



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

AMANDA DE FÁVERI PITZ

**PADRONIZAÇÃO DE UMA SEMI-NESTED PCR EM ÚNICA
ETAPA PARA A DETECÇÃO MOLECULAR DE FUNGOS
PATOGENICOS**

AMANDA DE FÁVERI PITZ

**PADRONIZAÇÃO DE UMA SEMI-NESTED PCR EM ÚNICA
ETAPA PARA A DETECÇÃO MOLECULAR DE FUNGOS
PATOGENICOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Emerson José Venancio

Londrina
2011

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

P692p Pitz, Amanda de Fáveri.

Padronização de uma semi-nested PCR em única etapa para a detecção molecular de fungos patogênicos / Amanda de Fáveri Pitz. – Londrina, 2011.
60 f.

Orientador: Emerson José Venâncio.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2011.

Inclui bibliografia.

1. Patologia experimental – Teses. 2. Fungos patogênicos – Diagnóstico molecular – Teses. 3. Paracoccidiodomicose – Teses. 4. Micoses fungóides – Teses. I. Venâncio, Emerson José. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616-092

AMANDA DE FÁVERI PITZ

**PADRONIZAÇÃO DE UMA SEMI-NESTED PCR EM ÚNICA
ETAPA PARA A DETECÇÃO MOLECULAR DE FUNGOS
PATOGENICOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de mestre.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Emerson José Venancio
UEL – Londrina - PR

Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. Flávio de Queiroz Telles Filho
UFPR – Curitiba - PR

Londrina, 28 de fevereiro de 2011.

À minha família, em especial, meus pais
Roseli e Jonas Pitz, que sempre me ensinaram o caminho
do trabalho e da honestidade, e me apoiaram e
incentivaram a buscar por objetivos maiores.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela dádiva da vida, pelo constante e minucioso cuidado em todos os aspectos, e pela paz advinda da sua presença.

Ao meu orientador Prof. Dr. Emerson José Venancio, por me proporcionar a oportunidade de aprender sempre, pela enorme paciência durante esses valiosos anos de trabalho no laboratório, pela humildade admirável, pelos conselhos que sempre foram muito importantes e sempre serão lembrados com muito carinho, e principalmente pela amizade conquistada e pelo exemplo de pesquisador.

Ao Prof. Dr. Flávio de Queiroz Telles Filho, pelo aceite de convite para a banca de defesa, que certamente muito enriqueceu esses anos de estudo na área da micologia médica.

Às professoras Eiko Nakagawa Itano e Lucy Megumi Yamauchi Lioni, pelo aceite do convite para a banca de qualificação e pelas valiosas sugestões para melhorar ainda mais o trabalho desenvolvido.

Aos professores Rinaldo Ferreira Granda e Eduardo Alexandre Loth, pela atenção, e principalmente pela parceria estabelecida no envio das amostras clínicas, que foram de grande importância para a realização do presente trabalho.

À todos os professores do Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental, pelos momentos de partilha de conhecimento.

À minha família, pelo apoio e força, pais Roseli e Jonas Pitz, irmãos Viviane e Vinicius, e sobrinho Gabriel. Em especial, à minha mãe, pelos momentos de companhia e apoio, pelo amor demonstrado através do cuidado e preocupação com cada detalhe.

À Alfredo Castanha Coscia, pelo apoio, amor, paciência, e compreensão durante os dias e noites de estudo.

À minha amiga e irmã do coração Stephanie Caroline Bergamo Fazoli, que apesar da distância, sempre foi parte essencial da minha vida e me deu força para continuar na batalha.

À todos os meus amigos de turma de mestrado e do Laboratório de Imunologia IV, pela amizade, convivência e companheirismo, em especial, Andrea Cristine Koishi, Ana Carolina Navarro dos Santos, Ana Flávia Leal Specian, Bárbara Gionco, Carolina Sayuri Takamoto, Denise Turini Gonçalves Marioto, Eduardo Vignoto Fernandes, Eliandro Reis Tavares, Fábio Goulart de Andrade, Isabele Kazahaya, Julie Massayo, Marco Aurélio Chiara, Mariana Cerezini, Melina Bertolla Galvão, Narciso Junior Vieira, Sandmary Dechechi Chambó, Silas Eto e Thiago Fujita.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa fornecida durante o mestrado.

À todos aqueles que indiretamente me auxiliaram para a realização deste trabalho.

PITZ, Amanda de Fáveri. **Padronização de uma Semi-Nested PCR em Única Etapa para Detecção Molecular de Fungos Patogênicos**. 2011. 60 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

Na tentativa de contribuir para um diagnóstico mais rápido e preciso para infecções fúngicas, uma reação de *semi-nested* PCR em única etapa foi desenvolvida com oligonucleotídeos iniciadores para a região ITS do DNA ribossomal. O limite de detecção desta reação foi de 2,5 pg para DNA dos fungos *P. brasiliensis* e *H. capsulatum*. Não foram observadas reações cruzadas com os fungos *Candida albicans*, *Sporothrix schenckii*, *T. rubrum* e *Cryptococcus sp.* Para avaliar a eficiência da *semi-nested* PCR em única etapa desenvolvida neste estudo, fizemos a sua comparação com outras reações baseadas na reação em cadeia da polimerase (*nested* e *semi-nested* PCR) para identificação do fungo *P. brasiliensis*, utilizando DNA extraído de cultura e também de amostras de escarro de pacientes portadores da infecção. No total foram comparadas quatro reações diferentes, sendo duas de *nested*-PCR, uma de *semi-nested* PCR e uma de *semi-nested* PCR em única etapa (desenvolvida neste estudo), todas utilizam como alvo sequências das regiões espessadoras internas - *Internal Transcribed Spacer* (ITS1 e ITS2), caracterizada por possuir regiões altamente conservadas e regiões altamente específicas. Os resultados nos mostraram que o método de Imai *et al.* (2000) é o que apresenta menor limite de detecção (2,5 ng), enquanto que a reação de Theodoro *et al.* (2005) tem um limite de até 25 pg, enquanto a reação de Koishi *et al.* (2010) apresentou um limite de detecção de 2,5 pg, assim como a *semi-nested* PCR em única etapa desenvolvida neste estudo. A comparação também foi realizada com 14 amostras de escarro, sendo que a *semi-nested* PCR em única etapa e a reação de Koishi *et al.* (2010) foram positivas para todas as amostras, enquanto que as reações de Theodoro *et al.* (2005) e Imai *et al.* (2000) foram positivas para 8 e 4 amostras respectivamente. Foi também observado que a principal causa da diferença dos limites de detecção e do número de amostras clínicas positivas entre as reações foi o número de ciclos, uma vez que com o aumento do número de ciclos foi observado um aumento do limite de detecção e da quantidade de amostras clínicas para ambas as reações. A reação de *semi-nested* PCR em única etapa desenvolvida neste trabalho mostrou um limite de detecção semelhante a outras reações descritas na literatura, porém ela é mais rápida e menos propensa a contaminação do que as reações já descritas. Além disso, pode ser modificada para detecção de outros fungos patogênicos pela utilização de oligonucleotídeos iniciadores específicos. Por isso, esta reação de *semi-nested* PCR tem um grande potencial para ser utilizada no âmbito do diagnóstico molecular de infecções fúngicas.

Palavras-chave: Micoses. Paracoccidioidomicose. Histoplasmose. DNAr. Diagnóstico Molecular.

PITZ, Amanda de Fáveri. **Development of molecular reactions for pathogenic fungi detection.** 2011. 60 p. Dissertation (Master degree in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

In an attempt to contribute to a faster and more accurate diagnosis for fungal infection, a one tube semi-nested PCR was developed with primers for the ITS region of ribosomal DNA. The detection limit of this reaction was 2.5 pg of DNA from fungi *P. brasiliensis* and *H. capsulatum*. No cross reactions with the fungus *Candida albicans*, *Sporothrix schenckii*, *T. rubrum* and *Cryptococcus sp.* was observed. To evaluate the efficiency of one tube semi-nested PCR developed in this study, we compared with other reactions based on polymerase chain reaction (nested and semi-nested PCR) for identification of the fungus *P. brasiliensis*, using DNA extracted from culture, and sputum samples from patients with the infection. A total of four different reactions were compared, two nested-PCR, a semi-nested PCR and a one tube semi-nested PCR (developed in this study), all use as target sequences of Internal Transcribed Spacer (ITS1 and ITS2), characterized by presenting highly conserved regions and highly specific regions. The results show that the method of Imai et al. (2000) is due to a lower detection limit (2.5 ng), whereas the reaction of Theodoro et al (2005) presents a limit of 25 pg, while the response of Koishi et al (2010) shows a limit detection of 2.5 pg, as well as the one tube semi-nested PCR developed in this study. The comparison was also performed with 14 sputum samples, and the semi-nested PCR (Koishi et al., 2010) and one tube semi-nested were positive for all samples, while the reactions of Theodoro et al. (2005) and Imai et al. (2000) were positive for 8 and 4 samples respectively. It was also noted that the main cause of the difference of detection limits and the number of positive clinical samples from the reactions was the number of cycles, since the increase in the number of cycles was observed an increase in detection limit and the amount clinical samples for both reactions. The reaction of one tube semi-nested PCR developed in in this study showed a detection limit similar to other reactions described in literature, but it is faster and less prone to contamination than the reactions described above. Moreover, it can be modified to detect other pathogenic fungi by using specific primers. Therefore, this reaction semi-nested PCR has great potential to be used in the molecular diagnosis of fungal infections.

Keywords: Mycoses. Paracoccidioidomycosis. Histoplasmosis. Rdna. Molecular Diagnostics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - <i>P. brasiliensis</i> : colônia de leveduras e de micélio filamentoso título da figura.....	18
Figura 2 - Microscopia ótica da cultura de levedura de <i>P. brasiliensis</i>	18
Figura 3 - Distribuição geográfica da Paracoccidiodomicose	20
Figura 4 - <i>Histoplasma capsulatum</i> : cultivo das fases filamentosa e leveduriforme.....	23
Figura 5 - <i>Histoplasma capsulatum</i> var. <i>capsulatum</i> em esfregaço de escarro corado ao Grocott.....	25
Figura 6 - Estrutura da região gênica do DNAr. Sequência completa do 5.8S, incluindo as regiões intergênicas e sequências parciais das regiões 18S e 28S de <i>P. brasiliensis</i> . Regiões de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores da semi-nested PCR em única etapa para <i>P. brasiliensis</i>	31
Figura 7 - Estrutura da região gênica do DNAr. Sequência completa do 5.8S, incluindo as regiões intergênicas e sequências parciais das regiões 18S e 28S de <i>H. capsulatum</i> . Regiões de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores da semi-nested PCR em única etapa para <i>H. capsulatum</i>	34
Figura 8 - Sequência completa do 5.8S, incluindo as regiões intergênicas e sequências parciais das regiões 18S e 28S de <i>P. brasiliensis</i> . Regiões de anelamento dos oligonucleotídeos das quatro reações comparadas.....	35
Figura 9 - Reação de semi-nested PCR em única etapa, realizada sem e com a presença de gelatina, para o fungo <i>P.brasiliensis</i> e <i>H. capsulatum</i>	40
Figura 10 - Reação de semi-nested PCR em única etapa, realizada sem e com a presença do oligonucleotídeo ITS4, para o fungo <i>P. brasiliensis</i> e <i>H. capsulatum</i>	41
Figura 11 - Especificidade da semi-nested PCR em única etapa para <i>P. brasiliensis</i> e <i>H. capsulatum</i>	42
Figura 12 - Comparação das sensibilidades dos métodos de Imai <i>et al.</i> , 2000, Theodoro <i>et al.</i> ,2005, Koishi <i>et al.</i> , 2010, e da semi-nested PCR em única etapa.....	43
Figura 13 - Teste de limite de detecção para as reações de Imai <i>et al.</i> , 2000, e Theodoro <i>et al.</i> , 2005 com 35 ciclos.....	44

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Esquema de Tratamento ambulatorial para formas leves e moderadas da Paracoccidiodomicose22
- Tabela 2** - Programa das reações de *nested* PCR, *semi-nested* PCR e *semi-nested* PCR em um tubo utilizadas neste estudo39
- Tabela 3** - Resultado das PCRs das amostras clínicas de escarro de pacientes com PCM. Os números entre parênteses mostram os resultados das reações de Imai *et al.*, 2000 e Theodoro *et al.*, 2005 após aumentar a quantidade de ciclos48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µl	microlitro
%	por cento
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucléico
DNAr	DNA ribossômico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
fg	Fentograma
g	grama
L	litro
LDR1	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> cepa LDR1
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
M	Molaridade
mg	Miligrama
min	Minuto
mM	Milimolar
ng	nanograma
°C	Graus Celsius
pb	Pares de bases
Pb	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
Pb 18	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> cepa Pb 18
HC	<i>Histoplasma capsulatum</i>
PCM	Paracoccidioidomicose
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucléico
T_m	Temperatura de <i>melting</i>
V	volume
v/v	volume/volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE INFECÇÕES FÚNGICAS	13
1.2	<i>PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS</i>	17
1.2.1	A Biologia	17
1.2.2	Paracoccidioidomicose (PCM).....	19
1.3	<i>HISTOPLASMA CAPSULATUM</i>	23
1.3.1	A Biologia	23
1.3.2	Histoplasmose	24
2	OBJETIVOS	26
2.1	OBJETIVO GERAL	26
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
3	MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1	MICROORGANISMOS	27
3.2	AMOSTRAS CLÍNICAS	27
3.3	EXTRAÇÃO DE DNA	27
3.3.1	Fungos em Cultura	27
3.3.2	Amostras Clínicas.....	28
3.4	ANÁLISE DO DNA EXTRAÍDO	28
3.4.1	Integridade.....	28
3.4.2	Quantificação de DNA	28
3.4.3	Amplificação por PCR.....	29
3.5	DESENVOLVIMENTO DE UMA SEMI-NESTED PCR EM ÚNICA ETAPA PARA FUNGOS PATOGÊNICOS	29
3.5.1	Oligonucleotídeos Iniciadores - <i>P. brasiliensis</i>	30
3.5.2	Condições da semi-nested PCR em Única Etapa para <i>P. brasiliensis</i>	32
3.5.3	Semi-nested PCR em Única Etapa para <i>H. capsulatum</i>	33
3.6	COMPARAÇÃO DAS REAÇÕES DE NESTED, SEMI-NESTED, E SEMI-NESTED PCR EM ÚNICA ETAPA PARA DETECÇÃO DE <i>P. BRASILIENSIS</i>	34
3.6.1	NESTED PCR - MÉTODO DE IMAI <i>ET AL.</i> , 2000	36
3.6.1.1	Oligonucleotídeos Iniciadores - Imai <i>et al.</i> , 2000	36

3.6.1.2	Condições da nested PCR – Imai <i>et al.</i> , 2000	36
3.6.1.3	Programa da <i>nested</i> PCR - Imai <i>et al.</i> , 2000	36
3.6.2	<i>Nested Pcr</i> Método de Theodoro <i>et al.</i> , 2005	37
3.6.2.1	Oligonucleotídeos Iniciadores - Theodoro <i>et al.</i> , 2005.....	37
3.6.2.2	Condições da <i>nested</i> PCR - Theodoro <i>et al.</i> , 2005	37
3.6.2.3	Programa da <i>nested</i> PCR - Theodoro <i>et al.</i> , 2005	37
3.6.3	SEMI-NESTED PCR - MÉTODO DE KOISHI <i>et al.</i> , 2010	38
3.6.3.1	Oligonucleotídeos Iniciadores - Koishi <i>et al.</i> , 2010	38
3.6.3.2	Condições da semi- <i>nested</i> PCR - Koishi <i>et al.</i> , 2010	38
3.6.3.3	Programa da semi- <i>nested</i> PCR - Koishi <i>et al.</i> , 2010	38
3.7	ANÁLISE DOS RESULTADOS DA NESTED, SEMI-NESTED PCR E SEMI-NESTED PCR EM ÚNICA ETAPA.....	39
4	RESULTADOS	40
4.1	SEMI-NESTED PCR EM ÚNICA ETAPA	40
4.2	ESPECIFICIDADE DA REAÇÃO DE SEMI-NESTED PCR EM ÚNICA ETAPA PARA <i>P. BRASILIENSIS</i> E <i>H. CAPSULATUM</i>	42
4.3	COMPARAÇÃO ENTRE AS SENSIBILIDADES DOS MÉTODOS DE IMAI <i>ET AL.</i> , 2000, THEODORO <i>ET AL.</i> , 2005, KOISHI <i>ET AL.</i> , 2010 E A SEMI-NESTED PCR EM ÚNICA ETAPA	42
4.4	COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS DOS MÉTODOS DE IMAI <i>ET AL.</i> , 2000, THEODORO <i>ET AL.</i> , 2005, KOISHI <i>ET AL.</i> , 2010 E E SEMI-NESTED PCR EM ÚNICA ETAPA COM AMOSTRAS CLÍNICAS	44
5	DISCUSSÃO	46
	CONCLUSÕES	51
	REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

1.1 DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE INFECÇÕES FÚNGICAS

Nos últimos anos, os fungos têm emergido como importantes patógenos, principalmente dentro do ambiente hospitalar, sendo responsáveis pela mortalidade e morbidade em pacientes com câncer, pacientes da unidade de tratamento intensivo (UTI), transplantados, queimados, HIV-positivos e até mesmo idosos e recém-natos (EINSELE, *et al.*, 1997; BORMAN *et al.*, 2008).

