



JUCIANI MISTURINI

**IMUNODIFUSÃO RADIAL DUPLA PARA DETECÇÃO DE
PARACOCCIDIOIDOMICOSE INFECÇÃO**

**GUARAPUAVA
2019**

JUCIANI MISTURINI

**IMUNODIFUSÃO RADIAL DUPLA PARA DETECÇÃO DE
PARACOCCIDIOIDOMICOSE INFECÇÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Banca Avaliadora, como critério para obtenção do grau de bacharela em Biomedicina.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Adriane Lenhard Vidal

GUARAPUAVA
2019

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
ExoAg	Exoantígeno
ID	Imunodifusão
mL	Mililitro
mm	Milímetro
PCM	Paracoccidioidomicose
µL	Microlitros
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UNICENTRO	Universidade Estadual do Centro-Oeste

SUMÁRIO

RESUMO	4
ABSTRACT	4
1. INTRODUÇÃO	5
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	6
2.1 POPULAÇÃO E AMOSTRA.....	6
2.2 ANTÍGENOS.....	7
2.3 IMUNODIFUSÃO	7
3. RESULTADOS.....	8
4. DISCUSSÃO	8
CONCLUSÃO	10
REFERÊNCIAS.....	11

IMUNODIFUSÃO RADIAL DUPLA PARA DETECÇÃO DE PARACOCCIDIOIDOMICOSE INFECÇÃO

MISTURINI, Juciani¹ (Campo Real)

SILVA, Bruna Bittencourt¹ (Campo Real)

LENHARD-VIDAL, Adriane² (Campo Real)

RESUMO

A Paracoccidioomicose (PCM) é uma micose sistêmica causada pelo fungo termodimórfico *Paracoccidioides* spp. A PCM doença é dividida em duas formas clínicas, a aguda e crônica. Existe também uma terceira forma da micose, a PCM infecção, quadro sem sintomas clínicos, mas com a presença de anticorpos específicos. O diagnóstico padrão ouro consiste em exames direto, histopatológico e cultura, mas os testes sorológicos são usados como exames complementares. Imunodifusão Radial Dupla (ID) possui sensibilidade de 95,6% para detecção de PCM doença. Este trabalho objetivou avaliar seu uso para detecção de PCM infecção. Foi utilizado exoantígeno (ExoAg) da cepa B339 de *P. restrepiensis* no orifício central e, nos orifícios circundantes, soros não diluídos de voluntários previamente diagnosticados com PCM infecção em ELISA com antígenos totais. Os testes com soros de voluntários não foram reagentes na ID com ExoAg, possivelmente pela necessidade de níveis altos de anticorpos específicos para formação de banda de precipitação antígeno-anticorpo. Com isso, a ID não parece adequada para detecção de PCM infecção.

Palavras-chave: Antígenos totais; Blastomicose Sul-Americana; Exoantígeno; Paracoccidioides.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis caused by the thermomorphic fungus *Paracoccidioides* spp. PCM disease is divided into two clinical forms, acute and chronic. There is also a third form, named PCM infection, without clinical symptoms but with detectable specific antibodies. The gold standard diagnosis consists of direct or histopathological exams and culture. Meanwhile, serological tests are used as complementary diagnosis and Double Radial Immunodiffusion (ID) has 95.6% sensitivity for PCM disease detection. This research aimed to evaluate its use for the diagnosis of PCM infection. Exoantigen (ExoAg) from *P. restrepiensis* strain B339 was used in the central orifice, and in the surrounding orifices, undiluted sera from volunteers previously diagnosed with PCM infection by total antigen ELISA. No sera was reactive in ExoAg ID, possibly due to the need of high levels of specific antibodies to form the antigen-antibody precipitation band. Thus, ID doesn't seem suitable for PCM infection diagnosis.

Keywords: Total antigens; South American Blastomycosis; Exoantigen; Paracoccidioides.

¹ Acadêmica do curso de Biomedicina, 8º Período, Centro Universitário Campo Real.

² Biomédica, Docente do curso de Biomedicina do Centro Universitário Campo Real, Doutora em Patologia Experimental (UEL).

