	30
4.3. Obtenção de antígeno.....	30
4.4. Dosagem proteica.....	31
4.5. Imunodifusão Dupla em gel de Agarose.....	31
4.6. Dot-blot (DB).....	33
4.7. Repetitividade e reprodutibilidade intermediária do ensaio de <i>Dot-Immunobinding</i> (DB).....	34
4.8. Estabilidade das membranas.....	35
4.9. <i>Immunoblotting</i> (IB).....	35
4.10. Avaliação dos parâmetros intrínsecos.....	37
4.10.1. Sensibilidade.....	38
4.10.2. Especificidade.....	39
4.10.3. Valor preditivo.....	39
4.10.4. Prevalência.....	40
4.10.5. Acurácia ou Eficiência.....	40
4.11. Índice <i>Kappa</i> de Cohen.....	40
4.12. Teste do Qui-quadrado.....	41
<b>5. RESULTADOS</b> .....	42
5.1. Otimização do ensaio de Dot-Blot.....	42
5.1.1. Antígeno.....	42
5.1.2. Soros.....	43
5.1.3. Anticorpo secundário.....	44
5.1.4. Protocolo otimizado de Dot-blot.....	45
5.1.5. Critérios adotados para interpretação dos Dot-blots.....	46

5.2.	Caracterização e avaliação do grupo controle.....	47
5.3.	Análise da performance do ensaio de Dot-Blot.....	50
5.4.	Avaliação da repetitividade e reprodutibilidade intermediária.....	53
5.5.	Análise da estabilidade das membranas.....	55
5.6.	<i>Immunoblotting</i> (IB).....	57
5.7.	Cálculo dos parâmetros intrínsecos dos ensaios sorológicos.....	63
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>61</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>88</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>90</b>
<b>ANEXO</b>	.....	<b>105</b>

# 1. INTRODUÇÃO

A paracoccidiodomicose (PCM) foi descrita há mais de um século, por Adolpho Lutz, como uma doença que se caracterizava por apresentar lesões graves, com presença de úlceras que tomavam conta da boca e destruíam a mucosa da gengiva e do véu palatino, apresentando ainda significativa repercussão ganglionar. Após identificar o agente causal, bem como seu modo característico de reprodução, Lutz a classificou como micose pseudococcídica (Lutz, 1908; Lacaz, 1982). Entretanto, a classificação definitiva e consensualmente aceita foi feita em 1930 por Floriano Paulo de Almeida (Almeida, 1930; Lacaz, 1982; Lacaz, 2002), ao confirmar os achados anteriormente descritos por Lutz em 1908, estabelecendo, assim, as diferenças entre o agente etiológico da paracoccidiodomicose e o *Coccidioides immitis*, com o qual era frequentemente confundido (Almeida, 1930).

Segundo Lacaz (2002), após 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 ou ainda Doença de Lutz-Splendore-Almeida, (Almeida, 1930). Porém, a oficialização do termo paracoccidiodomicose foi estabelecida apenas em 1971, durante o *First Pan American Symposium on Paracoccidiodomycosis*, realizado em Medellín, Colômbia sendo mundialmente aceita desde então.

O agente etiológico da PCM é um fungo termo-dirmórfico, que se apresenta sob duas formas, ou seja, em vida saprofítica ou quando cultivado a 25-28°C se encontra em fase miceliana e quando cultivado a temperatura de 35-37°C ou em vida parasitária como levedura (Brummer et al., 1993).

Na fase infectante, o patógeno apresenta-se, macroscopicamente, sob a forma de colônias brancas e aderentes ao meio de cultura. Microscopicamente observam-se hifas delgadas, hialinas, septadas, multinucleadas e ramificadas com produção de clamidósporos terminais ou intercalares (Restrepo, 1985).

Por outro lado, quando cultivado a 35-37°C ou no tecido hospedeiro exhibe colônias de coloração creme, chamadas de cerebriformes ou leveduriformes. O exame microscópico demonstra a presença de células arredondadas ou ovais, multinucleadas, com parede celular espessa, birrefringente, rodeada por multibrotamentos (Lacaz, 1994).

A infecção humana se dá principalmente pela inalação de conídios presentes em solos, coleções hídricas e plantas. Por esse motivo, trabalhadores rurais e pessoas que têm contato direto com ambientes propícios para o crescimento do patógeno estariam mais suscetíveis a exposição, infecção e doença pelo fungo (Brummer et al., 1993).

A PCM acomete predominantemente indivíduos do sexo masculino (razão de masculinidade 7,2:1) com faixa etária entre 30 a 50 anos, residentes em áreas rurais ou periurbanas, que exercem ou exerceram diferentes atividades relacionadas direta ou indiretamente à agropecuária. Entre estas atividades, pode-se citar: agricultores, tratoristas, motoristas, lenhadores, vaqueiros, jardineiros, granjeiros, entre outros. Um fato de suma importância que deve ser levado em consideração diz respeito ao uso de máquinas agrícolas como tratores e colheitadeiras. Apesar de indispensável para o preparo do solo de grandes áreas, o emprego das mesmas promove a formação de verdadeiras “nuvens” de poeira, que muitas vezes carregam partículas e/ou propágulos fúngicos, o que contribui para que operadores de tratores, colheitadeiras e até mesmo motoristas de caminhões que fazem o transporte da produção, na dependência de seu estado imunológico e tempo de exposição, adquiram infecção por *P. brasiliensis*. Na ausência desses antecedentes, é fundamental investigar a procedência remota do indivíduo, enfatizando a migração, atividade profissional ou viagem, mesmo que de lazer a regiões sabidamente endêmicas (Silva-Vergara, 1996).

O baixo índice de pacientes do sexo feminino portadoras da infecção causada por *P. brasiliensis*, pode ser explicado pelos níveis adequados de estrógeno, responsáveis pela “resistência aparente” das mulheres à infecção.

Segundo, Restrepo et al. (1984) e Salazar et al. (1988), o 17- $\beta$  estradiol atua inibindo a síntese de proteínas de *P. brasiliensis* importantes para a transformação/reversão da fase infectante para a parasitária. Por outro lado, na ausência de níveis adequados deste hormônio observa-se a mesma prevalência da infecção em ambos os sexos, especialmente em pacientes com idade inferior a 13 anos ou em mulheres menopausadas (Shankar et al., 2011).

Mesmo após um século de sua descrição, até o momento pouco se conhece sobre o habitat natural e as condições de vida saprofítica de *Paracoccidioides brasiliensis*. Baseado nas características ecológicas das regiões endêmicas acredita-se que o microrganismo habite preferencialmente regiões tropicais e sub-tropicais ou de transição para o cerrado, com temperaturas médias anuais entre 18 a 24°C, índices pluviométricos elevados, variando de 900 a 1.800 mm, com verões chuvosos, invernos quentes e solos ácidos (Franco et al., 2000; Restrepo et al., 2001; Calle et al., 2001; Coutinho et al., 2002).

Uma vez inalado, o fungo 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, caracterizando, assim, o complexo primário na PCM. No entanto, essas lesões podem regredir espontaneamente em indivíduos imunocompetentes, com destruição total ou parcial do fungo (Lopez e Restrepo, 1983), caracterizando a forma subclínica da doença (Lacaz et al., 1959).

Em relação às manifestações clínicas da PCM, atualmente são levadas em consideração além das próprias, os parâmetros imunológicos da enfermidade (Franco et al., 1987; Mendes, 1994).

De acordo com a classificação proposta por Franco et al. (1987), a PCM apresenta três diferentes formas: PCM-infecção, PCM-doença e PCM-residual.

A PCM-infecção é observada em indivíduos que apresentam positividade em testes cutâneos frente a paracoccidiodina, sendo considerada a forma assintomática da doença. Nestes indivíduos a imunidade celular apresenta-se preservada, observando-se intensas reações intradérmicas (Franco et al., 1987).

A PCM-doença é dividida em duas formas: a aguda (juvenil) acometendo indivíduos de ambos os sexos, predominantemente crianças, adolescentes e adultos jovens apresentando quadros mais severos e elevados níveis de anticorpos. Ocorre em 15 a 20% dos casos e o acometimento pulmonar é raro, estando presente em 5 a 11% dos pacientes (Franco et al., 1987; Del Negro, 1994; Mendes, 1994).

A forma crônica (adulta) representa 90% dos casos, e a doença desenvolve-se a partir de um foco quiescente (Del Negro, 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 (forma crônica unifocal) ou disseminar-se para outros órgãos (forma crônica multifocal) (Franco et al., 1987).

A forma residual da PCM é marcada por sequelas, acometendo 60% da população das áreas endêmicas, comprometendo principalmente os tecidos: pulmonar, adrenal, laríngeo, digestivo, encefálico, causando enfisema, dispneia, síndrome de Addison, estenose, rouquidão, hipertensão intracraniana, etc. (Mendes et al., 2008; Shikanai-Yasuda et al., 2006).

O tratamento da enfermidade é difícil, visto a taxa de adesão aos antifúngicos ser muito baixa. Soma-se a esta observação, o fato dos pacientes serem geralmente tabagistas e/ou etilistas, dois fatores de risco importantes que provocam a depressão do sistema imunológico do hospedeiro (Martinez e Moya, 1992).

A paracoccidioomicose apresenta distribuição geográfica restrita a países da América Latina, apresentando maior incidência no Brasil, com aproximadamente 80% dos casos, Venezuela e Colômbia (Colombo et al., 2011).

Estima-se que, a cada ano, a taxa de incidência na população brasileira seja de 1 a 3 casos por 100.000 habitantes e a taxa de mortalidade de 1,4 por milhão de habitantes. Até 2002, a micose figurava como oitava causa de morte por doença, entre as infecciosas e parasitárias (Coutinho et al., 2002). Dados registrados durante o período de 2000 a 2011, junto ao sistema de informações sobre mortalidade, do Ministério da Saúde, demonstraram que a infecção por *P. brasiliensis* ainda é considerada a principal causa de mortalidade entre as micoses no país, apresentando média de 88,03 óbitos/ano ([http://:tabnet.datasus.gov.br](http://tabnet.datasus.gov.br)).

No Brasil a região Sudeste é considerada, por diversos autores, como área de grande endemicidade para PCM (Coutinho et al., 2002; Barrozo et al., 2009; Wanke e Aidê, 2009; Barrozo et al., 2010); sendo que a região central do Estado de São Paulo é conhecida pela maior frequência de relatos da doença (Santo, 2008).

Kamikawa (2011) e 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 por imunodifusão dupla em gel de agarose. Os autores observaram que a maioria dos pacientes sorologicamente reagentes para *P. brasiliensis* concentra-se nas macro-regiões de Campinas, São Paulo e Grande São Paulo, Sorocaba e São João da Boa Vista, enquanto as maiores taxas de reatividade foram observadas nos municípios de Piracicaba, Franca, Araçatuba e Presidente Prudente. Contudo, os autores ressaltam que os resultados estão subestimados, uma vez que não foram incluídas no estudo, amostras de pacientes atendidos nos serviços de referência de importantes polos endêmicos da doença como Botucatu, Ribeirão Preto, Araraquara e Bauru.

Segundo Pinto et al. (2012) no período de 2008 a 2011, 166 casos da micose foram “notificados” a 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 epidemiológica estadual.

As micoses sistêmicas não estão contempladas na Portaria nº. 05/SVS/MS de 21 de fevereiro de 2006, que trata das doenças de notificação compulsória. Portanto, a PCM ainda não é objeto de vigilância epidemiológica de rotina. Apenas em alguns estados brasileiros, entre os quais pode-se citar: Paraná, São Paulo, Mato Grosso do Sul e Rondônia (Martinez, 2010; Mendes, 2010; Vieira et al., 2014), é que a paracoccidiodomicose integra o rol das doenças de notificação compulsória. Por se apresentar como importante problema de Saúde Pública, relacionado aos custos sociais e econômicos derivados, não apenas da doença em atividade, que ocorre em indivíduos na sua fase mais produtiva da vida, como pelo alto potencial incapacitante para o trabalho associado as sequelas secundárias à infecção e quantidade de mortes prematuras que acarreta, quando não há intervenção terapêutica oportuna, têm sido proposta, em diversos fóruns, a inclusão da PCM entre as doenças de notificação compulsória em todos os estados da Federação (Brasil, MS-SVS, 2010).

O agente etiológico da paracoccidiodomicose encontra-se taxonomicamente classificado no Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Pleomycetes, Ordem Onigenales, Família Ajellomycetaceae, Gênero *Paracoccidioides* (Untereiner et al., 2004).

Até pouco tempo atrás, acreditava-se que o gênero compreendia uma única espécie, a bem estudada, caracterizada e documentada *P. brasiliensis*. Entretanto, o avanço da ciência e das pesquisas envolvendo métodos moleculares como RAPD (Soares et al., 1995; Calcagno et al., 1998; Molinari-Madlum et al., 1999; Hahn et al., 2002; Hahn et al., 2003), RFLP (Nino-Vega et

al., 2000), cariotipagem (Montoya et al., 1997) e microssatélite (Nascimento et al., 2004) demonstram, comprovam e suportam a especiação dentro do gênero *Paracoccidioides*.

Adicionalmente, a realização de estudos moleculares forneceu maiores subsídios para melhor compreensão da forma como tais diferenças podem influenciar os mecanismos de virulência (Molinari-Madlum et al., 1999), de resistência a drogas (Hahn et al., 2003) bem como permitiu avaliar as possíveis correlações com origens geográficas (Calcagno et al., 1998; Nino-Vega et al., 2000).

Nesse sentido, Matute et al. (2006) estabeleceram que *P. brasiliensis* tenha passado por dois eventos de especiação (em que duas ou mais espécies contemporâneas evoluem a partir de um único ancestral), evoluindo, possivelmente para três (3) espécies crípticas distintas:

- S1: contendo 38 isolados de diferentes localizações geográficas (Brasil, Argentina, Paraguai e Venezuela, Antártida);

- PS2: contendo cinco isolados brasileiros (São Paulo e Minas Gerais) e um isolado venezuelano (Caracas);

- PS3: contendo 21 isolados estritamente colombianos.

Sendo S1 originada de diferentes ancestrais, PS2 formada por duas espécies filogenéticas e PS3 por três espécies filogenéticas. Além disso, PS2 e PS3 têm mesma origem ancestral.

Ao analisarem árvores filogenéticas de genes codificadores de proteínas, Carrero et al. (2008) propuseram a existência de uma quarta espécie constituída por isolados (Pb-01 e IFM 54648) que não poderiam ser agrupados em nenhum dos grupos anteriormente citados (S1, PS2, PS3), demonstrando que tais espécies são extremamente divergentes quando comparadas às demais. Fato que, corroborou para que o isolado Pb01 e seus semelhantes fossem denominados de "*Pb01-like*".

Teixeira et al. (2009) propuseram que um clado composto por 17 isolados geneticamente similares, “*Pb01- like*”, sejam considerados uma nova espécie: *Paracoccidioides lutzii*. De acordo com os autores, utilizando o método de reconhecimento de espécies por concordância genealógica (GCPSR) tais isolados apresentam características genéticas (por análises polimórficas), genealógicas (reconstrução da história filogenética e identificação de espécies) e morfológicas bastante distintas das espécies propostas por Matute et al. (2006). Salgado-Salazar et al. (2010) manifestaram amplo apoio a tal proposta, com o auxílio de diversas análises de genes mitocondriais.

Teixeira et al. (2013) formalizaram a existência da nova espécie, *P. lutzii*, dentro do gênero *Paracoccidioides*. Segundo os autores, a proposta para a criação desta nova espécie esta alicerçada nos seguintes achados: a) expressiva divergência genética observada entre os isolados de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*; b) o fato das duas espécies terem sido separadas aproximadamente há 24-32 milhões de anos atrás; c) ausência/falha de fluxo gênico e comprovação do isolamento/distanciamento genético entre *P. brasiliensis* e *P. lutzii* evidenciado pela análise de recombinação, bem como pela existência de uma longa proporção de polimorfismos fixos observados entre os genomas das duas espécies; d) informações de RAPD; e) características genômicas entre as quais se podem citar: tamanho do genoma e conteúdo gênico, famílias de genes e sua expansão e presença de elementos transponíveis; f) aquisição de um elemento transponível TremE encontrado apenas em *P. lutzii*; g) as cepas de *P. lutzii* produzem conídios mais alongados quando comparados aos produzidos por *P. brasiliensis* e h) a distribuição geográfica de *P. lutzii* estar aparentemente restrita às regiões Centro-Oeste e Norte do Brasil.

Neste mesmo trabalho, Teixeira et al. (2013) chamam a atenção quanto ao diagnóstico laboratorial, implicações clínicas e tratamento observados pelas “peculiaridades regionais” dos isolados de *P. lutzii*.

Batista Jr. et al. (2009) foram os primeiros a demonstrar a importância da origem geográfica de isolados de *Paracoccidioides* sp na obtenção de

antígenos visando o imunodiagnóstico da PCM. Os autores comprovaram a existência de diferenças na composição antigênica dos isolados de *P. brasiliensis*, utilizando exoantígeno do isolado B-339 (pertencente à espécie críptica S1) e filtrado de cultura do isolado 550B ("*Pb01-like*" ou *P. lutzii*). A análise dos resultados revelou que o primeiro produzia altas taxas de gp43 enquanto o segundo apresentou ausência da mesma, porém maior expressão de uma glicoproteína de 66kDa. Ressaltaram também que o isolado 550B é oriundo da região centro-oeste, onde ocorre segundo Teixeira et al. (2009), principalmente a espécie *P. lutzii*, e quando testado frente a soros de pacientes da região sudeste do país, apresenta baixa taxa de reatividade, assim como o antígeno B-339, quando aplicado frente a soros de pacientes procedentes da região centro-oeste do Brasil. Os autores, concluíram que tais diferenças antigênicas podem acarretar em diagnóstico equivocado, especialmente resultado falso-negativo.

Recentemente, Machado et al. (2013) avaliaram se a ocorrência de espécies crípticas S1, PS2, PS3 de *P. brasiliensis* bem como *P. lutzii*, influenciavam no imunodiagnóstico da PCM. Os autores demonstraram que pequenas quantidades de gp43 foram encontradas em filtrado de cultura dos isolados de *P. lutzii*, demonstrando ainda que a expressão desta molécula parece ser mais variável dentro de *P. lutzii* visto que a taxa de mutação sinônimo-não-sinônimo foi menor, o que indica um processo evolutivo diferente dos demais genótipos. Verificaram também variabilidade na produção de gp43 entre os isolados do complexo *P. brasiliensis*, indicando que os eventos de especiação são importantes, mas não suficiente para explicar completamente a diversidade na produção deste antígeno. Corroborando com os resultados de Batista Jr et al. (2009), os autores demonstraram também a diferença no padrão de reatividade, pela técnica de imunodifusão dupla em gel de agarose, entre os antígenos obtidos das diferentes espécies crípticas de *P. brasiliensis* e de *P. lutzii*. O melhor padrão de reatividade e sensibilidade foi observado para o antígeno obtido a partir do isolado Epm 83 de *P. brasiliensis* (PS3) quando comparado ao antígeno padrão, ou seja, B-339 pertencente à espécie críptica S1 de *P. brasiliensis*. Neste trabalho, verificou-se ainda que todos os antígenos

obtidos a partir de amostras fúngicas ou isolados fúngicos da espécie *P. lutzii* apresentaram baixo padrão de reatividade.

Na PCM, como em outras micoses, o diagnóstico considerado padrão ouro é o isolamento do agente etiológico em cultura. 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 crescendo lentamente (15 a 30 dias) sob a forma de micélio apresentando colônias brancas ou amarronzadas, cotonosas ou glabras. Contudo, para o diagnóstico definitivo e identificação correta do microrganismo é necessário realizar a reversão da cultura da fase miceliana para a 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; Lacaz et al., 1998; Mendes-Giannini e Melhem, 2001; Lacaz et al., 2002).

Na maioria das vezes, as leveduras de *P. brasiliensis* podem ser facilmente 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, tecidos de biópsia, pus de gânglios, urina, líquido cefalorraquidiano (LCR), entre outros. Em material de punção ganglionar, por exemplo, visualizam-se células globosas, ovais ou elípticas com 5 a 25µm 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 da micose por meio da observação, no interior dos granulomas, de células típicas multibrotantes. As células em múltiplo brotamento são esféricas (10 a 20µm de diâmetro) e os brotos esféricos ou em forma de limão, encontram-se dispostos ao redor da célula mãe (Brummer et al. 1993; Lacaz, 1994, Lacaz et al., 1998; Lacaz et al., 2002).

Entretanto, resultados falso-negativos podem ocorrer, pois formas teciduais de *P. brasiliensis* são muito semelhantes a *Histoplasma capsulatum* (Lacaz, 1994), *Coccidioides immitis* (Lacaz et al., 2002) ou *Blastomyces dermatitidis* (Salfeder, 1979; Figueroa et al., 1994).

Diante do exposto, a amostra a ser avaliada necessita ser cuidadosamente coletada, armazenada e transportada, permitindo que o agente etiológico seja corretamente cultivado, isolado e quando possível identificado.

Importante salientar que a PCM, principalmente em sua forma pulmonar, deve ser diferenciada de outras micoses bem como da tuberculose. Achados clínicos e radiológicos são inespecíficos; assim como, 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. Além disso, o comprometimento do sistema linfático pode simular doença de Hodgkin ou 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 a fresco ou em cultivo. Na paracoccidioidomicose, assim como para a maioria das micoses, o diagnóstico considerado como padrão ouro é o isolamento do agente etiológico em cultura. No entanto, em algumas situações, como 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).

Nestes casos, as técnicas imuno-sorológicas são de grande valia uma vez que permitem inferir o diagnóstico com certo grau de certeza, otimizando o tempo utilizado para se obter resultados, aliando sensibilidade à especificidade. Além disso, em alguns casos, o resultado sorológico é a primeira indicação da

infecção micótica dos pacientes, principalmente naqueles que ainda não apresentam lesões clínicas aparentes (Mendes-Giannini et al., 1984; Camargo e Franco, 2000; Camargo, 2008).

Apesar de técnicas sorológicas como imunodifusão dupla em gel de agarose, contraímunoeletroforese (ID), ELISA e *immunoblotting* (IB), serem empregadas para o diagnóstico presuntivo e/ou confirmatório da PCM visando a pesquisa de anticorpos e antígenos circulantes, o índice de resultados falso-positivos e falso-negativos ainda é muito elevado (Camargo e Franco, 2000; Camargo, 2008)

Segundo Mendes-Giannini et al. (1994), as técnicas sorológicas utilizadas nos centros especializados podem oferecer em torno de 84,3%, chegando a 100% de sensibilidade dependendo do teste, da preparação antigênica e da forma clínica da doença.

O primeiro teste amplamente utilizado no diagnóstico e acompanhamento de pacientes com PCM foi a fixação de complemento (FC), desenvolvido por Moses (1916) que empregava extrato de *P. brasiliensis* em salina como antígeno, obtendo sensibilidade de 80%. Posteriormente, o emprego de antígeno polissacarídico de *P. brasiliensis* elevou a sensibilidade da técnica para 90% (Fava-Netto, 1955; Fava-Netto, 1961; Negroni et al., 1975). Contudo, devido sua baixa especificidade e as dificuldades metodológicas envolvidas, (instabilidade das hemácias e do complemento), esta técnica, agora, é raramente utilizada (Ferreira-da-Cruz et al., 1990; Mendes-Giannini et al., 1994).

A técnica sorológica amplamente utilizada para o imunodiagnóstico da PCM é a imunodifusão dupla em gel de agarose (ID), tendo Ferri (1961) como pioneiro no emprego da mesma. A ID apresenta baixo custo operacional, alta especificidade e sensibilidade variando de 65 a 100%; sendo de fácil execução e não necessitando de automação (Do Valle et al., 2001; Camargo e Franco, 2000; Camargo, 2008). Entretanto, situações entre as quais podem-se citar: a)

o efeito pró-zona, devido ao excesso de antígenos decorrentes da disseminação/gravidade da doença; b) a formação de imunocomplexos com oclusão de epítomos; c) a presença de anticorpos assimétricos inibindo a ligação secundária em reações de precipitação; e d) níveis de anticorpos abaixo do limite de detecção da técnica, podem interferir na sensibilidade e eficácia da metodologia (Do Valle et al., 2001).

Técnicas imunoenzimáticas como ELISA, têm sido adotadas na prática sorológica, devido sua exequibilidade, possibilidade de automação, alta sensibilidade (95 a 100%) e capacidade de detectar nanogramas de anticorpos por mililitro de soro. Na PCM, esta metodologia foi usada inicialmente para caracterizar a resposta humoral geral aos antígenos de *P. brasiliensis* (Mendes-Giannini et al., 1994; Camargo et al., 1994; Blotta e Camargo, 1993). Apesar disso, em relação ao imunodiagnóstico da referida micose, esta técnica ainda oferece grandes porcentagens de reatividade cruzada frente a outras infecções fúngicas, como histoplasmoze, aspergilose, candidíase, doença de Jorge Lobo, coccidioidomicose, e eventualmente, com infecções causadas por *Mycobacterium* sp; ou ainda, frente a soros de pessoas aparentemente saudáveis, residentes em áreas endêmicas para PCM (Elias-Costa et al., 2000; Botteon et al., 2002; Maluf et al. 2003; Albuquerque et al., 2005; Camargo, 2008).

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. Para tanto, a performance da técnica foi avaliada frente a 517 amostras de soro de pacientes com suspeita clínica da doença, empregando exoantígeno bruto obtido a partir da cepa B-339 de *P. brasiliensis* e os resultados sorológicos comparados aqueles obtidos pela reação de imunodifusão dupla em gel de agarose (ID), considerada o padrão ouro sorológico. Do total de amostras avaliadas, 250 (48,4%) soros 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 a 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) àquela obtida pelo teste padrão ouro sorológico (93,6%).