O diagnóstico dessas infecções deve ser rápido, pois interfere diretamente no prognóstico do paciente e na escolha do tratamento adequado (WHITE *et al.*, 2009).

Diversos métodos e técnicas para o diagnóstico de infecções fúngicas estão disponíveis na rotina clínica laboratorial, como a observação direta da amostra biológica, o isolamento por cultura, a histopatologia, e os testes sorológicos. (ALBUQUERQUE *et al.*, 2005).

A observação direta do fungo na amostra clínica, na maioria dos casos, não permite a identificação da espécie ou mesmo do gênero de fungos que não apresentam estruturas morfológicas típicas como espécies do gênero *Candida*. (MARIMON *et al.*, 2007).

A eficiência da cultura pode ser variável e depende de vários fatores como: a experiência e a habilidade técnica do profissional envolvido, e da possibilidade do fungo ser cultivado. Apesar de a cultura ser relativamente simples, ter um baixo custo, e de permitir a identificação definitiva do agente, o fungo pode ter um tempo de crescimento acima de 20 dias, é vulnerável à contaminação e erro, podendo atrasar o tratamento correto, levando a riscos significativos ao paciente (ATKINS & CLARK, 2004; LINTON *et al.*, 2007). Além disso, para o cultivo de fungos é exigido um alto nível de biossegurança no laboratório (BIALEK *et al.*, 2000).

Os exames por histopatologia também são amplamente utilizados para o diagnóstico de infecções fúngicas, com coloração de hematoxilina e eosina, metanamina de prata, Grocott ou pelo *Periodic Acid Schiff* (PAS), porém a célula fúngica pode não ser observada no corte em análise, ou ainda serem observadas células fúngicas com morfologia atípica, o que dificulta a identificação do agente (BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993).

O teste de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) vem sendo utilizado para detecção e quantificação de anticorpos e antígenos, mas apesar de possuir uma alta sensibilidade, apresenta a desvantagem de não ser altamente específico. Também existem casos de pacientes colonizados e não infectados que apresentam níveis significativos de anticorpos específicos (ALBUQUERQUE *et al.*, 2005). Além disso, em pacientes imunocomprometidos, a produção de imunoglobulinas pode estar prejudicada, fazendo com que a sorologia não seja de grande importância nesses casos (VIDAL *et al.*, 2005).

Novas metodologias com testes mais rápidos e precisos vêm sendo desenvolvidas e usadas para o diagnóstico de infecções fúngicas. Estas incluem as tecnologias de sondas DNA/RNA e PCR. Em contraste aos métodos tradicionais, as amostras podem ser testadas diretamente, e isolados não exigem cultivo. São rápidos, específicos e podem ser usados para detectar pequenas quantidades de DNA. Estas tecnologias também podem ser realizadas como rotina e não exigem um alto nível de perícia para a interpretação dos resultados (ATKINS e CLARK, 2004).

Atualmente, vários autores têm pesquisado e descrito técnicas moleculares para a identificação de espécies fúngicas. Estes estudos tem tornado possível a detecção da infecção, mesmo antes do aparecimento dos primeiros sintomas, podendo precocemente facilitar o acompanhamento de pacientes de risco, como transplantados e queimados (BADIEE *et al.*, 2007)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi desenvolvida por Mullis e colaboradores na década de 80. É uma técnica para amplificação *in vitro* de sequências específicas de DNA utilizando a extensão simultânea de iniciadores ou oligonucleotídeos complementares às fitas do DNA em análise (McPHERSON, QUIRKE, TAYLOR, 1994).

A PCR pode ser uma importante ferramenta para o diagnóstico, podendo ser aplicada à vários fins dentro da microbiologia médica. O maior problema para esse tipo de reação é a contaminação das amostras clínicas por inibidores da PCR, como por exemplo, ácidos húmicos com grupos fenólicos, que possuem solubilidade similar à do DNA (ZHOU *et al.*, 1996; MOREIRA *et al.*, 1998).

A PCR pode apresentar variações, como a *nested* e a *semi-nested* PCR. A *nested* utiliza duas PCRs consecutivas, na primeira é empregado o uso de um par de iniciadores externos, enquanto que a segunda possui um par interno. Já na *semi-nested* PCR, que utiliza somente três iniciadores em duas reações de PCR

consecutivas, ou seja, um iniciador é comum nas duas reações. Nos dois casos, o fragmento maior gerado na primeira reação é utilizado como molde para a segunda, e o resultado pode ser até mil vezes mais sensível que a PCR padrão (McPHERSON *et al.*, 1994; KOISHI *et al.*, 2010).

As infecções causadas por *P. brasiliensis* e *H. capsulatum* são duas das mais frequentes infecções sistêmicas endêmicas causadas por fungos, e alguns estudos no campo do diagnóstico molecular dessas infecções vem sendo desenvolvidos. O escarro é um fluido biológico que pode ser útil no diagnóstico destas infecções (BORMAN *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2009).

O primeiro estudo que utilizou PCR para detecção de DNA de *P. brasiliensis* em amostras de escarro de pacientes com PCM foi descrito em 2000. A reação foi baseada em oligonucleotídeos iniciadores para sequências do gene da gp43, e foi capaz de detectar até 10 células do fungo por ml de escarro (GOMES *et al.*, 2000).

Para identificação de fungos em métodos moleculares, os genes que codificam para os RNAs ribossomais são constantemente utilizados. Estes genes, estão presentes em todos os organismos e em grande número de cópias, o que auxilia na sensibilidade das reações de PCR. O DNA ribossomal dos fungos é formado por três genes, o da subunidade maior (25S ou 28S), da subunidade menor (18S) e o gene 5.8S separados por regiões *internal transcribed spacer* (ITS). A região ITS, nos fungos, é característica por apresentar regiões altamente conservadas e regiões altamente variáveis, o que favorece o desenvolvimento de oligonucleotídeos específicos para a identificação de espécies fúngicas (ATKINS e CLARK, 2004; LINTON *et al.*, 2007; BORMAN *et al.*, 2008; WHITE, PERRY, BARNES, 2009).

Em 2000, Imai e colaboradores desenvolveram uma reação baseada na região ITS para *P. brasiliensis*, o produto da PCR foi detectado em todas as 29 cepas estudadas e nenhuma reatividade cruzada foi observada com *A. fumigatus*, *B. dermatitidis*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *H. capsulatum*, e *Penicillium marneffe* (IMAI *et al.*, 2000).

Posteriormente, foi descrita uma nova reação de *nested* PCR que também utilizou a região ITS para detecção molecular de *P. brasiliensis* em solo infectado com o fungo. Os resultados mostraram que a reação foi mais eficiente que

a cultura e a inoculação em animais. Além disso, foi possível a detecção do fungo em três de quatro amostras de solo inoculado analisadas (THEODORO *et al.*, 2005).

Com o objetivo de detectar DNA de *H. capsulatum*, uma semi-nested PCR foi desenvolvida para amplificar um fragmento do gene para o antígeno H em amostras como sangue. A reação foi capaz de detectar menos de 10 células do fungo e não apresentou reação cruzada com espécies fúngicas e bacterianas (BRACCA *et al.*, 2003).

A PCR em tempo real também é uma técnica muito estudada para o diagnóstico, combinando a amplificação da PCR com os fluoróforos. A PCR em tempo real é um método bastante rápido e busca maior eficiência, sensibilidade e especificidade ao resultado, possibilitando o uso de material genético obtido de culturas puras ou de amostras clínicas (ESPY *et al.*, 2006).

Diversas reações de PCR em tempo real foram descritas para a detecção de fungos, e em um dos estudos, a região ITS2 foi alvo para a identificação de *Candida sp.* e *Aspergillus sp.* e a diferenciação entre as duas espécies foi realizada através da curva de dissociação, sendo que a menor quantidade de detecção pela técnica, foi de uma unidade formadora de colônia (CFU) por PCR (SCHABEREITER-GURTNER *et al.*, 2007).

Uma reação de PCR em tempo real foi desenvolvida para detecção de *H. capsulatum*, utilizando-se a região ITS. A reação identificou corretamente 34 isolados do fungo em meio a 107 isolados de outras espécies, além disso, foi capaz de detectar a infecção em amostras de lavagem broncoalveolar e biópsia de pulmão de três pacientes com histoplasmose confirmada por cultura (MARTAGON-VILAMIL *et al.*, 2003).

Apesar dos resultados já obtidos em trabalhos anteriores para identificação de fungos, ainda é necessário o desenvolvimento de uma técnica de PCR que possa ser utilizada para a identificação de qualquer fungo, que seja rápida, com menores riscos de contaminação, sensível e específica.

As infecções causadas por *P. brasiliensis* e *H. capsulatum* são duas das mais frequentes infecções sistêmicas endêmicas causadas por fungos, e por isso foram selecionados para o desenvolvimento da semi-nested PCR em um tubo descrita neste trabalho.

Uma descrição mais detalhada da biologia de cada espécie e da infecção fúngica em si é apresentada logo abaixo.

1.2 *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS*

1.2.1 A Biologia

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da micose sistêmica chamada Paracoccidioidomicose (PCM). O fungo já foi considerado de espécie única, mas com o aumento do uso de métodos moleculares foi possível considerar a existência de três espécies filogenéticas diferentes para *P. brasiliensis* denominadas: S1, PS2 e PS3 (MATUTE *et al.*, 2006).

Em 2009, Takayama e colaboradores observaram a existência de um isolado atípico do fungo, e pela análise de múltiplos genes sugeriram a existência de uma nova espécie. Muitos estudos estão sendo realizados no campo da filogenia da espécie *Paracoccidioides*, e recentemente uma nova espécie denominada *Paracoccidioides lutzzi*. Geneticamente ela é bastante diferente dos demais isolados de *P. brasiliensis*, além de ter uma maior frequência na região Centro-Oeste do Brasil (OLIVEIRA *et al.*, 2010; THEODORO *et al.*, 2010; BAGAGLI e THEODORO, 2010).

P. brasiliensis é um fungo que apresenta dimorfismo dependente de temperatura, sendo assim, observamos a forma micelial à temperatura de 25°C, e a forma de levedura a 37°C. Essa transformação é reversível e dependente da regulação enzimática da síntese de glucanas que causam modificações na parede celular do fungo (ARRAES *et al.*, 2005). A cultura das formas de filamento e levedura são mostradas na figura 1.

O fungo pode ter mais que um núcleo, e em seu citoplasma foram visualizados vacúolos, retículo endoplasmático e ribossomos. As mitocôndrias são numerosas em células jovens, e os vacúolos aumentam de tamanho com o envelhecimento celular. A parede celular é formada por duas camadas, sendo a camada externa elétron-densa, formada por β -1-3 glucana na forma micelial e α -1-3 glucana na forma de levedura. A camada interna é elétron-transparente, formada por quitina e justaposta à membrana citoplasmática (ALMEIDA, JACKS, SCULLY, 2003). A β -1-3 glucana é um polissacarídeo que contém apenas glicose em sua composição e é considerado determinante para o dimorfismo e também como fator de virulência (SAN-BLÁS; NIÑO-VEGA, 2008).

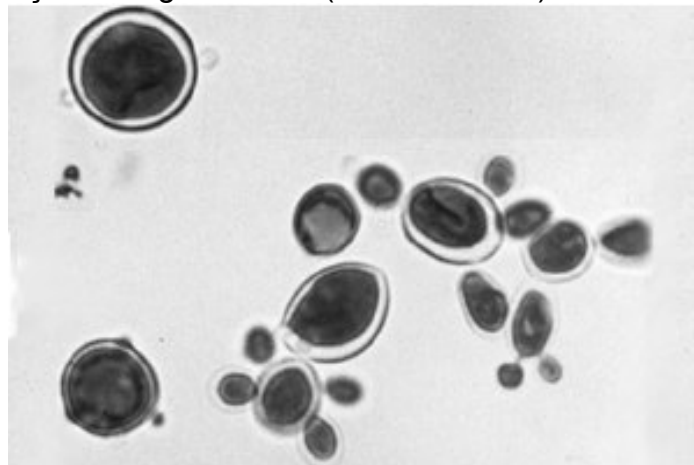
Figura 1 - *P. brasiliensis*: colônia de leveduras, com aspecto cerebriforme obtida a 37°C (à esquerda) e colônias de micélio filamentoso e esbranquiçado obtidas por crescimento a temperatura entre 25 e 30°C (à direita).



Fonte: R. Martinez (2004).

Uma característica importante, é a formação de novos fungos por brotamentos da parede das células mães, resultando, numa forma típica chamada roda-de-leme (MARTINEZ 2004), mostrada na Figura 2.

Figura 2 - Microscopia ótica da cultura de levedura de *P. brasiliensis* a 36°C (Ágar tripticase de soja). Brotamentos característicos formando “roda-de-leme”. Preparação de algodão azul (Aumento 40 X).



Fonte: CORREDOR *et al.*, 1999.

Existem poucos dados sobre a ecologia e o habitat do fungo *P. brasiliensis*, mas acredita-se que o fungo viva em solo úmido, rico em matéria orgânica (RESTREPO, 1985), havendo alguns casos de isolamento do fungo do solo na Argentina (NEGRONI, 1966), na Venezuela (ALBORNOZ, 1971) e no Brasil, em uma plantação de café no estado de Minas Gerais (SILVA-VERGARA *et al.*, 1998).

