



SOROLOGIA DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE

SEROLOGY OF PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS

SEROLOGÍA DE LA PARACOCCIDIOIDOMICOSIS

**Aline Lyra Pereira¹, Fernanda Gobbi Amorim^{2*}, Ronaldo Bragança Martins
Júnior³**

¹Mestre, Universidade Federal do Espírito Santo

²Doutoranda, Universidade de São Paulo

³Mestre, Universidade Federal do Espírito Santo

*autor para correspondência: fernandagamorim@gmail.com

Recebido em 07/07/2012, Aceito em 15/08/2012.

Resumo: Recentemente, a paracoccidiomicose (PCM) foi listada entre as doenças infecciosas negligenciadas na América Latina. Sabe-se que sua patogênese ainda não está totalmente esclarecida, mas se acredita que a interação entre o fungo e a resposta imunológica do hospedeiro influenciam diretamente no curso da infecção. Paralelo a isso, os testes sorológicos têm um papel crucial no diagnóstico e acompanhamento da doença e é imprescindível que esses testes sejam cada vez mais sensíveis, acessíveis e reprodutíveis, e que possam estar disponíveis na rede de Saúde, para que se consiga diminuir os indicadores dessa doença no Brasil.

Palavras chaves: micose, paracoccidioidomicose, testes sorológicos.

Abstract: Recently, paracoccidiomicose (PCM) was listed among the neglected infectious diseases in Latin America. It is known that his pathogenesis is not yet fully understood, but it is believed that the interaction between the fungus and the host immune response influence directly the course of infection. Parallel to this, serological tests play a crucial

role in the diagnosis and monitoring of disease and is indispensable that these tests are more sensitive, reproducible and accessible, and that may be available on the network of Health, for one to reduce the indicators dessa disease in Brazil

Keywords: mycosis paracoccidioidomycosis, serological tests.

Resumen: Recientemente, la paracoccidiomicose (PCM) fue incluida entre las enfermedades infecciosas desatendidas en América Latina. Se sabe que su patogénesis aun no es entendida completamente, pero se cree que la interacción entre el hongo y la respuesta inmune del huésped influyen directamente en el curso de la infección. Adicionalmente, las pruebas serológicas desempeñan un papel crucial en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad, por tanto, es esencial que estas pruebas sean más sensibles, reproducibles y accesibles, y que puedan estar disponibles en la red de Salud, para reducir los indicadores de esta enfermedad en Brasil.

Palabras clave: micosis, paracoccidioidomycosis, pruebas serológicas.

Introdução

A paracoccidioidomycose (PCM), também conhecida como doença de Lutz, blastomicose sul-americana, blastomicose brasileira, moléstia de Lutz-Splendore-Almeida e micose de Lutz, foi descrita pela primeira vez em 1908, por Adolfo Lutz(1).

A PCM é uma micose sistêmica causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) que, na temperatura ambiente (25°C), cresce na forma de filamentos septados que dão origem ao micélio, forma encontrada no solo como saprofítica permanente(1-2). Esse dimorfismo tem grande importância no diagnóstico laboratorial através da cultura, em que se pode observar crescimento nas temperaturas de 25°C e de 37°C(1-3-4). Essa habilidade pode ser considerada um fator de virulência, uma vez que o fungo consegue sobreviver à situações inóspitas no ambiente, como mudanças súbitas de temperaturas e se mantendo hábil a invadir o hospedeiro(2). Uma vez inalados, em

contato com o tecido do hospedeiro a temperatura de 35°C, os conídios dão origem à forma leveduriforme do fungo, considerada sua forma infectante.

A PCM é uma micose considerada endêmica, característica da América Latina e tem sido considerada um problema de saúde pública de muitos países da região, uma vez que é a micose sistêmica de maior prevalência(1-3). O Brasil é considerado o de maior endemicidade (cerca de 80% dos casos)(5-6). Uma vez que a doença não é de notificação compulsória, não se tem dados precisos sobre a real incidência da micose no país, porém, dados baseados em inquéritos epidemiológicos e série de casos indicam que os estados de maior incidência são Rio de Janeiro, Minas Gerais e principalmente, São Paulo, embora a doença seja distribuída por quase todo o território brasileiro(3-7).

A infecção é, principalmente, adquirida nas duas primeiras décadas de vida, com evolução da doença mais comumente

encontrada em adultos com faixa etária de 30 a 50 anos, frequentemente associada à reativação do foco endógeno, adquirido nos primeiros anos de vida e, na maioria das vezes, assintomático(1-3). Os homens são mais acometidos pelo *P. brasiliensis* que as mulheres(1-3-7). Dados sugerem que a proporção de adultos infectados é de 78 homens para 1 mulher, embora outros dados indiquem 10-15:1(8-9). Segundo o consenso de paracoccidiodomicose de 2006, a PCM é classificada em forma aguda/subaguda (tipo juvenil) ou forma crônica (tipo adulto)(3-5-9).

Aspectos Imunológicos e Patológicos

A patofisiologia da PCM está longe de ser completamente esclarecida(8). Assim como em outras infecções fúngicas, a paracoccidiodomicose depende da interação entre o fungo e a resposta imunológica do hospedeiro para evoluir para cura espontânea ou disseminar pelo o organismo, causando lesões granulomatosas crônicas(1-10-11). Essa interação tem sido alvo de pesquisas que tentam esclarecer o que torna um indivíduo suscetível ao *P. brasiliensis*, ou mesmo o que leva a reativação de um foco endógeno, tantos anos após a infecção(12).

