

**DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVO PARA AUXÍLIO DA TÉCNICA DE
IMUNODIFUSÃO RADIAL DUPLA PARA O DIAGNÓSTICO DE
PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

***DEVELOPMENT OF A DEVICE TO ASSIST DUAL RADIAL IMMUNODIFUSION
TECHNIQUES FOR THE DIAGNOSIS OF PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS***

Diego André Rodrigues

Graduando em Tecnologia em Sistemas Biomédicos pela Fatec Bauru

E-mail: diegoandrerodrigues@gmail.com

Marcos Alexandre de Andrade

Graduando em Tecnologia em Sistemas Biomédicos pela Fatec Bauru

E-mail:marcosalexandre.br@gmail.com

Adriana Sierra Assencio Almeida Barbosa

Orientadora. Docente no curso de Tecnologia em Sistemas Biomédicos na Fatec
Bauru

E-mail: adriana.barbosa@fatec.sp.gov.br

RESUMO:

A Paracoccidioidomicose é uma micose sistêmica, causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*). A doença é endêmica na América Latina e muito comum no Brasil, a grande maioria dos casos estão concentrados na região Sudeste e Sul. A contaminação ocorre quando as pessoas entram em contato através da inalação dos esporos do fungo. O diagnóstico da doença pode ser realizado pelo exame micológico direto, radiológico, histopatológico e sorológico. Dos exames sorológicos, a imunodifusão radial dupla é uma das técnicas com grande assertividade no diagnóstico. A fim de auxiliar no diagnóstico da referida doença, o presente estudo buscou desenvolver um dispositivo para facilitar a realização da técnica de imunodifusão radial dupla. Para construção do dispositivo, foram utilizados pequenos tubos de inox e placas de acrílico com as furações nas medidas necessárias. O resultado alcançado foi a construção do dispositivo com baixo custo e material durável. Obteve-se como conclusão, o desenvolvimento do dispositivo de material duradouro e de baixo custo, para que seja essencial no desenvolvimento no diagnóstico da Paracoccidioidomicose através da realização da técnica de imunodifusão radial dupla.

Palavras-chave: Paracoccidioidomicose. Imunodifusão Radial Dupla. Diagnóstico.

ABSTRACT:

Paracoccidioidomycosis is a systemic mycosis, caused by the fungus Paracoccidioides brasiliensis (P. brasiliensis). The disease is endemic in Latin America and very common in Brazil, the vast majority of cases are concentrated in the Southeast and South. Contamination occurs when people come into contact through inhalation of the fungus spores. The diagnosis of the disease can be made by direct mycological, radiological and immunological examination. Of the immunological exams, double radial immunodiffusion is one of the techniques with great assertiveness in the diagnosis. In order to assist in the diagnosis of this disease, the present study sought to develop a device to facilitate the performance of the double radial immunodiffusion technique. For the construction of the device, small stainless steel tubes and acrylic plates were used with the holes in the necessary measures. The result achieved was the construction of the device. As a conclusion, it was obtained the development of a durable and low cost material device, to be used in the diagnosis of Paracoccidioidomycosis through the realization of the double radial immunodiffusion technique.

Keywords: *Paracoccidioidomycosis. Dual Radial Immunodiffusion. Diagnosis.*

1 INTRODUÇÃO

A Paracoccidioidomicose (PCM) é causada por fungos *Paracoccidioides brasiliensis (P. brasiliensis)*. A doença é predominantemente encontrada na América do Sul, especialmente no Sudeste e Sul do Brasil, na Argentina e no Paraguai. É muito comum em pessoas do sexo masculino e em idade produtiva geralmente lavradores e trabalhadores rurais, onde são contaminados por inalação de partículas do fungo no trabalho nas áreas rurais. (Andrade et al, 2019)

A doença foi descoberta por Adolfo Lutz no ano de 1908, foi caracterizada por apresentar lesões nas mucosas da gengiva, úlceras, pode ainda causar tosse e escarro. Como a Paracoccidioidomicose é uma doença sistêmica, pode ser desenvolvida em todos os órgãos, por esse motivo necessita do diagnóstico preciso, pois o tratamento dura por 2 anos. (Restrepo et al, 2009)