O fungo já foi isolado também de fezes de pinguim da espécie *Pigocelis adelia* (GEZUELE, 1989); ração de cães (FERREIRA *et al.*, 1990) e de tatus da espécie *Dasypus novemcinctus* (SILVA-VERGARA *et al.*, 2000). Os tatus parecem ser importantes na eco-epidemiologia do fungo, pelo frequente isolamento do mesmo de seus órgãos e principalmente a observação constante de lesões granulomatosas nos pulmões desses animais, sugerindo então que o tatu também pode desenvolver a doença (DIEZ *et al.*, 1999; MARTINEZ, 2004; BAGAGLI *et al.*, 2006)

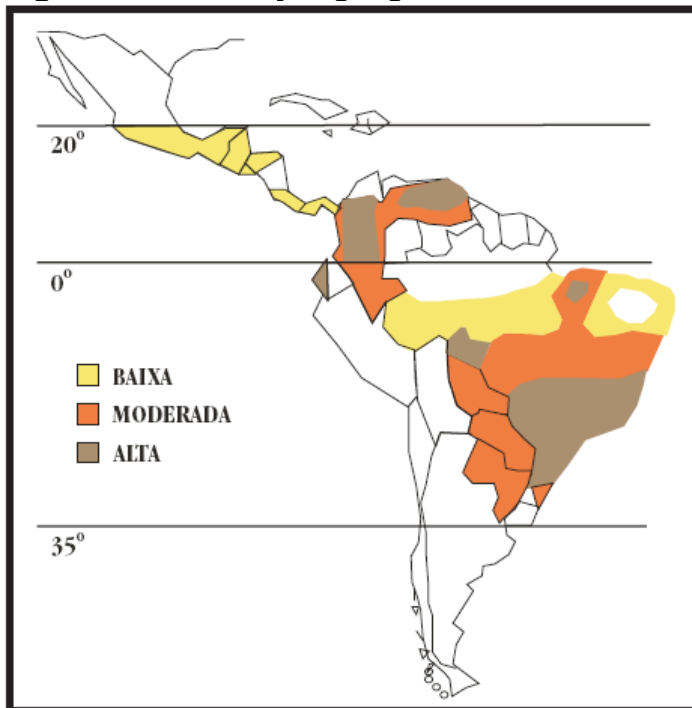
Além do tatu, os cães estão frequentemente entrando em contato com o fungo e podem eventualmente desenvolver a doença (ONO *et al.*, 2001; ONO *et al.* 2003; EISELE *et al.* 2004; RICCI *et al.*, 2004).

1.2.2 Paracoccidioidomicose (PCM)

O primeiro relato da Paracoccidioidomicose foi feito pelo médico e cientista Adolpho Lutz, em 1908, em dois pacientes que apresentavam lesões orais e linfadenopatia cervical. Lutz foi o primeiro a identificar o material retirado das lesões e a efetuar o primeiro isolamento do fungo em cultura, diferenciando a forma filamentosa (LUTZ, 1908; MARTINEZ, 2004).

A PCM é uma micose sistêmica que ocorre somente na América Latina, com exceção dos casos importados, ou seja, quando um indivíduo de uma área ou país onde não ocorre a PCM adquire a mesma devido a uma viagem à um local endêmico (ALMEIDA *et al.*, 2003; MAYAYO *et al.*, 2007). É considerada uma das mais importantes micoses sistêmicas no Brasil, e ocorre principalmente nas regiões Sul e Centro-Oeste do país (BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993; COUTINHO *et al.*, 2002; VERLI *et al.*, 2005).

Figura 3 - Distribuição geográfica da Paracoccidioidomicose.



Fonte: Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006.

A infecção tem início com a inalação de conídios, que atuam como propágulos infecciosos, e depende da transformação dimórfica de micélio para levedura, que ocorre geralmente nos pulmões do hospedeiro, causando uma infecção primária, podendo ainda ocorrer disseminação para outros locais por vasos sanguíneos e linfáticos (ARISTIZABAL *et al.*, 1998; ALMEIDA *et al.*, 2003).

Há duas diferentes formas clínicas de PCM, a aguda e a crônica. A forma aguda representa somente 3 a 5% dos casos, afetando principalmente crianças e adolescentes, e é caracterizada por um curso mais rápido e grave da doença, lesões pulmonares raramente estão presentes. A forma crônica ocorre em mais de 90% dos pacientes, sendo grande parte dos pacientes do sexo masculino. A PCM crônica afeta primariamente os pulmões, mas pode se disseminar para outros órgãos e sistemas (BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993; ALMEIDA *et al.*, 2003).

A PCM ocorre predominantemente em indivíduos do sexo masculino, com faixa etária de 40 anos e profissão relacionada à agricultura (GODOY; REICHART, 2003; PANIAGO *et al.*, 2003; SILVA, 2008). Essa preferência do microrganismo por indivíduos do sexo masculino é explicada pela ação protetora do estradiol em mulheres. Este hormônio feminino pode inibir a transição da forma

micelial para a forma de levedura, alterando os perfis de síntese de proteínas da parede do fungo (SALAZAR; RESTREPO; STEVENS, 1988; BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002).

O etilismo e tabagismo são hábitos que estão frequentemente associados PCM (MARTINEZ, MOYA, 1992; BLOTTA *et al.*, 1999; SANTOS *et al.*, 2003; SILVA, 2008).

A resposta do hospedeiro mais eficiente contra *P. brasiliensis* é a resposta imune celular, sendo os macrófagos as principais células de defesa contra o fungo, realizando fagocitose, ainda assim, o fungo pode sofrer replicação intracelular na ausência de interferon- γ (IFN- γ) (BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002).

O tratamento da PCM geralmente é prolongado, e a maioria dos pacientes devem receber a terapia durante um a dois anos (VALLE *et al.*, 1993). Na ausência de terapias com fármacos, o indivíduo poderá ir à óbito (MARTINEZ, 2004).

Tabela 1 - Esquema de Tratamento ambulatorial para formas leves e moderadas da Paracoccidiodomicose

Medicamentos	Dose	Duração do tratamento
Itraconazol**	Adultos: 200mg por dia, logo após uma das refeições principais (almoço ou jantar), em uma única tomada. Crianças com < 30kg e > 5 anos, 5 a 10mg/kg/dia, ajustar a dose não abrindo a cápsula***	6 a 9 meses nas formas leves e 12 a 18 meses nas formas moderadas
Sulfametoxazol /trimetoprim**	Adultos: trimetoprim: 160 a 240mg sulfametoxazol 800mg a 1.200mg. VO 12/12hs Crianças – trimetoprim, 8 a 10mg/kg sulfametoxazol, 40 a 50 mg/kg, VO 12/12h	12 meses nas formas leves e de 18 a 24 meses, nas formas moderadas.

*Ver item critérios de gravidade. Casos graves devem ser encaminhados a centros de maior resolutividade.

** Primeira escolha para adultos, com base na facilidade de administração, melhor aderência e tolerabilidade. Crianças que não deglutem cápsulas de itraconazol podem ser tratadas com a solução oral de sulfametoxazol/trimetoprim.

*** Maior experiência em crianças é com sulfametoxazol/trimetoprim.

Fonte: Shikanai-Yasuda *et al.*, 2006.

Apesar da limitação das informações disponíveis em estudos comparativos com diferentes esquemas terapêuticos, sugere-se o itraconazol como a opção terapêutica que permitiria o controle das formas leve e moderada. Entretanto, considerando que o medicamento não está disponível na rede pública da maioria dos Estados, a associação sulfametoxazol/trimetoprim é a alternativa mais utilizada na terapêutica ambulatorial dos pacientes com PCM. Pacientes com formas graves, necessitando de internamento hospitalar, devem receber anfotericina B ou associação sulfametoxazol/trimetoprim por via intravenosa (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 2006).

1.3 HISTOPLASMA CAPSULATUM

1.3.1 A Biologia

O fungo *H. capsulatum* é o agente etiológico da Histoplasmose, uma micose sistêmica que acomete o homem e outros mamíferos (KAUFFMAN, 2007).

São admitidas três variedades *H. capsulatum*, var. *capsulatum*, var. *farciminosum* e var. *duboisii* (KASUGA, TAYLOR, WHITE, 1998; KOMORI *et al.*, 2005).

H. capsulatum é um fungo termodimórfico, apresentando a forma de micélio à temperatura de 25°C, e a forma de levedura a 37°C (hospedeiro humano) (KAUFFMAN, 2006).

O microrganismo já foi isolado de fezes de aves, morcegos e outros mamíferos (SILVA-VERGARA *et al.*, 2001) assim como de solos enriquecidos com nitrogênio e fósforo, contendo fezes desses animais. Os morcegos são potenciais dispersores da doença, e existem muitos relatos de histoplasmose em visitantes e exploradores de cavernas habitadas por esses animais. Além das cavernas, minas abandonadas e casas inabitadas são também propícios para o habitat do fungo, principalmente por serem locais úmidos e escuros (TAYLOR *et al.*, 1999; TAYLOR *et al.*, 2005).

Figura 4 - Cultivo das fases filamentosa (esquerda) e leveduriforme (direita) de *Histoplasma capsulatum*.



Fonte: Wanke & Lazera (2004).

1.3.2 Histoplasmose

A histoplasmose foi descrita pela primeira vez entre 1905 e 1906, por Samuel Darling, que necropsiou três casos disseminados da doença. Na época a doença descrita pelo patologista era similar à Leishmaniose visceral, e foi por ele considerada erroneamente ser causada por um protozoário encapsulado. Somente em 1934, o microrganismo foi corretamente identificado como um fungo termodimórfico (FERREIRA, BORGES, 2009)

A infecção tem uma prevalência mundial, e é considerada a principal doença respiratória causada por fungos no mundo, sendo encontrada principalmente no Hemisfério Norte, incluindo algumas áreas do sudoeste dos Estados Unidos, sul do México e da América do Sul (KAUFFMAN, 2007).

No Brasil, surtos de histoplasmose já foram observadas nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Mato Grosso e Minas Gerais (FERREIRA, BORGES, 2009). Em algumas regiões do vale do Mississipi e Ohio cerca de 90% da população está infectada (WOODS, 2002).

Em geral, em áreas endêmicas de histoplasmose, aproximadamente 80% da população, com idade maior que 20 anos, mostram reações cutâneas de hipersensibilidade a histoplasmina positivas (FERREIRA & BORGES, 2009)

A entrada no hospedeiro pode se iniciar pela inalação de propágulos na forma micelial do fungo e posteriormente devido ao dimorfismo, ocorre o aparecimento de células leveduriformes que podem sobreviver e se multiplicar dentro dos macrófagos. A infecção pode ser restrita aos pulmões ou ainda atingir outros órgãos, principalmente quando a infecção ocorre em pacientes imunocomprometidos (RETALLACK e WOODS, 1999; RICKETS *et al.*, 2002).

A resposta imune mais eficiente do organismo contra o fungo é do tipo celular, que é observada principalmente após a segunda semana de infecção. Com a alta produção de interferon-gama e outras citocinas, ocorre a ativação dos macrófagos, os quais adquirem capacidade de lisar leveduras de *H. capsulatum* (WHEAT *et al.*, 2007).

Pacientes com linfomas, transplantados renais, cardíacos e hepáticos, pacientes em uso de altas doses de corticosteróides e, particularmente, doentes com AIDS, podem desenvolver quadros de Histoplasmose disseminada (UNIS, OLIVEIRA, SEVERO, 2004).

A infecção por *H. capsulatum* também acomete trabalhadores rurais, da construção civil e faxineiros, frequentemente em atividades relacionadas à presença de detritos acumulados, aumentando a probabilidade de inalação dos propágulos infectantes (HAGE *et al.*, 2008).

Figura 5 - *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* em esfregaço de escarro corado ao Grocott, mostrando os elementos leveduriformes unibrotantes característicos.



Fonte: Wanke & Lazera (2004).

Em pacientes saudáveis, reinfecções excepcionalmente acontecem, mas em pacientes com quadro de imunodepressão, células fúngicas viáveis podem permanecer nas áreas cicatrizadas por vários anos, podendo ocorrer a reativação de uma infecção prévia (ROSSINI & GOULART, 2006)

O tratamento é instituído pelo uso de cetoconazol e/ou itraconazol em casos de infecção leve e moderada. Na doença disseminada, o tratamento sistêmico com anfotericina B é quase sempre curativo, embora alguns pacientes possam necessitar de tratamento prolongado e monitorização para evitar recidivas. Tipicamente os pacientes com AIDS sofrem recidiva apesar da terapia, por consequência, esses indivíduos necessitam do tratamento com manutenção do cetoconazol por via oral ou com anfotericina B semanalmente (NEGRONI *et al.*, 2000).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver reações de detecção molecular para fungos patogênicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desenvolver reações de semi-*nested* PCR em única etapa/um tubo para detecção molecular dos fungos *P.brasiliensis* e *H. capsulatum*.

Avaliar a reação de semi-*nested* PCR em única etapa para detecção de *P.brasiliensis* em amostras clínicas de escarro de pacientes com PCM.

Comparar as reações descritas por Imai *et al.*, 2000, Theodoro *et al.*, 2005, Koishi *et al.*, 2010 e a semi-*nested* PCR em única etapa na detecção de *P. brasiliensis* em amostras clínicas de escarro de pacientes com PCM.

3 METODOLOGIA

3.1 MICRORGANISMOS

No presente estudo foram utilizadas amostras dos seguintes microrganismos: *P. brasiliensis* cepas LDR 1 e Pb 18 (cedidos pelo Prof. Dr. Mario Augusto Ono), *Cryptococcus sp* (cedido pela Profa. Regina Mariuza Borsato Quesada), *Sporothrix spp*, *Histoplasma capsulatum* (cedidos pela Profa. Dr Halha Ostrensky Saridakis) e *Candida albicans* cepa CR15 (cedido pela Profa. Dr Ionice Felipe) e *Trichophyton rubrum* (cedido pela Profa Regina Mariuza Borsato Quesada) para uso nas reações de especificidade. Todas as amostras foram imediatamente processadas para a extração de DNA.

3.2 AMOSTRAS CLÍNICAS

As quatorze amostras clínicas de escarro de pacientes com paracoccidioidomicose foram gentilmente fornecidas pelos Prof. Dr. Rinaldo Ferreira Granda e Prof. Ms. Eduardo Alexandre Loth.

Essas amostras clínicas foram coletadas de Janeiro de 2009 a Julho de 2010, no Hospital Universitário de Cascavel, pela Universidade do Oeste do Paraná, Cascavel, Paraná, Brasil. Esse estudo foi aprovado pela Comissão de ética em Seres Humanos da Universidade do Oeste do Paraná processo nº 27373/2009, CAAE nº 0097.0.276.000-09.

3.3 EXTRAÇÃO DE DNA

3.3.1 Fungos em Cultura

Aproximadamente 100 mg do fungo em cultura foram macerados em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. O material foi transferido para um tubo plástico contendo 300 µl de fenol-clorofórmio (v/v) e 200µl de água estéril. A mistura foi centrifugada (Cientec, CT-14000) a 14.000 g por 10 minutos (2 repetições) e o sobrenadante transferido para um novo tubo, limpo e esterilizado. A precipitação do DNA foi feita com 0,1 V de acetato de sódio e 2,5 V de etanol

absoluto, incubado a 4°C por no mínimo 2 horas, seguido de centrifugação a 14.000 g por 10 minutos e lavagem com etanol 70%. Após secagem, o precipitado foi ressuspensionado em 50 µl de água ultra pura.

3.3.2 Amostras Clínicas

Para extração de DNA das amostras de escarro foi realizado o mesmo procedimento descrito acima. Em algumas amostras foi necessário repetir o processo a partir do procedimento de centrifugação com fenol-clorofórmio para eliminar inibidores de PCR.

3.4 ANÁLISE DO DNA EXTRAÍDO

3.4.1 Integridade

Após a extração de DNA, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,25% e analisadas quanto à integridade do DNA.

3.4.2 Quantificação de DNA

A concentração do DNA extraído das colônias de fungos foi obtida através de leitura em espectrofotômetro a 260 nm, de acordo com a seguinte relação: 1OD = 50ng/µl de DNA dupla fita (HAQUE *et al.*, 2003); e sua pureza determinada pela razão $A_{260/280}$ e $A_{260/230}$.

Na razão $A_{260/280}$ um valor maior que 1.7 é indicativo de DNA puro, enquanto que uma razão baixa indica contaminação por proteínas. Na razão $A_{260/230}$ um valor maior que 2 é indicativo de DNA puro, enquanto que uma razão baixa indica contaminação por fenol/ácidos húmicos (STEFAN *et al.*, 1988).

A concentração de todas as amostras de extração de DNA foi ajustada para 12,5 ng/µL.