Passos (2012) avaliou 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. A autora observou 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 ( $k=0,76$ ). Como conclusão, a autora pontua que as metodologias são complementares para o diagnóstico presuntivo; prognóstico da doença e possível detecção precoce do processo infeccioso e/ou de recaídas.

Recentemente, Bertoni et al. (2012) demonstraram o potencial do *western blot* no diagnóstico diferencial entre tuberculose pulmonar e paracoccidiodomicose ao avaliarem amostras de soro de 134 pacientes triados clínica e radiologicamente para estas patologias. A pesquisa de anticorpos circulantes anti-gp43 de *P. brasiliensis*, por WB, impediu que seis pacientes recebessem terapia empírica para tuberculose; por outro lado permitiu que outros seis pacientes, que não reagiram frente a gp43, fossem encaminhados para investigação laboratorial e tratamento adequado.

Silveira-Gomes e Marques-da-Silva (2011) padronizaram um teste de látex para a detecção de anticorpos anti-*P. brasiliensis*, utilizando antígeno bruto desta espécie fúngica aderido a partículas de látex. Cinquenta e uma amostras de soro de pacientes portadores de doença ativa foram avaliadas, sendo observada reatividade em 84,31% (43/51) e padrões de aglutinação variando de uma a quatro cruces (+ a ++++). A sensibilidade, especificidade e valores preditivos, positivo e negativo, do teste de látex foram 84,31%, 81,05%, 70,49% e 90,59%, respectivamente. Apesar da factibilidade da metodologia, os autores

concluíram a necessidade da melhor caracterização dos fatores interferentes e a eliminação de qualquer reatividade cruzada antes de sua aplicação em análises laboratoriais de rotina.

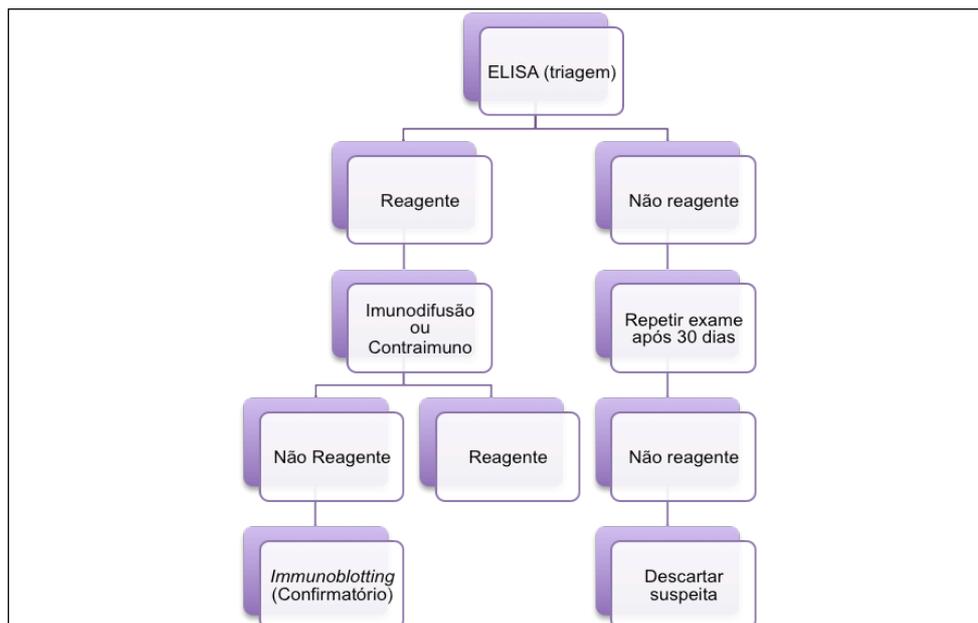
Visando otimizar o ensaio de aglutinação em látex (LAT) para o imunodiagnóstico da PCM, Silveira-Gomes e Marques-da-Silva (2012), avaliaram o efeito da inativação das amostras de soro de pacientes com doença em curso. Para as amostras *in natura*, observou-se sensibilidade de 87% pela reação de imunodifusão dupla e de 73% para LAT; por outro lado, a sensibilidade do LAT para amostras de soro inativadas foi de 83%. Os valores de especificidade foram de 100%, 79% e 90%, respectivamente. Em conclusão, o processo de inativação das amostras de soro reduziu, mas não eliminou a reatividade cruzada e os resultados falso-negativos. Segundo os autores, experimentos empregando preparações antigênicas purificadas e deglicosiladas de *P. brasiliensis* (Puccia e Travassos, 1991b) ou o tratamento de amostras com 2-mercaptoetanol e  $\beta$ -pronase (Engler e Shea 1994), são necessárias para a obtenção de índices adequados de sensibilidade e especificidade.

Considerando a importância da gp-43 como antígeno imunodominante de *P. brasiliensis*, Santos (2012) padronizou o teste de látex visando a detecção de anticorpos específicos anti-gp43 bem como a detecção do antígeno gp43 em amostras biológicas de pacientes com PCM objetivando o diagnóstico rápido da doença. Foram avaliadas 65 amostras de soro de diferentes pacientes com PCM. A sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo produzidos pelo teste foram de 98,5%, 93%, 91,4%, 98,7%, respectivamente. Quatorze amostras de líquido e 13 amostras de lavado-brônquico alveolar também foram avaliados. A sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos da metodologia foi de 85,7%, 100%, 100% e 75%, para as amostras de líquido e de 61,5%, 100%, 100%, 54,5% para as amostras de lavado-brônquico. Em relação à pesquisa de antígenos a sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos produzidos pelo teste foram de 97%, 88,5%, 86,3%, 97,5%, para as amostras de soro; 85,7%, 100%,

100% e 75% para as amostras de líquido e 84,6%, 100%, 100%, 75%, para as amostras de lavado brônquico. A autora concluiu que a reação padronizada apresenta altos valores dos parâmetros estudados, demonstrando que a mesma pode ser utilizada em laboratórios de rotina para triagem sorológica.

No Estado de São Paulo, a Divisão de Tuberculose e outras Pneumopatias do Centro de Vigilância Epidemiológica Prof. Alexandre Vranjac da Coordenadoria de Controle de Doenças Secretaria de Estado da Saúde (CVE-CCD-SES-SP), coordena desde 2008 o Programa de Vigilância e Controle da Paracoccidiodomicose, trabalhando com doze unidades/hospitais assistenciais de referência e com laboratórios de imunodiagnóstico nas cidades de Araraquara, Botucatu, Campinas, Ribeirão Preto e São Paulo, sendo o Instituto Adolfo Lutz o Laboratório de Referência Estadual para o imunodiagnóstico da PCM.

A **Figura 1** apresenta o fluxograma sorológico para triagem da suspeita clínica e seguimento até a cura, proposto no Manual de Vigilância e Controle da Paracoccidiodomicose. Entretanto, deve-se salientar que ele não tem sido seguido por todos os laboratórios de mico-sorologia do Estado de São Paulo, especialmente no que diz respeito à realização dos ensaios imunoenzimáticos, ou seja, reação de ELISA para a triagem sorológica e *immunoblotting* ou *western blot* para a confirmação de imunodifusão discordante. De forma geral, na grande maioria dos laboratórios a metodologia frequentemente empregada é a imunodifusão dupla em gel de agarose, tanto para a realização do diagnóstico presuntivo como para o acompanhamento sorológico dos pacientes em tratamento.



**Figura 1:** Organograma proposto pela Vigilância Epidemiológica da Paracoccidioidomicose. (Adaptado do Manual de Controle e Vigilância da Paracoccidioidomicose do Estado de São Paulo.)

Existe uma ampla variedade de metodologias capaz de fornecer informações valiosas para o fechamento do diagnóstico de determinado agravo. Entretanto, deve-se salientar que muitas destas técnicas apresentam baixo desempenho ou tornam a execução do trabalho restrito a laboratórios altamente especializados. De maneira geral esta ineficiência ou baixo desempenho é provocado por fatores como o longo tempo necessário para a obtenção do resultado, fato frequentemente relatado no caso de culturas microbiológicas, por exemplo. Outro fato de extrema relevância concentra-se na sensibilidade e especificidade do ensaio. Associa-se, muitas vezes a estes fatores o custo com a aquisição de reagentes e equipamentos, bem como com a manutenção e calibração dos últimos. Além disso, a necessidade de equipamentos especializados e/ou sofisticados acaba por inviabilizar a realização de trabalhos de campo, muitas vezes fundamental para a tomada de medidas preventivas e/ou educativas (Heberling e Kalter, 1986).

Diante do exposto, não causa estranheza a existência e necessidade de uma busca constante para o desenvolvimento de testes mais rápidos, sensíveis

e específicos com fins diagnósticos. A explicação para tal necessidade vem da constatação de que um diagnóstico definitivo é extremamente importante não apenas na gestão adequada do paciente bem como para a correta avaliação sobre a instauração de regimes terapêuticos adequados.

Sabendo que ensaios imunoenzimáticos são frequentemente usados como métodos de triagem sorológica e baseados na experiência do Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses com a metodologia de *immunoblotting* (Silva et al., 2008; Passos, 2012) idealizamos otimizar e validar o ensaio de Dot-blot inicialmente descrito por Hawkes et al. (1982).

Hawkes et al. (1982), adaptaram a metodologia de *dot-hybridization* (dot-hibridização) descrita por Kafatos et al. (1979) visando sua aplicação na seleção de clones produtores de anticorpos monoclonais. A esta “nova técnica” denominaram de *dot-immunobinding*, também conhecida pelas sinónimas de Dot-Blot (Stott, 1989), *Dot-ELISA* (Pappas et al., 1983b; Pappas et al., 1984b; Pappas, 1988) ou Dot-Blot *ELISA* (Eamsobhana et al., 2004).

Trata-se de uma técnica extremamente versátil (Hawkes et al., 1982; Pappas, 1988) que pode ser aplicada com excelentes resultados não apenas para o *screening* de anticorpos monoclonais (Hawkes et al., 1982; Beyer, 1984), bem como para a avaliação de outras proteínas solúveis, ácidos nucléicos, membranas celulares, organelas, fungos, protozoários, bactérias e vírus (Pappas, 1988). Vale a pena ressaltar que a versatilidade da metodologia inclui sua aplicabilidade em trabalhos de campo (Pappas, 1988; Dominguez, 2000).

O ensaio pode ser utilizado para avaliação qualitativa permitindo a triagem rápida de um grande número de amostras, discriminando as mesmas em reagentes ou não reagentes, ou, ainda, para uma avaliação quantitativa, quando se deseja determinar a concentração de anticorpo e/ou antígeno presente na amostra (Stott, 1989).

O princípio da técnica é muito simples. Antígeno puro ou diluído em solução salina é imobilizado na superfície de uma membrana de nitrocelulose. Após a fixação e/ou ligação do antígeno à membrana, a mesma é incubada com anticorpo primário que após as etapas estabelecidas de incubação e lavagem, são incubadas com anticorpo secundário conjugado, normalmente à peroxidase. Após novo período de incubação e lavagem, ocorre a adição do cromógeno, sendo a reação antígeno-anticorpo visualizada por um ponto colorido que contrasta com o fundo branco da membrana (Hawkes et al., 1982).

Pappas et al. (1983a) foram os pioneiros na padronização da técnica de Dot-blot visando sua aplicabilidade no diagnóstico rápido da leishmaniose visceral. Neste estudo, os autores sensibilizaram sobre a membrana de nitrocelulose 1µL de suspensão de promastigotas de *Leishmania donovani*. Após fixação dos promastigotas e bloqueio das membranas, as mesmas foram incubadas com soro de pacientes com leishmaniose visceral. Após o período de incubação com anticorpo secundário e adição do cromógeno, foi possível observar a detecção de baixas concentrações de anticorpos (0,1 a 1,0ng) comparável àquelas obtidas pelo radioimensaio.

Pappas et al. (1983b) analisaram 167 amostras de soro de pacientes com leishmaniose para avaliar a repetitividade do ensaio, observando que 150 (90%) amostras não apresentaram variação no título de anticorpos circulantes. As 17 (10%) amostras restantes, diferiram apenas em um título.

Pappas et al. (1984a), compararam a performance das técnicas de Dot-blot, ELISA clássico e fixação de complemento na pesquisa de anticorpos circulantes anti-leishmaniose visceral africana (kalazar). A sensibilidade dos métodos sorológicos foi avaliada frente a 44 amostras de soro de pacientes com doença ativa, podendo-se observar 95% de sensibilidade pelo Dot-blot, 98% pelo ELISA clássico e 80% pela fixação de complemento. A especificidade foi avaliada frente a 33 soros de indivíduos saudáveis que não residiam em área endêmica. Verificou-se 97% de especificidade para Dot-blot e ELISA clássico e 98% para a fixação de complemento. Os autores concluíram que os

índices de sensibilidade e especificidade são equivalentes entre Dot-blot e ELISA clássico. A repetitividade das análises sorológicas revelou ser melhor em Dot-blot quando comparado ao ELISA clássico e sensivelmente melhor que aquela obtida pela reação de fixação de complemento.

A técnica de Dot-blot pode ser usada na diferenciação de casos de infecções humanas e veterinárias, demonstrado por Wanduragala et al. (1987) ao avaliar a babesiose canina. Os autores compararam os resultados das técnicas de Dot-Blot e imunofluorescência indireta (IFA), obtendo índice de sensibilidade semelhante e índice de especificidade superior, o que permitiu aos autores concluir que a técnica anteriormente usada apresentava altas taxas de fluorescência inespecífica, o que não acontece com o Dot-Blot.

Tenter (1988), em seu trabalho sobre a sarcosistose, também comparou resultados da técnica de Dot-blot com IFA e ELISA na detecção de anticorpos em soros de camundongos experimentalmente infectados e imunizados com *Sarcocystis muris*, concluindo que o aumento da sensibilidade ocorreu em camundongos imunizados na detecção de anticorpos anti-IgG e resultados equivalentes às outras técnicas em soros de animais infectados com a doença.

Na toxoplasmose, os procedimentos mais utilizados para o diagnóstico sorológico são a IFA e o ELISA, que necessitam de equipamentos caros (microscópio de fluorescência, lavadora de placas de ELISA e fotômetros). Neste sentido, Pappas et al. (1986) compararam tais procedimentos ao Dot-blot na sorodetecção de anticorpos IgG e IgM para *Toxoplasma*, obtendo resultados estatisticamente não diferentes em termos de números de soros regentes, porém ao titular as amostras de soro, o Dot-blot apresentou sensibilidade e especificidade maiores às outras técnicas.

Kumar et al. (1985), em trabalho desenvolvido para o diagnóstico rápido da amebíase, utilizando protocolo semelhante ao de Pappas et al. (1983b) e comparando a outras técnicas já utilizadas para o diagnóstico da doença, demonstraram que o Dot-blot é mais sensível que a hemaglutinação indireta e

apresenta sensibilidade equivalente ao ELISA, principalmente em pacientes com a presença de abscesso no fígado causado pelo agente e amebíase intestinal.

Londner et al. (1987) desenvolveram um Dot-blot para o diagnóstico rápido da malária, para pesquisa tanto de anticorpos como de antígenos. O ensaio, quando comparado à técnica de radioimunoensaio (RIA) apresentou ótima correlação. Na detecção de antígenos, o Dot-Blot pôde detectar um mínimo de 0,001% de parasitemia, indicando sensibilidade aproximada ao exame microscópico.

Recentemente, Cervantes-Ladín et al. (2014) otimizaram e padronizaram a metodologia de Dot-blot, comparando-a com os ensaios de ELISA e *Western blot* na detecção de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi*. Os autores avaliaram 360 amostras de soro, dentre elas 96 de pacientes chagásicos reagentes pelas técnicas imunoenzimáticas, 153 de indivíduos saudáveis, 40 amostras de sangue recolhidas em papel filtro e 71 amostras de pacientes com outras infecções. Os cálculos obtidos foram de 97% de sensibilidade e 89% de especificidade e índice de concordância *Kappa* de 0,79, apresentando baixa reatividade cruzada com soros de pacientes com leishmaniose.

Além disso, a metodologia tem sido usada para detecção de antígeno de *Neospora caninum* em cães (Pinheiro et al., 2005), avaliação da soroprevalência da brucelose canina (Barkha et al., 2011), diagnóstico simultâneo para as doenças de Chagas, malária e sífilis (Coelho et al., 2007), como teste rápido na detecção de antígenos de *Mycobacterium* em pacientes com tuberculose pulmonar (El-Masry et al., 2008) e meningite tuberculosa em LCR (Sumi et al., 1999; Mathai et al., 2003), no diagnóstico da neurocisticercose (Biswas et al., 2004; Shukla et al., 2008), toxocaríase humana (Camargo et al., 1992; Roldán et al., 2006) e canina (Bojanich et al., 2012), para o diagnóstico prematuro da leptospirose humana (Silva et al., 1994; Blanco et al., 2009), diagnóstico da esquistossomose (Pinto et al., 1995), e na pesquisa de anticorpos específicos anti-*Fasciola hepática* (Rokni et al., 2006).

Pesquisas visando o diagnóstico de doenças fúngicas, através da metodologia de Dot-blot, não são tão evidenciadas quando comparadas às infecto-prasitárias. O primeiro trabalho descrito formalmente na literatura é o de Sato et al. (1987) que avaliou a metodologia de Dot-blot visando a pesquisa de anticorpos circulantes anti-*Blastomyces dermatitidis*, obtendo 76,2% de sensibilidade e baixa reatividade cruzada com antígenos de *Histoplasma capsulatum* e *Coccidioides immitis*.

Importante ressaltar que, segundo os autores, antecederam à sua publicação, os estudos de Chamberlain et al. (1985) e de McGowan et al. (1985), o primeiro grupo avaliou a aplicabilidade do Dot-blot para a pesquisa de anticorpos séricos circulantes anti-*C.immitis* e o segundo para a pesquisa de anticorpos anti- *P. brasiliensis*.

Na PCM, o emprego da metodologia de Dot-Blot foi, formalmente, relatado pela primeira vez por Taborda e Camargo (1994), como sendo um ensaio simples e rápido, com resultados eficientes frente a antígenos purificados apresentando alta sensibilidade e caracterizando-o como ensaio de triagem. Os autores, avaliaram 50 amostras de soros de pacientes com PCM, durante o período de tratamento com anti-fúngico, utilizando como antígeno a fração de 43kDa (gp43) purificada. A análise dos resultados demonstrou sensibilidade e eficiência da metodologia, uma vez que revelou 100% de reatividade. Os autores concluíram ser o Dot-Blot, um ensaio promissor para ser utilizado no diagnóstico da micose, no acompanhamento dos pacientes durante o tratamento anti-fúngico e principalmente em estudos soroepidemiológicos.

Martins et al. (1997), avaliaram pelas técnicas de Dot-blot, ELISA e *Western-Blot*, utilizando *pool* de antígenos (somático e filtrado de cultura), o perfil de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis* em amostras de soro de pacientes com doença ativa na fase pré-tratamento e durante o tratamento com itraconazol. Na fase de pré-tratamento, a detecção de anticorpos circulantes no soro de pacientes com título elevado de anticorpos IgG foi de 81,5% pelo Dot-blot e 84% pelo ELISA. Por outro lado, as porcentagens de soros pré-

tratamento com títulos elevados para anticorpos IgA e IgM foram menores (51,9% e 51,8%, respectivamente para Dot-Blot e 16% e 36% para ELISA) com tendência a se tornarem negativos. A técnica de DB apresentou decréscimo na fase pós-tratamento para 61% após um ano e 50% após três anos. Neste trabalho, os autores confirmaram a complexidade da resposta humoral dos pacientes com PCM bem como reforçaram a necessidade do emprego de ensaios sorológicos diferentes para a detecção de anticorpos anti-*P. brasiliensis*.

Carvalho et al (2008) compararam o desempenho da gp43 recombinante, solúvel expressa em *Picchia pastoris* e da gp43 nativa, pelas metodologias de imunodifusão e Dot-blot, demonstrando que a proteína glicosilada apresentou maior especificidade pelo ensaio de imunodifusão; por outro lado, a metodologia de Dot-blot, apresentou 100% de especificidade apenas após o tratamento com metaperiodato de sódio ou deglicosilação enzimática.

Recentemente, Assunção (2012) demonstrou que a proteína recombinante gp43 $\Delta$ Nt pode ser empregada na metodologia de Dot-blot, para a pesquisa de anticorpos séricos espécie-específicos anti-*P. brasiliensis*. A autora observou que os resultados obtidos empregando a proteína recombinante foram similares àqueles obtidos frente a gp43 nativa, verificando ainda, 100% de correlação com a imunodifusão dupla ao distinguir pacientes doentes e tratados.

Entretanto, apesar dos resultados promissores demonstrados por Taborda e Camargo (1994), Martins et al. (1997), Carvalho et al. (2008) e Assunção (2012), esta metodologia não se encontra disponível nos laboratórios de microssorologia, tendo os trabalhos ficado apenas no cunho acadêmico.

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho é otimizar e validar a técnica de Dot-Blot para o diagnóstico da paracoccidiodomicose, propondo que a mesma seja disponibilizada para a rotina de maneira a triar soros com suspeita clínica para a doença.

## 2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO

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

Diante do exposto, o diagnóstico precoce e acurado destas infecções assume grande importância, pois permite entre outros fatores, a instituição de terapia anti-fúngica adequada e a diminuição do emprego desnecessário de drogas tóxicas; além de reduzir o uso de terapia empírica, minimizando, por exemplo, o surgimento de linhagens fúngicas multidrogas resistentes.

O emprego de ensaios sorológicos é de extrema importância no diagnóstico não apenas da paracoccidioidomicose, como também de outros processos infecciosos causados por fungos endêmicos ou oportunistas, visto que a demonstração em exame direto bem como o isolamento e identificação destes fungos muitas vezes apresentam resultados negativos, principalmente nos casos de doenças autolimitadas.

Outra informação importante que deve ser levada em consideração, diz respeito que em algumas situações entre as quais se pode citar o estado físico ou clínico dos pacientes, torna-se impossível o acesso ao local da lesão,

impedindo assim a coleta do material biológico (Ferreira-da-Cruz et al., 1990). As provas sorológicas propiciam a obtenção de resultados em menor tempo quando comparadas às micológicas e, como já mencionado, consistem, muitas vezes, na única evidência da infecção fúngica.

Como laboratório de Saúde Pública, o Instituto Adolfo Lutz (IAL) atende não apenas os hospitais e demais unidades de saúde da cidade de São Paulo e Grande São Paulo, mas também toda a demanda vinda de 12 dos 13 laboratórios regionais existentes, localizados no interior do Estado de São Paulo. No período compreendido entre dezembro de 1998 a agosto de 2014, foram avaliadas, pela reação de imunodifusão dupla em gel de agarose (provas qualitativa e semiquantitativa), amostras biológicas de 12.876 pacientes quanto à presença ou não de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis*.

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

Na condição de Laboratório de Referência Estadual para o imunodiagnóstico das micoses sistêmicas, tendo como atribuição garantir a qualidade e acurácia dos resultados sorológicos e, considerando, o fato de que a grande maioria das requisições médicas que chegam não contém nenhum tipo de informação adicional sobre o estado clínico-epidemiológico do paciente ou relacionadas a exames micológicos e/ou histopatológicos, torna-se necessária a implantação de uma técnica mais sensível, como o Dot-Blot, para

triar de forma mais sensível e rápida os casos de paracoccidiodomicose, selecionando os potencialmente reagentes e descartando os não reagentes.

Um ponto que corrobora com a necessidade de melhor avaliação do Dot-blot diz respeito à implantação no Estado de São Paulo do Programa de Vigilância e Controle da Paracoccidiodomicose, o qual preconiza, em seu algoritmo, a realização do ensaio de ELISA indireto para a triagem sorológica. Entretanto, cinco anos após a implantação e divulgação do Manual de Vigilância e Controle da Pararoccidiodomicose pela Divisão de Tuberculose e Outras Pneumopatias do Centro de Vigilância Epidemiológica Prof. Alexandre Vranjac, Coordenadoria de Controle de Doenças, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Pinto et al. (2012) relatam que o mesmo não é seguido pelos laboratórios de mico-sorologia.

Uma abordagem de extrema importância que justifica o desenvolvimento deste trabalho é a falta de padronização e, conseqüentemente, validação dos ensaios utilizados no imunodiagnóstico da paracoccidiodomicose. O processo de validação de ensaios laboratoriais tem por objetivo demonstrar que o método seja adequado para a finalidade pretendida. Deve garantir, por meio de estudos experimentais, que as exigências do método às aplicações analíticas sejam atendidas e a confiabilidade dos resultados, assegurada (ANVISA, 2003, Passos, 2012).

Segundo a Resolução nº899, de 29 de maio de 2003, da ANVISA, um ensaio validado deve apresentar, dependendo de sua natureza, parâmetros como especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação e exatidão avaliadas, determinadas e adequadas à análise a que se destina. O processo de validação deve ser suficientemente abrangente para atender e respaldar as necessidades de uma determinada aplicação. Além disso, a determinação do desempenho de um ensaio deve incluir análises comparativas com resultados obtidos por outros métodos (ANVISA, 2003; ABNT, 2005).

Devido à grande heterogeneidade dos protocolos descritos na literatura para o desenvolvimento do Dot-blot, já supracitados neste texto, tanto para o diagnóstico da paracoccidiodomicose quanto de outros agravos; neste estudo se buscará, primeiramente, otimizar uma metodologia adequada às condições do laboratório e avaliar o desempenho da metodologia na casuística atendida pelo Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses, Centro de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz de São Paulo. Em seguida, pretende-se dar início as primeiras análises referentes aos parâmetros necessários ao processo de validação do ensaio de Dot-blot.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1. Objetivo Geral

Otimizar a técnica de Dot-blot, empregando antígeno bruto de *P. brasiliensis*, como teste rápido e/ou de triagem para a pesquisa de anticorpos espécie-específicos em amostras de soros de pacientes com suspeita clínica de paracoccidiodomicose, encaminhados ao Instituto Adolfo Lutz para avaliação da resposta imune humoral.