Por ser uma doença de que não necessita de notificação compulsória, o número correto de casos nacionais ou internacionais são incertos. Um grande problema para detecção da doença é a solicitação de exames específicos para o diagnóstico, quanto mais cedo o diagnóstico melhor será o prognóstico do paciente, o diagnóstico tardio pode levar a morte do indivíduo. (Marchiori et al, 2011)

O diagnóstico da doença pode ser realizado pelo exame micológico direto, radiológico, histopatológico e sorológico. Dos exames sorológicos, a imunodifusão radial dupla é uma das técnicas com grande assertividade no diagnóstico, possuindo sensibilidade de 90% e especificidade de 100%. A reação de imunodifusão é hoje vista como o principal método de diagnóstico sorológico da Paracoccidioidomicose. (Mendes et al, 2017)

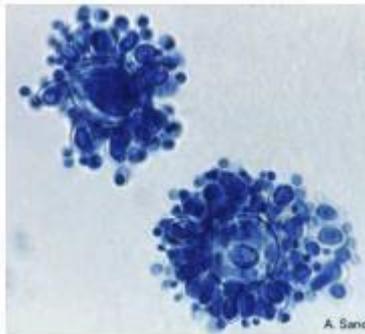
O Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP, realiza o diagnóstico da Paracoccidioidomicose através da técnica de imunodifusão radial dupla. A fim de

auxiliar o Instituto no diagnóstico da referida doença, o presente estudo buscou desenvolver um dispositivo para facilitar a realização da técnica de imunodifusão radial dupla.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

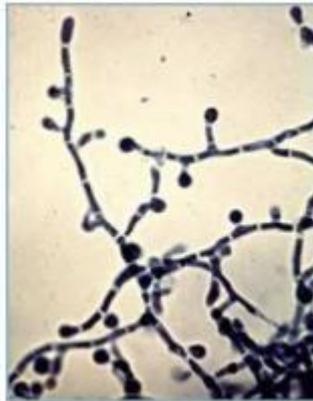
A Paracoccidioidomicose é uma micose sistêmica humana, cujo agente etiológico é o *Paracoccidioides brasiliensis*, fungo termodimórfico que promove uma doença inflamatória crônica granulomatosa, que é uma faz parte das Imunodeficiências Primárias e surge na grande maioria dos casos na infância. Ela consiste na incapacidade do organismo em combater infecções causadas por certos fungos e bactérias. Trata-se de um defeito hereditário no funcionamento dos glóbulos brancos, que são os responsáveis por combater os invasores do organismo. Em temperatura ambiente apresenta-se na fase filamentosa, sua forma infectante, que ocorre na natureza. Em tecidos humanos e em culturas mantidas a 37°C apresenta-se na fase leveduriforme, sua forma patogênica. (Teixeira et al., 2009) Abaixo a Figura 1 e 2 mostrando a forma infectante e leveduriforme.

Figura 1- *Paracoccidioides brasiliensis* no forma leveduriforme.



Fonte: Camargo et al., 2010.

Figura 2- *Paracoccidioides brasiliensis* no forma filamentosa.



Fonte: Camargo et al., 2010.

O contágio do hospedeiro ocorre mais frequentemente quando propágulos da fase micelial do fungo são inalados, instalando-se nos alvéolos pulmonares, onde se transformam em células leveduriformes, produzindo a infecção. O fungo pode, então, se disseminar por via hematogênica e, ou, linfática para qualquer parte do organismo. O fungo também pode instalar-se na pele e mucosas por inoculação traumática. (Cavalcante et al., 2009)

Como não é doença de notificação compulsória no Brasil, a real prevalência da PCM não pode ser calculada, porém nas áreas endêmicas, acredita-se na ocorrência de 3 casos por 100 mil habitantes. É considerada a terceira causa de morte por doença infecciosa crônica. (Castro et al., 2009)

Segundo Coutinho et al. (2002) estudaram 3181 óbitos por Paracoccidioidomicose no Brasil entre 1980 e 1995 e demonstraram a grande magnitude e a baixa visibilidade dessa micose, destacando que constituía a oitava causa de morte por doença predominantemente crônica ou repetitiva, entre as infecciosas e parasitárias, e a mais elevada taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas.

