

# REATIVIDADE DE IGG DE PACIENTES COM PARACOCCIDIOIDOMICOSE NO NORTE DO PARANÁ COM OS ANTÍGENOS SOLÚVEIS DE *Paracoccidioides brasiliensis* E DE *P. lutzii* (LDR2)

Data de submissão: 30/06/2023

Data de aceite: 01/08/2023

### **Franciele Ayumi Semêncio Chiyoda-Rodini**

Universidade Estadual de Londrina,  
Departamento de Ciências Patológicas,  
Londrina - Paraná  
<http://lattes.cnpq.br/2374286387972536>

### **Bianca Dorana de Oliveira Souza**

Universidade Estadual de Londrina,  
Departamento de Ciências Patológicas  
Londrina - Paraná  
<http://lattes.cnpq.br/2433694369223422>

### **Maria Catarina Cavalcanti Fracazzo**

Universidade Estadual de Londrina,  
Departamento de Ciências Patológicas  
Londrina - Paraná  
<http://lattes.cnpq.br/5675442700469429>

### **Marianna Enque Fava**

Universidade Estadual de Londrina,  
Departamento de Ciências Patológicas  
Londrina - Paraná  
<http://lattes.cnpq.br/6789741800401087>

### **Helena Kaminami Morimoto**

Universidade Estadual de Londrina,  
Departamento de Patologia, Análises  
Clínicas e Toxicológicas  
Londrina - Paraná  
<http://lattes.cnpq.br/7570047184158328>

### **Maria Angelica Ehara Watanabe**

Universidade Estadual de Londrina,  
Departamento de Ciências Patológicas  
Londrina - Paraná  
<http://lattes.cnpq.br/3411343294900797>

### **Flávio Hiroshi Itano**

Universidade Estadual de Londrina,  
Departamento de Microbiologia  
Londrina - Paraná  
<http://lattes.cnpq.br/3813318833602894>

### **Mario Augusto Ono**

Universidade Estadual de Londrina,  
Departamento de Ciências Patológicas  
Londrina - Paraná  
<http://lattes.cnpq.br/2409390685316192>

### **Eiko Nakagawa Itano**

Universidade Estadual de Londrina,  
Departamento de Ciências Patológicas  
Londrina - Paraná  
<http://lattes.cnpq.br/0678087604864219>

**RESUMO:** A paracoccidiodomicose (PCM) é uma micose sistêmica causada pelos fungos *Paracoccidioides brasiliensis* (S1, PS2 e PS3) e *P. lutzii*, sendo que *P. brasiliensis* S1 possui maior prevalência na região sul do Brasil. O ensaio

imunoenzimático (ELISA - *enzyme linked immunosorbent assay*) é uma das metodologias aplicadas para o diagnóstico e monitoramento do tratamento da doença. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a reatividade de anticorpos de amostras de soros de pacientes com PCM atendidos no Hospital das Clínicas/Universitário, Londrina, PR a antígenos solúveis de *P. brasiliensis* S1 e *P. lutzii*. Como meio de diagnóstico sorológico, as amostras foram inicialmente analisadas por ELISA utilizando exoantígeno de *P. brasiliensis* Pb339 e amostras de soro humano normal (NHS) como controle negativo. Foram selecionadas 37 amostras positivas para PCM, sendo 03 de pacientes do sexo feminino e 34 de pacientes do sexo masculino com PCM crônica unifocal ou multifocal, não tratada ou em tratamento. Para avaliação da reatividade foram utilizadas placas de ELISA sensibilizadas com antígenos solúveis (antígenos livres de células, CFA) de *P. brasiliensis* Pb18 (S1) e *P. lutzii* LDR2 e incubadas com amostras de soros diluídos a 1/200. Os resultados obtidos, expressos em média de D.O., foram de  $2.43 \pm 1.06$  com antígenos de *P. brasiliensis* Pb18 e  $1.29 \pm 0.845$  com antígenos de *P. lutzii* LDR2 ( $P < 0.05$ ). Concordando com os dados da literatura, a maior reatividade de soros de pacientes com PCM atendidos na região norte do Paraná ocorre com os antígenos de *P. brasiliensis* S1 em relação aos antígenos de *P. lutzii* LDR2.