3.4.3 Amplificação por PCR

Para fazer um controle da extração de DNA das amostras clínicas, foi feita uma PCR para o gene da quimiocina CXCL12.

Esta reação foi realizada para as quatorze amostras clínicas de escarro de pacientes com Paracoccidioidomicose, juntamente com os controles positivo (250 ng DNA humano) e negativo (água ultra-pura).

Foram utilizados os oligonucleotídeos SDF1 (5' CAG TCA ACC TGG GCA AAG CC 3') e SDF2 (5' CCT GAG AGT CCT TTT GCG GG 3'), que geram um fragmento de 293-pb.

A reação foi feita para um volume final de 25 µl, contendo 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil), 1x de tampão de reação (20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl) (Invitrogen, Brasil), 1,5mM de MgCl₂ (Invitrogen, Brasil), 0,25 mM dNTPs (Amresco) e 1,5µM de cada oligonucleotídeo iniciador (Invitrogen, Brasil).

O termociclador (Biocycler) foi programado para denaturação inicial a 94°C por 5 min, seguida de 25 ciclos de denaturação a 95°C por 1 min, anelamento dos oligonucleotídeos a 60°C por 1 min, extensão a 72°C por 1 min, e extensão final a 72°C por 10 min.

3.5 DESENVOLVIMENTO DE UMA SEMI-NESTED PCR EM ÚNICA ETAPA PARA FUNGOS PATOGENICOS

A reação aqui descrita, foi desenvolvida com o objetivo de detectar DNA de diversas espécies fúngicas por uma *semi-nested* PCR em um tubo específica para a região ITS.

Basicamente, para realizar a *semi-nested* PCR em uma única etapa, é necessário o uso dos oligonucleotídeos iniciadores ITS13B, ITS4, e um terceiro oligonucleotídeo iniciador espécie específico.

Durante a padronização desta reação, foi testado o uso de BSA (*Bovine Serum Albumin*) (2,5µg/ml, 5µg/ml e 25µg/ml), DMSO (Dimetilsulfóxido) (2,5%, 5% e 10%), e gelatina (0,1mg/ml e 0,2mg/ml).

Uma característica desta reação é que o oligonucleotídeo específico tem uma temperatura de anelamento significativamente maior que a dos demais oligonucleotídeos, tornando possível a realização da *semi-nested* PCR em um único

tubo. Para isso, diversas temperaturas de anelamento de oligonucleotídeos para a segunda etapa de ciclos foram testadas, sendo 65°C, 68°C, 70°C e 72°C.

Para o desenvolvimento dessa reação, nos baseamos nos oligonucleotídeos ITS1 e ITS4, descritos por White *et al.*, (1990 *apud* MOTOYAMA *et al.*, 2000) que são universais para fungos e correspondem a parte das sequências 18S e 28S, que flanqueiam o DNA ribossômico 5.8S, e das regiões ITS (*internal transcribed spacer*).

Na reação, foi utilizado o oligonucleotídeo ITS1 com uma modificação em relação à descrição original. A modificação consistiu a adição de três bases nitrogenadas na posição 5', (ITS13B - 5' - GTT TCC GTA GGT GAA CCT GCG G - 3').

Para realizar esta modificação, as sequências nucleotídicas da região ITS1, 5.8S E ITS2 do DNA genômico de alguns fungos foram obtidos do banco de dados (GenBank) disponível no sítio <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, sendo 73 de *Histoplasma capsulatum*, 11 de *Coccidioides immitis*, 18 de *Sporothrix schenckii*, 41 de *Paracoccidioides brasiliensis*, 6 de *Blastomyces dermatitidis*, 11 de *Aspergillus fumigatus* e 34 de *Candida albicans*. Posteriormente, essas sequências foram alinhadas, e uma sequência consenso foi obtida através do programa Bio Edit (versão 7.0.9) para a construção do oligonucleotídeo ITS13B.

Para concluir, através das mesmas sequências de espécies fúngicas já citadas acima, foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada espécie estudada. Após as sequências serem alinhadas, e obtido uma sequência consenso para cada espécie, uma região onde não apresentou variação foi selecionada como oligonucleotídeo. Para a avaliação das sequências dos oligonucleotídeos iniciadores, bem como o T_m (Temperatura de *melting*) foi utilizado o programa Oligo Analyzer versão 1.0.2.

3.5.1 Oligonucleotídeos Iniciadores – *P. brasiliensis*

Para a reação de detecção do fungo *P. brasiliensis*, nos baseamos no oligonucleotídeo MJ03, descrito por Koishi *et al.*, 2010, específico para *P. brasiliensis*. Contudo, para sua utilização na reação de semi-nested PCR em um tubo foi necessária a adição de 4 bases nitrogenadas na porção 5', sendo então o

oligonucleotídeo iniciador modificado chamado MJ034B (5' - ATA GGT CTC AGA CGT CAA AGC TCC - 3') (Figura 7). Essas modificações foram realizadas a partir de seqüências de *P. brasiliensis* (AB304414, AB304421, AB304431, AB304437, AB035710, AY374336, AB038164, AY631234, AY445662, AF416745, AF038460, AY618990, AY618999, AF092903, AF322389) e espécies relacionadas (AB071821, AB071822, AB071823, AB232890, AB232891, AB232893, ADU18364, AF038355, AF038356, AB122038, AB122039, AB122040) depositadas no GenBank.

Figura 6 - Estrutura da região gênica do DNAr. Setas indicam os sitios de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores ITS13B, ITS4 e MJ034B (A). Sequência completa do 5.8S, incluindo as regiões intergênicas e seqüências parciais das regiões 18S e 28S de *P. brasiliensis*. As regiões em negrito e sublinhadas representam os locais de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores necessários para a realização da *semi-nested* PCR em única etapa para detecção de *P. brasiliensis* (AB035710.2) (B).

A



B

ITS13B

1 GGAAGTAAAA GTCGTAACAA **GGTTCCGTA GGTGAACCTG CGGAAGGATC ATTAACGCGC**

61 CGTGGGGGGA CGGGGCCCGA TCGGGTTCCC GGCCCTCTCA CCTGGCCACC CTTGTCTATT

121 CTACCTGTTG CTTCGGCGGG CCTGCAGCGA TGCTGCCGGG GGGGCTCGGC CTCCCGGGCT

181 CGTGCCCGCC GGGGACACCG TTGAACTTCT GGTTC**GGAGC TTTGACGTCT GAGACCTATC**

MJ034B

241 ATAATCAGTA **AAAAC TTTCA ACAACGGATC TCTTG GTTCC GACATCGATG AAGAACGCAG**

301 CGAAATGCGA TAAGTAATGT GAATTGCAGA ATTCCGTGAA TCATCGAATC TTTGAACGCA

361 CATTGCGCCC TCTGGTATTC CGGGGGGCAT GCCTGTCCGA GCGTCATTTT AACCCTCAAG

421 CGCGGCTTGC GTGTTGGGCC CGCGTCCCC CGTGGACGTG CCCGAAATGC AGCGGCGGCG

481 TCGCGTTCCG GTGCCCGAGC GTATGGGGCT TCGTCACACG CTCTCAGAGG CCCGGCCGAC

541 TCCGGCCCCA CTCATCGACC CCGGCGGGGG GGAAAAAGGT GTCCTCTCTC GATCGACACC

601 CTTCCCCCTT GCCGACCAAG **GTTGACCTCG GATCAGGTAG GGATACCCGC TGAAC TTAAG**

ITS4

661 **CATATCAATA AGCGGAGGA**

3.5.2 Condições da Semi-nested PCR em Única Etapa Para *P.brasiliensis*

As condições iniciais da reação de semi-nested PCR em única etapa foram as seguintes: 1 X de Tampão (20mM Tris-HCl (pH8,4), 50mM KCl) (Invitrogen, Brasil), 0,3 mM dNTP (Amresco), 2mM de MgCl₂ (Invitrogen, Brasil), 1μM do oligonucleotídeo ITS13B, 0,1μM do oligonucleotídeo ITS4, 1μM do oligonucleotídeo MJ034B, 1U de *taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil), água ultra-pura para um volume final de 25μl. Em todos os testes foi utilizado como controle negativo, água estéril no lugar do DNA, e como controle positivo, 2,5 ng de DNA purificado LDR1 ou Pb18.

Diversos programas variando a temperatura de anelamento foram avaliados para esta reação foram avaliados e consistiam das seguintes condições: denaturação inicial a 95°C por 2 min, seguida de 30 ciclos de denaturação a 95°C por 30 seg, anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores a 55°C por 30 seg, extensão a 72°C por 1 min (primeira reação da semi-nested PCR), seguida de uma sequência de 35 ciclos de denaturação inicial a 95°C por 30 seg, anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores nas temperaturas 65°C, 68°C, 70°C ou 72°C por 30 seg, extensão a 72°C por 1 min. Após a sequência de ciclos é feita a extensão final a 72°C por 5 min.

Para melhorar a sensibilidade da reação, foi avaliado o uso de BSA (2,5μg/ml, 5μg/ml e 25μg/ml), DMSO (2,5%, 5% e 10%), e gelatina (0,1mg/ml e 0,2mg/ml) na reação.

Após a identificação das condições ótimas de reação, a reação de semi-nested PCR em um tubo foi padronizada para as seguintes condições: 1 X de Tampão (20mM Tris-HCl (pH8,4), 50mM KCl) (Invitrogen, Brasil), 0,3mM dNTP (Amresco), 2mM de MgCl₂ (Invitrogen, Brasil), 1μM do oligonucleotídeo ITS13B, 0,1μM do oligonucleotídeo ITS4, 1μM do oligonucleotídeo MJ034B, 0,1mg/ml de gelatina purificada, 1U de *taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil), e água ultra-pura para um volume final de 25μl. O programa otimizado para amplificação ficou definido nas seguintes condições: denaturação inicial a 95°C por 2 min, seguida de 30 ciclos de denaturação a 95°C por 30 seg, anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores a 55°C por 30 seg, extensão a 72°C por 1 min (primeira reação da semi-nested PCR), seguida de uma sequência de 35 ciclos de denaturação inicial a 95°C por 30 seg, anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores nas temperaturas 65°C, 68°C, 70°C ou

72°C por 30 seg, extensão a 72°C por 1 min. Após a sequência de ciclos é feita a extensão final a 72°C por 5 min.

3.5.3 Semi-nested PCR em Única Etapa para *H. capsulatum*

Para realização da semi-nested PCR em um tubo para o fungo *H. capsulatum*, todas as condições descritas no item acima foram repetidas, exceto o oligonucleotídeo, que, desta vez foi específico para *H. capsulatum*.

O oligonucleotídeo HC01 foi descrito inicialmente por Tavares (2009), é específico para *H. capsulatum* sendo localizado dentro da sequência do gene 5.8 S. Nesta reação, agora chamado de HC013B (5'TCA TGC TCA GAC GCC AAT CGT TC 3') o mesmo também sofreu uma modificação, sendo esta, a adição de 3 bases, com esta modificação o novo nucleotídeo é capaz de amplificar um fragmento de 221 pares de base.

Essas modificações foram realizadas a partir de sequências de *H. capsulatum* (AB071821, AB071822, AB071823, AB1071824, AB071825, AB071826, AB071827, AB071828, AB071829, AB071830, AB071831, AB071832, AB071833, AB071834, AB071835, AB071836, AB071837, AB071838, AB071839, AB071840, AB071841, AB071842, AB071843, AB071844, AB055228, AB055229, AB055230, AB055231, AB055231, AB055232, AB055233, AB055234, AB055235, AB055236, AB055237, AB055238, AB055239, AB055240, AB055241, AB055242, AB055243, AB055244, AB055245, AB055246, AB055246, AB055247, AB055248, AB220055, AB220056, AB220057, AB220058, AB220059, AB220060, AB220061, AB211529, AB211548, AB211549, AB211550, AB211551, AB211552, AB214319, AB214320, AB214321, AB214322, AB214323, AB214324, AB214325, AB214326, AB214327, AF038353, AB061781, AF162917, AB353921, ACU18363) depositadas no GenBank.

As condições da semi-nested PCR em um tubo para detecção de *H. capsulatum* e programa utilizado foram as mesmas padronizadas para *P. brasiliensis*, com exceção do uso do oligonucleotídeo iniciador HC013B em vez do oligonucleotídeo iniciador MJ034B

Figura 7 - Estrutura da região gênica do DNAr. Setas indicam os sítios de anelamento dos oligonucleotídeos ITS13B, ITS4 e HC013B (A). Sequência completa do 5.8S, incluindo as regiões intergênicas e sequências parciais das regiões 18S e 28S de *H. capsulatum*. As regiões em negrito e sublinhadas representam os locais de anelamento dos oligonucleotídeos necessários para a realização da semi-nested PCR em única etapa para detecção de *H. capsulatum* (AB436785) (B).

A



B

ITS13B

1 GGAAGTAAAA GTCGTAACAA **GGTTTCCGTA GGTGAACCTG** CGGAAGGATC ATTACCACGC

61 CGTGGGGGGC TGGGAGCCTC TGACCGGGAC CCCTCCGCCC CCCTACCCGG CCACCCTTGT

121 CTACCGGACC TGTTGCCTCG GCGGGCCTGC AGCGATGCTG CCGGGGGAGC TTCTCCTCCC

HC013B

181 CGGGCCCGTG TCCGCCGGGG ACACCGCAAG AACCCTCGGT **GAACGATTGG CGTCTGAGCA**

241 **TGAGAGCGAT** AATAATCCAG TCAAACTTT CAACAACGGA TCTCTTGGTT CCGACATCGA

301 TNAAGAACGC AGCGAAATGC GATAAGTAAT GTGAATTGCA GAATTCCGTG AATCATCGAA

361 TCTTTGAACG CACATTGCGC CCCCTGGTAT TCCGGGGGGC ATGCCTGTCC GAGCGTCATT

421 **GCAACCCTCA** AGCGCGGCTT GTGTGTTGGG CCGTCGTCCC CCCTCGACCG GCGGGACGTG

481 CCCGAAATGC AGTGGCGGTG TCGAGTCCG GTGCCCGAGC GTATGGGGCT TTGCCACCCG

541 CTCTGGAGGC CCGGCCGGCT CCGGCCACC ATCTCAACCC CCCCCTTTCT **CACACCAGGT**

ITS4

601 TGACCTCGGA TCAGGTAGGG ATACCCGCTG AACTTAAGCA **TATCAATAAG CGGAGGA**

3.6 COMPARAÇÃO DAS REAÇÕES DE NESTED, SEMI-NESTED-PCR E SEMI-NESTED PCR EM ÚNICA ETAPA PARA DETECÇÃO DE *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS*

Para a realização desta comparação, as reações de Imai *et al.*, 2000, Theodoro *et al.*, 2005, Koishi *et al.*, 2010 e a descrita neste trabalho foram selecionadas, sendo as duas primeiras de *nested* PCR e a última de *semi-nested* PCR. As quatro reações utilizam como alvo as sequências dos genes do DNA

ribossomal, mais especificamente da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*), e são específicas para detecção do fungo *P. brasiliensis*.

Todas as reações foram repetidas por no mínimo três vezes para confirmação dos resultados, e o protocolo de cada autor foi seguido minuciosamente. O DNA de *P. brasiliensis* utilizado para os testes de limite de detecção foi o mesmo para as três reações.

As amostras clínicas de escarro de pacientes com PCM também foram submetidas às quatro reações para comparação dos resultados.

No esquema a seguir é possível visualizar a região gênômica de *P. brasiliensis* onde ocorre o anelamento dos oligonucleotídeos das quatro reações (ITS4/ITS5 e PbITS1s/PbITS3a – Imai *et al.*, 2000; ITS4/ITS5 e PbTSE/PbITSR – Theodoro *et al.*, 2005; ITS1/ITS4 e ITS1/MJ03 – Koishi *et al.*, 2010). As regiões cinzas representam final da região 18S, 5.8 S e início da região 28S respectivamente.

