



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DEL NORDESTE



FACULTAD
DE MEDICINA

Maestría en Micología Médica

**Estudio sero-epidemiológico de anticuerpos de
Paracoccidioides brasiliensis
en pacientes con cuadros pulmonares en Paraguay**

Maestrando

Juana M. Ortellado de Canese

Director

Dr. Gustavo Giusiano

Año 2017

Para Andrés, Nicolás y Alejandro

Agradecimientos

Al Profesor Gustavo Giusiano, director de la tesis por sus aportes y conocimientos para la elaboración de este trabajo final de años de aprendizaje, estudios y amistad.

A María Emilia Cattana por todo su apoyo, tanto por sus consejos para el trabajo, así como por la amabilidad de acogernos en su hogar.

A todo el personal del Instituto de Medicina Regional de la Universidad Nacional del Nordeste en Resistencia, por el aporte técnico y de materiales. En especial, Florencia, Tina y Liliana.

A Beatriz Soilán por su apoyo con los pacientes del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y del Ambiente de Asunción.

A Amelia por compartir viajes y trabajo.

Muchas gracias

Tabla de contenido

RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	7
Paracoccidioidomicosis (PCM)	7
Historia de la paracoccidioidomicosis en América	8
Sistemática y Filogenia del género PARACOCCIDIOIDES	8
Paracoccidioides brasiliensis	9
Paracoccidioides lutzii.....	9
Dimorfismo	10
Hábitat. Ecología	11
Asociación del clima con la patología.....	14
Epidemiología	15
PCM en Paraguay	15
Justificación del tema	19
Objetivos.....	20
Objetivo general.....	20
Objetivos específicos	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
RESULTADOS	25
A) De la población estudiada	25
B) De los casos de PCM.....	29
C) Evaluación de la prueba diagnóstica. Análisis de la prueba serológica de IDD para diagnóstico de PCM en la población estudiada.....	31
DISCUSIÓN	32
CONCLUSIONES.....	38
BIBLIOGRAFIA	39

RESUMEN

La paracoccidioidomicosis (PCM) es una infección sistémica endémica de América Latina, causada por los hongos termodimórficos *Paracoccidioides brasiliensis* y *Paracoccidioides lutzii*. La infección se adquiere por inhalación de sus propágulos de dispersión (conidios o trozos de hifas) que llegan a los pulmones y desde donde pueden diseminarse. A pesar de que la infección suele ser subclínica, la enfermedad se presenta con formas crónicas y severas hasta procesos diseminados graves que pueden llevar a la muerte en todos los casos. El diagnóstico es clínico, microbiológico y serológico (por detección de anticuerpos).

La incidencia real en el Paraguay no se conoce y hay pocos casos registrados. El objetivo de este estudio fue conocer la prevalencia de la PCM y sus características epidemiológicas en una población con patología pulmonar en Paraguay y demostrar la utilidad de la búsqueda sistemática de anticuerpos anti-*Paracoccidioides* en pacientes con patologías pulmonares crónicas en el área endémica.

Entre julio y octubre de 2014, se analizaron sueros de 508 pacientes que acudieron al centro de referencia de enfermedades pulmonares de Paraguay (INERAM) utilizando la técnica de inmunodifusión doble de Ouchterlony (IDD). Se obtuvo reacción de identidad en 5 de 8 casos de PCM diagnosticados por microscopia. La sensibilidad de esta prueba fue del 63 %, 100 % de especificidad y valores predictivos positivos 100% y negativos 99,5%. La falta de reactividad en 3 casos enfatizan la importancia de considerar el origen geográfico de los mismos y la necesidad de implementar estudios epidemiológicos moleculares para conocer las especies de *Paracoccidioides* circulantes en el Paraguay, ya que los sueros de estos pacientes podrían no ser capaces de precipitar el antígeno de la cepa de referencia Pb339.

Todos los casos positivos para PCM fueron del sexo masculino, con edades entre 19 a 60 años, oriundos de zonas subtropicales de la Región Oriental del Paraguay. Se observó asociación significativa ($p < 0,05$) entre los casos de PCM - alcoholismo y PCM - tabaquismo.

La IDD es una técnica sencilla, de fácil montaje y con bajo costo operativo cuya incorporación en la sistemática de diagnóstico servirá de herramienta para la detección de esta micosis endémica, evitando diagnósticos tardíos con las correspondientes consecuencias, ya que muchas veces es subdiagnosticada. Su implementación y evaluación como herramienta de diagnóstico aportará al conocimiento de la epidemiología de la PCM en Paraguay.

INTRODUCCIÓN

Las micosis sistémicas endémicas han aumentado su incidencia en la misma proporción en que se ha incrementado el número de centros capacitados para el diagnóstico (1). Estas micosis están limitadas a zonas o ámbitos geográficos determinados y entre ellas se cuentan, la coccidioidomicosis presente en zonas semidesérticas de América, la histoplasmosis distribuida en todo el continente americano y algunas regiones tropicales del mundo, la paracoccidioidomicosis (PCM) en regiones tropicales y subtropicales de América Central y del Sur y, por último, la blastomicosis en climas templados de América del Norte y Central y África del Este. Todas ellas tienen una patogénesis similar en la que el agente causal ingresa por vía inhalatoria (2–4).

Paracoccidioidomicosis (PCM)

Sinonimia: Granuloma paracoccidioidal, blastomicosis sudamericana, blastomicosis brasileña, enfermedad de Lutz, enfermedad de Lutz-Splendore-Almeida, blastomicosis latinoamericana (5–7). Es una micosis sistémica granulomatosa, causada por hongos termodimorfos, saprófitos de suelos, patógenos primarios, denominados *Paracoccidioides brasiliensis* y *Paracoccidioides lutzii* (2). La PCM, es endémica de América Latina con una mayor prevalencia en poblaciones de zonas rurales donde es la causa más alta de mortalidad entre las micosis sistémicas (8). Aunque esta enfermedad puede ser mortal, no es de informe obligatorio en la mayoría de los países, por lo que su frecuencia real se desconoce.

Historia de la paracoccidioidomicosis en América

En la historia de la PCM, los nombres de Adolpho Lutz (1855-1940), Alfonso Splendore (1871-1953) y Floriano Paulo de Almeida (1898-1977) tienen los trabajos fundamentales sobre esta infección. Moses, en 1916, practicó las primeras pruebas inmunológicas, Fonseca y Leao produjeron el primer antígeno para uso intradérmico (9,10). Desde 1930 en adelante, aumenta la literatura pertinente sobre la enfermedad, con importantes y significativos eventos. Se profundiza en la parte experimental e inmunológica y aparecen drogas para el tratamiento (11). Se han realizado varias encuestas en países de América Latina. Se publicaron revisiones sobre la PCM por Restrepo, Padilla-Goncalvez y Franco y col (11). El hongo ha sido aislado de la naturaleza por primera vez en 1966, por Ricardo Negróni en Argentina (11). En los últimos años, Teixeira y colaboradores hicieron revisiones taxonómicas del género *Paracoccidioides* basada en métodos moleculares de secuenciación (3,7,12,13).

Sistemática y Filogenia del género *PARACOCCIDIOIDES*

Los estudios filogenéticos del género *Paracoccidioides* lo ubican en el clado relacionado con la familia *Ajellomycetaceae* (*Ascomycetes*), Orden *Onygenales*, que incluye los géneros *Blastomyces*, *Histoplasma* y *Emmonsia*, con los que comparte un ancestro común, *Lacazia loboi*. No tiene fase teleomorfa (sexuada) conocida (7).

Paracoccidioides fue descrito primeramente por Almeida en 1930 y, durante 75 años, se consideró al género integrado por una sola especie, *P. brasiliensis* (14). Sin embargo, algunos factores sugirieron que *Paracoccidioides* podría estar compuesto por varios grupos. Primero, su amplia distribución geográfica que se extiende desde México hasta Argentina, lo que podría permitir una población estructural o incluso especies alopátricas. Luego, la variabilidad genética demostrada por diferentes aislamientos de *Paracoccidioides* cuando se analizan mediante herramientas moleculares (12,13,15).

Paracoccidioides brasiliensis (Splend.) F.P. Almeida, (1930)

Sinonimia: (16)

Zymonema brasiliense Splendores, 1913;

Zymonema histoporocellularis Habersfeld, 1919;

Mycoderma brasiliensis Brumpt, 1922;

Monilia brasiliensis Vuillemin, 1922;

Proteomyces faverae Dodge, 1935;

Paracoccidioides tenuis Moore, 1938;

Coccidioides histopotocellularis Fonseca Filho, 1935;

Lutziomyces histoporocellularis Fonseca Filho, 1939;

Blastomyces brasiliensis Conant et Howel Jr., 1941;

Aleurisma brasiliensis Aroeira Neves et Bogliolo, 1951.

Actualmente, *Paracoccidioides* incluye dos especies: *Paracoccidioides brasiliensis* y *Paracoccidioides lutzii*.

P. brasiliensis comprende un complejo de, hasta el momento, cuatro especies crípticas diferentes (S1, PS2, PS3 y PS4). *P. brasiliensis* S1 es parafilética y de recombinación de especies, ampliamente distribuida en América del Sur, asociada con la mayoría de los casos (7,17). Se ha recuperado también de armadillos, de suelo y heces de pingüino (17,18) *P. brasiliensis* PS2 es monofilética y de recombinación de especies, hasta el momento, sólo se ha encontrado en Brasil y Venezuela. *P. brasiliensis* PS3 ha sido recuperada de humanos y armadillos en regiones endémicas de Colombia (17,19). *P. brasiliensis* PS4 se ha encontrado a partir de aislamientos clínicos en Venezuela (20).

Paracoccidioides lutzii. Teixeira, Bagagli, San-Blas et Felipe, (2010)

Inicialmente llamada PB 01-like, exhibe una gran divergencia genética con respecto al complejo *P. brasiliensis*. Se compone de una sola recombinación monofilética de una

población que, hasta el momento, solo ha sido informada en el centro y sudoeste de Brasil (regiones de Goias y Rondonia) y también en Ecuador. La evaluación morfológica de ambas especies muestra que los aislados de *P. lutzii* presentan conidios alargados que no se observaron en las especies del complejo *P. brasiliensis* (5,7,21).

En 2017, Turisini y colaboradores, con el uso de la taxonomía molecular llegaron a la identificación de más especies en el complejo de especies *brasiliensis*. Con esto son cinco especies propuestas de *Paracoccidioides* (*P. lutzii* y cuatro especies del complejo *brasiliensis*) que también parecen diferenciarse morfológicamente. Los rasgos morfológicos de la levadura son en gran parte, pero no completamente, predictivos de la identidad de la especie. Tomados en conjunto, los resultados de Turisini y colaboradores, indican que las especies filogenéticas de *Paracoccidioides* deben elevarse a especie taxonómica. Proponen restringir el uso de *P. brasiliensis* para S1 y adoptar convencionalmente los nombres *P. americana* para PS2, *P. restrepiensis* para PS3 y *P. venezuelensis* para PS4 (22).

