

MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DE PARACOCCIDIOIDOMICOSE - REVISÃO SISTEMÁTICA

DIAGNOSTIC METHODS OF PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS - SYSTEMATIC REVIEW

Victor Almeida Amatuzy¹
Ana Paula Jafet Ourives Vanderlinde²

1 Médico formado pela Faculdade Santa Marcelina FASM.

2 Prof. Dr. Da Disciplina de Propedêutica e Semiologia da Faculdade Santa Marcelina

Trabalho de Conclusão de Curso de Medicina apresentado à Faculdade Santa Marcelina de Itaquera.

Recebido para publicação: 2022

Aprovado pelo COPEFASM – Comitê de orientação a Pesquisa da Faculdade Santa Marcelina P092/2022.

Endereço para correspondência:

ana.ourives@santamarcelina.edu.br

RESUMO

A paracoccidiodomicose (PCM) é uma doença causada pelo fungo do gênero *Paracoccidioides*. Foi listada como oitava maior causa de mortalidade entre doenças infecciosas parasitárias crônicas, além de apresentar a maior taxa de mortalidade dentre as micoses sistêmicas. O objetivo deste estudo é compreender os métodos diagnósticos da paracoccidiodomicose, visando a um melhor entendimento da patologia e uma abordagem mais eficiente. Foi realizada uma revisão sistemática da literatura mediante busca e análise nas bases de dados da PubMed, MEDLINE, LILACS e SciELO. Após análise dos artigos selecionados, os achados deste estudo revelaram os métodos microscópicos como os mais utilizados na identificação de *Paracoccidioides* spp. Como alternativa ao diagnóstico laboratorial clássico, destacam-se os ensaios moleculares que podem ser utilizados visando a diferentes estratégias, como detecção e identificação. É fundamental que sejam realizados diagnósticos diferenciais para melhor compreensão da doença e um diagnóstico mais precoce a fim de se obter um desfecho clínico mais favorável.

PALAVRAS-CHAVE: Epidemiologia. Métodos diagnósticos. Paracoccidiodomicose.

ABSTRACT

Paracoccidiodomycosis (PCM) is a disease caused by the fungus of the genus *Paracoccidioides*. It was listed as the eighth leading cause of mortality among chronic parasitic infectious diseases, in addition to having the highest mortality rate among systemic mycoses. The objective of this study is to understand the diagnostic methods of paracoccidiodomycoses, aiming at a better understanding of the pathology and a more efficient approach. A systematic literature review was performed by searching and analyzing PubMed, MEDLINE, LILACS and Scielo databases. After analyzing the selected articles, the findings of this study revealed the microscope methods as the most used in the identification of *Paracoccidioides* spp. As an alternative to classical laboratory diagnosis, molecular assays that can be used for different strategies, such as detection and identification, stand out. It is essential that differential diagnoses are performed for a better understanding of the disease and an earlier diagnosis, aiming at a more favorable clinical outcome.

KEYWORDS: Epidemiology. Diagnostic methods. Paracoccidiomycosis.

INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença fúngica e sistêmica que pode acometer qualquer órgão do corpo humano, tendo predileção por: pulmões, mucosas do trato digestivo, peles e glândulas adrenais¹. A moléstia é endêmica do continente americano, sendo mais prevalente em regiões da América do Sul² e foi descrita pela primeira vez em 1908 por Adolfo Lutz, que isolou o agente etiológico a partir de lesões orais em pacientes com a doença³. O principal agente etiológico é o fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, mas outra espécie também foi identificada *Paracoccidioides lutzii*, sendo essa última mais encontrada no centro-oeste do Brasil⁴. A PCM foi listada como oitava maior causa de mortalidade entre doenças infecciosas parasitárias crônicas, além de apresentar a maior taxa de mortalidade dentre as micoses sistêmicas⁵.

Os fungos *Paracoccidioides spp.* desenvolvem-se a partir de estruturas filamentosas que produzem infectantes conhecidos como conídios que, quando inalados, darão origem a formas leveduriformes do fungo, os quais terão um caráter parasitário em relação aos hospedeiros. Neste caso, destaca-se o ser humano e o tatu bola, que podem ser infectados no ambiente rural e periurbano⁵. Na maioria dos casos, a infecção pelo *Paracoccidioides spp.* ocorre em pessoas que foram expostas a atividades agrícolas durante as duas primeiras décadas de vida⁶.

