



Perfil sorológico dos pacientes com suspeita clínica de paracoccidiodomicose avaliados pelo Instituto Adolfo Lutz no ano de 2016

Serological profile of patients with clinical suspicion of paracoccidiodomycosis evaluated by Instituto Adolfo Lutz in 2016

RIALA6/1770

Camila Mika KAMIKAWA, Karolina Rosa Fernandes BERALDO, Lúcia Cupertino BARRETO, Mayra Simioni ZAPAROLI, Adriana Pardini VICENTINI*

*Endereço para correspondência: Centro de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz, Avenida Dr. Arnaldo, 355, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01246-000. Fone/Fax: +55 11 3068 2898.
E-mail: adriana.vicentini@ial.sp.gov.br

Recebido: 07.03.2018 - Aceito para publicação: 28.03.2019

RESUMO

Oitenta por cento dos casos de paracoccidiodomicose (PMC) ocorrem no Brasil. As regiões brasileiras com maior número de casos são: sul, sudeste e centro-oeste, sendo emergente no norte e nordeste. A imunodifusão dupla em gel de agarose assume grande importância no diagnóstico, por permitir o monitoramento da doença e por oferecer subsídios para levantamentos soroepidemiológicos. O objetivo deste trabalho foi de avaliar e caracterizar os pacientes atendidos no Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, em 2016. Trata-se de um estudo retrospectivo realizado utilizando-se dados secundários e avaliando-se as seguintes informações: idade, sexo, procedência do pedido médico, resultado e histórico sorológico dos pacientes. Dos 1.408 pacientes, 12,8% apresentaram reatividade sorológica para *Paracoccidioides brasiliensis*. Destes, 42,5% não possuíam histórico sorológico, sendo considerados como casos novos da doença. A classificação dos pacientes reagentes por gênero demonstrou que 83,4% eram do sexo masculino, com razão de masculinidade de 5:1. A faixa etária variou de um (1) a 92 anos, e aproximadamente 40% dos pacientes eram da faixa etária de 41 a 60 anos. Este estudo demonstra e reforça a importância da implementação dos estudos soroepidemiológicos como ferramenta auxiliar para nortear as ações de vigilância e políticas em saúde na PCM.

Palavras. *Paracoccidioides brasiliensis*, paracoccidiodomicose, imunodiagnóstico.

ABSTRACT

Eighty percent of paracoccidiodomycosis (PMC) cases occur in Brazil. The highest numbers occur in south, southeast and center-west region, being emergent in the north and northeast areas. The double immunodiffusion in agarose gel is valuable for its diagnosis, as it allows the monitoring of the disease and offers subsidies for the seroepidemiological surveys. This study evaluated and characterized the patients attended in 2016 at the Mycoses Immunodiagnosis Laboratory of Adolfo Lutz Institute of São Paulo. This retrospective study, based on the secondary data, evaluated the information: age, sex, medical request origin, result and serological history of the patients. Of 1,408 patients, 12.8% presented positive serological reactivity for *Paracoccidioides brasiliensis*. Of them, 42.5% had no serological history and they were considered as new cases. The classification of reactive patients by gender showed that 83.4% were males, being the masculinity ratio of 5:1. The age range was one (1) to 92 years old, and $\pm 40\%$ of the patients were of age ranging from 41-60 years old. This study reinforces the importance of the implementation of the seroepidemiological studies as to guide the surveillance actions and the public health politics in PCM.

Keywords. *Paracoccidioides brasiliensis*, paracoccidiodomycosis, immunodiagnosis.

INTRODUÇÃO

A paracoccidiodomicose (PCM), causada por fungos do gênero *Paracoccidioides*: *P. brasiliensis* e *P. lutzii* é micose de alta endemicidade na América do Sul, entretanto, aproximadamente 80% dos casos são registrados no Brasil, particularmente nos estados de São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás e Rondônia^{1,2}.

A PCM acomete predominantemente indivíduos do sexo masculino com faixa etária entre 30 a 50 anos, residentes em áreas rurais ou periurbanas, que exercem ou exerceram atividades relacionadas à agropecuária¹⁻³. Estima-se que, a cada ano, a taxa de incidência na população brasileira seja de 1 a 3 casos por 100.000 habitantes⁴. Contudo, deve-se ressaltar que a PCM pode ter seu diagnóstico clínico confundido com outros processos infecciosos causados por *Leishmania* spp. e *Mycobacterium tuberculosis*, além de apresentar índices expressivos de letalidade estimados entre 2 a 23% nos casos graves, podendo alcançar 30% quando associada a AIDS⁵. Até 2002, a micose figurava como oitava causa de morte por doença, entre as infecciosas e parasitárias⁶. Dados registrados durante o período de 2010 a 2015, junto ao sistema de informações sobre mortalidade, do Ministério da Saúde, revelam que a infecção por *P. brasiliensis* ainda é considerada a principal causa de mortalidade entre as micoses no país, apresentando média de 133,4 óbitos/ano⁷.