Dimorfismo

El dimorfismo fúngico es el fenómeno reversible por el cual un hongo puede cambiar su morfología de una forma micelial a una levaduriforme y viceversa, según determinadas condiciones de temperatura o de nutrientes. Dentro de este grupo se encuentra *Paracoccidioides* y otros hongos productores de micosis endémicas (2,9).

A temperatura ambiente *Paracoccidioides* desarrolla su fase filamentosa o micelial (forma saprófita o infectante). En medios de cultivo no enriquecidos incubados a 28°C crece lentamente, en 3 a 4 semanas aparecen colonias blancas, plegadas y con surcos profundos. Microscópicamente se observa un micelio hialino, ramificado, tabicado de 2 a 3 µm de diámetro y microconidios esféricos de 10 a 12 µm de diámetro (6,23,24). Su fase levaduriforme (forma parasitaria) es el paso fundamental para el

establecimiento de la infección ya que la misma le permite proliferar en los tejidos. *Paracoccidioides* desarrolla como levadura en los tejidos infectados y en los cultivos con medios enriquecidos como agar-infusión cerebro y corazón con o sin sangre incubados a 37 °C. Las colonias se hacen visibles en 6 a 10 días, son plegadas, cerebriformes, pastosas y de color amarillo cremoso. Microscópicamente se presenta como células esféricas de 10 a 40 µm de diámetro, con una pared celular con una doble capa y múltiples brotaciones que se unen a la célula madre por un pedículo estrecho. En los casos más típicos los brotes rodean a la célula madre en forma de una corona completa (rueda de timón). Estas formas se observan en cultivos o en materiales clínicos (25–27).

Hábitat. Ecología

El nicho ecológico o ambiental del hongo permanece indefinido a pesar de los esfuerzos de varios grupos de investigación. El hábitat medioambiental más probable de la fase micelial de *Paracoccidioides* es el suelo donde se encuentran las estructuras infectantes (24). Ha sido descrito en cafetales y cañaverales. El descubrimiento del hongo en armadillos, en perros, en perezosos de dos dedos y hasta en momias del norte de Chile ha aportado más conocimientos, pero aun así deben seguir los esfuerzos (28–30). La ecología de *Paracoccidioides* y la relación con su huésped humano probablemente están relacionados con el pasado evolutivo del hongo. En los estudios filogeográficos, sólo dos cepas de *Paracoccidioides* han sido analizadas del Chaco paraguayo (20,28) .

Patogenia

El hombre se infecta por vía inhalatoria. Los propágulos fúngicos (conidios o trozos de hifas) de la forma micelial ingresan hasta el alvéolo pulmonar donde son fagocitados por macrófagos alveolares y allí, por efecto de la temperatura, se transforman en elementos levaduriformes que se reproducen activamente. La infección por inoculación

directa es un evento raro. Esta micosis no es transmisible de persona a persona, ni de los animales al hombre (31–33). Entre los factores de virulencia que se han identificado se cuentan: el α -1,3-glucano; la glucoproteína de 43 kDa, (antígeno dominante, ayuda a evadir los mecanismos defensivos del hospedero y que posee efectos proteolíticos sobre la elastina y la gelatina) y la melanina (interviene en la evasión de la fagocitosis). Su capacidad de crecer a 37°C facilita su desarrollo en el organismo de los animales susceptibles (34–36).

Formas clínicas de la Paracoccidioidomicosis

Una baja proporción de las personas infectadas desarrollan enfermedad. De acuerdo a las diferentes relaciones entre el hospedero y el hongo parásito, pueden presentarse diversas formas clínicas que incluyen desde la infección asintomática hasta procesos diseminados graves con el compromiso de varios órganos. Los pulmones están involucrados con frecuencia y las manifestaciones clínicas pulmonares deben diferenciarse de muchas otras enfermedades infecciosas y no infecciosas. El hombre parece ser resistente a la infección por *P. brasiliensis*, ya que la enfermedad es usualmente observada como casos aislados entre los miembros de una población que está en contacto directo con la naturaleza, especialmente agricultores y ganaderos (39).

Los factores favorecedores del desarrollo de una PCM son desnutrición, tabaquismo, alcoholismo y enfermedades subyacentes que cursan con inmunodeficiencia, sobre todo en personas que viven con el virus de la inmunodeficiencia humana/Sida (PVVS) (37,38).

Las formas clínicas de la PCM se basan en diferentes criterios: topografía de las lesiones, gravedad de la enfermedad, resultado de las pruebas serológicas, procedencia de zona endémica, etc.

Se reconocen tres formas clínicas de la PCM: (39,40)

1) Infección asintomática o latente, la cual es llamada **PCM infección**: La mayoría de las infecciones son asintomáticas o leves y no se diagnostican, habitualmente son autolimitadas y quedan como focos residuales pulmonares o ganglionares. La mayor parte de los habitantes de zonas endémicas se infecta en los primeros 10 a 20 años de la vida y no se observa diferencia en la frecuencia de la infección entre los sexos (41,42).

2) **Forma crónica del adulto**: es la más frecuente de las formas clínicas de PCM. Es progresiva, corresponde a más del 90 % de los pacientes y se presenta principalmente en adultos entre los 30 y 60 años.

La enfermedad ocurre como resultado de la reactivación de un foco quiescente con un promedio de latencia reportado de 15 años. El riesgo de que esto ocurra es cada vez mayor en el futuro debido al aumento de la prevalencia de inmunosupresión por drogas terapéuticas, cánceres o por la coinfección con VIH (38,43–45).

Con frecuencia se detectan antecedentes de tabaquismo y alcoholismo y, también, una dieta desequilibrada. Su inicio es lento y progresa silenciosamente, pudiendo pasar años antes de que sea diagnosticada. La manifestación puede ser unifocal, por ejemplo, en la mucosa orofaríngea o laríngea, o bien, afectar a más de un órgano simultáneamente: mucosas, piel, ganglios, pulmón y glándulas suprarrenales. El estado general del paciente se deteriora progresivamente, sufre astenia, pérdida de peso, anemia y finalmente puede ser mortal, sino es tratado (34,41).

3) **Forma aguda o subaguda tipo juvenil**: es la menos frecuente (3-10 % de los casos), afecta niños, adolescentes y adultos jóvenes, eventualmente se presenta en individuos hasta los 30 años de edad. Tiene un periodo de incubación corto, de semanas a meses. Puede desarrollar una patología focal o multifocal. Generalmente produce un rápido deterioro del estado general, con signos y síntomas de una infección grave (forma juvenil diseminada). La mortalidad es mayor que en la forma crónica (42,43,46–48).

Algunos consideran que la PCM no cura totalmente, sino que permanece latente y puede reactivarse en el futuro en función del estado inmunitario del huésped (38,49,50). La PCM puede presentarse asociada a otras enfermedades infecciosas y no infecciosas, entre las primeras se destaca la tuberculosis (TB) con porcentajes del 5 al 10 %, también se asocia con lepra, sida, leishmaniasis, enteroparasitosis, sífilis, mal de Chagas, otras micosis (candidiasis, histoplasmosis, criptococosis). Entre las patologías no infecciosas, figura la enfermedad de Hodgkin y carcinomas (47,51).

La posibilidad de que existan asociaciones de especies de *Paracoccidioides*, incluyendo especies crípticas, produciendo diferentes manifestaciones clínicas no debe descartarse y debe ser investigada (22). Además de las manifestaciones clínicas, los problemas dirigidos al tratamiento han sido planteados por *Hahn et al* (52).

Asociación del clima con la patología

Aunque los brotes de PCM no se han documentado, la distribución geográfica es heterogénea y se asocia con tasas moderadas a altas de precipitación, temperaturas suaves y suelos fértiles. Las zonas endémicas se caracterizan por veranos cálidos, lluviosos y prolongados y los inviernos cortos. El clima general cálido con una estación lluviosa, suelos de pH ácido, ricos en sustancias orgánicas con numerosos cursos de agua dulce y zonas boscosas, parecen definir el área del hábitat del *Paracoccidioides*. Esta micosis ha sido encontrada a nivel del mar y hasta 2.000 metros de altitud, la temperatura media anual varía entre 17 °C y 24 °C y los índices pluviométricos oscilan entre los 900 mm y los 2.500 mm anuales (53,54).

Anomalías climáticas, como las provocadas por el evento *El Niño*, se han asociado con un aumento de casos de PCM agudas en comparación con el número de casos esperados en el mismo período (55,56).

Epidemiología

Se considera que hay casi 10 millones de personas infectadas en el mundo con *Paracoccidioides*, aunque su frecuencia real se desconoce por ser una infección subclínica. El mayor número de casos se registra en Sudamérica, la mayoría en Brasil, seguido de Venezuela, Colombia, Ecuador y Argentina (42,43,57). Se han documentado cerca de 8.000 casos, 80 % provenientes de Brasil, en donde la tasa de incidencia anual es 10 a 30 infectados por millón de habitantes y la tasa media de mortalidad es de 1,4 por millón de habitantes por año, por lo que esta enfermedad es la mayor causa de mortalidad entre las micosis sistémicas de ese país (58). La PCM afecta a individuos de cualquier edad, raza y sexo, pero con franco predominio en hombres de 30 a 50 años de edad (59). La relación varón: mujer varía entre 14:1 y 70:1, según las diferentes zonas endémicas, favorecido por los niveles de beta-estradiol presentes en la mujer que inhiben la transformación de la fase filamentosa (infectante) a la fase levaduriforme (parasitaria) (7,14). El mayor número de casos se ha informado en trabajadores en zonas rurales, favorecido por la inhalación de aerosoles que contienen material fúngico durante la manipulación del suelo, pero es importante considerar que actualmente se han informado una serie de casos en zona urbanas o periurbanas (60).

PCM en Paraguay

En el Paraguay la primera referencia sobre la PCM fue hecha por Boggino, en 1935 quien la denominó Granuloma coccidioidico o enfermedad de Posadas, posteriormente cataloga este cuadro como Granuloma paracoccidioidico (61).

Desde 1936, Gatti y Boggino publican dos casos más, Chirife recopila 11, Castillo y Ramírez relatan 3 y Caballero presenta la localización pulmonar en 4 casos. En 1964, Maas agrega 22 casos nuevos de diferentes centros hospitalarios de nuestro país, siendo 4 del Sanatorio J. M. Boettner (actual INERAM) (61).

En 1969, Canese publica resultados de encuestas con una actualización de 38 nuevos casos, con una prevalencia total de 85 casos presentados, concluyendo que la PCM es una enfermedad bastante frecuente en nuestro medio. (61) Rolón, estudió en 10 años (1960/69) la incidencia de 48 casos en el Instituto de Anatomía Patológica de Asunción (62). En 1999, Silvero y colaboradores, publican sobre la experiencia en 24 casos de PCM entre 1995 y 1998 (63).