1. INTRODUÇÃO

A paracoccidiodomicose (PCM), é uma micose sistêmica causada pelo fungo termodimórfico *Paracoccidioides* spp. A PCM ocorre mais nos países da América Latina, especialmente no Brasil, com 80% dos casos de PCM. O fungo *Paracoccidioides* spp. está presente no solo e a infecção acontece por meio da inalação de propágulos do fungo, geralmente envolvendo atividades agrícolas ou manejo do solo (MARTINEZ, 2017; PALMEIRO; CHERUBINI; YURGEL, 2005; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

A infecção ocorre quando os humanos entram em contato com o solo contaminado com micélios do fungo, inalando os propágulos que, chegando aos pulmões, transformam-se em leveduras. Seu quadro clínico geralmente é assintomático e as manifestações clínicas são pouco constatados nas primeiras semanas após o contato com o fungo (PALMEIRO; CHERUBINI; YURGEL, 2005; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017)

A PCM doença acontece quando ocorre a disseminação das leveduras por via linfática/hematogênica, se manifestando de duas formas clínicas, a doença aguda e crônica (DA SILVA et al., 2016). A aguda ou subaguda é mais comum em crianças e adultos jovens, desenvolve-se rapidamente comparado a forma crônica, surge algumas semanas ou meses após o contato com o fungo, que se espalha em diferentes órgãos e sistemas. As manifestações clínicas são linfadenomegalia localizada ou generalizada, hepatoesplenomegalia, e lesões de pele, mucosa oral e intestinal e dos ossos. Já a forma crônica é mais comum em adultos, se desenvolve de forma lenta (pode demorar meses ou anos após ao contato com o fungo), afeta as idades de 30 a 60 anos, mais homens do que mulheres. As manifestações clínicas ocorrem principalmente nos pulmões e vias aéreas superiores, mucosa oral e pele adjacente à boca e ao nariz. A doença é classificada como leve, moderada ou grave (MARTINEZ, 2015, 2017; SHIKANAI-YASUDA, et al., 2017). Ainda há outra forma chamada de PCM infecção, que é caracterizada por níveis detectáveis de anticorpos específicos na ausência de sintomas clínicos, mas sua prevalência é desconhecida na população (MARTINEZ, 2017).

O diagnóstico laboratorial de PCM doença baseia-se em exames direto, histopatológico ou cultura. Outra forma de diagnóstico para a doença são os testes imunológicos, os mais utilizados atualmente para o diagnóstico são a Imunodifusão Radial Dupla (ID) e os Ensaio Imunoenzimáticos, como o ELISA (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). O teste de ID para PCM possui uma sensibilidade em torno de 95,6%. Ocorre a formação da linha de precipitação entre a amostra de soro e o antígeno selecionado (CAMARGO et al., 1988).

A PCM já foi classificada no Brasil como a oitava causa mais comum de morte entre as doenças infecciosas e parasitárias crônicas. As regiões que apresentaram maior índice de mortalidade pela doença foram Sudeste com média de 106,66 óbitos ao ano, em seguida vem o Sul com 54,69 e por fim o Centro-Oeste com 19,88 (COUTINHO et al., 2002).

Entre os estados do sul do Brasil, o Paraná alcançou o primeiro lugar em números de mortos pela doença, com um coeficiente de mortalidade anual médio de PCM de 3,48 óbitos por milhão de habitantes no período de 1980 a 1998 (COUTINHO et al., 2002). A região centro-sul do Paraná, apresentou um coeficiente de 2,48 de óbitos pela doença. No município de Guarapuava, encontrado na região centro-sul do Estado, foram registradas 10 mortes no período de 1980 a 1998, ficando entre as menores taxas dos municípios paranaenses (BITTENCOURT; OLIVEIRA; COUTINHO, 2005).