O diagnóstico de certeza da PCM deriva da demonstração e do reconhecimento do agente etiológico em preparados histológicos, exame a fresco ou em cultivo^{2,4}. No entanto, em algumas situações entre as quais pode-se citar o estado físico ou clínico dos pacientes, torna-se impossível o acesso ao local da lesão, impedindo assim a coleta do material biológico.

Desta forma, técnicas imuno-sorológicas são de grande valia uma vez que permitem inferir o diagnóstico com certo grau de certeza, otimizando o tempo utilizado para se obter resultados, aliando sensibilidade à especificidade^{8,9}.

A técnica sorológica amplamente utilizada para o imunodiagnóstico da PCM é a imunodifusão dupla em gel de agarose (ID), apresentando baixo custo operacional, alta especificidade e sensibilidade

variando de 65 a 100%; sendo de fácil execução, não necessitando de automação, assumindo grande importância por permitir o monitoramento da doença bem como por oferecer subsídios para levantamentos soroepidemiológicos^{8,10}.

Kamikawa¹¹ e Kamikawa et al³ demonstraram que 60% dos municípios do estado de São Paulo apresentaram ao menos um paciente com anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis*, detectados por imunodifusão dupla em gel de agarose. Os autores observaram que a maioria dos pacientes sorologicamente reagentes para *P. brasiliensis* concentrava-se nas macro-regiões de Campinas, São Paulo e Grande São Paulo, Sorocaba e São João da Boa Vista, enquanto as maiores taxas de reatividade foram observadas nos municípios de Piracicaba, Franca, Araçatuba e Presidente Prudente. Contudo, os autores ressaltaram que os resultados estão subestimados, uma vez que não foram incluídas no estudo, amostras de pacientes atendidos nos serviços de referência de importantes pólos endêmicos da doença como Botucatu, Ribeirão Preto, Araraquara e Bauru.

Segundo Pinto et al¹² no período de 2008 a 2011, 166 casos da micose foram notificados à Divisão de Tuberculose e outras Pneumopatias do Centro de Vigilância Epidemiológica Prof. Alexandre Vranjac de São Paulo. Os autores alertam que apesar da recomendação de notificação dos casos de PCM no estado de São Paulo, os dados apresentados encontram-se subnotificados, visto que das doze unidades de referência para atendimento da PCM, apenas quatro notificaram ao sistema de vigilância epidemiológica estadual, dificultando portanto, quaisquer iniciativas visando a prevenção, diagnóstico e melhorias no tratamento da mesma^{6,13}.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar e caracterizar retrospectivamente, os pacientes atendidos no ano de 2016, pelo Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

O Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do Centro de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo (LIM-IAL-SP), de janeiro a dezembro de 2016, analisou, pela

reação de imunodifusão dupla em gel de agarose (provas qualitativa e semi-quantitativa), amostras biológicas de 1.408 pacientes com suspeita clínica de paracoccidiodomicose quanto à presença ou não de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis*.

Todo paciente cuja amostra foi enviada ao LIM-IAL-SP para realização de diagnóstico presuntivo e/ou confirmatório, foi registrado no Banco de Dados construído com a ajuda do software Microsoft-Access 2000. O banco de dados foi alimentado com informações extraídas das requisições de exame (número de amostra, unidade requisitante, procedência, matrícula, número do IAL, nome, sexo, idade, suspeita clínica, exame solicitado, nome e registro profissional do médico, data de coleta). Além destas, o banco contém informação referente ao resultado sorológico dos pacientes bem como um campo destinado ao acompanhamento laboratorial dos mesmos.

Imunodifusão dupla em gel de agarose

Para a pesquisa de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis*, o LIM-IAL-SP, emprega-se rotineiramente a reação de imunodifusão dupla em gel de agarose (ID), proposta por Ouchterlony¹⁴. Toda amostra foi primeiramente avaliada pela prova qualitativa e no caso de reatividade frente a antígeno de *P. brasiliensis* (filtrado de cultura do isolado Pb B-339) a mesma foi avaliada, diluindo-se a amostra biológica na razão dois (2), pela prova semi-quantitativa a fim de determinar-se o título de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis*.