Os conídios entram pela via respiratória até os pulmões e seu potencial infeccioso é controlado pela ação imune celular, portanto, a infecção tende a ser assintomática ou com sintomas inespecíficos, sendo que poucos indivíduos manifestarão a doença⁷.

Há duas formas clínicas em que o fator de distinção serão os aspectos clínicos e a resposta imunológica do paciente. A primeira é a forma aguda, que é caracterizada por ocorrer normalmente em crianças e jovens adultos que apresentam uma resposta imune ineficaz, sendo que o quadro clínico surge semanas ou meses após a exposição. A principal clínica apresentada é linfonodomegalia generalizada ou intra-abdominal, associada às lesões de pele e mucosa. De modo secundário, os pacientes apresentam febre, perda de peso, anorexia e podem produzir massas tumorais. Já, a forma crônica ocorre em 80% dos casos e geralmente sobrevém após os 30 anos de idade, limitando-se a pulmões e vias aéreas superiores^{6, 8, 9}.

Os pacientes diagnosticados com PCM procuram atendimento anos depois de evadirem de áreas endêmicas; além do mais, há alguns fatores de riscos que contribuem para o desenvolvimento da patologia, tais como: tabagismo (>20 cigarros/dia) e alcoolismo¹⁰.

O diagnóstico padrão ouro é o isolamento do agente etiológico em amostras de escarros ou encontrados em lesões, associado também a exame físico e anamnese, e deve-se considerar internamento desse paciente, quando apresentar quadro clínico disseminado, morbidades que possam influenciar no prognóstico do indivíduo, como AIDS, tuberculose ou neoplasia, ou sequelas e instabilidade clínica¹¹.

Os fungos causadores da PCM respondem bem ao tratamento com antifúngico. A principal linha de tratamento é com os derivados dos azólicos, destacando-se o Itraconazol, com duração de tratamento entre 9-18 meses para as formas leves e moderadas¹². A Anfotericina B é utilizada para o tratamento das formas graves e disseminadas¹³. Além do tratamento antifúngico, deve-se estabilizar o paciente, reduzindo sintomas álgicos, fazer a correção de peso corporal e controlar eventuais distúrbios secundários à infecção.

O objetivo do presente estudo é compreender, por meio de uma revisão sistemática, os principais métodos diagnósticos, sejam eles clínicos, radiológicos e laboratoriais, visando a uma abordagem diagnóstica mais eficiente.

MÉTODO

Tipo de estudo e bases de dados

Esta pesquisa é uma revisão sistemática da literatura com busca de estudos publicados nos bancos de dados da MEDLINE, LILACS, PubMed e SciELO.

Estratégia de busca

Foram utilizados os descritores "paracoccidioidomicose" (paracoccidioidomycosis) associado a "métodos de diagnóstico" (diagnostic methods), "epidemiologia" (epidemiology). Todos os descritores constaram, pelo menos, do título, do resumo ou das palavras-chave.

