

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**ANA PAULA RIBEIRO**

**AVALIAÇÃO SOROLÓGICA A ANTÍGENOS DO *Paracoccidioides brasiliensis* PELO  
TESTE DE ELISA E PROVA INTRADÉRMICA NA REGIÃO RURAL DE  
ALFENAS, MG**

Alfenas/MG

2014

---

**ANA PAULA RIBEIRO**

**AVALIAÇÃO SOROLÓGICA A ANTÍGENOS DO *Paracoccidioides brasiliensis* PELO  
TESTE DE ELISA E PROVA INTRADÉRMICA NA REGIÃO RURAL DE  
ALFENAS, MG**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Saúde como requisito parcial para obtenção do título de mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde.

Área de concentração: Doenças infecto-parasitárias.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias

Alfenas/MG

2014

Ribeiro, Ana Paula.

Avaliação sorológica a antígenos do *Paracoccidioides brasiliensis* pelo teste de ELISA e prova intradérmica na região rural de Alfenas, MG / Ana Paula Ribeiro. - Alfenas, 2014.

51 f. -

Orientador: Luiz Cosme Cotta Malaquias.

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.

Bibliografia.

1. Paracoccidioidomicose. 2. Ensaio de Imunoadsorção Enzimática. 3. Ureia. I. Malaquias, Luiz Cosme Cotta. II. Título.

CDD: 616.079

**ANA PAULA RIBEIRO**

**AVALIAÇÃO SOROLÓGICA A ANTÍGENOS DO *Paracoccidioides brasiliensis* PELO  
TESTE DE ELISA E PROVA INTRADÉRMICA NA REGIÃO RURAL DE  
ALFENAS, MG**

A Banca examinadora abaixo assinada aprova o projeto de qualificação apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à saúde pela Universidade Federal de Alfenas - MG. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Aprovada em: 25/08/14

Prof. Dr Luiz Cosme Cotta Malaquias - Orientador



Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:


Prof. Drª Tania Regina Grão Velloso



Instituição: UFES-ES

Assinatura:

Prof. Dr Luiz Felipe Leomil Coelho



Instituição: Unifal-MG

Assinatura:

Dedico a Deus, à minha mãe,  
e ao meu noivo, pelo  
apoio e compreensão  
na realização deste trabalho.

---

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Alfenas-MG pela oportunidade oferecida e contribuição à minha formação pessoal e profissional.

Ao meu orientador, Prof<sup>o</sup> Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias, pela dedicação, conhecimentos transmitidos e confiança depositada na realização desta dissertação.

Ao mestrando Antônio José Araújo de Lima, pela colaboração, apoio e incentivo prestados na realização desta dissertação.

À Prof<sup>a</sup> Roberta Ribeiro Silva que colaborou com essa dissertação realizando a análise estatística.

Aos moradores da zona rural de Alfenas-MG e demais voluntários que participaram do projeto inicial, que gerou essa dissertação.

## RESUMO

A paracoccidiodomicose (PCM) micose sistêmica granulomatosa crônica, endêmica em países da América Latina, causada pelo fungo termo-dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*. A endemicidade está relacionada com regiões agrícolas, onde o fungo encontra condições ecológicas favoráveis para seu desenvolvimento. Se não diagnosticada e tratada a tempo, pode levar a formas disseminadas graves e letais, com rápido envolvimento dos pulmões, tegumento, gânglios, baço, fígado e órgãos linfóides do tubo digestivo. O surgimento da doença depende da interação entre o fungo e a resposta imune do hospedeiro, o qual pode evoluir à cura espontânea ou disseminar-se pelo organismo causando reação granulomatosa crônica. O diagnóstico da PCM é feito por exame clínico e laboratorial. Os exames laboratoriais são auxiliares no diagnóstico. Entre estes destacam a biópsia e a cultura, que visam identificar o fungo em amostras biológicas. No entanto, existe a possibilidade da ocorrência de resultado falso-positivo. Por sua vez, os testes sorológicos como imunodifusão dupla (IDD), contraímuno eletroforese (CIE), imunofluorescência indireta (IFI), ensaio imunoenzimático (ELISA) e imunoblot (IB) são auxiliares no diagnóstico e, permitem avaliar de forma indireta a presença de anticorpos do hospedeiro contra antígenos do fungo. A IDD, o teste de referência, apresenta alta sensibilidade e especificidade, no entanto, requer que o paciente apresente altos títulos de anticorpos, período onde a doença já está instalada. O teste de ELISA é um método sensível, rápido e apropriado para análise de grande amostragem, porém, apresenta como desvantagem a reatividade cruzada entre diferentes espécies de fungos. O projeto tem como objetivo a realização de ensaios de ELISA utilizando amostras de soros de moradores da zona rural de Alfenas, Minas Gerais, na presença ou ausência de solução de ureia 6M. Comparando-se o teste de ELISA sem ureia e com ureia, pode-se observar uma redução do número de resultados positivos em todas as faixas etárias tanto no sexo feminino, quanto no sexo masculino e um aumento no número de resultados negativos em ambos os sexos, e também em todas as faixas etárias. Ao se avaliar a região rural de Alfenas, MG utilizando o teste de ELISA tratado com ureia 6M, a soroprevalência obtida foi de 55,75%.

Palavras chaves: Paracoccidiodomicose. ELISA. Ureia.

## ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM), a chronic granulomatous systemic mycosis, endemic in Latin America, is caused by the thermo-dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. The endemicity is associated with agricultural areas where the fungus has favorable ecological conditions for its development. If the disease is not diagnosed and treated in time, it can lead to severe and lethal dissemination with rapid involvement of the lung, integument, lymph nodes, spleen, liver and lymphoid organs of the digestive tract. The emergence of the disease depends on the interaction between the fungus and the host immune response, which may progress to spontaneous cure or it may spread through the body causing chronic granulomatous reaction. The diagnosis of PCM is made by clinical examination and laboratory tests. The latter are used as a diagnostic aid. Among these stand out biopsy and culture, aimed at identifying the fungus in biological samples. However, the occurrence of false negative is high. In turn, these serological tests as double immunodiffusion (DID), counterimmunoelectrophoresis (CIE), indirect immunofluorescence (IIF), enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoblotting (IB) are auxiliary in the diagnosis and allows to indirectly assessing the presence of antibodies against the host fungus antigens. DID, the reference test has high sensitivity and specificity, but requires that the patient has high levels of antibodies, a period when the disease is already installed. The ELISA assay is sensitive, fast, and suitable for large sample analysis. It has the disadvantage of cross-reactivity between different species of fungi. The project aims to carry out ELISA assays using sera samples from residents of rural areas in Alfenas, Minas Gerais, in the presence or absence of 6M urea solution. Comparing the results of ELISA in the presence or absence of urea we can observe a reduction in the number of positives cases in all age groups, both female as male and an increasing number of negative outcomes in both sexes, and in all age groups. When evaluating the rural of Alfenas, MG using the ELISA treated with 6M urea, the seraprevalence obtained was 55.75%.

Key words: Paracoccidioidomycosis. ELISA. Urea.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Paracoccidioides brasiliensis forma leveduriforme característica com brotamentos múltiplos em forma de roda de leme KOH 400x .....	14
<b>Figura 2-</b> Aspectos clínicos da doença .....	15
<b>Figura 3 -</b> Distribuição geográfica da PCM .....	17
<b>Figura 4 –</b> Divulgação e conscientização do trabalho .....	26
<b>Figura 5 –</b> Peça teatral e preenchimento das fichas cadastrais .....	27
<b>Figura 6 -</b> Realização do teste de Intradermorreação .....	28
<b>Figura 7 -</b> Fotografia de uma placa do teste de ELISA convencional e com ureia .....	30

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Interpretação dos valores de k .....	31
<b>Tabela 2</b> - Caracterização de moradores de área endêmica para PCM submetidos ao teste de ELISA no ano de 2009 em Alfenas, MG quanto ao sexo, faixa etária e idade .....	32
<b>Tabela 3</b> - Distribuição da frequência do teste intradérmico e dos testes de ELISA positivos e negativos de moradores de área endêmica para PCM no ano de 2009 em Alfenas, MG .....	33
<b>Tabela 4</b> - Distribuição da frequência no teste de ELISA convencional por sexo e por faixa etária de moradores de área endêmica para PCM no ano de 2009 em Alfenas, MG .....	34
<b>Tabela 5</b> - Distribuição da frequência no teste de ELISA com ureia por sexo e faixa etária de moradores de área endêmica para PCM no ano de 2009 em Alfenas, MG .....	35
<b>Tabela 6</b> - Distribuição da frequência no teste intradérmico por sexo e faixa etária de moradores de área endêmica para PCM no ano de 2009 em Alfenas, MG .....	36
<b>Tabela 7</b> - Comparação entre o teste intradérmico (IDR) e o teste de ELISA convencional de moradores de área endêmica para PCM no ano de 2009 em Alfenas, MG .....	37
<b>Tabela 8</b> - Comparação entre o teste intradérmico (IDR) e ELISA com ureia de moradores de área endêmica para PCM no ano de 2009 em Alfenas, MG .....	37
<b>Tabela 9</b> - Comparação dos testes de ELISA com ureia e o teste de ELISA convencional de moradores de área endêmica para PCM no ano de 2009 em Alfenas, MG .....	38
<b>Tabela 10</b> - Comparação entre o teste de ELISA com ureia e ELISA convencional considerando o sexo feminino de moradores de área endêmica para PCM no ano de 2009 em Alfenas, MG .....	38
<b>Tabela 11</b> - Comparação entre o teste de ELISA com ureia e ELISA convencional considerando o sexo masculino de moradores de área endêmica para PCM no ano de 2009 em Alfenas, MG .....	39
<b>Tabela 12</b> - Comparação entre o teste de ELISA com ureia e ELISA convencional considerando a faixa etária de 11 à 29 anos de moradores de área	

endêmica para PCM no ano de 2009 em Alfenas, MG .....	39
<b>Tabela 13</b> - Comparação entre o teste de ELISA com ureia e ELISA convencional considerando a faixa etária de 30 à 49 anos de moradores de área endêmica para PCM no ano de 2009 em Alfenas, MG .....	40
<b>Tabela 14</b> - Comparação de positivos e negativos entre o teste de ELISA com ureia e ELISA convencional considerando a faixa etária maior ou igual a 50 anos de moradores de área endêmica para PCM no ano de 2009 em Alfenas, MG .....	40
<b>Tabela 15</b> - Comparação entre os resultados positivos e negativos dos testes de ELISA convencional e ELISA com ureia pelo teste de Kappa .....	41
<b>Tabela 16</b> - Comparação entre os resultados positivos e negativos dos testes de ELISA convencional e IDR pelo teste de Kappa .....	41
<b>Tabela 17</b> - Comparação entre os resultados positivos e negativos dos testes de ELISA com ureia e IDR pelo teste de Kappa .....	41

## LISTA DE ABREVIATURAS

**CIE** – Contraimunoeletroforese

**DO** - Densidades óticas

**ELISA** – Ensaio Imunoenzimático

**IB** – Imunoblot

**IDD** – Imunodifusão Radial Dupla

**IDR** – Intradermorreação

**GP 43** - Glicoproteína de 43 KDa

**IFI** – Imunofluorescência Indireta

**IFN- $\gamma$**  – Interferon gama

**PCM** – Paracoccidiodomicose

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2 OBJETIVO</b> .....	24
2.1 OBJETIVO GERAL.....	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	25
3.1 LOCAL DE ESTUDO.....	25
3.2 TIPO DE ESTUDO E CONSCIENTIZAÇÃO DOS MORADORES DE LOCALIDADES RURAIS.....	25
3.3 PARACOCCIDIOIDINA.....	27
3.4 INTRADERMORREAÇÃO.....	27
3.5 TESTE DE ELISA CONVENCIONAL.....	28
3.6 TESTE DE ELISA TRATADO COM UREIA.....	29
3.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	30
<b>4 RESULTADOS</b> .....	32
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	42
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	46
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	47

## 1 INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) micose sistêmica granulomatosa crônica causada pelo fungo termodimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* (RESTREPO et al., 2011). Este se apresenta sob duas formas: miceliana e leveduriforme, mostrada na figura abaixo. A forma miceliana cresce à temperatura de 18 a 25° C e é produtora dos esporos ou conídios infectantes, que quando inalados pelos hospedeiros susceptíveis podem se transformar em células leveduriformes (LACAZ et al., 2002).