Resumidamente, lâminas de vidro (26x75mm) foram primeiramente revestidas com 1,0 mL de solução de ágar a 1% (p/v). Estas foram então recobertas com 3,0 mL de solução de agarose-citrato e deixadas em câmara úmida, a 4°C, até a solidificação da agarose. O gel foi escavado com auxílio de molde em forma de roseta (Bioficina-Indústria e Comércio de Aparelhos Laboratoriais, São Paulo-Brasil), contendo um orifício central e seis laterais, sendo o excesso do gel retirado empregando-se pipeta Pasteur acoplada à bomba de vácuo (DIA-PUMP Compressor, FANEN, São Paulo, Brasil). Após a aplicação dos imunobiológicos (antígeno de *P. brasiliensis* e anticorpo policlonal anti-antígeno de *P. brasiliensis*) e soros de pacientes com suspeita clínica de PCM nos orifícios, as lâminas foram

incubadas em câmara úmida, à temperatura ambiente, por 48 horas. Após esse período, com o auxílio de negatoscópio, realizou-se a leitura para verificação da presença ou não de linhas de precipitação. As lâminas de vidro foram lavadas por 45 minutos em solução citrato de sódio 5% (p/v), seguindo-se de sucessivas lavagens, por 24 horas, em solução salina 0,85%. Ao fim desta etapa, os orifícios foram recobertos com solução de ágar 1% (p/v) e as lâminas levadas para secar em estufa a 60°C (FANEN, São Paulo-Brasil). Após secagem, as lâminas foram coradas pelo Coomassie Brilliant Blue R (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, USA), durante 5 minutos e em seguida descoradas por aproximadamente 10 minutos, utilizando-se solução descorante (10% de ácido acético glacial, 45% de álcool etílico, 45% de água destilada). A leitura definitiva foi então realizada, por dois observadores distintos e os resultados registrados no banco de dados.

Aspectos éticos

Para a condução deste estudo, não houve necessidade da obtenção de termo de consentimento livre e esclarecido, visto tratar-se de análise retrospectiva cujos resultados foram encaminhados aos serviços públicos solicitantes e informados ao paciente pelo seu médico, assegurando-se assim o acompanhamento, tratamento ou orientação do sujeito da pesquisa. Durante a tabulação dos dados foram respeitados e preservados o anonimato dos sujeitos da pesquisa e a confidencialidade das informações. O projeto foi aprovado pelos Comitês Científico e de Ética do IAL (CTC 68H/2015 e CAAE 39480814.1.3001.0059).

RESULTADOS

O Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses do Instituto Adolfo Lutz realizou no ano de 2016, 1.408 avaliações sorológicas visando a pesquisa de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis*. A análise da porcentagem de requisições de exames recebidas revelou que: 55,2% corresponderam à solicitação de pesquisa de anticorpos circulantes para *P. brasiliensis*; 14,5% para *P. brasiliensis* e

Histoplasma capsulatum; 1,8% para *P. brasiliensis* e *Aspergillus fumigatus* e 28,5% das requisições solicitaram sorologia para fungos, ou seja, sorologia para *P. brasiliensis*, *H. capsulatum* e *A. fumigatus* (Figura 1).

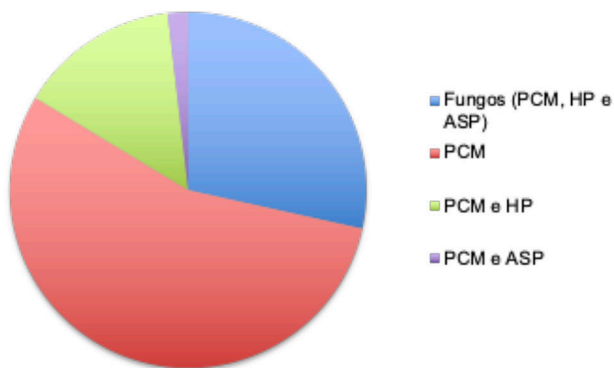


Figura 1. Distribuição das requisições de exames, no período de janeiro a dezembro de 2016, visando a pesquisa de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis*, anti-*P. brasiliensis* e anti-*H. capsulatum*, anti-*P. brasiliensis* e anti-*A. fumigatus* e anti-*P. brasiliensis*, anti-*H. capsulatum* e anti-*A. fumigatus*. Onde PCM: paracoccidiodomicose, HP: histoplasmose e ASP: aspergilose