Crítérios de inclusão e exclusão

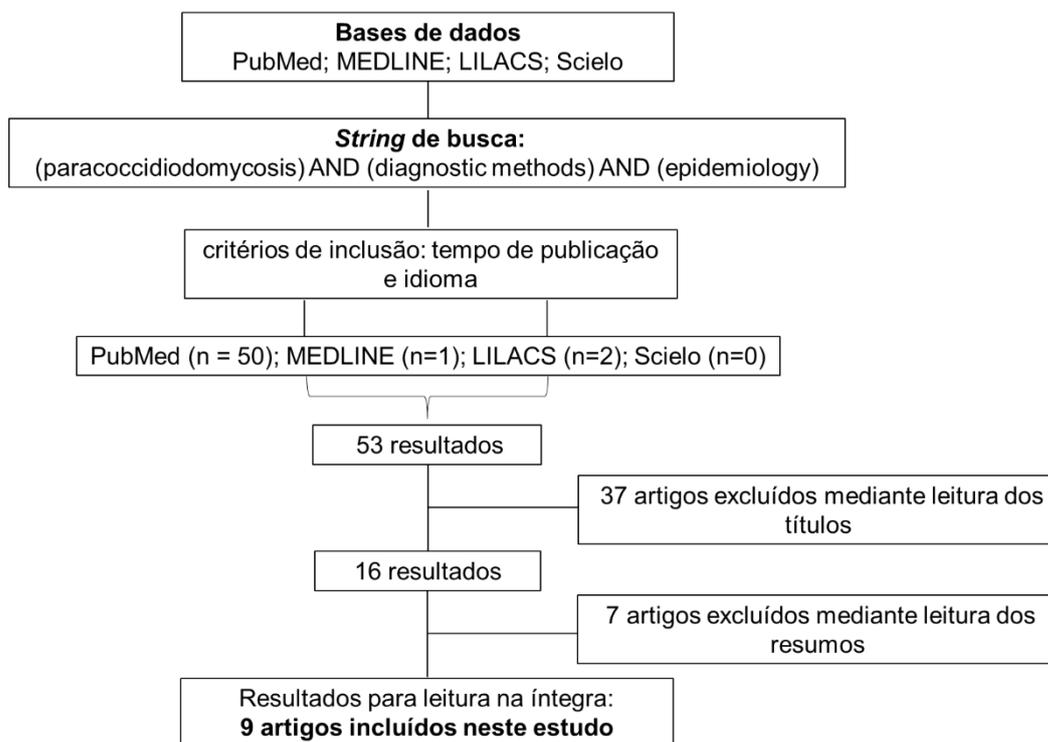
Foram estabelecidos, como critérios de inclusão, os estudos transversais, ensaios clínicos, estudos de coorte e revisões de literatura que abordem o tema supracitado. Foram selecionados artigos científicos no período entre 2000 e 2022 nos idiomas português, inglês e espanhol. Foram excluídos estudos, cuja abordagem seja o tratamento da patologia, tal como estudos anteriores ao período pré-selecionado.

Extração dos dados

A busca e análise dos artigos foi feita de forma independente pelo pesquisador sob supervisão da orientadora. A elegibilidade dos estudos e o processo de seleção dos artigos foram conduzidos pelo autor, e a seleção das publicações foi realizada em três etapas: 1- análise de títulos, 2- análise de resumos e 3- leitura na íntegra. Posteriormente a essas etapas, foram selecionados nove

estudos, os quais foram incluídos nesta revisão. A estratégia de busca dos estudos está ilustrada no fluxograma da figura 1.

Figura 1. Fluxograma da estratégia de busca dos artigos inseridos no estudo com base nos critérios de inclusão e exclusão.



RESULTADOS

Os dados dos artigos selecionados foram extraídos e tabulados quanto ao título, autores, método diagnóstico, tipo de estudo e principais achados (Tabela 1).

Tabela 1. Estudos incluídos na revisão de literatura

Título	Autores	Método diagnóstico	Tipo de estudo	Principais achados
A multicentre study of oral paracoccidioidomycosis: analysis of 320 cases and literature review	Arruda et al. 2018	Análise histopatológica	Estudo retrospectivo e revisão de literatura	As lesões orais da PCM geralmente exibem achados histopatológicos de outras lesões e inflamações granulomatosas. Entretanto colorações especiais como PAS e Grocott-Gomori revelam <i>P. brasiliensis</i> , auxiliando no diagnóstico diferencial.