Uma vez inalados os conídios atingirão primeiramente o pulmão, onde se desenvolvem as lesões pulmonares e posteriormente pode se disseminar para outros órgãos produzindo lesões secundárias na mucosa, pele, nódulos linfáticos e glândula adrenal. Frequentemente podem aparecer fibroses pulmonares como sequelas. Na ausência de terapia eficiente, a PCM progride e pode ser letal. A infecção por *P. brasiliensis* é caracterizada por um longo período de latência, e na maioria dos casos, a doença se manifesta após décadas (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

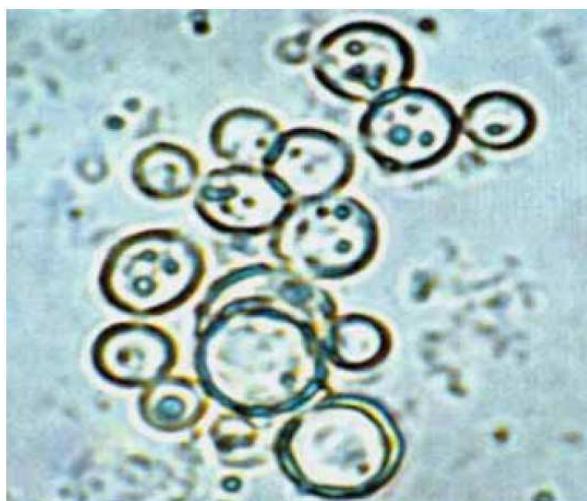


Figura 1- *Paracoccidioides brasiliensis*, forma leveduriforme característica com brotamentos múltiplos em forma de roda de leme. KOH-400X.

Fonte : FORTES et al. (2011).

A paracoccidioidomicose pode manifestar-se nas formas aguda e crônica, onde a forma aguda tipo juvenil ocorre em indivíduos de até 30 anos, se desenvolve grave e rapidamente, enquanto que a forma crônica tipo adulto é mais frequente e acomete indivíduos

de 30 a 50 anos com uma evolução lenta e gradual (PALMIEIRO et al., 2005). Os aspectos clínicos são demonstrados na figura que seguinte.



Figura 2- Aspectos clínicos da doença. 2.1- Forma aguda e subaguda. 2.2- Forma crônica.  
Fonte: SHIKANAI-YASUDA et al. (2006).

Quando o diagnóstico e o tratamento são feitos tardiamente, podem ocorrer as formas disseminadas graves e letais, com comprometimento rápido e progressivo dos pulmões, do tegumento, dos gânglios, do baço, do fígado e dos órgãos linfoides do tubo digestivo (LACAZ et al., 2002; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; RESTREPO et al., 2011). Na clínica, o diagnóstico da PCM pode ser confundido com outras infecções. É necessário que se dê atenção especial à tuberculose, devido à sobreposição de histórico clínico e epidemiológico. A confirmação da doença é dada pela demonstração direta das células multibrotantes características do *P. brasiliensis* em amostras biológicas, ou o isolamento do fungo.

É possível que os casos de PCM sejam subestimados no Brasil, principalmente no interior do país, o que é justificado por várias razões: semelhança com outras doenças, variabilidade de manifestações clínicas, que acabam negligenciando a PCM em relação à tuberculose. O indicado seria, antes da medicação, realizar exames mais sensíveis, como broncoscopia, tomografia de tórax e, sobretudo, cultura de amostras pulmonares, incluindo biópsia transbrônquica, líquido pleural, entre outros para confirmação ou não, da tuberculose. Em regiões distantes dos grandes centros, a PCM ainda não é incluída entre as hipóteses diagnósticas de sintomáticos respiratórios (BERTONI et al., 2010).

A PCM, assim como outras doenças fúngicas, depende da interação entre o fungo e a resposta imunológica do hospedeiro para evoluir para a cura espontânea ou disseminar-se pelo organismo causando reação granulomatosa crônica. Os mecanismos relacionados à resistência ou à suscetibilidade do homem ao *P. brasiliensis* ainda não são totalmente conhecidos (VALLE; COSTA, 2001).

O contato do *P. brasiliensis* com o tecido do hospedeiro inicia uma reação inflamatória com predominância de neutrófilos, que posteriormente são substituídos por macrófagos, estes se dispõem em nódulos frouxos e células gigantes multinucleadas. Dessa forma é composto o granuloma da PCM, células gigantes do tipo Langhans e corpo estranho, e arranjo nodular de células epitelióides, muitas contendo fungos.

Em indivíduos com resposta imune celular preservada, os granulomas são compactos, bem definidos, com poucos fungos e infecção benigna localizada. Em pacientes com comprometimento imunológico o granuloma contém grande número de fungos, são frouxos, mal organizados, mal definidos, com exudato supurativo e áreas de necrose. Há disseminação e proliferação do fungo, ocasionando a doença generalizada.

A reação granulomatosa é a resposta do tecido do hospedeiro na tentativa do organismo bloquear e restringir o fungo, impedindo a multiplicação e disseminação pelos tecidos.

A resposta imune humoral não é efetiva contra o fungo, sendo caracterizada pela alta produção de anticorpos IgG4, IgA e IgE, associadas a citocinas supressoras do granuloma como IL-4, IL-5, TGF- $\beta$  e intensa eosinofilia. Ocorre em pacientes com as formas mais graves da PCM (FORTES et al., 2011).

Vários fungos que causam micoses sistêmicas são controlados pela habilidade do hospedeiro em desenvolver resposta imune mediada por células, se esses mecanismos falham se torna difícil eliminar o agente agressor. A resposta imune específica é determinada por citocinas produzidos por células T auxiliares, que se subdividem em duas populações: células Th2 secretoras de IL-4 e IL-10, que inibem as funções de macrófagos e estimulam a produção de anticorpos; e as células Th1 que secretam Interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e IL-2 que são responsáveis pela resposta imune celular, ativando células T e estimulando a fagocitose, com desenvolvimento de imunidade protetora a patógenos intracelulares e fungos. Porém, há evidências de que as respostas Th1 e Th2 são antagônicas, pois parece que IL-10 e IL-4 produzidas pelas células Th2 suprimem a atividade de Th1, e INF- $\gamma$  suprime atividade das



células tipo Th2. Uma resposta exacerbada Th1 leva a uma resposta inflamatória e pode ocasionar danos às células do hospedeiro, e uma resposta inadequada do tipo Th2 pode gerar uma continuidade da infecção. Uma estimulação inadequada de células Th1 associada às células tipo Th2, pode induzir o estado crônico da doença e inibir a estimulação de células Th1, que são responsáveis pela imunidade protetora (BENARD, 2008; CANO et al., 2012).

Existem inúmeros trabalhos de pesquisa sobre a PCM investigando, principalmente, a epidemiologia da doença em regiões endêmicas distintas, uma vez que esta é uma das micoses sistêmicas mais importantes da América Latina, tendo alta prevalência no Brasil, Venezuela, Colômbia e Argentina. No Brasil não há uma distribuição uniforme da doença devido fatores ecológicos que influenciam na existência do fungo no local. A sua maior ocorrência está nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (FORNAJEIRO et al., 2005).

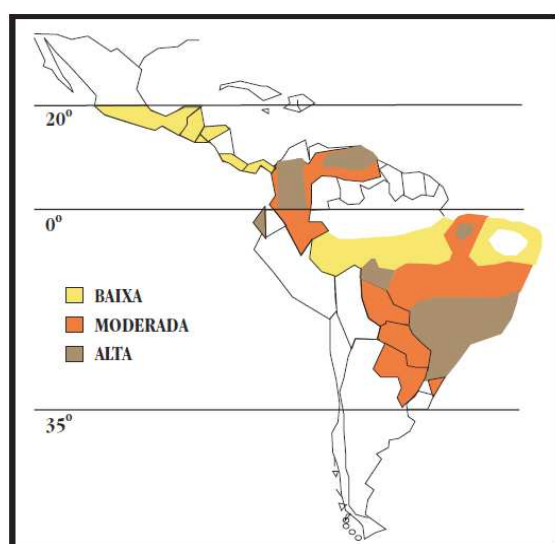


Figura 3- Distribuição geográfica da PCM.  
Fonte: SHIKANAI-YASUDA et al.(2006).

No Brasil, com exceção de alguns Estados (Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo e Paraná), a doença não é de notificação obrigatória, não sendo inserida em programas governamentais direcionados à prevenção, ao diagnóstico e ao tratamento dessa importante micose e de suas complicações e sequelas (MARTINEZ 2010; RESTREPO et al., 2011; BELLISSIMO-RODRIGUES et al., 2011). Entre os estados brasileiros, o Paraná, encontra-se em segundo lugar em índice da mortalidade pela doença, ficando atrás somente do estado de São Paulo (BITTENCOURT et al., 2005).

No Brasil, a endemidade está relacionada, principalmente, com as regiões agrícolas, pois são regiões onde o fungo encontra condições ecológicas favoráveis para o seu desenvolvimento, por exemplo, um solo e vegetação com umidade (PALMIEIRO et al., 2005).

A grande maioria das pessoas atingidas são as que têm contato prolongado com a terra, principalmente do sexo masculino, etilistas crônicos com condições de higiene, nutricionais e socioeconômicas precárias (MARTINEZ; MOYA, 1992). Há uma baixa incidência entre o sexo feminino que está relacionado ao fator protetor do hormônio estrogênio. O hormônio feminino 17- $\beta$ -estradiol é o responsável por essa inibição, pois, o fungo tem uma proteína de ligação com especificidade para esse hormônio, o que gera o impedimento da conversão da forma miceliana para a forma leveduriforme (SALAZAR et al., 1988).