A PCM é observada principalmente em trabalhadores rurais adultos, do sexo masculino, em contato constante com a vegetação e solo, na faixa etária entre 30 e 59 anos. A predominância de homens em relação às mulheres afetadas pela PCM ocorre devido ao possível efeito protetor hormonal, este definido pela presença de receptores para estrógenos na parede do fungo. (Borges-Walmsley et al., 2012) O estrogênio retarda ou impede as transições micélio- levedura e conídio-levedura, necessárias para que o fungo atinja a fase patogênica, o que pode explicar o reduzido número de mulheres afetadas pela doença na idade adulta e a observação da mesma prevalência em ambos os sexos em pacientes com idade inferior a 13 anos. (Franco et al., 2015)

A classificação de forma clínica e gravidade é de acordo com sua história natural e condições clínicas do paciente nas formas aguda ou subaguda e crônica. As manifestações clínicas dependem da virulência da cepa infectante do *P. brasiliensis*, do grau e do tipo de resposta imunológica desencadeada, dos tecidos infectados e, especificamente, de características intrínsecas do seu hospedeiro. (Shikanai-Yasuda et al., 2017)

O tratamento das micoses sistêmicas é feito com antifúngicos sistêmicos, as drogas mais utilizadas no tratamento são o itraconazol e o cotrimoxazol. (Andrade et al., 2019)

O diagnóstico etiológico se baseia na achado de *P. brasiliensis* nas espécimes clínicos. O exame direto realizado ao microscópio óptico (micológico direto) permite a identificação do fungo devido à sua morfologia. (Mendes et al., 2017)

O exame histopatológico de amostra de tecidos evidencia a parede espessa e birrefringente do fungo, assim como o aspecto típico de multibrotamento, que pode ser visualizado através da coloração de Hematoxilina-eosina (HE). Além disso, o fungo pode ser identificado através do seu cultivo em meios como o ágar Micosel e Sabouraud. O crescimento do fungo é lento, em geral, demora de 15 a 20 dias para formar colônias aparentes no meio de cultura. Por esta demora no resultado, a cultura tem sido pouco utilizada como método para confirmação diagnóstica. (Franco et al., 2015)

Os exames sorológicos específicos têm importância no auxílio diagnóstico, como também avaliam a resposta ao tratamento e as recidivas da doença. As técnicas sorológicas disponíveis para o diagnóstico são a imunodifusão radial dupla, imunofluorescência indireta, contra-imunoeletroforese, ELISA e immunoblotting. (Castro et al., 2013)

A imunodifusão radial dupla foi primeiramente utilizada no diagnóstico da PCM e permanece como método de escolha, empregado rotineiramente pelos laboratórios clínicos devido ao seu fácil procedimento, baixo custo operacional, com alta sensibilidade e especificidade. Além disso, esta técnica consente que os clínicos realizem o acompanhamento sorológico dos pacientes, verificando a quantificação dos títulos de anticorpos, permitindo também avaliar a eficácia da terapia antifúngica. (Restrepo et al., 2009)

Del Negro et al., em 1999 calcularam a sensibilidade, especificidade e eficiência da IDD de grupos de pacientes (entre indivíduos saudáveis e doentes) e chegaram a uma sensibilidade de 91,3% e especificidade de 100%. Comparando com testes como a fixação do complemento, a imunodifusão radial dupla se mostrou superior em relação a sensibilidade e especificidade.

