

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas

Dissertação de Mestrado

**Diagnóstico molecular de paracoccidiodomicose associada à tuberculose em amostras de
escarro**

Lisandra Silvani Massi

Porto Alegre, 2016

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas

**Diagnóstico molecular de paracoccidioidomicose associada à tuberculose em amostras de
escarro**

Lisandra Silvani Massi

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Ciências Pneumológicas,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
como requisito parcial para o título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Severo
Co-Orientadora: Dr^a Aline Gehlen Dall Bello

Porto Alegre, 2016

CIP - Catalogação na Publicação

Massi, Lisandra Silvani
Diagnóstico molecular de paracoccidioidomicose
associada à tuberculose em amostras de escarro /
Lisandra Silvani Massi. -- 2016.
47 f.

Orientador: Luiz Carlos Severo.
Coorientadora: Aline Gehlen Dall Bello.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2016.

1. Pneumologia. 2. Micologia. 3. Tuberculose. 4.
Biologia Molecular. I. Severo, Luiz Carlos, orient.
II. Dall Bello, Aline Gehlen, coorient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Severo, pela oportunidade de realizar esse trabalho.

À minha co-orientadora, Aline Gehlen Dall Bello, pela sua dedicação, disponibilidade de tempo, orientação, amizade e, principalmente, pelo incentivo nos momentos críticos.

Ao Prof. Dr. Pedro D'Azevedo, pela colaboração ao disponibilizar o Laboratório de Biologia Molecular para os experimentos.

Aos meus colegas de trabalho do Hospital Sanatório Partenon, pela colaboração, apoio e carinho.

À minha mãe, que sempre esteve ao meu lado me apoiando e confortando nas minhas escolhas.

Ao meu amor, Rafael, pela paciência, ajuda, companheirismo e por conseguir minimizar meus problemas durante esse percurso.

Ao meu filho Pedro, por ser meu maior incentivo para a conclusão deste trabalho.

Diagnóstico molecular de paracoccidioidomicose associada à tuberculose em amostras de escarro

Pesquisadores envolvidos:

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Severo^{1,2} #

Co-Orientador: Dr^a Aline Gehlen Dall Bello³ *

Colaborador: Prof. Dr. Pedro D'Azevedo³ †

Instituições envolvidas:

1. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas. Rua Ramiro Barcelos, 2400 - 2º andar, Porto Alegre, RS, Brasil, CEP 90035-003.

2. Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA). Avenida Independência, 75, Porto Alegre, RS, Brasil, CEP 90050-070.

3. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Rua Sarmiento Leite, 245. Porto Alegre, RS, Brasil, CEP 90050-170.

Laboratório de Micologia, Hospital Santa Rita (ISCMPA). Tel.: +55 51 32285208. Email: severo@santacasa.tche.br

* Laboratório de Microbiologia Molecular, UFCSPA. Tel.: +55 51 3303-8825. E-mail: agdbello@gmail.com

† Laboratório de Microbiologia Clínica, UFCSPA. Tel.: +55 51 3303-8740. E-mail: pedro_dazevedo@yahoo.com.br.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	VIII
ÍNDICE DE TABELAS	X
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1. Paracoccidioidomicose	3
2.1.1. Definição	3
2.1.2. Agente Etiológico	3
2.1.3. Epidemiologia.....	4
2.1.4. Patologia	4
2.1.5. Métodos Diagnósticos	5
2.1.6. Tratamento.....	7
2.1.7. Comorbidades.....	7
2.2. Tuberculose.....	8
2.2.1. Definição	8
2.2.2. Agente Etiológico	9
2.2.3. Epidemiologia.....	9
2.2.4. Patologia	10
2.2.5. Métodos Diagnósticos	10
2.2.6. Tratamento.....	12
3. JUSTIFICATIVA.....	14
4. OBJETIVOS.....	15
4.1. Objetivo geral	15
4.2. Objetivos específicos	15
5. ASPECTOS ÉTICOS.....	16
6. REFERÊNCIAS	17
7.1. Título.....	23
Instituições envolvidas:.....	23
7.2. Resumo	23
7.3. Abstract.....	24

7.4.	Introdução	24
7.5.	Materiais e Métodos.....	25
7.6.	Resultados	26
7.7.	Discussão	27
7.8.	Conclusão.....	28
7.9.	Conflito de Interesse	28
7.10.	Referências	29
7.11.	Anexos.....	31
8.	CONCLUSÕES.....	32
9.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
10.	ANEXO	34
10.1.	Formulário de coleta de dados dos pacientes	34

LISTA DE ABREVIATURAS

PCM - Paracoccidiodomicose

TB - Tuberculose

ID - Imunodifusão dupla

CIE - Contraimunoeletroforese

IFI - Imunofluorescência indireta

ELISA – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

IB - Immunoblot

AIDS - Acquired Immune Deficiency Syndrome

PCR - Polymerase Chain Reaction

IL-12 - Interleucina 12

IL-23 - Interleucina 23

INF- γ - Interferon gama

BAAR - Bacilo Álcool-Ácido Resistente

ZN - Ziehl-Neelsen

SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

MGIT - Mycobacteria Growth Indicator Tube

TCAR - Tomografia Computadorizada de Alta Resolução

RM - Ressonância Magnética

TEP - Tomografia com Emissão de Pósitrons

BCG - Bacillus Calmette-Guérin

ADA - Adenosinadeaminase

PAS - Ácido Para-Aminossalicílico

R - Rifampicina

H - Isoniazida

Z - Pirazinamida

E - Etambutol

RNA - Ribonucleic acid

DNA - Deoxyribonucleic acid

ISCMPA - Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

UFCSA - Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

RPM - Rotações por Minuto

C+ - Controle positivo

C- - Controle negativo

HIV - Human immunodeficiency virus

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Perfil e resultados das amostras com coinfeção.....	31
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Análise de amostras clínicas (escarro) de PCM por PCR. M: marcador de peso molecular de 100 pb; Br: branco ou controle negativo; C+: controle positivo; 1, 43, 44 e 59: amostras..... 31

RESUMO

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica endêmica causada pelo fungo *Paracoccidioides* spp. O diagnóstico de PCM é baseado na visualização dos elementos fúngicos no exame microscópico direto e no isolamento em cultura de espécimes clínicos. A PCM pode estar associada a outras doenças infecciosas, as quais interferem diretamente no tratamento e prognóstico da doença. A tuberculose (TB) está presente em 10-15% dos casos de PCM pulmonar e pode ocorrer simultaneamente ou sequencialmente, já que uma pode facilitar a reativação de um foco quiescente endógeno da outra ou ainda facilitar a infecção recente. Dessa forma, é importante conhecer as diferenças clínicas, epidemiológicas e laboratoriais da PCM quando associada à TB para prevenir disseminação e complicações. O objetivo deste estudo foi determinar a associação entre TB e PCM em pacientes com exame micológico negativo, utilizando técnicas moleculares. Foram incluídas 53 amostras de escarro, provenientes do Sanatório Partenon de Porto Alegre, em conjunto com o Laboratório de Micologia da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, positivas para bacilo álcool ácido resistente (BAAR), exame direto e cultivo micológicos negativos. Foram identificadas 9 amostras (18,4%) positivas para PCM pelo método Polymerase Chain Reaction (PCR). Assim, a aplicação de um método molecular rápido e acurado propiciou o diagnóstico diferencial de PCM em escarro de pacientes com TB, o que interfere diretamente no tratamento e no grau de morbidade dos pacientes.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM) is an endemic systemic mycosis caused by *Paracoccidioides* spp. The diagnosis of PCM is based on the visualization of fungal elements on microscopic direct examination and isolation in culture of clinical specimens. The PCM may be associated with other infectious diseases, which interfere directly in the treatment and prognosis of the disease. Tuberculosis (TB) is present in 10-15% of cases of pulmonary PCM and may occur simultaneously or sequentially, since one can facilitate the reactivation of an endogenous quiescent or other focus of recent facilitate infection. Thus, it is important to know the clinical, epidemiological and laboratory differences of PCM when associated to TB to prevent spread and complications. The objective of this study was to determine the association between TB and PCM in patients with negative mycological analysis, using molecular technique. Included were 53 sputum samples from the Sanatório Partenon of Porto Alegre, in conjunction with the Mycology Laboratory of Irmandade Santa Casa of Misericórdia of Porto Alegre, positive for acid fast bacilli alcohol (BAAR), negative for direct examination and mycological cultivation. Were identified 9 samples (18.4%) to PCM positive by Polymerase Chain Reaction (PCR) method. Thus, the application of rapid and accurate molecular method provided the differential diagnosis of PCM in sputum of TB patients, which interferes directly in the treatment and the morbidity of patients.

1. INTRODUÇÃO

Os métodos moleculares vêm sendo testados diretamente em amostras clínicas através da análise de regiões do genoma fúngico (Dias et al., 2012; Sidrim et al., 2010), no entanto, ainda são usados somente na pesquisa. A técnica molecular mais comum é a *Polymerase Chain Reaction* (PCR), que tem o potencial de melhorar o diagnóstico de infecção fúngica de modo específico, sensível e rápido (White et al., 2009). Além disso, dados preliminares indicam que testes diagnósticos baseados em PCR guiam a terapêutica antifúngica, o que leva à redução da mortalidade e diminuição de tratamentos desnecessários, evitando custos e toxicidade (Kourkoumpetis et al., 2012). Este procedimento, quando padronizado, é rápido, seguro e sensível (Atkins & Clark, 2004; Wengenack & Binnicker, 2009; Dean & Dark, 2011).

O diagnóstico de paracoccidiodomicose (PCM) é baseado na visualização dos elementos fúngicos sugestivos de *Paracoccidioides spp.* através do exame microscópico direto e o isolamento em cultura de espécimes clínicos. Esses testes são extremamente específicos, mas pouco sensíveis. O crescimento deste fungo em meios de cultura ocorre somente em 85% dos casos de PCM e a duração da incubação ocorre entre 20 e 30 dias (Restrepo et al., 1976; Morris, 1996; Restrepo & Tobón, 2010).

