

**ELABORAÇÃO DE LÂMINAS DE MICROSCOPIA PARA TÉCNICA DE  
IMUNOFLUORESCÊNCIA AUXILIANDO NO DIAGNÓSTICO DE  
PARACOCCIDIOIDOMICOSE**

***PREPARATION OF MICROSCOPY BLADES FOR IMMUNOFLUORESCENCE  
TECHNIQUE HELPING IN THE DIAGNOSIS OF  
PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS***

Ana Lívia Silva Campos  
Graduanda em Tecnologia em Sistemas Biomédicos pela Fatec Bauru  
E-mail: ana.campos16@fatec.sp.gov.br

Luciana Leme de Oliveira  
Graduanda em Tecnologia em Sistemas Biomédicos pela Fatec Bauru  
E-mail: luciana.oliveira30@fatec.sp.gov.br

Mariana dos Santos  
Graduanda em Tecnologia em Sistemas Biomédicos pela Fatec Bauru  
E-mail: mariana.santos80@fatec.sp.gov.br

Rodrigo Pires Correia  
E-mail: rodrigo.correia2@fatec.sp.gov.br  
Orientador na Fatec Bauru

Adriana Sierra Assencio Almeida Barbosa  
Orientadora e docente na Fatec Bauru  
E-mail: adriana.barbosa@fatec.sp.gov.br

**RESUMO:**

A Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose endêmica sistêmica, causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*). A infecção envolve primariamente os pulmões pela inalação do fungo e pode disseminar-se para vários órgãos e sistemas originando lesões secundárias nas mucosas, nos linfonodos, na pele e nas glândulas adrenais. Como não é doença de notificação compulsória no Brasil, a real prevalência da PCM não pode ser calculada, porém é considerada a terceira causa de morte por doença infecciosa crônica. O diagnóstico da doença pode ser realizado pelo exame micológico direto, radiológico, histopatológico e sorológico. Dos exames sorológicos, a imunofluorescência é uma das técnicas com grande assertividade no diagnóstico. Com o objetivo de auxiliar o diagnóstico da referida doença, o presente estudo buscou desenvolver lâmina de microscopia específica para realização da técnica de imunofluorescência. Para o desenvolvimento da metodologia foi utilizado o software CorelDRAW Graphics Suite para realização do desenho gráfico. Como resultado do presente estudo obteve-se a realização do desenho gráfico com 10 círculos, de diâmetro de 10mm cada, logo foi realizada a impressão em papel adesivo tamanho A4, após foi inserido na lâmina de microscopia. As lâminas foram encaminhadas para o Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP, para verificação da metodologia realizada, no qual foi validado o produto. Conclui-se que o presente trabalho pretendeu como um grande diferencial foi o desenvolvimento de lâminas de microscopia específica e de baixo custo, objetivando a detecção da doença. Com a utilização do dispositivo para o diagnóstico de PCM a preparação da lâmina para o exame ficará muito simples, podendo deixar a aplicação da técnica mais rápida.

**Palavras-chave:** Paracoccidioides brasiliensis; Paracoccidioidomicose; diagnóstico; lâmina de microscopia; técnica de imunofluorescência.

## 1 INTRODUÇÃO

A Paracoccidioidomicose (PCM) é causada por fungos *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*). A patologia tem prevalência na América do Sul, especialmente no Sudeste e Sul do Brasil, na Argentina e no Paraguai. Predomínio em pessoas do sexo masculino e em idade produtiva geralmente lavradores e trabalhadores rurais, onde são infectados por inalação de suspensão fúngica nas atividades laborais rurais (ANDRADE et al., 2019).

A descoberta da patologia ocorreu pelo Adolfo Lutz ano de 1908, que foi caracterizada por apresentar lesões nas mucosas da gengiva, úlceras, pode ainda causar tosse e escarro. A doença é sistêmica podendo ser disseminada em todos os órgãos, por esse motivo é imperativa o diagnóstico exato e precoce, pois a tratamento dura por 2 anos (MENDES et al., 2017).

Por ser uma doença de não necessidade 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).

A Paracoccidioidomicose (PCM) é a principal micose sistêmica no Brasil, com maior frequência nas regiões sul, sudeste e centro-oeste. 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., 2019).