Discute-se a importância epidemiológica resultante do isolamento do *P.brasiliensis* a partir do tatu (*Dasypus novemcinctus*) em regiões do Brasil e Colômbia. Destaca-se o achado de formas leveduriformes do fungo em amostras de baço e pulmão de tatus capturados, detectadas por exame direto ou histopatológico, neste último, em meio a processo inflamatório de padrão granulomatoso com formação de microabscessos (MARQUES, 2003).

Esses achados demonstram que alguns animais apresentavam, não apenas a infecção, mas paracoccidiodomicose doença. Os fatos de a distribuição territorial do *D. novemcinctus* na natureza se sobreporem, em grande parte, às áreas em que incide a paracoccidiodomicose doença e de ser animal de íntimo contato com o solo, com hábitos de vida que não o afastam grandes distâncias de sua toca, permitem que se delimite com maior precisão a área de possível reservatório do *P. brasiliensis* e, conseqüentemente, aquela em que o paciente se contamina (RESTREPO et al., 2001).

Os indivíduos desenvolvem um estado de hipersensibilidade quando infectados pelo fungo, o qual se põe em manifestação mediante a prova intradérmica com a paracoccidiodina, que se positiva de maneira rápida logo após o contato. Este teste se negativa nos estados anérgicos, onde é necessário um prognóstico mais específico (CAVALO et al., 2002). No emprego da paracoccidiodina, o antígeno é fabricado pela fase leveduriforme do *P.brasiliensis* (FAVA; FAVA NETTO, 1998), permitindo o estudo da epidemiologia desta micose nas áreas que possuem condições ambientais propícias para o desenvolvimento do fungo.

Em um inquérito epidemiológico com a paracoccidioidina na região de Sorocaba, Estado de São Paulo, utilizando antígeno polissacarídeo de Fava Neto, onde se obteve uma alta percentagem de reações positivas nas zonas rurais dessa região (49,6%), um nível expressivo de infecção que poderia ser atribuído às condições ecológicas favoráveis ao desenvolvimento do *P. brasiliensis* (BAGATIN, 1986).

A epidemiologia da infecção por *P. brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum* avaliada por Diogenes et al. (1990) no município de Pereiro – Ceará foi baseada em reações intradérmicas de leitura macroscópica do local de injeção do antígeno no antebraço, após 48 horas. O trabalho revelou a ocorrência de infecções de PCM e Histoplasmose. Como se detectou reatividade simultânea nas duas provas cutâneas é sugestivo a existência de reação cruzada ou a infecção simultânea pelos fungos *Histoplasma Capsulatum* e *P. brasiliensis*.

A proteína purificada de 43 KDa (gp43) obtida a partir de *P. brasiliensis* foi testada como paracoccidioidina em ensaios de DTH em animais experimentais e em pacientes com PCM e comparado com o polissacarídeo tradicional antígeno Fava Neto. O uso de gp43 como paracoccidioidina em seres humanos mostraram que esta molécula pode ser usada para avaliar a resposta de DTH em pacientes com PCM. Eles descobriram que os pacientes que eram sensíveis ao antígeno de *P. brasiliensis*, 92,3% reagiram contra gp43 e 53,8% reagiram contra antígeno Fava Netto. Respostas do teste cutâneo gp43 foram significativamente maiores do que os obtidos com o antígeno Fava Netto, demonstrando a eficácia desta preparação (SARAIVA et al., 1996).

O inquérito epidemiológico sobre a PCM, realizado por Fornajeiro et al. (2005) utilizando a gp43 em dois municípios do noroeste do Paraná, mostrou que a positividade das reações intradérmicas foi de 43% e sugere a necessidade de se estabelecer mecanismos que tornem possível o diagnóstico e terapêutica precoce para a PCM.

As frequentes migrações na população de nosso país também dificultam a interpretação dos resultados com Intradermorreação (IDR) que se baseiam na imunidade celular, sendo esta mantida por longos períodos, podendo refletir sensibilização ocorrida no passado, talvez em região geográfica distante da amostrada. O diagnóstico precoce da PCM é importante para evitar complicações que implicam em altos gastos econômicos e sociais que vão tornar a doença de grande relevância para saúde pública (MALUF et al., 2003).

A paracoccidioidomicose pode ser diagnosticada através de testes sorológicos que detectam o anticorpo contra o fungo no organismo anteriormente aos exames histopatológicos e de cultura, além de serem muito usados para a confirmação da doença. Durante a fase de

infecção pelo *P. brasiliensis* é secretado um antígeno exocelular glicoprotéico diagnosticado em todas as formas clínicas e usado nos testes sorológicos. Uma prática bastante útil que permite a avaliação da eficiência do tratamento é a detecção de anticorpos da classe IgM e IgA) assim como o sequenciamento desses anticorpos para o antígeno glicoproteico. (MENDES-GIANINNI et al., 1990).

A paracoccidioidomicose pode ocorrer em associação com AIDS, consequência da disseminação da infecção pelo HIV em pequenos centros urbanos, superpondo-se às regiões em que a infecção pelo *P. brasiliensis* é mais prevalente. Em teste de Immunoblot (IB) utilizando soro de pacientes com AIDS, a fração IgG anti-*P. brasiliensis* reage principalmente com a gp 43, sendo reconhecida em 100% dos casos. Embora a técnica IB seja extremamente sensível e específica, não é ainda acessível à rotina diagnóstica da PCM. A técnica de captura de antígeno em fluidos corporais, como, por exemplo, a detecção de antigenúria, tem sido sugerida como método promissor para diagnosticar PCM - doença, avaliar eficácia de tratamento e detectar recaídas ainda em estágios subclínicos. As técnicas utilizadas para tanto são IB ou ELISA, com sensibilidade oscilando entre 75% (ELISA) e 91,7% (IB).

Os testes sorológicos comumente usados no auxílio diagnóstico da PCM são: Imunodifusão Radial Dupla (IDD), ELISA, mas também existem trabalhos em que se fez a detecção de antígenos de *P. brasiliensis* em soro humano por Imunoradiometria (DA CRUZ et al., 1991) e de anticorpos por Imunoensaio de Captura Enzimática (CAMARGO et al., 1994).

A sorologia para a PCM, além de auxílio diagnóstico, tem a função de acompanhamento durante e após o tratamento antimicótico. A técnica utilizada, portanto, deve apresentar sensibilidade e especificidade, para que o valor preditivo seja máximo e reproduzível. Para tanto, o substrato antigênico é parte fundamental da técnica, e, nesse sentido, o mais importante avanço foi a identificação e purificação da gp 43 como o antígeno exocelular imunodominante, relatado como específico do *P. brasiliensis* (PUCCIA et al., 1986).

Por isso, quando o preparado do antígeno for composto apenas pela gp43, o esperado será especificidade de 100%. Porém, a gp43, não é uma molécula totalmente específica, pois sua fração carboidrato contém epítomos capazes de serem reconhecidos por soro heterólogo, principalmente, soros contendo anticorpos anti-*Histoplasma capsulatum* (PUCCIA; TRAVASSOS, 1991).

A reação de IDD em gel de agar é atualmente o principal método de diagnóstico sorológico da PCM. Tendo em vista a maior simplicidade do teste, a não necessidade de equipamentos de maior custo, a sensibilidade > 80% e a especificidade > 90%. Recomenda-se para IDD ou qualquer outro teste utilizado no diagnóstico de PCM que os soros sejam titulados, para melhor interpretação da resposta terapêutica, uma vez que os títulos de anticorpos diminuem progressivamente com o controle clínico da doença. É desejável que ocorra a negatização ou estabilização na diluição de 1:2 ou menos para considerar-se o critério de cura sorológica (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). Há a formação de uma linha de precipitação, devido à reação do anticorpo presente na amostra de soro que interage com um antígeno específico (CAMARGO et al., 1998).

É comum ocorrer reações cruzadas com outros organismos fúngicos, como *Histoplasma capsulatum*, e doença de Jorge Lobo. Para o diagnóstico de PCM com o teste de ELISA, de acordo com a especificidade é dependente da adsorção prévia do soro com *Candida albicans* ou *Histoplasma capsulatum* (CAMARGO et al., 1994).

A técnica utilizada, portanto, deve apresentar sensibilidade e especificidade, para que o valor preditivo seja máximo e reproduzível. Para tanto, o substrato antigênico é parte fundamental da técnica, e, nesse sentido, o mais importante avanço foi a identificação e purificação da gp 43 como o antígeno exocelular imunodominante, relatado como específico do *P. brasiliensis* (PUCCIA et al., 1986).

A técnica de Western Blot também foi usada para componentes de extrato leveduriforme de *P. brasiliensis* por Casotto (1990) e continham todos os antígenos identificados em soros de pacientes, havendo a detecção de anticorpos específicos para a PCM e também de reação cruzada com histoplasmose, candidíase e aspergilose. Demonstrando ser realmente uma ferramenta útil para o diagnóstico da PCM confirmando 87% dos casos (na combinação de 58, 57 e 45 KDa) e revelou heterogeneidade nas respostas dos soros dos pacientes.

Em um estudo retrospectivo foi avaliada a distribuição geográfica da PCM no estado brasileiro de São Paulo, com dados secundários a partir de análises sorológica realizada pela IDD de pacientes com suspeita de PCM, a partir de janeiro de 1999 a maio de 2010. Sessenta por cento dos 10.176 pacientes, de 239 cidades, foram sorologicamente reagentes para *P. brasiliensis*. As cidades que mostraram maior reatividade sorológica entre os pacientes foram São João da Boa Vista (85%), Piracicaba (75%), Sorocaba (73%), Campinas (72 %) e São Paulo (62%) (KAMIKAWA et al., 2012).

No estudo de Neves et al. (2003) soros de pacientes com IDD negativo, foram positivos no teste de ELISA com gp43 como antígeno para *P. brasiliensis*, entretanto, eles tinham baixo título de IgG quando comparado aos soros de IDD positivos. Observou-se também que quando os soros dos pacientes com PCM foram testados com gp43 tratado com metaperiodato de sódio, os valores de absorvância dos pacientes com IDD negativos caíram significativamente, atingindo densidades ópticas (DO) abaixo do corte. No entanto, os soros de IDD positivos tiveram uma diminuição significativa, mas com DO acima do corte. Esse trabalho comprovou a produção de IgG2 contra os antígenos, uma vez que se observou a diminuição da reatividade destes anticorpos contra gp43 tratado com metaperiodato de sódio. Ainda em Neves et. al. (2003) também foi determinada a avidéz dos anticorpos anti-gp43 calculada a partir da capacidade do anticorpo permanecer ligado ao antígeno na presença de ureia 6M (JENUM; STRAY-PEDERSEN; GUNDERSEN apud NEVES et al., 2003).