En el Hospital de Clínicas, Ortellado y colaboradores, hacen una revisión de 5 años (1995/2000) hallando 28 casos, observando un aumento de casos comparado con las primeras referencias nacionales, que hablaban de 50 casos en 30 años. González y colaboradores, hacen una revisión del 2005 al 2011 encontrando 16 pacientes con diagnóstico de PCM (0,02 % de frecuencia), representando el 44 % de las micosis profundas (64,65).

Revisando la literatura nacional, se encuentran aisladas presentaciones de casos clínicos y algunos trabajos de revisión como el de Pérez en el INERAM, pero aun así estos casos no reflejan las características epidemiológicas de la enfermedad en Paraguay (66–70).

Diagnóstico de la PCM

Los procesos sistémicos o invasores presentan una mayor problemática para el diagnóstico que los superficiales. El diagnóstico de las micosis sistémicas endémicas actualmente sigue abordándose desde cuatro puntos de vista: el diagnóstico clínico, microbiológico, histopatológico y el serológico o inmunológico. Los datos epidemiológicos también apoyan al diagnóstico (71–73).

El diagnóstico de laboratorio de la PCM puede dividirse en métodos directos e indirectos. Los primeros incluyen el examen micológico que permite la observación directa de las formas parasitarias típicas del hongo en los materiales clínicos y su recuperación a partir del cultivo. Los métodos indirectos ponen en evidencia la respuesta inmune específica y en algunos casos es la herramienta que permite llegar

a un diagnóstico más rápido. La utilidad de estos métodos diagnósticos depende de la especificidad y sensibilidad de la prueba (74,75).

En el futuro, el diagnóstico molecular, los *microarrays* y tecnologías más recientes de biosensores, junto a nuevas herramientas de la bionanotecnología, sin duda mejorarán el diagnóstico de la PCM y de otras micosis a través, de la detección biomolecular muy específica y sensible de patógenos (76).

Diagnóstico serológico

La inmunodifusión en agar (ID), la contrainmunolectroforésis (CIEF), la reacción de fijación del complemento (RFC) y el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), son las metodologías que han sido aplicadas para el diagnóstico de la PCM. Más del 90% de los pacientes con PCM evolutiva presentan anticuerpos específicos contra el hongo, demostrables por estas pruebas (77,78). Las glicoproteínas específicas de 43 kDa (gp43) y 70 kDa (gp70), son antígenos de *P. brasiliensis* que ha sido identificados, caracterizados y clonados. Las pruebas de ID y CIEF son las más utilizadas debido a su buena sensibilidad y alta especificidad, empleando la glicoproteína purificada de 43 kDa (gp43) como antígeno específico (79,80).

Los títulos de anticuerpos son proporcionales a la carga fúngica, por lo tanto, son más elevados en los casos graves y descienden durante el tratamiento exitoso y la convalecencia del paciente (81). Las pruebas serológicas tienen interés diagnóstico, pronóstico y de control sobre la eficacia del tratamiento (82–84). La ID es utilizada para estudiar la especificidad de reacciones de anticuerpos. La sensibilidad de los diferentes métodos de ID son de 10-50 µg/ml para la ID radial de Mancini, de 20-200 µg/ml para la inmunodifusión doble de Ouchterlony (IDD) y la Inmunolectroforésis (85). La IDD se ha empleado durante el último medio siglo para el diagnóstico serológico de rutina de PCM (51,86,87). También es utilizada como una herramienta en el diagnóstico de infecciones provocadas por otros agentes dimorfos, tales como, *Coccidioides*, *Histoplasma* y *Blastomyces* (14,82,88,89). El mejoramiento en la calidad

de los antígenos, convirtió a ésta en una metodología reproducible y específica para la investigación de patologías fúngicas en población inmunocompetente (74).

Justificación del tema

La región oriental de la República del Paraguay está incluida en la zona endémica de la PCM, es escasa la información sobre las características epidemiológicas que presenta y no hay estudios previos de seroprevalencia de la enfermedad.

El Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y del Medio Ambiente (INERAM), concentra pacientes con patologías pulmonares de la capital y de gran parte del interior del país. En Paraguay no se realizan estudios serológicos sistemáticos para diagnóstico diferencial. La implementación sistemática de un estudio seroepidemiológico de detección de anticuerpos específicos de *P. brasiliensis* en pacientes con enfermedades pulmonares podría brindar importante información sobre la prevalencia de la PCM y la comorbilidad de la misma con otras enfermedades en el país.

Siendo la PCM una enfermedad subdiagnosticada, la información obtenida de este estudio permitiría mejorar el conocimiento de su situación epidemiológica, aportar a la sistemática del diagnóstico diferencial y cambiar conductas o sustentar cambios en las políticas de salud pública en el Paraguay.

Objetivos

Objetivo general

Implementar el diagnóstico serológico de paracoccidioidomicosis en pacientes con patología pulmonar de Paraguay para conocer la prevalencia y sus características epidemiológicas. Demostrar la relevancia de su incorporación en la sistemática del diagnóstico.

Objetivos específicos

- 1.- Investigar la presencia de anticuerpos anti-*Paracoccidioides brasiliensis* en sueros de pacientes con cuadros pulmonares.
- 2.- Evaluar la correlación del diagnóstico serológico y el diagnóstico a través del examen micológico directo (observación microscópica de la levadura).
- 3.- Determinar la prevalencia de PCM y evaluar la coexistencia de esta micosis con otras patologías pulmonares.
- 4.- Analizar los factores de riesgo de los casos detectados.
- 5.- Evaluar la utilidad de la búsqueda sistemática de *Paracoccidioides brasiliensis* en pacientes con patologías pulmonares crónicas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Diseño:

a) Estudio epidemiológico de diseño transversal, observacional y descriptivo.

b) Evaluación de una prueba diagnóstica a través de la práctica clínica habitual.

Se evaluó la utilización de la prueba de IDD en el contexto clínico de una patología respiratoria como predictor de una PCM o de la asociación de ella con otras patologías.

2. Población de estudio:

Se estudiaron sueros de pacientes con dificultad respiratoria o con sintomatología de patologías pulmonares que acudieron al Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y del Ambiente (INERAM) “Prof. Dr. Juan Max Boettner”, del Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social del Paraguay. Esta institución atiende un promedio anual de 20.500 personas, se internan 2.500 pacientes y 13.500 son atendidos en salas de Neumología. El INERAM es el Centro de referencia para enfermedades pulmonares, por lo que las muestras son representativas de todos los Departamentos del Paraguay (90).

Población enfocada: pacientes mayores de 10 años con enfermedad pulmonar o dificultad respiratoria.

Población accesible: pacientes ambulatorios o internados atendidos durante los meses de julio a octubre de 2014 en el INERAM de Asunción, Paraguay.

Criterio de inclusión: Paciente con alguna sintomatología pulmonar o dificultad respiratoria.

Criterio de exclusión: Paciente cuyos datos de la ficha epidemiológica estaban incompletos, o bien, cuyo suero estaba hemolizado.

Definición de caso confirmado: paciente con dificultad respiratoria o enfermedad pulmonar con diagnóstico de PCM por microscopía.

3. Obtención y procesamiento de las muestras:

Las muestras de suero fueron obtenidas en el laboratorio del INERAM con el consentimiento del paciente. Posteriormente fueron remitidas al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Católica de Asunción (FCS-UCA) para su conservación y registro y verificación de los datos en las fichas epidemiológicas correspondientes. Los sueros fueron conservados a -20 °C y derivados, sin aditivos, al Departamento de Micología del Instituto de Medicina Regional (IMR) de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE), Resistencia, República Argentina, donde fueron procesados. Las muestras de materiales respiratorios (esputo, lavado bronco alveolar, etc.) y de otros orígenes fueron procesados en el laboratorio del INERAM.

4. Variables:

Variable predictora: prueba de IDD

Variable desenlace: resultado del examen microscopio directo de las muestras respiratorias o de otros orígenes provenientes de los pacientes, que se tomaron durante la estadía del mismo en el INERAM.

Variables epidemiológicas: Edad, sexo, procedencia.

Variables de factores de riesgo asociados con patología pulmonar de PCM: etilista, tabaquista, ocupación, pérdida de peso, persona que vive con el virus VIH/Sida (PVVs). Estas variables fueron registradas según referencia del paciente.

Otras variables registradas:

- Diagnóstico al ingreso y al egreso.
- Paciente con diagnóstico presuntivo o confirmado de PCM.
- Paciente con diagnóstico presuntivo o confirmado de tuberculosis (TB).
- Paciente con diagnóstico presuntivo o confirmado de cáncer de pulmón (CA).
- Paciente con diagnóstico de Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC)
- Otras patologías pulmonares o imagen radiológica compatible con micosis pulmonar.

5. Revisión de Historias Clínicas del Archivo:

Los datos necesarios para la confección de la ficha epidemiológica de cada paciente se obtuvieron accediendo al archivo del INERAM. Estos datos fueron corroborados con la historia clínica del paciente.

Tanto para la utilización de las muestras clínicas (sueros) como para la revisión de las fichas e historias clínicas de las salas y de los laboratorios, se obtuvo la autorización de los responsables de cada Departamento.

El estudio realizado garantizó la confidencialidad de la identidad de los pacientes y de sus resultados.

6. Búsqueda de anticuerpos anti-*P. brasiliensis*:

El estudio serológico se realizó mediante el método de IDD, siguiendo la técnica recomendada por el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (INEI - ANLIS) "Dr. Carlos G. Malbrán" (Argentina) (75,91). Se utilizaron antígenos y sueros controles de *P. brasiliensis* elaborados y provistos por el mismo Instituto (75,92).

Figura 1. Antígenos estandarizados y sueros controles de *P. brasiliensis*



Tal como lo recomienda dicha metodología, las lecturas se realizaron a las 72 h. verificando la presencia de reacción de identidad inmunológica. La prueba se consideró válida cuando se observó una banda de precipitación entre el antígeno y el suero control positivo y ninguna en el suero control negativo; en caso contrario, la prueba carecía de valor y se repitió el ensayo. Los sueros testigos positivo y negativos se utilizaron para cada placa donde se analizaban 6 sueros.

Una vez considerada como válida una prueba se realizó un lavado del gel con citrato de sodio al 5 % en solución fisiológica, durante 90 min, con el objeto de disolver bandas inespecíficas. Para detectar bandas no evidenciadas claramente, los geles se colorearon posteriormente con Azul de *Coomassie* R-250 al 0,3 % previo lavado y deshidratación del mismo, durante 20-30 minutos.

En los casos positivos se realizó la dilución del suero correspondiente y se procedió a seguir la técnica del INEI- ANLIS para determinar el título de anticuerpos (91).

7. Análisis de datos y métodos estadísticos:

Los datos de las fichas epidemiológicas fueron cargados en una planilla electrónica (Ms Excel 2010).

Para el análisis de datos se utilizó el programa informático EpiInfo 7.0. Los resultados obtenidos fueron presentados como frecuencia, porcentaje, porcentaje acumulado.

Utilizando EpiInfo 7.0 se evaluó la prueba diagnóstica de la IDD, determinando sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la misma, tomando como prueba de referencia la visualización del hongo a través del examen microscópico directo de las muestras clínicas de los pacientes sospechosos de PCM.