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).

A contaminação ocorre 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., 2014).

A infecção envolve primariamente os pulmões pela inalação do fungo e pode disseminar-se para vários órgãos e sistemas originando lesões secundárias nas mucosas, nos linfonodos, na pele e nas glândulas adrenais. Diante de um quadro de paciente apresentando linfadenomegalia generalizada associada à febre e perda ponderal, além da paracoccidioidomicose, vários diagnósticos diferenciais devem ser pensados: doenças granulomatosas (tuberculose, sarcoidose), infecções virais (mononucleose, toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus) e tumores (principalmente em idosos) (MARCHIORI et al., 2011).

Nas áreas endêmicas, a forma crônica do adulto mais frequente é de disseminação multifocal, com envolvimento dos pulmões, linfonodos, pele e mucosas. Essa forma tem evolução crônica com diagnóstico tardio. Tosse, dispneia e perda de peso associada a lesões cutâneas e das mucosas são evidentes e constituem as queixas principais da doença (MARCHIORI et al., 2011).

Quando os fatores ligados ao volume do inóculo, virulência do agente e capacidade de resposta imune do hospedeiro, o complexo pulmonar pode ser eliminado, evoluir para doença progressiva ou para estado de equilíbrio agente hospedeiro, o denominado foco quiescente com fungos viáveis. É possível a ocorrência transitória de disseminação linfo-hematogênica do fungo, bem como a instalação de focos quiescentes metastáticos em diferentes órgãos e sistemas (MARQUES, 2013).

A presença de lesões orocutâneas (tegumentares) específicas é de grande importância, tanto pela frequência com que ocorrem quanto por seu valor diagnóstico e significado clínico. Raros, porém, são os estudos que quantificaram e qualificaram as lesões cutâneas ou tegumentares na PCM. Estudos detectaram lesões cutâneas em 30% de pacientes jovens, com menos de 14 anos de idade e portadores de PCM forma juvenil. Identificaram lesões em 31,2% de 144 pacientes, independente da forma clínica. Em 166 pacientes, detectou a presença de lesões cutâneas em 54,2% deles. Esses estudos corresponderam à análise retrospectiva de prontuários, produto do registro de achados de diferentes observadores ao longo do tempo, portanto sujeito a viés de aferição (MARQUES, 2013).

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 et al., 2017).

Como não é doença de notificação compulsória no Brasil, a real prevalência da PCM não pode ser calculada, porém é considerada a terceira causa de morte por doença infecciosa crônica (CASTRO et al., 2013).

Segundo Coutinho et al. (2012) estudaram 3181 óbitos por PCM 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.

Na clínica, o diagnóstico é baseado na observação de sintomas e sinais clínicos e apoiado por análises laboratoriais microbiológicas e patológicas. Das análises laboratoriais, os exames sorológicos além da importância no auxílio diagnóstico, também avaliam a resposta ao tratamento e as recidivas da doença. As técnicas sorológicas disponíveis para o diagnóstico são a imunodifusão radial dupla, imunofluorescência, contra-imunoeletroforese, ELISA e immunoblotting (CASTRO et al., 2013).

A identificação do agente etiológico é fundamental para o melhor manejo das doenças infecciosas, sendo o diagnóstico assertivo é uma importante ferramenta para os médicos, pois pode aumentar a qualidade de vida do paciente, além disso, pode informar ao profissional de saúde sobre o prognóstico da doença, auxiliando na avaliação da evolução do tratamento (CAVALCANTE et al., 2014).

A imunofluorescência é um valioso instrumento auxiliar no diagnóstico laboratorial por ser uma técnica suficientemente simples e rápida, que apresenta melhores resultados em termos de sensibilidade e especificidade que as demais técnicas disponíveis para o diagnóstico laboratorial (MENDONÇA, et al., 2016).

O diagnóstico da doença pode ser realizado pelo exame micológico direto, radiológico, histopatológico e sorológico. Dos exames sorológicos, a imunofluorescência é uma das técnicas com grande assertividade no diagnóstico, possuindo sensibilidade de 90% e especificidade de 100% (ANDRADE et al., 2019).