A imunodifusão radial dupla é um método de teste imunológico, que é utilizado no Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, é referência no tratamento em doenças dermatológicas utiliza essa técnica para o diagnóstico da Paracoccidioidomicose. Esse teste é muito utilizado por ter um baixo custo, facilidade de aplicação e grande sensibilidade que chega próximo dos 90%. (Cavalcante et al., 2014)

A imunodifusão radial dupla consiste na realização do teste utilizando lâminas de microscopia revestidas com uma fina camada de ágar. Após secagem em estufa da lâmina, o antígeno Pb182 é colocado nos orifícios centrais de cada lâmina e a amostra do soro diluído do paciente é inserida nos orifícios laterais. Sempre será utilizada com um controle positivo para garantir a qualidade do exame, como pode ser visualizado na Figura 3.

Figura 3- Desenho da lâmina utilizada na técnica de imunodifusão radial dupla.



Cor vermelha: controle positivo. Cor amarela: antígeno Pb182. Fonte: Castro et al., 2013.

3 MATERIAIS E MÉTODO

O dispositivo foi desenvolvido com o objetivo de auxiliar na realização do diagnóstico mais preciso da Paracoccidioidomicose com exame de imunodifusão

Radial Dupla, onde é necessária a realização de 7 orifícios no Ágar, sendo um orifício central e os outros 6 dispostos de maneira simétrica na lâmina.

Para construção do dispositivo, foi realizada uma pesquisa junto aos profissionais que realizam o exame e levantadas as informações necessárias para a construção do protótipo.

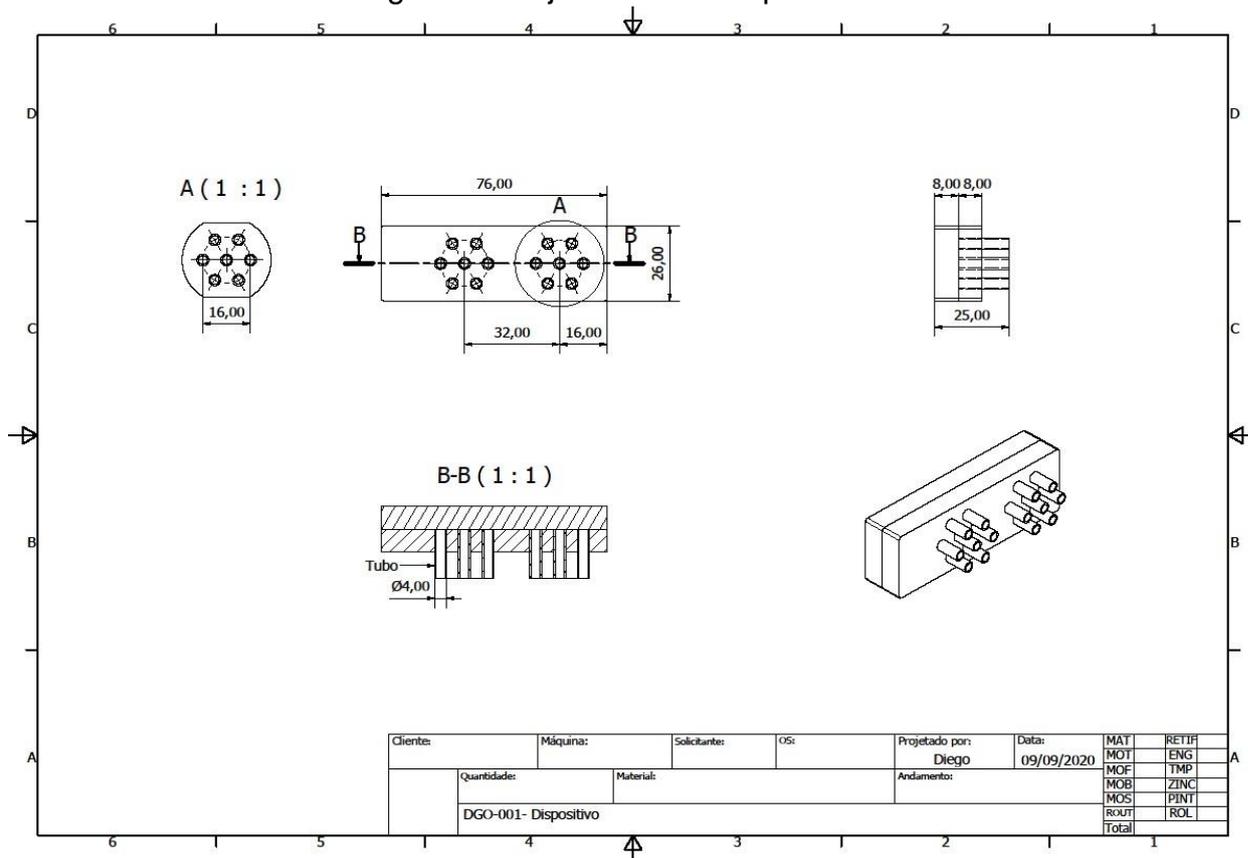
No desenvolvimento foram utilizadas 2 placas de acrílico com 6mm de espessura (1 placa com 14 furos simétricos para o melhor posicionamento das marcações no ágar e a outra placa sem furos) e 14 tubos de inox com 5mm de diâmetro. Foram tomados todos os cuidados necessários na escolha dos materiais, pois precisam ser higienizados com frequência, assim evitando contaminação cruzada.