Os estudos epidemiológicos sobre PCM infecção tornam-se importantes porque podem auxiliar no diagnóstico de PCM doença, uma vez que permite estimar a porcentagem da população que entra em contato com o fungo, alertando os profissionais de saúde. A técnica de ID, se torna interessante para estudos epidemiológicos, pelo seu baixo custo e facilidade de execução. Sendo assim, esta pesquisa avaliou se pessoas já diagnosticadas com PCM infecção por ELISA também recebem este diagnóstico em ID.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 POPULAÇÃO E AMOSTRA

Foi utilizado material coletado em pesquisa anterior realizada na região centro-sul do Paraná, especialmente no município de Guarapuava. Foram convidadas pessoas aleatórias para participar desse projeto em laboratórios médicos e universidades da cidade. No total, foram coletadas amostras de soro de 359 pessoas. Na pesquisa atual, foram utilizados apenas soros reagentes previamente em ELISA com antígenos totais do tipo CFA (*cell free antigen*) (LENHARD-VIDAL, 2018). Como controle positivo, foi utilizado soro de paciente diagnosticado com PCM doença, previamente reagente em ID. Essas amostras são provenientes do banco de amostras biológicas do Laboratório de Imunologia Aplicada da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brasil. A pesquisa atual foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO) (CAAE 46195615.4.0000.5231, parecer 1.494.550).

2.2 ANTÍGENOS

Os antígenos utilizados foram cedidos prontos pelo Laboratório de Imunologia Aplicada da UEL e foram produzidos a partir da cepa B339 (IFM 41630; TAKAYAMA et al., 2010) de *P. restrepiensis* (TURISSINI et al., 2017), considerada anteriormente como *P. brasiliensis* PS3 por Muñoz et al. (2016). O fungo foi mantido em forma de levedura a 35 °C no ágar Sabouraud dextrose, a cada 5-7 dias o fungo foi subcultivado.

Foi utilizado exoantígeno (ExoAg), constituído por antígenos que são liberados pelas células em meio líquido, o que parcialmente mimetiza o que acontece no organismo durante a doença (CAMARGO et al., 1988), sendo o antígeno padrão para ID. A técnica de obtenção consiste em cultivar a cepa *P. restrepiensis* B339 em meio líquido TOM (ágar enriquecido com suco de tomate). O fungo foi cultivado na fase de levedura à 35 °C por 4 dias, após esse período ocorreu a transferência para meio fresco, e novamente foi incubado por um período de 5-10 dias. Após essa incubação, as culturas foram mortas por Merthiolate (Timerosal) a 0,02%, e posteriormente filtradas em filtro de papel. O sobrenadante foi concentrado através de liofilização (PUCCIA; TAKAOKA; TRAVASSOS, 1991).

2.3 IMUNODIFUSÃO

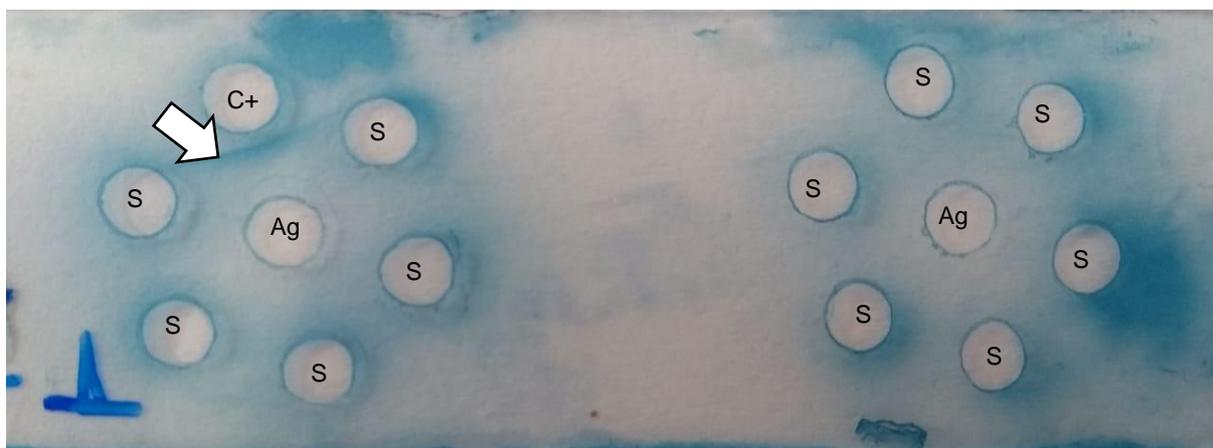
Foram utilizadas lâminas de vidro cobertas com 3 mL de ágar 1%, recortada com um molde em roseta (esse processo foi realizado com lâminas em duplicata). O padrão da ID consiste em um orifício central e mais seis orifícios circundantes, cada um deles mede 3 mm de diâmetro. Foram utilizadas amostras não diluídas nos orifícios externos, aplicando-se 25 µL de soro de 6 indivíduos diferentes em cada poço e o poço central foi preenchido com ExoAg. Após realizar esse processo, as lâminas foram incubadas em câmara úmida à temperatura ambiente por 24 horas, sendo posteriormente lavadas durante 24 horas em solução salina 0,9%. Após secar as lâminas com uso de papel filtro, foi realizada a coloração em um tempo de 3 a 5 minutos, em azul de Coomassie brilhante à 0,15% em solução de etanol-ácido acético-água (4:2:4) para evidenciar as bandas de precipitação (CAMARGO et al., 1988). Posteriormente, os soros reagentes seriam avaliados em nova imunodifusão, sendo titulados de 1:2 até 1:32. Em cada rodada de ID, adicionou-se o soro do controle positivo em um par de lâminas.