Paracoccidioidomycosis en un hospital monovalente	Messina et al. 2017	Exame microscópico direto e/ou estudo histopatológico	Estudo descritivo e retrospectivo	A paracoccidioidomicose deve ser incluída no diagnóstico diferencial de pacientes provenientes de área endêmica e que apresentem comprometimento de pele, mucosas ou sistema respiratório associado a uma síndrome infecciosa inespecífica.
Molecular Tools for Detection and Identification of Paracoccidioides Species: Current Status and Future Perspectives	Pinheiro et al. 2020	Diagnóstico molecular	Revisão de literatura	Vários métodos baseados em PCR podem detectar polimorfismos de DNA em Paracoccidioides e, assim, apoiar a identificação das espécies. Esta revisão discute esses avanços à luz das mudanças taxonômicas no gênero Paracoccidioides
Histoplasmosis and Paracoccidioidomycosis in a Non-Endemic Area: A Review of Cases and Diagnosis	Buitrago et al. 2011	Diagnóstico molecular RT-PCR	Estudo transversal	O método PCR para PCM detectou 100% dos casos. As técnicas de RT-PCR desenvolvidas parecem ser sensíveis, específicas e rápidas e podem ser úteis para detectar esse tipo de micose.
Prevalence and serological diagnosis of relapse in paracoccidioidomycosis patients	Sylvestre et al. 2014	Métodos sorológicos	Estudo de coorte prospectivo	Este estudo avaliou diferentes métodos sorológicos para diagnóstico de recidiva da PCM, a partir da reação DID, que tem sido o método de escolha devido à sua especificidade, valor preditivo positivo, repetibilidade e simplicidade ao immunoblotting com identificação de gp43. Esses achados evidenciam que o teste ELISA deve ser o método de escolha para o diagnóstico de recidiva da PCM.
Identifying Paracoccidioides phylogenetic species by PCR-RFLP of the alpha-tubulin gene	Roberto et al. 2016	Diagnóstico sorológico e molecular por PCR-RFLP	Estudo transversal	O TUB1 -RFLP é uma ferramenta eficiente, rápida e barata para a identificação de Paracoccidioides spp., o que pode ser aplicado diretamente aos estudos epidemiológicos moleculares da paracoccidioidomicose.
Serological diagnosis of paracoccidioidomycosis: high rate of inter-laboratorial variability among medical mycology reference centers	Vidal et al. 2014	Diagnóstico sorológico	Estudo de coorte prospectivo	Os resultados mostram que existem inconsistências entre os laboratórios, fortes o suficiente para resultar em informações conflitantes sobre o tratamento do paciente, e que esforços renovados devem ser promovidos para melhorar a padronização do diagnóstico sorológico da PCM.

Accuracy of routine diagnostic tests used in paracoccidioidomycosis patients at a university hospital	Moreto et al. 2011	Diagnóstico citopatológico, histopatológico e exame micológico direto, associado a teste de avaliação sorológica por DID	Estudo transversal	Este estudo demonstrou que a identificação de <i>P. brasiliensis</i> por HP, CB e/ou DM associada a DID é suficiente para estabelecer o diagnóstico laboratorial de paracoccidioidomicose em praticamente todos os casos.
Utility of Real-time PCR for the detection of <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> DNA in the diagnosis of imported paracoccidioidomycosis	Buitrago et al. 2009	Diagnóstico molecular por RT-PCR	Estudo transversal	A PCR em tempo real foi positiva para todas as cepas de cultura, bem como para as de ambos os pacientes.

Após análise dos artigos selecionados, foi observado que os métodos diagnósticos sorológicos ainda caracterizam padrão ouro para o diagnóstico da paracoccidioidomycoses. No entanto a maioria dos estudos aqui abordados relatam sobre as técnicas moleculares, em seguida, métodos sorológicos e histopatológicos.

DISCUSSÃO

O método sorológico para a identificação de paracoccidioidomicose (PCM) caracteriza-se como padrão ouro. O método inclui o isolamento in vitro do patógeno e/ou visualização de levedura multibrotamento patognomônica a partir de amostras clínicas¹⁴. Testes sorológicos específicos são de grande importância no diagnóstico presuntivo e prognóstico da doença, permitindo ao médico avaliar e monitorar a resposta do paciente ao tratamento.