Figura 8 - Sequência completa do 5.8S, incluindo as regiões intergênicas e sequências parciais das regiões 18S e 28S de *P. brasiliensis*. As regiões em negrito e sublinhadas representam locais de anelamento dos oligonucleotídeos das quatro reações comparadas (AB035710.2).

	ITS5		ITS13B		ITS1	
1	<u>GGAAGTAAAA</u>	<u>GTCGTAACAA</u>	<u>GTTTCCGTA</u>	<u>GGTGAACCTG</u>	<u>CGGAAGGATC</u>	ATTAACGCGC
61	CGTGGGGGGA	CGGGGCCCGA	TCGGGTTCCC	GGCCCTCTCA	CCTGGCCACC	CTTGTCTATT
121	CTACCTGTTG	CTTCGGCGGG	CCTGCAGCGA	TGCTGCCGGG	GGGGCTCGGC	CTCCCGGGCT
181	<u>PbITS1s</u>	<u>CGTGCCCGCC</u>	<u>GGGGACACCG</u>	<u>TTGAACTTCT</u>	<u>PbITSE</u>	<u>MJ03</u>
					<u>MJ034B</u>	<u>GAGACCTATC</u>
241	ATAATCAGTA	<u>AAAACTTTCA</u>	<u>ACAACGGATC</u>	<u>TCTTGGTTCC</u>	<u>GACATCGATG</u>	<u>AAGAACGCAG</u>
301	<u>CGAAATGCGA</u>	<u>TAAGTAATGT</u>	<u>GAATTGCAGA</u>	<u>ATTCCGTGAA</u>	<u>TCATCGAATC</u>	<u>TTTGAACGCA</u>
361	<u>CATTGCGCCC</u>	<u>TCTGGTATTC</u>	<u>CGGGGGGCAT</u>	<u>GCCTGTCCGA</u>	<u>GCGTCATTTT</u>	<u>AACCCTCAAG</u>
421	CGCGGCTTGC	GTGTTGGGCC	CGCGTCCCC	CGTGGACGTG	CCCGAAATGC	AGCGGCGGGC
481	TCGCGTTCCG	GTGCCCGAGC	GTATGGGGCT	TCGTACACAG	CTCTCAGAGG	CCCGGCCGAC
541	TCCGGCCCCA	CTCATCGACC	CCGGCGGGGG	GGAAAAAGGT	<u>PBITSR</u>	<u>PbITS3a</u>
					<u>GTCCTCTCTC</u>	<u>GATCGACACC</u>
601	<u>CTT</u>	<u>CCCCCTT</u>	<u>GCCGACCAAG</u>	<u>GTTGACCTCG</u>	<u>GATCAGGTAG</u>	<u>GGATACCCGC</u>
	<u>ITS4</u>					<u>TGAACTTAAG</u>
661	<u>CATATCAATA</u>	<u>AGCGGAGGA</u>				

3.6.1 *Nested Pcr* - Método de IMAI *et al.*, 2000

3.6.1.1 Oligonucleotídeos Iniciadores – Imai *et al.*, 2000

Na primeira reação foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores ITS5 (5' - CCGAGTGCGGCCTCTGGGTCC - 3') e ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3'), universais para fungos. O produto gerado da reação com DNA de *P. brasiliensis* foi de 634 pb.

Na segunda reação foram utilizados os oligonucleotídeos PbITS1s (5'- CCGCCGGGGACACCGTTG 3') e PbITS3a (5'- AAGGGTGTTCGATCGAGAG 3') que geram um fragmento de 418 pb.

3.6.1.2 Condições da *Nested-PCR* – Imai *et al.*, 2000

A primeira reação da *nested-PCR* foi realizada com o par de oligonucleotídeos ITS5/ITS4, e a segunda com o par PbITS1s/PbITS3a. O volume da primeira reação utilizado na segunda foi de 2µl. As reações foram feitas com volume final de 25 µl, contendo 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil), 1x de tampão de reação (20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl (Invitrogen, Brasil), 1,5mM de MgCl₂ (Invitrogen, Brasil) e 0,2 mM dNTPs (Amresco). Foi também utilizado 20 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador (Invitrogen, Brasil), tanto para a primeira quanto para a segunda reação. Em todos os testes foi utilizado como controle negativo, água estéril no lugar do DNA molde, e como controle positivo, DNA de *P. brasiliensis* LDR1 ou Pb18 na concentração de 2,5 ng.

3.6.1.3 Programa da *Nested-PCR* – Imai *et al.*, 2000

Denaturação inicial a 94°C por 10 min; seguida de 25 ciclos de denaturação a 95°C por 1 min, anelamento dos oligonucleotídeos a 55°C por 1 min, extensão a 72°C por 2 min, e extensão final a 72°C por 10 min. Essa programação foi utilizada para a primeira e a segunda reação.

Também foi utilizada uma sequência de 35 ciclos para o mesmo programa, e esse aumento de 10 ciclos foi utilizado com o objetivo de observar mudanças nos valores de limites de detecção.

3.6.2 NESTED-PCR – MÉTODO DE THEODORO *et al.*, 2005

3.6.2.1 Oligonucleotídeos iniciadores – Theodoro *et al.*, 2005

Na primeira reação foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores ITS5 e ITS4 descritos acima. Para a segunda foram utilizados PbitSE (5' - GAGCTTTGACGTCTGAGACC - 3') e PbitSR (5' - AAGGGTGTCGATCGAGAGAG - 3'). Um fragmento de 387 pb foi obtido como produto de reação.

3.6.2.2 Condições da *Nested-PCR* - Theodoro *et al.*, 2005

A primeira reação da *nested-PCR* foi realizada com o par de oligonucleotídeos ITS5/ITS4, e a segunda com o par PbitSE/PbitSR. O volume da primeira reação utilizado na segunda foi de 2 µl. As reações foram feitas com volume final de 25 µl, contendo 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil), 1x de tampão de reação (20 mM Tris-HCl (pH 8.4) 50 mM KCl) (Invitrogen, Brasil), 1,5mM de MgCl₂ (Invitrogen, Brasil) e 0,2Mm dNTPs (Amresco). Foi também utilizado 10 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador, tanto para a primeira quanto para a segunda reação. Em todos os testes foi utilizado como controle negativo, água estéril no lugar do DNA molde, e como controle positivo, DNA de *P. brasiliensis* LDR1 ou Pb18 com concentração de 10 ng.

3.6.2.3 Programa da *Nested-PCR* – Theodoro *et al.*, 2005

Denaturação inicial a 94°C por 5 min; seguida de 25 ciclos de denaturação a 94°C por 1 min, anelamento dos oligonucleotídeos a 60°C por 2 min, extensão a 72°C por 2 min, e extensão final a 72°C por 7 min para a primeira reação. Para a segunda reação (PbitSE/PbitSR) as condições foram similares, mas a temperatura de anelamento foi de 62°C.

Também foi utilizada uma sequência de 35 ciclos para o mesmo programa, e esse aumento de 10 ciclos foi utilizado com o objetivo de observar mudanças nos valores de limite de detecção.

3.6.3 Semi-Nested PCR - Método de KOISHI *et al.*, 2010

3.6.3.1 Oligonucleotídeos Iniciadores - Koishi *et al.*, 2010

Na primeira reação foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3') e ITS4 (5' - TCCTCCGCTTATTGATAT GC - 3'), universais para fungos. O produto gerado da reação com DNA de *P. brasiliensis* foi de 649 pb.

Na segunda reação foram utilizados os oligonucleotídeos ITS1, já descrito acima e MJ03 (5' - GTCTCAGACGTCAAAGCTCC - 3') que geram um fragmento de 212 pb.

3.6.3.2 Condições da Semi-nested PCR – Koishi *et al.*, 2010

A primeira reação da snPCR foi realizada com o par de oligonucleotídeos ITS1/ITS4, e a segunda com o par ITS1/MJ03. O volume da primeira reação utilizado na segunda foi de 1 µl. As reações foram feitas com volume final de 25 µl, contendo 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, Brasil), 1x de tampão de reação (20 mM Tris-HCl (pH 8.4) 50 mM KCl (Invitrogen, Brasil), 2mM MgCl₂ (Invitrogen, Brasil) e 0,25 mM dNTPs (Amresco). Em todos os testes foi utilizado como controle negativo, água estéril no lugar do DNA molde, e como controle positivo, DNA de *P. brasiliensis* LDR1 ou Pb18 com concentração de 2,5 ng.

3.6.3.3 Programa da Semi-nested PCR - Koishi *et al.*, 2010

Denaturação inicial a 95°C por 2 min; seguida de 35 ciclos de denaturação a 95°C por 30 seg, anelamento dos oligonucleotídeos a 55°C por 30 seg, extensão a 72°C por 1 min; e extensão final a 72°C por 5 min para a primeira e a segunda reação.

Tabela 2 - Programa das reações de *nested* PCR, *semi-nested* PCR e *semi-nested* PCR em um tubo utilizadas neste estudo.

Método	1ª Reação					2ª Reação				
	Denaturação Inicial °C/T	D °C/T	A °C/T	E °C/T	N° de ciclos	D °C/T	A °C/T	E °C/T	Extensão Final °C/T	N° de ciclos
Imai <i>et al.</i> , 2000	94/10min	95/1min	55/1min	72/1min	25	95/1min	55/1min	72/1min	72/10min	25
Theodoro <i>et al.</i> , 2005	94/5min	94/1min	60/2min	72/2min	25	94/1min	62/2min	72/2min	72/7min	25
Koishi <i>et al.</i> , 2010	95/2min	95/30seg	55/30seg	72/1min	35	95/30seg	55/30seg	72/1min	72/5min	35
Reação em um tubo	95/2min	95/30seg	55/30seg	72/1min	30	95/30seg	72/30seg	72/1min	72/5min	35

Legenda: T - tempo; D – denaturação; A - anelamento; E- extensão.

3.7 ANÁLISE DOS RESULTADOS DAS *NESTED* PCR, *SEMI-NESTED* PCR E *SEMI-NESTED* PCR EM ÚNICA ETAPA

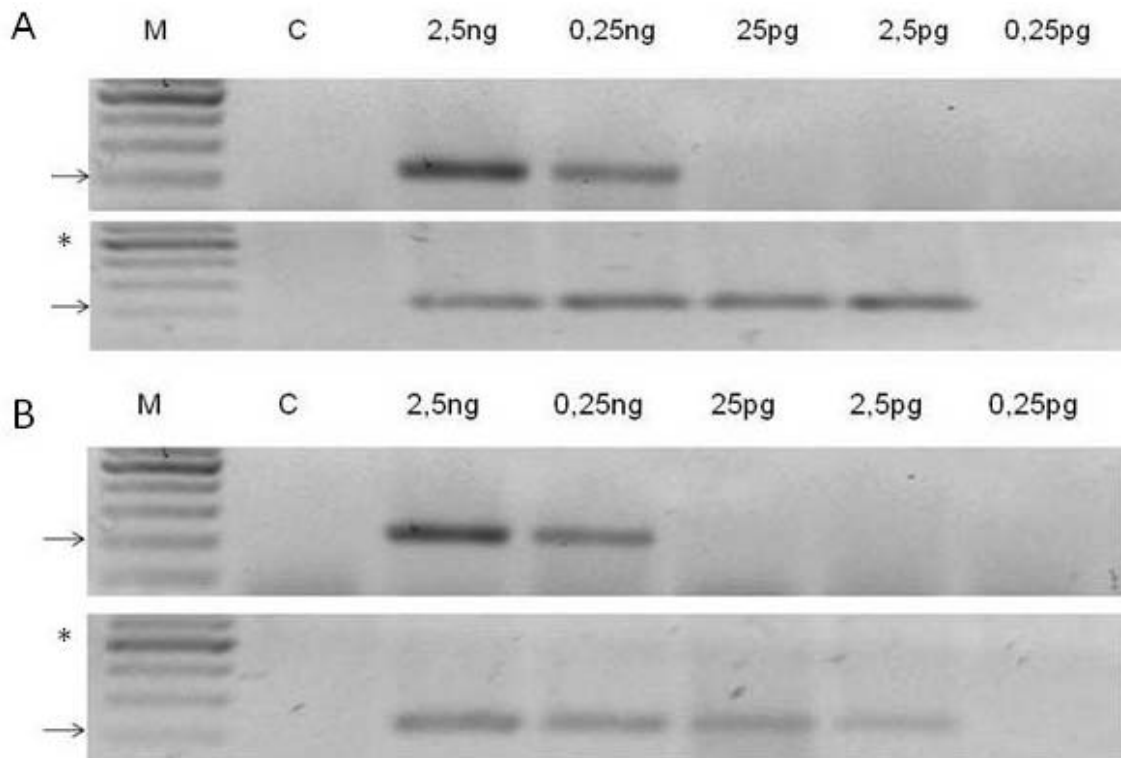
Os produtos da PCR (10µl) foram analisados em gel de agarose 1,25%, corado com brometo de etídeo 0,5 µg/ml por 15 minutos ou por SYBR SAFE (Invitrogen, Brasil) e visualizado em transluminador UV.

4 RESULTADOS

4.1 SEMI-NESTED PCR EM ÚNICA ETAPA

Durante a padronização da reação de semi-nested PCR em um tubo, foi avaliado o uso de BSA, DMSO e gelatina pura como intensificadores da reação. Com o uso de BSA e DMSO não foi observado aumento de sensibilidade da reação de semi-nested PCR em um tubo, porém, os resultados obtidos com o uso de gelatina para análise microbiológica (DIFCO) na concentração de 0,1mg/ml aumentam significativamente o limite de detecção da reação, passando de 0,25ng para 2,5pg, tanto para *P. brasiliensis* como para *H. capsulatum* (Figura 9).

Figura 9 - Reação de semi-nested PCR em única etapa, realizada sem e com a presença de gelatina (DIFCO) respectivamente, para o fungo *P. brasiliensis* (A) e *H. capsulatum* (B).

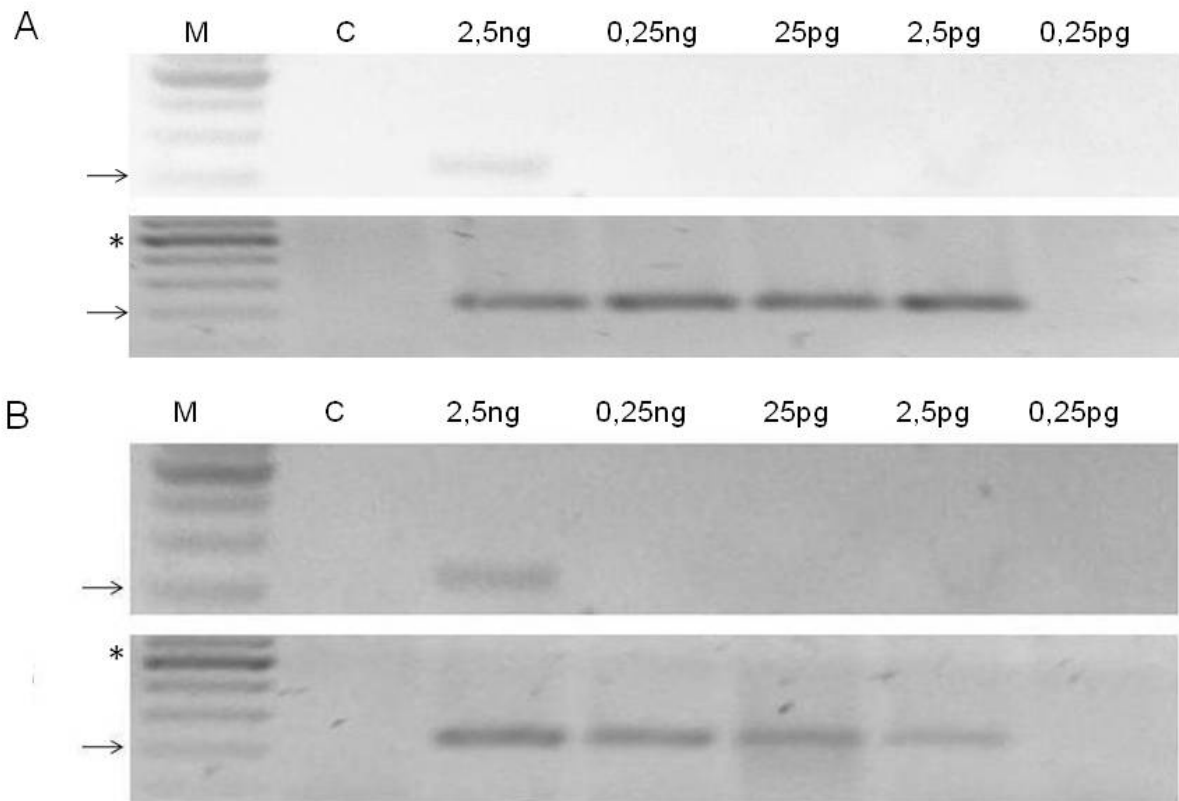


A reação perde sensibilidade quando a gelatina não é utilizada, por motivos ainda não elucidados. Eletroforese em gel de agarose 1,25%, corado com SYBR SAFE. . M. Marcador Molecular (Ladder 100pb Invitrogen), C. Controle negativo, *. presença de gelatina, →. 200-pb.