Se realizaron análisis utilizando las Tablas de 2x2 y el Chi cuadrado para tendencia con el *AddStatCalc* de EpiInfo.

RESULTADOS

A) De la población estudiada

Se analizaron un total de 508 sueros obtenidos de pacientes con los criterios de inclusión planteados.

Teniendo en cuenta la variable sexo, 308 pacientes pertenecieron al sexo masculino (61 %) y 200 (39 %) del sexo femenino.

El rango de edades de los mismos fue de 11 a 92 años. Estratificando por grupos etarios se encontró que los grupos comprendidos entre 41 y 70 años correspondieron al 51 % de la población total. Ver Tabla 1.

Tabla 1. Frecuencia de pacientes según el grupo etario.

Grupo etario	Frecuencia	Porcentaje	% Acumulado
11 - 20	31	6,10 %	6,10 %
21 - 30	59	11,61 %	17,72 %
31 - 40	64	12,60 %	30,31 %
41 - 50	81	15,94 %	46,26 %
51 - 60	100	19,69 %	65,94 %
61 - 70	79	15,55 %	81,50 %
71 - 80	66	12,99 %	94,49 %
81 - 90	27	5,31 %	99,80 %
91 - 100	1	0,20 %	100,00 %
TOTAL	508	100,00 %	100,00 %

En cuanto a la procedencia de los pacientes, 215 (42 %) provenían del Dpto. Central y 103 (20 %) de Asunción, abarcando ambos lugares el 62 % del total de las muestras analizadas. Solo 17 (3 %) eran de la Región Occidental o Chaco. Ver Tabla 2.

Tabla 2. Procedencia de la población estudiada.

Departamento	Frecuencia	Porcentaje	% Acumulado
Alto Paraguay	4	0,79 %	0,79 %
Alto Paraná	7	1,38 %	2,17 %
Amambay	3	0,59 %	2,76 %
Asunción	103	20,28 %	23,03 %
Boquerón	3	0,59 %	23,62 %
Caaguazú	24	4,72 %	28,35 %
Caazapá	9	1,77 %	30,12 %
Canindeyú	5	0,98 %	31,10 %
Central	214	42,13 %	73,23 %
Concepción	5	0,98 %	74,21 %
Cordillera	38	7,48 %	81,69 %
Guairá	18	3,54 %	85,24 %
Itapúa	9	1,77 %	87,01 %
Misiones	12	2,36 %	89,37 %
Ñeembucú	3	0,59 %	89,96 %
Paraguarí	20	3,94 %	93,90 %
Pdte. Hayes	10	1,97 %	95,87 %
San Pedro	21	4,13 %	100,00 %
TOTAL	508	100,00 %	100,00 %

En la Tabla 3 se resumen las causas de consulta de los pacientes incluidos en el estudio. Dificultad respiratoria, tuberculosis y neumonía fueron los 3 motivos más frecuentes de consulta o diagnósticos iniciales, totalizando el 52 % de la población estudiada.

En 40 pacientes se encontraron factores de riesgo asociados con posible patología pulmonar de PCM. El tabaquismo fue el más frecuente, ya sea presentado como único factor de riesgo o asociado con otros factores.

Tabla 3. Motivos de consulta o diagnóstico al ingreso de la población estudiada.

Motivo de Consulta/ Diagnóstico al Ingreso	Frecuencia	Porcentaje	% Acumulado
Asma/Disnea	33	6,50 %	6,50 %
CA	24	4,72 %	11,22 %
Dificultad respiratoria	137	26,97 %	38,19 %
Derrame pleural	29	5,71 %	43,90 %
Dolor torácico/Pleural	9	1,77 %	45,67 %
Edema/Empiema	8	1,57 %	47,24 %
EPOC	24	4,72 %	51,97 %
Hemoptisis	14	2,76 %	54,72 %
IRA	19	3,74 %	58,46 %
NAC	41	8,07 %	66,54 %
Neumonía	44	8,66 %	75,20 %
Otros	30	5,91 %	81,10 %
SBO	8	1,57 %	82,68 %
Sepsis/Shock séptico ppp	4	0,79 %	83,46 %
TB	84	16,54 %	100,00 %
TOTAL	508	100,00 %	100,00 %

CA: Carcinoma; EPOC: Enfermedad Pulmonar obstructiva Crónica; IRA: Insuficiencia Respiratoria Aguda; NAC: Neumonía adquirida en la Comunidad; SBO: Síndrome Bronquial Obstructivo, Sepsis/Shock séptico ppp: Sepsis/Shock séptico punto de partida pulmonar, TB: Tuberculosis

Tabla 4. Factores de riesgo asociados con PCM en la población estudiada.

Factores de Riesgo	Frecuencia	Porcentaje	% Acumulado
LES	1	1,25 %	5,00 %
PVVs	3	3,75 %	8,75 %
Agricultor	2	2,50 %	2,50 %
Tabaquismo	22	27,50 %	36,25 %
Tabaquismo - Etilismo	10	12,50 %	50,00 %
Tabaquismo - Agricultor - DCP	1	1,25 %	37,50 %
CA	1	1,25 %	3,75 %
TOTAL	40	100,00 %	100,00 %

LES: Lupus Eritematoso Sistémico; PVVS: Personas que viven con el virus VIH/sida; CA: Carcinoma; DCP: Desnutrición Calórica Proteica.

En la Tabla 5 se exponen los diagnósticos finales obtenidos, siendo neumonía la más frecuente, seguida por tuberculosis. De los 8 casos de PCM, en 2 tuvieron el diagnóstico final de PCM diseminada y en 3 de PCM pulmonar. Los otros diagnósticos encontrados en la historia clínica fueron: sepsis a punto de partida pulmonar, TB pulmonar y CA pulmonar, por más que los datos del laboratorio daban positivo por microscopía.

Tabla 5. Diagnóstico final en la población estudiada.

DIAGNÓSTICO Final	Frecuencia	Porcentaje	% Acumulado
Asma	13	2,56 %	2,56 %
Aspergiloma pulmonar	3	0,59 %	3,15 %
CA	5	0,98 %	4,13 %
CA pulmonar	28	5,51 %	9,65 %
Derrame pleural	6	1,18 %	10,83 %
Empiema	6	1,18 %	12,01 %
EPOC	46	9,06 %	21,06 %
Estenosis traqueal	10	1,97 %	23,03 %
Fibrosis pulmonar	7	1,38 %	24,41 %
IRA	19	3,74 %	28,15 %
NAC	69	13,58 %	41,73 %
Neumonía	87	17,13 %	58,86 %
Neumotórax	7	1,38 %	60,24 %
Muerte	12	2,36 %	62,60 %
PCM Diseminada	2	0,39 %	74,41 %
PCM pulmonar	3	0,59 %	75,00 %
SBO	3	0,59 %	75,59 %
Sepsis ppp	8	1,57 %	77,17 %
Shock séptico ppp	18	3,54 %	80,71 %
TB	12	2,36 %	83,07 %
TB Miliar/Extrapulmonar	3	0,59 %	83,66 %
TB pulmonar	60	11,81 %	95,47 %
TB pulmonar activa caso nuevo	16	3,15 %	98,62 %
TB secuelas	7	1,38 %	100,00 %
Otros	58	11,42 %	74,02 %
TOTAL	508	100,00 %	100,00 %

CA: Carcinoma; EPOC: Enfermedad Pulmonar obstructiva Crónica; IRA: Insuficiencia Respiratoria Aguda; NAC: Neumonía adquirida en la Comunidad; SBO: Síndrome Bronquial Obstructivo; Sepsis/Shock séptico ppp: Sepsis/Shock séptico punto de partida pulmonar, TB: Tuberculosis; Otros: patologías con menos de 3 casos, excepto casos de PCM ppp: punto de partida pulmonar

B) De los casos de PCM

Dentro de los 508 pacientes anteriormente descritos, se encontraron 8 casos de PCM diagnosticados por microscopia. Los 8 pacientes fueron del sexo masculino y con edades comprendidas entre 19 y 60 años. Según los grupos etarios definidos, 4 casos correspondieron al grupo de 51 a 60 años, 3 casos al de 41 a 50 años y un paciente al grupo de 11 a 20 años.

Los 8 casos provenían de diferentes departamentos del país. Ningún caso se detectó en la Región Occidental o Chaco (Ver Figura 2).

Los datos epidemiológicos de estos pacientes y el resultado de la IDD se presentan en la Tabla 6. De estos casos, 5 presentaron reacción de identidad en el estudio serológico. En las Figuras 3 y 4 se observan las bandas obtenidas en las IDD de las diluciones de los sueros y coloreadas con Azul de *Coomassie*.

Figura 2. Localización geográfica de los 8 casos de PCM.

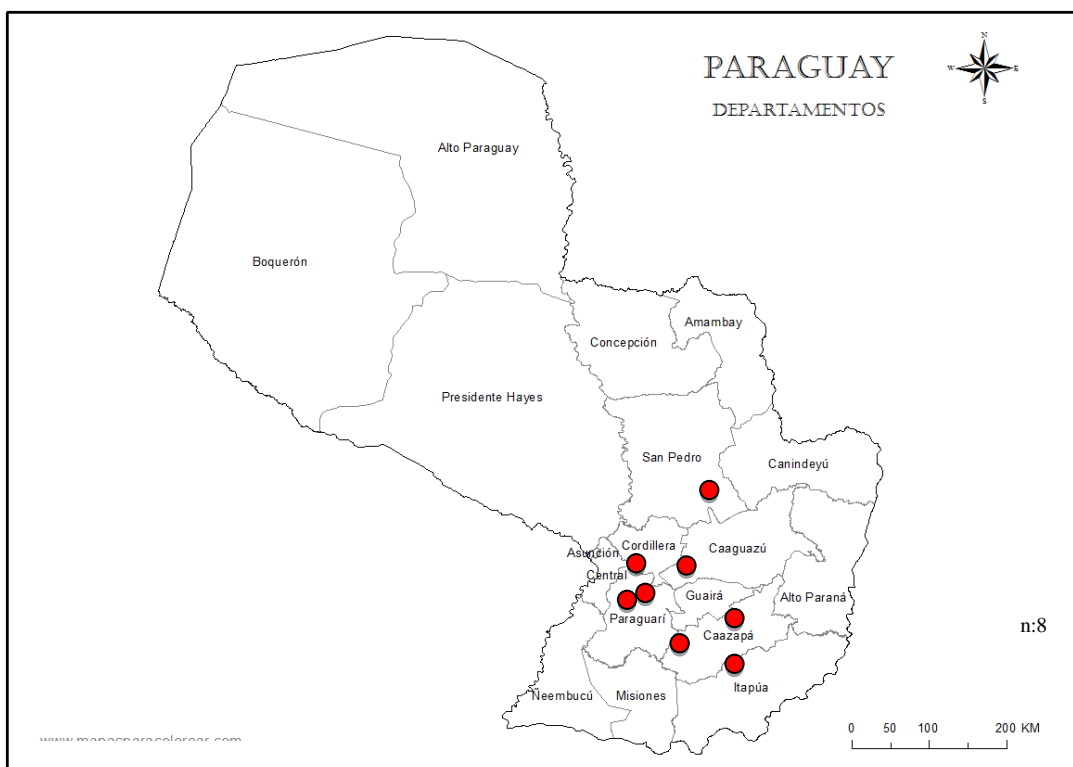
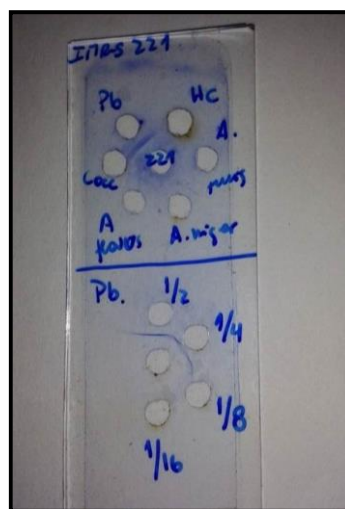
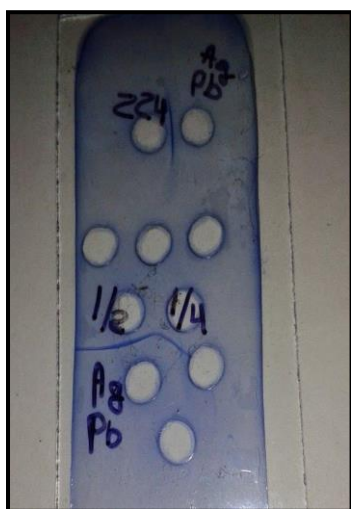