### 3.2. Objetivos Específicos

- \* Avaliar o desempenho e aplicabilidade da metodologia de Dot-blot como teste rápido e/ou de triagem no imunodiagnóstico da paracoccidiodomicose;
- \* Comparar os parâmetros intrínsecos entre as metodologias de Dot-blot e imunodifusão dupla em gel de agarose considerada a técnica “padrão ouro” sorológica;
- \* Avaliar a estabilidade (tempo de prateleira) das membranas dotadas e armazenadas a temperatura de 4°C e -20°C, no período de 7, 15, 30, 45, 60 e 90 dias visando o imunodiagnóstico da paracoccidiodomicose;
- \* Avaliar a estabilidade (tempo de prateleira) das membranas dotadas e armazenadas a temperatura ambiente para utilização das mesmas a campo, no período de 7, 15, 30, 45, 60 e 90 dias visando o imunodiagnóstico da paracoccidiodomicose;
- \* Propor novo algoritmo sorológico para o imunodiagnóstico da paracoccidiodomicose.

## 4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

### 4.1. Soros Humanos

Foram avaliadas quanto à presença de anticorpos circulantes dirigidos ao *Paracoccidioides brasiliensis* 443 amostras de soros assim distribuídas:

- 23 amostras de soro de indivíduos aparentemente saudáveis, doadores de banco de sangue oriundos de regiões de alta e baixa endemicidade para *P. brasiliensis*;
- 23 amostras de soro de pacientes com confirmação sorológica de outras micoses como: histoplasmose (16) e aspergilose (8), encaminhadas para avaliação da resposta imune humoral ao Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses, Centro de Imunologia;
- 20 amostras de soro de pacientes com tuberculose, 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;
- 77 amostras de soro de pacientes com paracoccidioidomicose confirmada, encaminhadas para avaliação da resposta imune humoral ao Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses, Centro de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz;
- 300 amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de paracoccidioidomicose, encaminhadas para avaliação da resposta imune humoral ao Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses, Centro de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz.

#### 4.2. Considerações Éticas

A realização deste estudo foi aprovada pela Comissão Técnico Científica do Instituto Adolfo Lutz- Projeto CTC-IAL#117D/2012 e pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto Adolfo Lutz sob o número CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética) Plataforma Brasil 13673313.1.0000.0059 e número de parecer consubstanciado 229.815 de 21/03/2013 **[ANEXO 1]**.

#### 4.3. Obtenção do Antígeno de *P. brasiliensis*

Para a obtenção dos dois exoantígenos avaliados neste estudo, ou seja, filtrado de cultura obtido a partir da amostra 113 e filtrado de cultura obtido a partir da cepa B-339 de *P. brasiliensis*, foi utilizada a metodologia proposta por Garcia et al. (1993) e modificado por Silva (2005).

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

Ao conteúdo da membrana adicionou-se 10,0g de glicose (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), 100,0mg de cloreto de tiamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e 200,0mg de asparagina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Após o ajuste do pH adicionou-se, ao meio de cultura, água Milli-q® em quantidade suficiente para 1000,0mL. O meio de cultura foi distribuído em frascos tipo Erlenmayer (500,0mL), e esterilizado em autoclave a 120°C, por 15 minutos. Para o preparo dos exoantígenos, o crescimento fúngico de aproximadamente três (3) a quatro (4) tubos contendo culturas de sete (7) dias, de cada um dos isolados, ou seja, B-339 e 113, crescidas a 36°C foram inoculados nos frascos tipo Erlenmayer contendo 200,0mL do meio e colocados em incubadora com plataforma de agitação circular, por 20 dias, a 36°C, com rotação constante de 50rpm. Após este período, o crescimento

fúngico foi interrompido pela adição de thimerosal (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 1:5000 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 1,0mL do sobrenadante em ágar Fava Netto (FN) e ágar BHI (*Brain Heart Infusion* - Infusão de Cérebro-Coração) a 25 e 36°C, durante 30 dias.

As células foram separadas por filtração em papel de filtro, o sobrenadante coletado e o seu conteúdo proteico determinado pelo método de Bradford (1976). As preparações antigênicas tiveram seu perfil eletroforético analisado por SDS-PAGE e a imunorreatividade avaliada por imunodifusão dupla em gel de agarose e *immunoblotting*. Após caracterização imunoquímica o material resultante da diálise foi alíquotado e armazenado a 4°C, até o momento do uso.

#### 4.4. Dosagem proteica

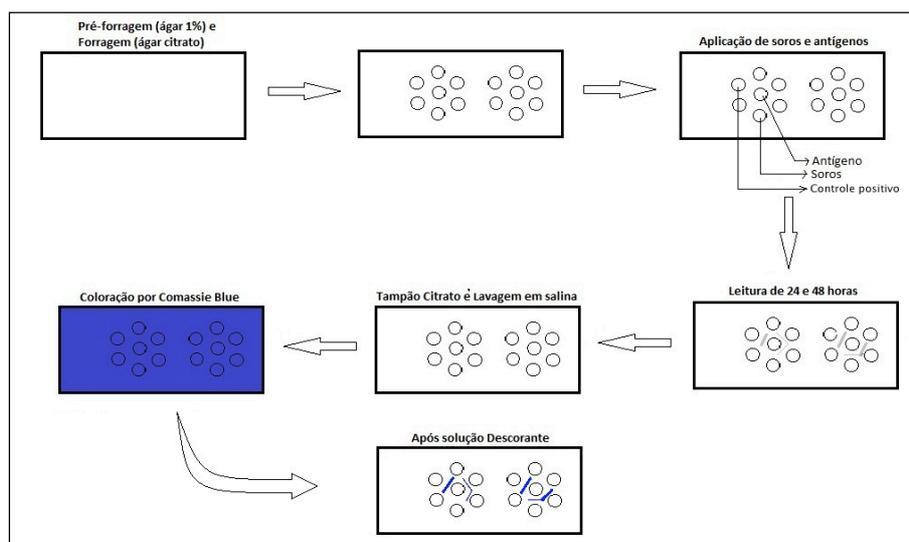
A concentração proteica dos filtrados de cultura Pb B-339 e Pb 113 foi determinada pelo método de Bradford (1976) através do equipamento NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, DE, USA). Foram realizadas três dosagens para cada preparação antigênica e a concentração proteica foi determinada pela média dos valores encontrados.

#### 4.5 Imunodifusão Dupla em Gel de Agarose (ID)

Para a pesquisa de anticorpos circulantes anti-*Paracoccidioides 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 (26x75mm) foram primeiramente revestidas com 1,0mL de solução de ágar a 1% (p/v). Estas foram então recobertas com 3,0mL de solução de ágar-citrato e deixadas em câmara úmida, a 4°C, até a solidificação da agarose. O gel foi escavado com auxílio de

molde em forma de roseta (Bioficina-Indústria e Comércio de Aparelhos Laboratoriais, São Paulo, SP, Brasil), contendo um orifício central e seis laterais, sendo o excesso do gel retirado empregando-se pipeta Pasteur acoplada a bomba de vácuo (DIA-PUMP Compressor, FANEN, São Paulo, Brasil). Após a aplicação dos reagentes biológicos (antígeno de *P. brasiliensis*, anticorpo policlonal anti-antígeno de *P. brasiliensis* 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 parcial das lâminas a fim de averiguar a formação das 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 0,85%. Ao fim dessa etapa, os orifícios foram recobertos com solução de ágar 1% (p/v) e as lâminas levadas para secar em estufa a 50°C (Fanen, São Paulo, SP, Brasil). Após desidratação do gel, as lâminas foram coradas pelo Coomassie Brilliant Blue R (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, Mo, USA), durante dez (10) minutos e em seguida descoradas, utilizando-se solução descorante (10% de ácido acético glacial, 45% de álcool etílico, 45% de água destilada) por cinco (5) minutos. A leitura definitiva foi realizada, por pelo menos dois técnicos e os resultados registrados no livro de registro e banco de dados do Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses (**Figura 2**).



**Figura 2:** Esquema ilustrativo da reação de imunodifusão dupla em gel de agarose.

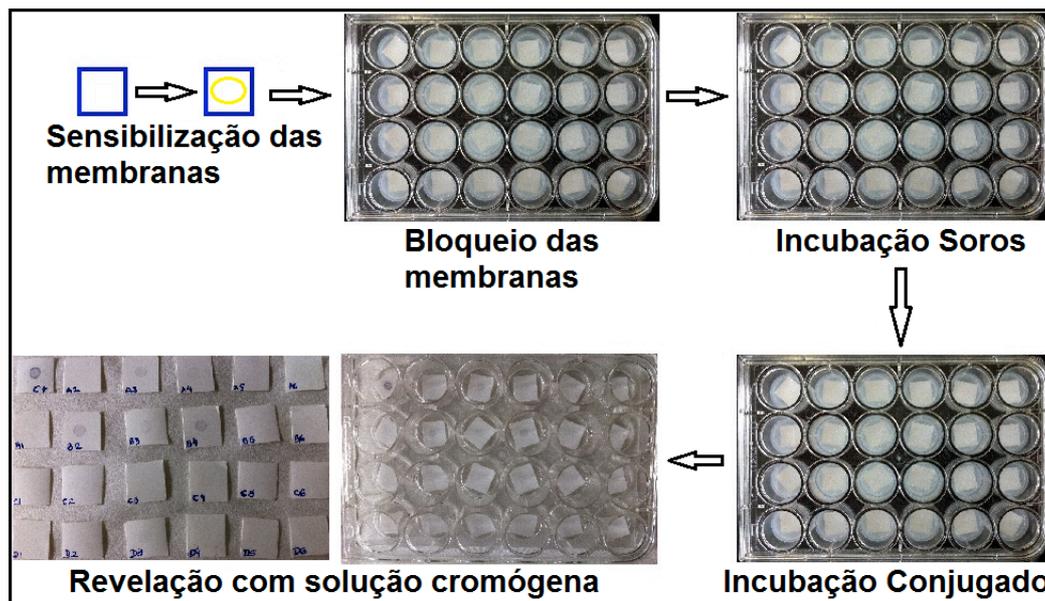
#### 4.6. Dot-Blot (DB)

A metodologia de Dot-Blot foi otimizada tomando-se como base os protocolos descritos por Hawkes e cols. (1982) e Pappas (1988). Assim, membranas de nitrocelulose de 0,22 $\mu$ m (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Califórnia, USA), foram sensibilizadas com as duas preparações antigênicas (filtrado de cultura obtido das amostras Pb-113 e Pb B-339) de *P. brasiliensis*. A fixação dos antígenos à membrana de nitrocelulose ocorreu por meio da incubação das mesmas a 37°C, em estufa incubadora (Modelo 002 CB, Fanem, São Paulo, SP, Brasil) por 30 minutos. Em seguida, as membranas foram bloqueadas adicionando-se 500,0 $\mu$ L de tampão salina tamponada com fosfatos pH 7,4 acrescida de 5% de leite desnatado (Elegê, Teutônia, Rio Grande do Sul, Brasil), PBS-L 5%, por orifício de placa de cultura, por uma hora à temperatura ambiente, sob agitação constante em plataforma tipo gangorra (Bioficina-Indústria e Comércio de Aparelhos Laboratoriais, São Paulo, SP, Brasil).

Posteriormente, as fitas de nitrocelulose foram incubadas com as amostras de soro de pacientes com paracoccidiodomicose, soro de indivíduos doadores de banco de sangue e anticorpo policlonal anti-exoantígeno de *P. brasiliensis*, com soro controle-positivo em PBS-L à temperatura ambiente por duas horas, sob agitação constante, em plataforma tipo gangorra seguida de três lavagens, de cinco minutos cada, com PBS-T 0,1% (PBS acrescido de 0,1% de Tween 20). Após esta etapa, a incubação com o anticorpo secundário, ou seja, anti-IgG humana conjugada a peroxidase foi realizada, diluindo-se o conjugado em PBS-L à temperatura ambiente, por 90 minutos, ao abrigo da luz e sob agitação constante, também seguida de três lavagens.

A reação foi revelada empregando-se como cromógeno de 4-cloro-1-naftol (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, Mo, USA). A interrupção da reação foi feita por meio de lavagens sucessivas em água bidestilada (**Figura 3**).

Os resultados obtidos no ensaio de Dot-Blot foram comparados àqueles obtidos nos ensaios de imunodifusão dupla em gel de agarose, teste considerado como padrão ouro sorológico. No caso de resultados discordantes as amostras foram reavaliadas empregando-se as mesmas metodologias, ou seja, ID e DB. Caso a discrepância entre os resultados persistisse, a contra prova foi realizada através da metodologia de *immunoblotting* (IB).



**Figura 3:** Esquema ilustrativo da reação de *Dot-immunobinding* (Dot-Blot).

#### 4.7. Repetitividade e reprodutibilidade intermediária do ensaio de Dot-blot (DB)

A capacidade de um método ser reprodutível refere-se à obtenção de resultados iguais num mesmo ambiente, em ensaios realizados por pessoas diferentes, utilizando-se as mesmas amostras. Neste trabalho, quatro (4) analistas realizaram o ensaio com as mesmas amostras, em dias diferentes, no mesmo laboratório.

Já a repetitividade refere-se aos resultados obtidos no ensaio em amostras analisadas em duplicata, ou seja, de forma que as amostras sejam aplicadas duas vezes, processadas no mesmo momento, para que o resultado seja analisado.

A variação dos resultados, tanto ao comparar os diferentes analistas como a duplicata, de tais parâmetros, está associada a fatores relacionados a erros acidentais ou sistemáticos.

#### 4.8. Estabilidade das membranas

O teste de estabilidade das membranas foi realizado com o propósito de avaliar o tempo de prateleira das mesmas, ou seja, determinar o prazo de validade. Dessa forma, membranas de nitrocelulose, contendo antígeno de *P. brasiliensis* imobilizado, foram divididas em dois grupos: membranas bloqueadas com PBS-L 5% e membranas não bloqueadas. Ambos os grupos de membranas foram armazenados, estocando-os à -20°C, 8°C e à temperatura ambiente nos períodos de 7, 15, 30, 45, 60 e 90 dias.

Para isso, foram selecionadas, aleatoriamente, das 300 amostras de pacientes com suspeita clínica da doença, 11 amostras de soro. Destas, três apresentaram ausência de reatividade e oito apresentaram reatividade para *P. brasiliensis* pela reação de imunodifusão dupla em gel de agarose.

#### 4.9. Immunoblotting (IB)

A transferência eletroforética de proteínas contidas em géis de poliacrilamida para membranas de nitrocelulose foi executada conforme metodologia otimizada por Passos (2012) a partir dos protocolos estabelecidos por Towbin et al. (1979) e Vicentini (1997), usando equipamento Trans-Blot System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Califórnia, USA).

Após a eletroforese, os géis foram apostos sobre membranas de nitrocelulose de 0,22µm (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, 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 30V por 18 horas, a 4°C. Após a transferência, a fim de verificar a eficácia do processo, as membranas foram coradas com Ponceau-S (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, Mo, USA) por cinco minutos e descoradas em água bidestilada.

As membranas de nitrocelulose 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* (Bio Oficina Indústria e Comércio de Aparelhos Laboratoriais, São Paulo-Brasil).

As fitas contendo as preparações antigênicas de *P. brasiliensis* foram incubadas com 2,0mL de amostra de soro teste e soro controle-positivo, ambos diluídos na proporção de 1:100 em tampão PBS-L 3%. Esta etapa do ensaio foi realizada a temperatura ambiente sob agitação constante, por duas (2) horas. Finalizado o período de incubação, as fitas de nitrocelulose foram lavadas seis vezes, por 10 minutos cada, em solução PBS-T.

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

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.

#### 4.10. Avaliação dos parâmetros intrínsecos

Segundo Ferreira e Ávila (2001), para a validação de um ensaio sorológico, a avaliação de seus vários parâmetros intrínsecos se faz necessária. A avaliação intrínseca de um ensaio refere-se ao seu desempenho perante amostras de soro de pacientes sabidamente doentes e não doentes para que os resultados da técnica a ser validada comprovem ou não a realidade apresentada.

Assim, seguindo o modelo demonstrado na **Tabela 1**, relacionamos a presença ou ausência da doença obtida nos ensaios de imunodifusão dupla e Dot-blot, para o cálculo dos parâmetros intrínsecos isoladamente. A seleção da amostragem assume, portanto, grande importância.

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

O grupo de **não doentes** foi composto por indivíduos aparentemente saudáveis, doadores de banco de sangue e por pacientes que apresentaram manifestações clínicas compatíveis com paracoccidiodomicose, porém sem confirmação etiológica da mesma por métodos micológicos, histopatológicos ou imunológicos, e cujo, diagnóstico tenha sido posteriormente descartado (mudança de diagnóstico).

Após a validação da reação de Dot-blot, comparou-se seu desempenho à metodologia de referência (padrão ouro), neste caso, o ensaio de imunodifusão dupla em gel de agarose. Os cálculos também foram feitos seguindo o modelo da **Tabela 1**, porém substituiu-se os campos descritos como “Doença presente/ausente” por “Imunodifusão Reagente/Não reagente”.

Assim, os termos sensibilidade relativa ou co-positividade e especificidade relativa ou co-negatividade foram utilizados em substituição, respectivamente, à sensibilidade e especificidade, visto que o padrão empregado é outro teste considerado de referência para a doença em questão e não os diagnósticos de certeza de presença ou ausência da doença.

A **Tabela 1** traz as relações entre os resultados de um teste diagnóstico verdadeiro. O teste é considerado positivo ou negativo, e a doença presente ou ausente.

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

Teste \ Padrão	Positivo	Negativo	Total
	Positivo	A	B
Negativo	C	D	C+D
Total	A+C	B+D	N

#### 4.10.1. Sensibilidade

É a capacidade que o teste diagnóstico ou de triagem apresenta de detectar os indivíduos verdadeiramente positivos, ou seja, de diagnosticar corretamente os doentes. Por outro lado, ao compararmos duas técnicas, emprega-se o termo co-positividade ou sensibilidade relativa, que representa a porcentagem de coincidência de resultados positivos para um novo ensaio, no presente estudo a reação de Dot-blot perante o ensaio de referência sorológica, ou seja, ensaio de imunodifusão dupla em gel de agarose. A multiplicação do valor encontrado por 100 permite a apresentação da sensibilidade em porcentagem. Logo:

Sensibilidade =  $VP / (VP + FN) \times 100$ , onde

VP = Verdadeiro Positivo

FN = Falso Negativo

#### 4.10.2. Especificidade

É a capacidade que o teste diagnóstico ou de triagem tem de detectar os verdadeiros negativos, isto é, diagnosticar corretamente os indivíduos sadios. Da mesma forma, os termos co-negatividade e especificidade relativa representam a porcentagem de coincidência de resultados negativos para um novo ensaio, no presente estudo a reação de Dot-blot perante a reação de imunodifusão dupla em gel de agarose. A multiplicação do valor encontrado por 100 permite a apresentação da especificidade em porcentagem. Logo:

Especificidade=  $VN/(VN+FP) \times 100$ , onde

VP=Verdadeiro Negativo

FN=Falso Positivo

#### 4.10.3. Valor preditivo

No âmbito clínico, a validade de um marcador sorológico refere-se à extensão com que ele pode prever a ocorrência da doença e/ou infecção. Diante do exposto, devemos estar, portanto, preparados para responder a questão que se segue: Visto que o ensaio apresentou resultado positivo (ou negativo), qual a probabilidade do indivíduo ser ou estar realmente doente (ou não)? A característica de um ensaio sorológico em discriminar e/ou determinar doença e/ou infecção é conhecida como Valor Preditivo e pode ser classificado em Valor Preditivo Positivo (VPP) ou Valor Preditivo Negativo (VPN). O valor preditivo (positivo e negativo) é determinado pela interação de três variáveis, a saber: sensibilidade e especificidade do teste associado a prevalência da doença no grupo de estudo.

- \* Valor preditivo positivo (VPP): é a proporção de doentes entre os positivos pelo teste. Para calcular, emprega-se a seguinte fórmula:  
 $VPP = VP / (VP + FP) \times 100$ ;

- \* Valor preditivo negativo (VPN): é a proporção de sadios (sem a doença) entre os negativos ao teste. Seu cálculo foi realizado de acordo com a seguinte fórmula:  $VPN = VN / (VN + FN) \times 100$ .

#### 4.10.4. Prevalência

Sabe-se que os valores preditivos 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 determinada população, sendo assim calculada:  $Prevalência = (VP + FN) / (VP + VN + FP + FN)$

#### 4.10.5. Acurácia ou Eficiência

Refere-se ao grau em que o teste é capaz de determinar o “verdadeiro” do que está sendo medido. Informa se os resultados representam a “verdade” ou o quanto se afastam dela. A fórmula utilizada para seu cálculo foi:  $Acurácia = (VP + VN) / (VP + VN + FP + FN)$

#### 4.11. Índice *Kappa* de Cohen

Medida ou avaliação bastante utilizada para expressar a confiabilidade de um teste. O índice  $\kappa$  representa um avanço em relação à taxa geral de concordância, visto ser um indicador de concordância ajustada, pois leva em consideração, a concordância, devida a probabilidade.

O índice de *Kappa* leva em consideração as proporções das concordâncias observadas e esperadas, 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  $\kappa$  é positivo; se a concordância é completa,  $\kappa=1$ . Zero indica o mesmo que leituras feitas ao acaso. Sua classificação está disposta no **Quadro 1**, a seguir:

**Quadro 1:** Escala de concordância do índice *Kappa*.

<b>Valor de Kappa</b>	<b>Concordância</b>
<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.*

O índice *kappa* é estimado como:  $K = \frac{Po - Pe}{1 - Pe}$

Sendo,  $Po$ = Proporção de concordâncias observadas e  $Pe$ = Proporção de concordâncias esperadas.

#### 4.12. Teste do Qui-quadrado

Para a comparação das proporções utilizou-se o teste do Qui-quadrado. Os cálculos foram realizados por meio do programa Epiinfo 6.0 (Center for Disease Control and Prevention- <http://www.cdc.gov>) com valor de significância  $p \leq 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Otimização do ensaio de Dot-Blot

#### 5.1.1. Antígeno

O primeiro passo do processo de otimização da metodologia de Dot-blot, foi a avaliação da adsorção de ambas as preparações antigênicas de *P. brasiliensis*, ou seja, filtrado de cultura obtido da cepa B-339 e do isolado 113 a membrana de nitrocelulose.

A análise dos resultados demonstrou que a aplicação das preparações antigênicas sobre a superfície das membranas de nitrocelulose com posterior incubação em estufa à 37°C durante 30 minutos, forneceu condições adequadas para a adsorção do antígeno.

O segundo passo do processo de otimização do Dot-blot, foi a avaliação da imunoreatividade das duas preparações antigênicas de *P. brasiliensis*.

Empregando-se o NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000, verificou-se que a concentração proteica do filtrado de cultura obtido a partir da cepa B-339 foi de 7ng/μL e para o filtrado de cultura obtido a partir da amostra 113 de 18ng/μL.

Objetivando determinar qual a melhor concentração antigênica para ser aplicada nas membranas, avaliou-se a imunoreatividade dos mesmos, frente a amostras de soro de pacientes com paracoccidioidomicose confirmada, soro de indivíduos saudáveis e anticorpo policlonal anti-exoantígeno de *P. brasiliensis* nas seguintes condições: a) antígenos puro, ou seja, sem diluir em água Milli-q® e b) antígeno diluído na razão dois (2) em água Milli-q®, até a diluição de 16. Assim, foram aplicados 6μL de antígeno/dot na membrana totalizando 42ng, 21ng, 10,5ng, 5,25ng e 2,625ng para o isolado Pb B-339 e; 108ng, 54ng, 27ng, 13,5ng e 6,75ng para o isolado Pb 113.

A análise dos resultados revelou que o melhor padrão de reatividade foi obtido quando se aplicou as preparações antigênicas sem diluição ou *in natura*, ou seja, puras à superfície da membrana de nitrocelulose. Desta forma, para os antígenos utilizados neste estudo, estabeleceu-se a concentração de 42ng/dot de filtrado de cultura da cepa Pb B-339 e 108ng/dot de filtrado de cultura da amostra Pb 113.

Verificou-se também, que apesar de ambos os filtrados de cultura apresentarem em sua composição antigênica as glicoproteínas de 43 e 70kDa, consideradas marcadores sorológicas da doença, a imunorreatividade do antígeno obtido da cepa B-339 de *P. brasiliensis* foi superior e visualmente melhor àquela observada para o antígeno obtido da amostra 113, principalmente nas avaliações semi-quantitativas.

#### 5.1.2. Soros

Assim como feito com os antígenos, os soros dos pacientes com paracoccidiodomicose confirmada, soros de indivíduos saudáveis doadores de banco de sangue e soros de pacientes com histoplasmose, aspergilose e tuberculose e anticorpo policlonal anti-exoantígeno de *P. brasiliensis* utilizados para a otimização e consequente validação da técnica de Dot-blot, foram incubados em diferentes diluições, a saber: 1:20, 1:40 e 1:100.

Entretanto, antes de determinar-se a melhor diluição dos anticorpos primários avaliou-se qual a melhor concentração para a solução de diluição.

Levando-se em consideração a experiência do Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses com o emprego de leite desnatado para a formulação da solução de diluição, optou-se em avaliar duas formulações distintas de solução salina tamponada com fosfatos acrescida de leite desnatado, ou seja, PBS-L 1% e PBS-L 3%.