Nesse cenário, também se destaca o uso rotineiro da dupla imunodifusão (DID), evidenciado em estudo de Moreto *et al.*¹⁵ e Sylvestre *et al.*¹⁶, e que possibilita a detecção quantitativa de anticorpos circulantes na PCM. A identificação de medidas laboratoriais apropriadas para a confirmação de hipóteses clínicas é importante no atendimento médico de rotina da paracoccidioidomicose. Moreto *et al.*¹⁵ analisaram quatro métodos diagnósticos e demonstraram que a identificação de *P. brasiliensis* por HP, CB e/ou DM associada a DID é suficiente para estabelecer o diagnóstico laboratorial de paracoccidioidomicose em praticamente todos os casos. Além disso, verificaram que o exame histopatológico apresentou a maior sensibilidade (96,7%)¹⁵.

Adicionalmente, Sylvestre *et al.*¹⁶ enfatizam um outro fator importante, que é o diagnóstico em casos de recidiva da PCM. Os fungos do gênero *Paracoccidioides brasiliensis* e *Paracoccidioides lutzii*, causadores da PCM, vivem no solo e atingem principalmente os trabalhadores rurais no período mais produtivo de suas vidas. Nesse sentido, a PCM pode recidivar após tratamento eficaz, porque os fungos quiescentes podem se reativar. Sylvestre *et al.*¹⁶ avaliaram diferentes métodos sorológicos para o diagnóstico de recidiva da PCM, e verificaram que a prevalência de recidiva foi baixa e os novos testes sorológicos apresentaram sensibilidade um pouco maior do que o DID, sobressaindo o teste ELISA como o método de escolha para o diagnóstico em casos de recidiva da PCM. Como os

testes sorológicos apresentaram apenas uma sensibilidade moderada, os autores salientam que exames micológicos, citopatológicos, histopatológicos diretos e isolamento em cultura para *P. brasiliensis* devem ser realizados de forma adequada e rotineira, quando se considera a hipótese de recaída. Além disso, a baixa prevalência de recidiva sorológica pode levar a complicações em diagnósticos futuros, pois pode sugerir outra doença manifestada, retardando o diagnóstico e o tratamento da recidiva da PCM.¹⁶

Arruda *et al.* esclarecem que, no caso de uma PCM oral, é uma lesão incomum detectada em biópsia oral e amostras maxilo faciais, e sua incidência requer atenção em termos de políticas públicas de saúde para o diagnóstico e tratamento. Estes autores, estudando a frequência de CMP oral em uma população brasileira, e considerando que as características clínicas da CMP podem apresentar achados histopatológicos semelhantes a outras lesões granulomatosas e infecções fúngicas sistêmicas, relataram que colorações especiais como PAS e Grocott-Gomori podem auxiliar no diagnóstico diferencial de *P. brasiliensis*.¹⁷

Por outro lado, Vidal *et al.*¹⁸ compararam o desempenho de seis centros brasileiros de referência para diagnóstico sorológico de PCM e concluíram que existem inconsistências entre os laboratórios que podem potencialmente resultar em informações conflitantes sobre o tratamento do paciente. Os autores ressaltam que o tipo de reação e a preparação do antígeno podem ser fatores que influenciam na acurácia do resultado sorológico. A quantidade desses componentes nas preparações de antígenos varia não apenas entre as cepas, mas também em uma única cepa, dependendo do número de subcultivos repetidos, meio utilizado, da fase logarítmica de crescimento, quando o fungo é colhido, entre outros fatores. Este é provavelmente um fator importante nas inconsistências entre os centros. Esforços renovados devem ser promovidos para melhorar a padronização do diagnóstico sorológico da PCM.¹⁸

As Paracoccidioides spp. incluem um grande número de fenótipos que podem se sobrepor, especialmente entre grupos intimamente relacionados¹⁴. Nessa situação, os critérios morfológicos, por si só, são insuficientes para o reconhecimento das espécies e outros testes são necessários, com ferramentas moleculares mostrando-se promissoras^{19, 20}. As técnicas baseadas em PCR são as mais comuns em micologia médica devido à sua versatilidade e capacidade de direcionar e amplificar ácidos nucleicos de cepas isoladas ou diretamente de amostras clínicas, como escarro, biópsia e material de lavado bronco alveolar (LBA), líquido cefalorraquidiano (LCR), sangue etc., usando equipamentos rápidos, baratos e amplamente disponíveis²¹⁻²³.