Tabla 6. Datos de los 8 casos con diagnóstico de PCM.

Paciente	Grupo etario	Dpto.	Diagnóstico al ingreso	Diagnóstico Final	Factor/es de riesgo	Muestras analizadas (+)	IDD Suero
1.	41-50	Caazapá	D Resp	PCM pulmonar	Agricultor	BAL-Espuito-Úlcera bucal-Heces	+(1:1)
2.	51-60	Cordillera	D Resp	PCM pulmonar	Tabaquismo Desnutrición calórica proteica-Agricultor	Lengua	+ (1:64)
3.	41-50	Guairá	Hemoptisis	PCM pulmonar	Asperligoma pulmonar	Secreción traqueal	Negativo
4.	41-50	Central	PCM Diseminada	PCM Diseminada	Tabaquismo Etilismo Agricultor	Espuito	+ (1:1)
5.	51-60	Paraguarí	TB	PCM pulmonar	Tabaquismo – Etilismo	Espuito	+ (1:8)
6.	11-20	Asunción	TB pulmonar	TB pulmonar activa caso nuevo	TB pulmonar activa caso nuevo	Espuito	Negativo
7.	51-60	Central	D Resp	Sepsis ppp	Ductus anterior	Espuito-Granuloma	Negativo
8.	51-60	San Pedro	CA Neoplasia pulmonar a invest.	CA pulmonar	Agricultor	Espuito	+ (1:64)

CA: Carcinoma; D Resp: Dificultad Respiratoria; TB: Tuberculosis; Sepsis ppp: Sepsis punto de partida pulmonar.

Figuras 3 y 4. Bandas de precipitación obtenidas con la IDD de las titulaciones de los sueros positivos y coloreadas con Azul de Coomassie.



C) Evaluación de la prueba diagnóstica. Análisis de la prueba serológica de IDD para diagnóstico de PCM en la población estudiada.

De los 8 casos de PCM diagnosticados por microscopía, se obtuvieron 5 resultados concordantes con IDD positiva. No hubo ningún resultado positivo por IDD sobre el total de los 508 pacientes sin confirmación microscópica de PCM.

Tabla 7. Tabla de IDD versus casos confirmados de PCM por microscopia (estándar de referencia).

		PCM (+)	PCM (-)	
Prueba IDD	(+)	5	0	5
	(-)	3	500	503
	Total	8	500	508

Sensibilidad: $5/8 \times 100 = 62,5\%$

Especificidad: $500/500 \times 100 = 100\%$

Valor Predictivo Positivo (VPP): $5/5 \times 100 = 100\%$

Valor Predictivo Negativo: $500/503 \times 100 = 99,4\%$

A fin de analizar la asociación de los factores de riesgo tabaquismo y etilismo con la PCM, se realizó el cálculo de Chi², prueba que permite determinar si dos variables cualitativas están o no asociadas. La asociación es estadísticamente significativa con ambos factores de riesgo, tanto tomándolos independientemente, tabaquismo ($p=0,00034$) y etilismo ($p = 0,0000023$) como con la presencia conjunta de tabaquismo y etilismo ($p = 0,000000063$).

DISCUSIÓN

A pesar de que Paraguay forma parte de la zona endémica de la PCM en Sudamérica, ya que posee las características climáticas que favorecen la permanencia del *Paracoccidioides* en el ambiente, es poco el conocimiento sobre las particularidades de la epidemiología de esta micosis en este país. (5,9,49,93) Tal como ocurre en otros países de Latinoamérica, las micosis sistémicas endémicas continúan siendo enfermedades infecciosas con bajo nivel de sospecha en Paraguay, probablemente por la escasa comprensión del ciclo biológico de esta infección y la poca experiencia en el diagnóstico y manejo de la enfermedad (1).

En este estudio se encontró una prevalencia de 1,6 % PCM en pacientes con cuadros pulmonares sintomáticos, siendo todos los casos pacientes varones adultos, coincidiendo con lo que refleja la bibliografía sobre la mayor incidencia de esta enfermedad en el sexo masculino (14,46,87). Los estudios paraguayos previos también muestran esta situación (61,62,64–66). Esto podría deberse a la mayor exposición de los varones al ambiente relacionado con el hábitat natural del *Paracoccidioides* por sus actividades dentro del ámbito de la agricultura, lo que genera manipulación del suelo y, consecuentemente, la posible inhalación de aerosoles conteniendo material fúngico (94,95). Esta situación se observó como factor predisponente en la mayoría de los casos detectados en esta investigación. Por otro lado, el hombre y la mujer si bien se exponen por igual a la infección por *Paracoccidioides*, la menor incidencia en mujeres se debe a que el beta-estradiol inhibe la transformación de la fase filamentosa (infectiva) a la fase levaduriforme (parasitaria) funcionando como protección para el desarrollo de la PCM (8,14,96).

Siete de los casos encontrados en el presente trabajo tenían edades comprendidas entre 47 y 60 años; a pesar de que los primeros trabajos en Paraguay señalaban a una población afectada por la PCM relativamente más joven, con edades entre 20 a 40 años (61,62). Esto concuerda con la mayoría de las investigaciones que reportan como grupo más frecuentemente afectado a varones de 30 a 50 años de edad,

coincidiendo con el período más activo de la vida, lo cual genera serios problemas sociales y económicos para los pacientes y su entorno (39,97,98).

Paraguay es un país con poca variación en la altitud (la gran mayoría del territorio se encuentra entre los 100 y 500 m y la altitud máxima no supera los 900 m). La temperatura media aumenta de sur a norte, sin embargo, las precipitaciones medias anuales disminuyen de sur a norte y de este a oeste. Estas características dividen al país en dos regiones climáticas distintas. Es así que la Región Oriental posee un clima subtropical húmedo, con una temperatura media de 21° C y un promedio de precipitaciones anuales de 1.200 mm, mientras que la Región Occidental posee un clima de sabana con zonas semiáridas, temperatura media de 25° C y 700 mm de precipitaciones medias anuales (62,98,99). Si tenemos en cuenta que la totalidad de los casos de PCM del presente estudio provenían de la Región Oriental, es notoria la asociación de los mismos con un entorno húmedo y no tan caluroso como lo señala la literatura (19).

A pesar de que se asocia a la PCM con un entorno rural, en trabajos recientes realizados en la provincia del Chaco, Argentina, se ha observado en los últimos años un aumento de casos urbanos y periurbanos de PCM, aunque muchos de ellos con formas infanto-juveniles (100). Así también en Paraguay, en un estudio previo llamaba la atención que un número importante de casos eran provenientes del departamento Central, el cual posee una elevada densidad poblacional, con características principalmente urbanas (65). En el presente estudio, también se han encontrado casos provenientes del departamento Central, pero es importante considerar que en este departamento existen también áreas rurales y no todas las localidades son urbanizadas, lo cual podría explicar dicho fenómeno. Por otro lado, la distribución real de la enfermedad podría no corresponderse con la encontrada, ya que la infección podría haber sido adquirida en un ambiente rural y, posteriormente, la persona migrar a localidades más urbanizadas. También se debe tener en cuenta que muchos registros de casos no reflejan esta situación ya que se registra la localidad de vivienda

actual y no la anterior donde pudo haber sido el sitio donde realmente ocurrió la infección (6).

La PCM tiene una baja frecuencia con respecto a las afecciones respiratorias más comunes y, generalmente, no se la sospecha como diagnóstico diferencial en los pacientes con problemas respiratorios. No debe desestimarse la coexistencia con la tuberculosis ya que ha sido informada por varios autores con cifras que van del 15 al 30 % (77,101,102). De los 8 casos encontrados en este trabajo, 2 (25 %) tuvieron diagnóstico de ambas patologías.

En los 508 pacientes incluidos en el presente estudio, solamente en un caso el diagnóstico presuntivo de ingreso fue la PCM, mientras que la tuberculosis representó el diagnóstico inicial más frecuente. Una explicación de la baja sospecha de la PCM podría ser que el centro asistencial donde se desarrolló el estudio es la institución de referencia para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades respiratorias donde la tuberculosis es la más frecuente, por lo cual es probable que, en el momento de hacer el diagnóstico de ingreso, el médico piense primero en dicha patología. Es con relación a este razonamiento que se debe destacar la importancia de la implementación de la IDD para la detección de PCM ya que, a pesar de la falta de sospecha inicial en la misma, en los pacientes con enfermedades respiratorias, una simple prueba serológica con gran valor predictivo positivo (tal como se observó en el presente trabajo) puede contribuir a su diagnóstico. Es por este motivo que diversos autores señalan la gran utilidad diagnóstica de la IDD (39,86,103). Tampoco debe olvidarse que en muchos casos resulta dificultosa la obtención de una muestra clínica para estudio microbiológico ante la sospecha de PCM.

En el presente trabajo, 7 de los 8 casos correspondieron a la forma crónica típica del adulto. La falta de reconocimiento de la PCM en el adulto genera retrasos en su diagnóstico y tratamiento, ocasionando la progresión de la enfermedad hacia la forma crónica que, en algunos casos, puede llevar a la muerte (94,101,104). Si bien en los casos aquí estudiados no se produjeron óbitos, es importante considerar que la PCM

es una enfermedad invalidante e incapacitante, lo que genera la pérdida de la productividad de la persona.