A interpretação e análise dos resultados revelou que os melhores resultados foram obtidos quando se empregou uma maior concentração (p/v) de leite desnatado, ou seja, 3% para o preparo da solução de diluição, sendo, portanto, esta a solução adotada para a condução dos ensaios.

Em relação à diluição das amostras, após a realização dos ensaios diluindo-se os soros vinte, quarenta e cem vezes em PBS-L 3%, pode-se observar que o melhor padrão de reatividade da reação antígeno-anticorpo foi obtido para as amostras diluídas 40 vezes, sendo, portanto esta a condição adotada para os anticorpos primários.

Quanto ao tempo de incubação, estabeleceu-se, que as membranas de nitrocelulose contendo antígeno imobilizado, permaneceriam em contato com os anticorpos primários, por duas horas, sob agitação constante, em plataforma tipo gangorra, à temperatura ambiente.

### 5.1.3. Anticorpo secundário

Para a determinação da melhor diluição do anticorpo secundário, ou seja, IgG de cabra anti-IgG humana conjugada à peroxidase, foram avaliadas as seguintes concentrações: 1:1000 e 1:2000. O melhor padrão de reatividade foi encontrado, quando utilizou-se anticorpo secundário na diluição de 1:2000. Além disso, a solução de diluição utilizada foi a mesma que aquela empregada para os anticorpos primários, isto é, PBS-L 3%. Porém, o tempo de incubação estabelecido foi de uma hora e 30 minutos, ao abrigo da luz, sob agitação constante, à temperatura ambiente.

Após o período de incubação das membranas com os anticorpos primários e secundários, respeitando os tempos de incubação estabelecidos, foram realizadas três lavagens de cinco minutos cada, empregando-se solução de PBS-T 0,1%.

#### 5.1.4. Protocolo otimizado de Dot-blot

Membranas de nitrocelulose de 0,22µm (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, Califórnia, USA), foram sensibilizadas com 6µL/dot (42ng) de filtrado de cultura obtido a partir da cepa B-339 de *P. brasiliensis*. A fixação dos antígenos à membrana de nitrocelulose ocorreu por meio da incubação das mesmas a 37°C, em estufa incubadora (Modelo 002 CB, Fanem, São Paulo, SP, Brasil) por 30 minutos. Em seguida, as membranas foram bloqueadas adicionando-se 500,0µL de solução salina tamponada com fosfatos pH 7,4 acrescida de 5% de leite desnatado (Elegê, Teutônia, Rio Grande do Sul, Brasil), PBS-L 5%, por orifício de placa, por uma hora à temperatura ambiente, sob agitação constante em plataforma tipo gangorra (Bioficina-Indústria e Comércio de Aparelhos Laboratoriais, São Paulo, SP, Brasil).

Posteriormente, as membranas de nitrocelulose foram incubadas com as amostras de soro de pacientes com paracoccidiodomicose, soro de indivíduos doadores de banco de sangue e anticorpo policlonal de coelho anti-exoantígeno de *P. brasiliensis*, como soro controle-positivo, diluídas quarenta vezes (1:40) em PBS-L 3% à temperatura ambiente por duas horas, sob agitação constante, em plataforma tipo gangorra seguida de três lavagens, de cinco minutos cada, com PBS-T 0,1%, (PBS acrescido de 0,1% de Tween 20). Após esta etapa, a incubação com o anticorpo secundário, ou seja, anti-IgG humana conjugada à peroxidase foi realizada, diluindo-se o conjugado duas mil vezes em PBS-L 3% à temperatura ambiente, por 90 minutos, ao abrigo da luz e sob agitação constante, também seguida de três lavagens em PBS-T 0,1%.

A reação foi revelada empregando-se como cromógeno 4-cloro-1-naftol (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, Mo, USA), e a interrupção da reação foi feita por meio de lavagens sucessivas em água destilada.

A **Tabela 2** sumariza os diferentes parâmetros/condições padronizados para a realização do ensaio de Dot-blot.

**Tabela 2:** Condições estabelecidas para a realização da técnica de Dot-Blot no diagnóstico da PCM.

Condições	Concentração/ Diluição	Temperatura	Tempo de incubação (minutos)	Diluyente	Lavagens após
Sensibilização (Antígeno Pb B-339)	42ng	37°C	30	-	-
Bloqueio		22 a 25°C	60	PBS-L 5% <sup>a</sup>	-
Soro	1:40	22 a 25°C	120	PBS-L 3% <sup>b</sup>	PBS-T 0,1% <sup>c</sup> (3 x 5min.)
Conjugado	1:2000	22 a 25°C (abrigo da luz)	90	PBS-L 3%	PBS-T 0,1% <sup>c</sup> (3 x 5min.)
Substrato/ Cromógeno	4 cloro naftol	22 a 25°C	10	Tris/metanol	Água destilada

a: PBS pH7.4 com 5% de leite desnatado

b: PBS pH7.4 com 3% de leite desnatado

c: PBS pH7.4 com 0,1% de Tween 20

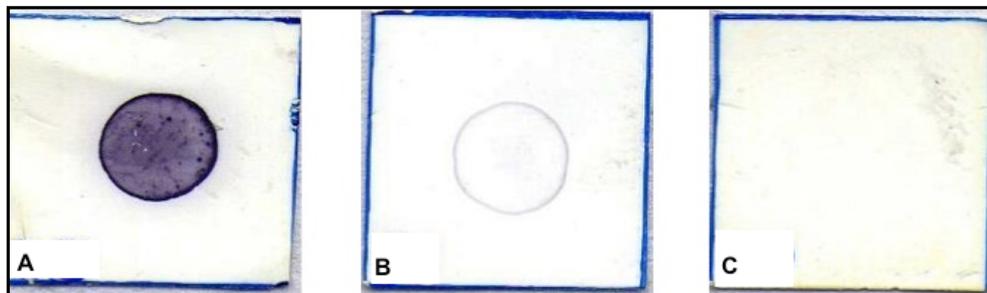
#### 5.1.5. Critérios adotados para interpretação dos Dot-blots

Verificou-se que as leituras resultantes da reação antígeno-anticorpo apresentaram três padrões distintos de reatividade para o diagnóstico sorológico da micose, como demonstra a **Figura 4**.

Entretanto, como em qualquer leitura que exija acuidade visual, observou-se certo grau de subjetividade, especialmente para as leituras onde a intensidade da cor/reação poderia apresentar interpretação entre “fracamente reagente” e não reagente. Diante do exposto, os padrões de reatividade/leitura foram assim definidos:

- 1) Reagente: Independente da intensidade da cor apresentada, a borda do círculo onde o antígeno foi dotado tem coloração roxa e o interior do mesmo tem preenchimento da mesma cor;
- 2) Não Reagente: A membrana de nitrocelulose não apresenta coloração alguma, deixando-a branca, e;

- 3) Indeterminado: A borda do círculo não é totalmente colorida, e o preenchimento é difuso, ou não preenchido. Tal resultado, apesar de duvidoso seria um possível reagente.

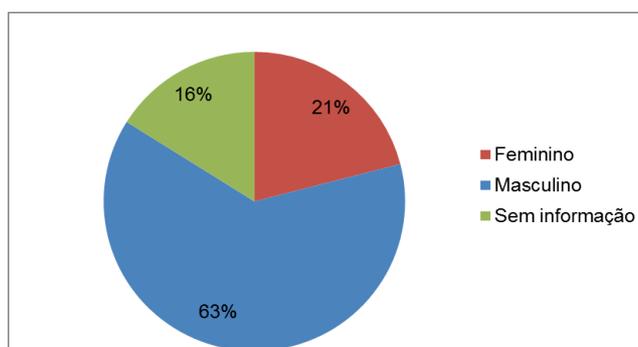


**Figura 4:** Padrão de leitura da técnica de Dot-Blot, onde **a** é reagente, **b** é indeterminado e **c** é não reagente.

## 5.2. Caracterização e avaliação do grupo controle

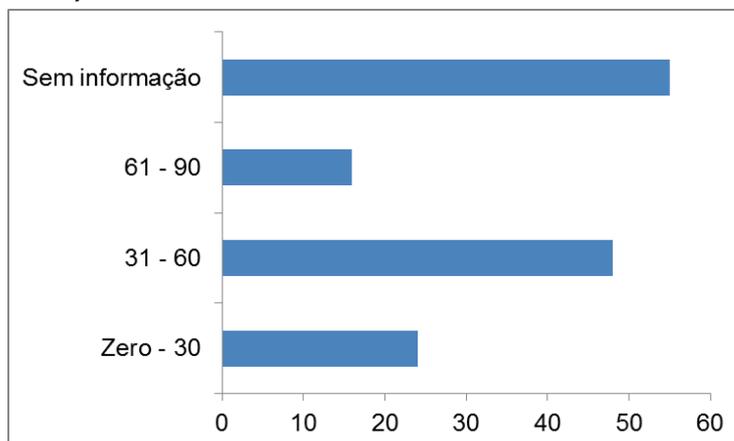
Foram avaliadas 143 amostras de soro para a padronização da metodologia de Dot-Blot, dentre estas, constituíram o grupo controle positivo 77 amostras de soro de pacientes com paracoccidioidomicose confirmada. O grupo controle negativo foi composto por amostras de soro de indivíduos “saudáveis”, doadores de banco de sangue (23 amostras) e soros de pacientes portadores de outras doenças pulmonares que não paracoccidioidomicose (43 amostras).

Do total de amostras avaliadas, 63% foram obtidas de indivíduos do sexo masculino e 21% do sexo feminino, demonstrando razão de masculinidade de 3:1 (**Figura 5**).



**Figura 5:** Distribuição por gênero dos pacientes do grupo controle.

Em relação à faixa etária dos pacientes do grupo controle, a variação foi de oito (8) a 83 anos, apresentando uma média aproximada de 43 anos. Para os indivíduos onde foi possível recuperar a informação sobre a idade, pode-se observar que a maioria se concentrou na faixa etária entre as idades de 30 a 60 anos (**Figura 6**).

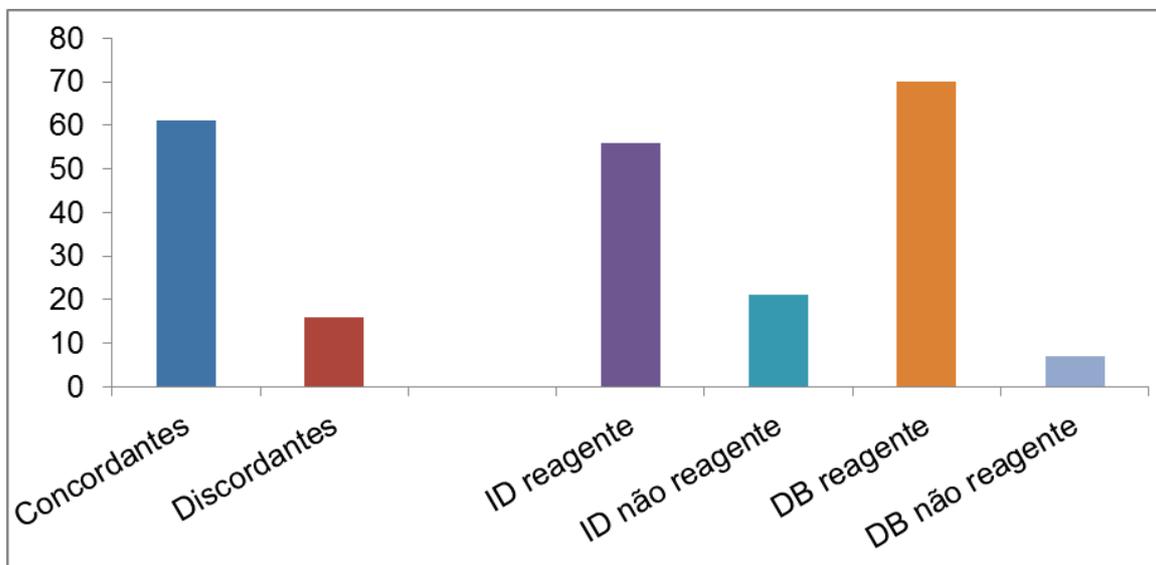


**Figura 6:** Distribuição por faixa etária dos indivíduos do grupo controle.

Verificou-se que as 23 amostras de soro de indivíduos aparentemente saudáveis, doadores de banco de sangue apresentaram ausência de reatividade frente ao antígeno (filtrado de cultura) do isolado B-339 de *P. brasiliensis* tanto pela técnica de ID, como pela técnica de DB. Quando se avaliou as 43 amostras de soro de pacientes com infecção causada por outros agentes etiológicos que não *P. brasiliensis* observou-se também, ausência de reatividade para a maioria (95,3%) dos soros de pacientes portadores de tuberculose, histoplasmose e aspergilose, tanto pelo ensaio padrão ouro sorológico, ou seja, ID como pelo Dot-blot. Dentre estas, apenas duas (4,65%) amostras uma de histoplasmose e outra de aspergilose, apresentaram reatividade frente ao antígeno de *P. brasiliensis*, por DB, indicando reatividade cruzada.

Em relação as 77 amostras de soro de pacientes com paracoccidiodomicose confirmada, 56 (72,7%) apresentaram reatividade frente ao filtrado de cultura de *P. brasiliensis* pelo método de ID e 70 (91%) apresentaram reatividade pelo ensaio de DB, reforçando a maior sensibilidade dos métodos imunoenzimáticos quando comparado aos métodos sorológicos

que tem como princípio a precipitação de anticorpos e antígenos na zona de equivalência. Sessenta e uma amostras de soro (79,2%) demonstraram resultados concordantes entre ambas as metodologias avaliadas e 16 (20,8%) amostras apresentaram resultados discordantes (**Figura 7**).



**Figura 7:** Distribuição do perfil de reatividade das amostras de soro de pacientes com paracoccidiodomicose confirmada, avaliadas por ID (Imunodifusão Dupla) e DB (Dot-Blot).

Verificou-se que entre as amostras discordantes, uma (1) apresentou reatividade pela técnica de imunodifusão dupla em gel de agarose apresentando, entretanto, ausência de reatividade pelo ensaio de Dot-Blot. Por outro lado, 15 amostras que apresentaram reatividade por DB se mostraram sorologicamente não reagentes para *P. brasiliensis* quando avaliadas pela técnica de imunodifusão dupla, sugerindo mais uma vez, devido a maior sensibilidade dos ensaios imunoenzimáticos, a possibilidade de uso da metodologia de Dot-blot para a triagem sorológica das amostras recebidas para a pesquisa de anticorpos circulantes *anti-P. brasiliensis* (**Quadro 2**).

**Quadro 2:** Distribuição dos resultados discordantes das amostras de soro de pacientes com paracoccidioidomicose doença quando avaliados pelos ensaios de imunodifusão dupla e Dot-blot.

Amostra	ID	DB
02	NR	R
04	NR	R
06	NR	R
07	NR	R
14	NR	R
18	NR	R
19	NR	R
27	NR	R
33	NR	I
37	NR	R
43	NR	R
45	NR	R
64	NR	I
68	NR	R
69	R	NR
75	NR	I

ID – Imunodifusão Dupla; DB – Dot-Blot; NR – Não Reagente; R – Reagente; I – Indeterminado.

### 5.3. Análise da performance do ensaio de Dot-blot

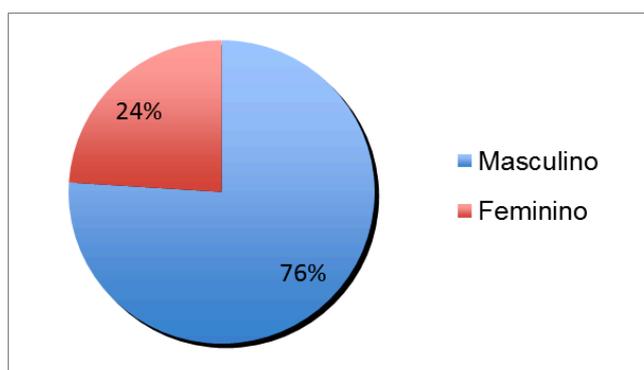
Após a otimização da metodologia de Dot-blot, avaliou-se a performance do ensaio frente a amostras que entram diariamente na rotina, para a pesquisa de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis*, do Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses.

Desta forma, foram selecionadas aleatoriamente 300 amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de infecção por *P. brasiliensis* ou que realizam periodicamente controle de tratamento.

As 300 amostras foram avaliadas tanto pela reação de imunodifusão dupla em gel de agarose, considerada padrão ouro sorológico e proposta no algoritmo para o imunodiagnóstico da PCM como pela reação de Dot-blot.

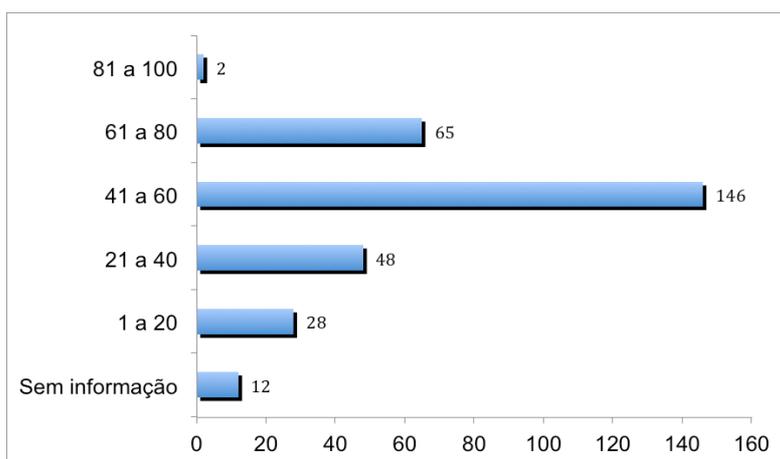
Ambas as avaliações sorológicas foram realizadas empregando-se como antígeno, filtrado de cultura da cepa Pb B-339 de *P. brasiliensis*.

A caracterização amostral revelou que 76% dos soros analisados eram de pacientes do sexo masculino e 24% do feminino, revelando razão de masculinidade de 3:1 (**Figura 8**).



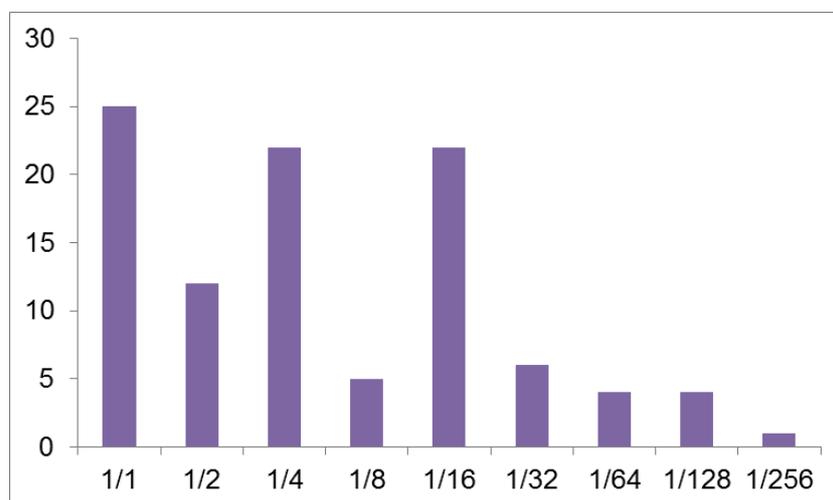
**Figura 8:** Distribuição por gênero dos pacientes com suspeita clínica de paracoccidioidomicose ou com doença confirmada cujas amostras foram recebidas para pesquisa de anticorpos séricos circulantes anti-*P. brasiliensis*.

Em relação à faixa etária dos pacientes verificou-se que a idade variou de um (1) a 86 anos, apresentando idade média de 47 anos. Observou-se também que 48,7% têm entre 41 a 60 anos de idade, concordando com a faixa etária de manifestação da doença, como mostra a **Figura 9**.



**Figura 9:** Distribuição por faixa etária dos pacientes com suspeita clínica de paracoccidioidomicose ou com doença confirmada cujas amostras foram recebidas para pesquisa de anticorpos séricos circulantes anti-*P. brasiliensis*.

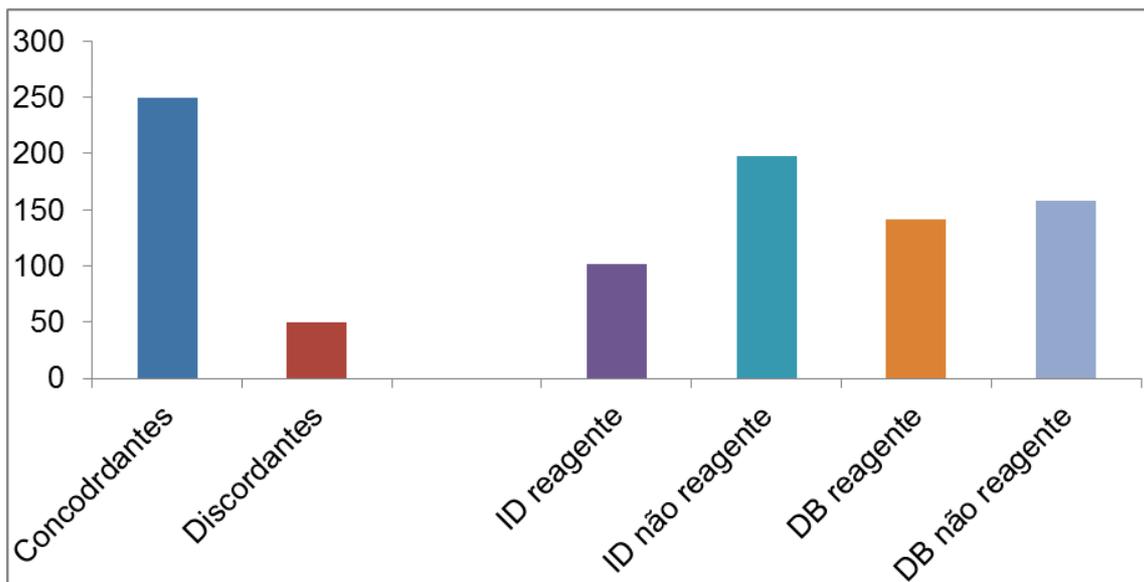
Do total de amostras de soro de pacientes com suspeita clínica para PCM analisadas, observou-se que 102 (34%) foram reagentes para *P. brasiliensis* pela técnica de imunodifusão dupla em gel de agarose, apresentando títulos séricos de anticorpos circulantes variando de 1:1 a 1:256 (**Figura 10**), sendo que a maioria apresentou título de 1:1 (24,8%).



**Figura 10:** Distribuição por títulos de diluição das amostras de soro reagentes para imunodifusão dupla dos pacientes com suspeita clínica para PCM.

A pesquisa de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis* empregando-se o ensaio de imunodifusão dupla em gel de agarose, padrão ouro sorológico, das 300 amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de PCM revelou que 34% (102/300) apresentaram reatividade e 66% (198/300) ausência de reatividade para *P. brasiliensis*. Por outro lado, através da metodologia padronizada de Dot-blot observou-se o reconhecimento de anticorpos séricos anti-*P. brasiliensis* em 47,3% (142/300) e ausência de reatividade em 52,7% (158/300).

Comparando a capacidade discriminatória de ambas as metodologias, ou seja, padrão ouro sorológico e ensaio de Dot-blot padronizado, pode-se sugerir que este último, por ser uma metodologia mais sensível, apresenta uma tendência de elevar o padrão de reatividade, uma vez que reconheceu 40 (13,3%) soros a mais que a ID. Duzentos e cinquenta (83,3%) amostras de soro obtiveram resultados concordantes em ambas as técnicas utilizadas e 50 (16,7%) foram discordantes (**Figura 11**).



**Figura 11:** Distribuição do padrão de reatividade das amostras de soro com suspeita clínica de paracoccidiodomicose, avaliadas por ID (Imunodifusão Dupla) e DB (Dot-Blot).

Entre as amostras concordantes, 153 (61,2%) apresentaram ausência de reatividade para o agente etiológico da paracoccidiodomicose e em 97 (38,8%) foi possível detectar anticorpos circulantes espécie específico. Dentre as amostras discordantes, 45 (90%) foram reagentes na técnica de Dot-blot e não reagente para ID; enquanto o contrário aconteceu com cinco (10%) das amostras utilizadas no estudo.

#### 5.4. Avaliação da repetitividade e reprodutibilidade intermediária

Para análise da repetitividade, foram escolhidas aleatoriamente, 11 amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de PCM. Desta forma, as amostras foram avaliadas em duplicatas aplicadas em pontos ou *dots* equidistantes, como mostra a **Figura 12**. Os resultados obtidos demonstraram duplicatas com intensidades iguais de cor, quando a amostra de soro se apresentava reagente pela reação de Dot-blot, por outro lado, na ausência de reatividade, as membranas de nitrocelulose apresentavam-se brancas por inteiro. Já a reprodutibilidade intermediária do ensaio foi avaliada com a análise das mesmas amostras, por quatro (4) analistas diferentes em dias diferentes.

A **Tabela 3** apresenta os resultados obtidos por cada analista que realizou a técnica de Dot-blot, obtendo 73% (8/11) de concordância nos resultados e pequena diferença nos resultados de cada analista.



**Figura 12:** Esquema da aplicação das amostras de soro em placa de Dot-Blot. Os números representam a ordem em que foram aplicadas e as cores o local de aplicação das mesmas amostras em duplicata.

**Tabela 3:** Comparação dos resultados observados entre as análises de Dot-blot realizadas por diferentes analistas (1, 2, 3 e 4) com as mesmas amostras, em dias distintos e no mesmo laboratório.