Nesse contexto, vários métodos moleculares para identificar e distinguir espécies fúngicas estão sendo aplicados como ferramentas de diagnóstico^{14, 24, 25}. Buitrago *et al.*²⁴, utilizando um ensaio baseado em PCR em tempo real, avaliaram a técnica com um total de 12 cepas de *P. brasiliensis* e também com amostras dos dois pacientes com PCM confirmada. Todas as cepas de *P. brasiliensis* apresentaram resultado positivo, enquanto nenhuma das cepas das demais espécies incluídas nos ensaios como controle apresentou sinal positivo na PCR em tempo real. O desenvolvimento desse tipo de técnica para identificar o fungo de uma cultura pode reduzir significativamente o risco de manipulação de culturas e pode abreviar o tempo necessário para identificar o fungo. Em amostras

clínicas, essas técnicas também podem ser utilizadas como método de diagnóstico precoce e monitoramento da resposta ao tratamento²⁴.

Entretanto existem barreiras difíceis de serem superadas no uso da PCR, como, por exemplo, a suspeita sobre o agente etiológico em razão da ausência de testes de triagem ou panfúngicos e pequenas quantidades de material genético fúngico de amostras clínicas²⁶. Desta forma, na rotina clínica, os distintos agentes etiológicos raramente são identificados até o nível da espécie por ferramentas moleculares. Nesse sentido, Roberto *et al.* mostraram que TUB1 -RFLP pode discriminar eficientemente entre espécies distintas de *Paracoccidioides* com alta precisão. Os autores recomendam incluir pelo menos uma reação RFLP de controle positivo de uma cepa de referência bem caracterizada. Esse método representa uma alternativa aos esquemas de tipagem de sequência multilocus. Também, TUB1 -RFLP pode ser uma ferramenta útil para a tipagem de um grande número de isolados de *Paracoccidioides* em estudos epidemiológicos¹⁴.

Uma outra barreira em relação às técnicas moleculares é que elas não são padronizadas para uso rotineiro nos laboratórios de serviços públicos de saúde nos países em desenvolvimento, onde a PCM é endêmica. Ainda, a sensibilidade e a especificidade desses métodos moleculares não são superiores ao exame histopatológico, embora apresentem sensibilidade um pouco maior do que o teste DID¹⁵.

Já, em uma área não endêmica, a PCM raramente é suspeitada devido ao período extremamente longo de silêncio dessa doença²⁷. No entanto esse tipo de micose é cada vez mais frequente nessas áreas²⁵. Nos achados de Buitrago *et al.*²⁵, a sorologia mostrou-se útil e positiva em todos os pacientes em uma área não endêmica. Porém, a RT-PCR mostrou boa sensibilidade, detectando 100% dos casos. Os autores consideram que técnicas mais novas e mais rápidas devem ser utilizadas para o diagnóstico precoce. As técnicas de RT-PCR desenvolvidas parecem ser sensíveis, específicas e rápidas e podem ser úteis para detectar essas micoses. Todavia é fundamental que os médicos considerem a PCM em indivíduos oriundos de áreas endêmicas e que realizem diagnósticos diferenciais.²⁵

Em revisão da literatura, Pinheiro *et al.*²⁸ abordam que, com o advento do sequenciamento do genoma completo e sua disponibilidade para a comunidade científica, novos testes diagnósticos, baseados em métodos NGS, podem ser uma alternativa importante, tanto do ponto de vista diagnóstico, quanto epidemiológico. Esse estudo fornece muitas contribuições aos estudos da PCM. Embora o diagnóstico microbiológico possa ser considerado o padrão ouro para a confirmação da hipótese diagnóstica, os métodos moleculares estão em expansão e ficou evidente que o desenvolvimento desse tipo de técnica para identificar o fungo de uma cultura pode reduzir significativamente o risco de manipulação de culturas e pode abreviar o tempo necessário para identificar o fungo. Em amostras clínicas, essas técnicas também podem ser utilizadas como método de diagnóstico precoce e monitoramento da resposta ao tratamento ²⁴.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados evidenciados sugerem que os métodos microscópicos são mais utilizados na identificação de *Paracoccidioides* spp. Como alternativa ao diagnóstico laboratorial clássico, os ensaios moleculares podem ser usados visando a diferentes estratégias, como detecção e identificação. Nesse cenário, os ensaios de base molecular fornecem os resultados mais rápidos e precisos sobre a infecção, atingindo o nível de espécie com mais eficiência.