Um dos principais métodos de diagnóstico sorológico da Paracoccidioidomicose é a técnica de imunofluorescência, que o seu

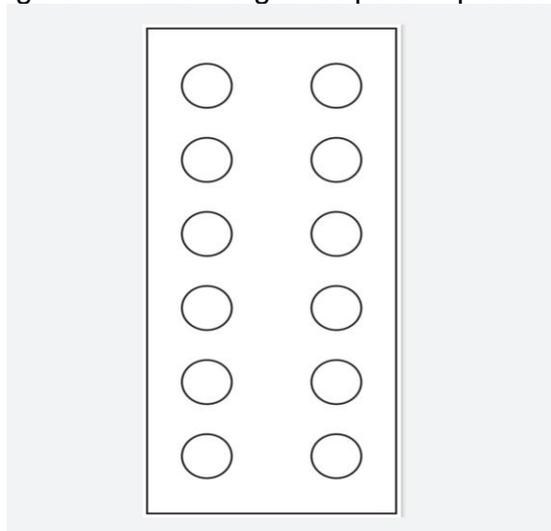
desenvolvimento consiste na utilização de lâmina de microscopia composta de 10 círculos, cujo será inserido em cada orifício os reagentes e a amostra sanguínea do paciente para detecção da patologia (MENDES et al., 2017).

Os estudos sobre a paracoccidiodomicose continuam até nossos dias, motivados pelas lacunas no conhecimento de seu ciclo biológico, sua complexa relação com o hospedeiro homem, objetivando melhor controle dessa endemia. O objetivo do presente estudo buscou desenvolver lâmina de microscopia específica e de baixo custo, para realização da técnica de imunofluorescência, para realização do diagnóstico da Paracoccidiodomicose.

## 2 MATERIAIS E MÉTODO

O presente trabalho foi realizado na Faculdade de Tecnologia de Bauru – FATEC Bauru, Bauru, SP. Para o desenvolvimento da metodologia foi utilizado o software CorelDRAW Graphics Suite para efetuar o desenho de 10 círculos, com diâmetro de 10mm cada, como pode ser observado na Figura 1.

Figura 1- Desenho gráfico para impressão.



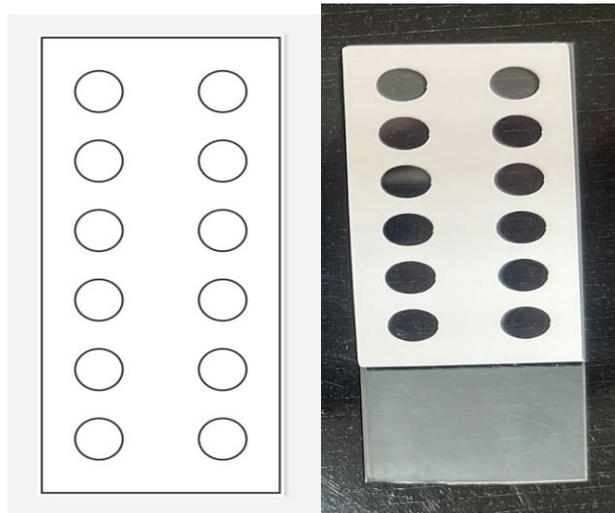
Fonte: Arquivo pessoal.

Após a elaboração do desenho gráfico foi realizada a impressão em papel adesivo tamanho A4 do material poliéster metalizado, em seguida foi inserido na lâmina de microscopia tamanho 26x76 mm ponta fosca.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado do presente estudo pode ser observado na figura 2.

Figura 2- Desenho gráfico e colagem na lâmina.



Fonte: Arquivo pessoal.

Após o desenvolvimento do desenho gráfico, foi enviado para impressão em papel adesivo, que depois de impresso foi colado na lâmina de microscopia para assim poder ser realizado os devidos estudos sobre a utilização desse novo método proposto, como consta na figura 3.

Figura 3- Lâmina de microscopia inseridas o impresso em papel adesivo.



Fonte: Arquivo pessoal.