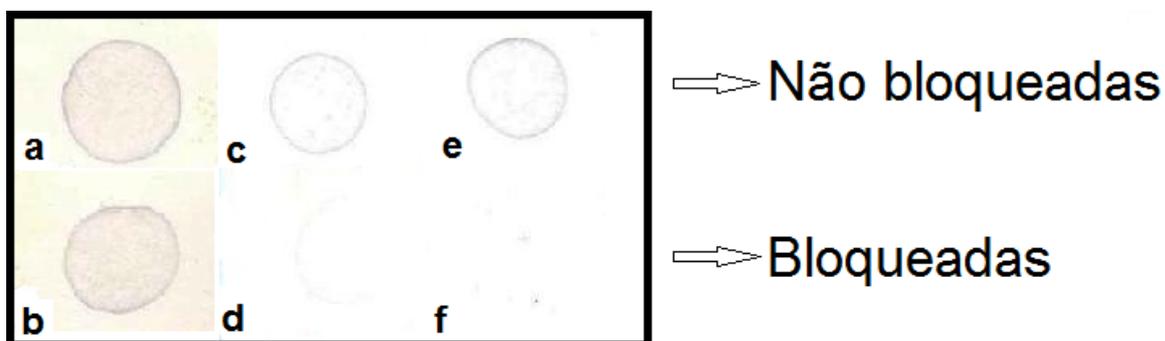
Amostras	Analista	Resultados			
		Analista 1	Analista 2	Analista 3	Analista 4
1	I	I	I	I	
2	NR	NR	NR	NR	
3	NR	NR	NR	NR	
4	NR	I	I	NR	
5	I	I	NR	NR	
6	NR	NR	NR	NR	
7	R	R	R	R	
8	I	I	NR	NR	
9	R	R	R	R	
10	R	R	R	R	
11	R	R	R	R	

I – Indeterminado; NR – Não Reagente e R – Reagente.

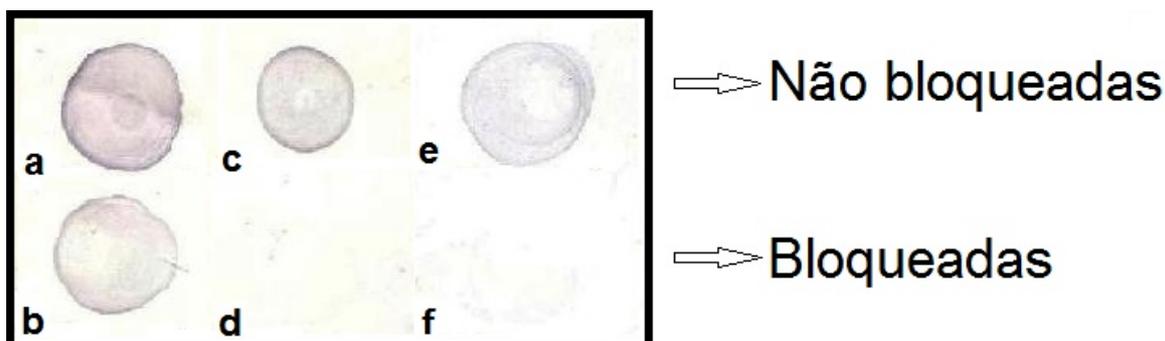
## 5.5. Análise da estabilidade das membranas

Assim, onze amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de PCM foram selecionadas, de forma aleatória, para a realização da análise da estabilidade das membranas de nitrocelulose.

A análise dos resultados demonstrou que membranas bloqueadas não apresentaram o mesmo padrão de reatividade, quando comparadas às membranas não bloqueadas quando armazenadas tanto à  $-20^{\circ}\text{C}$  (**Figura 13**) quanto à  $8^{\circ}\text{C}$  (**Figura 14**). Observou-se uma melhor visualização da reação antígeno-anticorpo, em ambas temperaturas, quando as membranas não foram bloqueadas com PBS-L 5%.



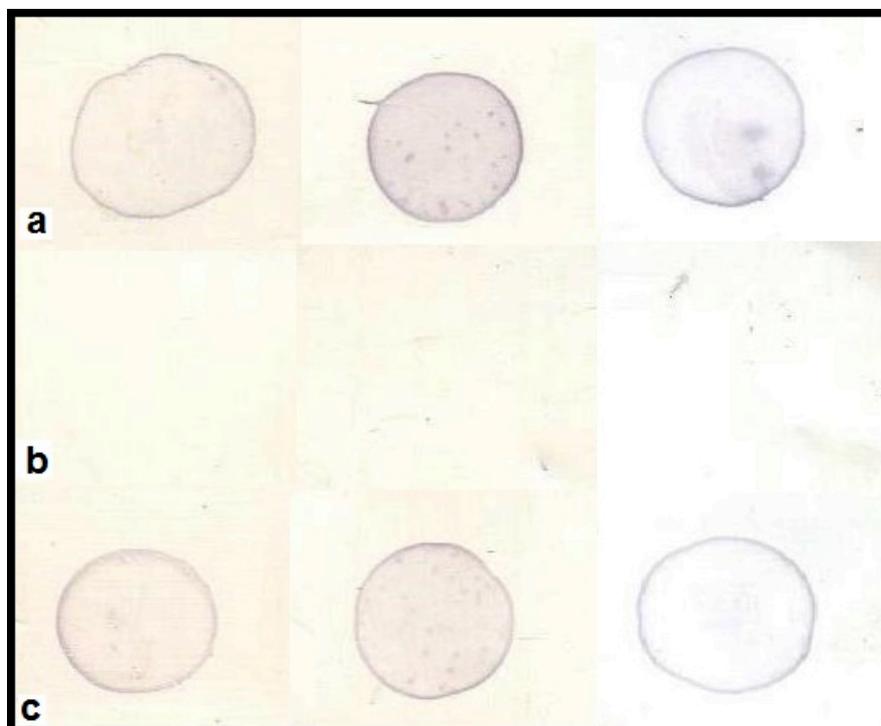
**Figura 13:** Avaliação da estabilidade das membranas de nitrocelulose à  $-20^{\circ}\text{C}$ . a, b: membranas após 7 dias de adsorção do antígeno; c, d) 15 dias de antígeno dotado e e, f) 30 dias de antígeno dotado.



**Figura 14:** Avaliação da estabilidade das membranas de nitrocelulose à  $8^{\circ}\text{C}$ . a, b: membranas após 15 dias de adsorção do antígeno; c, d) 30 dias de antígeno dotado e e, f) 90 dias de antígeno dotado.

Tendo em vista que os resultados obtidos avaliando-se membranas previamente bloqueadas com PBS-L 5%, à -20°C e 4°C, não foram satisfatórios, optou-se por avaliar as membranas à temperatura ambiente, sem bloqueio.

A análise dos resultados demonstrou que membranas contendo antígeno de *P. brasiliensis* imobilizado e não bloqueadas com PBS-L 5% apresentaram de forma geral, boa estabilidade após 90 dias de adsorção do antígeno (**Figura 15**). Contudo, vale ressaltar que amostras de soro com baixa titulação pelo ensaio de imunodifusão dupla podem apresentar perda no padrão de reatividade após 30 dias de sensibilização da membrana.



**Figura 15:** Avaliação da estabilidade das membranas de nitrocelulose à temperatura ambiente nos tempos de 7, 30 e 90 dias após adsorção do antígeno. a) amostra de soro de paciente com suspeita clínica para paracoccidiodomicose com alta titulação para imunodifusão dupla; b) amostra de soro de paciente com suspeita clínica para paracoccidiodomicose, não reagente para imunodifusão dupla e, c) amostra de soro de paciente com suspeita clínica para paracoccidiodomicose com baixa titulação pela reação de imunodifusão dupla.

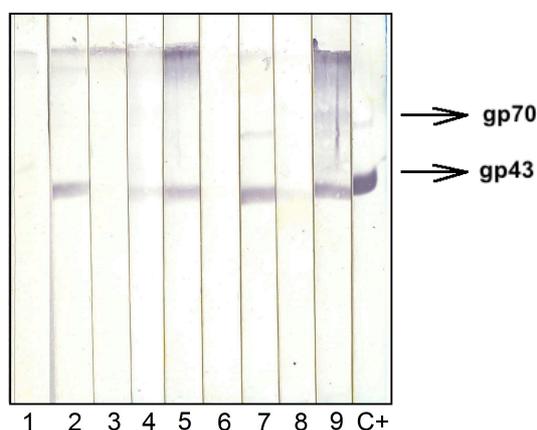
## 5.6. Immunoblotting (IB)

Das 300 amostras de soro utilizadas no estudo, dez (10) obtiveram resultados discordantes, mesmo após repetição do ensaio padronizado. Destas, uma (1) amostra não pôde ser reavaliada por falta de material e uma (1) não confirmou o resultado observado na técnica de ID, as oito (8) amostras de soro restantes apresentaram resultado concordante à DB (**Figura 16 e Quadro 3**).

**Quadro 3:** Amostras discordantes entre imunodifusão e Dot-blot analisadas por *immunoblotting*. Resultados concordantes com o ensaio de Dot-blot.

Amostra	ID	DB	IB
1	NR	R	R
2	NR	R	R
3	NR	R	NR
4	NR	R	R
5	NR	R	R
6	R	NR	NR
7	NR	R	R
8	NR	R	R
9	NR	R	R
10	NR	R	-

ID – Imunodifusão dupla; DB – Dot-Blot; IB – *Immunoblotting*; NR – Não reagente; R – Reagente; – – Amostra insuficiente.



**Figura 16:** *Immunoblotting* (IB) das amostras de soro dos pacientes com suspeita clínica de paracoccidioidomicose com resultados discordantes entre imunodifusão e Dot-blot. Foram reagentes frente a glicoproteína de 43kDa, as fitas 2, 4, 7 e 9 e a fita controle positivo (C+); as demais apresentaram ausência de reatividade.

## 5.7. Cálculo dos parâmetros intrínsecos dos ensaios sorológicos

Os parâmetros intrínsecos (sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e acurácia) foram avaliados primeiramente para cada ensaio sorológico isoladamente e depois comparando-se a performance de ambos.

Os cálculos foram realizados como descrito nos itens 4.10.1., 4.10.2., 4.10.3., 4.10.4. e 4.11..

Dessa forma, de acordo com a **Tabela 4**, para a reação de imunodifusão dupla em gel de agarose a sensibilidade do teste foi de 72,7% (56/77) e a especificidade foi de 98,5% (65/66). O Valor Preditivo Positivo (VPP) foi de 98,2% (56/57) e o Negativo (VPN) de 75,6% (65/86), em uma prevalência de 54%. O ensaio de ID apresentou acurácia de 84,6% (121/143).

**Tabela 4:** Avaliação das amostras de soro por ID, de acordo com a confirmação clínico-laboratorial da micose.

	PCM doentes	PCM não doentes	Total
ID reagentes	56	1	57
ID não reagentes	21	65	86
Total	77	66	143

PCM – Paracoccidioidomicose; ID – Imunodifusão Dupla.

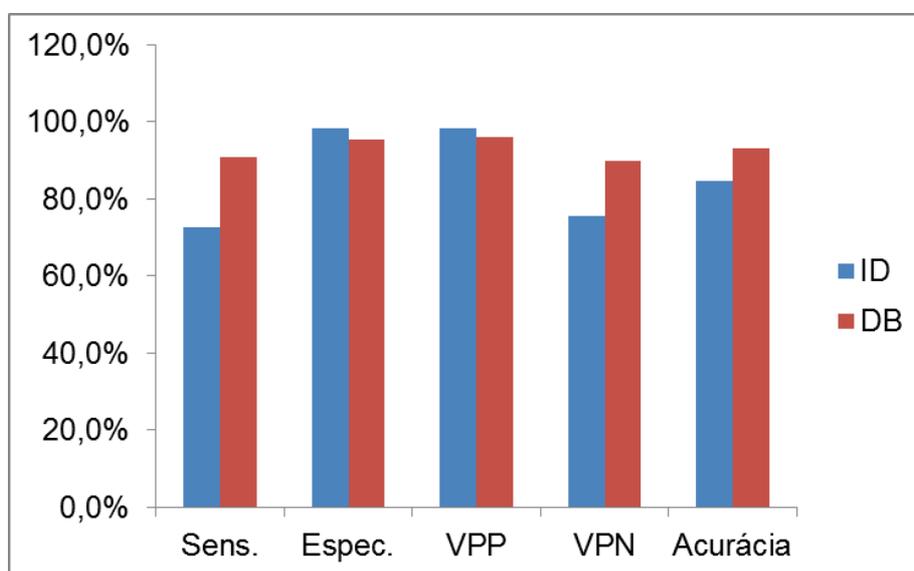
Na avaliação da metodologia de Dot-blot, os valores, de acordo com a **Tabela 5** foram: sensibilidade de 91% (70/77) e especificidade de 95,4% (63/66). Os Valores Preditivos Positivo e Negativo foram de 96% (70/73) e 90% (63/70), respectivamente em prevalência de 54%. O ensaio de DB apresentou acurácia de 93%. Vale ressaltar que para a metodologia de DB, resultados indeterminados foram considerados reagentes para tais cálculos.

**Tabela 5:** Avaliação das amostras de soro por DB, de acordo com a confirmação clínico-laboratorial da micose.

	PCM doentes	PCM não doentes	Total
DB reagentes	70	3	73
DB não reagentes	7	63	70
Total	77	66	143

PCM – Paracoccidioidomicose; DB – Dot-Blot.

Para melhor ilustrar os valores dos parâmetros intrínsecos calculados no estudo, a **Figura 17**, compara a eficiência dos ensaios.



**Figura 17:** Comparação em porcentagem dos parâmetros intrínsecos dos ensaios de Imunodifusão Dupla e Dot-Blot: Sens. – Sensibilidade; Espec. – Especificidade; VPP – Valor Preditivo Positivo; VPN – Valor Preditivo Negativo.

Durante a determinação dos parâmetros intrínsecos comparou-se também os resultados dos ensaios sorológicos, tendo como teste padrão a imunodifusão dupla. Desta forma, a relação de co-positividade ID/DB foi de 95% (97/102), a co-negatividade ID/DB foi de 77,3% (153/198) e o índice *Kappa* foi de 0,66 – classificando a concordância como boa (**Tabela 6**).

**Tabela 6:** Comparação das amostras de soro avaliadas por ID e DB.

	ID reagentes	ID não reagentes	Total
DB reagentes	97	45	142
DB não reagentes	5	153	158
Total	102	198	300

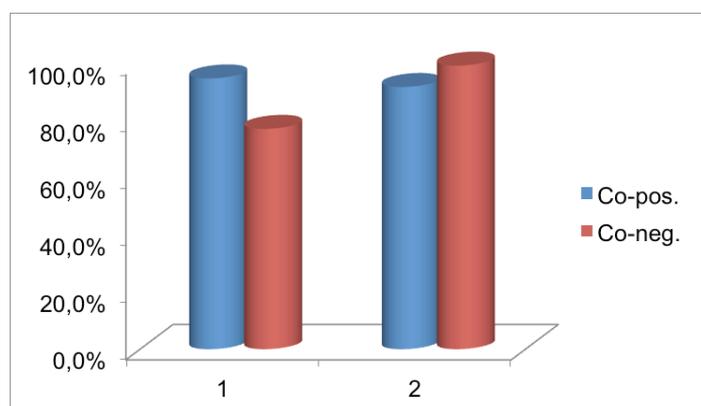
DB – Dot-Blot; ID – Imunodifusão Dupla.

Posteriormente, amostras com resultados discordantes, foram reavaliadas para confirmação dos mesmos. Assim, diferentes valores de co-positividade, co-negatividade e *Kappa* foram encontrados para este segundo momento: 92% (101/110), 99,5 % (189/190) e 0,93 – concordância ótima (**Tabela 7 e Figura 18**).

**Tabela 7:** Comparação das amostras de soro avaliadas por ID e DB no momento 2.

	ID reagentes	ID não reagentes	Total
DB reagentes	101	9	110
DB não reagentes	1	189	190
Total	102	198	300

DB – Dot-Blot; ID – Imunodifusão Dupla.



**Figura 18:** Comparação em porcentagem dos valores de sensibilidade e especificidade relativas da técnica de Dot-blot, no primeiro momento (1) e após repetição das amostras discordantes (2).

## 6. Discussão

Sabe-se que a PCM devido ao importante impacto sócio-econômico associado às graves sequelas provocadas nos pacientes acometidos, configura como a micose sistêmica de maior relevância entre as doenças parasitárias especialmente no Brasil (Colombo et al., 2011).

Estima-se que existam nas regiões endêmicas aproximadamente, 10 milhões de pessoas infectadas por espécies fúngicas do complexo *Paracoccidioides brasiliensis*, e destes apenas 1 a 2% irão desenvolver a doença (Restrepo, 1985; Restrepo et al., 2001; Calle et al., 2001; Colombo et al., 2011).

O Brasil concentra 80% dos casos da micose, sendo a maior prevalência observada nos Estados do Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Rondônia (Colombo et al., 2011; Vieira et al., 2014).

Inúmeras pesquisas têm demonstrado e comprovado ao longo dos últimos anos a alta endemicidade da doença no Estado de São Paulo. Postula-se que a existência de áreas endêmicas bem definidas e conseqüentemente o grande número de casos possa guardar estreita relação com as características climáticas e fisiográficas favoráveis ao desenvolvimento, reprodução, adaptação e sobrevivência do fungo (Blotta et al., 1999; Barrozo et al., 2010; Kamikawa, 2011; Kamikawa et al., 2012).

O diagnóstico laboratorial considerado como padrão ouro da paracoccidioidomicose, pauta-se no isolamento do agente etiológico a partir de diferentes tipos de material biológico, seguido da cultura com conseqüente reversão da forma infectante para a parasitária (Lacaz et al., 2002).

Entretanto, historicamente, as técnicas sorológicas, vêm desempenhando importante auxílio no diagnóstico presuntivo e/ou confirmatório não apenas da

paracoccidiodomicose como de outras infecções fúngicas, permitindo o monitoramento do curso da doença durante e pós-tratamento (Camargo e Franco, 2000; Camargo, 2008).

A reação de imunodifusão dupla em gel de agarose vem sendo amplamente utilizada desde 1961, no imunodiagnóstico da PCM, visando a pesquisa de anticorpos séricos circulantes anti-*P. brasiliensis* (Ferri, 1961, Camargo e Franco, 2000; Camargo, 2008). Entretanto, apesar de permitir a avaliação qualitativa e semi-quantitativa das amostras, apresentar bons índices de sensibilidade e especificidade, ser de fácil execução e apresentar baixo custo, demora aproximadamente de sete (7) a dez (10) dias para a liberação de seu resultado, pois necessita de tempo de incubação e lavagens mais demoradas, quando comparada aos ensaios imunoenzimáticos como ELISA e *immunoblotting* (Shikanai-Yassuda et al., 2006).

Durante a década dos anos 80, foi notório o interesse no desenvolvimento de técnicas indiretas para o diagnóstico laboratorial de doenças parasitárias e microbianas, que fossem sensíveis, específicas, reprodutíveis, rápidas, de fácil execução e pouco onerosas.

Contudo, técnicas sorológicas tradicionais como a hemaglutinação indireta (Jacobs e Lunde, 1957), fixação de complemento (Kent e Fife, 1963), contraímunoeletroforese (Gentilini e Pinon, 1972) e imunofluorescência indireta (Duxbury e Sadun, 1964; Pappas et al., 1983a), entre outras, apresentaram algumas particularidades que as impediram, de alguma forma, de serem utilizadas pelos laboratórios de rotina diagnóstica como “padrão ouro” sorológico.

Um dos fatores limitantes para a condução “*in house*” das reações de hemaglutinação indireta e fixação de complemento, concentra-se na necessidade do emprego de hemoderivados obtidos a partir de animais mantidos em biotérios. Esta necessidade dificulta, muitas vezes, a padronização e validação destas metodologias, pois nem sempre este material

encontra-se disponível em grandes quantidades, ou mantem o mesmo padrão de qualidade fazendo com que a mesma tenha que ser “repadronizada” a cada vez que um novo lote de reagente comece. Neste sentido, salienta-se também, o alto consumo dos reagentes não só para a padronização, otimização e validação da metodologia, como também para a realização da própria rotina diagnóstica.

Outro ponto a ser discutido, diz respeito ao custo-benefício de uma determinada metodologia. Isso pode ser facilmente exemplificado para as avaliações realizadas empregando-se os ensaios de imunofluorescência direta e/ou indireta. As metodologias são vantajosas quando se avalia a sensibilidade e especificidade. Entretanto, a necessidade de aquisição e manutenção do microscópio de fluorescência e de seus componentes, o custo relativamente elevado dos anticorpos fluorescentes e a impossibilidade de avaliação de mais de um paciente/amostra por lâmina/teste torna o mesmo dispendioso fazendo assim que na maioria das vezes esta reação seja realizada apenas por laboratórios de referência e muitas vezes como teste confirmatório (Silveira, 2013, comunicação pessoal).

Neste sentido, o *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) foi desenvolvido com o objetivo de proporcionar a detecção, em larga escala, de inúmeras doenças parasitárias (Voller et al., 1976). Mesmo assim, algumas desvantagens foram apontadas por Pappas (1988): a) necessidade de treinamento e capacitação de pessoal; b) ocorrência de leituras discrepantes placa-a-placa e poço-a-poço, conhecido como “efeito de margem” (Kricka et al., 1980); c) aquisição e manutenção de equipamentos específicos, como lavador de placas e fotômetros; e d) aquisição de reagentes específicos.

Importante comentar, que o custo para a aquisição tanto para o aparato eletrônico como para o treinamento de pessoal responsável é alto e requer tempo maior para que tudo se ajuste e adapte conforme pede a metodologia. Deve-se salientar também que as despesas com manutenção preventiva e

calibração contribuem significativamente para o encarecimento das análises (Pappas, 1988).

Por apresentar inúmeros pré-requisitos, uma importante limitação observada para várias das técnicas citadas acima é a não portabilidade para uso em áreas remotas, ou seja, a campo (Pappas, 1988). Desta forma, seu uso fica, rotineiramente, restrito a laboratórios equipados com refrigeração adequada e técnicos responsáveis somente pela realização específica de uma metodologia, às vezes, limitando o conhecimento de etapas além-laboratório.

Diante do exposto, pode-se afirmar que a otimização de protocolos e/ou metodologias objetivando o imunodiagnóstico de determinado agravo, seja pela detecção de anticorpos ou pela pesquisa de antígenos circulantes, exige antes de qualquer coisa que se defina primeiramente para qual fim o método será aplicado, ou seja, para fins de triagem sorológica ou para fins de diagnóstico.

A partir da definição da aplicabilidade do ensaio, deve-se preferencialmente conduzir os experimentos empregando-se: a) amostragem bem caracterizada e definida, ou seja, avaliar o desempenho do teste frente a amostras de soros ou qualquer outro fluido biológico obtido a partir de indivíduos portadores e não portadores do agravo em questão; soros de indivíduos reagentes e não reagentes para o agravo e soros de indivíduos portadores de outras patologias, neste caso para avaliar a reatividade cruzada ou especificidade do teste; b) material de referência certificado, quando aplicável; c) equipe técnica capacitada e d) equipamentos devidamente calibrados e certificados.

Associado a estes importantes fatores, deve-se avaliar também: a) condições laboratoriais adequadas para o seu desenvolvimento; b) capacidade analítica do ensaio; c) custo benefício do mesmo; d) possibilidade do mesmo ser realizado a campo; e) tempo de prateleira; f) desempenho nas avaliações de repetitividade e reprodutibilidade; g) possibilidade de ser desenvolvido em laboratórios que não sejam de referência e h) criteriosa análise dos resultados para que os cálculos dos parâmetros intrínsecos possam garantir reais valores

de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo, acurácia, etc.

Avaliando o *status* do Instituto Adolfo Lutz como Laboratório de Referência Estadual para o imunodiagnóstico da Paracoccidioidomicose, é indiscutível a necessidade da aplicabilidade e disponibilidade de uma metodologia que permita a realização da triagem sorológica das amostras biológicas (soro, plasma, líquido) de pacientes com suspeita clínica de PCM ou mesmo daqueles com doença ativa e/ou confirmada. Desta forma, no presente estudo, optou-se por otimizar e validar, para as condições do Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses, a metodologia de Dot-blot.

Estudos anteriores já haviam demonstrado que o Dot-Blot é extremamente aplicável na detecção de antígenos e anticorpos em soros humanos, animais bem como em pesquisas relacionadas para a agricultura (Hawkes et al., 1982; Pappas et al., 1983a; Pappas et al., 1983b; Pappas, 1988, Stott, 1989).

Hawkes et al., (1982) demonstraram que a metodologia de Dot-blot apresenta duas grandes vantagens quando comparada aos demais ensaios imunoenzimáticos que utilizam microplacas como suporte para a reação. Segundo o autor, a primeira vantagem diz respeito à quantidade significativamente inferior de antígeno necessária para a condução da reação, propiciando assim não apenas economia de reagente bem como diminuição do custo do ensaio; a segunda vantagem relaciona-se ao fato de que o emprego de membrana de nitrocelulose permite a visualização da reação antígeno-anticorpo face a um fundo branco, aumentando assim, o poder discriminatório entre resultados reagentes e não reagentes quando comparada às placas de poliestireno e/ou linhas de precipitação visualizadas nos ensaios de precipitação em lâminas.

Segundo Gouvea et al. (1987) a membrana de nitrocelulose pode substituir com grandes vantagens as placas de poliestireno comumente utilizadas como fase sólida ou suporte inerte para ensaios imunoenzimáticos. De acordo com

os autores, o emprego de membrana de nitrocelulose simplifica a adição de reagentes bem como as etapas de lavagem, já que dispensa a utilização de equipamentos próprios para tanto. Além disso, a mesma pode ser cortada na quantidade e no tamanho desejado, de acordo com a amostragem a ser avaliada.