Existem barreiras difíceis de serem superadas no uso da PCR, como, por exemplo, a suspeita sobre o agente etiológico devido à ausência de testes de triagem ou panfúngicos e pequenas quantidades de material genético fúngico de amostras clínicas.

Vale ressaltar que é fundamental que sejam realizados diagnósticos diferenciais para melhor compreensão da doença e um diagnóstico mais precoce e visando a um desfecho clínico mais favorável.

REFERÊNCIAS

1. Mendes RP, Cavalcante R de S, Marques SA, et al. Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. *Open Microbiol J*. 2017;11(1):224-282. doi:10.2174/1874285801711010224
2. Martinez R. New Trends in Paracoccidioidomycosis Epidemiology. *J Fungi*. 2017;3(1):1. doi:10.3390/jof3010001
3. Lutz A. Uma Micose Pseudococcídica Localizada Na Boca e Observada No Brasil. *Contribuição Ao Conhecimento Das Hifoblastomicoses Americanas*. Vol 1.; 1980.
4. Teixeira MM, Theodoro RC, Nino-Vega G, Bagagli E, Felipe MSS. Paracoccidioides Species Complex: Ecology, Phylogeny, Sexual Reproduction, and Virulence. Heitman J, ed. *PLoS Pathog*. 2014;10(10):e1004397. doi:10.1371/journal.ppat.1004397
5. Lacaz LC. Paracoccidioidomicose. (Ltda SE de LM, ed.). São Paulo: Tratado de Micologia Médica; 2002.
6. Bagagli E, Franco M, Bosco SDMG, Hebelbarbosa F, Trínca LA, Montenegro MR. High frequency of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in armadillos (*Dasypus novemcinctus*): an ecological study. *Med Mycol*. 2003;41(3):217-223. doi:10.1080/13693780310001597368
7. Buccheri R, Khoury Z, Barata LCB, Bernard G. Incubation Period and Early Natural History Events of the Acute Form of Paracoccidioidomycosis: Lessons from Patients with a Single *Paracoccidioides* spp. Exposure. *Mycopathologia*. 2016;181(5-6):435-439. doi:10.1007/s11046-015-9976-0
8. Shikanai-Yasuda MA, Mendes RP, Colombo AL, et al. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2017;50(5):715-740. doi:10.1590/0037-8682-0230-2017
9. Bellissimo-Rodrigues F, Bollela VR, Da Fonseca BAL, Martinez R. Endemic paracoccidioidomycosis: relationship between clinical presentation and patients' demographic features. *Med Mycol*. 2013;51(3):313-318. doi:10.3109/13693786.2012.714529
10. Barrozo LV, Bernard G, Silva MES, Bagagli E, Marques SA, Mendes RP. First Description of a Cluster of Acute/Subacute Paracoccidioidomycosis Cases and Its Association with a Climatic Anomaly. Carvalho MS, ed. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(3):e643. doi:10.1371/journal.pntd.0000643
11. Barbosa W, Daher R, Oliveira AR de. Forma linfático-abdominal da blastomicose sul-americana. *Rev Inst Med Trop*. 1968;10(1):16-27.
12. Coutinho ZF, Wanke B, Travassos C, Oliveira RM, Xavier DR, Coimbra CEA. Hospital morbidity due to paracoccidioidomycosis in Brazil (1998-2006). *Trop Med Int Heal*. 2015;20(5):673-680. doi:10.1111/tmi.12472
13. Shikanai-Yasuda MA, Bernard G, Higaki Y, et al. Randomized trial with itraconazole, cetoconazol and sulfadiazine in paracoccidioidomycosis. *Med Mycol*. 2002;40(4):411-417. doi:10.1080/mmy.40.4.411.417
14. Roberto TN, Rodrigues AM, Hahn RC, de Camargo ZP. Identifying *Paracoccidioides* phylogenetic species by PCR-RFLP