Observou-se que 67% (943/1.408) dos pacientes com suspeita clínica de paracoccidiodomicose eram do sexo masculino e 33% (465/1.408) do feminino (Figura 2). Verificou-se ainda, que entre os indivíduos do sexo masculino, 16% (151/943) apresentaram reatividade sorológica para *P. brasiliensis* enquanto 6,5% (30/465) das amostras reagentes eram de pacientes do sexo feminino.

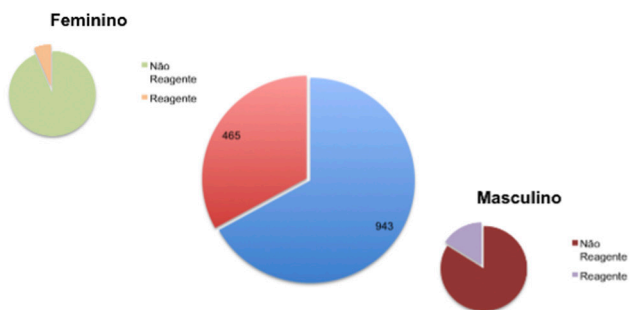


Figura 2. Distribuição dos pacientes segundo gênero, no período de janeiro a dezembro de 2016, com reatividade sorológica para *P. brasiliensis*

Em relação à faixa etária, verificou-se que a mesma variou de um (1) a 92 anos e, independentemente do sexo, a maioria dos indivíduos apresentou idade entre 41 a 60 anos (Figura 3).

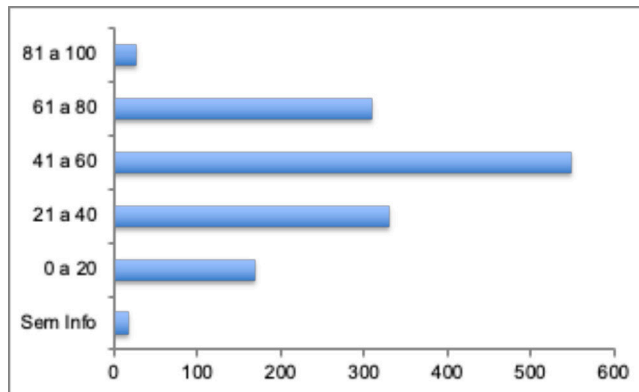


Figura 3. Distribuição dos pacientes com suspeita clínica de PCM, segundo a faixa etária, registrados no ano de 2016

Dos 1.408 exames realizados no ano de 2016, visando a pesquisa de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis*, 181 (12,9%) apresentaram reatividade para *P. brasiliensis* e 1.227 (87,1%) apresentaram ausência de reatividade pela técnica de imunodifusão dupla em gel de agarose. Com relação ao acompanhamento sorológico dos mesmos, 350 pacientes apresentaram pelo menos uma observação neste campo do banco de dados, com o histórico mais antigo datando de 1994. Entre os pacientes com reatividade sorológica, 77 (42,5%) não possuíam registro de acompanhamento sorológico anterior em nosso banco de dados, sendo assim, considerados casos novos da doença.

Verificou-se que dos 645 municípios do estado de São Paulo, 149 enviaram, para análise sorológica, amostras de soro de pacientes com suspeita clínica para PCM. Destes, aproximadamente 41% (61 municípios) apresentaram pelo menos um paciente com reatividade sorológica para *P. brasiliensis*. As cidades com maior taxa de reatividade foram: São Paulo (22/337), Jundiaí (18/57), Sorocaba (18/119) e Campinas (15/99).

DISCUSSÃO

O Instituto Adolfo Lutz, como Laboratório Central de Saúde Pública do estado de São Paulo, baseado nas diretrizes da Lei nº 8.080/1990 é responsável no estado pelo diagnóstico laboratorial da PCM sendo considerado Laboratório de Referência Estadual.

Contudo, por não ser doença de notificação compulsória em todos os estados da federação, os dados relacionados à real prevalência e taxas de mortalidade e morbidade da doença não são precisos^{2,13,15}. As informações disponíveis na literatura baseiam-se principalmente em inquéritos epidemiológicos bem como na experiência de serviços de referência no atendimento de pacientes com a doença, tornando-se, portanto, difícil a comparação de nossos resultados com os demais trabalhos existentes¹⁶⁻²⁴.