A PCM é importante em países tropicais e subtropicais da América Latina, do México até a Argentina, especialmente no Brasil (Garcia et al., 2008). É uma doença endêmica em todo o território nacional, predominando nos estados do Sudeste, Centro-Oeste e Sul, com prevalência estimada de até 3 casos/100.000 habitantes/ano (Restrepo et al., 2001). É uma patologia com múltiplas apresentações clínicas, evolução prolongada e alta taxa de mortalidade e morbidade. Acomete igualmente todas as raças e cerca de nove vezes mais homens do que mulheres (Bocca, 2013). A fase primária da infecção aparece normalmente em indivíduos jovens, como uma doença pulmonar autolimitada e, raramente, progride para o estado agudo ou subagudo da infecção. Após um longo período de latência, uma infecção pode ser reativada, originando uma doença pulmonar crônica, podendo ou não envolver outros órgãos (Cerri et al., 1998; Giovani et al., 2000).

A PCM pode estar associada a outras doenças infecciosas e/ou não infecciosas, as quais interferem diretamente no tratamento e prognóstico da doença. (Shikanai-Yasuda et al., 2006). A tuberculose (TB) está presente em 10-15% dos casos de PCM pulmonar e pode ocorrer simultaneamente ou sequencialmente, já que uma pode facilitar a reativação de um foco quiescente da outra ou ainda facilitar a infecção (Quagliato Júnior et al., 2007). A diminuição da imunidade celular é a responsável pelo desencadeamento de ambas as doenças (Moraes-Vasconcelos et al., 2005).

O diagnóstico diferencial entre as duas doenças é de extrema importância devido à sobreposição e similaridades das manifestações clínicas, radiológicas e epidemiológicas (Moraes-Vasconcelos et al., 2005). Dessa forma, o desenvolvimento e padronização de um método diagnóstico, por técnicas moleculares, corroboram com o diagnóstico clínico, principalmente em pacientes com exame micológico negativo para PCM.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Paracoccidioidomicose

2.1.1. Definição

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica endêmica causada pelo fungo *Paracoccidioides* spp. A infecção ocorre pela inalação de conídios presentes no ar com subsequente transformação para células leveduriformes (Wanke & Aidê, 2009). Após a inalação, os propágulos se alojam nos pulmões e assim, como para outras micoses sistêmicas, dependendo da interação do fungo com a resposta imunológica do hospedeiro, esta pode evoluir para a cura espontânea ou disseminar-se pelo organismo causando uma doença inflamatória granulomatosa crônica (Restrepo et al, 2001; Coutinho et al, 2002).

2.1.2. Agente Etiológico

Desde a sua descrição, o *P. brasiliensis* vinha sendo citado como a única espécie do gênero *Paracoccidioides*, mesmo existindo uma grande diversidade em relação a sua estrutura genômica e virulência, entre diferentes isolados desse fungo (Singer-Vermees et al, 1989). Entretanto, recentemente foi descrito que o gênero *Paracoccidioides* abriga quatro espécies crípticas, filogenéticas distintas: S1 (grupo parafilético formado por 38 isolados da Argentina, Brasil, Peru, Venezuela e Antártida), PS2 (contém 6 isolados, 5 dos quais provenientes do Brasil e 1 da Venezuela), PS3 (com 21 isolados da Colômbia) e PS4 (isolados clínicos da Venezuela), que se diferenciam por características evolutivas e distribuição geográfica (Matute et al, 2006). Neste processo de caracterização molecular dos diferentes isolados do *Paracoccidioides*, foi descrito um novo clado, composto por 17 isolados geneticamente similares. Estes isolados foram descritos como uma nova espécie, denominada *P. lutzii* (Teixeira et al., 2009). O *P. Lutzii* é encontrado principalmente nas regiões centro-oeste do Brasil e Equador. O tipo de multiplicação conhecido é assexuado, porém dados recentes sugerem a presença de ciclo sexual e a recombinação gênica intraespécies (Teixeira et al., 2013).

Paracoccidioides é um fungo termodimórfico, com estruturas filamentosas (hifas) contendo propágulos ou conídios infecciosos na natureza e, a 37°C, apresenta-se como leveduras com multibrotamentos. *In vitro*, a fase filamentosa cresce lentamente a 25°C e as colônias desenvolvem uma coloração branca ou castanha, podendo ter aspecto enrugado. A forma miceliar não é usada para o diagnóstico, pois não tem características que permitam sua distinção. As hifas são hialinas e septadas com clamidoconídeos intercalados. Assim, para que seja identificado como *Paracoccidioides* spp. é necessário que esta forma se converta na forma de levedura. A forma de levedura cresce em cultura a 37°C e é também observada nos tecidos. As células leveduriformes

se apresentam como uma forma oval ou esférica, com tamanhos variáveis de 3 a 30µm ou até mesmo maiores, com paredes retráteis duplas e gêmulas únicas ou múltiplas que dão origem a blastoconídeos. Os blastoconídeos estão ligados à célula mãe por uma ligação estreita, e uma célula pode originar cerca de seis ou até mais células filhas, com tamanhos variáveis. Deste modo, o número de blastoconídeos, os tamanhos e as suas ligações com a célula mãe são as características que permitem a identificação deste fungo (Zaitz, 1998).

2.1.3. Epidemiologia

A inexistência de notificação compulsória dos casos de PCM impede a existência de dados precisos sobre a incidência e gravidades da doença no Brasil. As informações disponíveis se baseiam em relatos de inquéritos epidemiológicos e de séries de casos. A PCM é endêmica em todo o Brasil, predominando nos estados do Sudeste, Centro-Oeste e Sul, com prevalência estimada de até 3 casos/100.000 habitantes/ano. É a principal causa de morte entre as micoses sistêmicas no país, incluindo as complicações tardias, em cerca de 5% dos pacientes. Apesar da alta incidência estimada da PCM em humanos, o homem é um hospedeiro acidental do fungo. Estima-se que em 2001 mais de 10 milhões de pessoas estavam infectadas por este micro-organismo (Restrepo et al, 2001). A PCM é de grande interesse para os países tropicais e subtropicais da América Latina, do México até a Argentina, especialmente no Brasil (Garcia et al., 2008). As áreas mais endêmicas são as florestas úmidas subtropicais com muitos rios e montanhas onde a temperatura média varia de 18°C a 23°C e o índice pluviométrico anual varia entre 800 a 2.000 mm. Não são relatados casos de PCM em áreas secas e quentes ou florestas equatoriais com temperatura média acima de 25°C (Restrepo, 1994).

2.1.4. Patologia

A PCM é uma doença com múltiplas apresentações clínicas e evolução prolongada; o período de incubação é desconhecido e a taxa de mortalidade e morbidade é alta. Acomete igualmente todas as raças e cerca de nove vezes mais homens do que mulheres (Bocca, 2013). Já foi demonstrado que o estrógeno é capaz de inibir a transformação do micélio ou conídio em leveduras (Aristizabal, 2002; Pinzan, 2010). O estradiol (17b-estradiol), hormônio feminino, leva a uma modificação na parede celular do fungo durante essa fase, indicando que, ainda na forma miceliana, ocorre uma modulação transcricional promovida pelo hormônio na parede celular, que acarreta uma supressão da atividade das proteínas Fks1 e AGS, fundamentais na síntese da β-1-3 glicana sintase. (Clemons et al, 1989; Shankar et al, 2011; Tavares et al., 2014). A proteção hormonal feminina impede a progressão da infecção para doença, inibindo ou dificultando a adaptação do fungo ao organismo do hospedeiro (Oliveira et al., 1997).

As formas clínicas da PCM são classificadas de acordo com o Consenso de PCM publicado em 2006 no Brasil. As definições foram estabelecidas através da relação entre os aspectos clínicos e história natural da doença. As formas de infecção foram definidas em: aguda/subaguda (tipo juvenil) podendo ser classificada como moderada a grave; e crônica (tipo adulto) que pode ser classificada baseada em lesões unifocal ou multifocal (Shikanai-Yasuda et al., 2006).

A fase primária da infecção aparece usualmente em indivíduos jovens como uma doença pulmonar autolimitada e, raramente, progride para o estado agudo ou subagudo da infecção. Após um longo período de latência, uma infecção pode ser reativada, originando uma doença pulmonar crônica, podendo ou não envolver outros órgãos. O paciente com PCM pode queixar-se de insônia, debilidade, inapetência, disfagia, dispneia, tosse, hemoptise, febre, perda de peso, prurido e ardor (Cerri et al., 1998; Giovani et al., 2000). As principais sequelas são: disfunção suprarrenal (15-50% dos pacientes), disfonia e/ou obstrução da laringe, epilepsia e/ou hidrocefalia (6-25% dos casos) (Wanke & Aidê, 2009).

2.1.5. Métodos Diagnósticos

O padrão ouro para o diagnóstico de PCM é o encontro de elementos fúngicos sugestivos de *Paracoccidioides* spp. através do exame microscópico a fresco em amostras de escarro ou outro espécime clínico (raspado de lesão, aspirado de linfonodos e/ou fragmento de biopsia de órgãos supostamente acometidos) tratados com KOH ou calcoflúor; ou ainda, em amostras fixadas e coradas com hematoxilina-eosina, Gomori-Grocott e Papanicolau (Restrepo et al., 1976; Morris, 1996; Restrepo & Tobón, 2010).

O crescimento deste fungo em meios de cultura ocorre somente em 85% dos casos de PCM e a duração da incubação ocorre entre 20 e 30 dias. Além disso, é necessária a conversão para a forma de levedura a 37°C para a identificação definitiva (Restrepo et al., 1976; Morris, 1996; Restrepo & Tobón, 2010).

As provas sorológicas específicas têm importância, não apenas no auxílio diagnóstico, como também na avaliação da resposta do hospedeiro ao tratamento específico. Atualmente, são disponíveis em diferentes serviços de referência os métodos de imunodifusão dupla (ID), contraímunoeletroforese (CIE), imunofluorescência indireta (IFI), ensaio imunoenzimático (ELISA) e imunoblot (IB) (Teles et al., 2011). Os testes de ID e CIE são utilizados para detectar anticorpos anti-*Paracoccidioides* quando as lesões possuem difícil acesso. Utilizando-se técnicas padronizadas e antígenos adequados, estes testes apresentam sensibilidade entre 85% e 100%. O título de anticorpos específicos anti- *Paracoccidioides* tem correlação com a gravidade das formas clínicas, sendo mais elevados na forma aguda-subaguda da doença (Fortes, 2011). Casos de PCM

com resultados falso-negativos, observados em quaisquer testes, na maioria das vezes, associam-se a lesões muito localizadas e com hospedeiros com *Acquired Immune Deficiency Syndrome* (AIDS) ou imunodeprimidos. A especificidade dos testes sorológicos varia de 85% a valores próximos de 100%, conforme a técnica utilizada. Reações falso-positivas podem ocorrer em soros de pacientes com histoplasmose, aspergilose, criptococose e candidíase (Bertolini et al.,2012).