Sabe-se que o controle da infecção se dá pela resposta imune adaptativa do tipo Th1, com envolvimento células T CD₄⁺/CD₈⁺ e principalmente de macrófagos, com produção de citocinas, que tem sido estudada, a fim de auxiliar no entendimento da patogênese da doença(12). É aceito que os macrófagos desempenhem um papel central na resistência da PCM, participando do mecanismo inicial da infecção. Estudos microscópicos mostraram

que o *P. brasiliensis* é capaz de se reproduzir dentro de macrófagos, embora já se tenha sido relatado que macrófagos ativado por linfócitos têm a capacidade de ingerir e matar o fungo. Apesar de não se entender totalmente, sabe-se que o estudo da interação entre a superfície do fungo e a dos macrófagos é essencial para esclarecer como o fungo invade a célula e escapa dos mecanismos de defesa dessas células(8). A melanina já foi descrita também como fator de virulência, uma vez que consegue aumentar à resistência do fungo a fagocitose pelos macrófagos(13). Essa organização da resposta celular, chamada de granuloma, permite o controle da replicação do fungo, controlando a doença. Porém, é possível que o fungo permaneça quiescente no interior desses granulomas(12).

Citocinas X Th₁/Th₂

Modelos experimentais demonstram que a presença de interferon gama (INF γ) e interleucina dois (IL-2) está relacionada com proteção da doença(14). Essa afirmação está de acordo com achados que estabelecem o padrão de resposta Th₁ com o controle da doença, levando a um quadro assintomático ou leve da doença(1-10-12). Isso significa que aqueles pacientes que apresentarem uma resposta imune Th₁ sem alteração, serão capazes de controlar a instalação da PCM(1-12).

Por outro lado, observa-se que, quando a resposta imune do indivíduo está polarizada para o padrão Th₂, com altos níveis de IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- β , há uma progressão da paracoccidiodomicose(1-12-15).

Recentemente, quimiocinas e citocinas têm sido avaliadas através da análise do RNA mensageiro (RNAm) de pacientes com infecção por PCM, comparados aos de pacientes com a forma aguda e crônica da doença. Em pacientes com infecção aguda/subaguda se observa uma regulação negativa (“down regulation”) da citocinas Th1 e uma polarização Th2. Nos pacientes que apresentavam a forma crônica, havia um misto de células e citocinas Th₁ e Th₂(12-15).

Em estudo feito com células mononucleares de pacientes tratados para PCM, observou-se que o nível de INF γ nos indivíduos com a forma aguda da doença era baixo, e havia o predomínio de citocinas Th₂ e também, um aumento do nível de anticorpos, não protetores anti-Pb. O nível desses anticorpos diminui à medida que se institui a terapia e o sistema imune se reorganiza. Estudos em modelos animais comprovam que o INF γ desempenha um papel crucial na resistência ao *P. brasiliensis* e, juntamente com os macrófagos, tem um efeito fungicida(12).

Em outro estudo, adjuvantes de respostas Th₁ e Th₂ foram utilizados em camundongos BALB-c infectados com *P. brasiliensis*. Foi observado que aqueles animais estimulados com adjuvantes Th₁ apresentaram granulomas compactos no pulmão, enquanto o outro grupo apresentava granulomas epiteliais, com linfócitos/monócitos e muitas leveduras viáveis e não viáveis na lesão, bem como altos níveis de IL-4, IL-5, IL-10, TNF- α e TGF- β e duas vezes mais antígenos circulantes(10).

Altos níveis de Il-18, uma citocina proinflamatória da superfamília da IL-1, foram associados a pacientes com a forma juvenil da

doença, quando comparados aos indivíduos com a forma crônica e com grupo controle. Il-18, juntamente com o TNF pode ser útil como marcador da atividade e severidade da PCM e também um importante modulador da resposta adaptativa do hospedeiro(16). O mesmo tem sido observado com as chamadas células T reguladoras (Treg). Altos níveis dessa célula têm sido observados em indivíduos com PCM (forma juvenil ou crônica), quando comparado a indivíduos saudáveis, embora a contagem das Treg diminua após o tratamento com antifúngicos(17).

Devido ao importante papel que a resposta imune do hospedeiro tem frente a infecção da PCM, pesquisadores tem tentado esclarecer como essa interação entre fungo/hospedeiro se dá, para no futuro promover tratamentos que utilizem adjuvantes imunológicos, com capacidade de estimular a resposta Th₁, chamado “terapia imunoestimulatória”(1-10).

Componentes Antigênicos do fungo (gp43 e gp70 e outros)

O principal componente antigênico do *P. brasiliensis* é a glicoproteína extracelular de peso molecular de 43 kDa (gp43), considerado o principal fator de virulência do fungo, é também o principal antígeno para diagnóstico sorológico da PCM(4-11). Por ser o principal exoantígeno secretado pelo fungo, esse componente foi encontrado no soro de 100% dos pacientes com PCM, testados com imunoblot(4-18-19). Há hipóteses de que uma de suas funções seja a de uma laminina que adere a levedura à membrana da célula hospedeira, o que, acredita-se, ser responsável pela entrada do fungo na célula

humana na infecção primária (4-11). Outras ações como inibição da fagocitose, do óxido nítrico (NO) e do H₂O₂ produzido pelos macrófagos, tem sido relatadas(11).

A gp43 é o principal antígeno para o diagnóstico imunológico, pois se considera que os anticorpos da maioria dos pacientes diagnosticados com PCM são dirigidos contra esse componente espécie-específico do *P. brasiliensis*(19). Ele é secretado pelas leveduras na fase de infecção(20). Diferentes isoformas do gp43 tem sido relatadas, com variação entre distintos isolados do fungo(19-21).