Al igual que lo señalaron otros autores, el tabaquismo y el etilismo fueron los dos principales factores de riesgo encontrados, no obstante, la alta prevalencia de tabaquismo en personas con problemas respiratorios, puede constituir una dificultad en el momento de la evaluación inicial, así como también, para el pronóstico del paciente (59,105). Uno de los casos, con varios factores predisponentes fue un agricultor, tabaquista con desnutrición calórica proteica. La malnutrición ha sido considerada una importante condición favorecedora para el desarrollo de la PCM porque compromete la inmunidad celular (40,105,106).

La detección y cuantificación de los anticuerpos anti-*P. brasiliensis* son prácticas fundamentales para el diagnóstico, pronóstico y evaluación del tratamiento de la PCM ya que se ha demostrado una correlación directa entre los niveles séricos de anticuerpos y la gravedad de la PCM, en donde la detección y cuantificación de los anticuerpos son parámetros utilizados para la clasificación de la forma clínica y la gravedad de la enfermedad (35). Este estudio no tuvo como objetivo realizar el seguimiento de los niveles séricos de anticuerpos durante el tratamiento de los casos detectados, pero está demostrado que los mismos disminuyen progresivamente hasta volverse negativos cuando la respuesta al tratamiento es favorable, constituyendo así la prueba más útil para el control de cura de la PCM (107–110). La IDD que utiliza en antígeno de la cepa Pb B339 está señalada de poseer un 80% de sensibilidad y más del 90% de especificidad como prueba diagnóstica para la PCM (111). Si bien existen varias metodologías para detectar la presencia de anticuerpos, la técnica de IDD, además de ser práctica y de bajo costo operativo, es una de las más sensibles y específicas (74,75), tal como se señala en un trabajo multicéntrico realizado en la Argentina (112). En el presente trabajo, se ha obtenido una especificidad del 100% pero sensibilidad del 62,5%, ya que en 3 de los 8 casos de PCM demostrados no se obtuvo reacción de identidad. Una explicación de la menor sensibilidad obtenida

podría ser que los anticuerpos de esos pacientes no tuvieron la capacidad de precipitar a los antígenos de la cepa de referencia *P. brasiliensis* B339 (ATCC 32069 / CBS 372.73), por las diferencias en la composición antigénica que podrían existir con las cepas de *Paracoccidioides* circulantes en la región geográfica donde se produjeron los casos (103,113,114). Por lo tanto, no debería soslayarse el origen geográfico y las posibles especies de *Paracoccidioides* circulantes en el Paraguay, lo cual influiría sobre la sensibilidad y especificidad de la IDD. Estudios con la prueba diagnóstica de la IDD realizados en pacientes del Chaco, Argentina, limítrofe con el Paraguay, informan una sensibilidad entre 84,5 al 92,7% como consecuencia de la posible circulación de *Paracoccidioides lutzii* y/o diferentes especies crípticas de *P. brasiliensis* (100,112). De igual manera que lo observado en este estudio, la presencia de agentes con un perfil antigénico diferente al de la cepa de referencia utilizada para la obtención de los antígenos para la prueba, podría explicar la ausencia de reacción de identidad serológica en los casos falsos negativos.

Otras causas de baja sensibilidad de la IDD, por las que podrían obtenerse resultados negativos, son: formas muy agudas, casos de lesiones focalizadas, pacientes con sida o inmunodeprimidos severos o con problemas de inmunidad.(74,86,115,116). No obstante, de los 3 pacientes que dieron pruebas falsas negativas por IDD, ninguno de ellos poseía inmunodepresión activa, tampoco se ha encontrado ningún caso de PCM asociado con VIH/sida o registrado como PVVs. Al respecto no debe desestimarse que sueros de pacientes con PCM infectados con el VIH, generalmente muestran títulos inferiores de anticuerpos anti-*P. brasiliensis*, pero que, a pesar de la menor intensidad e incluso ausencia de la respuesta humoral específica, las pruebas serológicas siguen siendo herramientas útiles para el diagnóstico de PCM en PVVs (87).

Existen varios trabajos en Sudamérica (112,117,118) que evalúan la exactitud de la IDD para el diagnóstico de la PCM y su gran utilidad. La especificidad y el valor predictivo positivo (ambos 100%) e incluso el valor predictivo negativo (99,4 %), obtenidos en el presente estudio enfatizan la importancia de esta prueba como

herramienta diagnóstica de la PCM. A pesar de la alta especificidad, algunos autores (28,115) han informado reacciones falsas positivas en pacientes con histoplasmosis y aspergilosis (101,110) y se ha demostrado que el empleo conjunto con la técnica de *immunoblotting* aumenta ostensiblemente su especificidad (117). En el presente trabajo la IDD tuvo un alto valor predictivo positivo, ya que no se detectaron casos falsos positivos. Este hecho cobra mayor importancia dentro del contexto de la baja frecuencia de la PCM y en el diagnóstico diferencial en personas con trastornos respiratorios. Una prueba con un nivel elevado de valor predictivo positivo resulta de suma utilidad para la confirmación de patologías poco prevalentes, como lo es la PCM (51,86).

La IDD es una técnica de fácil montaje en el laboratorio asistencial y con bajo costo (91,118,119). Siendo la PCM una enfermedad de baja prevalencia, pero reemergente en la región (102,103), sus valores predictivos positivos y de especificidad permiten aconsejar la implementación de esta prueba como una herramienta complementaria en la sistemática de diagnóstico en habitantes de áreas endémicas con sintomatología respiratoria y en aquellos cuyas muestras sean de difícil obtención. Esto favorecería el diagnóstico diferencial y la detección de asociaciones. Al mejorar la estrategia podremos tener un diagnóstico precoz.

El diagnóstico certero y un tratamiento a tiempo evitarían una consecuencia importante del padecimiento de la PCM que es la pérdida de la productividad de la persona afectada. Las secuelas interfieren en forma permanente con el bienestar y generan jubilaciones prematuras en la mayoría de los casos adultos. En el caso de los niños evitará la alta mortalidad que tiene esa afección para esos pacientes.

Esto, además, contribuiría a la disminución de los altos costos de internación, medicación y estudios de laboratorio.

CONCLUSIONES

- La prevalencia detectada de PCM en pacientes con trastornos respiratorios en Paraguay, es relativamente baja.
- La epidemiología encontrada respecto de la relación hombre/mujer y rango de edades coincide con la de otras regiones endémicas, pero el patrón de distribución geográfica de los casos tiene una mayor distribución urbana en contraste con la histórica relación de la PCM con el ambiente rural.
- Es evidente la falla en el diagnóstico clínico de ingreso por la falta de sospecha de la PCM. La asociación de la PCM con la tuberculosis y otras patologías pulmonares debe considerarse en las áreas endémicas.
- La IDD puede constituirse en una herramienta fundamental para la detección de la PCM en situaciones de baja prevalencia favorecida por los altos valores de especificidad y predictivos positivos.
- La practicidad y el bajo costo de la IDD permiten implementar la búsqueda sistemática en habitantes de áreas endémicas con patología pulmonar, mejorar la estrategia del diagnóstico precoz y, consecuentemente, los resultados del tratamiento.
- La posible circulación en Paraguay de especies o genotipos de *Paracoccidioides* con una composición antigénica diferente a las cepas de referencia usadas para la IDD, puede generar anticuerpos que no sean detectados. Esto enfatiza la importancia del conocimiento de la epidemiología molecular de la PCM en Paraguay como proyección futura de este estudio.

BIBLIOGRAFIA

1. Negroni R. Lecciones de Clinica Micologica. La Agenda, editor. Lecciones de Clinica Micologica. Bs.As.; 1997. 179 p.
2. Bonifaz A. Micologia Médica Básica. 5a. Cap.21. Mexico: McGraw-Hill; 2015. 740 p.
3. Marques SA. Paracoccidioidomycosis: epidemiological, clinical, diagnostic and treatment up-dating. *An Bras Dermatol.* 2013;88:700–11.
4. Alves CCS, Azevedo ALS, Rodrigues MF, Machado RP, Souza MA, Machado MA, et al. Cellular and humoral immune responses during intrathoracic paracoccidioidomycosis in BALB/c mice. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2009;32(6):513–25.
5. Theodoro RC, Teixeira M de M, Felipe MSS, Paduan K dos S, Ribolla PM, San-Blas G, et al. Genus *Paracoccidioides*: Species recognition and biogeographic aspects. *PLoS One.* 2012;7.
6. Desjardins CA, Champion MD, Holder JW, Muszewska A, Goldberg J, Bailão AM, et al. Comparative genomic analysis of human fungal pathogens causing paracoccidioidomycosis. *PLoS Genet.* 2011;7.
7. Teixeira MM, Theodoro RC, Nino-Vega G, Bagagli E, Felipe MSS. *Paracoccidioides* species complex: ecology, phylogeny, sexual reproduction, and virulence. *PLoS Pathog.* 2014 Oct;10(10):e1004397.
8. López-Martínez, R., Hernández-Hernández, F., Méndez-Tovar, L. J., Manzano-Gayosso, P., Bonifaz, A., Arenas, R., Padilla-Desgarenes, M. d. C., Estrada, R. and Chávez, G. (2014) D 1111/myc. 1219. Paracoccidioidomycosis in Mexico: clinical and epidemiological data from 93 new cases (1972–2012). *Mycoses*, 57 525–530. México; 2015;
9. Lacaz CS. Tratado de Micologia Médica Lacaz. 9ª ed. São Paulo: Sarvier; 2009. 1104 p.
10. Jawetz M & A. Medical Microbiology. 26ª Ed. Weitz, M & Naglieri C, editor.

- U.S.A.; 2013. 863 p.
11. Arenas R. *Micología Médica Ilustrada*. 4Ed. Mexico DF: Mc Graw- Hill.; 2011. 425 p.
 12. Teixeira MM, Theodoro RC, de Carvalho MJA, Fernandes L, Paes HC, Hahn RC, et al. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the *Paracoccidioides* genus. *Mol Phylogenet Evol*. 2009;52:273–83.
 13. Teixeira MDM, Theodoro RC, Oliveira FFM De, Machado GC, Hahn RC, Bagagli E, et al. *Paracoccidioides lutzii* sp. nov.: biological and clinical implications. *Med Mycol*. 2014;52:19–28.
 14. Bonifaz A, Vázquez-González D, Perusquía-Ortiz AM. Endemic systemic mycoses: coccidioidomycosis, histoplasmosis, paracoccidioidomycosis and blastomycosis. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2011;9:705–15.
 15. Arantes TD, Bagagli E, Niño-Vega G, San-Blas G TR. *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii*, A secret love affair. *Rev do Inst Med Trop São Paulo*. 2015;57(19):25–30.
 16. Mycobank home. *Paracoccidioides brasiliensis*. [cited 2015 Nov 17]. Available from:
<http://www.mycobank.org/name/Paracoccidioides%20brasiliensis&Lang=Eng>.
Search on : Mycobank.
 17. Matute DR, McEwen JG, Puccia R, Montes BA, San-Blas G, Bagagli E, et al. Cryptic speciation and recombination in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* as revealed by gene genealogies. *Mol Biol Evol*. 2006;23:65–73.
 18. Barbosa F. Caracterização molecular de isolados de *Paracoccidioides brasiliensis* obtidos de *Dasypus novemcinctus* (tatu) e sua correlação com virulência e origem geográfica. [Internet]. 2002 [cited 2015 Nov 17]. p. 76. Available from: Dissertação (mestrado) – Faculdade de Medicina de; Universidade Estadual Paulista; 2002.
 19. Arantes TD, Theodoro RC, Teixeira M de M, Bosco S de MG, Bagagli E.