**PALAVRAS-CHAVE:** Ensaio imunoenzimático, Imunodiagnóstico, Micose.

#### IGG REACTIVITY OF PATIENTS WITH PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS IN NORTHERN PARANÁ WITH *Paracoccidioides brasiliensis* AND *P. lutzii* (LDR2) SOLUBLE ANTIGENS

**ABSTRACT:** Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis caused by the fungi *Paracoccidioides brasiliensis* (S1, PS2 and PS3) and *P. lutzii*, with *P. brasiliensis* S1 having a higher prevalence in southern Brazil. The immunoenzymatic assay (ELISA - enzyme linked immunosorbent assay) is one of the methodologies applied for the diagnosis and monitoring of the treatment of the disease. The objective of the present study was to evaluate the reactivity of antibodies in serum samples from patients with PCM treated at Hospital das Clínicas/Universitário, Londrina, PR to soluble antigens of *P. brasiliensis* S1 and *P. lutzii*. As a means of serological diagnosis, samples were initially analyzed by ELISA using *P. brasiliensis* Pb339 exoantigen and normal human serum (NHS) samples as a negative control. Thirty-seven samples positive for PCM were selected, 03 from female patients and 34 from male patients with chronic unifocal or multifocal PCM, untreated or undergoing treatment. To evaluate the reactivity, ELISA plates sensitized with soluble antigens (cell-free antigens, CFA) of *P. brasiliensis* Pb18 (S1) and *P. lutzii* LDR2 were used and incubated with serum samples diluted at 1/200. The results obtained, expressed as mean O.D., were  $2.43 \pm 1.06$  with *P. brasiliensis* Pb18 antigens and  $1.29 \pm 0.845$  with *P. lutzii* LDR2 antigens ( $P < 0.05$ ). In agreement with data from the literature, the highest reactivity of sera from patients with PCM treated in the northern region of Paraná occurs with *P. brasiliensis* S1 antigens in relation to *P. lutzii* LDR2 antigens.

**KEYWORDS:** Enzyme immunoassay, Immunodiagnosis, Mycosis.

## 1 | INTRODUÇÃO

A paracoccidiodomicose (PCM) é, segundo o ministério da saúde, a principal micose sistêmica Brasileira e a oitava doença infecciosa e parasitária que mais mata no país. Esta doença é causada pelos fungos termodimórficos *Paracoccidioides brasiliensis* e suas diferentes linhagens filogenéticas (S1, PS2 e PS3) e a nova espécie, *P. lutzii* (TEIXEIRA et al., 2009; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). O contágio ocorre principalmente pelo manejo do solo contaminado e, por essa razão, atividades agrícolas, jardinagem, construção civil entre outras, são as principais atividades que favorecem a infecção por esses fungos (McEWEN, 1995).

A PCM é restrita às regiões tropicais e subtropicais da América Latina, sendo endêmica no Brasil, Colômbia, Venezuela e Argentina (SAN-BLAS; NIÑO-VEJA; ITURRIAGA, 2002). A literatura relata que 80% dos casos de PCM ocorrem no território brasileiro, tornando este país o maior centro endêmico da doença, distribuídos nas regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste (CARRERO et al., 2008), e concentrados nos estados do Paraná, São Paulo, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Minas Gerais (COUTINHO et al., 2002), Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás (PANIAGO et al., 2003). No Paraná, são registrados os maiores índices de mortalidade do Sul do Brasil (BITTENCOURT et al., 2005).

Análises de ocorrência de infecção fúngica em animais pelos agentes etiológicos da PCM podem indicar qual a incidência das espécies causadoras da doença em cada região do país. Estudos que avaliaram a ocorrência de infecção por *P. brasiliensis* em animais foram realizadas principalmente utilizando testes sorológicos e a maioria desses estudos foi realizada no Sul e Sudeste do Brasil (ONO et al., 2001). A espécie *P. lutzii* é encontrada com maior frequência nas regiões centro-oeste, sudeste e norte do Brasil e no Equador (CARRERO et al., 2008; THEODORO et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2013). Porém, a detecção de anticorpos anti-*P. lutzii* em animais do Estado de Rio Grande do Sul sugere que o fungo pode ser encontrado no sul do Brasil, apesar de ser descrito principalmente no centro-oeste e sudeste do país (MENDES et al., 2017).

A PCM é classificada em PCM infecção e PCM doença, esta pode se apresentar na forma aguda ou subaguda (ou forma juvenil), forma crônica (tipo adulto) ou forma residual (sequelas). A forma crônica pode ser subdividida em PCM unifocal ou multifocal conforme o número de locais das lesões (FRANCO et al., 1987). A PCM acomete principalmente os pulmões, mas pode afetar diversos órgãos, como os linfonodos, as mucosas, a pele, as glândulas adrenais, o sistema nervoso central etc. (MENDES, 1994). Por se tratar de uma micose sistêmica, a PCM apresenta uma ampla gama de sinais, sintomas e manifestações clínicas, sendo difícil estabelecer um diagnóstico clínico preciso.