A gp70 é também uma importante glicoproteína do *P. brasiliensis*, apresenta apenas uma isoforma, e é encontrada principalmente dentro da célula fúngica. Acredita-se que a gp70 não é espécie-específica, uma vez que pacientes infectados com *Histoplasma capsulatum* são reativos à gp70, mas não à gp43(8). Estudos comprovam que 96% dos pacientes com PCM tem anticorpos anti-gp70(8-19). Um relato de caso apresentou um paciente de 34 anos, com sorodiagnóstico negativo (IDD e CIE), que, apesar de não ter anticorpos anti-gp43, possuía anti-gp70. Foi recentemente sugerido que essa gp70 facilita a estabilização e progressão da doença em modelos experimentais de infecção primária(19). Esse antígeno pode ser detectado na urina de pacientes em fase aguda da doença(22).

Além das gp43 e gp70, outras proteínas, glicoproteínas e glicosíngolipídios (GSL) presentes no *P. brasiliensis* são antigênicos em humanos, e sua frequência está relacionada a espécie, estágio de diferenciação e desenvolvimento do fungo. Foi comprovado em modelos experimentais que

esses dois antígenos são capazes de induzir a proliferação de linfócitos de pacientes com PCM(8).

A tentativa é de se identificar possíveis novos alvos de marcadores da doença. Um estudo mostrou que, dentre os dois GSL (Pb-1 e Pb-2), soros de pacientes com PCM reagiram fortemente ao Pb-1, molécula que compõe 90-95% dos GSL da levedura de Pb, enquanto Pb-2 compõe apenas 5-10% e não é considerado imunogênico(18).

Produção de Anticorpos

Resposta Th₂ com grande ativação de linfócitos B, associada a altos níveis de anticorpos (Ac) está associada com um mau prognóstico da PCM. Isso porque, além de indicar uma polarização na resposta imune que prejudica o controle da doença, estes Ac não são protetores, isto é, não tem ação neutralizante sob o *P. brasiliensis*(3-23).

Um estudo feito por Unterkircher(23) com pacientes com a forma juvenil e a forma crônica da doença, mostrou que os níveis de anticorpos do tipo IgG, particularmente o isotipo IgG1, foi consideravelmente maior nesses pacientes, quando comparados indivíduos saudáveis. Os mesmos autores afirmaram também que esses níveis de anticorpos variam de acordo com a forma clínica e talvez com a severidade da doença: na forma crônica, foram relatados títulos de anticorpos específicos mais altos que Ac naturais, dentre estes, o tipo IgG4 foi encontrado também nesses pacientes, o que indica exposição prolongada ao antígeno. Neves(24) demonstrou diferenças no perfil dos isotipos de anticorpos de pacientes com formas clínicas variadas. Pacientes com forma

adultas unifocais (pulmonar) apresentavam predominância de IgG2, enquanto indivíduos com a forma juvenil exibiam perfil de IgG4, além de IgG2 e na forma adulta multifocal a IgG1. Isso mostra que a forma clínica está diretamente ligada ao perfil de resposta humoral. Uma das hipóteses do trabalho é que o IgG2 é anticorpo dirigido contra epítopos de carboidratos, uma vez que, quando esses são tratados com metaperiodato de sódio (substância que se liga a esses epítopos), há uma queda na avididade desses anticorpos que se reflete numa diminuição da absorvância no teste do ELISA.

Uma ferramenta que pode ser utilizada para diferenciar essas duas formas clínicas através do estudo de Ac é realizar teste de avididade, como é feito em outras doenças, como a toxoplasmose e dengue. Embora não se tenha um protocolo ainda definido, Yoshida(25) tem publicado trabalhos nesse campo da pesquisa e conseguiu identificar Ac de moderada-alta avididade nos soros de pacientes que apresentavam a forma crônica da doença, enquanto nos soros da forma aguda, predominava os Ac de baixa avididade.

Analisando esses Ac na pós terapêutica, observou-se que o aumento dos níveis de Ac com alta avididade foi encontrado em pacientes que tinham a forma crônica multifocal, o que não foi demonstrado naqueles indivíduos que apresentavam a forma aguda ou crônica unifocal, talvez devido ao pequeno período de duração da doença, ou mesmo por uma limitação no número de amostras do estudo. A associação do aumento de Ac de alta avididade e a resposta clínica favorável ao tratamento da forma crônica pode ser uma ferramenta útil para os médicos(25).

Diagnóstico Laboratorial

Padrão-Ouro

O diagnóstico considerado por muitos autores padrão-ouro para a PCM é o encontro de células fúngicas sugestivas de *Paracoccidioides brasiliensis* no Exame Microscópico Direto (EMD) de escarro ou outro espécime clínico (raspado de lesão, aspirado de linfonodos) ou fragmento de biópsia(1-3-5-9). A cultura em agar Sabouraud também é recomendada, porém, o crescimento do fungo é lento e pode levar até um mês para ser observado(1-5).

Sorologia

Nos anos 50, Fava Neto foi o primeiro a padronizar o teste de fixação de complemento em tubo de precipitação para diagnóstico e acompanhamento de pacientes com PCM. Depois, Restrepo introduziu a imunodifusão dupla (IDD), logo após, a contraímunoeletroforese (CIE) e a imunofluorescência indireta (IFI) também foram introduzidas. Mais recentemente técnicas de ELISA (ensaio imunoenzimático) e Imunoblotting também têm sido aplicadas(26).