Com a finalização do estudo obtemos resultados positivos pois conseguimos realizar desenvolvimento das lâminas de microscopia utilizadas da técnica de imunofluorescência para o diagnóstico de Paracoccidiodomicose consequentemente o que já era previsto conseguimos entregar um produto de baixo custo. Com o novo produto de diagnóstico de paracoccidiodomicose, a confecção das lâminas de inspeção se tornará muito simples, tornando mais rápida a aplicação dessa tecnologia, proporcionando assim um melhor atendimento aos pacientes pois irá ser possível a iniciação dos tratamentos mais rápido.

Com o aumento dos casos de PCM nas últimas décadas, são necessárias inovações nas técnicas diagnósticas, pois os métodos tradicionais têm se mostrado insensíveis e/ou demorados para um diagnóstico rápido e confiável.

O diagnóstico rápido e preciso da paracoccidiodomicose é essencial para iniciar o tratamento de forma eficaz e específica, evitando danos e sequelas nos pacientes acometidos.

O diagnóstico de PMC pode ser feito por cultura e isolamento de fungos, exame sorológico, exame histopatológico de pele e mucosas e observação de radiografia de tórax de envolvimento pulmonar. Histologicamente, a coloração de hematoxilina e eosina (HE) muitas vezes falha em identificar a morfologia do parasita, sendo necessário o uso de coloração de Grocott-Gomori e ácido periódico de Schiff (PAS). Elmo de marinho" (PINHEIRO et al., 2021).

O diagnóstico diferencial da paracoccidiodomicose é particularmente desafiador porque seus sinais e sintomas clínicos, bem como achados histopatológicos e radiológicos, assemelham-se aos de outras doenças, como coccidiodomicose, histoplasmose, tuberculose, doença etc. Seu tratamento inadequado pode trazer consequências prejudiciais para os pacientes (WAGNER et al., 2021).

A paracoccidiodomicose em hospedeiros imunocompetentes pode se manifestar de duas formas clínicas: aguda/subaguda e crônica. No entanto, achados clínicos associados à PCM em pacientes infectados pelo HIV sugerem que formas agudas e crônicas da doença podem ocorrer concomitantemente, o que pode aumentar a gravidade clínica em pacientes coinfectados por HIV/PCM (SHIKANAI et al., 2017).

A identificação de patógenos é fundamental para uma melhor gestão de doenças infecciosas. O diagnóstico sorológico serve como uma ferramenta importante para os médicos. Além disso, a sorologia pode informar os médicos sobre o prognóstico da doença e ajudar a avaliar o progresso do tratamento (CAVALCANTE et al., 2014).

Nos últimos anos, a detecção por imunofluorescência tornou-se o método preferencial para o diagnóstico inicial de casos suspeitos de PCM devido às vantagens de operação simples, sem necessidade de equipamentos caros e alta sensibilidade e especificidade (FRANCO et al., 2015).

Higueta-Gutiérrez, e colaboradores em 2019, realizaram uma meta-análise de testes imunológicos, pois eles têm sido amplamente utilizados como alternativas para o diagnóstico de PCM e, além da análise, permitem monitorar a evolução da doença e sua resposta ao tratamento. São mais simples e menos dispendiosos que os testes moleculares, o que deve facilitar sua implementação. Os principais testes imunológicos incluem imunodifusão em gel de ágar (IDGA), imunofluorescência indireta, ELISA, Western blot e Western Blot. Nesses testes, existem diferenças significativas na obtenção de antígenos e preparações de antígenos a partir de misturas de antígenos brutos parcialmente purificados, como gp43, o que pode ter implicações no desempenho diagnóstico, principalmente devido à reatividade cruzada com outros microrganismos.

Técnicas de imunodiagnóstico baseadas na detecção de antígenos fúngicos ou anticorpos do paciente são importantes para o diagnóstico, e glicoproteínas de 43 kDa (gp43), 70 kDa (gp70), 27 kDa (gp27) e 150 kDa (gp150) são amplamente utilizadas. Sabe-se que as glicoproteínas de 43 kDa, 70 kDa e 27 kDa são altamente específicas no diagnóstico de PCM, respondendo em 90% dos pacientes com PCM (CAVALCANTE, 2021).

Técnicas moleculares têm sido utilizadas como ferramentas para o diagnóstico de uma variedade de doenças fúngicas com resultados rápidos e

eficazes. Para identificar e diferenciar espécies de *Paracoccidioides* em amostras clínicas, foram utilizados primers baseados em sequências específicas de genes fúngicos, como gp43, gp27 e ITS 1 e 2 específicos para *Paracoccidioides brasiliensis* (SOUSA et al., 2021).