A análise das informações dos 1.408 pacientes com suspeita clínica da doença demonstrou que 67% (943) dos indivíduos eram do sexo masculino e 33% (465) do feminino sendo a razão de masculinidade de 2:1, sugerindo que o gênero não apresenta relação com a suspeita clínica da doença. Porém ao analisarmos os 181 pacientes com presença de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis* verificou-se que 83,4% (151/181) eram do sexo masculino e 16,6% (30/181) do feminino, demonstrando razão de masculinidade de 5:1, corroborando com os dados da literatura, onde Pinto et al¹² encontraram razão de masculinidade de 4:1; Bellissimo-Rodrigues et al²⁵ de 6:1; Moreto²⁶ de 7,2:1; Blotta et al²³ de 5,4:1; Marques et al¹⁸ de 10,7:1; por outro lado, Vieira et al²⁷, na região amazônica obtiveram relação entre pacientes masculino:feminino de 14:1; Paniago et al²⁸ no Mato Grosso do Sul obtiveram relação de 10:1; Telles-Filho et al²⁹ em Curitiba obtiveram relação de 9,1:1 e Almeida et al³⁰ demonstraram que esta razão foi de 10,2:1.

A distribuição da faixa etária entre os pacientes, tanto com suspeita clínica quanto os reagentes para PCM, mostrou que a maioria dos indivíduos apresentou idade entre 41 a 60 anos, corroborando com trabalhos anteriormente

realizados pelo Laboratório de Imunodiagnóstico das Micoses^{3,11,12} e de outros grupos^{27,28}. Vale ressaltar que os poucos trabalhos existentes avaliando a faixa etária dos pacientes, são baseados na avaliação da resposta imune celular (Reação de Hipersensibilidade do Tipo Tardio) e na avaliação sorológica de grupos de pacientes classificados segundo a forma clínica da doença, ou seja, PCM aguda/juvenil ou PCM crônica/adulto, porém empregando reações sorológicas e/ou antígenos diferentes ou ainda pelos estudos de mortalidade.

Além dos fatores de predisposição e modulação, como gênero e faixa etária, descritos anteriormente, Martinez¹ cita que a progressão da doença está intimamente relacionada à: a) características demográficas; b) condições e estilo de vida do hospedeiro (tabagismo e etilismo); c) etnia (negros e mulatos apresentam lesões disseminadas da forma aguda/subaguda da doença mais frequentemente que brancos); d) exposição rural (também atribuída a fatores hormonais); e) doenças de base (infecções crônicas, câncer e AIDS) e; f) tipo de resposta imunológica, influenciada principalmente por sua variabilidade genética (a comparação do sistema de histocompatibilidade de pacientes de diferentes regiões endêmicas sugere que a expressão clínica e progressão da infecção variam conforme a base genética dos mesmos).

O percentual de reatividade para *P. brasiliensis* das amostras encaminhadas ao LIM-IAL-SP foi de 12,4% e não apresentou grande diferença com a taxa de reatividade obtida em avaliação anterior realizada entre os anos de 1999 à 2010³. Existem algumas possíveis explicações para esta baixa reatividade sorológica, entre elas pode-se citar: a) falhas na avaliação clínica do paciente, visto que a patologia pode ter seu diagnóstico clínico confundido com outros processos infecciosos causados por *Leishmania* spp. e *Mycobacterium tuberculosis*⁵; b) os pacientes apresentarem grandes quantidades de IgG2, imunoglobulina não precipitante, contribuindo assim, para a liberação de resultado falso negativo³¹; c) os pacientes apresentarem níveis de anticorpos circulantes abaixo do limite de detecção da reação de imunodifusão dupla em gel

de agarose³²; e d) os pacientes terem sido infectados por um isolado que não expresse e secrete quantidades suficientes da glicoproteína de 43 kDa (gp43), considerada o antígeno imunodominante de *P. brasiliensis*³³.