Os testes sorológicos mais utilizados no diagnóstico e acompanhamento dos pacientes de PCM são: fixação do complemento (CF), contraímunoeletroforese (CIE), imunofluorescência, radioimunoensaio, inibição passiva da hemoaglutinação, imunodifusão dupla (IDD), ensaio imunoenzimático (ELISA e MELISA), dot blot, Western Blot e mais recentemente ELISA de competição(27).

Diagnóstico sorológico é utilizado como uma importante ferramenta para os médicos. Apesar de não ser conclusivo, ele se mostra útil quando se há suspeita da doença e não há observação do *P. brasiliensis* no EDM, isso porque pacientes crônicos podem apresentar uma quantidade reduzida do fungo nas amostras(28). Além disso, a sorologia pode informar ao médico sobre o prognóstico da doença, auxiliando na avaliação da evolução do tratamento(21-29).

Reações falso-negativas (FN) podem ser observadas em pacientes com infecção pulmonar intensa e imunossupressão(21). Um relato de caso de um indivíduo de 34 anos com infecção ativa mostrou que a IDD e a CIE foram negativas e, embora casos como esse sejam raros, o autor atribui o fato à baixa sensibilidade do testes. Reações FN podem ocorrer também quando preparações do antígeno são pobres em gp43(19).

Embora a gp43 seja considerado o principal exoantígeno da *P. brasiliensis*, há relatos de pacientes sorologicamente negativos para essa substância, enquanto outros indivíduos exibem níveis persistentes desses anticorpos específicos ao longo do curso da PCM(18).

Efeito prozona também pode ocasionar reações FN e ocorre quando os títulos de anticorpos se encontram muito altos, impossibilitando a ligação antígeno X anticorpo. Embora sejam raros, casos de efeito prozona podem acontecer no diagnóstico da PCM, quando não se dilui o soro durante a realização do teste.

É recomendável que o diagnóstico sorológico seja realizado com pelo menos dois testes, com titulação dos anticorpos, o que se

torna útil no seguimento dos pacientes durante o tratamento(19).

Preparação do antígeno para a realização dos testes

A produção do antígeno a ser utilizado nos testes imunológicos é o primeiro passo para a realização de um diagnóstico confiável. Em 1986, Puccia(30) descreveu a identificação de 2 componentes exocelulares separados por cromatografia de afinidade, que chamaram de E₁ e E₂ e demonstraram que a fração E₂ era mais específica para *P. brasiliensis*, mais tarde esta seria identificada como a gp43. Protocolos para obtenção de antígenos são sugeridos na literatura e variam muito, como o uso de sobrenadante de culturas (antígeno bruto filtrado), de frações polissacarídicas, e de antígenos purificados, modificados ou recombinantes(7). Porém, muitos laboratórios que trabalham na área não padronizam o preparo desses antígenos, o que faz com que haja diferenças interlaboratórios de protocolos, como variações em relação a meio de cultura, tempo de incubação, temperatura, tamanho inicial do inóculo, dentre outros, podendo comprometer a qualidade do resultado do teste. Puccia(30) afirmaram que, por eletroforese, é possível se identificar a proporção dos componentes da cultura, dessas diferentes preparações que variam com as condições de incubação. A necessidade de se produzir antígenos de acordo com esses padrões muitas vezes é suplantada pela limitação tecnológica e financeira do laboratório. Pensando nisso, esforços têm sido feitos para simplificar o método(27).

A utilização do antígeno bruto é ampla por ser de fácil obtenção, apresenta uma boa especificidade, mas com a desvantagem de possuir componentes que são comuns a outros fungos, o que pode explicar reações cruzadas entre soros de pacientes com PCM e outras micoses como histoplasmose ou lobomiose (doença de Jorge Lobo)(31-32).

Já foi provado que podem ocorrer instabilidades na síntese de componentes antigênicos do mesmo isolado de *P. brasiliensis* sob condições de incubação. Quando se usam isolados específicos para produzir antígenos para a realização de testes como a IDD, a cultura poderá ter gp43, porém, isso não é reprodutível e algumas vezes essa preparação pode não conter esse antígeno. Berzaghi(31) apresentaram a hipótese de que a cultura é composta por diferentes clones e que por alguma razão ainda não esclarecida, somente alguns secretam gp43. Foi demonstrado através da análise da secreção de gp43 de dois diferentes métodos de cultura que, a cultura de isolados *P. brasiliensis* diminuía a capacidade de excretar essa molécula a partir da 3ª subcultura. Uma hipótese para isso é de que esses isolados são infectantes para o homem quando estão na natureza e que, conservados em coleções, são compostos de células policlonais. Isso implica que, quando se utiliza esses isolados no laboratório, o fungo apresenta informações genéticas que podem ser diferentes na sua biologia, antigenemia e propriedades bioquímicas. Testando 90 clones de Pb, eles observaram que todos secretavam a gp43, porém, em concentrações diferentes(31).

Dados da literatura indicam também que tratamentos com esses antígenos brutos, como a deglicosilação, podem eliminar esse

problema de reação cruzada entre essas doenças, como demonstrado por Puccia(30). A purificação de gp43 pode ser feita a partir do sobrenadante da cultura, e essa técnica foi facilitada com a produção de anticorpos monoclonais e tem sido utilizada em testes sorológicos(21).

Imunodifusão Dupla (IDD)

Nos últimos anos, a imunodifusão dupla (IDD) tem sido a primeira escolha para diagnóstico inicial de casos suspeitos de PCM, uma vez que apresenta simplicidade na execução, baixo custo, além de alta sensibilidade e especificidade, que variam de 65 a 100%, dependendo do antígeno utilizado(21-22-27).