Tendo em vista a maior simplicidade do teste, a não necessidade de equipamentos de alto custo, a sensibilidade maior que 80% e a especificidade maior que 90%, bem como a experiência acumulada nas últimas décadas, a reação de imunodifusão dupla em gel agar é considerada, atualmente, o principal método de diagnóstico sorológico da PCM. Recomenda-se para ID 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 se tornem negativos ou estabilizem em diluições de 1:2 ou menos para que contemplem o critério de cura sorológica. Alguns pacientes podem apresentar, já no diagnóstico, títulos abaixo de 1:4. Nesses casos, o critério sorológico pela ID tem valor limitado no seguimento do tratamento (Telles et al.,2012, Telles et al., 2011).

O ELISA representa um método alternativo para o sorodiagnóstico da PCM, mais rápido e apropriado para exame de grande número de soros. É uma técnica mais sensível, porém sua especificidade é menor do que a da ID, exigindo cuidadosa padronização e interpretação dos resultados positivos (Bertolini et al.,2012).

A reação de imunoblot é usada como teste confirmatório, sendo mais sensível e específico que os testes sorológicos, pois permite especificar os tipos de anticorpos séricos contra os diversos determinantes antigênicos do fungo. Outra abordagem diagnóstica consiste na demonstração de anticorpos ou antígenos em outros fluídos, incluindo líquido cefalorraquiano, lavado bronco-alveolar e urina (Bertolini et al.,2012).

Western blot, avaliado experimentalmente, tem se mostrado um importante método confirmatório de diagnóstico de PCM, mesmo quando são encontrados resultados negativos em outros testes sorológicos, tal como a ID (Bertolini et al.,2012).

Com uma perspectiva factível para aplicação em laboratórios clínicos e com maior poder de detecção que a cultura, os métodos moleculares vêm sendo testados diretamente em amostras clínicas através da análise de regiões do genoma fúngico (Dias et al., 2008; Sidrim et al., 2010), no entanto, ainda são usados basicamente somente na pesquisa. A técnica molecular mais comum é a PCR, poderosa ferramenta capaz de amplificar segmentos de DNA *in vitro*, por ação enzimática da DNA polimerase (White et al., 2009). Caracteristicamente, tem o potencial de melhorar o diagnóstico de infecção fúngica de modo específico, sensível e rápido. Além disso, dados

preliminares indicam que testes diagnósticos baseados em PCR guiam a terapêutica antifúngica, o que leva à redução de mortalidade e diminuição de tratamentos desnecessários, evitando custos e toxicidade (Kourkoumpetis et al., 2012). Este procedimento, quando padronizado, é rápido, seguro, sensível e dispensa a realização de cultura (Atkins & Clark, 2004; Wengenack & Binnicker, 2009; Dean & Dark, 2011). Existem muitas variações da reação de PCR, cada uma com uma característica diferente, que responde melhor à necessidade imposta pela amostra clínica. WHITE et al. (2009) acreditam que, para o teste direto de espécimes clínicos, com limitados alvos de DNA, o *nested* ou *semi-nested* PCR (variações do PCR convencional onde são realizadas duas rodadas de amplificação e o produto da primeira reação serve de molde para a segunda) são mais indicados, pois aumentam muito a sensibilidade do método. Apesar de promissor, o diagnóstico molecular ainda é considerado elaborado e, para sua padronização, é pré-requisito obrigatório: a escolha da amostra biológica, o volume a ser testado e o método de extração do DNA; os parâmetros de ciclagem da reação são essenciais para o sucesso da técnica e devem ser amplamente estudados para que possa haver aumento da sensibilidade e especificidade dos métodos diagnósticos (Klutts & Robinson-Dunn, 2011).

2.1.6. Tratamento

O manejo terapêutico da PCM deve obrigatoriamente incluir medidas de suporte às complicações clínicas associadas ao envolvimento de diferentes órgãos pela micose, além da terapêutica antifúngica específica. As drogas recomendadas para as formas leves e moderadas são itraconazol e a combinação de sulfametoxazol-trimetoprim; já para os casos graves é usado anfotericina B e ainda o voriconazol. A disseminação das lesões e a terapêutica prolongada, aliadas à frequência elevada de recidivas e dificuldade no acompanhamento dos pacientes, fazem desta micose objeto de grande interesse clínico e de pesquisa (Shikanai-Yasuda et al., 2006).

2.1.7. Comorbidades

A PCM pode estar associada a outras doenças infecciosas e/ou não infecciosas, as quais interferem diretamente no tratamento e prognóstico da doença. Por isso, a presença de comorbidades em indivíduos que fazem uso regular de medicação antifúngica e apresentam resposta clínica insatisfatória deve ser investigada (Shikanai-Yasuda et al., 2006).

Entre as comorbidades, a AIDS é a menos comum, ocorrendo em torno de 1,5% dos casos. A maioria dos casos relatados na literatura apresenta características da forma aguda e disseminada de PCM concomitantemente às características da forma crônica da doença. A maioria dos pacientes com co-infecção de PCM e HIV (Human immunodeficiency vírus) apresenta-se com níveis de linfócitos T CD4 inferiores a 200 células/mL e os anticorpos anti-*Paracoccidioides* estão

presentes em apenas 60% dos casos (Shikanai-Yasuda et al., 2006). A infecção pelo HIV e a consequente imunodepressão celular modificam a história natural da PCM. Em comparação à doença em imunocompetentes, os pacientes coinfectados tendem a ser mais jovens e menos envolvidos em atividades agrícolas, predominando as profissões urbanas. A PCM oportunista evolui com maior rapidez e com presença de febre e sintomas de inflamação, devendo ser considerada como uma condição definidora de AIDS. Estudos sobre a imunopatogenicidade da PCM indicam que a resposta imunológica ao fungo depende da interação dos linfócitos T CD4+ e das células polimorfonucleares. As citocinas produzidas por esses linfócitos modulam a atividade fagocítica dos macrófagos e neutrófilos ocorrendo, nos pacientes imunocompetentes, a resposta granulomatosa capaz de controlar a doença (Dias et al., 2008; Fortes et al., 2011). Devido à eficácia da terapia antirretroviral, mais casos de co-infecções PCM/HIV são esperados em pacientes que vivem em área de risco (Safe et al., 2014).

Menos frequentemente, é relatada a concomitância de PCM com casos de leishmaniose, micoses (dermatofitoses, candidíase, cromoblastomicose, esporotricose, histoplasmose clássica e criptococose), hanseníase, lues e doença de Chagas. Doença de Hodgkin e carcinomas, doenças não infecciosas, são também relatadas como comorbidades. A presença de carcinoma de pulmão em pacientes com PCM pulmonar pode ser mascarada por manifestações decorrentes de fibrose pulmonar consequente à micose (Rodrigues et al., 2010). O mesmo pode ocorrer em lesões cicatriciais de acometimento de laringe e faringe, particularmente nos pacientes tabagistas e alcoolistas. Dessa forma, indivíduos que apresentam resposta insatisfatória ao uso regular de antifúngicos devem ser investigados para outras comorbidades ou sequelas (Shikanai-Yasuda et al., 2006).

A queda da imunidade celular é a responsável pelo desencadeamento de ambas as doenças. Além disso, a deficiência na produção de algumas citocinas e de seus receptores como as interleucinas (IL) IL-12, IL-23 e o interferon γ (INF- γ) predispõem os pacientes tanto à TB quanto à PCM. A sobreposição e similaridades das manifestações clínicas, radiológicas e epidemiológicas das duas doenças, contribuem para que o erro diagnóstico seja comum (Moraes-Vasconcelos et al., 2005). Além disso, no Brasil, os casos de PCM são negligenciados em relação à TB, isso ocorre devido às altas taxas de infecções de TB, principalmente, na região Sul do Brasil e menor valorização de micoses, excluindo tal hipótese diagnóstica de sintomáticos respiratórios (Fornajero et al., 2005).

2.2. Tuberculose

2.2.1. Definição

A tuberculose (TB) é transmitida quase sempre pela via inalatória. A principal fonte de infecção da TB é o indivíduo bacilífero (doente que elimina bacilos no ar ambiente), portador de lesão pulmonar ou laríngea que, ao tossir ou falar, lança na atmosfera gotículas de secreção com bacilos. Estas partículas contêm bacilos viáveis, infectantes e que, ao serem inalados, alcançam os alvéolos, onde os micro-organismos se estabelecem e se desenvolvem (Nicas et al., 2005).

A contenção dos bacilos no organismo falha quando a condição imunológica é alterada e ocasionada geralmente pela desnutrição, etilismo, idade avançada, AIDS, diabetes e uso de medicamentos imunossupressores. Além da carga bacilífera e da virulência do micro-organismo também influenciarem no aparecimento da doença em indivíduos imunocompetentes (Melo et al., 2009).

2.2.2. Agente Etiológico

O agente etiológico da TB pertence ao gênero *Mycobacterium*, o qual compreende 83 espécies, a maioria saprófitas de vida livre. O Complexo *M.tuberculosis* é composto pelas espécies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. caprae* e *M. microti*, sendo que a mais importante é a *M. tuberculosis*. Morfologicamente, essas bactérias são bacilos aeróbios intracelulares, pequenos e finos, de crescimento lento e com parede celular rica em lipídeos estruturais, os quais formam uma barreira hidrofóbica que confere resistência à dessecação e à descoloração por álcool e ácido. Tal propriedade morfotintorial é a característica diagnóstica mais importante do bacilo, já que, em virtude disso, as micobactérias são denominadas bacilo álcool-ácido resistentes (BAAR) (Melo et al., 2006; Lorenz et al., 2009; Melo et al., 2009).