As técnicas histopatológicas permitem o isolamento de tecido a partir de biópsias e são relevantes para o diagnóstico patológico da PCM, permitindo a visualização da morfologia microscópica e resposta tecidual, visualização de células fúngicas com brotamento redondo, esférico ou elíptico, com dupla membrana birrefringente aderida à célula-mãe, com grandes granulomas densos preenchidos com células epitelioides contendo fungos. Apesar de sua inatividade e trauma para o paciente, a histopatologia é altamente sensível para o diagnóstico de PCM, pois facilita a visualização do patógeno e seu diagnóstico se realizado adequadamente (CAVALCANTE, 2021).

Um estudo de Moreira et al. (2020) mostrou que a imunoproteômica é considerada uma ferramenta poderosa para a identificação de antígenos, e que os antígenos são moléculas reconhecidas pelo sistema imunológico, tornando-os excelentes alvos para testes diagnósticos de doenças causadas por microrganismos. Possível estudar quais antígenos são secretados por espécies representativas do gênero *Paracoccidioides*. Além disso, essas análises permitem a identificação de excelentes candidatos a biomarcadores para triagem epidemiológica, diagnóstico e acompanhamento de pacientes. Tem sido observado que diferenças nos perfis de exoantígenos entre espécies podem ser validadas, e essas diferenças são essenciais para identificar biomarcadores específicos, funções biológicas, homologia de exoantígenos, predição de epítomos e obtenção de dados mais precisos para cada *Paracoccidioides spp.*

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para o diagnóstico da doença pela técnica de imunofluorescência é necessário a utilização de lâminas de microscopia, cujo a comercialização é escassa e custosa. Por essa razão, o presente trabalho pretendeu como um grande diferencial foi o desenvolvimento de lâminas de microscopia específica e de baixo custo, no qual foi realizada e alcançou o resultado esperado, com a elaboração do produto de objetivando a detecção da doença.

#### 5 REFERÊNCIAS

ANDRADE, U. V; OLIVEIRA, S. M. D. V. L; CHANG, M. R; PEREIRA, E. F; MARQUES, A. P. D. C; CARVALHO, L. R; MENDES, R. P; PANIAGO, A. M. M. Treatment compliance of patients with paracoccidioidomycosis in Central-West Brazil. **J Bras Pneumol**, v. 45, n. 2, p. e20180167, 2019.

BORGES-WALMSLEY, M. I., CHEN, D., SHU, X., WALMSLEY, A. R. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends in microbiology**, v.10, n. 2, p. 80-7, 2012.

CASTRO, L. F., FERREIRA, M. C., DA SILVA, R. M., BLOTTA, M. H., LONGHI, L. N., MAMONI, R. L. Characterization of the immune response in human paracoccidioidomycosis. **The Journal of infection**, v. 67, n. 5, p. 470–485, 2013.

CAVALCANTE, R.S., SYLVESTRE, T. F., LEVORATO, A. D., DE CARVALHO, L. R., MENDES, R. P. Comparison between itraconazole and cotrimoxazole in the treatment of paracoccidioidomycosis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 4, p. e2793, 2014.

CAVALCANTE, L. Aplicação das técnicas de diagnóstico da paracoccidioidomicose no Brasil: revisão sistemática. **South American Journal of Basic Education, Technical and Technological**, v. 6, n. 2, p. 762–775, 2021.

COUTINHO, Z. F., SILVA, D. D., LAZÉRA, M., PETRI, V., OLIVEIRA, R. M. D., SABROZA, P. C., WANKE, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cadernos De Saúde Pública**, v. 18, n. 5, p. 1441–1454, 2012.

FRANCO, M., BAGAGLI, E., SCAPOLIO, S., DA SILVA LACAZ, C. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. **Medical mycology**, v. 38, n. 3, p. 185–191, 2015.

HIGUITA-GUTIÉRREZ, L. F; QUINTERO-QUINCHÍA, C; MADERA-MIRANDA, I. C; & CARDONA-ARIAS, J. A. Metanálisis de pruebas inmunológicas para el diagnóstico de la infección por *Paracoccidioides*, 1972-2017. **Infecto**, v. 23, n. 2, p. 167-174, 2019.