- Environmental Mapping of *Paracoccidioides* spp. in Brazil Reveals New Clues into Genetic Diversity, Biogeography and Wild Host Association. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(4).
20. Theodoro RC, Teixeira M de M, Felipe MSS, Paduan K dos S, Ribolla PM, San-Blas G, et al. Genus *Paracoccidioides*: Species recognition and biogeographic aspects. *PLoS One*. 2012;7(5).
 21. Carrero LL, Niño-Vega G, Teixeira MM, Carvalho MJA, Soares CMA, Pereira M, et al. New *Paracoccidioides brasiliensis* isolate reveals unexpected genomic variability in this human pathogen. *Fungal Genet Biol*. 2008;45:605–12.
 22. Turissini DA, Gomez OM, Teixeira MM, McEwen JG, Matute DR. Species boundaries in the human pathogen *Paracoccidioides*. *Fungal Genet Biol*. 2017;
 23. Negroni R GL. Manual de Procedimientos para Laboratorios de Micología Clínica. *Acta Bioquímica Clínica Latinoam supl 1*. Buenos Aires: Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires.; 1999;1–57.
 24. Franco M, Bagagli E, Scapolio S, da Silva Lacaz C. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. *Med Mycol*. 2000;38:185–91.
 25. Facultad de Medicina de la UNAM. *Actualidades en Micología Médica*. 5ª ed. Mendes Tovar L, editor. Mexico; 2010. 442 p.
 26. Fisher F CN. Fungos sistémicos. In: Revinter, editor. *Micología Fundamentos e Diagnóstico*. 1ª. Rio de Janeiro.: Ed. Revinter Ltda.; 2001. p. 337.
 27. Calle D, Rosero DS, Orozco LC, Camargo D, Castañeda E, Restrepo A. *Paracoccidioidomycosis* in Colombia: an ecological study. *Epidemiol Infect*. 2001;126:309–15.
 28. Vidal MS, de Melo NT, Garcia NM, Del Negro GM, de Assis CM, Heins-Vaccari EM, et al. *Paracoccidioides brasiliensis*. A mycologic and immunochemical study of a sample isolated from an armadillo (*Dasipus novencinctus*). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1995;37:43–9.
 29. Allison MJ, Gerszten E, Shadomy HJ, Munizaga J, Gonzalez M.

- Paracoccidioidomycosis in a Northern Chilean mummy. *Bull N Y Acad Med.* 1979;55:670–83.
30. Canteros CE, Madariaga MJ, Lee W, Rivas MC, Davel G IR. Agentes de micosis endémicas en un área rural de Argentina: estudio seroepidemiológico en perros. *Rev Iberoam Micol.* 2009;31;27(1):14–9.
 31. Barrozo L V., Mendes RP, Marques SA, Benard G, Siqueira Silva ME, Bagagli E. Climate and acute/subacute paracoccidioidomycosis in a hyper-endemic area in Brazil. *Int J Epidemiol.* 2009;38(6):1642–9.
 32. Fortes MRP, Miot HA, Kurokawa CS, Marques MEA, Marques SA. Immunology of paracoccidioidomycosis. *Anais Brasileiros de Dermatologia.* 2011. p. 516–25.
 33. Restrepo A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. *Sabouraudia.* 1985;23:323–34.
 34. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: An update. *Clinical Microbiology Reviews.* 1993. p. 89–117.
 35. Biagioni L, Souza MJ, Chamma LG, Mendes RP, Marques SA, Mota NG, et al. Serology of paracoccidioidomycosis. II. Correlation between class-specific antibodies and clinical forms of the disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1984;78(5):617–21.
 36. De Camargo ZP, de Franco MF. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev Iberoam Micol organo la Asoc Esp Espec en Micol.* 2000;17:41–8.
 37. Tobon AM, Orozco B, Estrada S, Jaramillo E, De Bedout C, Arango M, et al. Paracoccidioidomycosis and AIDS: Report of the first two Colombian cases. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1998;40:377–81.
 38. Corti M, Villafañe MF, Negroni R, Palmieri O. Disseminated paracoccidioidomycosis with peripleuritis in an AIDS patient. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2004;46:47–50.
 39. Shikanai-Yasuda M.A., De Queiroz Telles Fihlo F. PMR y cols. Consenso em

- Paracoccidioidomycose. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006;39:297–310.
40. Restrepo A, Gómez BL TA. Paracoccidioidomycosis: Latin America's Own Fungal Disorder. *Curr Fungal Infect Rep.* 2012;6:303–11.
 41. Negroni R. Paracoccidioidomycosis (South American blastomycosis, Lüt's Mycosis). *Intern J Dermatol.* 1993;32:847–59.
 42. Colombo AL, Tobón A, Restrepo A, Queiroz-Telles F NM. Epidemiology of endemic systemic fungal infections in Latin America. *Med Mycol.* 2011;Nov:49(8):785–98.
 43. Ameen M, Talhari C, Talhari S. Advances in paracoccidioidomycosis. *Clinical and Experimental Dermatology.* 2010. p. 576–80.
 44. Bellissimo-Rodrigues F, Vitali LH, Martinez R. Serological diagnosis of paracoccidioidomycosis in HIV-coinfected patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010;105(7):904–7.
 45. Shikanai-Yasuda MA, Conceição YMT, Kono A, Rivitti E, Campos AF, Campos S V. Neoplasia and paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia.* 2008. p. 303–12.
 46. Restrepo A, Benard G, de Castro CC, Agudelo CA, Tobón AM. Pulmonary paracoccidioidomycosis. *Semin Respir Crit Care Med.* 2008;29:182–97.
 47. Hurtado R. Vargas Flores J V. Paracoccidioidomycosis. *Dermatología Ibero-Americana Online.* 2010. p. [cited 2016 Nov 11]. Available from: <http://piel-or>.
 48. Corti M, Villafañe MF, Trione N, Palmieri O, Negroni R, Yampolsky C, et al. Infección diseminada crónica con abscesos cerebrales múltiples por Paracoccidioides brasiliensis. *Rev argent radiol.* 2010;74(3):255–8.
 49. Ferreira MS. Paracoccidioidomycosis. *Paediatr Respir Rev.* 2009;10:161–5.
 50. Negroni R, Arechavala AI, Maiolo E, Bianchi MH, Santiso G, Garro S OT. Problemas clínicos en Micología Médica: problema n.º 31. *Rev Iberoam Micol;* 25(1):62–4.
 51. Pato AM, Giusiano G, Mangiaterra M. Paracoccidioidomycosis asociada a otras patologías respiratorias en un hospital de Corrientes, Argentina. *Rev Argent*

- Microbiol. 2007;39:161–5.
52. Batista J, de Camargo ZP, Fernandes GF, Vicentini AP, Fontes CJF HR. Is the geographical origin of a *Paracoccidioides brasiliensis* isolate important for antigen production for regional diagnosis of paracoccidioidomycosis? *Mycoses* 2010; 53 176–80. 2010; 53 176–80.
 53. Bagagli E, Arantes TD, Theodoro RC. *Paracoccidioides brasiliensis*: Ecology and evolution. *Mycoses*. 2012;55:54–5.
 54. Simões LB, Marques SA, Bagagli E. Distribution of paracoccidioidomycosis: determination of ecologic correlates through spatial analyses. *Med Mycol*. 2004;42:517–23.
 55. Kayano MT AR. Relations of South American summer rainfall interannual variations with the Pacific Decadal Oscillation. *Int J Clim*. 27::531–540.
 56. Barrozo LV, Benard 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. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4.
 57. Massad E, Ortega NRS, de Barros LC, Struchiner CJ. Modern epidemiology. *Stud Fuzziness Soft Comput*. 2008;232:41–57.
 58. Paracoccidioidomycosis. *Clin Dermatol*. 2012;30(6):610–5.
 59. Fernández R AR. Paracoccidioidomycosis. Actualización. *Dermatología Rev Mex* 2009; 53. 2009;53(1):12–21.
 60. Dawaher J, Colella MT, Roselló A, Pérez C, Olaizola C, Newman W, et al. Paracoccidioidomycosis: Clinical Considerations, Epidemiology and Treatment. *Rev Kasmera*. 2012;40(2):160–71.
 61. Canese A. Paracoccidioidomycosis en Paraguay. *Rev Paraguaya Microbiol Cátedra Bacteriol y Parasitol FCM-UNA*. 1969;Vol. IV. N.
 62. Rolon PA. *Mycopathologia*. *Mycopathol* vol 59, 2, pp 67-80, 1976. 1976;59(2):67–80.
 63. Velazquez D, Taboada A, Alarcón R, Benítez G SS. Paracoccidioidomycosis y

- Tuberculosis, Co-infección. Rev Paraguaya Infectología Órgano Of la SPI. 2011;Vol. 4 (1).
64. Ortellado J. Paracoccidioides brasiliensis, 5 años de hallazgos de laboratorio. Rev Congr Paraguayo Med Interna. 2000;1.
 65. Gonzalez L, Di Martino B, Rodriguez L, Rodriguez M, Knopfmacher O BL. Paracoccidioidomicosis: análisis clínico-patológico de 16 casos 2005-2011. Folia dermatol Peru 2011; 22 11-16. 2011;1(22):11–6.
 66. Pérez D, Oviedo J GS. Paracoccidioidomicosis: características clínicas y evolutivas de 94 casos. In: Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y del Ambiente (INERAM) VII Congreso Paraguayo de Medicina Interna: Asunción, Paraguay. 2004.
 67. Agüero Zaputovich F, Cardozo L, Di Martino B, Valdovinos G, Rodríguez Masi M, Knopfmacher O, et al. Paracoccidioidomicosis en paciente HIV+. Rev Esp Patol. 2008;41:150–3.
 68. Chirife A. La paracoccidioidomicosis en el Paraguay. Anales de la Facultad de Medicina (UNA) 1944; 4(19):13-65.
 69. Ortiz R. Revisión de la paracoccidioidomicosis. Cátedra de Semiología Médica. Anales de la Facultad de Ciencias Medicas (UNA). Vol XXX Nos 1-2, 1997.
 70. Mingo E. Paracoccidioidomicosis en el Paraguay. Resúmenes del congreso de la Asociación Latinoamericana de Tórax (ALAT), 2002.
 71. Blanco JL GM. Presente y futuro del diagnóstico inmunológico de las micosis animales. Rev Iberoam Micol. 2000;(17):23–8.
 72. Gómez BL, Figueroa JI, Hamilton AJ, Diez S, Rojas M, Tobón AM, et al. Antigenemia in patients with paracoccidioidomycosis: Detection of the 87-kilodalton determinant during and after antifungal therapy. J Clin Microbiol. 1998;36:3309–16.
 73. Queiroz-Telles F, Escuissato DL. Pulmonary paracoccidioidomycosis. Semin Respir Crit Care Med. 2011;32:764–74.