2.2.3. Epidemiologia

A TB é uma das mais antigas doenças infecciosas que representa um importante problema de saúde pública em todo o mundo. Devido a sua magnitude, transcendência e vulnerabilidade, a doença continua a ser hoje uma das principais causas de morte por um agente infeccioso. Estima-se que 1/3 da população mundial esteja infectada com o bacilo causador da doença e que em 2013 ocorreram nove milhões de casos novos e um milhão de óbitos (WHO, 2014). No Brasil, a cada ano, são notificados aproximadamente 70 mil casos novos e ocorrem 4,6 mil mortes em decorrência da doença. O país ocupa o 17º lugar entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos de tuberculose no mundo (BRASIL, 2012). No Rio Grande do Sul a incidência de TB é de 42,4 casos por 100 mil habitantes, sendo que Porto Alegre apresenta coeficiente de incidência de 99,3 casos por 100 mil habitantes e 3 mortes a cada 100 mil habitantes (BRASIL, 2015).

2.2.4. Patologia

A TB é caracterizada por uma resposta inflamatória granulomatosa e pode ocorrer com diferentes manifestações clínicas que estão diretamente relacionadas com o órgão acometido e resposta do hospedeiro ao microorganismo. As manifestações da forma pulmonar são as mais frequentes e também a mais relevante para a saúde pública, já que esta forma tem sido a principal responsável pela manutenção da cadeia de transmissão da infecção. No entanto, existem as apresentações extrapulmonares da TB, que tem sua ocorrência aumentada em pacientes imunocomprometidos de uma forma geral (Souza, 2009; BRASIL, 2011; Silva et al., 2011).

A TB pulmonar pode apresentar-se sob a forma primária, pós-primária (ou secundária) ou miliar. A forma primária é mais comum em crianças e, clinicamente, na maioria das vezes, mostra-se de forma insidiosa. A forma pós-primária pode acometer qualquer idade, sendo mais comum no adolescente e adulto jovem. A forma miliar está vinculada ao aspecto radiológico pulmonar, sendo a forma grave da doença. O dano da TB pulmonar é causado pela presença dos bacilos nos macrófagos desencadeando uma inflamação crônica descontrolada e progressiva (Campos, 2006). Tem como principal sintoma a tosse seca ou produtiva com expectoração mucóide ou purulenta, com a presença ou não de hemoptise. O paciente também pode apresentar irritabilidade, sudorese noturna, inapetência, emagrecimento e febre vespertina que não costuma ultrapassar 38,5°C (BRASIL, 2011).

As formas extrapulmonares da TB têm seus sinais e sintomas dependentes dos órgãos ou sistemas acometidos, sendo classificadas segundo a sua localização: laríngea, ganglionar periférica, meningoencefálica, óssea, genitourinária, miliar e ainda cutânea e ocular. Sua ocorrência aumenta entre pacientes com AIDS, especialmente entre aqueles com imunocomprometimento grave. Os sinais podem ser poucos até que a doença esteja avançada. O paciente apresenta febre com picos de até 40 a 41° C principalmente no período vespertino, além de tosse e sudorese. Outras queixas comuns abrangem mal-estar, fadiga, perda de peso, dor torácica e dispnéia (Silva et al., 2011).

2.2.5. Métodos Diagnósticos

A pesquisa bacteriológica é fundamental em adultos, tanto para o diagnóstico quanto para o controle de tratamento (BRASIL, 2011).

O exame microscópico direto ou baciloscopia direta é a técnica mais utilizada e consiste no esfregaço do escarro *in natura* seguida da coloração pelo método de Ziehl-Neelsen (ZN); a metodologia é viável para todos os níveis de complexidade laboratorial e a sensibilidade do método é de 60% a 80% para o diagnóstico de TB pulmonar, o que é importante do ponto de vista epidemiológico, já que os casos bacilíferos são os responsáveis pela manutenção da cadeia de

transmissão. Existem outros métodos de coloração como de Kinyoun (variante ZN, coloração sem aquecimento da fucsina) e coloração pela Auramina. Esta propriedade está diretamente relacionada com os ácidos micólicos da parede celular que formam complexos estáveis com corantes como a fucsina e a auramina (Nolte & Metchock, 1995; Tarantino & Rosemberg, 1997; BRASIL, 2011).

A cultura é um método de elevada especificidade (98,4-100%) e sensibilidade (30-96%) no diagnóstico da TB. Nos casos pulmonares com baciloscopia negativa, a cultura do escarro pode aumentar em 30% o diagnóstico bacteriológico da doença. Para a cultura de micobactérias são utilizados comumente os meios de cultura sólidos Löwenstein-Jensen e Ogawa-Kudoh, que são de baixo custo e menor índice de contaminação. A principal desvantagem do meio sólido é o longo tempo de detecção do crescimento, que varia de 14 a 30 dias, podendo se estender por até 8 semanas. Tais meios sólidos também são utilizados para o teste de sensibilidade através do método de proporções, porém o resultado só é obtido após 42 dias de incubação (Levy et al., 1989).

Visando diminuir o tempo de cultivo de micobactérias de material clínico, na década de 70, novos sistemas foram desenvolvidos. Atualmente, o equipamento automatizado e não radiométrico MGIT® (*Mycobacteria Growth Indicator Tube*) utiliza um meio líquido para diagnóstico de TB através da detecção do consumo de O₂. No final da década de 1990, esse método passou a ser considerado padrão ouro, pois além de apresentar *performance* similar ao método de proporções, apresentou um tempo médio de detecção de sete dias (Coelho, 2007).

A radiografia do tórax é um método diagnóstico de grande importância na investigação da tuberculose, já que pode apontar a doença em atividade ou a doença no passado, além do tipo e extensão do comprometimento pulmonar. Entretanto, deve-se levar em conta que até 15% dos casos de TB pulmonar não apresentam alterações radiológicas, principalmente os imunodeprimidos. A tomografia computadorizada de alta resolução (TCAR), ressonância magnética (RM) e tomografia com emissão de pósitrons (TEP) são tecnologias propostas para o diagnóstico de TB ativa e latente e podem auxiliar no diagnóstico de tuberculose pulmonar atípica ou extrapulmonar (Goo, 2000; Buriril, 2007).

O diagnóstico histopatológico é empregado nas formas extrapulmonares ou pulmonares que se apresentam radiologicamente como doença difusa, como na TB miliar, ou em indivíduos imunossuprimidos (BRASIL, 2011).

Até o momento, os testes imunossorológicos comerciais ou *in house* não estão recomendados para o diagnóstico da tuberculose devido à variabilidade de resultados e maior sensibilidade em pacientes com baciloscopia positiva. Embora os métodos de detecção de antígeno sejam mais rápidos, apresentam menor especificidade em razão das reações cruzadas (Steingart et al., 2007).

Os testes imunológicos para detecção de gama interferon baseiam-se na estimulação da resposta celular usando peptídeos ausentes na BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) e em outras micobactérias atípicas, em amostras de sangue periférico. Não distingue tuberculose infecção de TB doença. (Dinnes et al., 2007).

A detecção da ADA (adenosinadeaminase), enzima intracelular presente particularmente no linfócito ativado, pode auxiliar no diagnóstico da TB ativa. O aumento da atividade da ADA no líquido pleural associado a outros parâmetros como idade maior que 45 anos, predomínio de linfócitos (acima de 80%) e proteína alta (exsudato), é indicador de pleurite tuberculosa (Trajman et al., 2008).

A amplificação de micobacteriófagos como indicadores da presença de *M. tuberculosis* viáveis em espécime clínico consiste numa técnica simples que não necessita de equipamentos especializados e requer apenas conhecimentos básicos de bacteriologia (Pai et al., 2003; Kalantri et al., 2005).

Os testes moleculares são baseados na amplificação e detecção de sequências específicas de ácidos nucleicos do complexo *M. tuberculosis* em espécimes clínicos. As técnicas de PCR em tempo real são rápidas e apresenta baixo risco de contaminação. Recentemente foi implantado na rede pública o teste molecular rápido XpertTM MTB/Rif que implica a purificação, concentração, amplificação de ácidos nucleicos e identificação da sequência de *rpoβ*. Fornece resultados em um mesmo equipamento e em menos de duas horas. Apresentou sensibilidade de 90% em amostras negativas à baciloscopia e especificidade de 97,9% (Perkins, 2009).

2.2.6. Tratamento

A era da quimioterapia da tuberculose se inicia no final da década de 40, com a descoberta da estreptomicina, utilizada em monoterapia, conforme os primeiros trabalhos publicados pelo Conselho Médico Britânico. A constatação do rápido desenvolvimento de resistência à estreptomicina levou à descoberta e a testes de novos fármacos, como: ácido para-aminossalicílico (PAS), isoniazida, pirazinamida, tiossemicarbazona, cicloserina, canamicina, etionamida, etambutol e capreomicina (Melo et al., 2006).

Os primeiros ensaios já demonstravam a necessidade de uma combinação farmacológica no tratamento como a principal medida para se prevenir a resistência. Nos anos 50, surge o primeiro regime poliquimioterápico, composto por estreptomicina, PAS e isoniazida, administrados por 24 meses. A longa duração e a difícil aceitação do PAS justificaram buscar regimes mais eficazes, mais curtos e mais toleráveis. Na década de 60, o PAS foi gradualmente substituído pelo etambutol, e o regime tríplice, com estreptomicina, isoniazida e etambutol, foi encurtado para 12 meses (BRASIL, 2011; Brunton et al., 2007).

A rifampicina foi introduzida na terapêutica em 1971 e é um marco no tratamento da tuberculose por sua potente atividade esterilizante, tanto na fase de multiplicação rápida, quanto na fase de manutenção. Sua incorporação aos esquemas possibilitou a redução do tempo de tratamento de 12 para 6 meses, com a chamada curta duração (Brunton et al., 2007; BRASIL, 2011).

A terapia de combinação constitui a abordagem desejável no tratamento de doenças micobacterianas a fim de assegurar uma atividade bactericida precoce, impedir a emergência da resistência e atividade esterilizante. A atividade bactericida precoce erradica o maior número de bacilos, em menor tempo possível, reduzindo a infectividade no início do tratamento. A emergência da resistência em um indivíduo portador de TB ocorre unicamente por meio da seleção de bacilos mutantes primariamente resistentes em uma população selvagem. Cada população micobacteriana tem diferentes proporções de bacilos com resistência natural aos diferentes medicamentos anti-TB (Melo et al., 2006).