Pesquisadores de todo o Brasil testaram o Ag7 (preparação de antígeno rica em gp43, padronizada em 1988) e mostraram uma sensibilidade de 84,3% e especificidade de 98,9%, comprovando que as condições em que esse antígeno é preparado pode ser uma importante ferramenta no diagnóstico da PCM, embora reações falso-negativas possam ocorrer em 2-3%(27).

Del Negro et al., em 1991 calcularam a sensibilidade, especificidade e eficiência da IDD de grupos de pacientes (entre indivíduos saudáveis e doentes) e chegaram a uma sensibilidade de 91,3% e especificidade de 100% . Comparando com testes como a fixação do complemento, a IDD se mostrou superior em relação a sensibilidade e especificidade. Já em 1999, Del Negro(26) encontraram uma sensibilidade de 95,3% no IDD, sendo somente 2 falso-negativos, e

esses pacientes apresentavam lesões localizadas.

Diferentes protocolos para preparações de *P. brasiliensis* podem ser utilizados no teste (antígeno bruto, gp43 purificado, gp43 recombinante), porém, todos devem possuir em comum o exoantígeno gp43, responsável por especificidade e sensibilidade de mais de 85% nos testes, em geral(21).

Camargo(33) analisaram a reatividade de soros de pacientes com PCM frente a antígenos obtidos de diferentes períodos de incubação (após 7, 10, 15, 20, 25 e 30 dias) e mostraram uma maior reatividade dos soros em antígenos de 20 a 25 dias. O pico de concentração da gp43 era de 15 a 20 dias de incubação, com diminuição significativa até os 30 dias. No período de 7 a 10 dias houve um pico de proteínas de 94 kDa, mas que não era detectado nos dias subsequentes. Uma hipótese para isso foi a presença de uma atividade proteolítica no período de incubação da cultura, em que a gp43 se mantinha por mais tempo, provando sua estabilidade frente as outras glicoproteínas.

Gano & Restrepo(34), analisando a especificidade e sensibilidade da IDD (utilizando a *P. brasiliensis* B339) em grupos de pacientes comprovadamente com PCM, saudáveis e outras micoses profundas acharam uma especificidade de 100% e sensibilidade de 88% no momento do diagnóstico e afirmaram que a terapia causava uma perda de sensibilidade no teste. O valor preditivo positivo foi de 100% em relação aos pacientes saudáveis e com outras doenças. Camargo(33) citaram uma sensibilidade de 95,6%.

Embora seja um teste de sensibilidade aceitável, a IDD apresenta desvantagens:

apresenta reações cruzadas com outras infecções fúngicas e resultados falso-negativos atribuídos à presença de IgG2 de baixa avidade. Além disso, muitas vezes resultados da IDD não se correlacionam com a clínica, por exemplo, títulos elevados (1:64) mesmo em pacientes considerados tratados e com cura clínica. Por outro lado, embora títulos baixos (1:2 e 1:4) sejam mais frequentemente relatados em pacientes assintomáticos, esses baixos títulos podem estar presentes em pacientes com sintomas da doença(22).

Já foi demonstrado também que pacientes com PCM na forma adulta unifocal podem apresentar produção baixa de anticorpos (principalmente isotipo IgG1), podendo levar a IDD falso-negativa. Isso indica que a apresentação da forma clínica pode influenciar no resultado do diagnóstico sorológico(24). Foi observado ainda que pacientes com PCM adulta unifocal, com IDD negativa mas alta concentração de IgG2, apresentaram reação sorológica positiva no ELISA. Uma hipótese para isso é que os epítopos de carboidrato (alvo principal desse isotipo de anticorpo) fica mais exposto em fase sólida (ELISA), uma vez que na forma solúvel, esses epítopos não estão disponíveis para ligação com anticorpos(24).

ELISA

Ensaio Imunoenzimático (ELISA) são testes muito utilizados, tanto em pesquisa científica como na medicina clínica. São excelentes por apresentarem resultados reprodutivos e com alta sensibilidade. Seu princípio básico é a detecção de anticorpos reagentes ou a detecção do antígeno

circulantes no soro do paciente. Os resultados podem ser quantitativos ou apenas qualitativos(31).

O ELISA para detecção de anticorpos anti-PCM é o mais utilizado entre os laboratórios do Brasil e foi primeiramente descrito por Pons(36) e desde então tem sido usado como base para muitas outras publicações sobre detecção de anticorpos nesses pacientes.

Economia e tempo de execução reduzido são as principais vantagens em sua utilização na rotina dos laboratórios. Porém, por ser altamente sensível, o número de reações cruzadas com outras doenças como a Histoplasmose pode ser uma limitação(37). Assim, muitos estudos têm sido desenvolvidos para tentar diminuir ou eliminar esse problema. A saída parece estar no antígeno utilizado no teste, que pode ser antígeno bruto, parcialmente purificado ou gp43 purificada(31).

Mendes-Giannini(32), observando que os vários antígenos até então estudados apresentavam especificidade baixa, com reatividade para soros de outras micoses, descreveram uma técnica em que o filtrado da cultura foi usado e o soro do paciente foi previamente absorvido por antígenos de *H. capsulatum*.

Outro trabalho foi sugerido por McGowan(38) em que os autores testaram antígenos citoplasmáticos de *P. brasiliensis* e viram que a sensibilidade passou de 87% para 97% e a especificidade foi de 99% e 100%, quando comparadas ao uso de antígeno bruto nos testes de ELISA e IDD, respectivamente. Também em 1985, Ferreira-da-Cruz(39), padronizaram a produção de antígenos de *P. brasiliensis*, *H. capsulatum* e *A. fumigatus* e obtiveram sensibilidade de 100% para PCM,

utilizando as técnicas de IDD e contraímuno eletroforese.