Outra vantagem, bem documentada por Pappas (1988), relacionada à metodologia de Dot-Blot esta no fato da membrana de nitrocelulose permitir efetivamente a ligação de uma grande diversidade de preparações antigênicas. Neste sentido, já foram imobilizadas à membrana de nitrocelulose: formas viáveis de *Leishmania* e *Trypanosoma*; sobrenadantes de sonicados congelados-descongelados; extratos antigênicos excretados/secretados de diferentes microrganismos, fluido de cistos, antígeno solúvel de ovos, antígeno de glândulas salivares, sonicados de culturas e etc (Giannini, 1985; Giannini, 1987; Pappas et al., 1984b; Zimmerman et al., 1985; Pappas et al., 1986; Whelen et al., 1986; Londner et al., 1987).

Pappas (1988) atribui esta importante e vantajosa característica aos inúmeros poros distribuídos ao longo da superfície da membrana que contribuem para o aumento da afinidade de ligação.

Desde sua descrição por Hawkes et al. (1982), a metodologia de DB demonstrou excelentes resultados no diagnóstico de inúmeras doenças infecciosas, causadas pelos mais variados agentes etiológicos, provando ser uma técnica versátil e rápida.

Gouvea e cols. (1987) também utilizaram a reação imunoenzimática para o diagnóstico de rotavírus e adenovírus em fezes de crianças com gastroenterites, obtendo ótimos resultados, inclusive, quando um *pool* de antígenos foi utilizado. Os autores compararam-na com o ensaio de ELISA e verificaram a obtenção de resultados iguais para ambas as metodologias, indicando que a membrana de nitrocelulose pode substituir as placas de

plástico comumente utilizadas como fase sólida para ensaios imunoenzimáticos clássicos.

Com relação à variedade antigênica utilizada em trabalhos sobre padronização/otimização da reação de Dot-blot, Pappas e cols. (1983b) padronizaram o ensaio para o diagnóstico rápido da leishmaniose visceral, utilizando antígenos provenientes de formas promastigostas de *Leishmania donovani*. Os autores obtiveram 98% de sensibilidade e especificidade, verificando ótimos resultados com titulação de amostras e baixo índice de reatividade cruzada. Os autores ressaltaram o valor da metodologia em países em desenvolvimento por seu baixo custo, rápida execução e ótimos benefícios para a área da saúde.

Matthews e Burnie (1988) relataram o emprego da metodologia de Dot-blot visando a pesquisa do antígeno imunodominante de 47kDa de *Candida albicans* no diagnóstico sorológico de indivíduos portadores de candidíase sistêmica. Neste trabalho, os autores compararam o desempenho do Dot-blot, empregando a fração antigênica de 47kDa como sonda frente a reação de aglutinação em látex e Dot-blot empregando soro hiperimune total não fracionado de *C. albicans*. A avaliação dos resultados revelou que a utilização da sonda de 47kDa aumentou a sensibilidade e especificidade do ensaio.

Reboli (1993) descreveu a performance do Dot-blot utilizando anticorpo policlonal de coelho anti-imunoglobulina G de *Candida* como anticorpo primário e ouro coloidal revestido com anti-imunoglobulina G de coelho como anticorpo secundário para a detecção de antígenos citoplasmáticos de *Candida*. Os resultados obtidos mostraram-se promissores, entretanto, segundo a autora o desempenho do mesmo precisa ser comprovado frente a uma amostragem maior.

Bernardis et al. (1993) avaliaram um ensaio de Dot-blot objetivando detectar manoproteína circulante, como antígeno em pacientes neutropênicos. A técnica baseia-se na utilização de um anticorpo monoclonal que reconhece

um epítopo partilhado pela manoproteína presente nas diferentes espécies patogênicas de *Candida*. A metodologia proposta permitiu a detecção do antígeno alvo em *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *Torulopsis glabrata*, e *C. parapsilosis*, entretanto não foi capaz de detectar o antígeno em *C. krusei*. A análise retrospectiva de soros de pacientes com candidíase invasiva comprovada e soros de controles revelou que o ensaio apresenta bons índices de sensibilidade, especificidade e valores preditivos para ser utilizado como método diagnóstico.

Para a condução deste trabalho, optou-se por empregar como antígeno, filtrados de cultura obtidos a partir das cepas B-339 (ATCC 32069) e 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.

Além disso, estes isolados foram escolhidos por serem bons produtores das glicoproteínas de 43kDa (B-339) e 43 e 70kDa (113), consideradas marcadoras sorológicas da PCM e reconhecidos respectivamente por 100 e 96% dos soros de pacientes (Camargo et al., 1988; Camargo et al., 1989; Gianinni et al., 1990; Camargo et al., 1991 Blotta e Camargo, 1993; Assis, 1997, Camargo et al., 2003).

Dados da literatura indicam que, para o imunodiagnóstico da PCM, a preparação antigênica adequada e com aplicabilidade 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.

O filtrado de cultura obtido a partir da cepa B-339 de *P. brasiliensis* apresenta grandes quantidades da glicoproteína de 43kDa, 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).

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).

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 do patógeno, 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).

A avaliação da imunoreatividade de ambos os filtrados de cultura adsorvidos a membrana de nitrocelulose frente a amostras de soro oriundas de pacientes sabidamente portadores da doença e com reatividade frente a *P. brasiliensis* pelo ensaio de imunodifusão dupla, revelou que o filtrado de cultura B-339, demonstrou melhor padrão de reconhecimento frente às amostras avaliadas.

Já a preparação antigênica proveniente do isolado 113 apresentou reatividade de menor intensidade frente as amostras de soro de pacientes, ou mesmo frente ao anticorpo policlonal anti-exoantígeno de *P. brasiliensis*, principalmente nas avaliações semi-quantitativas realizadas (dados não apresentados), o que nos levou a escolher a amostra B-339 para a condução

da otimização e validação. Além disso, a amostra 113 de *P. brasiliensis*, rica nas frações de 43 e 70kDa, apresentou maior reatividade cruzada frente a anticorpos policlonais anti-exoantígeno de *H. capsulatum* e *A. fumigatus*. A reatividade frente a gp70 de *P. brasiliensis* foi relatada por Unterkircher (1989) ao avaliar por ELISA, a proteína de 70 kDa, obtida por gel filtração frente a soros de pacientes com paracoccidioidomicose e outras micoses sistêmicas, apresentando intensa reatividades cruzada com soros de pacientes com Doença de Jorge Lobo e Histoplasmose.

Uma vez que o processo de sensibilização e fixação de ambas as preparações antigênicas foram realizadas seguindo-se o mesmo protocolo, algumas hipóteses possam explicar, talvez, a diferença no padrão e intensidade (cor) da reatividade entre o filtrado de cultura obtido a partir da cepa B-339 e da amostra 113 de *P. brasiliensis*.

Pode-se supor, que o tempo e temperatura para fixação do antígeno possa não ter sido suficiente. Neste estudo, ambas as preparações antigênicas foram fixadas à membrana de nitrocelulose por 30 minutos à 37°C, enquanto Pappas (1988) relata o emprego de temperatura a 56°C durante 10 minutos e Martins et al. (1997) descrevem que a fixação do antígeno ocorreu durante uma (1) hora a temperatura ambiente.

Pode-se especular também que a porosidade da membrana de nitrocelulose (0,22µm) não tenha sido ideal para permitir uma boa afinidade de ligação das frações antigênicas contidas no filtrado de cultura da amostra 113. Neste sentido, Martins et al. (1997) relatam o emprego de membrana de 0,45µm para a fixação da preparação antigênica constituída de uma mistura de antígeno somático e filtrado de cultura obtido a partir das amostras Bt1, Bt2, 18, 113, 192 e 265.

Ainda nesta linha de raciocínio, vários trabalhos relatam o emprego de pressão negativa com bomba de vácuo como facilitador e/ou potencializador da

ligação das preparações antigênicas às membranas de nitrocelulose (Stott, 1989; Taborda e Camargo, 1994; Correa et al., 2006).

Por último, deve-se considerar também que o perfil de imunorreatividade do filtrado de cultura da amostra 113 se apresenta de forma diferenciada pela metodologia de Dot-blot quando comparada aos ensaios de imunodifusão dupla em gel de agarose e *immunoblotting* pelo fato de que o antígeno está presente como estrutura íntegra e a reação com o anticorpo ocorre em solução, formando imunocomplexos precipitantes (Ouchterlony, 1949). Por outro lado, no *immunoblotting* as frações antigênicas são separadas eletroforéticamente segundo seu peso molecular, expondo desta forma os epítomos imobilizados na membrana de nitrocelulose, favorecendo, portanto, a ligação com o anticorpo específico (Towbin et al., 1979).

Passos (2012) avaliou a aplicabilidade da técnica de *immunoblotting* para a pesquisa de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis*, empregando como antígeno, filtrados de cultura das amostras B-339 e 113. A análise dos resultados demonstrou que a reação de *immunoblotting* apresentou sensibilidade superior àquela obtida pela imunodifusão dupla, quando empregou-se filtrado de cultura 113 imobilizado à membrana de nitrocelulose, observando-se para pacientes pré-tratamento sensibilidade de 94,4%.

Pelo fato do filtrado de cultura obtido a partir da cepa B-339 de *P. brasiliensis* não ter apresentado bom desempenho em relação ao reconhecimento da fração de 70kDa, optou-se por não empregá-lo no desenvolvimento da metodologia de *immunoblotting*. Neste mesmo trabalho, a autora avaliou soros de pacientes em vigência de terapia anti-fúngica, empregando a metodologia de *immunoblotting* e o ensaio de imunodifusão dupla. Em relação ao *immunoblotting*, considerou-se reagente apenas as amostras de soro que apresentaram reconhecimento simultâneo das frações de 43 e 70kDa. As amostras foram avaliadas com 30, 180, 360, 720 e > 720 dias de tratamento. O cálculo da sensibilidade foi de 96 versus 88%; 94,4 versus 85,4%; 90 versus 91%; 87 versus 79% e 85 versus 73%,

respectivamente. Para o grupo de pacientes classificados como estando em cura aparente, a sensibilidade foi de 81 versus 72% (Passos, 2012).

Sabe-se que a sensibilidade e especificidade de um dado teste sorológico, esta intimamente relacionada à qualidade da preparação antigênica utilizada (Vicentini-Moreira, 2008).

Devido ao valor diagnóstico da glicoproteína de 43kDa de *P. brasiliensis*, Taborda e Camargo (1994) padronizaram o ensaio de Dot-blot avaliando o desempenho desta molécula em duas condições distintas, gp43 glicosilada e deglicosilada, frente a 50 amostras de soro de pacientes com PCM ativa, 64 amostras de soro de pacientes portadores de outras infecções fúngicas (16 amostras de pacientes com candidíase sistêmica, 16 soros de pacientes com Doença de Jorge Lobo, 16 soros de pacientes com aspergilose, 08 soros de pacientes com histoplasmose e 08 soros de pacientes com criptococose), sendo o grupo de soros controle negativo composto por 50 amostras de soro de indivíduos saudáveis. A análise dos resultados, frente a gp43 nativa, ou seja, não tratada com metaperiodato de sódio, revelou que a metodologia de Dot-blot apresentou 100% de sensibilidade e taxa de reatividade cruzada de 4.3% incluindo os soros de indivíduos com outras infecções e os soros de indivíduos saudáveis. Por outro lado, quando empregou-se gp43 deglicosilada observou-se 100% de sensibilidade e especificidade.

Contudo, a gp43 não é uma molécula totalmente específica, na medida em que sua fração glicídica contém epítomos capazes de serem reconhecidos por soros com outras patologias, principalmente soros contendo anticorpos anti-*H. capsulatum* (Puccia e Travassos, 1991a; Camargo et al. 1984; Mendes-Gianinni et al. 1984).

Correa et al. (2006) objetivando melhorar a eficácia da metodologia de Dot-blot avaliaram a aplicabilidade da proteína recombinante do gene p27 de *P. brasiliensis* subclonado. Cinquenta amostras de soro foram analisadas: 10 soros de sete pacientes com PCM, 10 com histoplasmose, 10 com aspergilose,

10 com tuberculose e 10 soros de indivíduos com ausência de reatividade para *P. brasiliensis* por imunodifusão dupla. Apesar da afirmativa dos autores de que o processo de obtenção antigênica é mais fácil, menos oneroso e útil, o estudo envolveu apenas sete soros de pacientes com a confirmação da doença, o que resulta em valores altos de sensibilidade e especificidade (100 e 98%, respectivamente).

Carvalho et al. (2008) comparou, por imunodifusão dupla e Dot-Blot, o desempenho de três isoformas recombinantes de gp43 expressas em *Pichia pastoris* (gp43rA, gp43rD e gp43rE), com a gp43 nativa para o imunodiagnóstico da paracoccidiodomicose. Os autores demonstraram que entre as 90 amostras de soro de pacientes com paracoccidiodomicose e reagentes para *P. brasiliensis* por imunodifusão frente a gp43 purificada, 100% reagiram com gp43rD e gp43rE e 98% com gp43rA. Do total de amostras, 78 foram avaliadas por Dot-blot revelando 100% de reatividade frente a todas as isoformas recombinantes. Os autores verificaram ainda que a especificidade por imunodifusão foi de 100%. Por outro lado, especificidade de 100% por Dot-blot só foi possível quando os autores trataram as preparações antigênicas com 10mM de metaperiodato de sódio ou diluíram os soros 1000 vezes. Os autores concluíram que gp43 recombinante expressa em *P. pastoris*, especialmente as isoformas D e E, podem ser utilizadas em substituição a gp43 nativa em ambas as metodologias diagnósticas.

Assunção (2012) também comparou por imunodifusão e Dot-blot o desempenho da gp43 recombinante (gp43 $\Delta$ Nt) clonada e expressa em *Escherichia coli* frente a gp43 nativa, verificando que a gp43 $\Delta$ Nt pode ser empregada para o imunodiagnóstico da paracoccidiodomicose, uma vez que apresentou correlação com resultados obtidos por imunodifusão dupla, além de ter apresentado resultados semelhantes àqueles obtidos com a gp43 nativa. Os autores relataram também a ausência de reatividade cruzada frente a soros de pacientes com ausência de reatividade para *P. brasiliensis*, uma vez que a gp43 $\Delta$ Nt não apresenta resíduos de carboidratos.

A comparação dos percentuais de sensibilidade entre os protocolos, ou seja, o desenvolvido por Taborda e Camargo (1994), aquele apresentado por Correa et al. (2006) e o aqui apresentado, demonstra que não houve diferença expressiva entre a capacidade discriminatória das três metodologias, visto que Taborda e Camargo (1994) e Correa et al. (2006) obtiveram 100% de sensibilidade e neste trabalho demonstrou-se 91% de sensibilidade frente às amostras de conveniência (grupo controle) e 95% frente às amostras da rotina.

Pode-se dizer, portanto, que o filtrado de cultura obtido a partir da amostra B-339 de *P. brasiliensis*, conferiu padrão de sensibilidade semelhante à metodologia de Dot-blot, quando comparado àquelas anteriormente padronizadas, empregando preparações antigênicas mais específicas e refinadas. Esse achado traz grandes vantagens para um Laboratório de Saúde Pública, visto que a obtenção de filtrado de cultura é significativamente menos dispendiosa e exige procedimentos menos complexos do que aqueles necessários para a obtenção de antígenos purificados e/ou antígenos recombinantes.

Além disso, a publicação recente de Teixeira et al. (2013) que formaliza a existência de nova espécie dentro do gênero *Paracoccidioides* spp chama a atenção para as implicações clínicas e biológicas decorrentes da nova espécie descoberta, reforçando que a glicoproteína de 43kDa não é produzida em grandes quantidades pelo novo agente da doença, ou seja, *Paracoccidioides lutzii* (Machado et al., 2013).

Neste sentido, a produção antigênica se traduz em uma importante implicação biológica como demonstrada por Teixeira et al. (2013) e Machado et al. (2013). Seguindo este raciocínio, pode-se afirmar que a utilização de um antígeno purificado, contendo somente a gp43 faria com que muitos pacientes, infectados pelo recém-descoberto *P. lutzii*, possivelmente não apresentassem reatividade, provocando a liberação de resultados falso-negativos, e conseqüentemente atrasando ou até mesmo impedindo o início do tratamento adequado.

Diante do exposto e no intuito de uma caracterização prévia das preparações antigênicas obtidas de *P. lutzii* bem como de outras espécies crípticas, testes preliminares foram realizados utilizando a técnica de Dot-blot para a avaliação do desempenho destes antígenos. Assim, membranas de nitrocelulose foram sensibilizadas com diferentes preparações antigênicas obtidas a partir das amostras crípticas de *P. brasiliensis*: Epm 83 (PS3), Pb 265 (S1), Pb 113 (S1), Pb B-339 (S1) e das amostras de *P. lutzii* Pb 01, Pb 8334 e Pb 66. Avaliou-se também, o desempenho do filtrado de cultura obtido a partir da cepa B-339 e fornecido aos Laboratórios Centrais de Saúde (LACENs) pela Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública do Ministério da Saúde (CGLAB-MS) e avaliadas frente a três amostras de soro, (uma amostra de paciente reagente para *P. brasiliensis* por ID, uma amostra de indivíduo sadio e uma amostra de soro policlonal de coelho, utilizada como controle positivo da reação). A reação de Dot-blot seguiu os mesmos padrões da técnica otimizada no estudo e, por ter avaliado os antígenos na mesma fita, pôde-se comparar o comportamento dos mesmos de forma igual e simultânea.

Todas as preparações antigênicas avaliadas reconheceram a amostra de soro de paciente com paracoccidioisomicose, porém, as amostras Epm 83, Pb 265, Pb01, 8334, Pb66 apresentaram padrão de reatividade de menor intensidade, apresentando coloração mais clara comparada às preparações antigênicas rotineiramente utilizadas no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses, ou seja, filtrados de cultura obtidos da cepa B-339 e amostra 113 de *P. brasiliensis*. Além disso, as mesmas amostras antigênicas não apresentaram reatividade frente ao anticorpo policlonal anti-exoantígeno de *P. brasiliensis*.

Apesar de preliminares, os resultados demonstram a importância e relevância de experimentos mais aprofundados e em diferentes reações sorológicas utilizando amostras antigênicas diferentes, avaliando-se também soros de pacientes não apenas das regiões onde este isolado circula, mas também de pacientes das regiões onde não existe relato da circulação destas novas espécies de *Paracoccidioides* (dados não mostrados).

Com relação às soluções utilizadas, a escolha das mesmas pautou-se na experiência de outros grupos de pesquisa que padronizaram esta metodologia para diferentes sistemas. As soluções de bloqueio e diluição das amostras foram recomendadas, principalmente visando a eliminação de *background*, evitando ou minimizando eventuais dificuldades na leitura e interpretação dos resultados, considerando não apenas os índices de sensibilidade e especificidade, mas também na qualidade da visualização da reação antígeno-anticorpo (Araujo, 1985; Wanduragala et al., 1987; Pappas et al., 1984b; Pappas et al., 1983b; Walton et al., 1986; Gouvea et al., 1987).

Em relação às amostras biológicas, sabe-se que a escolha da amostragem é de extrema importância para a condução dos trabalhos de otimização, padronização e validação das metodologias com finalidade diagnóstica, sejam elas diretas ou indiretas.

Diante do exposto, os ensaios de otimização e validação da metodologia de Dot-blot, foram realizados empregando-se 143 soros assim distribuídos: 77 amostras de soro de pacientes com paracoccidiodomicose confirmada, 23 amostras de soro de indivíduos, doadores de banco de sangue e residentes em regiões de alta e baixa endemicidade para PCM; 23 amostras de soro de pacientes com outras infecções fúngicas que não PCM (16 de histoplasmose e 08 de aspergilose) e 20 amostras de soro de pacientes com tuberculose comprovada.

Os cálculos dos parâmetros intrínsecos para a metodologia de Dot-blot, realizada frente as 143 amostras de soro de pacientes do grupo controle revelaram valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e acurácia de 91%; 95,4%; 96%; 90% e 93%, respectivamente, com prevalência de 54%.

Em contrapartida, a reação de imunodifusão dupla, considerada o "padrão ouro" sorológico pela maioria dos laboratórios de mico-sorologia apresentou

valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo e acurácia de 72,7%; 98,5%; 98,2%; 75,6% e 84,6%, respectivamente.

A análise estatística, através do teste de qui-quadrado, demonstrou que a técnica de Dot-blot foi significativamente mais sensível ( $p=0,000067$ , ou seja,  $p<0,05$ ) que a metodologia de imunodifusão dupla em gel de agarose, comprovando e reforçando a aplicabilidade dos métodos enzimáticos como métodos de triagem sorológica. Da mesma forma, confirmou a aplicabilidade da técnica de imunodifusão dupla em gel de agarose, como teste para fins diagnóstico, devido sua alta especificidade.

Por outro lado, por meio da comparação dos valores preditivos negativos, de ambas as metodologias, encontrou-se diferença significativa ( $p=0,000982$ , ou seja,  $p<0,05$ ) comprovando que a metodologia de Dot-Blot é suficientemente segura para o reconhecimento dos soros verdadeiramente não reagentes ou dos indivíduos não doentes.

Importante comentar que o simples fato de poder trabalhar com dois grupos de amostras, ou seja, amostras bem caracterizadas ou amostras de conveniência e um grupo que retrata a realidade cotidiana de um laboratório de Saúde Pública, torna por si só, o trabalho aqui realizado diferenciado dos demais.

Desta forma, tendo otimizado e validado a metodologia de Dot-blot, 300 amostras de soro de pacientes com suspeita clínica para a PCM foram avaliadas para análise da performance do ensaio. Por não termos acesso ao histórico ou prontuário destes pacientes, os cálculos intrínsecos feitos foram embasados nos resultados do ensaio de imunodifusão dupla em gel de agarose, técnica considerada padrão ouro sorológica.

Observou-se que a reação de Dot-blot demonstrou capacidade de detecção superior àquela obtida pela técnica de imunodifusão dupla. Empregando-se a metodologia recém-otimizada, foi possível detectar a

presença de anticorpos séricos circulantes em 40 soros a mais, sugerindo, portanto, que a nova técnica apresenta uma tendência de elevar o padrão de reatividade.

Os cálculos de co-positividade (equivalente à sensibilidade) e co-negatividade (equivalente à especificidade) IDxDB, reforçaram ainda mais o valor do ensaio de Dot-blot como teste de triagem para o diagnóstico da paracoccidiodomicose, uma vez que os valores encontrados foram de 95% e 77,2%, respectivamente com índice de concordância de  $\kappa=0,66$  classificado como bom.

A avaliação estatística pelo método do qui-quadrado comprovou que, em relação ao ensaio de imunodifusão dupla, a metodologia de Dot-blot é significativamente mais sensível ( $p=0,0000000$ , ou seja,  $p<0,005$ ), 95% contra 72,7%. Em relação à especificidade relativa, observou-se que o Dot-blot apresentou um valor significativamente ( $p<0,005$ ) menor ao encontrado na padronização da mesma, ou seja, 95,4% contra 77,2%.

Durante a avaliação do desempenho da metodologia de Dot-blot frente às amostras recebidas para a rotina sorológica, verificou-se que das 300 amostras avaliadas 250 (83,3%) obtiveram resultados concordantes em ambas as técnicas utilizadas e 50 (16,7%) apresentaram resultados discordantes.

Visando aprimorar ainda mais a metodologia ou mesmo comprovar se os resultados obtidos eram realmente verdadeiros, optou-se pela reavaliação das 50 amostras discordantes frente ambas as metodologias, ou seja, a técnica padrão ouro sorológico e a recém-padronizada. Das 50 amostras discordantes, 45 (90%) apresentaram reatividade frente ao filtrado de cultura da amostra B-339 pelo Dot-blot e ausência de reatividade frente à mesma preparação antigênica pela imunodifusão dupla; as cinco amostras restantes, apresentaram ausência de reatividade pelo Dot-blot e reatividade para *P. brasiliensis* por imunodifusão dupla.

De posse das novas avaliações, observou-se que os resultados concordantes aumentaram, desta forma, os cálculos dos parâmetros intrínsecos foram refeitos, e outros valores de co-positividade, co-negatividade e índice *Kappa* foram obtidos: 99%, 95,4% e 0,93, respectivamente e classificando, assim, a concordância entre as metodologias como ótima.

Desta vez, a especificidade relativa aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) de 77,2% para 95,4%, demonstrando que a técnica de Dot-blot, quando repetida, também é específica o suficiente para, de acordo com o interesse diagnóstico requerido, não liberar resultados falso-positivos. A co-positividade ou sensibilidade relativa também apresentou leve aumento, o que continua a demonstrar a alta sensibilidade da reação de DB.

Das 50 amostras reavaliadas, dez (10) ainda persistiram com discrepância nos resultados. Desta forma, estas foram reavaliadas pela metodologia de *immunoblotting* padronizada para utilização no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses por Passos (2012). A interpretação dos resultados revelou que apenas a amostra 03 confirmou o resultado obtido com aquele da imunodifusão. Em relação ao Dot-blot, a mesma amostra apresentou resultado não concordante.

Apesar de empregar-se a metodologia de *western blotting*, para confirmar os resultados obtidos entre imunodifusão dupla e Dot-blot, é importante salientar que o ensaio de Dot-blot apresenta importantes vantagens em relação ao *immunoblotting*, entre as quais pode-se citar: menor custo e fácil execução; utilizar menor quantidade de antígeno para a sensibilização da membrana; dispensar o emprego da metodologia de SDS-PAGE, visando a separação das frações antigênicas, bem como dispensa a transferência eletroforética para membranas de nitrocelulose; e não requer o emprego de equipamentos caros para sua realização (Noya e Alarcon de Noya, 1998).

A comparação da metodologia de Dot-blot com outros ensaios sorológicos foi exaustivamente realizada por outros autores e revista por Pappas (1988).