O dispositivo precisava ter as medidas da lâmina microscópica e ainda um certo conforto no seu manuseio para o profissional.

Após o esboço do dispositivo foi construído um protótipo com materiais que tinha disponível para ajustes das medidas e um melhor aproveitamento.

Na Figura 4 consta o projeto do dispositivo desenvolvido no programa AutoCad.

Figura 4- Projeto final do dispositivo

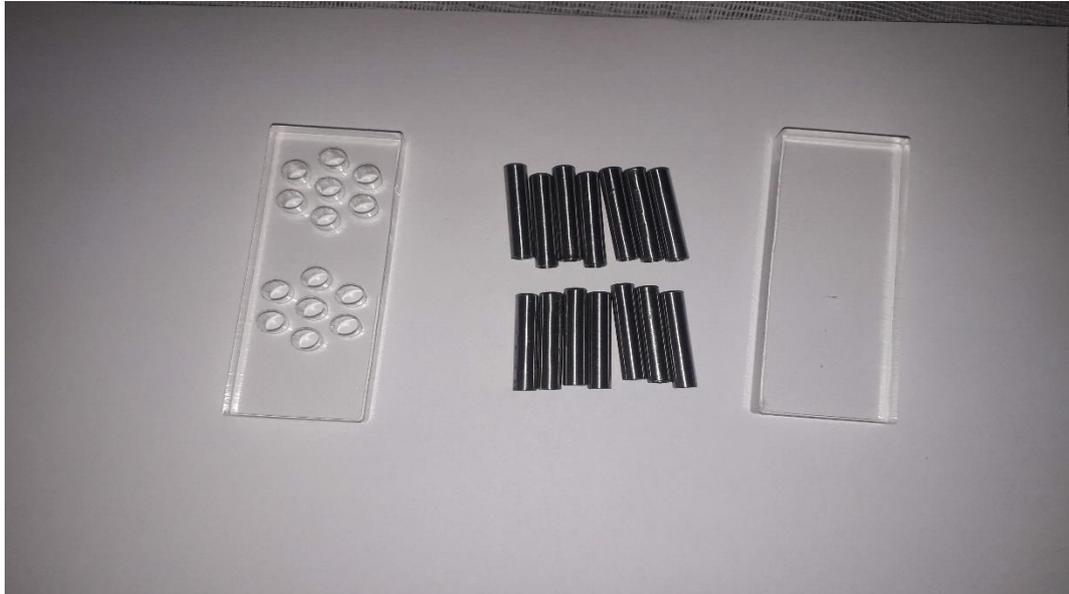


Fonte: Arquivo pessoal.

Após a definição das medidas finais e dos materiais que seriam utilizados para a construção do dispositivo o desenho do projeto foi finalizado. Com o projeto finalizado foi necessária a usinagem das peças que seriam utilizadas na montagem do dispositivo.