Taborda & Camargo(40) realizaram um "Dot Immunobinding Assay", um tipo de imunoenensaio em que se utiliza papel de nitrocelulose nos poços da placa de ELISA para a fixação do antígeno, que neste trabalho utilizaram gp43 purificado pela técnica da cromatografia de afinidade. A sensibilidade foi de 100% e apenas 4,3% de todos os casos de pacientes que não tinham PCM (entre controles saudáveis e positivos para outras doenças) tiveram reatividade no teste. Porém, quando se tratava previamente essa gp43 purificada com metaperiodato de Sódio, a especificidade do teste subia para 100%. A conclusão do estudo foi que este teste tem uma utilidade maior quando se dispõe de uma quantidade reduzida de antígeno para a realização do teste, além de obter resultados de fácil visualização.

Del Negro(26), avaliando o desempenho de testes sorológicos utilizados no diagnóstico e acompanhamento de pacientes de forma aguda e crônica (unifocal e multifocal) de PCM, chegaram a uma sensibilidade de 100% no ELISA, porém, com várias reações cruzadas com soros de outras doenças como histoplasmose e lobomicose. Os autores constataram também que os valores de densidade óptica (OD) a 490nm foram significativamente menores naqueles pacientes que apresentavam a forma crônica unifocal da doença, comparados às formas crônica multifocal e também à forma juvenil. Outra importante observação dos autores foi a capacidade do ELISA de distinguir, por meio do nível de anticorpo, as formas crônicas (unifocal e multifocal) da forma aguda.

Um estudo desenvolvido por Albuquerque(37) introduziu variações no teste do ELISA a fim de reduzir as reações cruzadas. Gp43 foi tratada com metaperiodado de Sódio e em seguida, soro de pacientes com PCM foram absorvidos com antígenos de *H. capsulatum*, e de *C. albicans*, o que, segundo os autores, elimina anticorpos cruzados. Depois, o soro foi diluído com galactose para eliminar anticorpos anti-galactose e principalmente epitopos de *P. brasiliensis* em comum com *H. capsulatum*. Combinando essas técnicas já padronizadas pela literatura, e, apesar de terem obtido uma melhor especificidade, os autores notaram que essa melhora nem sempre ocorria, isto é, nem sempre observavam uma boa diferenciação entre soros homólogos e soros heterólogos, o que os levou a concluir que outros fatores, ligados a características individuais do soro de cada paciente (o isolado de *P. brasiliensis* responsável pela doença ou a resposta imune contra esse isolado, por exemplo) podem influenciar na reação.

Marques-da-Silva (22) utilizaram IDD com antígeno bruto para a detecção de anticorpos no Lavado Broncoalveolar (LBA) de pacientes com PCM encontraram positividade em apenas 9 pacientes dos 27 pacientes estudados. Quando analisados os soros desses mesmos 27 indivíduos por ELISA, verificaram uma positividade de 85,18% e uma especificidade de 100%, com títulos entre 1:50 a 1:400.

Detecção de antígeno

Ausência de anticorpos anti-gp43 ou títulos baixos ao longo do curso da doença,

dificulta o uso do sorodiagnóstico também para o estabelecimento da cura do paciente. Pensando nisso, pesquisadores têm tentado aprimorar técnicas que detectem, ao invés do Ac, o antígeno circulante no soro do paciente durante o tratamento. Tem-se utilizado a gp43 como marcador da doença, uma vez que quase todos os soros de pacientes com PCM possuem esse antígenos circulante. A detecção pode ser feita pelo Western Blot, que pode detectar também a gp70. Observou-se com esta técnica que a gp43 circulante no soro começava a desaparecer no 10º mês de tratamento, tornando-se indetectável após 2 anos, sugerindo que a antigenemia pode ser uma importante ferramenta para o acompanhamento dos pacientes em tratamento(20).

A detecção de antígenos nos líquidos corporais (soro, lavado broncoalveolar-LBA) pode ser muito útil em casos de PCM invasiva e pode ser uma alternativa no diagnóstico da PCM (Marques-da-Silva et al., 2006). Apesar de amplamente utilizados, os testes voltados para a pesquisa de anticorpos no soro dos pacientes têm sido questionados como ferramenta de acompanhamento durante o tratamento por não apresentarem, algumas vezes, correlação com a clínica do paciente. Por isso, técnicas voltadas para a detecção de antígeno no soro do paciente pode ser mais promissoras(20).

Outros tipos de ELISA também podem ser usados, não só na determinação de anticorpos no soro do paciente, como também podem auxiliar na detecção de antígenos do *P. brasiliensis*. Freitas-da-Silva & Roche-Barreira(41) utilizaram ELISA de captura para determinar a antigenemia em pacientes com PCM. Em 66,3% dos soros não foi detectada a

presença do antígeno. Essa baixa sensibilidade pode ser devido a características individuais da doença ou instituição do tratamento ou ainda a formação de complexo imune que elimina epitopos livres não permitindo a detecção pelo teste. Porém, se observou que esse teste pode ser útil para se fazer correlação com a clínica, uma vez que eles observaram que, com a introdução do tratamento, havia uma queda brusca dos antígenos circulantes no soro do paciente, correlação que muitas vezes não se observa com os anticorpos. Silva(20), utilizando a mesma técnica de ELISA de captura observaram que a gp43 começou a desaparecer da circulação 10 meses após início do tratamento e com 2 anos não foi mais detectada nos 23 pacientes com PCM analisados no estudo. Gómez(42) realizaram um estudo no mesmo formato e chegaram a uma sensibilidade de 80,4%, com reação cruzada com soro heterólogo em 39,6%.