Diversas temperaturas de anelamento de oligonucleotídeos para a segunda etapa de ciclos foram testadas, sendo 65°C, 68°C, 70°C e 72°C, e o melhor resultado obtido foi com a temperatura de 72°C.

Para avaliar se a primeira parte da reação é necessária para a obtenção da sensibilidade observada, foi feita a reação de semi-*nested* PCR em um tubo sem a utilização do oligonucleotídeo ITS4 e os resultados obtidos mostram um limite de detecção de 2,5 pg na presença de ITS4 e 2,5 ng na sua ausência, isso mostra que para a obtenção do máximo limite de detecção a primeira parte da reação em um tubo é essencial.

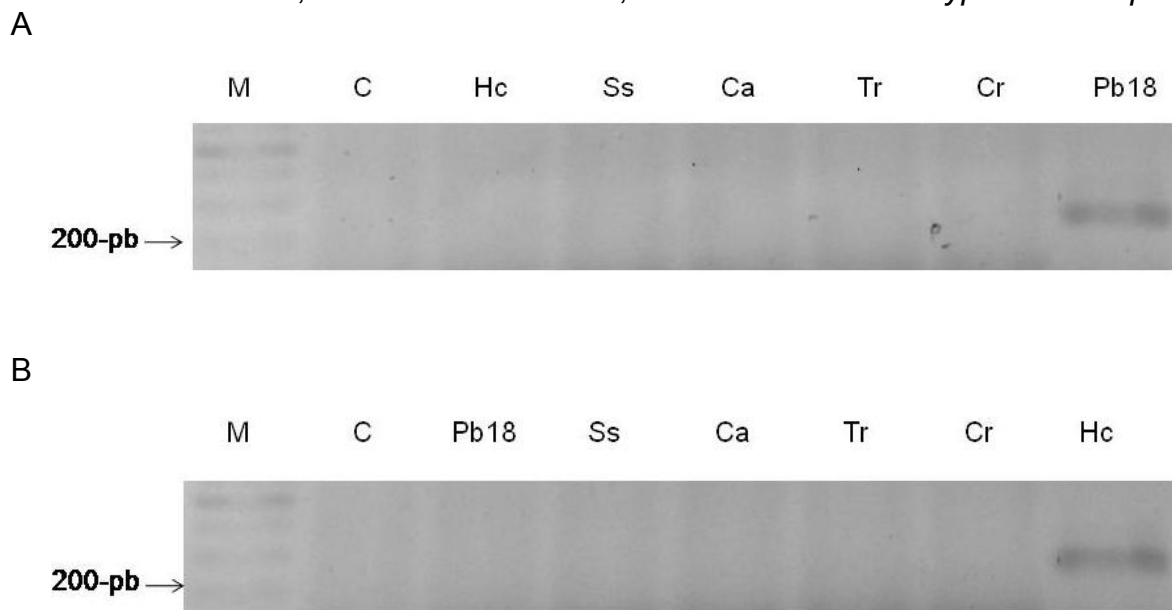
Figura 10 - Reação de semi-*nested* PCR em única etapa realizada sem e com a presença do oligonucleotídeo ITS4 para o fungo *P. brasiliensis* (A) e *H. capsulatum* (B). Eletroforese em gel de agarose 1,25%, corado com SYBR SAFE. M. Marcador Molecular (Ladder 100pb Invitrogen), C. Controle negativo, *. presença de ITS4, →. 200-pb.



4.2 ESPECIFICIDADE DA REAÇÃO DE SEMI-NESTED PCR EM ÚNICA ETAPA PARA *P. BRASILIENSIS* E *H. CAPSULATUM*

A figura 11 mostra o resultado do teste de especificidade das reações de semi-nested PCR em um tubo para *P. brasiliensis* (A) e *H. capsulatum* (B) que foi realizada com DNA dos fungos *Candida albicans*, *Cryptococcus sp*, *Sporothrix schenkii* e *Trichophyton rubrum*. Ambas as reações não apresentaram reatividade cruzada com outras amostras de DNA de fungos.

Figura 11 - Especificidade da semi-nested PCR em única etapa para *P. brasiliensis* (A) e *H. capsulatum* (B). Eletroforese em gel de agarose 1,25% corado com SYBR SAFE (Invitrogen). M. Marcador Molecular 100-pb; C. Controle negativo; 18. *P. brasiliensis* (Pb18); Hc. *H. capsulatum*; Ss *S. schenkii*; Ca. *Candida albicans*; Tr. *T. rubrum* e Cr. *Cryptococcus sp*.

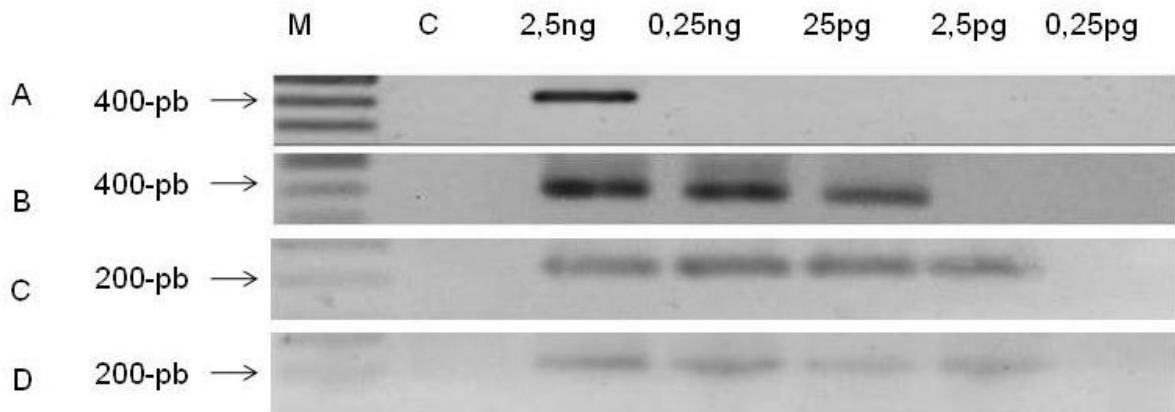


4.3 COMPARAÇÃO ENTRE AS SENSIBILIDADES DOS MÉTODOS IMAI ET AL., 2000; THEODORO ET AL., 2005, KOISHI ET AL., 2010 E A SEMI-NESTED PCR EM ÚNICA ETAPA

A figura 12 mostra o resultado das reações de nested-PCR, semi-nested PCR, e a semi-nested PCR em um tubo, com quantidades de DNA de *P. brasiliensis* variando de 2,5 ng à 25 fg. Os resultados mostram que a reação mais eficiente para detectar o DNA do fungo foi a semi-nested PCR em um tubo e a de Koishi et al., 2010, com 2,5 pg de limite de detecção, enquanto que a reação de

Theodoro apresentou um resultado intermediário, com 25 pg de sensibilidade, e por último, a reação de Imai, que foi a menos sensível, mostrando apenas 2,5ng de limite para detecção de DNA de *P.brasiliensis*.

Figura 12 - Comparação das sensibilidades dos métodos de Imai *et al.*, 2000

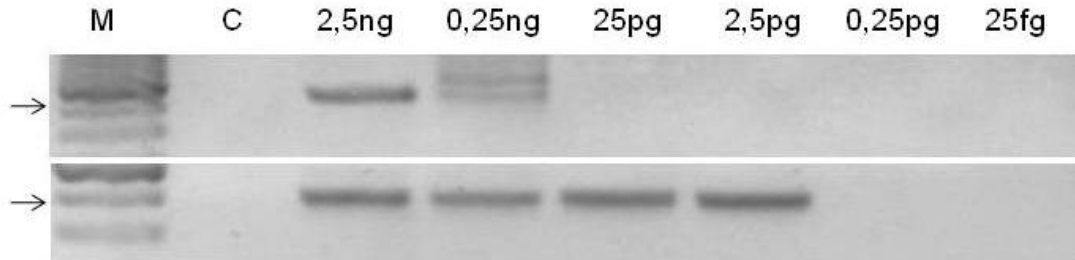


(A) - sensibilidade de 2,5ng (fragmento de 418 pares de base) Theodoro *et al.*, 2005 (B) -sensibilidade de 25pg (fragmento de 387 pares de base) Koishi *et al.*, 2010 (C) - sensibilidade de 2,5 pg (fragmento de 212 pares de base) e da semi-nested PCR em única etapa (D) - (fragmento de 219 pares de base) para a detecção do DNA de *P.brasiliensis*. Eletroforese em gel de agarose 1,25% corado com SYBR SAFE (Invitrogen, Brasil). M. Marcador Molecular 100 pb (Ladder 100pb, Invitrogen); C. Controle negativo.

Ainda para verificar a sensibilidade dos métodos de Imai *et al.*, 2000 e Theodoro *et al.*, 2005, as reações foram realizadas utilizando-se 35 ciclos, visto que a quantidade de ciclos era o fator com maior diferença em relação à reação de Koishi *et al.*, 2010.

A figura 13 mostra o resultado dessas reações após essa modificação. Em ambos os casos foi observado um aumento no limite de detecção das reações, porém na reação de Imai *et al.*, 2000 fragmentos inespecíficos foram observados nessas condições.

Figura 13 - Teste de limite de detecção para as reações de Imai *et al.*, 2000 (fragmento de 418 pares de base) e Theodoro *et al.*, 2005 (fragmento de 387 pares de base) com 35 ciclos. Eletroforese em gel de agarose 1,25% corado com SYBR SAFE (Invitrogen, Brasil). M. Marcador Molecular 100 pb (Ladder 100pb, Invitrogen); C. Controle negativo; →400pb.



4.4 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DOS MÉTODOS IMAI *ET AL.*, 2000; THEODORO *ET AL.*, 2005 E KOISHI *ET AL.*, 2010 E SEMI-NESTED PCR EM ÚNICA ETAPA COM AMOSTRAS CLÍNICAS

Para avaliar se a extração de DNA das amostras clínicas resultou em amostras de DNA livre de inibidores de PCR, todas as amostras de DNA foram testadas para a detecção do gene para a quimiocina CXCL12, e os resultados obtidos mostraram a presença de DNA livre de inibidores em todas as amostras.

A tabela 3 mostra o resultado das reações de *nested*-PCR, *semi-nested* PCR e *semi-nested* PCR em um tubo com as amostras clínicas.

Os resultados mostram que a reação mais eficiente para detectar o DNA do fungo em amostras clínicas como o escarro foi a reação de Koishi *et al.*, 2010 e a *semi-nested* PCR em um tubo, com todas das amostras positivas (100%), seguida da reação de Theodoro *et al.*, 2005, com 8 amostras positivas (57,2%) e por fim a reação de Imai *et al.*, 2000 com 4 amostras positivas (28,5%).

Tabela 3 – Resultado das PCRs das amostras clínicas de escarro de pacientes com PCM. Os números entre parênteses mostram os resultados das reações de Imai *et al.*, 2000 e Theodoro *et al.*, 2005 após aumentar a quantidade de ciclos para 35.

PROTOSCOLOS	POSITIVOS	%	NEGATIVOS	%
Imai <i>et al.</i> , 2000	4 (6)	28,5% (42,8%)	10	71,5%
Theodoro <i>et al.</i> , 2005	8 (10)	57,2% (71,4%)	6	42,8%
Koishi <i>et al.</i> ,2010	14	100%	0	0%
Reação em um tubo	14	100%	0	0%

Considerando que houve um aumento do limite de detecção quando do aumento do número de ciclos das reações de Imai *et al.*, 2000 e Theodoro *et al.*, 2005, foram feitas novas reações para a detecção de DNA de *P. brasiliensis* nas amostras clínicas. O resultados obtidos mostram que houve um aumento do número de amostras positivas de 4 para 6 (42,8%) e de 8 para 10 (71,4%) com as reações de Imai *et al.*, 2000 e Theodoro *et al.*, 2005, respectivamente (tabela 3).

5 DISCUSSÃO

O desenvolvimento de métodos moleculares tem aprimorado muito o diagnóstico de doenças infecciosas, resolvendo alguns problemas apresentados pelo diagnóstico tradicional, principalmente relacionados à falta de especificidade e à demora na liberação dos resultados (SAN-BLAS *et al.*, 2005; CHARBEL, LEVI, MARTINS, 2006).

O diagnóstico rápido e preciso é fundamental para o correto acompanhamento do paciente, e tem um grande impacto na saúde pública, já que as infecções fúngicas são importantes causas de morbidade e mortalidade (SANDHU *et al.*, 1995, PRADO *et al.*, 2009).

A reação de semi-*nested* PCR em um tubo aqui descrita, é específica para o segmento do DNAr que contém a região ITS1-5.8S-ITS2, e foi padronizada para *P. brasiliensis* e *H. capsulatum*.

Geralmente, as reações de *nested* ou semi-*nested* PCR realizadas em um só tubo perdem sensibilidade quando comparada com as reações que são realizadas em duas etapas, o que pode ser explicado pela limitação de dNTPs e *Taq* DNA polimerase em uma reação longa (GOMES *et al.*, 2007). No caso da reação descrita neste estudo, não foi observada essa diminuição de sensibilidade, pois os resultados nos mostram equivalência no limite de detecção (2,5 pg), sendo o mesmo limite encontrado na reação de semi-*nested* PCR de Koishi *et al.*, 2010, feitas nas mesmas condições do nosso estudo.

Alguns estudos mostram a utilização da gelatina em reações de PCR, com o objetivo de melhorar os resultados. Abath e colaboradores (2002) desenvolveram uma reação de *nested* PCR em um tubo para detecção de DNA de *Schistosoma mansoni*, com o uso de gelatina (0,1mg/ml) na reação, e obtiveram uma sensibilidade de 1fg. Apesar do uso da gelatina em alguns estudos, seu papel na reação ainda permanece desconhecido.

Reações de *nested* e semi-*nested* PCR em um tubo já foram desenvolvidas para o diagnóstico de várias infecções, mas neste trabalho descrevemos a primeira reação de semi-*nested* PCR em um tubo para detecção de *P. brasiliensis* e *H. capsulatum*, e com grande potencial para uso no diagnóstico de outros fungos patogênicos.

A reação de semi-*nested* PCR foi feita com os oligonucleotídeos iniciadores ITS13B, ITS4 e MJ034B para a detecção de DNA de *P. brasiliensis*, e para a detecção de *H. capsulatum*, deve-se apenas substituir o oligonucleotídeo iniciador MJ034B pelo HC013B, específico para *H. capsulatum*.