Por outro lado, merece especial atenção os 77 pacientes classificados neste estudo como casos novos, que apresentaram reatividade sorológica para *P. brasiliensis* pela primeira vez no ano de 2016, resultando numa incidência de 5,37/100.000 habitantes/ano. Martinez em 2015³⁴ observou incidência estimada de 0,71 a 2,70/100.000 habitantes/ano em levantamento bibliográfico de estudos nas regiões sul e sudeste do Brasil. A revisão realizada avaliou artigos científicos de casos comprovados de PCM, porém o mesmo autor, ao revisar estudos soropidemiológicos, descreve somente avaliações em doadores de sangue e população indígena, que apresenta baixa taxa de reatividade, dificultando sua comparação com o presente trabalho e enfatizando a escassa bibliografia disponível na área epidemiológica da doença. A detecção de anticorpos circulantes anti-*P. brasiliensis* em pacientes sem histórico sorológico indica fortemente que a doença é endêmica no estado de São Paulo e que *P. brasiliensis* ainda infecta indivíduos susceptíveis. Importante salientar que do ponto de vista de Saúde Pública, esta micose representa um importante problema, pelo seu alto potencial incapacitante e pelo número de mortes prematuras que provoca, quando não diagnosticada e tratada precocemente^{35,36}.

É importante citar que mais 273 pacientes também apresentaram histórico sorológico em nosso banco de dados. Apesar da ausência de reatividade como resultado do exame, tais pacientes foram reagentes há alguns anos, ressaltando a importância do acompanhamento sorológico durante o tratamento realizado pelo paciente. Além disso, o histórico mantido no Laboratório permite ajudar os Programas de Vigilância, Manuais e Consenso em Paracoccidiodomicose que são publicados e atualizados sempre, visando: a) capacitar médicos, enfermeiros e laboratoristas para atender o Programa de Paracoccidiodomicose

no que se refere a tratamento e diagnóstico dos pacientes acometidos por este agravo; b) diagnosticar precocemente os pacientes acometidos com paracoccidiodomicose; c) disponibilizar e uniformizar o diagnóstico laboratorial (micológico e sorológico); d) disponibilizar anti-fúngicos de 1ª e 2ª linhas; e) promover ações de capacitação permanente de recursos humanos, diagnóstico clínico/epidemiológico e laboratorial, tratamento e monitoramento dos pacientes e avaliação do programa; f) determinar a real magnitude/prevalência da doença; g) caracterizar as formas clínicas; h) avaliar a distribuição geográfica; i) estimar os índices de letalidade e mortalidade e j) apoiar e promover o desenvolvimento técnico-científico.

Vale salientar também que os resultados obtidos sobre a taxa de reatividade das amostras de soro não representam exatamente a taxa de reatividade do estado de São Paulo, pois os diagnósticos micológico, imunológico e patológico de inúmeros indivíduos com suspeita clínica de PCM e/ou com a doença em atividade e/ou em acompanhamento, são absorvidos por outros serviços, especialmente aqueles vinculados às Universidades Estaduais e Hospitais Escola (Hospital das Clínicas) como no caso das cidades de Botucatu, Campinas, Ribeirão Preto ou ainda Clínicas Odontológicas ligadas às Universidades Estaduais com curso de odontologia como no caso das cidades de Araraquara, Bauru, Campinas e Ribeirão Preto.

Ao se avaliar a distribuição dos pacientes com suspeita clínica da doença nos diferentes municípios do estado de São Paulo, observou-se que esta se dá de forma heterogênea. Diversos estudos epidemiológicos sugerem que diferentes fatores, nas diferentes regiões, para cada fungo em particular (temperatura, salinidade, presença de substratos orgânicos, altitude, pluviosidade, umidade, clima, tipo de vegetação, etc) podem ser determinantes para a permanência ou manutenção transitória ou definitiva dos mesmos, caracterizando suas reserváreas^{1,34,37}.

Assim, a ação conjunta dos hospitais,

Centro de Vigilância Epidemiológica e Instituto Adolfo Lutz como Laboratório de Referência Estadual, no Programa de Controle e Vigilância da Paracoccidiodomicose, contribuirá significativamente para a melhor compreensão e/ou conhecimento da doença no âmbito estadual. O conjunto de informações revela claramente que os pacientes infectados necessitam de suporte laboratorial e acompanhamento sorológico, reforçando ainda, a importância da manutenção constante da vigilância epidemiológica da doença.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos o suporte financeiro do Instituto Adolfo Lutz. Camila Mika Kamikawa e Karolina Rosa Fernandes Beraldo são bolsistas da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS

1. Martinez R. New trends in paracoccidiodomycosis epidemiology. *J Fungi*. 2017; 3(1). pii: E1. <https://doi.org/10.3390/jof3010001>
2. Shikanai-Yasuda MA, Mendes RP, Colombo AL, Queiroz-Telles F, Kono ASG, Paniago AMM et al. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidiodomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2017;50(5):744. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0230-2017>
3. Kamikawa CM, Kohara VS, Passos AN, Vicentini AP. Retrospective seroepidemiologic analysis of patients with suspicion of paracoccidiodomycosis in the São Paulo State. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2012;18(3):254-71. <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-91992012000300003>
4. Queiroz-Telles F, Fahal AH, Falci DR, Caceres DH, Chiller T, Pasqualotto AC. Neglected endemic mycosis. *Lancet Infect Dis*. 2017;(11):e367-e377. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30306-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30306-7)
5. Coutinho ZF, Da Silva D, Lazéra M, Petri V, De Oliveira RM, Sabroza PC et al. Paracoccidiodomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saúde Pública*. 2002;18(5):1441-54. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2002000500037>
6. Ministério da Saúde (MS). Informações de Saúde - Tabnet. [Internet]. 2017 Ago [acesso em 07 set 2017]. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=02>
7. Souza W. Doenças Negligenciadas. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências; 2010. Disponível em: <http://www.abc.org.br/IMG/pdf/doc-199.pdf>
8. Da Silva JF, Oliveira HC, Marcos CM, Assato PA, Fusco-Almeida AM, Mendes-Giannini MJS. Advances and challenges in paracoccidiodomycosis serology caused by Paracoccidiodomycosis species complex: an update. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016; 84(1):87-94. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.06.004>
9. Silva-Ferreira C, de Castro Ribeiro EM, Miranda Góes AD, Melo Silva BD. Current strategies for diagnosis of paracoccidiodomycosis and prospects of methods based on gold nanoparticles. *Future Microbiol*. 2016;11:973-85. <https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0062>
10. Camargo ZP. Serology of paracoccidiodomycosis. *Mycopathologia*. 2008;165(4-5):289-302. <https://doi.org/10.1007/s11046-007-9060-5>
11. Kamikawa CM. Distribuição da paracoccidiodomicose no estado de São Paulo pela avaliação sorológica das amostras enviadas ao Instituto Adolfo Lutz. [Monografia]. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz – Secretaria de Estado da Saúde; 2011.
12. Pinto VS, Galesi VMN, Fukasava S, Vicentini AP. Vigilância Epidemiológica da Paracoccidiodomicose no Estado de São Paulo. *BEPA, Bol Epidemiol Paul*. 2012;9(103):4-15. Disponível em: <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/pdf/bepa/v9n103/v9n103a01.pdf>

13. Millington MA, Nishioka SA, Martins ST, Santos ZMG, Lima Junior FEF, Alves RV. Paracoccidiodomicose: abordagem histórica e perspectivas de implantação da vigilância e controle. *Epidemiol Serv Saude*. 2018; 27(núm esp): e0500002. <http://dx.doi.org/10.5123/s1679-49742018000500002>
14. Ouchterlony O. Antigen-antibody reactions in gels. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1949; 26(4):507-15. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1949.tb00751.x>
15. Shikanai-Yassuda MA, Telles-Filho FQ, Mendes RP, Colombo AL, Moretti M et al. Consenso em paracoccidiodomicose. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39(3):297-310. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822006000300017>
16. Lacaz CS, Passos-Filho MCR, Fava-Netto C, Macarron R. Contribuição para o estudo da Blastomicose-infecção: inquérito com paracoccidiodina. Estudo sorológico e clínico radiológico dos paracoccidiodinos-positivos. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1959; 1:245-259.
17. Londero AT. Epidemiologia. In: Del Negro G, Lacaz CS, Fiorillo A. *Paracoccidiodomicose (Blastomicose sul-americana)*. São Paulo: Sarvier-Edusp; 1982. p.85-90.
18. Marques SA, Franco MF, Mendes RP, Silva NC, Baccili C, Curcelli ED et al. Aspectos epidemiológicos da paracoccidiodomicose na área endêmica de Botucatu (São Paulo – Brasil). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1983; 25:87-92.
19. Wanke B, Londero AT. Epidemiology and paracoccidiodomycoses infection. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo A, Del Negro G. (eds.). *Paracoccidiodomycosis: an update*. Boca Raton: CRC Press; 1994. p.109-17.
20. Mangiaterra B, Alonso J, Galvan M. Histoplasmin and paracoccidiodin skin reactivity infantile population of northern Argentina. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1996;38(5):349-53. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46651996000500005>
21. Silva-Vergara ML. Contribuição ao estudo epidemiológico da paracoccidiodomicose: estudo em área de cultura de café [tese doutorado]. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 1996. Resumo disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v30n1/0669.pdf>
22. Fava SC, Fava-Netto C. Epidemiologic surveys of histoplasmin and paracoccidiodin sensitivity in Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1998; 40(3):155-64. <http://dx.doi.org/10.1590/s0036-46651998000300005>
23. Blotta MH, Mamoni RL, Oliveira SJ, Nouér SA, Papaiordanou PM, Gouveia A et al. Endemic regions of paracoccidiodomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. *Am J Trop Med Hyg*. 1999; 61(3):390-4. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.1999.61.390>
24. Fornajeiro N, Maluf MLF, Takahachi G, Svidzinski TIE. Inquérito epidemiológico sobre a paracoccidiodomicose utilizando a gp43 em dois municípios do noroeste do Paraná, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005; 38(2):191-3. <http://dx.doi.org/10.1590/s0037-86822005000200014>
25. Bellissimo-Rodrigues F, Machado AA, Martinez R. Paracoccidiodomycosis epidemiological features of a 1,000-cases series from a hyperendemic area on the southeast of Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;85(3):546-50. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.11-0084>
26. Moreto TC. Diagnóstico da paracoccidiodomicose em pacientes atendidos em serviços de rotina de hospital universitário [dissertação de mestrado]. Botucatu(SP):Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, 2010. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/89945>
27. Vieira GD, Alves TC, Lima SM, Camargo LM, Sousa CM. Paracoccidiodomycosis in a western Brazilian Amazon State: clinical-epidemiologic profile and spatial distribution of the disease. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2014;47(1):63-8. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0225-2013>