Foi realizado um estudo por Maluf et al. (2003) com o objetivo de determinar os níveis de anticorpos anti-*P. brasiliensis* em doadores de sangue da região noroeste do Paraná e avaliar a possibilidade da aplicação do teste de ELISA para a detecção de PCM infecção. Foram utilizados como controle negativo soros de 30 doadores de sangue provenientes da área urbana de Curitiba, e para o controle positivo, soros de pacientes comprovadamente reativos. Empregou-se como metodologia o teste de ELISA clássico, onde os 96 poços foram sensibilizados com o exo-antígeno *P. brasiliensis* B339 utilizando um filtrado de cultura do fungo que apresentava a molécula gp43. Como resultados admitiu-se como sensibilizados os soros que apresentaram densidade ótica acima do dobro da média dos controles negativos, denominado em sorologia ponto de exclusão ou cut-off. 27% dos indivíduos apresentaram anticorpos anti *P. brasiliensis* acima desse nível, e 73% dos soros foram considerados não sensibilizados.

O teste de ELISA foi o de escolha por apresentar alta sensibilidade em estudos sobre a PCM e por ser utilizado para triagem sorológica. O uso de antígeno com expressiva quantidade de gp43, é importante na busca de alto grau de especificidade, pois essa molécula induz resposta de anticorpos em 100% dos pacientes portadores de PCM o que não ocorre com soro de indivíduos normais. No entanto, tendo em vista a alta sensibilidade da técnica de ELISA não pode ser descartada a possibilidade de reações cruzadas especialmente com histoplasmose, leishmaniose e doença de Chagas que são comuns na região do Paraná (MALUF et al., 2003).

Na literatura encontram-se trabalhos em que se avaliou a prevalência ou soro prevalência da PCM em regiões endêmicas da doença, para tais estudos foram utilizados os testes rotineiros de diagnóstico de PCM, IDR, IDD, ELISA e Western Blot (MARQUES et al., 2003). No entanto, testes sorológicos tradicionais apresentam reatividade cruzada com outras doenças fúngicas e podem gerar resultados falsos-negativos ou falsos-positivos. Isso ocorre com o teste de ELISA (CAMARGO et al., 1994). Tentativas de melhoria diagnóstica foram realizadas utilizando metaperiodato de sódio e ureia (NEVES et al., 2003; ALBUQUERQUE et al., 2005), mas não foram empregadas em levantamento soroepidemiológico para PCM.

Dados de levantamento preliminar da prevalência em área rural do município de Alfenas mostram uma dissociação entre os resultados da IDR e o teste de ELISA convencional (IDR negativo e ELISA positivo e vice versa) (RIBEIRO; PERES, 2011). Neste trabalho avaliou-se a possibilidade do emprego de reação sorológica (ELISA) como forma alternativa a IDR para indicar a sensibilização de moradores de áreas rurais a antígenos de *P. brasiliensis*. Para diminuir possíveis falsos resultados esse trabalho propôs o uso do teste de ELISA tratado com ureia 6M, como uma estratégia de levantamento da prevalência sorológica da PCM, utilizando soros de indivíduos moradores da zona rural de Alfenas expostos ao *P. brasiliensis*.

## 2 OBJETIVO

A seguir serão citados os objetivos.

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a soroprevalência da paracoccidiodomicose infecção em área endêmica pelo teste de ELISA antes e após a adição de solução de ureia 6M e intradermorreação.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Realizar o teste de ELISA utilizando antígeno bruto de *P. brasiliensis* em amostras de soros de moradores da região rural de Alfenas, MG;
- b) Comparar os resultados obtidos através o teste de ELISA de ELISA convencional, com os resultados o teste de ELISA após adição de solução de ureia 6M;
- c) Comparar esses resultados por idade e sexo;
- d) Comparar os resultados o teste de ELISA convencional e na presença de solução de ureia 6M com a intradermorreação.



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir serão citados os materiais e métodos.

#### 3.1 LOCAL DE ESTUDO

O estudo foi realizado com moradores residentes no município de Alfenas, Minas Gerais. Localizado na região sul de Minas Gerais, a 335 km de Belo Horizonte, a capital do Estado. A região possui clima tropical mesotérmico, temperatura média anual de 19,6°C e um índice pluviométrico anual de 1592,7 mm. Alfenas possui uma área geográfica de 848,320 km<sup>2</sup>, população de 74.505 habitantes com densidade de 91,3 hab./km<sup>2</sup>.

#### 3.2 TIPO DE ESTUDO E CONSCIENTIZAÇÃO DOS MORADORES DE LOCALIDADES RURAIS

Foi realizado um estudo epidemiológico com os dados de moradores no período de maio a dezembro de 2009. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alfenas de acordo com o protocolo número 23087.004231/2008-41.

A amostra foi constituída por demanda espontânea sem distinção de sexo de 15 a 89 anos de idade. Foi adotado como critério de exclusão o relato de infecção prévia e tratamento para PCM e gravidez.

Foi realizado preenchimento de ficha cadastral com dados pessoais contendo nome completo, data de nascimento, profissão, estado civil, sexo, local de residência, cidade de nascimento, telefone para contato, informações relativas ao estado de saúde geral, medicações em uso, braço em que foi realizado o teste de IDR, data e resultado. Além disso, todos os participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido concordando em participar do teste e permitindo a utilização dos dados para fins científicos.

Foi estruturado um banco de dados com as informações disponíveis, utilizando o programa EXCELL (2010). Os dados coletados foram codificados, utilizando-se um manual de codificação especialmente elaborado para o estudo.

Em conjunto com a Secretária de saúde de Alfenas, realizou-se encontro com os agentes de saúde com o objetivo de agendar oficinas, que foram desenvolvidas na UNIFAL-MG. Estas foram promovidas aos agentes de saúde e outros profissionais relacionados da Prefeitura de Alfenas, bem como aos alunos ligados da UNIFAL-MG. Com auxílio dos agentes de saúde, foi realizada uma prévia divulgação da PCM por panfletos durante as visitas médicas para os moradores, programadas pela Prefeitura de Alfenas. Posteriormente foram programados também o local de visita, data e horário para divulgação da PCM, além de gerar esclarecimentos sobre a PCM à comunidade, por meio de ensaios teatrais.

Nas figuras 4 e figura 5 estão expostos os folders para divulgação do trabalho e esclarecimento dos moradores, a apresentação teatral explicando o assunto, e o preenchimento de fichas cadastrais, fases realizadas por alunos participantes do trabalho e professor.

 <h2 style="color: red;">Paracoccidioidomicose</h2> <p>É uma doença causada por um fungo encontrado nas plantas e no solo. Afeta principalmente pessoas que lidam diretamente com o manuseio da terra.</p>  <p>Pode gerar lesões no pulmão, pele, mucosas e em outras partes do corpo.</p>   <p>Para descobrir se você entrou em contato com o fungo, faça um teste no qual é feita a injeção de um líquido no seu braço e 48 horas depois volte para confirmar o resultado pela medição de uma área avermelhada que poderá aparecer ou não. Após a leitura você será encaminhado ao serviço médico para confirmação do diagnóstico e tratamento se necessário.</p>   	 <h2 style="color: red;">Paracoccidioidomicose</h2> <p>Você sabe o que é ?</p>	<h3>O QUE É PARACOCIDIOMICOSE ?</h3>  <p>É uma doença causada por um fungo encontrado nas plantas e no solo. Afeta principalmente pessoas que lidam diretamente com o manuseio da terra.</p> <h3>COMO SE ADQUIRE ?</h3>  <p>Você pode pegar a doença ao respirar as partículas do fungo que estão suspensas no ar, durante o manuseio do trabalho rural. Essas partículas depositam-se dentro do seu corpo e podem atingir vários locais. O contato com o solo não apresenta risco de contágio.</p> <h3>O QUE ELA CAUSA ?</h3> <p>No início a doença pode não apresentar sintomas. Mas depois podem aparecer febre no peito, tosse, problemas nos pulmões, nervos e outras partes do corpo.</p>
	<h3>COMO SABER SE TIVE CONTATO ?</h3> <p>Através de um teste onde é feita a injeção de antígeno do fungo no braço e 48 horas depois pode aparecer no local da injeção uma área avermelhada e endurecida. O teste não transmite a doença.</p>    <h3>SE DER POSITIVO O QUE EU FAÇO ?</h3> <p>Deve procurar o médico para fazer o diagnóstico clínico e laboratorial.</p>	<h3>COMO TRATAR A DOENÇA ?</h3>  <p>Existem medicamentos como os antifúngicos que devem ser tomados sob orientação médica.</p>  <h3>COMO PREVENIR ?</h3> <p>Não existem vacinas ainda disponíveis. Assim, o melhor a fazer é realizar os testes e fazer a consulta com médico especialista</p>

Figura 4- Divulgação e conscientização do trabalho.

Fonte: Do autor.



Figura 5- Peça teatral e preenchimento das fichas cadastrais.

Fonte: Do autor.

### 3.3 PARACOCCIDIOIDINA

O antígeno utilizado no presente trabalho para o teste intradérmico foi o exoantígeno de *P. brasiliensis*, rico de gp43 foi referido como paracoccidioidina gp43 (SARAIVA et al., 1996). No preparo da paracoccidioidina utilizou-se a cepa *P. brasiliensis* B-339, bastante utilizada para produção de antígenos em toda a América Latina. No preparo da paracoccidioidina para uso intradérmico, a concentração protéica foi ajustada a 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (estéril e apirogênica), de modo a se usar 6  $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$  para o teste. A concentração de gp43 na paracoccidioidina era superior a 70%. O antígeno foi obtido através do Prof. Zoilo Pires de Camargo da UNIFESP-SP.

### 3.4 INTRADERMORREAÇÃO

Foi aplicado 0,1 mL da paracoccidioidina no terço médio ventral do braço esquerdo de cada paciente, em caso de impossibilidade de aplicação no braço esquerdo, o teste era realizado no braço direito. A leitura é feita após 48 h, onde foram consideradas positivas as indurações com diâmetro igual ou superior a 5 mm. Após a aplicação

intradérmica do antígeno, os moradores foram informados sobre o dia de retorno para leitura do mesmo e coleta de sangue.

Na figura 6 é possível observar realização do teste de intradermorreação, a formação da reação e a leitura do teste.