A reação descrita neste trabalho é composta por duas etapas de ciclos de amplificação. Na primeira etapa de ciclos ocorre a amplificação dos fragmentos gerados pelos oligonucleotídeos ITS13B e ITS4, enquanto que na segunda ocorre o anelamento dos oligonucleotídeos ITS13B com MJ034B ou ITS13B com HC013B, gerando um fragmento de 219 pares de bases para *P. brasiliensis* e 221 pares de base para *H. capsulatum*. A adição de bases na extremidade 5' dos oligonucleotídeos iniciadores ITS1, MJ03 e HC01, previamente descritos foi feita para que a segunda etapa de ciclos de amplificação pudesse ser feita em uma temperatura de anelamento significativamente mais elevada em relação a primeira etapa de ciclos (TAVARES, 2009; KOISHI *et al.*, 2010).

É importante ressaltar que a reação de semi-*nested* descrita aqui, precisa que as duas etapas de ciclos de amplificação ocorram para que o limite de detecção de 2,5pg seja atingido, como demonstrado pela realização da reação sem o oligonucleotídeo iniciador ITS4.

Os resultados mostram que as reações de semi-*nested* PCR em um tubo descritas são específicas para *P. brasiliensis* e *H. capsulatum*, considerando que não foi observada reatividade cruzada com *Candida albicans*, *Sporothrix schenckii*, *T. rubrum*, *Cryptococcus sp* e entre os próprios fungos já citados.

Com relação ao limite de detecção, as reações de semi-*nested* PCR em um tubo foram capazes de detectar 2,5pg de DNA de *P. brasiliensis* e *H. capsulatum*, limite igual ao da reação de Koishi e colaboradores realizada em duas etapas, e maior do que as reações descritas por Imai *et al.*, 2000 e Theodoro *et al.*, 2005.

O diagnóstico das infecções causadas por fungos deve ser rápido, pois é fundamental para o tratamento adequado do paciente e tem um impacto profundo no prognóstico da doença (CAILLOT *et al.*, 1997)

Os métodos tradicionais de diagnóstico vêm sendo substituídos por métodos moleculares como a PCR e suas variações, principalmente pela vantagem da rapidez na liberação do resultado, que geralmente não demoram mais que 2 dias, enquanto que a cultura (isolamento direto) pode demorar de 30 a 40 dias, e a

inoculação em animais (isolamento indireto) se torna caro e demora de 6 a 8 semanas (REID, SHAFER, 1999).

O tempo consumido para a realização de uma reação em um tubo se reduz consideravelmente quando comparada às reações de *nested* ou *semi-nested* PCR (YLITALO *et al.*, 1995). A *semi-nested* PCR em um tubo desenvolvida neste trabalho consome aproximadamente 8 horas para a liberação do resultado, considerando o tempo de extração de DNA e a eletroforese.

A rapidez do método mostra um grande potencial para o diagnóstico laboratorial, pois diminui significativamente o tempo necessário para a obtenção do resultado quando comparado à outros, podendo ser também de grande utilidade no campo do diagnóstico de outras infecções fúngicas, principalmente em pacientes que necessitam de um tratamento de urgência, como os imunocomprometidos, transplantados, queimados e em tratamento com quimioterápicos.

Outra grande vantagem da *semi-nested* PCR em um tubo, em relação as reações de *nested* e *semi-nested* PCR, é a diminuição dos riscos de contaminação, que ocorre mais frequentemente em reações de duas etapas, onde é necessário transferir os produtos da primeira etapa para um segundo tubo, havendo maior manipulação dos tubos (MELO *et al.*, 2006; MONTENEGRO *et al.*, 2004).

Quando a reação desenvolvida neste estudo foi utilizada para a detecção de *P. brasiliensis* em amostras clínicas, foi observada uma positividade em 100 % das amostras, mostrando que a reação de *semi-nested* PCR em um tubo apresenta um grande potencial de aplicação na detecção de *P. brasiliensis*. Também é importante ressaltar que a coleta do escarro não é um método invasivo, diferente da biópsia, o que facilita ainda mais o diagnóstico da PCM (KOISHI *et al.*, 2010).

Com o intuito de determinar qual a melhor metodologia para o diagnóstico de doenças infecciosas, diversos estudos comparando diferentes reações de detecção molecular, como é o caso da PCR e suas variações (*nested* e *semi-nested* PCR) têm sido feitos. Por exemplo, para identificar qual a melhor técnica de PCR para a identificação de *Mycobacterium tuberculosis*, Sankar e colaboradores (2010) compararam duas técnicas de PCR que utilizavam diferentes regiões genômicas. Essa comparação foi realizada com 191 amostras de escarro de pacientes com a doença, e variáveis como especificidade, tempo de execução do método, custo e quantidade de ciclos e reagentes foram alvos de comparação. Além disso, o estudo mostrou uma reação mais sensível que a outra.

Consideremos que neste estudo desenvolvemos uma nova reação de semi-*nested* PCR em um tubo para *P. brasiliensis*, decidimos compara a nossa reação com outras reações de *nested* e semi-*nested* PCR para a detecção do DNA do fungo. Todas as reações comparadas utilizaram como alvo as sequências dos genes do DNA ribossomal, que estão presentes em grande número de cópias nestas células, o que favorece a detecção e a sensibilidade da reação de PCR (ATKINS, CLARK, 2004). Foi interessante observar que diferentes limites de detecção foram encontrados durante a comparação, sendo mais sensível a reação de Koishi *et al.*, 2010 e a semi-*nested* PCR em um tubo desenvolvida neste trabalho, ainda assim, podemos considerar que a reação em um tubo descrita neste trabalho é a mais adequada para a utilização clínica por ser mais rápida e como menores os riscos de contaminação.

Essas diferenças nos resultados dos limites de detecção podem ser explicadas por diversos fatores, como os diferentes tamanhos de fragmentos gerados por cada reação, a estabilidade, temperatura de anelamento, e concentração de cada oligonucleotídeo iniciador, tempo e quantidade de ciclos necessários, entre outras variáveis presentes numa comparação entre reações moleculares (SANKAR *et al.*, 2010).

Ainda para verificar o limite de detecção de cada método, foi também realizada uma modificação nas reações de Imai *et al.*, 2000 e Theodoro *et al.*, 2005, aumentando a quantidade de ciclos de cada reação, passando de 25 para 35 ciclos e mantendo as outras condições de reação. Com isso, foi observado um aumento no limite para as duas reações, porém na reação de Imai *et al.*, 2000, foi observado a presença de fragmentos inespecíficos.

Quando as reações foram comparadas quanto a sua capacidade de detectar DNA do fungo nas amostras clínicas de escarro de pacientes com PCM, foi observado uma clara relação entre os limites de detecção observados e a capacidade de detecção em amostras clínicas, sendo a reação com maior limite de detecção foi a de Koishi *et al.*, 2010, e a semi-*nested* PCR aqui descrita, e a com menor, a reação de Imai *et al.*, 2000. Novamente, sugerindo que a reação descrita neste trabalho é a mais adequada para a detecção de *P. brasiliensis* em amostras clínicas.

Considerando que os métodos moleculares de detecção podem ser utilizados em diversos estudos, além das pesquisas sobre o diagnóstico de doenças,

acreditamos que a reação desenvolvida aqui pode também ser utilizada para estudos sobre a ecologia dos fungos (SILVA-VERGARA et al., 2000; THEODORO et al., 2005; BAGAGLI et al., 2008; SAN-BLÁS et al., 2002).

Em estudos futuros teremos como objetivo padronizar a semi-nested PCR em um tubo para a detecção de DNA dos fungos: *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus sp.* e *Sporothrix schenckii*.

Além disso, almejamos estabelecer parcerias com Hospitais e Centros de Atendimento Hospitalar, disponibilizando a reação de semi-nested PCR em um tubo para pesquisas envolvendo o diagnóstico clínico de infecções fúngicas, podendo contribuir ainda mais para validar a reação, e para o uso de um método de diagnóstico mais rápido e específico.

CONCLUSÕES

Com o presente trabalho e com os resultados obtidos, foi possível desenvolver reações de semi-nested PCR em um tubo específicas para *P. brasiliensis* e *H.capsulatum*. Não foram observadas reações cruzadas com *S. schenkii*, *C. albicans*, *T.rubrum* e *Cryptococcus sp.*

O limite de detecção das reações foi de 2,5pg de DNA de *P. brasiliensis*.

A reação descrita foi capaz de amplificar DNA de *P.brasiliensis* em amostras clínicas de escarro de pacientes com PCM.

A comparação de diferentes reações de nested e semi-nested PCR mostrou que nas condições realizadas, a reações com o maior limite de detecção para o DNA de *P. brasiliensis* foram as reações de semi-nested PCR descrita por Koishi *et al.*, 2010, e a reação de semi-nested PCR em um tubo descrita neste trabalho.

As reações de Koishi *et al.*, 2010 e a semi-nested PCR em um tubo foram capazes de detectar o DNA de *P. brasiliensis* em 100% das amostras clínicas usadas nesse estudo, enquanto que com a reação de Theodoro *et al.*, 2005 foi possível detectar em 57,2%, e com a reação de Imai *et al.*, 2000 foi apenas de 28,5%, confirmando os testes de limite de detecção.

A principal causa da diferença dos limites de detecção e do número de amostras positivas para cada uma das reações é o número de ciclos de cada reação.

REFERENCIAS

- ABATH, F.G.; MELO, F.L.; WERKHOUER, R.P.; MONTENEGRO, L.; MONTENEGRO, R.; SCHINDLER, H.C. Single-tube *nested* PCR using immobilized internal primers. **BioTechniques**, v.33, n.6, p.1210-1214, 2002.
- ALBORNOZ, M.B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from rural soil in Venezuela. **Sabouraudia**, v.9, n.3, p.248-253, 1971.
- ALBUQUERQUE, C.F. ; MARQUES DA SILVA, S.H.; CAMARGO, Z.P. Improvement of the specificity of an enzyme-linked Immunosorbent assay for diagnosis of paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.4, p.1944-1946, 2005.
- ALMEIDA, O.P.; JACKS, J.Jr.; SCULLY,C. Paracoccidioidomycosis of the mouth: an emerging deep mycosis. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v.14, n.5, p.377-383, 2003.
- ARISTIZABAL, B.H.; CLEMONS, K.V.; STEVENS, D.A.; RESTREPO, A. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeasts cells: in vivo inhibition in females. **Infection and Immunity**, v.66,
- ARRAES, F,B,M; BENOLIEL , B.; BURTET, R.T.; COSTA, P.L.; GALDINO, A.S.; LIMA, L.H.; MARINHO-SILVA, C.; OLIVEIRA-PEREIRA, L.; PFRIMER, P.; PROCÓPIO-SILVA, L.; REIS, V.C.; FELIPE, M.S. General metabolism of the dimorphic and patogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Genetics and Molecular Research**, v.4, n.2, p.290-308, 2005.
- ATKINS, S.D.; CLARK, I.M. Fungal molecular diagnostics: a mini review. **Journal of Applied Genetics**, v.45, n1, p.3-15, 2004.
- BADIEE, P.; KORDBACHEH, P.; ALBORZI, A.; MALEKHOSEINI, S.; ZEINI, F. ; MIRHENDI, H.; MAHMOODI, M. Prospective Screening in Liver Transplant Recipients by Panfungal PCR-ELISA for early Diagnosis of Invasive Fungal Infections. **Liver Transplantation**, v.13, n.7, p.1011-1016, 2007.
- BAGAGLI, E.; SANO, A.; COELHO, K.I.; ALQUATI, S.; MIYAJI, M.; DE CAMARGO, Z.P.; GOMES, G.M.; FRANCO, M.; MONTENEGRO, M.R. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus noveminctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.58, n.4, p.505-512, 1998.
- BAGAGLI, E.; BOSCO, S.M.; THEODORO, R.C.; FRANCO, M. Phylogenetic and evolutionary aspects of *Paracoccidioides brasiliensis* reveal a long coexistence with animal hosts that explain several biological features of the pathogen. **Infection, Genetics and Evolution**, v.6, n.5, p.344-351, 2006.
- BAGAGLI, E.; THEODORO, R.C. Marcadores Moleculares de *Paracoccidioides brasiliensis*. In: VI Congresso Brasileiro de Micologia, n.6, 2010, Brasília. **Anais**. p.730.

- BIALEK, R.; IBRICEVIC, A.; AEPINUS, C.; NAJVAR, L.K.; FOTHERGILL, A.W.; KNOBLOCH, J.; GRAYBILL, J.R. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue samples by a nested PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.8, p.2940-2942, 2000.
- BLOTTA, M.H.S.L.; MAMONI, R.L.; OLIVEIRA, S.J.; NOUÉR, S.A.; PAPAORDANOU, P.M.; GOVEIA, A.; CAMARGO, Z.P. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.61, n.3, p.390-394, 1999.
- BORGES-WALMSLEY, M.I.; CHEN, D.; SHU, X.; WALMSLEY, A.R. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Trends in Microbiology**, v.10, n.2, p.80-87, 2002.
- BORMAN, A.M.; LINTON, C.J.; MILES, S.; JOHNSON, E.M. Molecular Identification of Pathogenic Fungi. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.12, n.66, p.4356-4360, 2008.
- BRACCA, A.; TOSELLO, M.E.; GIRARDINI, J.E.; AMIGOT, S.L.; GOMEZ, C.; SERRA, E. Molecular Detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* in Human Clinical Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n.4, p.1753-1755, 2003.
- BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clinical Microbiology Reviews**, v.6, n.2, p.89-117, 1993.
- CAILLOT, D.; CASASNOVAS, O.; BERNARD, A.; COUAILLIER, J.F.; DURAND, C.; CUISENIER, B.; SOLARY, E.; PIARD, F.; PETRELLA, T.; BONNIN, A.; COUILLAULT, G.; DUMAS, M.; GUY, H. Improved Management of Invasive Pulmonary Aspergillosis in Neutropenic Patients using early thoracic computed tomography scan and surgery. **Journal of Clinical Oncology**, v.15, n.1, p.139-147, 1997.
- CORREDOR, G.G.; CASTAÑO, J.H.; PERALTA, L.A.; D'EZ, S.; ARANGO, M.; MCEWEN, J.; RESTREPO, A. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*, in an endemic area for paracoccidioidomycosis in Colombia. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.16, n.5, p.216-220, 1999.
- CHARBEL, C.E.; LEVI, J.E.; MARTINS, J.E. Evaluation of polymerase chain reaction for the detection of *Paracoccidioides brasiliensis* DNA on serum samples from patients with paracoccidioidomycosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, n.2, p.219-221, 2006.
- COUTINHO, Z.F.; SILVA, D.; LAZERA, M.; PETRI, V.; OLIVEIRA, R.M.; SABROZA, P.C.; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cadernos de Saúde**, v.16, n.5, p.1441-1454, 2002.
- DIEZ, S.; GARCIA, E.A.; PINO, P.A.; BOTERO, S.; CORREDOR, G.G.; PERALTA, L.A.; CASTAÑO, J.H.; RESTREPO, A.; MCEWEN, J.G. et al. PCR with *Paracoccidioides brasiliensis* specific primers: potential use in ecological studies. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.41, n.6, p.351-358, 1999.

EINSELE, H.; HEBART, H.; ROLLER, G.; LÖFFLER, J.; ROTHENHOFER, I.; MÜLLER, C.A.; BOWDEN, R.A.; VAN BURIK, J.; ENGELHARD, D.; KANZ, L.; SCHUMACHER, U. Detection and Identification of Fungal Pathogens in blood by using Molecular probes. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, p.1353-1360, 1997.

EISELE, R.C.; JULIANI, L.C.; BELITARDO, D.R.; ITANO, E.N.; ESTEVÃO, D.; BRACARENSE, A.P.; CAMARGO, Z.P.; ONO, M.A. Immune response in dogs experimentally infected with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Medical Mycology**, v.42, n. 15, p.549-553, 2004.