A Figura 5 mostra materiais que foram utilizados na montagem do dispositivo.

Figura 5 – Materiais utilizados na montagem do dispositivo.



Fonte: Arquivo pessoal.

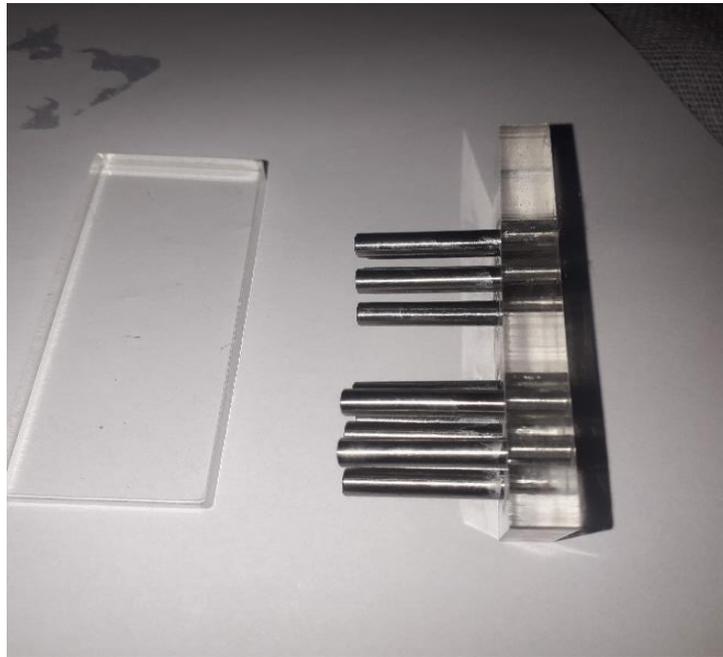
As Figuras 6 e 7 revelam as imagens do dispositivo sendo montado.

Figura 6 – Montagem do dispositivo



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 7 – Montagem do dispositivo



Fonte: Arquivo pessoal

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como resultado do presente estudo, obteve-se um equipamento inovador, de simples utilização e inexistente no mercado, produzido com o intuito de facilitar o trabalho dos profissionais do Instituto Lauro de Souza Lima na utilização da técnica de imunodifusão radial dupla no diagnóstico de Paracoccidioidomicose. As Figuras 8, 9 e 10 revelam o dispositivo finalizado.

Figura 8- Dispositivo finalizado.



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 9- Dispositivo finalizado



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 10- Dispositivo finalizado



Fonte: Arquivo pessoal

Com a utilização do dispositivo para o diagnóstico de Paracoccidiodomicose a preparação da lâmina para o exame ficará muito simples, podendo deixar a aplicação da técnica mais rápida.

A identificação do agente etiológico é fundamental para o melhor manejo das doenças infecciosas. Diagnóstico sorológico é utilizado como uma importante ferramenta para os médicos. Além disso, a sorologia pode informar ao médico sobre o prognóstico da doença, auxiliando na avaliação da evolução do tratamento. (Cavalcante et al., 2014)

Nos últimos anos, a imunodifusão radial dupla tem sido a primeira escolha para diagnóstico inicial de casos suspeitos de PCM, uma vez que apresenta simplicidade na execução, não necessidade de equipamentos de maior custo, além de alta sensibilidade e especificidade. (Franco et al., 2015)

5 CONCLUSÃO

A PCM é uma doença de grande impacto na saúde pública dos países e por isso, o diagnóstico é de grande importância para a comunidade científica. A principal técnica sorológica aplicada para o diagnóstico é a imunodifusão radial dupla. Com a construção do dispositivo proposto, contribuimos com os profissionais do Instituto Lauro de Souza Lima na utilização da técnica de imunodifusão radial dupla para o diagnóstico de Paracoccidiodomicose. O dispositivo foi desenvolvido de material duradouro e de baixo custo, para que seja essencial no desenvolvimento da técnica referida. A melhoria do diagnóstico auxilia os médicos na assertividade do tratamento, melhorando o prognóstico do paciente, aumentando a qualidade de vida dos pacientes.