Há relatos de que uma fração de alta massa molecular também pode ser detectada em pacientes com PCM, pelo método de ELISA de captura. A vantagem é que essa

fração do antígeno é comum em pacientes crônicos, o que não ocorre com a gp43, que é mais abundante nos pacientes com a forma aguda da doença (43).

Conclusão

A PCM é uma doença de grande impacto na saúde pública do Brasil e por isso, conhecimentos acerca de sua patogênese e seu diagnóstico são de grande importância para a comunidade científica. Esclarecer questões ainda não conhecidas acerca da relação entre o parasita e a resposta imune do hospedeiro pode ajudar no futuro da terapêutica da doença. As técnicas aplicadas hoje na sorologia para o diagnóstico e acompanhamento da PCM são muito variadas e em geral apresentam uma boa acurácia, seja na detecção de anticorpos ou de antígenos. Grandes esforços têm sido feitos para a melhoria desses testes, porém, não existe ainda uma padronização das técnicas, o que dificulta a comparação de resultados publicados na literatura.

Referências Bibliográficas

1. Palmeiro M, Cherubini K, Yurgel LS. Paracoccidioidomycosis – Literature Review. *Scientia Medica*. 2005;15(4):275-278;
2. San-Blas G, Nino-Vega G. Paracoccidioides brasiliensis: chemical and molecular tools for research on cell wall, antifungal, diagnosis, taxonomy. *Mycopathologia*. 2008;165:183-195;
3. Shikanai-Yasuda MA, Filho FQT, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. Guidelines in paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39(3):297-310;

4. Hogan LH, Klein BS, Levits SM. Virulence factors of Medically Important Fungi. *Clinical Microbiology Reviews*. 1996;9(94):469-488;
5. Ameen M, Talhari C, Talhari S. Advances in paracoccidioidomycosis. *Clin Exp Dermatol*. 2009;35:576-580;
6. Calle D, Rosero DS, Orozco LC, Camargo D, Casteneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis in Colombia: an ecological study. *Epidemiol. Infect.* 2001;126:309-315;
7. Travassos LR, Taborda CP, Colombo AL. Treatment options for paracoccidioidomycosis and new strategies investigated. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2008;6(2):251-262;
8. Grosso DM, Almenida SR, Mariano M, Lopes JD. Characterization of gp70 and anti-gp70 monoclonal antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* Pathogenesis. *Infect Immun.* 2003;71(11):6534-6542;
9. Wanke B, Aldê MA. Chapter 6 – Paracoccidioidomycosis. *J Bras Pneumol*. 2009;35(12):1245-1249;
10. Oliveira LL, Coltri KC, Cardoso CRB, Roque-Barreira MC, Panunto-Castelo A. *Plos Negl Trop Dise.* 2008;2(3):e183;
11. Cavassi, KA, Tristao FSM, Oliveira LL, Rocha FA, Vancim JO, Moreira AP, Campanelli AP, Panagio LA, Milanezi CM, Martinez R, Rossi MA, Silva JS. Cell-free antigens from *Paracoccidioides brasiliensis* drive IL-4 production and increase the severity of paracoccidioidomycosis. *Plos One*. 2011;6(6):e21423;
12. Sadahiro A, Diogo CL, Oshiro TM, Shikanai-Yasuda MA. Kinetics of INF- γ , TNF- α and IL-4 production by mononuclear cell stimulated with gp43 peptides in patients cured of paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007;40(2):156-162;
13. Taborda CP, Silva MB, Nosanchuk JD, Travassos LR. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi. *Mycopathologia* 2008;165(4-5):331-339;
14. Calich VLG, Kashino SS. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Braz J Med Biol Res*. 1998;31:615-623.;
15. Benard G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*. 2008;165:209-221;

16. Corvino CL, Mamoni RL, Fagundes GZZ, Blotta MHSL. Serum interleukin-18 and soluble tumour necrosis factor receptor 2 are associated with disease severity in patients with paracoccidioidomycosis. *Clin Exp Dermatol.* 2006;147:483-490;
17. Ferreira MC, Oliveira RTD, Silva RM, Blotta MHSL, Mamoni RL. Involvement of Regulatory T Cell in the Immunosuppression Characteristic of Patients with Paracoccidioidomycosis. *Infect Immun.* 2010;78(10):4392-4401;
18. Bertini S, Colombo AL, Takahashi HK, Straus AH. Expression of Antibodies Directed to *Paracoccidioides brasiliensis* glycosphingolipids during the course of Paracoccidioidomycosis Treatment. *Clin. Vaccine Immunol.* 2007;14(2):150-156;
19. Vidal MSM, Benard G, Brito T, Dnatas KC, Pereira NC, França FOS, Silva AMG, Martins JEC. Atypical Serological Response Marked by a Lack of Detectable Anti-gp43 Antibodies in a Patient with Disseminated Paracoccidioidomycosis. *J. Clin. Microbiol.* 2005;43(6):3014-3016;
20. Marques-da-Silva SH, Colombo AL, Blotta MHSL, Queiroz-Telles F, Lopes JD, Camargo ZP. Monitoring gp43 Antigenemia in Paracoccidioidomycosis Patients during Therapy. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42(6):2419-2424;
21. Camargo KC, Vallejo MC, Camargo ZP, Puccia R. Use of recombinant gp43 Isoforms Expressed in *Pichia pastoris* for Diagnosis of Paracoccidioidomycosis. *Clin. Vaccine Immunol.* 2008;15(4):622-629;
22. Marques-da-Silva SH, Colombo AL, Blotta MHSL, Queiroz-Telles F, Lopes JD, Camargo ZP. Diagnosis of Neuroparacoccidioidomycosis by Detection of Circulating Antigen and Antibody in Cerebrospinal Fluid. *J. Clin. Microbiol.* 2005;43(9):4680-4683;
23. Unterkircher CS, Leão MCP, Blotta MHSL, Camargo ZP. Natural antibodies in Paracoccidioidomycosis. *Braz J Microbiol.* 2004;35:59-63;
24. Neves AR, Mamoni RL, Rossi CL, Camargo ZP, Blotta MHSL. Negative Immunodiffusion Test Results Obtained with Sera of Paracoccidioidomycosis Patients May Be Related to Low-Activity Immunoglobulin G2 Antibodies Directed against Carbohydrate Epitopes. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003;10(5):802-807;
25. Yoshida M, Sanchez MCA, Shikanai-Yasuda MA. Increase Immunoglobulin G anti-*Paracoccidioides brasiliensis* Serum Antibody Avidity as a Predictor of Favorable Posttherapeutic Evolution in Paracoccidioidomycosis. *Clin. Vaccine Immunol.* 2009;16(11):1583-1586.