A PCM é usualmente diagnosticada por exames radiográficos para a detecção de lesões pulmonares. O diagnóstico clínico é realizado por análise de amostras biológicas

como escarros, a partir da observação do material clínico clarificado com KOH 20%. Outros exames clínicos como análise micológica e histopatológica, coloração da prata (Gomori-Grocott) ou PAS - ácido periódico de Schiff também são utilizados (BETHLEM et al., 1999; SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

Para o isolamento de *P. brasiliensis* são utilizados o ágar Sabouraud e BHI (FISHER; COOK, 2001; LACAZ et al., 2002). As desvantagens são o risco de contaminação e o tempo de incubação prolongado, podendo variar de uma a três semanas (SANO et al., 2001). O exame direto também apresenta baixa sensibilidade na visualização do fungo (SALINA et al., 1998). Exames histopatológicos com o emprego da coloração de hematoxilina-eosina (H&E) e impregnação pela prata também são utilizados no diagnóstico da PCM, no qual é possível visualizar a célula mãe, circundada por inúmeras células filhas, característica das múltiplas exoesporulações do *P. brasiliensis* (LACAZ et al., 2002).

A pesquisa de elementos fúngicos sugestivos de *Paracoccidioides* spp. em raspados de lesões, escarro e biopsias se apresenta como padrão ouro para o diagnóstico da PCM (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017). Entretanto, não é sempre que é possível a identificação direta do fungo nas amostras, tornando necessária a utilização de técnicas indiretas para a detecção de anticorpos específicos em amostras de soro. Portanto, para complementar o diagnóstico direto, é utilizado o diagnóstico indireto, utilizando métodos imunológicos de detecção de anticorpos para a confirmação da doença. Além disso, o título de anticorpos específicos anti-*P. brasiliensis* tem correlação com a gravidade das formas clínicas, sendo mais elevados na forma aguda-subaguda da doença (SHIKANAI-YASUDA et al., 2017).

A partir da descoberta da nova espécie *P. lutzii* como agente da PCM, novas preparações antigênicas e testes para um diagnóstico diferencial entre essas duas espécies estão sendo pesquisadas. Gegembauer et al. (2014) testando diferentes preparações de *P. lutzii* demonstraram que o antígeno livre de células derivado dessa espécie foi um excelente antígeno para diagnóstico sorológico e capaz de diagnosticar 100% dos soros de pacientes com PCM por *P. lutzii* com amostras de soro de pacientes predominantemente da região Centro-Oeste do Brasil.

Amostras de exoantígenos produzidos a partir de duas cepas de *P. brasiliensis* isolados em duas áreas geográficas diferentes foram comparados em termos de sensibilidade e especificidade em relação ao diagnóstico por Batista Jr et al. (2010). Neste estudo, foram utilizadas amostras de soros de pacientes do estado de Mato Grosso versus soros do estado de São Paulo e foram encontrados resultados distintos. Desta forma, os autores sugeriram que do ponto de vista prático, cada região macrogeográfica do Brasil teria que preparar antígenos de isolados de suas próprias áreas para garantir a maior sensibilidade possível dos métodos diagnósticos.

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a reatividade de anticorpos IgG de amostras de soros de pacientes da região norte do Paraná a antígenos solúveis de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Coleta de amostras dos pacientes

Os pacientes do Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná e do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Londrina (UEL) com suspeita de PCM que aceitaram participar do projeto (Projeto PROEX/UEL 02192 - Diagnóstico laboratorial e monitoramento de tratamento da Paracoccidioidomicose: fase III), responderam a um questionário, assinaram ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e passaram por coleta de sangue. Estas amostras foram processadas no Laboratório de Imunologia Aplicada/UEL.