6 REFERÊNCIAS

ANDRADE UV, OLIVEIRA SMDVL, CHANG MR, PEREIRA EF, MARQUES APDC, CARVALHO LR, MENDES RP, PANIAGO AMM. **Treatment compliance of patients with paracoccidioidomycosis in Central-West Brazil.** J Bras Pneumol. 2019; 45(2):e20180167.

BORGES - WALMSLEY MI, CHEN D, SHU X, WALMSLEY AR. **The pathobiology of Paracoccidioides brasiliensis.** Microbiologia 2012; 10(2): 80-7.

CASTRO LF, FERREIRA MC, DA SILVA RM, BLOTTA MH DE SL, LONGUI LN, MAMONI RL. **Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis.** J Infect 2013; 67(5): 470-85.

CAMARGO ZP, FRANCO MF. **Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis.** Rev Iberoam Micol. 2010; 17:41-48.

CAVALCANTE RS, SYLVESTRE TF, LEVORATO AD, DE CARVALHO LR, MENDES RP. **Comparison between Itraconazole and Cotrimoxazole in the Treatment of Paracoccidioidomycosis.** PLoS Negl Trop Dis 2014; 8(4): e2793. doi: 10.1371/journal.pntd.0002793.

COUTINHO Z F, SILVA D, LAZÉRA M, PETRI V, OLIVEIRA R M, SABROZA P C, ET AL. **Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995).** Cad Saúde Pública. 2002; 18(5): 1441-54.

DEL NEGRO GMB, PEREIRA CN, ANDRADE HF, PALACIOS SA, CECILIA MMSV, BENARD G. **Evaluation of tests for antibody response en the follow-up of aptients with acute and chronic forms of paracoccidioidomycosis.** Journal Med Microbiol. 1999; 49:37-46.

FRANCO M, BAGAGLI E, SCAPOLIO S, LACAZ CS. **A critical analysis of isolation of Paracoccidioides brasiliensis from soil.** Med Mycol 2015; 38: 185 – 91.

MARCHIORI E, VALIANTE PM, MANO CM, ZANETTI G, ESCUISSATO DL, SOUZA AS JR, CAPONE D. **Paracoccidioidomycosis: high-resolution computed tomography-pathologic correlation.** Eur J Radiol. 2011; 77(1):80-4.

MENDES RP, CAVALCANTE RS, MARQUES SA, MARQUES MEA, VENTURINI J, SYLVESTRE TF, PANIAGO AMM, PEREIRA AC, DA SILVA JF, FABRO AT, BOSCO SMG, BAGAGLI E, HAHN RC, LEVORATO AD. **Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil.** Open Microbiol J. 2017; 11:224-282.

RESTREPO A. **Morphological aspects of Paracoccidioides brasiliensis in lumph nodes: implications for the prolonged latency of Paracoccidioidomycosis?** Med Mycol. 2009; 38: 317-22.

SHIKANAI-YASUDA MA, MENDES RP, COLOMBO AL, QUEIROZ-TELLES F, KONO ASG, PANIAGO AM, NATHAN A, VALLE ACFD, BAGAGLI E, BERNARD G, FERREIRA MS, TEIXEIRA MM, SILVA-VERGARA ML, PEREIRA RM, CAVALCANTE RS, HAHN R, DURLACHER RR, KHOURY Z, CAMARGO ZP, MORETTI ML, MARTINEZ R. **Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis.** Rev Soc Bras Med Trop. 2017; 50(5):715-740.

TEIXEIRA M M, THEODORO R C, CARVALHO M J A, FERNANDES L, PAES H C, HAHN R C, MENDOZA L, BAGAGLI E, SAN-BLAS G, FELIPE M S S. **Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the Paracoccidioides genus molecular phylogenetics and evolution.** Elsevier. 2009; 52: 273-283.