

Edy Firmina Pereira

Distribuição geográfica, epidemiologia e clínica de casos de PCM causada por *Paracoccidioides brasiliensis* e *P. lutzii* no Estado de Mato Grosso do Sul.

Campo Grande

2015

Edy Firmina Pereira

Distribuição geográfica, epidemiologia e clínica de casos de PCM causada por *Paracoccidioides brasiliensis* e *P. lutzii* no Estado de Mato Grosso do Sul

Dissertação apresentada como exigência parcial à obtenção do grau de mestre em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob a orientação da Prof^aDr^a Anamaria Miranda Mello Paniago

Campo Grande

2015

DEDICATÓRIA

Aos meus pais: Hylário Escobar Pereira (*in memorian*), que foi o primeiro a pronunciar Blastomicose na minha Vida, Edite Simões Pacheco da Silva que me fez ser o que sou hoje, obrigada por tudo mãe, te amo!

A minhas irmãs que sempre foram presentes e me apoiaram: Maria, Hildete e Cristina.

Ao meu filho Filipe Antenor, pela paciência, amor da minha vida;

A Sigrid pelo suporte e dedicação, dando, carinho e atenção, valeu!

Aos meus amigos pelo incentivo.

Agradecimentos

Agradeço a DEUS e a Nossa Senhora por tudo nessa vida, pois sem eles eu nada seria.

Agradeço muito à minha orientadora Prof^aDr^a Anamaria M.M. Paniago, que com muita paciência e carinho, nos fez concluir este projeto.

Ao ProfDr. Zoilo Pires de Camargo pela colaboração e parceria no decorrer deste trabalho.

Agradeço a DEUS por ter em minha vida, uma amiga, e “coorientadora”: Mst Alcione C.F. Stief

Sou grata pela amizade, orientações e boa vontade em ajudar Prof^aDr^a Maria de Fatima Cepa Matos

Agradeço pela cumplicidade e cooperação da “chefe”, Prof^a Renata Trentin.

Agradeço a cada dia, por ter não só colegas de trabalho, mas sim uma família e “que família” Lucia Ribeiro, Rita de Cassia, Liliane Papa, Regina Rocha, Fernanda Spóssito, Debora Olartechea, Luis DallOnder, Larissa Bandeira e os professores do LAC.

As amigas do mestrado, Anna Leticia, Nara Tosta, Eunice Cury, Samara Graeff, Luciana Nogueira, pois partilhamos as dificuldades, e também nos alegamos juntas.

Aos amigos que fiz em São Paulo, Rosângela S. Pfister, Leticia M. Araujo, Gregory Gegembauer, Anne Chad, Marianne Amaral.

Enfim agradeço a todos que colaboraram de alguma forma na realização deste trabalho.

“Sabemos que todos nós temos conhecimento.”
Mas o conhecimento envaidece; é o amor que constrói.
Quando alguém julga ter alcançado o saber,
é porque ainda não sabe onde está
o verdadeiro conhecimento.”
(I Coríntios 8,1-2)