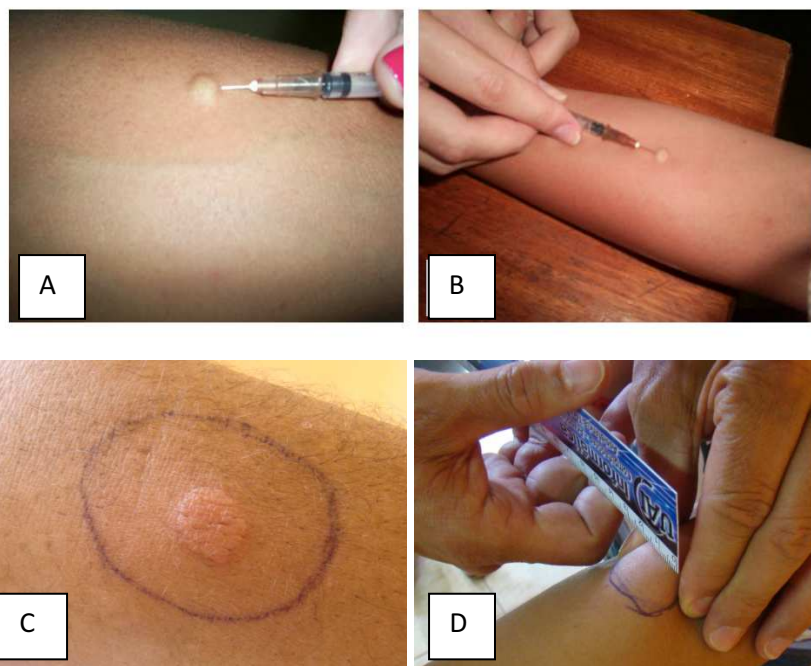


Figura 6- Realização do teste de intradermorreação. A e B: Aplicação da paracoccidioidina. C: Reação após 48 h e D: Leitura do teste.

Fonte: Do autor.

### 3.5 TESTE DE ELISA CONVENCIONAL

O teste de ELISA indireto foi realizado conforme descrito por Camargo e colaboradores (1984) com modificações. Placas de poliestireno de fundo chato com 96 poços (NUNC) foram sensibilizadas com antígeno bruto do *P. brasiliensis* na concentração de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por poço, em tampão carbonato-bicarbonato pH 9.6. Em seguida, a placa permaneceu “overnight” a 4°C. A placa foi lavada 5 vezes com solução de lavagem, retirando o excesso de solução. Posteriormente, a placa foi bloqueada com 150  $\mu\text{L}$  por poço com solução de leite desnatado (Molico®) a 5% em PBS-TWEEN 0,05% e incubada por uma hora em estufa a

37°C. As placas foram lavadas novamente cinco vezes com PBS-TWEEN 0,05% e retirado o excesso de solução.

Foram feitas as diluições dos soros dos moradores, controles positivos e negativos (1/200) em PBS-TWEEN-gelatina 0,3%. Estas diluições resultaram em volume final nas cavidades das placas de ELISA de 100 µL. Incubou-se a placa durante uma hora a 37°C. Estas foram lavadas cuidadosamente 5 vezes com solução de lavagem para retirar o excesso de solução.

Adicionou-se 100 µL de conjugado (IgG anti-humana marcada com peroxidase – (SIGMA) na diluição de 1:7500 por poço de cada placa, com incubação por uma hora a 37°C. As placas foram lavadas 5 vezes com solução de lavagem e retirado o excesso de solução. Em cada poço da placa foi colocado 100 µL do substrato o-fenilenodiamina (OPD-SIGMA) em tampão citrato 0,1M pH 4.5 e deixando em repouso por oito minutos em câmara escura. A reação foi paralisada pela adição de 30 µL de ácido sulfúrico 2N por poço. A leitura foi feita em espectrofotômetro (Zenyth 200 rt) no comprimento de onda de 492 nm. O teste de ELISA foi realizado utilizando soros de moradores positivos e negativos para o teste de IDR. O ponto de corte foi estabelecido pela média das densidades ópticas dos soros dos indivíduos negativos (controle negativo) acrescidos duas vezes o desvio padrão.

### 3.6 TESTE DE ELISA TRATADO COM UREIA

Uma estratégia adotada na melhoria do método consistiu na adição de solução ureia 6M. Este protocolo foi realizado de acordo com Namujju e colaboradores (2011) com algumas modificações, pois pacientes com diferentes infecções podem apresentar anticorpos de alta e baixa afinidade, e a ureia possui a propriedade de quebrar as ligações inespecíficas entre antígeno e anticorpo, diminuindo assim a ocorrência de reação cruzada. O tratamento do anticorpo com solução de ureia 6M provoca uma dissociação na ligação antígeno-anticorpo de baixa afinidade, o que diminui as reações cruzadas, devido à diminuição de ligações inespecíficas (RAHBARI et al., 2012). Após o período de incubação das amostras de soros, 100 µL/poço da solução de ureia 6M em PBS-Tween 0,05 % foi adicionada em câmara escura durante 5 min., em temperatura ambiente. As placas foram lavadas 5 vezes com solução de lavagem e foi retirado o excesso de solução. E nas etapas seguintes seguiu-se o mesmo

protocolo do Teste de ELISA convencional. A figura 7 representa a fotografia de uma placa de ELISA feita pelo autor, na realização dos experimentos do trabalho.

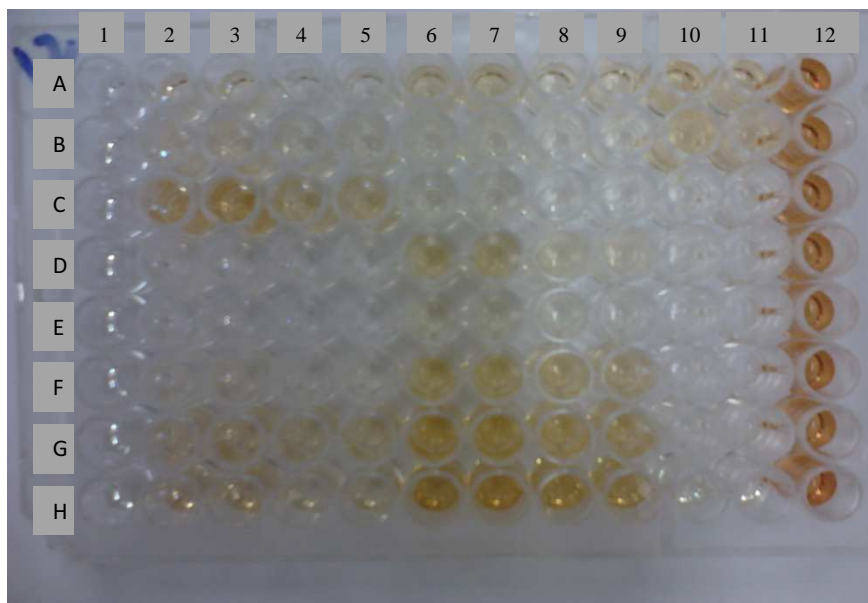


Figura 7- Fotografia de uma placa do teste de ELISA.

Nota: Nas colunas 2, 3, 6, 7 e 10 foi feito o teste de ELISA convencional, e nas colunas 4, 5, 8, 9 e 11 o teste de ELISA com ureia, a coluna 1 é o branco e a 12 o controle interno (Ig diluída 1/20). Os soros controle positivos estão nas linhas G e H das colunas 6 à 9 e nas linhas A e B das colunas 10 e 11, os controles negativos estão nas linhas C, D, E, F, G, H, das colunas 10 e 11.

Fonte: Do autor.

### 3.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o programa SPSS versão 16 (2007). Foi realizada análise da distribuição de frequência das principais variáveis, com o objetivo de caracterizar a população atendida no estudo. Para as variáveis contínuas, foram calculadas a média, mediana e quartis. A existência de associação entre as variáveis categóricas serão comparadas utilizando o teste do Qui-quadrado.

Na comparação dos testes de ELISA foi utilizado o resultado positivo ou negativo e não os valores de densidade ótica obtidos com as leituras das placas de ELISA.

O método estatístico usado para avaliação da concordância entre métodos foi o método de Kappa, que consiste no cálculo de um coeficiente de correlação interclasses, considerando também probabilidade.

Assim, temos que  $k = [\text{Pr}(x) - \text{Pr}(e)]/[1-\text{Pr}(e)]$ , em que  $k$  expressa a correlação entre os resultados,  $\text{Pr}(x)$  expressa a concordância observada entre determinada classe e  $\text{Pr}(e)$  expressa a probabilidade global de acordo aleatório.

Tabela 1- Interpretação dos valores de  $k$ .

K	Interpretação
<0	Sem acordo
0,0-0,20	Acordo ligeiro
0,21-0,4	Acordo “fair”
0,41-0,60	Moderada concordância
0,61-0,80	Acordo substancial
0,81-1,00	Concordância quase perfeita

Nota: K=correlação entre os resultados

Fonte: KREIGE,(2004).

#### 4 RESULTADOS

No ano de 2009 foi realizado um levantamento da prevalência de anticorpos anti-*P.brasiliensis* em Alfenas por intradermoreação utilizando exoantígeno do *P. brasiliensis* rico no antígeno gp 43 em 542 moradores de áreas rurais da cidade de Alfenas. Neste estudo, a prevalência obtida foi de 46.67% (253) (Magalhães et al., 2014, no prelo). A partir desta amostra selecionou-se uma coorte de 235 soros de moradores que trabalharam ou ainda trabalham em lavouras de café da região rural do município de Alfenas, todos com teste de imunodifusão radial dupla negativo para realização dos testes de ELISA. A Caracterização da amostra quanto o número, sexo e idade pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2- Distribuição por sexo e faixa etária de moradores submetidos ao teste de ELISA para detecção de anticorpos anti-*P. brasiliensis*.

Variáveis	Nº de indivíduos	%
<b>Sexo</b>		
Feminino	103	43,83
Masculino	132	56,17
Total	235	100,00
<b>Faixa etária</b>		
10-29	48	20,96
30-49	105	44,68
> =50	82	35,81
Total	235	100,00
<b>Idade (anos)</b>		
Mín. – Máx.	15-89	
Média (DP)	43,56	
Desvio Padrão	15,54	

Fonte: Do autor.



Por sua vez, a distribuição da frequência de indivíduos positivos e negativos entre os testes de intradermoreação e o teste de ELISA é mostrada na Tabela 3. Pode se observar uma prevalência de 68,94% para intradermoreação e 70,64% para ELISA (convencional) e uma prevalência de 55,74% de indivíduos positivos quando o teste de ELISA foi realizado na presença de ureia 6M.

Tabela 3- Distribuição da frequência do teste intradérmico e dos testes de ELISA positivos e negativos de pacientes de área endêmica para PCM no ano de 2009 em Alfenas, MG.

Variáveis	Nº de indivíduos	%
<b>Teste intradérmico</b>		
Negativo	73	31,06
Positivo	162	68,94
Total	235	100,00
<b>ELISA convencional</b>		
Negativo	69	29,36
Positivo	166	70,64
Total	235	100,00
<b>ELISA presença de ureia 6M</b>		
Negativo	104	44,26
Positivo	131	55,74
Total	235	100,00

Fonte: Do autor.

Na Tabela 4 é mostrada a distribuição da frequência de soros positivos e negativos no teste de ELISA convencional por sexo e faixa etária. 31,06% de indivíduos positivos eram do sexo feminino, e 39,57% do sexo masculino (P= 0,531). Na distribuição por faixa etária, o maior número de soros positivos está na faixa de 30-49 anos (31,06%) (P=0,602).

Tabela 4- Distribuição da frequência de indivíduos positivos e negativos no teste de ELISA convencional por sexo e por faixa etária de moradores de área endêmica para PCM no ano de 2009 em Alfenas, MG.