3. RESULTADOS

Foram analisadas 129 amostras de soros previamente reagentes em ELISA com CFA. Inicialmente, foram testados soros com os maiores resultados em densidade ótica no ELISA ou soros também reagentes com gp43 em outro ELISA, por este ser considerado o antígeno imunodominante de *P. brasiliensis* e, conseqüentemente, ser utilizado como teste confirmatório para PCM doença.

Mesmo assim, nenhuma das amostras de voluntários diagnosticados com PCM infecção por ELISA desenvolveu linha de precipitação, ou seja, não foram reagentes na ID com ExoAg, conforme pode ser observado na Figura 1.

Figura 1 – Lâmina de ID após coloração, para demonstrar os experimentos realizados, com controle positivo (C+), soros de voluntários (S) e exoantígeno (Ag).



Seta: indica a formação de linha de precipitação (resultado reagente) apenas no soro controle positivo.

4. DISCUSSÃO

O fungo *Paracoccidioides* spp. é considerado termodimórfico por possuir duas formas: miceliana a 25 °C e leveduriforme a 37 °C. O diagnóstico padrão ouro da PCM doença consiste nos exames direto, histopatológico e cultura, nos quais é possível visualizar o elemento fúngico. Na cultura realizada à 37 °C, observa-se uma colônia cerebriforme de coloração creme. Na microscopia, tanto de material biológico quanto cultura, observam-se leveduras com múltiplos brotamentos em formato de roda de leme (MOREIRA, 2008).

Existe o diagnóstico indireto para PCM que são os testes imunológicos, que vem sendo muito utilizado devido o processo lento e da qualidade dos exames diretos. Por exemplo, a cultura pode demorar trinta dias para ser observado crescimento do fungo, e

amostras de escarro nem sempre são representativas de secreção pulmonar. Devido ao estado do paciente e a localização de suas lesões, muitas vezes é difícil acesso para coletar o material necessário, como por exemplo, na PCM de sistema nervoso central. Com isso os testes imunológicos, por serem técnicas rápidas, se tornam importantes para a confirmação e acompanhamento da doença, assim como para avaliar a evolução do tratamento (DIAS, 2017; NEVES et al., 2003; PEREIRA, 2012; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

A ID, é a técnica sorológica que vem sendo mais empregada na prática clínica, devido seu baixo custo e facilidade execução. Apesar de sua utilidade como diagnóstico auxiliar, há relatos de pacientes com PCM doença confirmada que são não reagentes em ID com diferentes antígenos, inclusive contra o antígeno imunodominante de *P. brasiliensis*, gp43 (DEL NEGRO et al., 1995).