Neste artigo de revisão, o autor compara a metodologia frente a outras técnicas sorológicas como hemaglutinação indireta, imunofluorescência direta e indireta, ELISA, entre outros, frente a diferentes microorganismos (protozoários, metazoários, etc), assegurando que na grande maioria das vezes o Dot-blot apresenta equivalência entre os índices de sensibilidade e especificidade, enfatizando que em quaisquer cenários (laboratório ou a campo), o ensaio estudado não apresenta custos altos, os reagentes são mais resistentes (melhor conservados), não necessita de equipamentos que utilizam energia elétrica, que influenciam com grande impacto nos resultados da técnica, permitindo maior portabilidade em áreas com limitações de refrigeração (Walton et al., 1986; Pappas et al., 1983b).

Sato e cols. (1987) desenvolveram um Dot-ELISA comparativo visando o imunodiagnóstico da blastomicose, a partir da detecção de anticorpos espécie-específicos. Segundo os autores, apesar de consagradas, técnicas como a cultura e a fixação de complemento, apresentam baixos percentuais de sensibilidade: 25 e 62%, respectivamente. Das 21 amostras de soro de pacientes com blastomicose avaliadas, a metodologia de Dot-ELISA comparativa foi capaz de detectar a presença de anticorpos circulantes em 16 amostras, apresentando uma sensibilidade de 76,2%. Das 16 amostras reagentes, verificou-se que apenas duas (12,5%) reagiram cruzadamente frente a *H. capsulatum* e *C. immitis*. Os autores concluíram que o Dot-ELISA comparativo apresentou índices de sensibilidade e especificidade semelhante àquele do ELISA convencional. Além disso, o emprego de membrana de nitrocelulose como suporte sólido para a realização de ensaios imunoenzimáticos apresenta grande aplicabilidade, especialmente quando utilizados para triagem sorológica.

Mais recentemente, Cervantes-Landín et al. (2014) padronizaram a metodologia de Dot-ELISA visando a detecção de anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi*. Neste trabalho, os autores compararam o desempenho da metodologia padonizada frente a dois ensaios imunoenzimáticos: ELISA e *Western blot*. Foram avaliadas 320 amostras de soro, entre elas 96 amostras de pacientes

chagásicos, 153 amostras de indivíduos sadios e 71 amostras de pacientes com outras infecções. Verificou-se que o Dot-ELISA apresentou sensibilidade de 97% e especificidade de 89%. O índice de concordância entre as metodologias foi de 0,79; considerada boa. Em relação à reatividade cruzada, o maior índice foi observado frente a soros de pacientes infectados por *Leishmania* spp.

Martins et al. (1997) avaliaram a eficácia do tratamento antifúngico de 27 pacientes portadores de PCM empregando dois ensaios sorológicos distintos: Dot-blot e ELISA frente a uma mistura de filtrado de cultura e antígeno somático obtido das amostras Bt1, Bt2, 18, 113, 192 e 265. Os pacientes foram tratados com itraconazol numa posologia de 100-200mg/dia no primeiro mês e 100mg/dia por 8 meses, e o acompanhamento dos títulos de anticorpos séricos circulantes anti IgG, IgA e IgM anti-*P. brasiliensis* foi realizado até 42 meses após a introdução da terapia. As metodologias de Dot-blot e ELISA demonstraram que 81,5% e 84%, respectivamente, dos pacientes virgens de tratamento apresentavam títulos elevados de IgG anti-*P. brasiliensis* e que os mesmos decresceram levemente durante o tratamento, 61% após o primeiro ano e 50% após o terceiro ano. Por outro lado, as porcentagens de soros pré-tratamento com títulos elevados para IgA e IgM foram menores (51,9% e 51,8% para o Dot-blot e 16% e 36% para o ELISA, respectivamente); com o tratamento, entretanto, estes títulos tenderam a negativar.

No presente estudo, a sensibilidade inferior (91%) observada para o grupo de pacientes com paracoccidiodomicose (grupo controle positivo), quando comparada aos outros trabalhos encontrados (Tadorda e Camargo, 1994; Martins et al., 1997, Correa et al., 2006; Carvalho et al, 2008 e Assunção, 2012) pode ser explicada pelo fato de alguns destes pacientes estarem em cura clínica no momento da avaliação sorológica apresentando, portanto, baixo nível de anticorpo circulante que pode ter ocasionado um padrão de reatividade extremamente fraco e não reconhecido visualmente a olho nu ou apresentando nível indetectável de anticorpos circulantes.

Segundo Silva (2005) e Freitas (2005), a escolha da amostra fúngica é fundamental para a obtenção de antígenos com alta especificidade. No caso da preparação antigênica utilizada por Martins et al. (1997), apesar da mesma ser composta de um *pool* de isolados fúngicos, pode-se sugerir que a mesma não apresente quantidade ou concentração adequada da molécula de 43.000 daltons.

Esta mesma constatação pode ser aplicada para o imunodiagnóstico da paracoccidioomicose. Observou-se variabilidade no percentual de sensibilidade nos trabalhos que avaliaram o desempenho ou aplicabilidade da metodologia de Dot-blot para o imunodiagnóstico da referida micose. Taborda e Camargo (1994), Martins et al. (1997), Correa et al. (2006) e Carvalho et al (2008) obtiveram 100%, 96,2%, 81,5% e 100% de sensibilidade respectivamente. Já a sensibilidade do ensaio de Dot-blot obtida neste estudo foi de 95%. Certamente esta heterogeneidade observada relacionada a sensibilidade pode ser explicada pela diferença no protocolo metodológico especialmente relacionada a natureza do antígeno utilizado.

Apesar das inúmeras peculiaridades existentes nos trabalhos apresentados acima para o imunodiagnóstico ou para o acompanhamento sorológico dos pacientes com paracoccidioomicose, é unânime a conclusão dos autores de que a reação de Dot-blot é uma excelente ferramenta, principalmente para investigações soropidemiológicas, pois é extremamente adaptável em ambientes extra-laboratoriais permitindo a avaliação de alto número de amostras ao mesmo tempo usando menores quantidades de antígeno.

Outra importante avaliação feita no presente estudo, diz respeito a estabilidade das membranas de nitrocelulose sensibilizadas com o antígeno de *P. brasiliensis*. Um de nossos questionamentos era saber se a metodologia de Dot-blot poderia ser aplicada como teste para diagnóstico rápido da PCM. Desta forma, tão importante como ter uma metodologia com índices adequados de sensibilidade e especificidade é ter uma metodologia que possa ser desenvolvida assim que a amostra biológica chegue ao laboratório.

Apesar dos bons resultados obtidos com membranas não bloqueadas e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , os melhores resultados foram observados para membranas armazenadas à temperatura ambiente, por até 90 dias, sem bloqueio. Este achado abre perspectivas para que estas membranas possam ser enviadas a laboratórios situados em regiões distantes bem como que as mesmas possam ser utilizadas a campo.

Hawkes et al. (1982), já na descrição da metodologia de Dot-blot, testaram a estabilidade das membranas de nitrocelulose, observando que as mesmas podem ser estocadas secas por semanas sem bloqueio e meses bloqueadas sem que haja perda da atividade.

Autores como Pappas (1988) e Pinto et al. (1995) também realizaram a mesma análise e sugeriram que a membrana de nitrocelulose não perde sua funcionalidade por até 90 dias armazenada à  $8^{\circ}\text{C}$  e/ou  $-20^{\circ}\text{C}$ . Demonstrando sua aplicabilidade em trabalhos a campo, pois transportar membranas já sensibilizadas com o antígeno em experimentos à qualquer lugar, para que a reação ocorra sem necessitar de ambiente controlado e fechado é de grande importância em estudos soroepidemiológicos.

Além da comparação entre as técnicas imunoenzimáticas, Cervantes-Landín et al. (2014) também realizaram estudos de estabilidade do antígeno sensibilizado na membrana de nitrocelulose. Os resultados demonstraram que a membrana não perde a reatividade durante cinco (05) meses ao ser armazenada sensibilizada a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, observando que a diminuição da intensidade de cor da reação, em casos reagentes, só acontece após o sétimo mês que a membrana sensibilizada encontra-se armazenada. Os autores concluem que o Dot-blot é uma ótima ferramenta diagnóstica, principalmente em estudos a campo em zonas endêmicas, podendo ser empregada juntamente com outras técnicas, como o ELISA e o *Western blot* para confirmação da doença.

Outra importante aplicabilidade desta metodologia, diz respeito à possibilidade da avaliação semi-quantitativa das amostras sorológicas. Resultados do protocolo aqui otimizado demonstraram que amostras diluídas seriadamente na razão dois (2) apresentaram tanto por imudifusão quanto por Dot-blot os mesmos resultados em títulos, ou seja, amostras de soro avaliadas pela técnica padrão ouro sorológica apresentando títulos de 1:64, 1:32, 1:16, 1:4 e 1:1 foram avaliadas também por Dot-blot, resultando no mesmo título observado ou um (1) título a mais, porém com uma intensidade menor (dados não apresentados).

As missões desempenhadas por um Laboratório de Saúde Pública, vão muito além das respostas aos sistemas de vigilância epidemiológica ou sanitária ou ambiental. Entre estas missões destaca-se a oferta e realização de ensaios diagnósticos sensíveis, específicos e se possível de baixo custo para que se responda de forma rápida e eficiente a demanda do Sistema Único de Saúde.

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

Neste sentido a avaliação da repetitividade, reprodutibilidade ou reprodutibilidade intermediária é de extrema importância. Em relação à reprodutibilidade (reprodutibilidade intermediária) da técnica, os resultados se

apresentaram extremamente satisfatórios, pois as duplicatas mantiveram sua igualdade tanto no resultado em si (reagente, não reagente ou indeterminado) quanto na intensidade da coloração, corroborando com o trabalho de Pappas et al. (1983a) que ao verificar suas replicatas, obtiveram 10% de diferença apenas nos títulos de diluição das amostras de soro e não em seus resultados qualitativos.

O algoritmo sorológico para o diagnóstico da paracoccidiodomicose do Manual de Vigilância e Controle da Paracoccidiodomicose da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, recomenda que a triagem sorológica das amostras de soro de indivíduos com suspeita clínica de paracoccidiodomicose, seja realizada empregando-se o ensaio de ELISA indireto, utilizando como antígeno filtrado de cultura de *P. brasiliensis*. Orienta-se, ainda, que amostras de soro 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, descarta-se a suspeita clínica da doença. No caso de amostras reagentes na triagem sorológica, o manual recomenda a realização da técnica de imunodifusão dupla ou contra-imunoeletroforese, realizando avaliação qualitativa. Resultados concordantes têm suas amostras de soro diluídas, para a realização de avaliação semi-quantitativa por imunodifusão dupla ou contra-imunoeletroforese, visto que o maior valor/título do soro a reagir possibilita ao médico saber a gravidade da doença neste paciente e indicar o tratamento mais adequado. Resultados discordantes entre o teste de triagem sorológica, ou seja, ELISA indireto e o teste diagnóstico são submetidos a um terceiro ensaio confirmatório, no caso da PCM, o *immunoblotting*, fechando-se assim, o imunodiagnóstico da referida micose.

Sabe-se, entretanto, que a técnica de ELISA indireto, preconizada pela Secretaria de Estado da Saúde, ainda não é utilizada para triagem sorológica das amostras de soro dos pacientes com suspeita clínica de paracoccidiodomicose pela grande maioria dos laboratórios de mico-sorologia de São Paulo (Pinto et al., 2012). Soma-se a esta observação, o fato de não

existir, a exemplo das demais técnicas imunológicas, padronização da metodologia de ELISA indireto entre os diferentes laboratórios. A falta de homogeneidade e/ou padronização dos reagentes (antígenos, anticorpos policlonais anti-antígenos, etc) pode originar, portanto, resultados minimamente discrepantes e, muitas vezes errôneos.

Diante do exposto, corre paralelamente ao desenvolvimento deste estudo, um projeto que tem por objetivo principal otimizar a metodologia de ELISA indireto a partir de protocolos previamente descritos, otimizando-o para a realidade do Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses, especialmente, quanto à preparação antigênica utilizada.

Assim outra abordagem preliminar realizada neste estudo foi à comparação das metodologias de imunodifusão dupla em gel de agarose, Dot-blot e ELISA indireto. Para tanto, 156 amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de paracoccidiodomicose foram avaliados frente as três técnicas sorológicas, empregando como antígeno, filtrado de cultura da cepa B-339 de *P. brasiliensis*. A fim de estabelecer a existência ou não de diferença significativa entre o padrão de sensibilidade dos três ensaios sorológicos, aplicou-se o Teste Q ou Teste de Cochran, seguido do Teste de McNemar. A interpretação dos resultados demonstrou existir grande significância na sensibilidade entre os três métodos ( $p < 0,001$ ), boa diferença de sensibilidade entre os ensaios de imunodifusão e Dot-blot (ID x DB=28.8% vs 53.2%) e ELISA indireto (ID x ELISA=28.8% vs 53.8%),  $p < 0,02$ . Verificou-se, por outro lado, que a sensibilidade entre as metodologias de Dot-blot e ELISA indireto não diferiram entre si (Dot-blot x ELISA indireto=53,2% vs 53.8%).

Conclui-se, portanto, que o emprego da metodologia de Dot-blot apresenta-se extremamente promissora não apenas como técnica de triagem sorológica, visto sua alta sensibilidade, mas também como teste de diagnóstico rápido, visto que permitiu a liberação de resultados verdadeiramente negativos, por seu alto valor preditivo negativo, em tempo inferior quando comparado ao ensaio de imunodifusão dupla em gel de agarose, ou seja, um (1) *versus* sete

(7) dias, sendo, portanto, de grande valor diagnóstico, principalmente para o descarte da suspeita clínica para a micose em questão.

Ainda, a metodologia de Dot-blot apresenta a perspectiva de ser repassada a outros laboratórios que fazem parte da rede pública, que não possuem equipamentos como fotômetros, lavadores de placas, entre outros, ou mesmo ser usado a campo, com excelente tempo de prateleira/validade, ou seja, viabilizando o envio de membranas sensibilizadas com antígeno para laboratórios com menos recursos, sem alterações no padrão de reatividade e apresentando valores confiáveis de sensibilidade, especificidade, valores preditivos e acurácia e um ótimo índice de concordância com a metodologia padrão ouro sorológica, além de conferir bons sinais de adaptação e uso na rotina diagnóstica pela Saúde Pública do Estado.

Devido as inúmeras vantagens da metodologia este trabalho finaliza com proposta de ampla discussão sobre o atual algoritmo recomendado pelo Manual de Vigilância Epidemiológica da Paracoccidioidomicose, sugerindo a substituição da metodologia de ELISA indireto, preconizada atualmente na triagem das amostras de soro, para a metodologia aqui otimizada e validada, ou seja, Dot-blot, que se mostrou uma reação exequível, rápida, menos onerosa quando comparada ao ELISA tanto no que diz respeito ao gasto de reagentes e equipamentos, quanto no tempo para a realização da técnica e consequente liberação de resultados.

Finalmente, a análise comparativa das metodologias adotadas no presente estudo apenas reforça o que inúmeros pesquisadores vêm apontando há vários anos em termos de diagnóstico de doenças infecciosas: a adoção de um diagnóstico como padrão ouro (quando possível), associando metodologias que buscam maior sensibilidade, especificidade e sobretudo, que sejam factíveis à Rede de Saúde Pública.

## 7. CONCLUSÕES

- Devido sua alta sensibilidade, a metodologia de Dot-blot mostrou-se uma excelente ferramenta para o *screening* sorológico das amostras de soro de pacientes com suspeita clínica de paracoccidiodomicose e/ou com paracoccidiodomicose confirmada;
- O ensaio de Dot-blot apresentou especificidade inferior (95,4%) àquela calculada para a reação de imunodifusão dupla em gel de agarose (98,5%), comparando a aplicabilidade do ensaio de imunodifusão como teste para fins diagnóstico;
- A acurácia do ensaio de Dot-blot foi superior àquela calculada para a metodologia de imunodifusão dupla em gel de agarose, 93 *versus* 84,6%;
- A metodologia de Dot-blot apresentou baixa porcentagem de reatividade cruzada quando amostras de soro de pacientes com outras infecções pulmonares como histoplasmose, aspergilose e tuberculose foram avaliadas;
- O índice de concordância entre ambas as metodologias foi considerado bom ( $k= 0,66$ );
- A metodologia de Dot-blot apresentou-se extremamente promissora não apenas como técnica de triagem sorológica, visto sua alta sensibilidade, mas também como ensaio de diagnóstico rápido, visto que permitiu a liberação dos resultados verdadeiramente negativos, por seu alto valor preditivo negativo (90 *versus* 75,6%) e em tempo inferior quando comparado ao ensaio de imunodifusão dupla, ou seja, um (1) dia contra sete (7) dias, sendo, portanto, de grande valor diagnóstico, principalmente para o descarte da suspeita clínica da micose em questão;
- As membranas de nitrocelulose sensibilizadas com filtrado de cultura da cepa B-339 de *P. brasiliensis* armazenadas à temperatura ambiente, sem bloqueio prévio, por 90 dias, são estáveis, e;

- Os resultados obtidos nos permitem sugerir um novo algoritmo para o diagnóstico sorológico da PCM, substituindo a metodologia de ELISA indireto, proposta para a realização da triagem sorológica, pela metodologia de Dot-blot.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução – RE nº899, de 29 de maio de 2003. Determinação da publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. Diário Oficial da União, Brasília, 02 jun. 2003.

Albuquerque CF, Da Silva M, Camargo ZP. Improvement of the Specificity of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Paracoccidioidomycosis. J Clin Microbiol. 2005 abr; 43(4):1944-6.

Almeida FP. Estudos comparativos do granuloma coccidiótico nos Estados Unidos e no Brasil: novo gênero para o parasito brasileiro. An Fac Med S. Paulo. 1930; 5:125-41.

Araujo FG. A method for demonstration of antibodies to *Trypanosoma cruzi* by using antigen-coated nitrocellulose paper strips. Am. J Trop Med. Hyg. 1985; 34:242-5.

Assis CM. Estudo morfo-fisiológico de amostras de *Paracoccidioides*. São Paulo, 1997. 130p. [Tese de Doutorado-Universidade de São Paulo].

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

Assunção TRS. Desenvolvimento de método para diagnóstico da paracoccidioidomicose humana utilizando antígeno recombinante de *Paracoccidioides brasiliensis*. [Dissertação]. Londrina: Universidade Estadual de Londrina – Centro de Ciências Biológicas; 2012.

Barkha S, Kumar SD, Kumar SD. Immunochemical characterization of antigens of *Brucella canis* and their use in seroprevalence study of canine brucellosis. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 2011:857-61.

Barrozo LV, Benard G, Siqueira-Silva ME, Bagagli E, Marques SA, Mendes RP. First description of a cluster of acute/subacute paracoccidioidomycosis cases and its association with a climatic anomaly. PLoS Neglected tropical diseases. 2010 mar; 4(3):643.

Barrozo LV, Mendes RP, Marques SA, Benard G, Siqueira-Silva ME, Bagagli E. Climate and acute/subacute paracoccidioidomycosis in a hyper-endemic area in Brazil. International Journal of Epidemiology. 2009 mai; 38:1642-9.

Batista Jr. J, Camargo ZP, Fernandes GF, Vicentini AP, Fontes CJC, Hahn RC. Is the geographical origin of a *Paracoccidioides brasiliensis* isolate important to antigen production for regional diagnosis of paracoccidioidomycosis?. Mycoses. 2009; 53:176-80.

Bertoni TA, Perenha-Viana MCZ, Patussi EV, Cardoso RF, Svidzinski TIE. Western Blotting is an Efficient tool for differential diagnosis of Paracoccidioidomycosis and Pulmonary Tuberculosis. Clin Vaccine Immunol. 2012; 19(11):1887-8.

Bernardis F, Girmenia C, Boccanera M, Adriani D, Martino P, Cassone A. Use of monoclonal antibody in a Dot Immunobinding assay for detection of a circulating mannoprotein of *Candida* spp. In neutropenic patients with invasive candidiasis. J Clin Microbiol. 1993; 31(12):3142-6.

Beyer CF. A dot-immunobinding assay on nitrocellulose membrane for the determination of the immunoglobulin class of mouse monoclonal antibodies. J Immunol Methods. 1984; 67(1):79-87.

Biswas R, Parija SC, Narayan SK. Dot-ELISA for the diagnosis of neurocysticercosis. Rev Inst Med Trop S Paulo. 2004; 46(5):249-52.

Blanco RM, Takei K, Romero EC. Leptospiral glycolipoprotein as a candidate antigen for serodiagnosis of human leptospirosis. Lett Appl Microbiol. 2009; 49:267-73.

Blotta H, Mamoni RL, Oliveira SJ, Nouer SA, Papaiordanou PM, Gouveia A, Camargo ZP. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. Am Jour Trop Med. 1999, 3:390-4.

Blotta MHS e Camargo ZP. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis. J. Clin. Microbiol. 1993; 31(3):671-6.

Bojanich MV, Marino GL, López MA, Alonso JM. An evaluation of the Dot-ELISA procedure as a diagnostic test in an area with a high prevalence of human *Toxocara canis* infection. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012; 107(2):194-7.

Botteon FAG, Camargo ZP, Benard G, Coelho RF, Chamone DAF, Itano EN. *Paracoccidioides brasiliensis*-reactive antibodies in Brazilian blood donors. Med Mycol. 2002; 40(4):387-91.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye Binding. Analytical Biochemistry. 1976; 72:248-54.

Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Portaria nº 05, de 21 de fevereiro de 2006. Inclui doenças na relação nacional de notificação compulsória, define doenças de notificação imediata, relação dos resultados laboratoriais que devem ser notificados pelos Laboratórios de Referência Nacional ou Regional e normas para notificação de casos. 2006 fev. 22; Seção 1. p 34.

Brummer E, Castañeda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an Update. *Clinical Microbiology Reviews*. 1993; 6(2):89-117.

Calcagno AM, Nino-Vega G, San-Blas F, San-Blas G. Geographic discrimination of *Paracoccidioides brasiliensis* strains by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol*. 1998; 36(6):1733-6.

Calle D, Rosero DS, Orozco LC, Camargo D, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis in Colombia: an ecological study. *Epidemiol Infect*. 2001; 126(2):309-15.

Camargo ED, Nakamura PM, Vaz AJ. Standardization of Dot-ELISA for the serological diagnosis of toxocariasis and comparison of the assay with ELISA. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1992; 34:55-60.

Camargo ZP, Berzaghi R, Amaral CC, Silva SH. Simplified method for producing *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for use in immunodiffusion tests. *Med Mycol*. 2003; 41(6):539-42.

Camargo ZP e Franco MF. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev Iberoam Micol*. 2000; 17:41-8.

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; 32:2377-81.

Camargo ZP, Guedson JL, Drouhet E, Improvisi L. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*. 1984; 88:31-7.

Camargo ZP, Taborda CP, Rodrigues EG, Travassos LR. The use of cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests. *J Med Vet Mycol*. 1991; 1:31-8.

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

Camargo ZP, Unterkircher C, Campoy SP, Travassos LR. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. *J Clin Microbiol*. 1988; 26(10):2147-51.

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

Campos MC, Gesztesi JL, Vicentini AP, Lopes JD, Camargo ZP. Expression and isoforms of gp43 in different strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol*. 1995; 33(4):223-7.

Carrero LL, Nino-Vega G, Teixeira MM, Carvalho MJA, Soares CMA, Pereira M, Jesuino RSA, McEwen JG, Mendoza L, Taylor JW, Felipe MS, San-Blas G. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. *Fungal Genetics and Biology*. 2008; 45:605-12.

Carvalho KC, Vallejo MC, Camargo ZP, Puccia R. Use a recombinant gp43 isoforms expressed in *Pichia pastoris* for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *Clin Vac Immunol*. 2008;15(4): 622-9.

Cervantes-Landín AY, Martínez-Martínez I, Reyes PA, Shabib M, Espinoza-Gutiérrez B. Estandarización de la técnica Dot-ELISA para la detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* y su comparación con ELISA y Western blot. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014;32(6): 363-8.

Chamberlain AJ, Honigman AS, Terry JM, Scalarone GM. Antibody detection in coccidioidomycosis: enzyme immunoassays with mycelial and spherule phase antigens. Annual Meeting of the American Society for Microbiology (abstr.). 1985.

Coelho JS, Soares IS, Lemos EA, Jimenez MC, Kudó ME, Moraes SL, Ferreira AW, Sanchez MC. A multianalyte Dot-ELISA for simultaneous detection of malaria, Chagas disease, and syphilis-specific IgG antibodies. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007; 58(2):223-30.

Colombo AL, Tobón A, Restrepo A, Queiroz-Telles F, Nucci M. Epidemiology of a endemic systemic fungal infections in Latin America. *Medical Mycology*. 2011; Early on-line. DOI: 10.3109/13693786.2011.577821.

Correa MM, Bedoya AM, Guerrero MP, Méndez J, Restrepo A, McEwen JG. Diagnosis of paracoccidioidomycosis by a dot blot assay using a recombinant *Paracoccidioides brasiliensis* p27 protein. *Mycosis*. 2006; 50:41-7.

Coutinho ZF, Da Silva D, Lazéra M, Petri V, De Oliveira RM, Sabroza PC, Wanke B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saúde Pública*. 2002 set-out; 18(5):1441-54.

Del Negro GMB. General and clinical aspects: polar forms of Paracoccidioidomycosis, the disease in childhood. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo A, Del Negro G. Paracoccidioidomycosis. Flórida, USA: 1CRC Press Boca Raton; 1994.

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):373-7.

Dominguez HG. Vírus respiratório sincial bovino: padronização e comparação de técnicas sorológicas [Dissertação]. Campinas: Faculdade de Biologia-Universidade Estadual de Campinas; 2000.