Desde 2009, o tratamento da doença no Brasil passou a ser realizado pelo esquema de apresentação farmacológica em comprimidos de doses fixa combinadas de quatro medicamentos: Rifampicina - R, Isoniazida - H, Pirazinamida - Z e Etambutol - E. Sendo que nos dois primeiros meses (fase intensiva) utiliza-se a combinação RHZE e nos quatro meses restantes (fase de manutenção) a combinação RH. Esse esquema é utilizado para adolescentes e adultos, já para as crianças, o esquema utilizado é o RHZ por dois meses (fase de ataque) e RH, por quatro meses (fase de manutenção). O uso desses esquemas deve ser diário em uma única administração conjunta. Os casos que evoluem para falência do tratamento devem ser avaliados quanto ao histórico terapêutico, adesão aos tratamentos anteriores e comprovação de resistência aos medicamentos. Tais casos receberão o Esquema Padronizado para Multirresistência ou Esquemas Especiais individualizados, contemplados com fármacos de segunda linha, conforme a combinação de resistências apresentadas pelo teste de sensibilidade (BRASIL, 2011).

Cada medicamento tem um mecanismo de ação específico contra a micobactéria. A rifampicina, antibiótico de amplo espectro, age suprimindo a síntese de RNA (ribonucleic acid), resultando em uma ação bactericida, porém não pode ser administrado isoladamente no tratamento da tuberculose, pois as micobactérias desenvolvem rápida resistência ao medicamento. A isoniazida age inibindo a síntese de ácidos micólicos, componente essencial da parede celular da micobactéria. A pirazinamida possui ação bactericida, é uma alternativa aos casos de resistência à isoniazida, rifampicina e/ou etambutol e seu mecanismo de ação não está esclarecido, mas parece estar envolvido na biossíntese do ácido micólico. Já o etambutol, específico para micobactéria, atua inibindo a biossíntese do arabinolactano, resultando um desarranjo na estrutura da parede celular da micobactéria (Brunton et al., 2007).

3. JUSTIFICATIVA

O fungo *Paracoccidioides* spp. é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), uma micose sistêmica de alta prevalência na América Latina, sendo o Brasil responsável por 80% dos registros da doença. A PCM apresenta graves quadros de infecção, em geral de evolução crônica, que variam em severidade e prognóstico, tornando a doença um importante problema de saúde pública. A PCM pode estar associada a outras doenças infecciosas, como a tuberculose (TB), que está presente em 10-15% dos casos de PCM pulmonar e pode ocorrer simultaneamente ou sequencialmente, interferindo diretamente no tratamento e prognóstico da doença. Assim, é importante conhecer as diferenças clínicas, epidemiológicas e laboratoriais da PCM quando associada à TB para prevenir disseminação e complicações.

O diagnóstico de PCM é baseado na visualização dos elementos fúngicos sugestivos de *Paracoccidioides* spp. através do exame microscópico direto e o isolamento em cultura de espécimes clínicos. Esses testes são extremamente específicos, mas pouco sensíveis. Assim, a aplicação de um método molecular rápido e acurado, como a reação em cadeia da polimerase, tem o potencial de melhorar o diagnóstico de infecção fúngica de modo específico, sensível e rápido, propiciando o diagnóstico diferencial de PCM em escarro de pacientes com TB. Além disso, pode guiar a terapêutica antifúngica, reduzindo a mortalidade e os tratamentos desnecessários, evitando custos e toxicidade.

Dessa forma, o desenvolvimento e padronização de um método diagnóstico, por técnicas moleculares, contribuem com o diagnóstico clínico, principalmente em pacientes com exame micológico negativo para PCM.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Determinar a associação entre TB e PCM em pacientes com exame micológico negativo, utilizando técnicas moleculares.

4.2. Objetivos específicos

- Padronizar a extração de ácidos nucleicos de amostras de escarro através de um método semi-automatizado;
- Padronizar o diagnóstico molecular por PCR para PCM em amostras de escarro.

5. ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da ISCMPA, parecer nº 521.332 (07/01/2014), e foi dispensada a assinatura dos pacientes no termo de consentimento, com o compromisso de manutenção do anonimato dos sujeitos da pesquisa.

6. REFERÊNCIAS

- ARISTIZABAL, B. H. et al. Experimental *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice: influence of the hormonal status of the host on tissue responses. *Medical Mycology*, v. 40, n. 2, p. 169-178, 2002.
- ATKINS, S. D. & CLARK, I. M. Fungal molecular diagnostics: a mini review. *Journal of Applied Genetics.*, v. 45, n. 1, p. 3-15, 2004.
- BERTOLINI, T. A. et al. Western blotting is an efficient tool for differential diagnosis of paracoccidioidomycosis and pulmonary tuberculosis. *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 19, n. 11, p. 1887–1888, 2012.
- BOCCA, A. L. et al. Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. *Future Microbiology*, v. 8, n. 9, p. 1177-1191, 2013.
- BRUNTON, L. L. et al. *As bases farmacológicas da terapêutica*. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 11^a ed., 2007. 1821 p.
- BURRIL, J. Tuberculosis: A radiologic review. *Radiographics*, Easton, v.27, n. 5, p.1255-1273, 2007.
- BRASIL. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 284 p.
- BRASIL. DATASUS, 2012. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2012/c17.def>>. Acesso em: 20 out 2015.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Boletim Epidemiológico, v. 46, n. 9, 2015. 19 p. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/marco/27/2015-007---BE-Tuberculose---para-substitui---o-no-site.pdf>>. Acesso em: 20 out 2015.
- CAMPOS, H. S. Etiopatogenia da tuberculose e formas clínicas. *Revista Pulmão*, v.15, n.1, p.29-35, 2006.
- CERRI, A. et al. Paracoccidioidomicose: aspectos de interesse para o cirurgião-dentista. *Revista Paulista de Odontologia*, v. 20, n. 1, p. 19-24, 1998.

CLEMONS, K. V. et al. Influence of estradiol on protein expression and methionine utilization during morphogenesis of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of general microbiology*, v. 15, n. 6, p. 1607-1617, 1989.

COELHO, A. G. V. et al. Avaliação do crescimento em cordas na identificação presuntiva do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 33, n. 6, p. 707-711, 2007.

COUTINHO, Z. F. et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Caderno Saúde Pública*. Rio de Janeiro, v. 18, n. 5, p. 1441-1454, 2002.

DEAN, P. P. & DARK, P. The diagnostic future for bloodstream infections? *Intensive Care Medicine*, v. 37, n. 2, p. 355-356, 2011.

DIAS, M. F. R. G. et al. Human neutrophils susceptibility to *Paracoccidioides brasiliensis*: an ultrastructural and cytochemical assay. *Medical Mycology*, v. 46, n. 3, p. 241-249, 2008.

DINNES, J. et al. A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection. *Health Technology Assessment*, Rockville, v. 11, n. 3, p. 1-196, 2007.

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, 2005.

FORTES, M. R. P. et al. Immunology of paracoccidioidomycosis. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 86, n. 3, p. 516-524, 2011.

GARCIA, I. et al. Paracoccidioidomycosis (south american blastomycosis) of the larynx mimicking carcinoma. *The American journal of the medical sciences*, v. 335, n. 2, p. 149-150, 2008.

GIOVANI, E. M. et al. Paracoccidioidomycosis in an HIV-positive patient: a case report with gingival aspects. *Oral diseases*, v. 6, n. 5, p. 327-329, 2000.

GOO, J. M. et al. Pulmonary tuberculoma evaluated by means of FDG PET: findings in 10 cases. *Radiology*, v. 216, p. 117-121, 2000.

KALANTRI, S. et al. Bacteriophage based tests for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens: a systematic review and meta- analysis. *BMC Infectious Diseases*, v. 5, n. 1, p. 59, 2005.

KLUTTS, J. S. & ROBINSON-DUNN, B. A Critical appraisal of the role of the clinical microbiology laboratory in diagnosis of invasive fungal infections. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 49, n. 9, p. S39-S42, 2011.

KOURKOUMPETIS, T. K. et al. Polymerase chain reaction–based assays for the diagnosis of invasive fungal infections. *Clinical infectious diseases*, v. 54, n. 9, p. 1322-1331, 2012.

LEVY, H. et al. Reevaluation of sputum microscopy and culture in the diagnosis of pulmonary and culture in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Chest*, v. 95, n.6, p. 1193-1197, 1989.

LORENZ, C. G. et al. Pesquisa de BAAR por meio de modificações na coloração de Ziehl-Neelsen e por Gram. *LAES & HAES*, v. 30, n. 180, p. 178-186, 2009.

MATUTE, D. R. et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Molecular Biology and Evolution*, v. 23, n. 1, p. 65-73, 2006.

MELO, F. A. F. et al. Tuberculose. In: LOPES A.C. *Tratado de Clínica Médica*. São Paulo: Editora Roca, v. 2, p. 2623-2642, 2006.

MELO, F. A. F. et al. Tuberculose. In: VERONESI, R.F. et al. *Tratado de Infectologia*. São Paulo: Editora Atheneu. 4^a ed., v. 1, 2009. p. 1263-1333.

MORAES-VASCONCELOS, D. et al. *Paracoccidioides brasiliensis* disseminated disease in a patient with inherited deficiency in the beta 1 subunit of the interleukin (IL)-12/11-23 receptor. *Clinical Infectious Disease*, v. 41, n. 4, p. 31-37, 2005.

MORRIS, A. J. et al. Duration of incubation of fungal cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 34, n. 6, p. 1583-1585, 1996.

NICAS, M. et al. Toward understanding the risk of secondary airborne infection: emission of respirable pathogens. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, v. 2, n. 3, p. 143-154, 2005.