	Variáveis	Nº de indivíduos	%	P
<b>Sexo Feminino</b>				
	Negativo	30	12,77	P= 0,531
	Positivo	73	31,06	
	Total	103	43,83	
<b>Sexo Masculino</b>				
	Negativo	39	16,60	
	Positivo	93	39,57	
	Total	132	56,17	
<b>Faixa etária</b>				
11-29 anos	Negativo	16	6,81	P=0,602
	Positivo	32	13,62	
	Total	48	20,43	
Faixa etária 30-49 anos	Negativo	32	13,62	
	Positivo	73	31,06	
	Total	105	44,68	
Faixa etária > = 50 anos	Negativo	21	8,94	
	Positivo	61	25,96	
	Total	82	34,89	

Fonte: Do autor.

Na Tabela 5 é mostrada a distribuição da frequência de indivíduos positivos e negativos quanto ao sexo e faixa etária no teste de ELISA na presença de ureia 6M. O percentual de indivíduos positivos no sexo feminino foi de 21,28% (50), e do sexo masculino foi de 34,47% (81) (P= 0,034). Na distribuição por faixa etária, o maior número de positivos encontra-se na faixa  $\geq 50$  anos sendo de 22,98% (P= 0,074).

Tabela 5- Distribuição da frequência de indivíduos positivos e negativos no teste de ELISA com ureia por sexo e faixa etária de moradores de área endêmica para PCM no ano de 2009 em Alfenas, MG.

Variáveis	Nº de indivíduos	%	P
<b>Sexo Feminino</b>			
Negativo	53	22.55	
Positivo	50	21.28	
Total	103	43.83	
<b>Sexo Masculino</b>			
Negativo	51	21.70	P= 0,034
Positivo	81	34.47	
Total	132	56.17	
<b>Faixa etária</b>			
<b>11-29 anos</b>			
Negativo	24	10.21	
Positivo	24	10.21	
Total	48	20.43	
<b>Faixa etária</b>			
<b>30-49 anos</b>			
Negativo	52	22.13	P= 0,074
Positivo	53	22.55	
Total	105	44.68	
<b>Faixa etária</b>			
<b><math>\geq 50</math> anos</b>			
Negativo	28	11.91	
Positivo	54	22.98	
Total	82	34.89	

Fonte: Do autor.

No teste intradérmico a maior frequência de indivíduos positivos se encontra no sexo masculino (77,77%) quando comparado ao sexo feminino (58,25%). Dentro das faixas etárias, a que tem maior índice de positividade é a faixa de 30 a 49 anos.

Tabela 6- Distribuição da frequência de indivíduos positivos e negativos no teste intradérmico por sexo e faixa etária de moradores de área endêmica para PCM no ano de 2009 em Alfenas, MG.

Variáveis	Nº de indivíduos	%
<b>Sexo Feminino</b>		
Negativo	43	41,75
Positivo	60	58,25
Total	103	100
<b>Sexo Masculino</b>		
Negativo	30	22,23
Positivo	102	77,77
Total	132	100
<b>Faixa etária</b>		
<b>11-29 anos</b>		
Negativo	21	43,75
Positivo	27	56,25
Total	48	100
<b>Faixa etária</b>		
<b>30-49 anos</b>		
Negativo	30	28,57
Positivo	75	71,43
Total	105	100
<b>Faixa etária</b>		
<b>&gt; = 50 anos</b>		
Negativo	22	26,83
Positivo	60	71,17
Total	82	100

Fonte: Do autor.

Quando se analisa a comparação entre o teste intradérmico e o teste de ELISA convencional pode-se observar que houve uma concordância de 57,41%, sendo 8,51% em relação aos negativos e 48,9 % aos positivos. Houve uma discordância de 42,90%, sendo 22,5% em relação aos indivíduos positivos no teste de ELISA convencional e negativos na IDR (P= 0,389) (Tabela 7).

Tabela 7- Comparação entre o teste intradérmico e o teste de ELISA convencional de moradores de área endêmica para PCM no ano de 2009 em Alfenas, MG.

IDR				
ELISA convencional	Negativos	Positivos	Total	P
Negativos	20 (8,51%)	49 (20,85%)	69 (29,36%)	P= 0,389
Positivos	53 (22,5%)	113 (48,9%)	166 (70,64%)	
Total	73 (31,06%)	162 (68,94%)	235 (100%)	

Fonte: Do autor.

Na Tabela 8 tem-se a comparação entre o teste intradérmico e ELISA com ureia. A concordância entre os testes foi de 55,32%, sendo que a percentagem de resultados negativos nos dois testes foi de 15,32% e de positivos de 40%. A discordância entre os dois testes foi de 44,68% sendo 15,74% positivos na IDR e negativos no ELISA e 28,94 % positivos na IDR e 15,74% negativos na IDR e positivos no teste de ELISA (P= 0,182).

Tabela 8- Comparação entre o teste intradérmico (IDR) e ELISA com ureia de moradores de área endêmica para PCM no ano de 2009 em Alfenas, MG.

IDR				
ELISA com ureia	Negativos	Positivos	Total	P
Negativos	36 (15,32%)	68 (28,94%)	104 (44,26%)	P= 0,182
Positivos	37 (15,74%)	94 (40%)	131 (55,74%)	
Total	73 (31,06%)	162 (68,94%)	235 (100%)	

Fonte: Do autor.

Pode-se observar na Tabela 9 a comparação geral entre os dois testes de ELISA. Tem-se um percentual de concordância de resultados de 83,4%, sendo a concordância entre os resultados negativos de 28,51%, e entre os resultados positivos de 54,89%. Quando a discordância, ela atingiu um percentual de 16,39%, sendo 15,54% de positivos no teste de ELISA convencional e negativos em ELISA com ureia, 0,85% de negativos no teste de ELISA convencional e positivos em ELISA com ureia (P= 0,000).

Tabela 9- Comparação dos testes de ELISA com ureia e o teste de ELISA convencional de moradores de área endêmica para PCM no ano de 2009 em Alfenas, MG.

ELISA com ureia				
ELISA convencional	Negativos	Positivos	Total	P
Negativos	67 (28,51%)	2 (0,85%)	69 (29,36%)	P= 0,000
Positivos	37 (15,54%)	129 (54,89%)	166 (70,64%)	
Total	104 (44,26%)	131 (55,74%)	235 (100%)	

Fonte: Do autor.

Avaliando o efeito do sexo feminino, o percentual de resultados negativos nos dois testes é de 28,16%, já em relação aos resultados positivos esse número chega a 47,57%. Quando se observa os positivos no teste de ELISA convencional e negativos em ELISA com ureia, temos um percentual de 23,30% e de 0,97% negativos no teste de ELISA convencional e positivos no teste de ELISA com uréia (Tabela 10) (P= 0,000).

Tabela 10 - Comparação entre o teste de ELISA com ureia e ELISA convencional considerando o sexo feminino de moradores de área endêmica para PCM no ano de 2009 em Alfenas, MG.

ELISA com ureia				
ELISA convencional	Negativos	Positivos	Total	P
Negativos	29 (28,16%)	1 (0,97%)	30 (29,13)	P= 0,000
Positivos	24 (23,30%)	49 (47,57%)	73 (70,87%)	
Total	53 (51,46%)	50 (48,54%)	103 (100%)	

Fonte: Do autor.

A Tabela 11 apresenta a comparação dos dois testes de ELISA considerando o sexo masculino. O número de negativos encontrado nos dois testes, é de 28,79%. Em relação aos positivos em ambos os testes esse percentual atinge 60,61%. Quando se analisa a discordância entre os resultados positivos no teste de ELISA convencional e negativos em ELISA com ureia, esse percentual cai para 9,85%, essa discordância é de somente 0,76%, quando se analisa os resultados negativos em ELISA convencional e positivos no teste de ELISA com ureia (P= 0,000).

Tabela 11- Comparação entre o teste de ELISA com ureia e ELISA convencional considerando o sexo masculino de moradores de área endêmica para PCM no ano de 2009 em Alfenas, MG.

ELISA com ureia				
ELISA convencional	Negativos	Positivos	Total	P
Negativos	38 (28,79%)	1 (0,76%)	39 (29,55%)	P= 0,000
Positivos	13 (9,85%)	80 (60,61%)	93 (70,45%)	
Total	51 (38,64)	81 (61,36%)	132 (100%)	

Fonte: Do autor.

Considerando a variável faixa etária de 11 à 29 anos sobre a comparação entre os dois testes de ELISA. Os resultados negativos em ambos os testes atinge um percentual de 33,33%, já o percentual de positivos em ambos os testes chega a 50%. Quando se analisa o percentual de positivos em ELISA convencional, e negativos no teste com ureia temos uma discordância de 16.67% (Tabela 12) (P= 0,000).

Tabela 12- Comparação entre o teste de ELISA com ureia e ELISA convencional considerando a faixa etária de 11 à 29 anos de moradores de área endêmica para PCM no ano de 2009 em Alfenas, MG.

ELISA com ureia				
ELISA convencional	Negativos	Positivos	Total	P
Negativos	16 (33,33%)	0 (0%)	16 (33,33%)	P= 0,000
Positivos	8 (16,67%)	24 (50%)	32 (66,67%)	
Total	24 (50,00%)	24 (50,00%)	48 (100,00%)	

Fonte: Do autor.

Em relação à faixa etária de 30 à 49 anos, em ambos os testes de ELISA, os resultados negativos nos dois testes atinge um percentual de 29,52%, e a concordância entre os positivos em ambos o testes é 49,52%. É possível observar que o percentual de discordância entre os resultados positivos em ELISA convencional e negativos em ELISA com ureia é 20% (Tabela 13) (P= 0,000).

Tabela 13- Comparação entre o teste de ELISA com ureia e ELISA convencional considerando a faixa etária de 30 à 49 anos de moradores de área endêmica para PCM no ano de 2009 em Alfenas, MG.

ELISA com ureia				
ELISA convencional	Negativos	Positivos	Total	P
Negativos	31 (29,52%)	1 (0,95%)	32 (30,48%)	P= 0,000
Positivos	21 (20,00%)	52 (49,52%)	73 (69,52%)	
Total	52 (49,52%)	53 (50,48%)	105 (100%)	

Fonte: Do autor.

Por sua vez a comparação na faixa etária maior ou igual a 50 anos, de ambos os testes de ELISA é mostrada na tabela 13. É possível observar um percentual de 24,39% de resultados negativos em ambos os testes, e o número de resultados positivos atinge um percentual de 64,63%. (P= 0,000).

Tabela 14- Comparação de positivos e negativos entre o teste de ELISA com ureia e ELISA convencional considerando a faixa etária maior ou igual a 50 anos de moradores de área endêmica para PCM no ano de 2009 em Alfenas, MG.