26. Del Negro GMB, Pereira CN, Andrade HF, Palacios SA, Cecilia MMSV, Benard G. Evaluation of tests for antibody response en the follow-up of aptients with acute and chronic forms of paracoccidioidomycosis. *Journal Med Microbiol.* 1999;49:37-46;
27. Camargo ZP. Serology of paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia.* 2007;165:289-302.
28. Queiroz-Telles F, Escuissato DL. Pulmonary Paracoccidioidomycosis. *Semin Respir Crit Care Med.* 2011; 32:764-774;
29. Camargo ZP, Gesztesi JL, Saraiva ECO, Taborda CP, Vicentini AP, Lopes JD. Monoclonal Antibody Capture Enzyme Immunoassay for Detection of Paracoccidioides brasiliensis Antibodies in Paracoccidioidomycosis. *J. Clin. Microbiol.* 1994;32(10):2377-2381;
30. Puccia R, Schenkman S, Gorin PAJ, Travassos LR. Exocellular Components of Paracoccidioides brasiliensis Identification of a Specific Antigen. *Infect Immun.* 1986;53(1):199-206;
31. Berzaghi R, Marques da Silva SH, Camargo ZP. Variable gp43 Secretion by Paracoccidioides brasiliensis clones obtained by Two Different Culture Methods. *J. Clin. Microbiol.* 2005;43(1):491-493;
32. Mendes-Giannini MJS, Camaro ME, Lacaz CS, Ferreira AW. Immunoenzymatic Absorption Test for Serodiagnosis of Paracoccidioidomycosis. *J. Clin. Microbiol.* 1984;20 (1):103-108;
33. Camargo ZP, Unterkircher C, Campoy SP, Travassos LR. Production of Paracoccidioides brasiliensis Exoantigens for Immunodiffusion Tests. *J. Clin. Microbiol.* 1988;26(10):2147-2151;
34. Gano LE, Restrepo A. Predictive Value of Serologic tests in the Diagnosis and Follow-Up of Patients with Paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1987;29(5):276-283;
35. Del Negro GMB, Garcia NM, Rodrigues EG, Cno MIN, Aguiar MSMV, Lirio VS, Lacaz CS. The Sensitivity, Specificity and Efficiency Values of some Serological Tests Used in the Diagnosis of Paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1991;33(4): 277-280;
36. Pons L, Gimenez M, Guilleron C, Szarfman A. La técnica de La inmunoperoxidaseen La detection de anticuerpos especificos em La infeccion humana por Paracoccidioides brasiliensis. *Medicina.* 1972;36:510-2;
37. Albuquerque CF, Marques da Silva SH, Camargo ZP. Improvement of the Specifity of an Enzyme-Linked Immunosorbment Assay for Diagnosis of Paracoccidioidomycosis. *J. Clin. Microbiol.* 2005;43(4):1944-1946;

38. McGowan KL, Buckley HR. Preparation and Use of Cytoplasmic Antigens for the Serodiansis of Paracoccidioidomycosis. J. Clin. Microbiol. 1985;22 (1):39-43;
39. Ferreira-da-Cruz MF, Galvão-Castro B, Wanke B. Produção e padronização dos antígenos de Paracoccidioides brasiliensis (Pb), Histoplasma Capsulatum (Hc) e Aspergillus fumigatus (Af) para uso no imunodiagnostico. Comparação entre as técnicas de Imunodifusão e Imunoeletrosmoforese. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1985;80(3):301-305;
40. Taborda CP, Camargo ZP. Diagnosis of Paracoccidioidomycosis by Dot Immunobinding Assay for Antibody Detection Using the Purified and Specific Antigen gp43. J. Clin. Microbiol. 1994;32(2):554-556;
41. Freitas-da-Silva G, Roque-Barreira MC. Antigenemia in Paracoccidioidomycosis. J. Clin. Microbiol. 1992;30(2):381-385;
42. Gómez BL, Figueroa JI, Hamilton AJ, Ortiz B, Robledo MA, Hay RJ, Restrepo A. Use of Monoclonal Antibodies in Diagnosis of Paracoccidioidomycosis: NEw Strategies for Detection of Circulating Antigens. J. Clin. Microbiol. 1997;38(12):3278-3283;
43. Frerich AL, Nagashima LA, Pavanelli WR, Marquez AS, Kaminami MS, Carlos NJ, Sano A, Ono MA, Itano EN. High molecular mass fraction in clinical isolates Paracoccidioides brasiliensis. Rev Soc Bras Med Trop. 2010;43(5):526-530.