Duxbury RE e Sadun EH. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1964; 13:525-9.

Eamsobhana P, Yoolek A, Punthuprapasa P, Suvouttho S. A dot-blot ELISA comparable to immunoblot for the specific diagnosis of human parastrongyliasis. *Journal of Helminthology.* 2004; 78:287-91.

El-Masry S, El-Kady I, Zaghloul MH, Al-Badrawey MK. Rapid and simple detection of a mycobacterium circulating antigen in serum of pulmonary tuberculosis patients by using a monoclonal antibody and Fast-Dot-ELISA. *Clin Biochem.* 2008; 41(3):145-51.

Engler HD e Shea YR. Effect of potential interference factors on performance of enzyme immunoassay and latex agglutination assay for cryptococcal antigen. *J Clin Microbiol.* 1994; 32: 2307-8.

Fava Netto C. Contribuição para o estudo imunológico da blastomicose de Lutz. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.* 1961; 21:99-194.

Fava Netto C. Estudos quantitativos sobre a fixação do complemento na blastomicose sul-americana, com antígeno polissacarídeo. *Arq Cir Clin.* 1955; 18:197-254.

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

Ferreira-da-Cruz MF, Francesconi-do-Vale AC, Espinera MC, Wanke B, Galvão-Castro B. Study of antibodies in paracoccidiodomycosis: follow-up of patients during and after treatment. *J Med Vet Mycol.* 1990; 28(2):151-7.

Ferri RG. Estudo imunológico de antígenos intracelulares. *Hospital.* 1961; 59:917-24.

Figuerola JI, Hamilton A, Allen M, Hay R. Immunohistochemical detection of a novel 22- to 25-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidiodoides brasiliensis* in biopsy material and partial characterization by using species-specific monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol.* 1994; 32:1566-74.

Franco M, Bagagli E, Scapolio S, Lacaz CS. A critical analysis of isolation of *Paracoccidiodoides brasiliensis* from soil. *Med Mycol.* 2000; 38(3):185-91.

Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques SA, Dillon NL, Mota NG. Paracoccidiodomycosis: a recently proposed classification of this clinical forms. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1987; 20(2):129-32.

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

Garcia NM, Del Negro GMB, Heins-Vaccari EM, Melo NT, Assis CM, Lacaz CS. *Paracoccidioides brasiliensis*, nova amostra isolada de fezes de um pinguim (*Pygoscelis adeliae*). Rev. Inst. Med. Trop. 1993; 35(3):227-35.

Gentilini M e Pinon JM. Interet de l'electrosynerese (ou sur immuno-electro-diffusion) membrane d'acetate de cellulose dans le diagnostic de l'hydatidose. Etude comparee avec les autres reactions de precipitations. Ann Med Intern. 1972;123:883-6.

Giannini SH. Introduction and detection of leishmanial infections in *Rattus norvegicus*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1985; 79:458-61.

Giannini SH. The specific anti-parasite immune responses of germ-free conventional rats infected with *Trypanosoma lewesi*. J Parasitol. 1987; 73: 144-8.

Gouvea VS, Castro L, Pereira HG. A combined dot nitrocelulose-enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus. Journal of Virological Methods. 1987; 18:57-65.

Hahn RC, Font's CJ, Batista RD, Hamdan JS. In vitro comparison os activities of terbinafine and itraconazole against *Paracoccidioides brasiliensis*. J Clin Microbiol. 2002; 40:2828-31.

Hahn RC, Morato Conceição YT, Santos NL, Ferreira JF, Hamdan JS. Disseminated paracoccidioidomycosis: correlation between clinical and in vitro resistance to ketoconazole and trimethoprim sulphamethoxazole. Mycoses. 2003; 46:342-7.

Hawkes R, Niday E, Gordon J. A Dot-Immunobinding assay for monoclonal and others antibodies. Analytical Biochemistry. 1982; 119:142-7.

Heberling RL e Kalter SS. Dot immunobinding assay of viral antigen and antibodies. Dev Biol Stand. 1986; 64:199-203.

Jacobs L e Lunde MN. A hemagglutination test for toxoplasmosis. J Parasitol. 1957; 43:308-14.

Kafatos FC, Jones CW, Efstradiadis A. Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure. Nucl Acids Res. 1979; 7:1541-52.

Kamikawa CM, Kohara VS, Passos AN, Vicentini AP. Retrospective seroepidemiologic analysis of patients with suspicion of paracoccidioidomycosis in the São Paulo State. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2012; 18(3):254-71.

Kamikawa CM. Distribuição da Paracoccidioidomicose no Estado de São Paulo pela Avaliação Sorológica das Amostras enviadas ao Instituto Adolfo Lutz. [Monografia]. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz – Secretaria de Estado da Saúde; 2011.

Kent JF e Fife EH. Precise standardization of reagents for complement fixation. *Am J Trop Med*. 1963; 12:103-16.

Kricka LJ, Carter TJN, Burt SM, Kennedy JH, Holder RL, Holliday MI, Telford ME, Wisdom GB. Variability in the adsorption properties of microtiter plates used as solid supports in enzyme immunoassay. *Clin Chem*. 1980; 26:741-4.

Kumar S, Band AH, Samantaray JC, Dang N, Talwar GP. A dot-enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Entamoeba histolytica*. *J Immunol Methods*. 1985; 83:125-133.

Lacaz CS, Passos Filho MCR, Fava Netto C, Macarron R. Contribuição para o estudo da Blastomicose-infecção: inquérito com paracoccidioidina. Estudo sorológico e clínico radiológico dos paracoccidioidinos-positivos. *Rev Inst Med Trop*. 1959; 1:245-59.

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

Lacaz CS, Porto E, Martins JEC. Tratado de micologia médica Lacaz. 9. ed. São Paulo: Sarvier; 2002.

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

Lacaz CS. Fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. In: Compêndio de micologia médica. 6.ed. São Paulo: Sarvier; 1977. p.229-71.

Lacaz CS. *Paracoccidioides brasiliensis*: Morphology; Evolutionary Cycle; Maintenance during Saprophytic Life; Biology, Virulence; Taxonom. In: Paracoccidioidomycosis, Franco MF, Lacaz CS, Restrepo A, Del Negro G. Paracoccidioidomycosis. 1994; CRC Press, Boca Raton, USA.

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

Landis JR e Koch GG. The Measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977; 33:159-74.

Londner MV, Rosen G, Sintov A, Splra DT. The feasibility of a dot enzyme-linked Immunosorbent assay (Dot-ELISA) for the diagnosis of *Plasmodium falciparum* antigens and antibodies. Am D Trop Med Hyg. 1987; 36:240-245.

Lopez RC e Restrepo A. Spontaneous regression of pulmonary paracoccidioidomycosis. Mycopathol. 1983; 83:187-9.

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

Machado GP, Moris DV, Arantes TD, Silva LRF, Theodoro RC, Mendes RP, Vicentini AP, Bagagli E. Cryptic species of *Paracoccidioides brasiliensis*: impact on paracoccidioidomycosis immunodiagnosis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013; 108(5):637-43.

Maluf MLF, Pereira SRC, Takahachi G, Svidzinski TIE. Prevalência da paracoccidioidomicose-infecção determinada através de teste sorológico em doadores de sangue na região noroeste do Paraná, Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2003; 36(1):11-6.

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

Martinez R e Moya MJ. Associação entre paracoccidioidomicose e alcoolismo. Rev Saúde Públ São Paulo. 1992; 26(1):12-6.

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

Martins R, Marques S, Alves M, Fecchio D, Franco MF. Serological follow-up of patients with paracoccidioidomycosis treated with itraconazole using Dot-Blot, ELISA and Western-Blot. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1997; 39(5):10.

Mathai A, Radhakrishnan VV, Sarada C, George SM. Detection of heat stable mycobacterial antigen in cerebrospinal fluid by Dot-Immunobinding assay. Neurology India. 2003; 51(1): 52-4.

Matthews R e Burnie. Diagnosis os systemic candidiasis by an enzyme-linked Dot immunobinding assay for a circulating immunodominant 47-kilodalton antigen. J Clin Microbiol. 1988; 26(3):459-63.

Mattos Grosso D, Almeida SR, Mariano M, Lopes JD. Characterization of gp70 and anti-gp70 monoclonal antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* pathogenesis. Infect Immun. 2003; 71(11):6534-42.

Matute DR, McEwen JG, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, Rauscher JT, Restrepo A, Morais F, Nino-Vega G, Taylor JW. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol.* 2006; 23:65-73.

McGowan KL, Largen MT, Buckley HR. Detection of antibodies of *P. brasiliensis* using an immunodot assay. Annual Meeting of the American Society of Microbiology (abstr.). 1985.

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

Mendes RP. Paracoccidioidomycosis surveillance and control. *J Venon Anim Toxins incl Trop Dis.* 2010; 16(2):194-7.

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

Mendes-Giannini MJ, Camargo ME, Lacaz CS, Ferreira AW. Immunoenzymatic absorption test for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol.* 1984; 20(1):103-8.

Mendes-Giannini MJ, Ricci LC, Uemura MA, Toscano E, Arns CW. Infection and apparent invasion of Vero cells by *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Med.Vet. Mycol.* 1994; 32(3):189-97.

Mendes-Giannini MJS e Melhem MC. Infecções fúngicas. In: Ferreira AW, Del Negro GMB. *Diagnóstico Laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imune*. 2.ed. São Paulo: Guanabara Koogan; 2001.

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

Molinari-Madlum EEWI, Felipe MSS, Soares CMA. Virulence of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates can be correlated to groups defined by random amplified polymorphic DNA analysis. *Med Mycol.* 1999; 37:269-76.

Montoya AE, Moreno MN, Restrepo A, McEwen JG. Electrophoretic karyotype of clinical isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Fungal Genet Biol.* 1997; 21:223-7.

Moses A. Fixação de complemento na blastomicose. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1916; 8:68-70.

Nascimento T, Martinez R, Lopes AR, Bernardes LAD, Barco CP, Goldman MHS, Taylor JW, McEwen JG, Nobrega MP, Nobrega FG, Goldman GH. Detection and selection of microsatellites in the genome of *Paracoccidioides*

*brasiliensis* as molecular markers for clinical and epidemiological studies. J Clin Microbiol. 2004; 42:5007-14.

Negrón R, Flores CI, Roble AM. Estudio de las reacciones serológicas cruzadas entre antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum*. Rev Asoc Arg Micro. 1975; 8:67-73.

Nino-Vega GA, Calcagno AM, San-Blas G, San-Blas F, Gooday GW, Gow NA. RFLP analysis reveals marked geographical isolation between strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. Med Mycol. 2000; 38:437-41.

Noya O e Alarcón de Noya B. The multiple antigen blot assay (MABA): a simple immunoenzymatic technique for simultaneous screening of multiple antigens. Immunol Lett. 1998; 63(1):53-6.

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

Ouchterlony O. Antigen–Antibody reactions in gels. Acta Path Microbiol Scand. 1949; 26(4):507-15.

Pappas MG, Hajkowisk R, Cannon LT, Hockmeyer WT. Dot-Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Dot-ELISA): Comparison with standard ELISA and Complement Fixation assays for the diagnosis of Human Visceral Leishmaniasis. Veterinary Parasitology. 1984a; 14:239-49.

Pappas MG, Hajkowisk R, Hockmeyer WT. Dot Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Dot-ELISA): a Micro Technique for the Rapid Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. J Immunol Methods. 1983b; 64:205-14.

Pappas MG, Hajkowski R, Hockmeyer WT. Standardization of the dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA) for human visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 1984b; 33:1105-11.

Pappas MG, Lunde MN, Hajkowski R, McMahon J. Determination of IgM and IgG antibodies to *Toxoplasma* using the IFA test, ELISA, and Dot-ELISA procedures. Vet. Parasitol. 1986; 20:31-42.

Pappas MG, McGreevy PB, Hajkowski R, Hendricks LD, Oster CN, Hockmeyer WT. Evaluation of promastigote and amastigote antigens in the indirect fluorescent antibody test for American cutaneous leishmaniasis. Am JTrop Med Hyg. 1983a; 32:1260-7.

Pappas MG. Recent applications of the Dot-ELISA in immunoparasitology. Veterinary Parasitology. 1988; 29:105-29.

Passos AN. Avaliação da aplicabilidade da técnica de imunoblotting 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.

Perenha-Viana MCZ, Gonzales IAA, Brockelt SR, Machado LNC, Svidzinski TIE. Serological diagnosis of paracoccidioidomycosis through a Western Blot technique. *Clin Vaccine Immunol.* 2012; 19(4):616-9.

Pinheiro AM, Costa MF, Paule B, Vale V, Ribeiro M, Nascimento I. Serologic immunoreactivity to *Neospora caninum* antigens in dogs determined by indirect immunofluorescence, western blotting and dot-ELISA. *Vet Parasitol.* 2005; 130:73-9.

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

Pinto PLS, Kanamura HY, Silva RM, Rossi CRN, Andrade Jr F, Neto VA. Dot-ELISA for the detection of IgM and IgG antibodies to *Schistosoma mansoni* worm and egg antigens, associated with egg excretion by patients. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 1995; 37(2):109-15.

Puccia R, Schenkman S, Gorin PA, Travassos LR. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. *Infect Immun.* 1986; 53(1):199-206.

Puccia R e Travassos LR. 43-kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis, or Jorge Lobo's disease. *J Clin Microbiol.* 1991a; 29(8):1610-5.

Puccia R e Travassos LR. The 43-kilodalton glycoprotein from the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* and its deglycosylated form: Excretion and susceptibility to proteolysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1991b; 21:298-302.

Reboli AC. Diagnosis of invasive Candidiasis by Dot Immunobinding assay for Candida antigen detection. *J Clin Microbiol.* 1993; 31(3):518-23.

Restrepo A, McEwen JG, Castaneda E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol.* 2001; 39(3):233-41.

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. *Infection and Immunity.* 1984; 46:346-53.

Restrepo A. The Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Sabouraudia.* 1985; 23(5):323-34.

Rokni MB, Samani A, Massoud J, Babei Nasr M. Evaluation of Dot-ELISA method using excretory-secretory antigens of *Fasciola hepatica* in laboratory diagnosis of human fasciolosis. Iranian J Parasitol. 2006; 1(1):26-30.

Roldán W, Cornejo W, Espinoza Y. Evaluation of the dot-enzyme linked immunosorbent assay in comparison with standard ELISA for the immunodiagnosis of human toxocariasis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006; 101:71-4.

Salazar ME, Restrepo A, Stevens DA. Inhibition by sterols of conidium to yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. Infect Immun. 1988; 56:711-3.

Salfeder K. Paracoccidioidomycosis. In: Salfeder K. Atlas en color: Micosis profundas en el Hombre. Mexico: Harla; 1979. 33-8.

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; 26:1-12.

Santo AH. Tendência da mortalidade relacionada à paracoccidioidomicose, Estado de São Paulo, Brasil, 1985 a 2005: estudo usando causas múltiplas de morte. Ver Panam Salud Publica. 2008; 23(5):313-24.

Santos PO. Padronização do teste de látex para detecção de anticorpos específicos anti-gp43 e antígeno gp43 pra diagnóstico rápido da paracoccidioidomicose [dissertação]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina; 2012.

Sato H, Honigman AS, Scalarone GM. Development of a comparative Dot-ELISA for the detection of antibodies in Blastomycosis. Diagn Microbiol Infect Dis. 1987; 7:37-43.

Shankar J, Restrepo A, Clemons KV, Stevens DA. Hormones and the resistance of women to paracoccidioidomycosis. Clin Microbiol Rev. 2011; 24(2):296-313.

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

Shukla N, Husain N, Agarwal GG, Husain M. Utility of *Cysticercus fasciolaris* antigen in Dot-ELISA for the diagnosis of neurocysticercosis. Indian J Med Sci. 2008; 62:222-7.

Silva DF, Assis CM, Zamboni IM, Barreto LC, Kohara VS, Vicentini-Moreira AP. Use of Immunoblotting assay improves the sensitivity of

paracoccidioidomycosis diagnosis. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis. 2008; 14(2):314.

Silva DF. Análise da estabilidade de exoantígenos de *Paracoccidioides brasiliensis* [Dissertação]. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde; 2005.

Silva MV, Nakamura PM, Camargo ED, Batista L, Vaz AJ, Brandão AP, Ferreira AW. Dot-ELISA IgM in saliva for the diagnosis of human leptospirosis using polyester fabric-resin as support. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1994; 36(5):475-8.

Silva-Vergara ML. Contribuição ao estudo epidemiológico da paracoccidioidomicose: Estudo em área de cultura de café [tese]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 1996.

Silveira-Gomes F e Marques da Silva SH. Effect of sérum sample inactivation on the performance of latex test for paracoccidioidomycosis serodiagnosis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012; 107(4):510-2.

Silveira-Gomes F e Marques da Silva SH. Evaluation of a latex agglutination test using particles coated with crude exoantigen of *Paracoccidioides brasiliensis* in the serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. Rev Pan-Amaz Saúde. 2011; 2(1):99.

Soares EE, Madlun CM, Silva SP, Pereira M, Felipe MS. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by random amplified polymorphic DNA analysis. J. Clin. Microbiol. 1995; 33:505-7.

Stambuk BU, Puccia R, De Almeida ML, Travassos LR, Schenkman S. Secretion of the 43kDa glycoprotein antigen by *Paracoccidioides brasiliensis*. J Med Vet Mycol. 1988; 26(6):367-73.

Stott DI. Immunoblotting and dot blotting. Journal of Immunological Methods. 1989; 119:153-187.

Straus AH, Freymuller E, Travassos LR, Takahashi HK. Immunochemical and subcellular localization of the 43kDa glycoprotein antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* with monoclonal antibodies. J Med Vet Mycol. 1996; 34:181-6.

Sumi MG, Mathai A, Sarada C, Radhakrishnan VV. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by a Dot Immunobinding assay to detect mycobacterial antigen in cerebrospinal fluid specimens. J Clin Microbiol. 1999; 37(12):3925-7.

Taborda CP e Camargo ZP. Diagnosis of Paracoccidioidomycosis by Dot Immunobinding Assay for Antibody Detection Using the Purified and Specific Antigen gp43. J Clin Microbiol. 1994; 32(2):554-6.

Teixeira MM, Theodoro RC, Carvalho MJA, Fernandes L, Paes H, Hahn RC, Mendoza L, Bagagli E, San-Blas G, Felipe MSS. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol.* 2009; 52:273-83.

Teixeira MM, Theodoro RC, Oliveira FFM, Machado GC, Hahn RC, Bagagli E, San-Blas G, Felipe MSS. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. *Medical Mycology Early OnLine.* 2013; 10p.

Tenter AM. Comparison of Dot-ELISA, ELISA and IFAT for the detection of IgG antibodies to *Sarcocystis muris* experimentally infected and immunized mice. *Vet Parasitol.* 1988; 29: 89-104.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979, 76(9): 4350-4.

Untereiner WA, Scott JA, Naveau FA, Sigler L, Bachewich J. The Ajellomycetaceae, a new family of vertebrate-associated Onygenales. *Mycologia.* 2004; 96(4):812-21.

Unterkircher CS. Antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis* e sua aplicação no diagnóstico sorológico da paracoccidioidomicose. [Tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 1989.

Vicentini AP. Caracterização da glicoproteína de 43kDa de *Paracoccidioides brasiliensis* como proteína ligante de laminina e seu papel na patogenicidade fúngica. [tese]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina; 1997.

Vicentini AP, Gesztes J, Franco MF, De Souza W, De Moraes JZ, Travassos LR, Lopes JD. Binding of *P. brasiliensis* to laminin through surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. *Infect Immun.* 1994; 62(4):1465-9.

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

Vieira GD, Alves TC, Lima SMD, Camargo LMA, Sousa CM. Paracoccidioidomycosis in a western Brazilian Amazon state: clinical-epidemiologic profile and spatial distribution of the disease. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014; 47(1):63-8.

Voller A, Bartlett A e Bidwell DE. Enzyme immunoassays for parasitic diseases. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1976; 70:98-106.

Walton BC, Pappas MG, Sierra M Jr, Hajkowski R, Jackson PR, Custodio R. Field use of the Dot-ELISA test for human visceral leishmaniasis in Honduras. *Bull Pan Am Health Org.* 1986; 20:147-56.

Wanduragala L, Kakoma I, Clabaugh GW, Abeygunawardena I, Levy MG, Ristic M. Development of dot-enzyme immunoassay for diagnosis of canine babesiosis. *Am J Trop Med Hyg.* 1987; 36:20-1.

Wanke B e Aidê MA. Paracoccidioidomycosis. *J Bras Pneumol.* 2009; 35(12):1245-9.

Whelen AC, Richardson LK, Wikel SK. Dot-ELISA assessment of guinea pig antibody responses to repeated *Dermacentor andersoni* infestations. *J Parasitol.* 1986; 72:155-62.

Yeo SF e Wong B. Current status os nonculture methods for diagnosis of invasive fungal infections. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(3):465-84.

Zimmerman GL, Nelson MJ, Clark CRB. Diagnosis of ovine fasciolosis by dot enzyme-linked immunosorbent assay: A rapid microdiagnostic technique. *Am J Vet Res.* 1985; 46:1513-5.

## ANEXO 1

INSTITUTO ADOLFO LUTZ/SES



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Padronização da metodologia de dot-blot para diagnóstico rápido 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:** 1

**CAAE:** 13673313.1.0000.0059

**Instituição Proponente:** Instituto Adolfo Lutz

**Patrocinador Principal:** Instituto Adolfo Lutz

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 229.815

**Data da Relatoria:** 21/03/2013

#### Apresentação do Projeto:

A otimização, padronização e avaliação da performance da metodologia de Dot-blot, empregando antígeno bruto, para a pesquisa de anticorpos anti-*P. brasiliensis* será realizada avaliando-se um total de 417 amostras de soro, divididas em: soros de indivíduos hígidos (aparentemente saudáveis, soros de indivíduos com paracoccidiodomicose confirmada, soros de indivíduos com suspeita clínica de PCM porém não reagentes para *P.*

*brasiliensis* pelo ensaio de imunodifusão dupla, soros de indivíduos portadores de outras micoses e soros de indivíduos com suspeita clínica de PCM. Durante o desenvolvimento do projeto, as seguintes etapas serão desenvolvidas: a) avaliar o desempenho da metodologia de Dot-blot como teste de triagem sorológica para paracoccidiodomicose; b) avaliar o desempenho da metodologia de Dot-blot como teste rápido comparado ao ensaio de imunodifusão dupla em gel de agarose considerado "padrão ouro" sorológico e c) avaliar a estabilidade das membranas dotadas.

#### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário

Padronizar a técnica de Dot-blot, empregando antígeno bruto, para a pesquisa de anticorpos anti-*P. brasiliensis* em amostras de soros de pacientes

com suspeita clínica para a doença enviadas ao Instituto Adolfo Lutz (IAL).

**Objetivos Secundários**

Avaliar o desempenho da metodologia de Dot-blot como teste de triagem sorológica para paracoccidiodomicose.

Avaliar o desempenho da metodologia de Dot-blot como teste rápido comparado ao ensaio de imunodifusão dupla em gel de agarose considerado padrão ouro sorológico.

Avaliar a estabilidade das membranas dotadas.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Risco mínimo aos sujeitos que originaram o material biológico pois as amostras são remanescentes de pesquisa anterior já aprovada pelo Cepial, e armazenadas na instituição, segundo declaração da pesquisadora responsável.

Quanto aos benefícios, trata-se de um ensaio rápido para a triagem das amostras; neste sentido, nos casos de soro com ausência de reatividade para PCM, a liberação do resultado será no máximo após 24 horas da realização do exame; hoje a liberação do laudo de um paciente com ausência de anticorpos leva 7 dias, isto caso não seja necessário a repetição do ensaio.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa está em consonância com a missão do IAL e é de grande interesse em Saúde Pública.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

1)Folha de Rosto

De acordo com a Resolução CNS 196/1996, com a observação para a área temática indicada - "3".

2)TCLE

A solicitação de dispensa do TCLE foi devidamente justificada frente ao fato de que as amostras são oriundas de outro projeto de pesquisa, o qual atendeu a todos os trâmites legais e, ainda, estas amostras estão devidamente armazenadas no IAL, segundo declaração da pesquisadora responsável.

3)Aprovação quanto ao mérito científico do Conselho Técnico Científico do IAL e corroborada pela Diretoria Geral da instituição.

**Recomendações:**

1)Quanto a área temática

A área temática "3" refere-se a estudos clínicos. Pelas características, este protocolo de pesquisa não se enquadraria na área temática "3".

2) Quanto ao risco ao sujeito

No projeto submetido na Plataforma Brasil, no item "Riscos" é afirmado que "o risco é mínimo

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

principalmente se a coleta de sangue for realizada por um profissional devidamente capacitado"; não se trata de nova coleta e, sim de amostras já armazenadas e depositadas no IAL.

Quanto a referência ao seguimento das normas de biossegurança, este não é pertinente à revisão ética, e sim visto como informação adicional.

3) Quanto a metodologia

A Metodologia poderia ser mais explícita, descrevendo o tipo de estudo, nº de amostras biológicas, origem das amostras e que o critério de armazenamento segue as determinações da Portaria DG/IAL 16 de 22/12/2010, e não restringir-se aos testes com os isolados; no entanto, tornou-se compreensível ao final da leitura do projeto submetido na Plataforma Brasil.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Aprovado à luz da Resolução CNS 196/1996.

**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 pessoal técnico participante do projeto; f) justificar, perante o CEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Os relatórios parciais deverão ser encaminhados ao CEP/IAL a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

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

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3088-2859

Fax: (11)3085-3505

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

SAO PAULO, 26 de Março de 2013

---

Assinador por:  
Luz Marina Trujillo  
(Coordenador)