ELISA com ureia				
ELISA convencional	Negativos	Positivos	Total	P
Negativos	20 (24,39%)	1 (1,22%)	21 (25,61%)	P= 0,000
Positivos	8 (9,76%)	53 (64,63%)	61 (74,39%)	
Total	28 (34,15%)	54 (65,85%)	82 (100,00%)	

Fonte: Do autor.

Como se obteve uma diferença significativa em todas as faixas etárias, quando se comparado os dois testes de ELISA convencional e na presença de ureia 6M, é possível se observar que quando se faz uso da ureia para tratamento dos soros, se obtém resultados distintos, de quando se faz uso somente da ELISA convencional.

Com a análise do teste de Kappa realizada entre os testes de ELISA convencional e ELISA com ureia obteve-se uma boa concordância (Kappa =0,6516) (Tabela 15).



Tabela 15- Comparação entre os resultados positivos e negativos dos testes de ELISA convencional e ELISA com ureia pelo teste de Kappa.

Concordância	Concordância esperada	Kappa	Erro padrão	Z	Prob>Z
83.40%	52.37%	0.6516	0.0620	10.52	0.0000

Fonte: Do autor.

Quando comparados os resultados entre o teste de ELISA convencional e IDR, pode-se observar que a concordância entre eles é nula ou inexistente (Tabela 16).

Tabela 16- Comparação entre os resultados positivos e negativos dos testes de ELISA convencional e IDR pelo teste de Kappa.

Concordância	Concordância esperada	Kappa	Erro padrão	Z	Prob>Z
56.22%	57.95%	-0.0411	0.0655	-0.63	0.7349

Fonte: Do autor.

Na análise da comparação entre os resultados positivos e negativos dos testes de ELISA com ureia e teste intradérmico, a concordância obtida pelo teste de Kappa foi ligeira (Kappa=0,0570) (Tabela 17).

Tabela 17- Comparação entre os resultados positivos e negativos dos testes de ELISA com ureia e IDR pelo teste de Kappa.

Concordância	Concordância esperada	Kappa	Erro padrão	Z	Prob>Z
54.94%	52.21%	0.0570	0.0629	0.91	0.1826

Fonte: Do autor.

## 5 DISCUSSÃO

A paracoccidioidomicose é uma micose sistêmica crônica granulomatosa causada pelo fungo termo-dimórfico *P.brasiliensis*. A infecção pode acometer a pele, mucosas, linfonodos e os órgãos internos, resultando na maioria das vezes em doença crônica grave (RESTREPO et al., 2011). É uma das micoses sistêmicas mais importantes da América Latina, tendo alta prevalência na Venezuela, Colômbia e Argentina. A maior prevalência da doença no Brasil encontra-se nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (FORNAJEIRO et al., 2005).

Um diagnóstico definitivo da PCM inclui a observação direta das células fúngicas leveduriformes com múltiplos brotamentos, em fluidos biológicos e secções de tecido ou o isolamento do fungo a partir de espécimes humanos. Contudo, os testes sorológicos geralmente fornecem resultados mais cedo do que a cultura e histopatologia e podem ser de grande ajuda no diagnóstico da doença. Boas preparações antigênicas são necessárias.. O principal antígeno presente em todo o crescimento da forma leveduriforme do *P. brasiliensis*, é a gp 43. No entanto, de diversos pesos moleculares (20 KDa, 21 KD, 52 KD, 94 KD e 100 KD) estão presentes, porém o que mais predomina é a gp 43 KDa (CAMARGO et al., 1998).

Os testes sorológicos comumente usados no auxílio diagnóstico da PCM são: IDD, CIE, ELISA, mas também existem trabalhos em que se fez a detecção de antígenos de *P.brasiliensis* em soro humano por imunoradiometria (DA CRUZ et al., 1991) e de anticorpos por imunoensaio de captura enzimática (CAMARGO et al., 1994). É comum ocorrer reações cruzadas com outros organismos fúngicos, como *Histoplasma capsulatum*, e doença de Jorge Lobo (CAMARGO et al., 1994).

No presente estudo, realizou o levantamento da prevalência da PCM-infecção com 235 moradores de áreas rurais do município de Alfenas. A maioria destes indivíduos era do sexo masculino (56,17%) e estavam situados na faixa etária de 30-49 anos (Tabela 2). A prevalência avaliada por IDR e pelo teste de ELISA convencional foi parecida (68,04%, e 70,64% respectivamente). Por sua vez, ao se avaliar a prevalência utilizando o teste de ELISA tratado com ureia 6M, a soroprevalência obtida foi de 55,75% (Tabela 3). Acredita-se que a diminuição em 14,9% de resultados positivos no teste de ELISA tratado com ureia quando comparado com o teste de ELISA convencional foi devido ao tratamento das amostras de soro com solução de ureia 6M, o que provoca uma dissociação na ligação antígeno-anticorpo

fracas, diminuindo desta forma as reações cruzadas, levando à diminuição de ligações inespecíficas (RAHBARI et al., 2012).

Em Neves et al. (2003) foi determinada a avidéz dos anticorpos anti-gp43 calculada a partir da capacidade do anticorpo permanecer ligado ao antígeno na presença de ureia 6M (JENUM; STRAY-PEDERSEN; GUNDERSEN apud NEVES et al., 2003).

No estudo de Maluf et al. (2003) com o objetivo de determinar os níveis de anticorpos anti-*P. brasiliensis* em doadores de sangue da região noroeste do Paraná e avaliar a possibilidade da aplicação do teste de ELISA para a detecção de PCM infecção. Como resultados admitiu-se como sensibilizados os soros que apresentaram densidade ótica acima do dobro da média dos controles negativos (cut-off) 27% dos indivíduos apresentaram anticorpos anti *P. brasiliensis* acima desse nível, e 73% dos soros foram considerados não sensibilizados.

Os dados apresentados mostram a distribuição da frequência de soros positivos e negativos em ambos os sexos no teste de ELISA convencional. No sexo feminino encontra-se um percentual um pouco menor de indivíduos positivos em relação ao sexo masculino (Tabela 4). Em todos os testes de ELISA a maior frequência de positividade foi em indivíduos do sexo masculino (39,57; 34,47 e 77,77% para ELISA Convencional, ELISA com ureia e IDR, Tabelas 4, 5, e 6 respectivamente). Assim como em Ribeiro; Peres (2011), onde o sexo masculino na amostra selecionada foi o grupo de maior positividade para os testes de ELISA com antígeno bruto e ELISA com gp43 tratada com metaperiodato.

A prova intradérmica não atinge 90% de positividade quando realizada em número significativo de casos da doença, não sendo recomendável sua utilização para o diagnóstico da paracoccidiodomicose doença. A maior importância da reação intradérmica é descobrir casos de paracoccidiodomicose infecção e investigar a epidemiologia da doença. Em um inquérito epidemiológico com a paracoccidiodina na região de Sorocaba, Estado de São Paulo, se obteve uma alta percentagem de reações positivas nas zonas rurais dessa região (49,6%), (BAGATIN et al., 1986).

Quando se analisa a distribuição por sexo do teste de ELISA com ureia (Tabela 5), comparando com a intradermorreação (Tabela 6), há uma diminuição de 13% no número de resultados positivos, no teste de ELISA com ureia, quando comparados com a intradermorreação. Os resultados negativos de ELISA com ureia e intradermorreação positivos possivelmente ocorreram pelas reações cruzadas no teste de intradermorreação devido à sensibilização por outros fungos como *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis* e

*Sporothrix schenckii* considerando que não houve formação de anticorpos (IgG) em número significativo para detecção no ELISA (BAGATIN, 1986; CAMARGO et al., 1994). Na amostra selecionada o sexo masculino foi o grupo de maior positividade para ambos os testes de ELISA convencional e ELISA com ureia e teste intradérmico. Os achados estão concordantes com o descrito na literatura, pois a PCM é mais frequente em homens expostos ao habitat do fungo pelo trabalho agrícola. Em mulheres, a infecção é rara em função do papel protetor do hormônio estrogênio (SALAZAR et al., 1988).

Quando analisamos as faixas etárias, o maior número de casos positivos encontra-se na faixa de 30 a 49 anos no teste de ELISA convencional (Tabela 4), acima de 50 anos no teste de ELISA com ureia (Tabela 5), e de 30 a 49 anos no teste intradérmico (Tabela 6). O fato de haver maior número de casos positivos para moradores na idade adulta, maiores que 30 anos, comprova o que se encontra na literatura, ou seja, a faixa etária mais acometida situa-se entre 30 e 50 anos de idade. Os indivíduos acometidos pela micose, usualmente encontram-se na fase mais produtiva da vida e relacionada com a participação permanente ou transitória em atividades rurais, sejam de trabalho, viagem ou lazer. Mas, levando-se em consideração também que esses indivíduos estiveram em exposição ao fungo por mais tempo e que há variação de condições imunológicas de indivíduo para indivíduo, além de fatores como fumo e alcoolismo (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006).

Não houve diferença significativa entre o teste intradérmico e o teste de ELISA convencional, ( $P=0,389$ ), o que sugere que o teste de ELISA convencional tem os resultados concordantes com o IDR (Tabela 7). A comparação do teste intradérmico com o teste de ELISA com ureia (Tabela 8) indicou que não houve diferença significativa entre os resultados obtidos nos dois testes ( $P=0,182$ ), mostrando assim que o teste de ELISA com ureia também pode ser usado para se fazer um levantamento soroepidemiológico.

Na literatura encontram-se trabalhos onde se avalia a prevalência da PCM em regiões endêmicas da doença, para tais estudos testes rotineiros de diagnóstico da doença foram utilizados, IDR, IDD, ELISA, e Western Blot (MARQUES et al., 2003). Em Maluf et al. (2003), foi utilizado o teste de ELISA como possibilidade de aplicação do teste para detecção de PCM infecção. Em um inquérito epidemiológico com a paracoccidoidina na região de Sorocaba, Estado de São Paulo, se obteve uma alta percentagem de reações positivas nas zonas rurais dessa região (49,6%) (BAGATIN, 1986).

Na comparação geral entre os testes de ELISA na ausência ou presença de ureia 6M, há diferença significativa, possivelmente pelo aumento da especificidade quando se trata os soros com ureia ( $P = 0,000$ ) (Tabela 9).

Ao se analisar os resultados da comparação dos dois testes por sexo (Tabelas 10 e 11) observa-se que houve uma diferença significativa ( $P=0,000$ ) em ambos os sexos: feminino e masculino, e a soroprevalência no sexo masculino foi maior nos dois testes, assim como comprova a literatura (SALAZAR et al., 1988).

Analisando a comparação entre os testes de ELISA nas faixas etárias de 11-19 anos, de 30-49 anos, e  $\geq$  a 50 anos (Tabelas 12, 13 e 14), obteve-se uma diferença significativa nos resultados em todas as faixas etárias, sendo que a maior concordância em ambos resultados positivos nos dois testes, e negativos nos dois testes se encontra na faixa de 11 a 29 anos (98,78%), e a maior discordância de resultados está na faixa etária igual ou maior de 50 anos (20,95%).