- NOLTE, F. S. & METCHOCK, B. Mycobacterium. In: MURRAY, P. R. et al. *Drug Susceptibility Testing. Manual of Clinical Microbiology*. Amer Society Microbiol, 1995. p. 400-437.
- OLIVEIRA, P. T. et al. Estudo de 54 casos de paracoccidioidomicose diagnosticados no Serviço de Estomatologia do Hospital São Lucas da PUCRS. *Revista Médica da PUCRS*, v. 7, n. 4, p. 161-166, 1997.
- PAI, M. et al. Diagnostic accuracy of nucleic acid amplification tests for tuberculous meningitis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infectious Diseases*, v. 3, n. 10, p. 633-643, 2003.
- PERKINS, M. Comunicação pessoal, 2009. Diagnostic Research and Development, United Nations Development Programme/World Bank/World Health Organization. The Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases Research (TDR).
- PINZAN, C. F. et al. Immunological basis for the gender differences in murine *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *PLoS One*, v. 5, n. 5, p. e10757-e10757, 2010.
- QUAGLIATO JÚNIOR, R. et al. Association between paracoccidioidomycosis and tuberculosis: reality and misdiagnosis. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 33, n. 3, p. 295-300, 2007.
- RESTREPO, A. et al. The gamut of paracoccidioidomycosis. *American Journal of Medicine*, v.61, n. 1, p. 33-42, 1976.
- RESTREPO A. Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*. In: FRANCO, M. et al. (Eds.), *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton: CRC Press, v. 410, p. 121-130, 1994.
- RESTREPO, A. et al. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Medical Mycology*, v. 39, n. 3, p. 233-241, 2001.
- RESTREPO, A. & TOBÓN, A. M. *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Mandell Mandell, G. L. et al. (Eds). *Principles and practice of Infections Diseases*. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, 7^a Edição, 2010. p. 3357-3363.
- RODRIGUES, G. S. et al. Association between paracoccidioidomycosis and cancer. *Jornal Brasileiro De Pneumologia*, v. 36, n. 3, p. 356-362, 2010.
- SAFE, I. P. et al. Extra-pulmonary manifestations of paracoccidioidomycosis associated with acquired immunodeficiency syndrome: a case report. *Anais Brasilerios de Dermatologia*, v. 89, n. 1, p. 150-153, 2014.

- SHANKAR, J. et al. Hormones and the resistance of women to paracoccidioidomycosis. *Clinical microbiology reviews*, v. 24, n. 2, p. 296-313, 2011.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. Consenso em paracoccidioidomicose. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 39, n.3, p. 297-310, 2006.
- SIDRIM, J. J. C. et al. Molecular methods for the diagnosis and characterization of *Cryptococcus*: a review. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 56, n.6, p. 445-458, 2010.
- SILVA, A. T. P. et al. Perfil epidemiológico dos pacientes portadores de tuberculose extrapulmonar atendidos em hospital da rede pública no estado do Maranhão. *Revista Brasileira de Clínica Médica*, v. 9, p. 11-14, 2011.
- SINGER-VERMES, L. M. et al. Evaluation of the pathogenicity and immunogenicity of seven *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice. *Medical Mycology*, v. 27, n. 2, p. 71-82, 1989.
- SOUZA, M. V. N. A Tuberculose e o desenvolvimento de novos tuberculostáticos em farmanguinhos (FIOCRUZ). *Revista Virtual de Química*, v. 1, n. 1, p. 9-16, 2009.
- STEINGART, K. R. et al. Commercial serological antibody detection tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a systematic review. *PLoS Med*, v. 4, n. 6, p. e202, 2007.
- TARANTINO, A. B. & ROSEMBERG, J. Tuberculose. In: TARANTINO, A. B. (Ed). *Doenças Pulmonares*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 4^a ed., 1997. p. 323-418.
- TAVARES, A. H. et al. Transcriptomic reprogramming of genus *Paracoccidioides* in dimorphism and host niches. *Fungal Genetics and Biology*, v. 81, p. 98-109, 2014.
- 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.
- TEIXEIRA, M. M. et al. Molecular and morphological data support the existence of a sexual cycle in species of the genus *Paracoccidioides*. *Eukaryotic cell*, v. 12, n. 3, p. 380-389, 2013.
- TELES, FRR & MARTINS, M.L. Laboratorial diagnosis of paracoccidioidomycosis and new insight for the future of fungal diagnosis. *Talanta*, v. 85, p. 2254-2264, 2011.
- TRAJMAN, A. et al. Novel tests for diagnosing tuberculous pleural efusion: what work and what does not? *European Respiratory Journal*, v. 31, n. 5, p. 1098-1106, 2008.

WANKE, B. & AIDÊ, M. A.. Capítulo 6 - Paracoccidioidomicose. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 35, n. 12, p. 1245-1249, 2009.

WENGENACK, N. L. & BINNICKER, M. J. Fungal molecular diagnostics. *Clinics In Chest Medicine*, v. 30, n. 2, p. 391-408, 2009.

WHITE, P. L. et al. Polymerase chain reaction diagnosis of fungal disease: finally coming of age. *Current Fungal Infection Reports*, v. 3, n. 4, p. 207-215, 2009.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Global tuberculosis report 2014*. Geneva: World Health Organization, 2014. Disponível em: <http://www.who.int/tb/publications/global_report/en>. Acesso em: 20 out 2015.

ZAITZ, C. et al. *Compêndio de Micologia Médica*. Rio de Janeiro: Guanabara, MEDSI, 1998. 434 p.

7. ARTIGO

7.1. Título

Diagnóstico molecular de paracoccidiodomicose associada à tuberculose em amostras de escarro.

Molecular diagnosis of paracoccidiodomicose associated with tuberculosis in sputum sample.

Lisandra Silvani Massi¹, Aline Gehlen Dall Bello³, Pedro Alves d'Azevedo³, Luiz Carlos Severo^{1,2}

Instituições envolvidas:

¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas. Rua Ramiro Barcelos, 2400 - 2º andar, Porto Alegre, RS, Brasil, CEP 90035-003.

²Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA). Avenida Independência, 75, Porto Alegre, RS, Brasil, CEP 90050-070.

³Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Rua Sarmento Leite, 245. Porto Alegre, RS, Brasil, CEP 90050-170.

Autor correspondente: Aline Gehlen Dall Bello, agdbello@gmail.com.br, alinegb@ufcspa.edu.br.

7.2. Resumo

Introdução: A paracoccidiodomicose (PCM) é uma micose sistêmica endêmica causada pelo fungo *Paracoccidioides* spp..

Objetivo: O objetivo deste estudo foi determinar a associação entre tuberculose (TB) e PCM em pacientes com exame micológico negativo.

Método: Estudo prospectivo de diagnóstico molecular de amostras de escarro, com resultado positivo para bacilo álcool ácido resistente (BAAR) e negativo no exame direto e cultivo micológico.

Resultados: A aplicação de técnicas moleculares resultou em 18,4% de pacientes coinfectados com PCM e TB.

Conclusão: O conhecimento das diferenças clínicas, epidemiológicas e laboratoriais da PCM quando associada à TB é importante para prevenir a disseminação da doença, complicações e o aumento da letalidade.

Palavras-chave: paracoccidiodomicose; tuberculose; diagnóstico molecular.

7.3. Abstract

Introduction: paracoccidioidomycosis (PCM) is an endemic systemic mycosis caused by *Paracoccidioides* spp ..

Objective: The aim of this study was to determine the association between tuberculosis (TB) and PCM in patients with negative mycological examination.

Method: Prospective study of molecular diagnosis of sputum samples with positive for bacilli resistant acid (BAAR) and negative on direct examination and mycological culture.

Results: The application of molecular techniques resulted in 18.4% of co-infected patients with PCM and TB.

Conclusion: Knowledge of clinical, epidemiological and laboratory differences PCM when associated with TB is important to prevent the spread of disease, complications and increased mortality.

Keywords: paracoccidioidomycosis; tuberculosis; molecular diagnosis

7.4. Introdução

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica endêmica na América Latina, causada pelos fungos *Paracoccidioides brasiliensis* e *P. lutzii*¹. A infecção ocorre pela inalação de conídios presentes no ar e posterior deposição dos propágulos nos pulmões com subsequente transformação para células leveduriformes². Dependendo da interação do fungo com a resposta imunológica do hospedeiro, a infecção pode evoluir para a cura espontânea ou disseminar-se pelo organismo causando uma doença inflamatória granulomatosa crônica^{1,3}. A fase primária da infecção aparece normalmente em indivíduos jovens como uma doença pulmonar autolimitada e, raramente, progride para o estado agudo ou subagudo da infecção. Após um longo período de latência, uma infecção pode ser reativada, originando uma doença pulmonar crônica, podendo ou não envolver outros órgãos^{4,5}.

A PCM pode estar associada a outras doenças infecciosas e/ou não infecciosas, as quais interferem diretamente no tratamento e prognóstico da patologia⁶. A associação entre tuberculose (TB) e PCM ocorre em 5,5-19%² dos casos e pode ocorrer simultaneamente ou sequencialmente, já que uma pode facilitar a reativação de um foco quiescente endógeno da outra ou ainda facilitar a infecção recente⁷. A queda da imunidade celular é a responsável pelo desencadeamento de ambas as doenças⁸.

O objetivo deste estudo foi determinar a associação entre TB e PCM em pacientes com exame micológico negativo, utilizando técnicas moleculares e assim contribuir para prevenção de complicações e sequelas nestes pacientes.

7.5. Materiais e Métodos

Estudo prospectivo, no qual foram incluídas amostras de escarro provenientes do Hospital Sanatório Partenon de Porto Alegre em conjunto com o Laboratório de Micologia da Irmandade Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA), no período de 2014-2015, positivas para bacilo álcool ácido resistente (BAAR) e negativas no exame direto e cultivo micológico para PCM. Algumas dessas amostras ainda tiveram diagnósticos complementares de cultivo e/ou teste molecular rápido para Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT). Foram incluídas 62 amostras de escarro, sendo que 9 eram de pacientes repetidos, e 1 controle positivo (CP). O CP é uma amostra proveniente do banco de cultura do Laboratório de Micologia da ISCMPA. O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da ISCMPA, parecer n° 521.332 (07/01/2014) e foi dispensada a assinatura dos pacientes no termo de consentimento, com o compromisso de manutenção do anonimato dos sujeitos da pesquisa.

A extração do DNA das células presentes nas amostras de escarro e no CP (suspensão em água livre de DNA e RNA) foi realizada com o kit comercial *Pathogen RNA/DNA MagMax*[®] no equipamento *MagMax*[™] Express, conforme a seguinte padronização: (1) preparo da solução de lise através da adição de Carrier RNA (2 µL) à solução concentrada de lise/ligação (250 µL), (2) adição da solução de lise (250 µL) e amostra (200 µL) em microtubos contendo esferas potencializadoras de atrito, (3) homogeneização rigorosa (15 min), (4) centrifugação (3min, 14000 RPM), (5) preparo da solução "Bead mix" (20µL) através da adição de esferas ligantes de ácidos nucleicos à solução Lysis enhancer, (6) preparo da placa com a solução "Bead mix", amostra, isopropanol, soluções de lavagem e tampão eluente, (7) inserção da placa no equipamento e posterior programação do mesmo (protocolo 4462359). Após esse processo, os ácidos nucleicos foram quantificados no equipamento Nanodrop®, diluídos a uma concentração de 10ng/µl e armazenados a -20°C.