28. Paniago AM, Aguiar JI, Aguiar ES, Cunha RV, Pereira GR, Londero AT et al. Paracoccidioidomicose: estudo clínico e epidemiológico de 422 casos observados no Estado de Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36:455-9. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822003000400004>
29. Telles-Filho FQ, Brandão HE, Boscardin R, Macedo E, Barros JA, Marquetti JL et al. Alguns aspectos clínicos e epidemiológicos da paracoccidioidomicose no Estado do Paraná. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1986; 19(supl I):93.
30. Almeida F, Lacaz CS, Cunha AA. Dados estatísticos sobre a granulomatose paracoccidióica (Blastomicose sul-americana ou Paracoccidioidomicose). *Rev Bras Med*. 1946;3(2):91-4.
31. Neves AR, Mamoni RL, Rossi CL, Camargo ZP, Blotta MH. 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*. 2003;10(5):802-7. <http://dx.doi.org/10.1128/CDLI.10.5.802-807.2003>
32. Do Valle AC, Costa RL, Fialho Monteiro PC, Von Helder J, Muniz MM, Zancopé-Oliveira RM. Interpretation and clinical correlation of serological tests in paracoccidioidomycosis. *Med Mycol*. 2001; 39(4):373-7. <http://dx.doi.org/10.1080/mmy.39.4.373.377>
33. Machado GP, Moris DV, Arantes TD, Silva LRF, Theodoro RC, Mendes RP et al. Cryptic species of *Paracoccidioides brasiliensis*: impact on paracoccidioidomycosis immunodiagnosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013;108(5):637-43. <http://dx.doi.org/10.1590/0074-0276108052013016>
34. Martinez R. Epidemiology of paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2015;57(Suppl 19):11-20. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652015000700004>
35. Santo AH. Tendência da mortalidade relacionada à paracoccidioidomicose, Estado de São Paulo, Brasil, 1985 a 2005: estudo usando causas múltiplas de morte. *Rev Panam Salud Publica*. 2008;23(5):313-24. Disponível em: <https://www.scielosp.org/pdf/rpsp/2008.v23n5/313-324/pt>
36. Souza SP, Jorge VM, Xavier MO. Paracoccidioidomycosis in southern Rio Grande do Sul: a retrospective study of histopathologically diagnosed cases. *Braz J Microbiol*. 2014;45(1):243-7. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822014000100035>
37. Coutinho ZF, Wanke B, Travassos C, Oliveira RM, Xavier DR e Coimbra CE Jr. Hospital morbidity due to paracoccidioidomycosis in Brazil (1998-2006). *Trop Med Int Health*. 2015; 20(5):673-680. <https://doi.org/10.1111/tmi.12472>