Três podem ser os motivos para os resultados não reagentes em ID desta pesquisa:

(1) Baixa concentração do ExoAg utilizado. Existem técnicas que podem aumentar a concentração dos antígenos, como métodos de centrifugação e liofilização, porém a concentração utilizada nos experimentos está perto do padrão utilizado por Camargo et al. (1988) para diagnóstico de PCM doença, mas talvez possa ser insuficiente para detectar PCM infecção, que costuma ter concentrações menores de anticorpos.

(2) O antígeno utilizado pode não ser da espécie prevalente na região. *P. brasiliensis* era distribuída em cinco espécies filogenéticas, que são S1a, S1b, PS2, PS3 e PS4. Elas são encontradas em diversos países da América do Sul: S1a e S1b estão no Brasil (sudeste e sul), Argentina e Paraguai; a PS2 é encontrada na Venezuela e Brasil (sudeste); e as espécies PS3 e PS4 são encontradas na Colômbia e Venezuela (MUÑOZ et al., 2016). Atualmente, Turissini et al. (2017) propuseram descrever novas espécies para as cinco espécies filogenética: *P. brasiliensis* para S1, *P. americana* para PS2, *P. restrepiensis* para PS3, *P. venezuelensis* para PS4. Ainda há espécie anteriormente considerada como atípica, *P. lutzii*, distribuída principalmente na região Centro-Oeste e Norte do Brasil (MARTINEZ, 2017; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). Todas as espécies de *Paracoccidioides* liberam o ExoAg quando cultivadas em meio nutritivo líquido. O perfil de antígenos é semelhante para a maioria das espécies, mas há relatos de cepas que produzem baixas quantidades ou não produzem gp43 (BATISTA JUNIOR et al., 2010; BERZAGHI et al., 2005). Por ser considerado o antígeno imunodominante de *P. brasiliensis*, isto pode fortemente influenciar o diagnóstico sorológico (CAMARGO, 2008). Além disso, a concentração de cada antígeno oscila muito conforme espécie e tempo de incubação (CARLOS et al., 2014). Segundo a padronização de Camargo et al. (1988) para produção de

ExoAg para ID, sua melhor concentração ocorre entre 7 a 15 dias de incubação no meio líquido. O ExoAg utilizado nesta pesquisa seguiu estas recomendações.

(3) Baixos níveis de anticorpos específicos contra *Paracoccidioides* spp. Os teste sorológicos de PCM estão relacionados com a imunidade humoral do indivíduo, caracterizando títulos altos e baixos de anticorpos, dependendo da fase da doença. Títulos baixos são mais frequentes em pessoas assintomáticas e títulos altos em pacientes que já possuem a doença em suas formas clínicas, inclusive sendo altos títulos de anticorpos relacionados com maior gravidade da doença. Pacientes com a doença aguda e crônica apresentam níveis elevados de anticorpos IgE e IgG, e na fase crônica esses marcadores podem ser úteis na avaliação da gravidade da doença (NEVES et al. 2003; PEREIRA, 2012; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

Por ser uma técnica menos sensível do que outras em que há amplificação do sinal, como em ELISA, são necessárias altas concentrações de anticorpos na técnica de ID para obter resultados reagentes. Pacientes com a doença intensa, apresentam níveis de titulação que variam de 1:16 a 1:32 (PEREIRA, 2012). Além disso, a ausência de reação antígeno-anticorpo detectável por esta técnica pode ser devida à anticorpos de baixa avidéz e predominância de subclasse IgG2 direcionada à epítomos de carboidrato (NEVES et al., 2003).

Uma possível explicação para a diferença de resultados entre o ELISA com CFA prévio e a ID realizada nesta pesquisa é a forma em que o antígeno fica disponível para reação nas duas técnicas. Na pesquisa de Lenhard-Vidal et al. (2013), alguns pacientes diagnosticados com PCM doença através de reação com ExoAg, e também reagentes em ELISA com CFA de B339, não foram reagentes em ID. Isto possivelmente ocorre devido à maior exposição dos epítomos quando o antígeno está na fase sólida (ELISA) em vez de solução (ID), permitindo um número maior de ligações e portanto, maior eficiência quando amostras de pacientes são testados, além da amplificação do sinal existente na técnica de ELISA, se comparado à ID.