O PCR das amostras extraídas foi dividido em duas reações. Na primeira reação (PCR1), utilizaram-se iniciadores específicos (*primers*) para detecção de CMT (INS1 5' CGTGAGGGCATCGAGGTGGC 3', INS2 5' GCGTAGGCGTCGGTGACAAA 3'). Essa etapa foi realizada para validação da extração, sendo o controle interno (CI) da reação de extração e visou eliminar falsos-negativos na PCR2, que ocorrem devido à presença de inibidores da reação de amplificação. A reação ocorreu em um volume de 50µL, contendo: 25µL de GO Taq Master Mix[®], 1µL de cada primer, 2µL de DNA da amostra extraída e 21µL de água livre de DNA. A amplificação por PCR em termociclador se deu em 35 ciclos de 94°C por 2min, 68°C por 2 min e 72°C por 2 min.

O DNA do CP foi submetido à reação em cadeia da polimerase (PCR). Os *primers* universais, espaçadores internos transcritos do DNA ribossomal (ITS1 5'

TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3' e ITS4 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'), foram utilizados para amplificação. Após, o produto do PCR foi purificado com o Kit comercial Wizard® PCR Clean-UP. Essa amostra foi encaminhada para sequenciamento no equipamento *ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer*® (Applied Biosystems). O resultado foi analisado no programa ClustalW para encontrar a sequência *contig*. A seguir, foi feito um alinhamento através da ferramenta BLAST no banco de dados GENBANK, concluindo-se que a amostra apresenta identidade com o *P. brasiliensis* (código da sequência: [dbj|AB038165.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/dbj|AB038165.1)). Após foi utilizado na PCR2 como controle positivo para PCM.

A segunda reação (PCR2), destinada a pesquisa de *Paracoccidioides* spp., foi feita somente nas amostras positivas da primeira reação. Os *primers* utilizados foram: OliPbmB1F 5' ACCCTTGTCTATTCTACC 3', OliPbmB1R 5' TTAAGTATTATGATAGGTCTC 3'. Realizou-se em um volume de 50µL contendo: 25µL de GO Taq Master Mix®, 1µL de cada *primer*, 2µL de DNA da amostra extraída e 21µL de água livre de DNA. A amplificação por PCR em termociclador se deu a 96°C por 5min, 40 ciclos de 96°C por 35s, 55°C por 35s e 72°C por 35s, finalizando com uma extensão de 72° por 7min.

Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados no fotodocumentador Bio Rad Gel Doc XR+®, após eletroforese em gel de agarose 2%, corado com Syber Safe®. Os fragmentos da primeira reação de PCR possuem 245pb e os fragmentos da segunda reação, 144pb. Eles foram quantificados conforme um marcador de peso molecular de 100pb e analisados por comparação com um controle positivo.

7.6. Resultados

Este estudo padronizou a extração de ácidos nucleicos fúngicos de amostras de escarro através do kit comercial *Pathogen RNA/DNA MagMax*® no equipamento MagMax™ Express. A eficiência da extração foi comprovada pela quantificação das moléculas de DNA que variou de 10 ng/ µL a 33,25 ng/µL e avaliação da pureza. A aplicação desta técnica proporcionou a obtenção de DNA purificado, pois a utilização das partículas magnéticas e o processamento semi-automatizado favoreceram a lise das paredes bacterianas e fúngicas com remoção dos possíveis inibidores de PCR. Das 53 amostras com DNA extraído, quatro foram negativas no PCR1 e foram excluídas do estudo, já que não tem como definir se foram negativas pela presença de inibidores da PCR ou por não haver o rompimento da parede celular do CMT, que possui estrutura rígida e complexa, constituída de ácidos micólicos.

Destas 49 amostras restantes, a idade média de todos os pacientes foi de 45 anos (25-75 anos), com predomínio do gênero masculino (96%). As condições associadas de alguns pacientes incluídos no trabalho são: 16% (8/49) população prisional, 14% (7/49) HIV, 10% (5/49)

diabéticos, 8% (4/49) moradores de rua, 2% (1/49) indígenas, 2% (1/49) usuários de droga, 2% (1/49) profissionais da saúde e 46% (22/49) não tinham informações cadastradas no sistema da Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul (RS). A pesquisa de resistência a rifampicina foi realizada em 37% (18/49) das amostras, apresentando 1 caso de resistência. Na PCR2, 13 amostras foram positivas (Figura 1), sendo que destas, 4, eram de pacientes repetidos, correspondendo então a 18,4% de pacientes coinfectados. Esses indivíduos apresentaram idade média de 36,1 anos e todos são do gênero masculino (Tabela 1).

7.7. Discussão

No Brasil, as taxas de TB são extremamente altas, chegando, a cada ano, a aproximadamente 70 mil casos novos notificados e ocorrendo 4,6 mil mortes em decorrência da doença⁸. No Estado do RS, a incidência é de 42,4 casos por 100 mil habitantes, sendo que o município de Porto Alegre apresenta coeficiente de incidência de 99,3 casos por 100 mil habitantes e 3 mortes a cada 100 mil habitantes⁹. A incidência de coinfeção com TB e PCM já está bem descrita na literatura⁷, como encontrado neste estudo (18,4%). Todos os pacientes avaliados no presente trabalho pertencem a grupos em situação de risco, pois são moradores de rua, dependentes químicos e privados de liberdade. Devido à alta incidência de TB no RS, o diagnóstico de PCM tem menor ênfase.

A PCM pulmonar crônica ocorre através da reativação de uma lesão quiescente em adultos entre 30-50 anos, com histórico de atividade relacionada ao solo, acometendo mais homens que mulheres (proporção de 15:1)¹⁰. Já a TB acomete indivíduos de qualquer idade e sexo, sendo mais comum em adultos jovens, com a maioria dos pacientes apresentando sintomas e exame físico comprometido¹¹. Apesar dessas diferenças, as informações não são suficientes para um diagnóstico diferencial entre ambas devido à sobreposição e similaridade das apresentações clínicas e radiológicas das duas doenças¹⁰.

O diagnóstico de PCM é baseado na visualização dos elementos fúngicos sugestivos de *Paracoccidioides* spp. através do exame microscópico a fresco e o isolamento em cultivo de espécimes clínicos, testes que apresentam alta especificidade com baixa sensibilidade¹². O crescimento desse fungo em meios de cultivo ocorre somente em 85% dos casos de PCM e a incubação demora entre 20 e 30 dias^{13,14,15}. Para aumentar essa sensibilidade do exame direto, LOPES (1955)¹⁶ desenvolveu uma técnica com soda, mas é necessária uma boa quantidade de escarro, que não estava disponível neste estudo.

A realização do teste sorológico de imunodifusão em gel (ID) colaboraria para uma melhor avaliação destes casos, já que os registros de dados são incompletos quanto à evolução da doença e retorno ao atendimento clínico. Não foi possível realizar o teste sorológico nos pacientes

porque as amostras de soro dos mesmos não foram disponibilizadas. A ID apresenta sensibilidade aproximada de 90% e especificidade de 100%, sendo que a positividade do teste indica a presença de uma lesão ativa^{10, 17, 18}.

Os pacientes coinfetados neste estudo receberam tratamento para TB, mas não para PCM. A rifampicina, isoladamente, não tem ação antifúngica, mas pode ser administrada com anfotericina B para tratamento das formas graves de PCM, pois a penetração da rifampicina no citoplasma e sua consequente ação farmacológica é possibilitada pela desorganização funcional da membrana celular fúngica causada pela anfotericina B^{10,11}. A opção terapêutica dos pacientes coinfetados com TB e PCM deve ser avaliada, pois a escolha para tratamento da PCM é o Itraconazol, que é metabolizado pelo sistema enzimático do citocromo P-450 (CYP3A4). A rifampicina um indutor deste sistema, diminuiu a biodisponibilidade do itraconazol, comprometendo sua eficácia¹⁹.

A metodologia utilizada nas nossas amostras de escarro foi descrita por Dias et al¹⁸ para amostras de soro e plasma. Os *primers* utilizados detectam somente o gênero *Paracoccidioides*, não sendo possível a diferenciação entre *P. brasiliensis* e *P. lutzzi*. Tratam-se de *primers* conservados da região ITS do rDNA, sendo mais apropriada para aplicação da técnica de PCR como ferramenta diagnóstica. Apesar de se saber que métodos moleculares quantitativos, como PCR em tempo real, são mais adequados para predizer doença ou infecção, são também consideradas técnicas caras, que necessitam de alta tecnologia. A PCR convencional pode ter uma ótima relação custo-benefício para diagnóstico de PCM em amostras de escarro com exame micológico negativo.

7.8. Conclusão

Desta forma, considerando as altas taxas de tuberculose no Brasil, principalmente no Rio Grande do Sul, é de extrema importância o diagnóstico diferencial da PCM, já que a associação dessas duas doenças é comum e muitas vezes negligenciada. Além disso, a padronização da extração de ácidos nucleicos em amostras de escarro possibilitou a obtenção rápida de DNA purificado e sem interferentes para a PCR. O diagnóstico molecular pela amplificação genômica demonstrou eficácia na detecção de PCM em escarro.

7.9. Conflito de Interesse

Os autores declaram não ter conflito de interesse.