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

PCM: Paracoccidiodomicose

ID: Imunodifusão Radial dupla

CFA: CellFreeAntígeno

Exo: Exoantígeno

kDa: KiloDaltons

Pb: Paracoccidioides brasiliensis

Pl: Paracoccidioieslutzi

μ: Micro

μL: Microlitro

ml: mililitro

mg: miligrama

rRNA: RNA ribossomal

rDNA: DNA ribossomal

ELISA EnzymeLinked Immunosorbent Assay

PCR: Polimerase Chain Reaction

β: Beta

pH: potencial de hidrogênio

SFM: sistema fagocítico-monocitário

BHI: infusão cérebro coração

IFI: imunofluorescência indireta

CIE: contraimunoeletroforese

WB: Western blot

Gp: Glicoproteína

Ag: Antígeno

DNA:do ácido desoxirribonucleico

PCR: reação em cadeia da polimerase

RAPD:randomamplifiedpolymorphic DNA

AIDS: síndrome da imunodeficiência adquirida

Rpm: rotações por minuto

MT: Mato Grosso

MS: Mato Grosso do Sul

HU: Hospital Universitário

Resumo

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica endêmica na América Latina causada por um fungo termo-dimórfico da família Ajellomycetaceae e gênero *Paracoccidioides*. Até pouco tempo acreditava-se ser o *P. brasiliensis* a única espécie envolvida na etiologia da PCM, até que, em 2009, foi identificada uma espécie denominada *P. lutzii* partir de isolados de pacientes com a doença, predominantemente na região Centro-Oeste do Brasil. A identificação das espécies do *Paracoccidioides* tem sido feita baseando-se no sequenciamento genético do fungo obtido de cultivos. A diferenciação da PCM causada pelo *P. brasiliensis* do *P. lutzii* pode ser obtida por pesquisa de anticorpos no soro de pacientes, utilizando-se antígenos específicos das duas espécies. A distribuição geográfica do *P. lutzii* e os aspectos epidemiológicos e clínicos da PCM associados a essa espécie ainda são pouco conhecidos. Detectando a ocorrência de PCM causada pelo *Paracoccidioides lutzii* em um Centro de Referência de Mato Grosso do Sul bem como comparar os aspectos clínicos e epidemiológicos da PCM causada pelas duas espécies. Foram selecionados soros de 82 pacientes com PCM atendidos no Hospital Universitário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, entre os anos de 2008 e 2012. Foi realizada Imunodifusão com a gp43, com exoantígeno de isolado B339 (ExoPb) e com antígenos obtidos de superfície celular CellFreeAntigen de isolado de *P. lutzii* (CFA Pl). Sendo considerado caso de PCM por *P. lutzii* aquele cujo soro reagiu contra CFA-Pl e não reagiu contra gp43. A procedência, dados clínicos, demográficos e epidemiológicos de casos de PCM causada por *P. lutzii* foram comparados com os casos por *P. brasiliensis*. Foram identificados 16 casos (19,75%) de PCM por *P. lutzii* e 65 casos (80,25%) de PCM por *P. brasiliensis*. A ID com ExoPb foi reagente em 83,1% dos 65 casos de *P. brasiliensis* e 31,3% dos 16 casos *P. lutzii*. A ID com CFA Pl resultou falso-positiva em 21,5% dos casos de PCM por *P. brasiliensis*. Os casos de *P. lutzii* procederam de diferentes municípios do Estado e não foram observadas diferenças demográficas e clínicas entre os casos de PCM por *P. lutzii* e PCM por *P. brasiliensis*. Um quinto dos pacientes atendidos no local do estudo apresentaram PCM causada por *P. lutzii*. O diagnóstico sorológico deve ser realizado com diferentes antígenos para a identificação de casos causados pelas diferentes espécies. Parece não haver diferenças clínicas entre a PCM causada pelas duas espécies.

Palavras-chave: Paracoccidioidomicose, *Paracoccidioides lutzii*, sorologia, distribuição geográfica.