### 2.2 Microrganismos e obtenção de antígenos

Foram utilizadas as seguintes amostras de fungos: *P. brasiliensis* (Pb339), *P. brasiliensis* (Pb18) e *P. lutzii* (isolado LDR2), mantidos a 35°C em meio sabouraud dextrose agar (SDA) 4% e subcultivados a cada cinco dias de crescimento. Para a obtenção de exoantígeno, fungos Pb339 crescidos por cinco dias foram coletados em meio TOM (líquido), mantidos a 35°C sob agitação por sete dias seguido de filtração e liofilização. O material liofilizado foi ressuspensão em água destilada (exoantígeno), a concentração proteica foi determinada pelo método de Lowry e o exoantígeno foi mantido a -80°C até o seu uso. Os antígenos livres de célula (*cell-free antigen* – CFA) de Pb18 e LDR2 foram obtidos de acordo com Camargo et al. (1991), modificado pela adição de inibidor de protease PMSF. A concentração proteica de cada amostra de CFA foi determinada em espectrofotômetro (NanoDrop) e estas foram mantidas a -80°C até o seu uso.

### 2.3 Ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto

As amostras de soro foram inicialmente analisadas por ELISA indireto utilizando exoantígeno de *P. brasiliensis* Pb339, método sorológico utilizado para diagnóstico de PCM. Para isso, placas de poliestireno de 96 poços foram sensibilizadas com exoantígeno de Pb339 diluído 1/5000 em tampão carbonato-bicarbonato 0,1M pH 9,6 por uma hora a 37°C e *overnight* a 4°C. Após lavagens e bloqueio das placas (PBS com 5% de leite desnatado em pó e 0,5% de tween-20, 200 µL/poço), foram adicionados 100 µL/poço das amostras séricas de pacientes com suspeita de PCM (n=51) e amostras de soro humano normal (SHN - controle negativo; n=10) diluídas em tampão diluição (0,5% leite desnatado em PBS) a 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800. As placas foram incubadas por 1,5 hora à 37°C. Após novas lavagens, adicionou-se conjugado-peroxidase anti-IgG humano diluído 1/5000 (Sigma) às placas que foram novamente incubadas por 1,5 hora à 37°C. Após as lavagens, a reação foi desenvolvida pela adição de substrato cromógeno orto-fenilenediamina (OPD; 10 mg de OPD em 25 mL de tampão citrato pH 4,5 e 10µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 100 µl/poço). A reação foi interrompida usando 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N, sendo feita a leitura à 492 nm em leitora de

microplacas (espectrofotômetro Multiskan EX, Uniscience-Labsystems, Helsinki, Finland). Após a leitura, os níveis de anticorpos foram expressos em densidade ótica (D.O.) e os valores de corte (cutoff) foram calculados como a média mais duas vezes o desvio padrão das leituras de SHN. Os soros com valores de D.O. acima do cutoff foram considerados reagentes para o teste.

Das amostras analisadas por ELISA, foram selecionadas 37 amostras positivas, sendo 03 do sexo feminino e 34 de pacientes do sexo masculino com PCM crônica unifocal ou multifocal, não tratada ou em tratamento. Essas amostras foram diluídas a 1/200 e novamente avaliadas pelo método de ELISA indireto descrito acima, porém, realizado com CFA de *P. brasiliensis* Pb18 e *P. lutzii* LDR2.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Frequentemente são utilizados antígenos solúveis de *Paracoccidioides* spp. para sorodiagnóstico tais como antígenos livres de células (CFA) que estão frouxamente ligados à superfície celular (CAMARGO et al., 1991) e exoantígenos de sobrenadantes de culturas líquidas (MENDES-GIANNINI et al., 1984; CAMARGO et al., 1988; CAMARGO, 2008). Neste trabalho, foi utilizado inicialmente exoantígeno de *P. brasiliensis* Pb339 e os resultados de análise de 51 amostras de soros de pacientes com PCM ou com suspeita de PCM por ELISA indireto resultou em 72,5% de positividade (figura 1a). Esta positividade é compatível com dados da literatura, considerando a inclusão de amostras de soros de pacientes com suspeita de PCM.

A utilização de exoantígeno por ELISA para fins de diagnóstico de PCM é altamente sensível, sendo citada até 100% de sensibilidade (MENDES-GIANNINI et al., 1984). Todavia, existe a possibilidade de ocorrer reação cruzada com outras doenças fúngicas, o que pode ser solucionada por processo de absorção ou por determinação de uma zona de corte (MENDES-GIANNINI et al., 1984).