O método estatístico de Kappa demonstrou uma boa concordância existente entre os testes de ELISA convencional e o teste de ELISA com ureia (Tabela 15). O que indica que o tratamento com ureia dos soros provoca uma diminuição no número de positivos, devido à diminuição de ligações inespecíficas, porém os resultados não discordam dos apresentados pelo teste de ELISA convencional.

Em Maluf et al. (2003), foi utilizado o teste de ELISA para determinar níveis de anticorpos anti-*P. brasiliensis*, em doadores de sangue da região Noroeste do Paraná, para avaliar a possibilidade da aplicação do teste para detecção de PCM infecção. ELISA foi o teste de escolha por apresentar alta sensibilidade em estudos sobre a PCM, não podendo ser descartada a possibilidade de reações cruzadas.

O uso de metaperiodato para tratamento da gp43, também foi uma alternativa para eliminar resultados falsos positivos e reações cruzadas com outros fungos. Este trabalho mostrou uma fraca concordância entre o teste de ELISA convencional e a IDR com o teste de ELISA com gp43 tratada com metaperiodato de sódio (RIBEIRO; PERES, 2011).

Pode-se dizer que uma maior especificidade é obtida com o uso do soro tratado com ureia, porém os resultados dos testes de ELISA são semelhantes, o que reforça a ideia de que o tratamento dos soros com ureia melhorou os resultados.

## **6 CONCLUSÃO**

O uso de ureia no teste de ELISA para tratamento das amostras de soros diminuiu a percentagem de resultados positivos com relação aos resultados negativos quando comparado com os resultados obtidos no teste de ELISA convencional e IDR. Acredita-se que a diminuição de resultados falsos positivos seja devido à diminuição das reações cruzadas. Este trabalho mostrou uma boa concordância entre o teste de ELISA convencional e o teste de ELISA com ureia, o que demonstra que este último pode substituir o teste de ELISA convencional, os resultados falsos positivos. O teste de ELISA com ureia pode ser utilizado em inquéritos epidemiológicos para avaliação da paracoccidiodomicose-infecção.

## REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, C. F.; MARQUES DA SILVA S. H.; CAMARGO Z. P. Improvement of the specificity of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for diagnosis of Paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, São Paulo, v.43, n. 4, p. 1944–46, abr. 2005.
- BAGATIN, E. Inquérito epidemiológico com a Paracoccidioidina, na Região de Sorocaba, Estado de São Paulo. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, São Paulo, v. 61, n. 1, p. 5-8. 1986.
- BENARD, G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 209-21, abr./mai. 2008.
- BELLISSIMO-RODRIGUES, F. et al. Paracoccidioidomycosis epidemiological features of a 1,000-cases series from a hyperendemic area on the southeast of Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 3, p. 546-50, set. 2011.
- BERTONI, T. A. et al. Paracoccidioidomicose e tuberculose: diagnóstico diferencial. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 1, p. 17-21, fev. 2010.
- BITTENCOURT, J. I. M.; OLIVEIRA, R. M.; COUTINHO Z. F.; Mortalidade por paracoccidioidomicose no estado do Paraná, Brasil, 1980/1998. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 21, n.6, p.1856-64, nov./dez. 2005.
- CALLE, D. e .al. Paracoccidioidomycosis in Colombia: an ecological study. **Epidemiology e Infection**, v.126, n.2, p.309-315, abr. 2001.
- CAMARGO, Z. P. et al. Monoclonal antibody Capture Enzyme Immunoassay for detection of *Paracoccidioides brasiliensis* antibodies in Paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n.10, p. 2377-81, out. 1994.
- CAMARGO, Z. P. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the paracoccidioidomycosis. Comparison with counterimmunoelectrophoresis and erythroimmunoassay. **Mycopathologia**, v. 88, n.1, p. 31-7, out. 1984.
- CAMARGO Z. P.;Unterkirche, Campoy, S. P.; Travassos, L. R. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for Immunodiffusion Tests. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 10, p. 2147-51, out. 1998.

CANO, L. E. et al. Pulmonary Paracoccidioidomycosis: clinical, immunological and histopathological aspects. In: IRUSEN, E. M. **Lung Diseases – Selected State of the Articles Reviews**, [S.I]: InTech, 2012. Cap. 16, p. 359-91.

CASOTTO M. Characterization of the cellular antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* yeast form. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, n.6, p. 1188-93, jul. 1990.

CAVALO, M. Estudio epidemiológico de la Paracoccidioidomycosis en la comunidad de Guapa, municipio Andrés Bello Blanco, estado Lara, Venezuela, octubre 2001-febrero 2002. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología**, v. 22, n. 2, p.158-163, jul. 2002.

DA CRUZ, M. de F. F.; CASTRO B. G.; RIBEIRO C. T. D. Sensitive Immunoradiometric assay for the detection of *Paracoccidioides brasiliensis* antigens in human sera. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n.6, p. 1202-5. jun. 1991.

DIOGENES, M. J. N. et. al. Reações a histoplasmina e paracoccidioidina na Serra de Pedreiro (estado do Ceará-Brasil). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 32, n. 2, p. 116-120, mar./abr. 1990.

FAVA, S.D.C.; NETTO, C.F. Epidemiologic surveys of histoplasmin and paracoccidioidin sensitivity in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 40, n. 3, p.155-166, maio/jun.1998.

FORNAJEIRO, N. et al. Inquérito epidemiológico sobre a paracoccidioidomicose utilizando a gp43 em dois municípios do noroeste do Paraná, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 2, p.191-193, mar./abr. 2005.

FORTES, M. R. P. Imunologia da Paracoccidioidomicose. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 3, p. 516-25, mai./jun. 2011.

FRANCO, M.; BAGAGLI, SCAPOLIO, S.; LACAZ, C. S. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. **Medical Mycology**, v. 38, n. 3, p. 185-192, jun. 2000.

GOMES, E.; WINGETER, M. A.; SVIDZINSKI, T. I. E. Dissociação clínico-radiológica nas manifestações pulmonares da paracoccidioidomicose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n.5, p. 454-58, set./out. 2008.

JENUM, P. A.; B. STRAY-PEDERSEN; A. G. GUNDERSEN; apud NEVES A. R. Improved diagnosis of primary *Toxoplasma gondii* infection in early pregnancy by determination of



antitoxoplasma immunoglobulin G avidity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 8, p. 1972-7, ago. 1997.

KAMIKAWA, C.M.; KOHARA, V. S.; PASSOS, A.N.; VICENTINI, A. P. Retrospective seroepidemiological analysis of patients with suspicion of paracoccidioidomycosis in São Paulo State, Brazil. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v.18, n.3, p. 264-71. 2012.

LACAZ, C. S. et al. **Paracoccidioidomicose**. Tratado de micologia médica. 9. ed. São Paulo: Sarvier, p. 639-729. 2002.

MALUF, L. F. et al. Prevalência de paracoccidioidomicose-infecção determinada através de teste sorológico em doadores de sangue na região Noroeste do Paraná, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.1, p. 11-16, jan./fev. 2003.

MARQUES, S.A. et al. Epidemiologic aspects of paracoccidioidomycosis in the endemic área of Botucatu (São Paulo- Brasil). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 25, n.2, p.87-92, mar/abr .1983.

MARQUES, S.A. Paracoccidioidomicose: atualização epidemiológica, clínica e terapêutica. Rio de Janeiro: **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n.2, p.135-150, mar./abr. 2003.

MARQUES, S.A. Paracoccidioidomicose. **Clinics in Dermatology**, v. 30, p. 610-615. 2012.

MARTINEZ, R.; MOYA, M. J. The relationship between paracoccidioidomycosis and alcoholism. São Paulo: **Revista de Saúde Pública**, v. 26, n. 1, p. 12-6, fev. 1992.

MARTINEZ, R. Paracoccidioidomycosis: the dimension of the problem of a neglected disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 480, jul./ago. 2010.

MENDES-GIANNINI, M. J. S. et. al. Antibody response to the 43 KDa glycoprotein of Paracoccidioides Brasiliensis as a marker for the evaluation of patients under treatment. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 43, n.2, p. 200-6, ago. 1990.

NAMUJU P. B.; et al. Low avidity of human papillomavirus (HPV) type 16 antibodies is associated with increased risk of low-risk but not high-risk HPV type prevalence. **BMC Research Notes**, v. 4, p.170, jun. 2011.

NEVES, A. R. et al. Negative Immunodiffusion Test results obtained with sera of Paracoccidioidomycosis patients may be related to low-avidity Immunoglobulin G2 A antibodies directed against carbohydrate epitopes. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 10, n. 5, p. 802-7, set. 2003.

PALMIEIRO, M.; CHERUBINI, K.; YURGEL, L.S. Paracoccidioidomicose – Revisão da Literatura. **Scientia Medica**, v.15, n. 4, p. 274-278, out./dez. 2005.

PUCCIA, R. et al. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. **Infection and Immunity**, v. 53, n.1, p. 199-206, jul. 1986.

PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L. R. 43-Kilodalton glycoprotein *Paracoccidioides brasiliensis*: immunochemical reactions with sera from patients with Paracoccidioidomycosis, Histoplasmosis and Jorge Lobo's disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 8, p. 2610-15, ago. 1991.

RAHBARI, A. H. et al. IgG Avidity ELISA Test for Diagnosis of acute Toxoplasmosis in Humans. **Korean Journal Parasitology**, v. 50, n. 2, p. 99-102, jun. 2012.

RESTREPO, A. et al. The Habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Medical Mycology**, v. 39, n.3, p. 233-41, jun. 2001.

RESTREPO, A. et al. Paracoccidioidomicose. In: KAUFFMAN, C.A. et al. (Duane R. Hospenthal, MD, PhD). **Essentials of Clinicals Mycology**, 2. ed. New York: Springer 2011. p. 367-85.

REIS, B.S. et al. Protective immunity induced by rPb27 of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Vaccine**, v.26, n.43, p.5461-9, out. 2008.

RIBEIRO, A. P.; PERES, B. R. **Comparação entre o teste de ELISA utilizando antígeno tratado com metaperiodato de sódio e com antígeno bruto no diagnóstico de paracoccidioidomicose**. 2011. 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Biomedicina). Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2011.

SALAZAR, M. E.; RESTREPO, A.; STEVENS, D. A. Inhibition by estrogens of Conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infection and Immunity**, v.56, n.3, p. 711-713, mar. 1988.

SARAIVA, E. C.; ALTEMANI A.; FRANCO MF, UNTERKIRCHER CS, CAMARGO ZP. *Paracoccidioides brasiliensis*-gp43 used as paracoccidioidin. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 34, n.3, p.155-61, jun/jul. 1996.

SHIKANAI-YASUDA, M.A.et.al. Consenso em paracoccidioidomicose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, p.297-310, 2006.

VALLE, A. C. F.; COSTA, R. L. B. Paracoccidioidomicose. Abordagem atual das doenças infecciosas e parasitárias. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro: Cultura médica, p. 943-958, 2001.