Abstract

Paracoccidioidomycosis (PCM) is an endemic systemic mycosis in Latin America caused by a thermo-dimorphic fungus of Ajellomycetaceae family and *Paracoccidioides* genus. Until recently *P. brasiliensis* was believed to be the only agent of PCM, but a new species called *P. lutzii* was identified of isolates from patients predominantly in the Midwest region of Brazil. Species identification is made based on the genetic sequencing of the fungus obtained from culture. The differentiation of PCM by *P. brasiliensis* or *P. lutzii* can be made by antibody detection in patients sera with specific antigens. The *P. lutzii* geographical distribution and epidemiological and clinical features of PCM by this species are still poorly understood. To identify the *Paracoccidioides* species involved in PCM cases of Mato Grosso do Sul by serological tests and to analyze if there are demographics and clinical differences in PCM by two species. Sera from 81 PCM patients treated at University Hospital, Federal University of Mato Grosso do Sul, between the years 2008 and 2012 were selected. Immunodiffusion (ID) was performed with gp43, with exoantigen isolate B339 (ExoPb) and antigens obtained from cell-free cell surface antigen isolated from *P. lutzii* (CFA Pl). The origin, clinical, demographic and epidemiological data of PCM caused by *P. lutzii* were compared with cases by *P. brasiliensis*. 16 cases (19.75%) of PCM *P. lutzii* and 65 cases (80.25%) of PCM *P. brasiliensis* were identified. The ID with ExoPb was positive in 83.1% of 65 cases of *P. brasiliensis* and 31.3% of 16 cases *P. lutzii*. The ID with CFA Pl was false-positive in 21.5% of cases of PCM by *P. brasiliensis*. Cases of *P. lutzii* came from different districts of the State and no demographic and clinical differences were observed between cases of *P. lutzii* and *P. brasiliensis*. A fifth of the patients seen at the study site showed PCM caused by *P. lutzii*. Serologic diagnosis must be made with different antigens for identification of cases caused by different species. It seems that no clinical differences between the PCM caused by two species.

Key-Words: Paracoccidioidomycosis, *Paracoccidioides lutzii*, serology, spatial distribution.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	09
2 REVISÃO DA LITERATURA	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.0
2.1 Agente etiológico	Erro! Indicador não definido.
2.2 Epidemiologia	Erro! Indicador não definido.
2.3 imunopatogenia	Erro! Indicador não definido.
2.4Manifestações clínicase tratamento	Erro! Indicador não definido.5
2.5 Diagnóstico laboratorial da paracoccidiodomicose	Erro! Indicador não definido.
2.5.1Micológico direto	Erro! Indicador não definido.
2.5.2Cultura	Erro! Indicador não definido.
2.5.3 Histopatológico.....	19
2.5.4 Sorologia.....	20
2.5.4.1 <i>Imunodifusão radial dupla (ID)</i>	21
2.5.4.2 <i>Contraímunoeletroforese (CIE)</i>	22
2.5.4.3 <i>Imunofluorescencia indireta (IFI)</i>	22
2.5.4.4 <i>Ensaio imunoenzimático (ELISA)</i>	23
2.5.4.5 <i>Western Blot (WB)</i>	23
2.5.5Biologia Molecular	24
3 OBJETIVOS	Erro! Indicador não definido.
3.1 Objetivo geral	Erro! Indicador não definido.
3.2 Objetivos específicos	Erro! Indicador não definido.
4 MATERIAL E MÉTODOS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
4.1 Tipo de estudo	Erro! Indicador não definido.
4.2Local e período	Erro! Indicador não definido.
4.3 Critérios de inclusão	Erro! Indicador não definido.
4.4Procedimentos	Erro! Indicador não definido.
4.4.1 Coleta de dados clínicos e demográficos	Erro! Indicador não definido.
4.4.2Coleta de amostras de soro	Erro! Indicador não definido.
4.4.3Obtenção dos antígenos a partir de isolados de <i>Paracoccidioides spp</i>	Erro! Indicador não definido.
4.4.3.1 Exoantígeno de <i>P. brasiliensis</i> B339 (ExoPb)	Erro! Indicador não definido.
4.4.3.2Antígeno de superfície celular Cell Free Antigen (CFA Pl)	Erro! Indicador não definido.
4.4.3.3Obtenção do antígeno gp43.....	30
4.4.4Técnica de Imunodifusão.....	33
4.4.5Distinção da PCM por <i>P. lutzii</i> por <i>P. brasiliensis</i>	32
4.5Processamento e análise dos dados	34
4.6Considerações éticas	34
5 RESULTADOS	35
6 DISCUSSÃO	Erro! Indicador não definido.
7 CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS	42
ANEXO	55
APÊNDICE	57