CONCLUSÃO

Apesar de a ID ser a técnica sorológica mais indicada no diagnóstico auxiliar de PCM doença pelo seu baixo custo e facilidade de execução, não parece ser uma técnica adequada para o diagnóstico de PCM infecção nas mesmas condições utilizadas para diagnóstico de PCM doença, possivelmente por baixa concentração de anticorpos específicos.

Por o ELISA apresentar maior sensibilidade comparado à ID, torna-se a técnica mais indicada nos estudos epidemiológicos sobre PCM infecção, mas pesquisas futuras empregando maior concentração de ExoAg ou outras formas de antígenos, como CFA e gp43, precisam ser realizadas antes de se descartar o emprego deste método.

REFERÊNCIAS

BATISTA JUNIOR, J.; CAMARGO, Z.P.; FERNANDES, G.F.; VICENTINI, A.P.; FONTES, C.J.; HAHN, R.C. Is the geographical origin of a *Paracoccidioides brasiliensis* isolate important for antigen production for regional diagnosis of paracoccidioidomycosis? **Mycoses**, v. 53, n. 2, p. 176-180, Mar 2010

BERZAGHI, R.; DA SILVA, S.H.; CAMARGO, Z.P. Variable gp43 secretion by *Paracoccidioides brasiliensis* clones obtained by two different culture methods. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 1, p. 491-493, Jan 2005.

BITTENCOURT, J.I.M.; OLIVEIRA, R.M.; COUTINHO, Z.F. Paracoccidioidomycosis mortality in the State of Paraná, Brazil, 1980/1998. **Cad Saúde Pública**, v. 21, n.6, p. 1856-1864, 2005.

CAMARGO, Z.P.; UNTERKIRCHER, C.; CAMPOY, S.P.; TRAVASSOS, L.R. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* Exoantigens for Immunodiffusion Tests. **J Clin Microbiol** v. 26, n. 10, p. 2147-2151, Oct 1988.

CARLOS, N. J.; PINTO, D.A.; ONO, M.A.; VENANCIO, E.J.; CAMARGO, Z.P.; SANO, A; ITANO, E.N. Immunoblotting of soluble antigens in *Paracoccidioides brasiliensis* culture. **Microbiol Immunol**, v. 58, n. 3, p. 212-214, 2014.

COUTINHO, Z.F.; SILVA D.; LAZÉRA, M.; PETRI, V.; OLIVEIRA, R.M.; SABROZA, P.C.; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil, 1980/1995. **Cad Saúde Pública**, v. 18, n. 5, p. 1441-1454, 2002.

DA SILVA, J.F.; DE OLIVEIRA, H.C.; MARCOS, C.M.; ASSATO, P.A.; FUSCO-ALMEIDA, A.H.; MENDES-GEANNINI, M.J.S. Advances and challenges in paracoccidioidomycosis serology, caused by *Paracoccidioides* species complex: an update. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 84, n. 1, p. 87-94, Jan 2016.

DEL NEGRO, G.M.; BENARD, G.; DE ASSIS, C.M.; VIDAL, M.S.; GARCIA, N.M.; OTANI, C.; SHIKANAI-YASUDA, M.A.; LACAZ, C.S. Lack of reactivity of paracoccidioidomycosis sera in the double immunodiffusion test with the gp43 antigen: report of two cases. **J Med Vet Mycol**, v. 33, n. 2, p. 113-6, Mar-Apr 1995.

DIAS, L.S. **Envolvimento dos neutrófilos na modulação da resposta imune em camundongos BALB/c vacinados com o peptídeo P10 na paracoccidioidomicose experimental**. 2017. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017. Doi: 10.11606/T.42.2017.tde-30102017-112411. Acesso em: 02 Out. 2019.

LENHARD-VIDAL, A. **Análise da reatividade de IgG/IgG2 a epítopos de carboidratos de espécies de *Paracoccidioides* e detecção de casos de Paracoccidioidomycose infecção na população de Guarapuava, PR**. 66 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 2018.