MARQUES, S. A. Paracoccidioidomycosis: epidemiological, clinical, diagnostic and treatment up-dating. **Anais Brasileiros De Dermatologia**, v. 88, n. 5, p. 700–711, 2013.

MARCHIORI, E; VALIANTE, P. M; MANO, C. M; ZANETTI, G; ESCUISSATO, D. L; SOUZA, A. S. J. R; CAPONE, D. Paracoccidioidomycosis: high-resolution computed tomography-pathologic correlation. **Eur J Radiol**, v. 77, n. 1, p. 80-4, 2011.

MENDES, R. P; CAVALCANTE, R. S; MARQUES, S. A; MARQUES, M. E. A; VENTURINI, J; SYLVESTRE, T. F; PANIAGO, A. M. M; PEREIRA, A. C; SILVA, J. F; FABRO, A. T; BOSCO, S. M. G; BAGAGLI, E; HAHN, R. C; LEVORATO, A. D. Paracoccidioidomycosis: Current Perspectives from Brazil. **Open Microbiol J**, v. 11, p. 224-282, 2017.

MENDONÇA, J. A; PERON FILHO, F; SCHINCARIOL, N. B; VIERHOUT, C. V; PROVENZA, J. R. Achados ultrassonográficos osteomusculares na paracoccidioidomicose. **Revista Brasileira De Reumatologia**, v. 56, n. 1, p. 75–78, 2016.

MOREIRA, A. L. E., OLIVEIRA, M. A. P., SILVA, L. O. S., INÁCIO, M. M., BAILÃO, A. M., PARENTE-ROCHA, J. A., CRUZ-LEITE, V. R. M., PACCEZ, J. D., DE ALMEIDA SOARES, C. M., WEBER, S. S., BORGES, C. L. Immunoproteomic Approach of Extracellular Antigens From *Paracoccidioides* Species Reveals Exclusive B-Cell Epitopes. **Frontiers in microbiology**, v.10, p. 2968, 2020.

PINHEIRO, B. G; PÔSSA, A. P; DELLA TERRA, P. P; CARVALHO, J. A; RICCI, G; NISHIKAKU, A. S; RODRIGUES, A. M. A New Duplex PCR-Assay for the

Detection and Identification of Paracoccidioides Species. **Journal of Fungi**; v. 7, n. 3, p. 169, 2021.

SHIKANAI, Y. M. A; MENDES, R. P; COLOMBO, A. L; QUEIROZ, T. F; KONO, A. S. G; PANIAGO, A. M; NATHAN, A; VALLE, A. C. F. D; BAGAGLI, E; BERNARD, G; FERREIRA, M. S; TEIXEIRA, M. M; SILVA, V. M. L; PEREIRA, R. M; CAVALCANTE, R. S; HAHN, R; DURLACHER, R. R; KHOURY, Z; CAMARGO, Z. P; MORETTI, M. L; MARTINEZ, R. Brazilian guidelines for the clinical management of paracoccidioidomycosis. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 50, n. 5, p. 715-740, 2017.

SOUSA, J. A. B; Sá, R. S; Pereira, E. M. Consequences of late diagnosis paracoccidioidomycosis: case report. **Jornal Brasileiro De Patologia E Medicina Laboratorial**, v. 57, p. e2372021, 2021.

TEIXEIRA, M. M; THEODORO, R. C; CARVALHO, M. J. A; FERNANDES, L; PAES, H. C; HAHN, R. C; MENDOZA, L; BAGAGLI, E; SAN- B. G; FELIPE, M. S. S. Phylogenetic analysis reveals a high level of speciation in the Paracoccidioides genus molecular phylogenetics and Evolution. **Elsevier**, v. 52, p. 273-283, 2019. WAGNER, G; MOERTL, D; GLECHNER, A; MAYR, V; KLERINGS, I; ZACHARIAH, C; WILLINGER, B. Paracoccidioidomycosis Diagnosed in Europe. **A Systematic Literature Review. Journal of Fungi**, v. 7, n. 2, p. 157, 2021.