7.10. Referências

1. Restrepo A, McEwen JG, Castañeda E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Med Mycol.* 2001;39:233-41.
2. Wanke B, Aide MA. Paracoccidioidomicose. *J Bras Pneumol.* 2009;35:1245-49.
3. Coutinho ZF, Silva D, Lazéra M, Petri V, Oliveira RM, Sabroza PC, et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saúde Pública.* 2002;18:1441-54.
4. Cerri A, Silva CEXSR, Pacca FO. Paracoccidioidomicose: aspectos de interesse para o cirurgião-dentista. *Rev Paul de Odontol.* 1998;20:19-24.
5. Giovani E, Mantesso A, Loducca S, Magalhaes M. Paracoccidioidomycosis in an HIV-positive patient: a case report with gingival aspects. *Oral Dis.* 2000;6:327-29.
6. Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho FQ, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML. Consenso em paracoccidioidomicose. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006;39:297-310.
7. Quagliato Júnior R, Grangeia TA, Massucio RA, De Capitani EM, Rezende SM, Balthazar AB. Association between paracoccidioidomycosis and tuberculosis: reality and misdiagnosis. *J Bras Pneumol.* 2007;33: 295-300.
8. Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico. 2015;46(9):[19screens]. Available from: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/marco/27/2015-007---BE-Tuberculose---para-substitui---o-no-site.pdf>.
9. Brasil. DATASUS. 2012. Available from: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2012/c17.def>.
10. Wanke B, Londero AT. *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Collier L, Bllows A, Sussman M (eds) Topley & Wilson's microbiology and microbial infections. 9th edition, Arnold, London, p. 395-407,1998.
11. Brunton LL, et al. As bases farmacológicas da terapêutica. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 11^a ed., 2007.1821 p.
12. Teles FRR, Martins ML. Laboratorial diagnosis of paracoccidioidomycosis and new insights for the future of fungal diagnosis. *Talanta.* 2011;85:2255–64.
13. Restrepo A, Robledo M, Giraldo R, Hernández H, Sierra F, Gutiérrez F, et al. The gamut of paracoccidioidomycosis. *Am J Med.* 1976;61:33-42.
14. Morris AJ, Byrne TC, Madden JF, Reller LB. Duration of incubation of fungal cultures. *J Clin Microbiol.* 1996;34:1583-85.
15. Restrepo A, Tobón AM. *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Mandell GL; Bennett JE & Dolin, editors. R Mandell, Douglas and Bennett`s. Principles and practice of Infections Diseases. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, 7^a ed, 2010.p.357-63.

16. Lopes OSS. Descrição de uma técnica de concentração para a pesquisa de *Paracoccidioides brasiliensis* no escarro. *O Hospital*. 1955;47:557-66.
17. Bocca AL, Amaral AC, Teixeira MM, Sato PK, Shikanai-Yasuda MA, Soares Felipe MS. Paracoccidioidomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. *Future Microbiol*. 2013;8:1177-91.
18. Dias L, Carvalho LF, Romano CC. Application of PCR in serum samples for diagnosis of paracoccidioidomycosis in the Southern Bahia - Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6:e1909.
19. Shikanaia-Yasuda MA. Paracoccidioidomycosis treatment. *Med. Trop*. 2015;57:31-7.

7.11. Anexos

Tabela 1: Perfil e resultados das amostras com coinfeção.

Amostras	Gênero	Idade	Condições associadas	Raio X	Diagnóstico bacteriológico				Diagnóstico Micológico			Tratamento	Evolução
					BAAR	Cultura CMT	TMR CMT	PCR 1	Direto a fresco PCM	Cultura PCM	PCR 2		
1	Masculino	34	NI	NI	++	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	RHZE	NI
43, 53 e 61	Masculino	45	Alcoolista, tabagista, cardiopata (implante de stent)	Cavidade lobo superior	+++	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	RHZE	Cura
44	Masculino	28	NI	NI	++	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	RHZE	NI
59	Masculino	25	Dependente químico	Cavidade lobo superior	++	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	RHZE	Abandono
60	Masculino	29	Dependente químico	lesões bilaterais	+	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	RHZE	Abandono
63	Masculino	54	NI	Múltiplas lesões	+++	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	RHZE	NI
39,72 e 79	Masculino	33	NI	NI	++	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	RHZE	NI
74	Masculino	50	Privado de Liberdade	Cavidade	+	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	RHZE	Abandono
75	Masculino	25	Dependente químico	Cavidade	+++	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	SELTZ	Abandono

Pos: positivo; Neg: negativo; NI: não informado; CMT: cultura para TB realizada em meio sólido Ogawa Kudoh; TMR: teste molecular rápido realizado por PCR em tempo real; SELT: Estreptomina, Etambutol, Levofloxacina, Pirazinamida, Terizidona; RHZE: Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida, Etambutol.

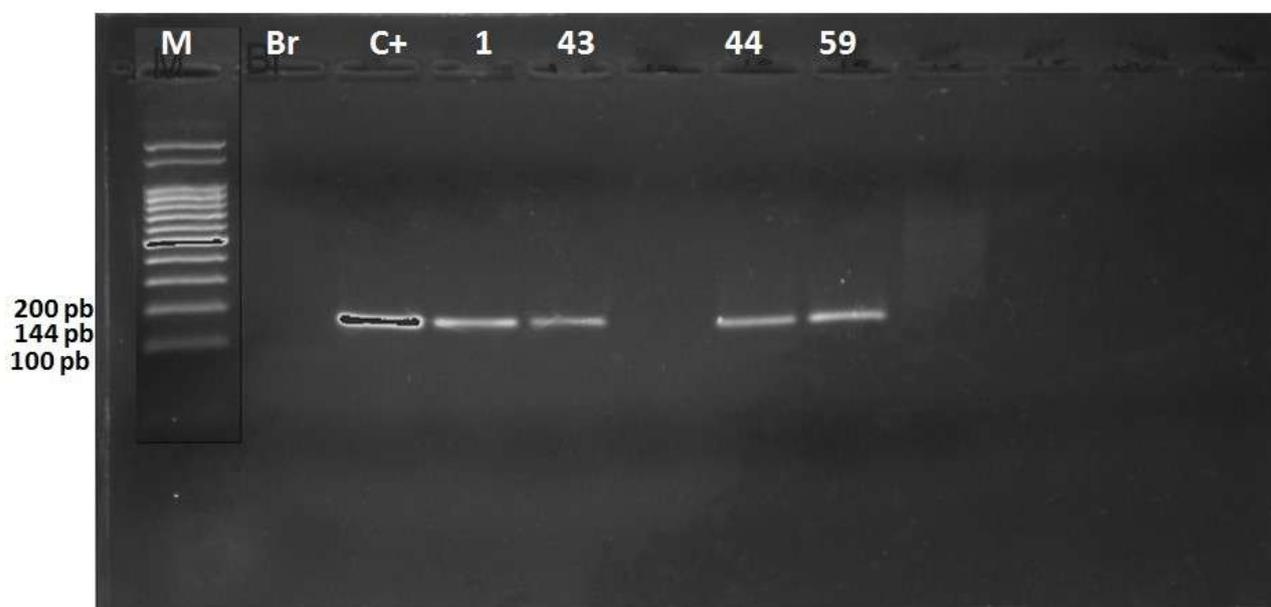


Figura 1: Análise de amostras clínicas (escarro) de PCM por PCR. M: marcador de peso molecular de 100 pb; Br: branco ou controle negativo; C+: controle positivo; 1, 43, 44 e 59: amostras.

8. CONCLUSÕES

- Considerando as altas taxas de tuberculose no Brasil, principalmente no Rio Grande do Sul, é de extrema importância o diagnóstico diferencial da PCM, já que a associação dessas duas doenças é comum e muitas vezes negligenciada;

- A padronização da extração de ácidos nucleicos em amostras de escarro possibilitou a obtenção rápida de DNA purificado e sem interferentes para a PCR;

- O diagnóstico molecular pela amplificação genômica demonstrou eficácia na detecção de PCM em escarro.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir deste trabalho, poderão ser realizados outros estudos para dar continuidade ao conhecimento dos *Paracoccidioides* spp., como a identificação genotípica das espécies S1 (grupo parafilético formado por 38 isolados da Argentina, Brasil, Peru, Venezuela e Antártida), PS2 (contém 6 isolados, com 5 dos quais provenientes do Brasil e 1 da Venezuela), PS3 (com 21 isolados da Colômbia), PS4 (isolados clínicos da Venezuela) e *P. lutz*.

Outra possibilidade é o desenvolvimento de estudos para viabilizar a utilização de testes moleculares rápidos, práticos e de baixo custo para utilização em rotinas de laboratórios clínicos.

10. ANEXO

10.1. Formulário de coleta de dados dos pacientes

Instrumento para colheita de dados

Dados de identificação

Nome: Registro.....
 Data internação:..... Idade:..... Sexo: () M () F
 Hospital..... Nº caso:.....

Condições predisponentes

Diabete melito () Sim () Não () Não informado
 Insuficiência renal () Sim () Não () Não informado
 HIV () Sim () Não () Não informado
 Drogas injetáveis () Sim () Não () Não informado
 Neutropênico () Sim () Não () Não informado
 Sepse bacteriana () Sim () Não () Não informado
 Neoplasia Qual:.....
 Transplante Qual:..... Tempo:.....
 Outros: Qual:.....

Dados clínicos

Motivo internação:.....
 Unidade internação () Clínica () Cirúrgica
 Cateter () venoso central () arterial
 NPT () Sim () Não () Não informado Nº de dias:.....
 Terapia intensiva () Sim () Não () Não informado
 Ventilação mecânica () Sim () Não () Não informado

Sítios de infecções:

Pulmão () Sim () Não
 SNC () Sim () Não
 Rins () Sim () Não Local-.....
 Ossos () Sim () Não Local-.....
 Pele () Sim () Não Local-.....
 Glândulas () Sim () Não Local-.....

Outros:

Lesões disseminadas :

Deterioração clínica sem outra explicação:.....

Terapia antimicrobiana

Fluconazol () Sim () Não () Não informado Há quanto tempo:.....
 Anfotericina B () Sim () Não () Não informado Há quanto tempo:.....
 Itraconazol () Sim () Não () Não informado Há quanto tempo:.....
 Voriconazol () Sim () Não () Não informado Há quanto tempo:.....
 Sulfametoxazol/ () Sim () Não () Não informado Há quanto tempo:.....

Trimetropim

Tratamento de tuberculose

R (Rifampicina) – H (Isoniazida) – Z (Pirazinamida) – E (Etambutol)

S (Estreptomina) – E (Etambutol) – L (Levofloxacina) – Z (Pirazinamida) – T (Terizidona)

Qual esquema terapêutico utilizado?

Diagnóstico de imagem (se possível tirar foto do exame de imagem ou salvá-lo)

RX:

CT:

Evolução

() Alta hospitalar Data:.....Duração internação:.....

() Óbito Data:.....()

Complicações Qual(is):.....