A partir de soros positivos com exoantígeno por ELISA, 37 amostras foram avaliadas quanto a reatividade sérica com antígenos de *P. brasiliensis* e *P. lutzii*. E nesta avaliação foi utilizada CFA tanto de *P. brasiliensis* como de *P. lutzii*, considerando que de acordo com Gegembauer et al. (2014) o preparado CFA é um excelente antígeno para diagnóstico sorológico de PCM devido a infecção por *P. lutzii*. E segundo Lenhard-Vidal et al. (2021), o CFA-ELISA parece ser uma boa opção para triagem sorológica em inquéritos epidemiológicos. Os nossos resultados obtidos com CFAs, expressos em média de D.O., foram de  $2.43 \pm 1.06$  com antígenos de Pb18 e  $1.29 \pm 0.845$  com antígenos de LDR2 ( $p < 0.05$ ), conforme figura 1b. Esses dados mostram uma maior reatividade dos soros de pacientes com PCM da nossa região com os antígenos de *P. brasiliensis* S1 em relação aos antígenos de *P. lutzii* LDR2.

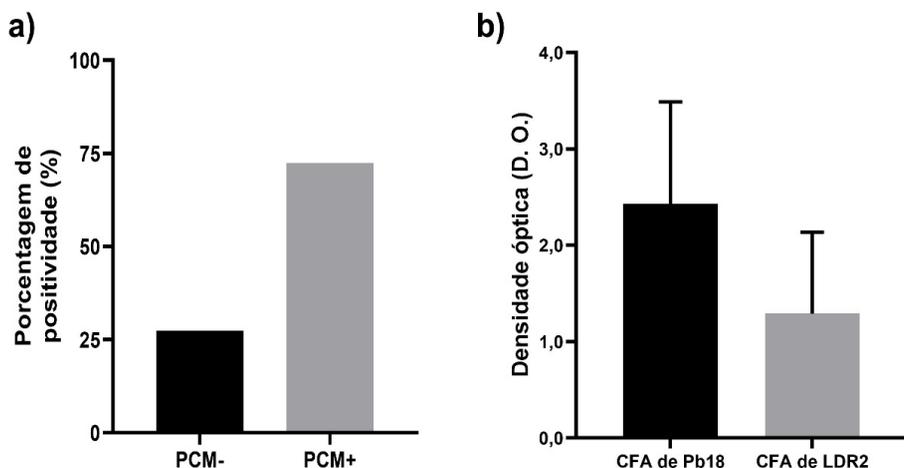


Figura 1. **a)** Porcentagem de positividade de pacientes diagnosticados com PCM através de ELISA indireto utilizando exoantígeno de *P. brasiliensis* S1 (Pb339). PCM- = soros não reagentes, 27,5%; PCM+ = soros reagentes, 72,5%. **b)** Reatividade de anticorpos IgG de pacientes com PCM a CFA de *P. brasiliensis* S1 (Pb18) e *P. lutzii* LDR2 pelo método de ELISA indireto. Houve maior reatividade de CFA de *P. brasiliensis* S1 em relação ao CFA de *P. lutzii* LDR2 ( $p < 0,05$ ).

Embora a espécie *P. lutzii* seja encontrada com maior frequência nas regiões centro-oeste, sudeste e norte do Brasil (CARRERO et al., 2008; THEODORO et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2013), a detecção de anticorpos anti-*P. lutzii* em animais do Estado de Rio Grande do Sul sugere que o fungo pode ser encontrado no sul do Brasil (MENDES et al., 2017). E o fungo utilizado neste trabalho, *P. lutzii* (LDR2), foi isolado de um paciente com PCM residente no norte do Paraná (TAKAYAMA et al., 2010), portanto, no Sul do Brasil. Além disso, Lenhard-Vidal et al. (2021) detectaram 21 amostras de soros reativos a *P. lutzii* LDR2 em pessoas que viviam apenas em Guarapuava, PR. A reatividade aos antígenos de LDR2, mesmo que fraca, observada neste trabalho também sugere a presença de casos de PCM infecção por *P. lutzii* na nossa região, embora sejam necessários estudos adicionais.

Não existe ainda antígeno ou técnica sorológica validado para diagnóstico de PCM por infecção por *P. lutzii* (SHIKANAI-YASSUDA et al., 2017), tornando importante o estudo de antígenos da nova espécie bem como a reatividade deles com os anticorpos presentes em soros de pacientes com PCM.

Para garantir a maior sensibilidade possível dos métodos diagnósticos, Batista Jr et al. (2009), sugeriram o preparo de antígenos de isolados de cada região macrogeográfica do Brasil. O nosso estudo representa a primeira investigação de reatividade de anticorpos aos antígenos de *P. brasiliensis* e *P. lutzii* LDR2 em amostras de soro de pacientes residentes na região norte do Paraná, Brasil e, concordando com os dados da literatura em relação a região sul do Brasil (THEODORO et al., 2012), a maior reatividade de soros ocorre com os antígenos de *P. brasiliensis* S1 em relação aos antígenos de *P. lutzii* LDR2.