74. Canteros C.E., Rivas M.C., Soria M., Lee W., Perrotta D. RL et al. Inmunodiagnóstico de micosis endémicas y aspergilosis broncopulmonar: Estudio multicéntrico en la República Argentina. *Micosis endémicas y aspergilosis en Argentina. Rev Argentina Microbiol* 36 68-74. 2004;36(2):68–74.
75. Perrotta D, Vivot W, Lee W, Rivas C, Rodero L, Canteros C DG. Producción de antisueros fúngicos específicos en conejos. *Rev Arg Microbiol*. 1998;30:115–21.
76. Teles FRR, Martins ML. Laboratorial diagnosis of paracoccidioidomycosis and new insights for the future of fungal diagnosis. *Talanta*. 2011. p. 2254–64.
77. Del Negro GM, Garcia NM, Rodrigues EG, Cano MI, de Aguiar MS, Lírio VS, et al. The sensitivity, specificity and efficiency values of some serological tests used in the diagnosis of paracoccidioidomycosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1991;33:277–80.
78. De Camargo ZP. Serology of paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*. 2008. p. 289–302.
79. Lacaz CDS, Vidal MSM, Pereira CN, Heins-Vaccari EM, De Melo NT, Sakai-Valente N, et al. Paracoccidioides cerebriformis Moore, 1935. Mycologic and immunochemical study. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1997;39:141–4.
80. Vidal MSM, Palacios SA, Takahashi De Melo N, Lacaz CDS. Reactivity of anti-gp43 antibodies from Paracoccidioides brasiliensis antiserum with extracts from cutaneous lesions of Lobo's disease. Preliminary note. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1997;39:35–7.
81. Martinez R. Epidemiology of Paracoccidioidomycosis. *Rev do Inst Med Trop São Paulo*. 2015;57 Suppl 1.
82. dos Santos PO, Rodrigues AM, Fernandes GF, da Silva SHM, Burger E, de Camargo ZP. Immunodiagnosis of Paracoccidioidomycosis due to Paracoccidioides brasiliensis Using a Latex Test: Detection of Specific Antibody Anti-gp43 and Specific Antigen gp43. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(2).
83. Vidal MSM, De Castro LGM, Cavalcante SC, Lacaz CDS. Immunoprecipitation

- techniques and ELISA in the detection of anti-Fonsecaea pedrosoi antibodies in chromoblastomycosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2003;45:315–8.
84. Ben R, Rodrigues R, Agostini AA, Graeff-Teixeira C. Use of heterologous antigens for the immunodiagnosis of abdominal angiostrongyliasis by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010;105(7):914–7.
 85. Mereles Rodríguez BE. Técnicas inmunológicas [Internet]. [cited 2016 Oct 11]. p. 1–44. Available from: <http://www.aulavirtual-exactas.dyndns.org/claroline/backends/download.php>
 86. M. A. Restrepo. La Prueba De Inmunodiffusion En El Diagnostico De La Paracoccidioidomycosis. *Sabouraudia J Med Vet Mycol*. 1966;4(4).
 87. Castillo J et al. Paracoccidioidomicocic Diagnóstico por el laboratorio de 333 casos. *Biomedica*. 1994;14(4):1–9.
 88. Bonfim CV, Mamoni RL, Blotta MHSL. TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med Mycol*. 2009;47:722–33.
 89. Reviákina V, Panizo M, Dolande M SS. Diagnóstico inmunológico de las micosis sistémicas durante cinco años 2002-2006. *Rev la Soc Venez Microbiol*. 2007;27:112–9.
 90. INERAM. [cited 2016 Sep. 10]. Available from: <http://www.mspbs.gov.py/v2/92-Instituto-Nacional-de-Enfermedades-Respiratorias-y-del-Ambiente>.
 91. Canteros C., Davel G., Tiraboschi IN CS. El laboratorio y el diagnóstico de las micosis sistémicas. *Dep Micol INEI ANLIS “Carlos G Malbrán.”* 2016;69–72.
 92. Davel G, Canteros CE, Burkett A, Tiraboschi IN, Pereda R, Pirola D, et al. Situacion de las micosis en la Republica Argentina. *Rev Argent Microbiol*. 2007;39(1):28–33.
 93. San-Blas G. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol*. 1993;31:99–113.

94. Bocca AL, Amaral AC, Teixeira MM, Sato PK, Sato P, Shikanai-Yasuda MA, et al. Paracoccidioomycosis: eco-epidemiology, taxonomy and clinical and therapeutic issues. *Future Microbiol.* 2013;8:1177–91.
95. Epidemiology of Paracoccidioomycosis. *Rev do Inst Med Trop São Paulo.* 2015;57 Suppl 1:11–20.
96. Shankar J, Restrepo A, Clemons K V., Stevens DA. Hormones and the resistance of women to paracoccidioomycosis. *Clinical Microbiology Reviews.* 2011. p. 296–313.
97. Basterreix KP, Michelena MA, Garritano MV, Arena G, Maradeo, R. Alves, E. Chiavassa AM. Paracoccidioomycosis. *Arch Argent Dermatol.* 2016;
98. Encuesta Permanente de Hogares 2014. [cited 2017 Jul. 14]. Available from: <http://www.dgeec.gov.py/Publicaciones/Biblioteca/EPH2014/Principales%20Resultados%20EPH%202014..pdf>.
99. Datos Meteorológicos del Paraguay. [cited 2016 Jul. 17]. Available from: <http://www.meteorologia.gov.py/publicaciones.php>.
100. Cattana ME, Tracogna MF, Marquez I, Giusiano GE. Instituto de Medicina Regional, Resistencia A. Paracoccidioomycosis in a central hospital of Chaco province.
101. Asconeguy FR, Bonasse J, Calegari LF, Conti Díaz IA. Paracoccidioomycosis: apropos of 3 new Uruguayan cases. *Mycopathologia.* 1982. p. 155–9.
102. Nogueira MGDS, Andrade GMQ, Tonelli E. Clinical evolution of paracoccidioomycosis in 38 children and teenagers. *Mycopathologia.* 2006;(161):73–81.
103. da Silva J de F, de Oliveira HC, Marcos CM, Assato PA, Fusco-Almeida AM M-GM. Advances and challenges in paracoccidioomycosis serology caused by Paracoccidiooides species complex: an update. [cited 2016 Jul 14] Available from *Diagn Microbiol Infect Dis [Internet].* 2016;84(1):87–94.
104. Espinoza Pérez J, Agüero Balbín R, Martínez Meñaca A, Ciorba C, Mora Cuesta

- V. Micosis pulmonares. [cited 2016 Jul 14] Programa Form Médica Contin
Acreditado [Internet]. 2014;11(66):3949–62. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304541214708674>
105. Pereira RM, Bucarechi F, Barison EDM, Hessel G, Tresoldi AT.
Paracoccidioidomycosis in children: Clinical presentation, follow-up and
outcome. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2004;46:127–31.
 106. Nogueira MGDS, Andrade GMQ, Tonelli E. Clinical evolution of
paracoccidioidomycosis in 38 children and teenagers. *Mycopathologia*.
2006;161:73–81.
 107. Mendes-Giannini MJS, Camargo ME, Lacaz CS, Ferreira AW.
Immunoenzymatic absorption test for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis.
J Clin Microbiol. 1984;20:103–8.
 108. Blotta MH, Altemani AM, Amaral E, Silva LJ, Camargo ZP. Placental
involvement in paracoccidioidomycosis. *Journal of medical and veterinary
mycology : bi-monthly publication of the International Society for Human and
Animal Mycology*. 1993. p. 249–57.
 109. Sposto MR, Mendes-Giannini MJ, Moraes RA, Branco FC, Scully C.
Paracoccidioidomycosis manifesting as oral lesions: clinical, cytological and
serological investigation. *J Oral Pathol Med*. 1994;23:85–7.
 110. Elias Costa MR, Da Silva Lacaz C, Kawasaki M, De Camargo ZP. Conventional
versus molecular diagnostic tests. *Med Mycol*. 2000;38 Suppl 1:139–45.
 111. Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho F de Q, Mendes RP, Colombo AL MM.
Guidelines in paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39:297–
310.
 112. Cattana ME, Sosa MA, Rojas FD, Fernández MS, Alegre LR, Tracogna MF,
Cech N, Arechavala A, Giusiano GE. Instituto de Medicina Regional, Resistencia
A. Diagnóstico etiológico de Paracoccidioidomycosis. Estado actual de su
utilidad en la Argentina.

113. de Macedo PM, Almeida-Paes R, Freitas DFS, Varon AG, Paixão AG, Romão AR et al. Acute juvenile Paracoccidioidomycosis: A 9-year cohort study in the endemic area of Rio de Janeiro, Brazil. *Vinetz JM, Ed PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(3).
114. Batista J, De Camargo ZP, Fernandes GF, Vicentini AP, Fontes CJF, Hahn RC. Is the geographical origin of a *Paracoccidioides brasiliensis* isolate important for antigen production for regional diagnosis of paracoccidioidomycosis? *Mycoses.* 2010;53:176–80.
115. Sugizaki MF, Peracoji MTS, Mendes-Giannini MJ, Soares AMVC, Kurokawa CS, Mendes RP, et al. Correlation between antigenemia of *Paracoccidioides brasiliensis* and inhibiting effects of plasma in patients with paracoccidioidomycosis. *Med Mycol.* 1999;37:277–84.
116. Cano LE, Singer-Vermes LM, Costa TA, Mengel JO, Xidieh CF, Arruda C, et al. Depletion of CD8+ T cells in vivo impairs host defense of mice resistant and susceptible to pulmonary paracoccidioidomycosis. *Infect Immun.* 2000;68:352–9.
117. Do Valle A, Costa R, Fialho Monteiro P, Von Helder J, Muniz M Z-OR. Interpretation and clinical correlation of serological tests in paracoccidioidomycosis. *Med Mycol.* 2001;39:373–7.
118. Chinchilla M, Kogson M, De Insignares R, Rodríguez M, Vargas M, Torrado E CE. Valor de las pruebas inmunológicas en el diagnóstico de las enfermedades micóticas: experiencia de un centro de referencia. *Biomédica.* 1998;18(3):179–184.
119. Tichellio AG, Mangiaterra M, Giusiano G. [Paracoccidioidomycosis in Formosa province (Argentina)]. *Rev Argent Microbiol.* 2008;40(1):24–9.
120. Nuño CG, Pablo P, Alfonso P, Carlos J. A propósito de las micosis pulmonares. *Acta Medica Cordoba.* 2000;9(1–2):59–66.