LENHARD-VIDAL, A.; ASSOLINI, J.P.; ONO, M.A.; BREDT, C.S.; SANO, A.; ITANO, E.N. *Paracoccidioides brasiliensis* and *P. lutzii* antigens elicit diferente serum IgG responses in chronic paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 176, n. 5-6, p. 345-352, Dec 2013.

MARTINEZ, R. Epidemiology of paracoccidioidomycosis. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 57, supl. 19, p. 11-20, Sep 2015.

MARTINEZ, R. New Trends in paracoccidioidomycosis Epidemiology. **J Fungi**, v. 3, n. 1, p. 1, 2017.

MOREIRA, A.P.V. Paracoccidioidomicose: histórico, etiologia, epidemiologia, patogênese, formas clínicas, diagnóstico laboratorial e antígenos. **BEPA, Bol Epidemiol Paul (Online)**, São Paulo, v. 5, n. 51, p. 11-24, Mar 2008.

MUÑOZ, J.F.; FARRER, R.A.; DESJARDINS, C.A.; GALLO, J.E.; SYKES, S.; SAKTHIKUMAR, S.; MISAS, E.; WHISTON, E.A.; BAGAGLI E.; SOARES, C.M.; TEIXEIRA, M.M.; TAYLOR, J.W.; CLAY, O.K.; McEWEN, J.G.; CUOMO, C.A. Genome Diversity, Recombination, and Virulence across the Major Lineages of *Paracoccidioides*. **mSphere**, v. 1, n. 5, p. 1-18, Sep-Oct 2016.

NEVES, A.R.; MAMONI, R.L.; ROSSI, C.L.; CAMARGO, Z.P.; BLOTTA, M.H.SL. Negative Immunodiffusion Test Results Obtained with Sera of Paracoccidioidomycosis Patients May Be Related to Low-Avidity Immunoglobulin G2 Antibodies Directed against Carbohydrate Epitopes. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 10, n. 5, p. 802-807, Sep 2003.

PALMEIRO, M.; CHERUBINI, K.; YURGEL, L.S. Paracoccidioidomicose-Revisão da Literatura, **Scientia Medica, Porto Alegre: PUCRS**, v. 15, n. 4, p. 274-278, 2005.

PEREIRA, A.L. **Diagnóstico Sorológico da paracoccidioidomicose**: comparação entre os testes de Imunodifusão Dupla (IDD) e Ensaio Imunoenzimático (ELISA). 2012. 98 f. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde, Vitória/ES, 2012.

PUCCIA, R.; TAKAOKA, D.T; TRAVASSOS, L.R. Purification of the 43 kDa glycoprotein from exocellular components excreted by *Paracoccidioides brasiliensis* in liquid culture (TOM medium). **J Med Vet Mycol**, v. 29, n. 1, p. 57-60, 1991.

SHIKANAI-YASUDA, M.A.; MENDES, R.P.; COLOMBO, A.L.; QUEIROZ-TELLES, F.; KONO, A.S.G.; PANIAGO, A.M.M.; NATHAN A.; VALLE, A.C.F.D.; BAGAGLI, E.; BENARD, G.; FERREIRA, M.S.; TEIXEIRA, M.M.; SILVA-VERGARA, M.L; PEREIRA, R.M.; CAVALCANTE, R.S.; HAHN, R.; DURLACHER, R.R.; KHOURY, Z.; CAMARGO, Z.P.; MORETTI, M.L.; MARTINEZ, R. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 50, n. 5, p. 715-740, Sep-Oct 2017.

TAKAYAMA, A.; ITANO, E.N.; SANO, A.; ONO, M.A.; KAMEI, K. An atypical *Paracoccidioides brasiliensis* clinical isolate based on multiple gene analysis. **Med Mycol**, v. 48, n. 1, p. 64-72, Feb 2010.

TURISSINI, D.A.; GOMEZ, O.M.; TEIXEIRA, M.M., MCEWEN, J.G.; MATUTE, D.R. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. **Fungal Genet Biol**, v. 106, p. 9-25, 2017.