## 4 | CONCLUSÃO

Concluimos através deste estudo que, concordando com os dados da literatura, há uma maior reatividade de soros de pacientes com PCM atendidos na região norte do Paraná com os antígenos de *P. brasiliensis* em relação aos antígenos de *P. lutzii* LDR2.

## REFERÊNCIAS

BATISTA JUNIOR, J. et al. 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.

BETHLEM, E. P. et al. Paracoccidioidomycosis. **Current Opinion in Pulmonary Medicine** 5(5):p 319-325, 1999.

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

CAMARGO, Z. P. et al. The use of cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis* in serological tests. **Journal Medical Veterinary Mycology**, v. 29, n. 1, p. 31-8, 1991.

CAMARGO Z. P. Serology of Paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia Journal**, v. 165, p. 289-302, 2008.

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.

CARRERO, L. L. et al. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. **Fungal Genet Biol**, v. 45, n. 5, p. 605-612, 2008.

COUTINHO, Z.F. et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cad Saude Publica**, v. 18, n. 5, p. 1441- 1454, 2002.

FISHER, F.; COOK, N. B. Micologia: fundamentos e diagnóstico. Rio de Janeiro: **Revinter**, 2001.

FRANCO, M. et al. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 20, n. 2, p. 129-132, 1987.

GEGEMBAUER, G. et al. Serology of paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides lutzii*. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 7, p. e2986, Jul 2014.

LACAZ, C.S. et al. Tratado de Micologia médica. **Sarvier**, v. 44, n. 5, p. 297-298, 2002.

LENHARD-VIDAL A. et al. IgG reactivity profile to *Paracoccidioides* spp. antigens in people with asymptomatic Paracoccidioidomycosis. **J Med Microbiol**, v. 70, n. 1, 2021.

MCEWEN, J. G. et al. A. In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Archives of medical research**, v. 26, n. 3, p. 305–306, 1995.

MENDES-GIANINNI, M. S. J. et al. Detection of the 43,000-molecular-weight glycoprotein in sera of patients with paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.27, n.12, p.2842-2845. 1989.

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; et al. Immunoenzymatic absorption test for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **J Clin Microbiol**, v. 20, p. 103-108, 1984.

MENDES, J. F. et al. Paracoccidioidomycosis infection in domestic and wild mammals by *Paracoccidioides lutzii*. **Mycoses**, v. 60, n. 6, p. 402-6, 2017.

MENDES, R. P. The gamut of clinical manifestations. In: FRANCO, M.; SILVA - LACAZ, C.; RESTREPO-MORENO, A. **Paracoccidioidomycosis**. CRC Press, p.233-258, 1994.

ONO, M.A. Canine paracoccidioidomycosis: a seroepidemiologic study. **Medical Mycology Journal**, v. 39, n. 3, p. 277–282, 2001.

PANIAGO, A. M. et al. Paracoccidioidomycosis: a clinical and epidemiological study of 422 cases observed in Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 455-459, 2003.

SALINA, M. A. et al. Detection of circulating *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in urine of paracoccidioidomycosis patients before and during treatment. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 6, p. 1723-1728, 1998.

SAN-BLAS, G.; NIÑO-VEGA, G.; ITURRIAGA, T. Paracoccidioides brasiliensis and paracoccidioidomycosis: Molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med Mycol**, v. 40, n. 3, p. 225–242, 2002.

SANO, A. et al. Detection of gp43 and ITS1-5.8S-ITS2 ribosomal RNA genes of *Paracoccidioides brasiliensis* in paraffin-embedded tissue. **Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi**, v. 42, p. 23-7, 2001.

SHIKANAI-YASUDA, M.A. et al. 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.; et al. An atypical *Paracoccidioides brasiliensis* clinical isolate based on multiple gene analysis. **Med Mycol**, v. 48, n. 1, p. 64-72, Feb 2010.

TEIXEIRA, M.D.M. et al. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. **Medical Mycology Journal**, n. 52, p. 1–10, 2013.

TEIXEIRA, M. M. et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 52, n. 2, p 273-283, 2009.

THEODORO, R. C. et al. Genus *Paracoccidioides*: Species Recognition and Biogeographic Aspects. **PLoS ONE** v. 7, n. 5, p e37694, 2012.