- of the alpha-tubulin gene. *Med Mycol.* 2016;54(3):240-247. doi:10.1093/mmy/myv083
15. Moreto TC, Marques MEA, de Oliveira MLSC, Moris DV, de Carvalho LR, Mendes RP. Accuracy of routine diagnostic tests used in paracoccidioidomycosis patients at a university hospital. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2011;105(8):473-478. doi:10.1016/j.trstmh.2011.03.001
 16. Sylvestre TF, Silva LRF, Cavalcante R de S, et al. Prevalence and Serological Diagnosis of Relapse in Paracoccidioidomycosis Patients. *Vinetz JM, ed. PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(5): e2834. doi: 10.1371/journal.pntd.0002834
 17. de Arruda JAA, Schuch LF, Abreu LG, et al. A multicentre study of oral paracoccidioidomycosis: Analysis of 320 cases and literature review. *Oral Dis.* 2018;24(8):1492-1502. doi:10.1111/odi.12925
 18. Vidal MSM, Del Negro GMB, Vicentini AP, et al. Serological Diagnosis of Paracoccidioidomycosis: High Rate of Inter-laboratorial Variability among Medical Mycology Reference Centers. *Vinetz JM, ed. PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(9):e3174. doi:10.1371/journal.pntd.0003174
 19. Teixeira MDM, Theodoro RC, Oliveira FFM De et al. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. *Med Mycol.* June 2013:1-10. doi:10.3109/13693786.2013.794311
 20. Theodoro RC, Teixeira M de M, Felipe MSS, et al. Genus *Paracoccidioides*: Species Recognition and Biogeographic Aspects. *Chaturvedi V, ed. PLoS One.* 2012;7(5):e37694. doi: 10.1371/journal.pone.0037694
 21. Teles FRR, Martins ML. Laboratorial diagnosis of paracoccidioidomycosis and new insights for the future of fungal diagnosis. *Talanta.* 2011;85(5):2254-2264. doi:10.1016/j.talanta.2011.07.099
 22. San-Blas G, Niño-Vega G, Barreto L, et al. Primers for Clinical Detection of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol.* 2005;43(8):4255-4257. doi:10.1128/JCM.43.8.4255-4257.2005
 23. Dias L, de Carvalho LF, Romano CC. Application of PCR in Serum Samples for Diagnosis of Paracoccidioidomycosis in the Southern Bahia-Brazil. *Hotez PJ, ed. PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(11):e1909. doi: 10.1371/journal.pntd.0001909
 24. Buitrago MJ, Merino P, Puente S, et al. Utility of Real-time PCR for the detection of *Paracoccidioides brasiliensis* DNA in the diagnosis of imported paracoccidioidomycosis. *Med Mycol.* 2009;47(8):879-882. doi:10.3109/13693780802713208
 25. Buitrago MJ, Bernal-Martínez L, Castelli M V., Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Histoplasmosis and Paracoccidioidomycosis in a Non-Endemic Area: A Review of Cases and Diagnosis. *J Travel Med.* 2011;18(1):26-33. doi:10.1111/j.1708-8305.2010.00477.x
 26. Alanio A, Bretagne S. Difficulties with molecular diagnostic tests for mould and yeast infections: where do we stand? *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20:36-41. doi:10.1111/1469-0691.12617
 27. Ginarte M, Pereiro M, Toribio J. Imported paracoccidioidomycosis in Spain. *Fallbericht: Importierte Paracoccidioidomykose. Mycoses.* 2003;46(9-10):407-411. doi:10.1046/j.0933-7407.2003.00914.x
 28. Pinheiro BG, Hahn RC, Camargo ZP de, Rodrigues AM. Molecular Tools for Detection and Identification of *Paracoccidioides* Species: Current Status and Future Perspectives. *J Fungi.* 2020;6(4):293. doi:10.3390/jof6040293

A responsabilidade de conceitos emitidos e de todos os artigos publicados caberá inteiramente aos autores.

Da mesma forma os autores serão responsáveis também pelas imagens, fotos e ilustrações inclusas no trabalho a ser publicado.