ESPY, M.J.; UHL, J.R.; SLOAN, L.M.; BUCKWALTER, S.P.; JONES, M.F.; VETTER, E.A.; YAO, J.D.; WENGENACK, N.L.; ROSENBLATT, J.E.; COCKERILL, F.R.; SMITH, T.F. Real-time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19, n.3, p.165-256, 2006.

FERREIRA, M.S. et al. Isolation and characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from a dogfood probably contaminated with soil in Uberlândia, Brazil. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v.28, n.3, p.253-256, 1990.

FERREIRA, M.S.; BORGES, A.S. Histoplasmosis: review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, n.2, p.192-198, 2009.

GEZUELE, E. Aislamiento de *Paracoccidioides* sp de heces de pingüino de la Antártida. In: Encuentro Internacional Sobre Paracoccidioidomicosis, n.4, 1989, Caracas. **Anais**. p. B-2.

GODOY, H.; REICHAERT, P.A. Oral manifestations of paracoccidioidomycosis. Report of 21 cases from Argentina. **Mycoses**, v.46, p.412-417, 2003..

GOLDANI, L.Z.; SUGAR, A.M. Short Report: Use of the polimerase chain reaction to detect *Paracoccidioides brasiliensis* in murine Paracoccidioidomycosis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.58, n.2, p.152-153, 1998.

GOMES, G.M.; CISALPINO, P.S.; TABORDA, C.P.; DE CAMARGO, Z.P. PCR for Diagnosis of Paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.9, p.3478-3480, 2000.

GOMES, A.L.V.; SILVA, A.M.; CORDEIRO, M.T.; GUIMARÃES, G.F.; MARQUES, E.T.JR.; ABATH, F.G. Single-tube nested PCR using internal immobilized primers for the identification of dengue virus serotypes. **Journal of Virology Methods**, v.145, n.1, p.76-79, 2007.

HAGE, C.A.; WHEAT, L.J.; LOYD, J.; ALLEN, S.D.; BLUE, D.; KNOX, K.S. Pulmonary histoplasmosis. **Respiratory and Critical Care Medicine**, v.29, n.3, p.151-165, 2008.

HAQUE, K.A.; PFEIFFER, R.M.; BEERMAN, M.B.; STRUEWING, J.P.; CHANOCK, S.J.; BERGEN, A.W. Performance of high-throughput DNA quantification methods. **BMC Biotechnology**, v.20, n.6, 2003.

- HURTADO, A.; ADURIZ, G.; MORENO, B.; BARANDIKA, J.; GARCÍA-PÉREZ, A.L. Single Tube nested PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in fetal tissues from naturally aborted ewes. **Veterinary Parasitology**, v.102, n.7, p.17-27, 2001.
- IMAI, T.; SANO, A.; MIKAMI, Y.; WATANABE, K.; AOKI, F.H.; BRANCHINI, M.L.; NEGRONI, R.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. A new PCR primer for the identification of *Paracoccidioides brasiliensis* based on rRNA sequences coding internal transcribed spacers (ITS) and 5.8S regions. **Medical Microbiology**, v.38, n.4, p.323-326, 2000.
- KASUGA, T.; TAYLOR, J.W.; WHITE, T.J. Phylogenetic relationships of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* darling. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n.3, p.653-663, 1998.
- KAUFFMAN, C.A. Fungal Infections. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v.5, n.3, p.35-40, 2006.
- KAUFFMAN, C.A. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. **Clinical Microbiology Reviews**, v.20, n.1, p.115-132, 2007.
- KOISHI, A.C.; VITURI, D.F.; DIONÍZIO FILHO, P.S.; SASAKI, A.A.; FELIPE, M.S.; VENANCIO, E.J. A semi-nested PCR Assay for Molecular Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in Tissue Samples. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.6, n.43, p.728-730, 2010
- KOMORI, T.; SANO, A.; YARITA, K.; KITAGAWA, T.; KAMEI, K.; NISHIMURA, K. Phylogenetic analysis of *Histoplasma capsulatum* based on partial sequence of D1/D2 region of the 28S rRNA gene. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi**, v.46, n.4, p.291-295, 2005.
- LINTON, C.J.; BORMAN, A.M.; CHEUNG, G.; HOLMES, A.D.; SZEKELY, A.; PALMER, M.D.; BRIDGE, P.D.; CAMPBELL, C.K.; JOHNSON, E.M. Molecular Identification of Unusual Pathogenic Yeast Isolates by Large Ribosomal Subunit Gene Sequencing: 2 years of experience at the United Kingdom Mycology Reference Laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p.1152-1158, 2007.
- LUTZ, A. Uma mycose pseudococcidica localisada na bocca e observada no Brazil. Contribuição ao conhecimento das hyphoblastomycosis americanas. **Brazil-Médico**, n. 13, p.121-124, 1908.
- MARIMON, R. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, Three new *Sporothrix* Species of Clinical Interest. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.10, p.3198-3206, 2007.
- MARTAGON-VILAMIL, J.; SHRESTHA, N.; SHOLTIS, M.; ISADA, C.M.; HALL, G.S.; BRYNE T LODGE, B.A.; RELLER, L.B.; PROCOP, G.W. Identification of *Histoplasma capsulatum* from Culture Extracts by Real-Time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.3, p.1295-1298, 2003.
- MARTINEZ, R. MOYA, M.J. The relationship between paracoccidioidomycosis and alcoholism. **Revista Saúde Pública**. v.26, p.6-12, 1992.

- MARTINEZ, R. Paracoccidioidomicose. *In*: SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.204-221, 2004.
- MATUTE, D.R.; SEPULVEDA, V.E.; QUESADA, L.M.; GOLDMAN, G.H.; TAYLOR, J.W.; RESTREPO, A.; MCEWEN, J.G. Microsatelite analysis of three phylogenetic species of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.6, p.2153-2157, 2006.
- MAYAYO, E.; LÓPEZ-ARACIL, V.; FERNÁNDEZ-TORRES, B.; MAYAYO, R. DOMÍNGUEZ, M. Report of an imported cutaneous disseminated case of paracoccidioidomycosis. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 24, n.1, p.44-46, 2007.
- McPHERSON, M.J.; QUIRKE, P.; TAYLOR, G.R. **PCR a Pratical Approach**. New York: Oxford University, 1994.
- MELO, F.L.; GOMES, A.L.; BARBOSA, C.S.; WERKHAUSER, R.P.; ABATH, F.G. Development of molecular approaches for the identification of transmission sites of schistosomiasis. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n.26, p.1049-1055, 2006.
- MONTENEGRO, L.M.L. Development of a single tube semi-nested PCR for genus-specific detection of *Plasmodium* in oligoparasitemic patients. **Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.98, n. 14, p.616-625, 2004.
- MOREIRA, D. Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations. **Nucleid Acid Research**, v.26, p.3309-3310, 1998.
- NEGRONI, P. The *Paracoccidioides brasiliensis* lives saprophytically in the soil of Argetina. **Prensa Médica Argentina**, v.53, n.39, p.2381-2382, 1966.
- NEGRONI, R. Clinical Spectrum and Treatment of Classis Histoplasmosis. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.17, n.2, 2000.
- OLIVEIRA, F.F.M. Caracterização molecular e morfológica de novos isolados do fungo *Paracoccidioides lutzii*. *In*: VI Congresso Brasileiro de Micologia, n.6, 2010. Brasília. **Anais**. p.198.
- ONO, M.A.; BRACARENSE, A.P.; MORAIS, H.S.; TRAPP, S.M.; BELITARDO, D.R.; CAMARGO, Z.P. Canine Paracoccidioidomycosis: a seroepidemiologic study. **Medical Micology**, v.39, n.2, p. 277-282, 2001.
- ONO, M.A.; KISHIMA, M.O.; ITANO, E.N.; BRACARENSE, A.P.; CAMARGO, Z.P. Experimental Paracoccidioidomycosis in Dogs. **Medical Micology**, v. 41, n.8, p.265-268, 2003.
- PANIAGO, A.M.M.; AGUIAR, .J., AGUIAR, E.S., DA CUNHA, R.V.; PEREIRA, G.R.; LONDERO, A.T.; WANKE, B. Paracoccidioidomycosis: a clinical and epidemiological study of 422 cases observed in Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.4, p.455-459, 2003.

- PRADO, M. SILVA, M.B.; LAURENTI, R.; TRAVASSOS, L.R.; TABORDA, C.P. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, n.3, p.513-521, 2009.
- RESTREPO, A. The ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Sabouraudia**, v.23, n.5, p.323-334, 1985.
- RETALLACK, D.M.; WOODS, J.P. Molecular Epidemiology, pathogenesis and genetics dimorphic fungus *Histoplasma capsulatum*. **Microbes Infect.** n.1, v.10, p.817-825, 1999.
- RICCI, G.; WAKAMATSU, A.; SERAFIM, R.C.; BORRA, R.C.; FRANCO, M. Paracoccidioidomycosis: case Canine report. **Medical Mycology**, v.42, n.2, p.379-383.
- RICKETS, V.; BIALEK, R.; TINTELNOT, K.; JACOBI, V.; JUST-NÜBLING, G.; Rapid PCR-based diagnosis of disseminated histoplasmosis in an AIDS patient. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.21, n.3, p.821-823, 2002.
- ROSSINI, T.F.; GOULART, L.S. Classis Histoplasmosis: Review. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.38, n.4, p.275-279, 2006.
- SALAZAR, M.E.; RESTREPO, A.; STEVENS, D.A. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*, **Infection and Immunology**, v.53, p.711-713, 1988.
- SAN-BLÁS, G.; NIÑO-VEGA, G.; ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Medical Mycology**, v.40, p.225-242, 2002.
- SAN-BLÁS, G.; NIÑO-VEGA, G.; BARRETO, L.; HEBELER-BARBOSA, F.; BAGAGLI, E.; OLIVERO DE BRICEÑO, R.; MENDES, R.P. Primers for clinical detection of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.8, p.4255-4257, 2005.
- SAN-BLÁS, G.; NIÑO-VEGA, G. *Paracoccidioides brasiliensis*: chemical and molecular tools for research on cell walls, antifungals, diagnosis, taxonomy. **Micopathologia**, v.165, n.4-5, p.183-95, 2008.
- SANDHU, G.S.; KLINE, B.C.; STOCKMAN, L.; ROBERTS, G.D. Molecular Probes for Diagnosis of Fungal Infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n.11, p.2913-2919, 1995.
- SANTOS, W.A. Associação entre tabagismo e paracoccidioidomicose: um estudo de casos-controle no estado do Espírito Santo, Brasil, **Cad Saúde Pública**, v.19, n.3, p.245-253.

SCHABEREITER-GURTNER, C.; SELITSCH, B.; ROTTER, M.L.; HIRSCHL, A.M.; WILLINGER, B. Development of a novel Real-Time PCR Assays for Detection and Differentiation of eleven medically important *Aspergillus* and *Candida* Species in Clinical Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p.906-914, 2007.

SHIKANAI-YASUDA, M.A.; Telles Filho, F.Q.; Mendes, R.P.; Colombo, A.L.; Moretti, M.L. Guidelines in paracoccidioidomycosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, n.3, n.297-310, 2006.

SILVA, D.F.V.R. **Detecção Molecular de *Paracoccidioides brasiliensis* por PCR em biópsias de lesão bucal de Paracoccidioidomicose**. 2008 Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental), Universidade Estadual de Londrina 2008.

SILVA-VERGARA, M.L. *Histoplasma capsulatum* isolated from *Didelphis albiventris* (marsupialia: Didelphidae) in the state os Minas Gerais, Brazil. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.18, n.14, p.180-182, 2001.

SILVA-VERGARA, M.L. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil off a coffe plantation in Ibia, State of Minas Gerais, Brazil. **Medical Mycology**, v.36, n.1, p.37-42, 1998.

SILVA-VERGARA, M.L.; MARTINEZ, R.; CAMARGO, Z.P.; MALTA, M.H.; MAFFEI, C.M.; CHADU, J.B. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus novemcintus*) in an area where the fungus was recently isolated from soil. **Medical Mycology**, v.38, n.3, p.193-199, 2000.

SPEERS, D.J. Clinical Applications of Molecular Biology for Infectious Diseases. **Clinical Biochemist Reviews**, v.27, p.39-51, 2006.

STEFAN, R.J.; GOKSØYR, J.; BEJ, A,K.; ATLAS, R.M. Recovering of DNA from soils and sediments. **Applied and enviromental microbiology**, v.54, n.12, p.2908-2915, 1988.

STOCKMAN, L.; CLARK, K.A.; HUNT, J.M.; ROBERTS, G.D. Evaluation of commercially of available acridinium ester-labeled chemiluminescent DNA probes for culture identification of *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, n.2, p.845-850, 1993.

TAYLOR, M.L.; CHÁVEZ-TAPIA, C.B.; VARGAS-YAÑEZ, R.; RODRÍGUEZ-ARELLANES, G.; PEÑA-SANDOVAL, G.R.; TORIELLO, C.; PÉREZ, A. REYES-MONTES, M.R. Enviromental conditions favoring bat infection with *Histoplasma capsulatum* in Mexican Shelters. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.6, n.61, p.914-919, 1999.

TAKAYAMA, A.; ITANO, E.N.; SANO, A.; ONO, M.A.; KAMEI, K. An atypical *Paracoccidioides brasiliensis* clinical isolate based on multiple gene analysis. **Medical Mycology**, v. 16, p.1-9, 2009.

TAYLOR, M.L.; CHÁVEZ-TAPIA, C.B.; ROJAS-MARTÍNEZ, A.; DEL ROCIO REYES-MONTES, M.; DEL VALLE, M.B.; ZÚÑIGA, G. Geographical distribution of genetic polymorphism of the pathogen *Histoplasma capsulatum* isolated from infected bats, captured in a central zone of Mexico. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.45, n.2, p.451-458, 2005.

TAVARES, E.R. **Padronização de uma Semi-nested PCR para Detecção Molecular do fungo *Histoplasma capsulatum***. 2009. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas), Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

THEODORO, R.C. Gênero *Paracoccidioides*: reconhecimento de espécie e aspectos biogeográficos. In: VI Congresso Brasileiro de Micologia, n.6, 2010, Brasília. **Anais**. p.212.

THEODORO, R.C.; CANDEIAS, J.M.; ARAÚJO, J.P. JR.; BOSCO, S.D.E.M.; MACORIS, S.A.; PADULA, L.O.; FRANCO, M. BAGAGLI, E. Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in soil. **Medical Micology**, v.43, n.8, p.725-729, 2005.

UNIS, G.; OLIVEIRA, F.M.; SEVERO, L.C. Histoplasmose disseminada no Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n.2, p.463-468, 2004.

VALLE, A.C.F. Tratamento da Paracoccidioidomicose. Estudo retrospectivo de 500 casos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.68, n. 4, p.65-70, 1993.

VERLI, F.D. Perfil clínico-epidemiológico dos pacientes portadores de paracoccidioidomicose no Serviço de Estomatologia do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.38, n.3, p.234-237, 2005.

VIDAL, M.S.M.; BENARD, G.; DE BRITO, T. DANTAS, K.C.; PEREIRA, C.N.; FRANÇA, F.O.; DA SILVA, A.M.; MARTINS, J.E. Atypical serological response marked by a lack of detectable anti-gp43 antibodies in a patient with disseminated paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p.3014-3016, 2005.

VISBAL, G.; SAN-BLAS, G.; MURGICH, J.; FRANCO, H. *Paracoccidioides brasiliensis*, paracoccidioidomycosis, and antifungal antibiotics. **Current Drug Targets Infectious Disorders**, v.5, n.3, p.211-226, 2005.

WANKE, B.; LAZERA, M. Histoplasmose Clássica e Africana. In: SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanbara Koogan, 2004, p.222-236.

WHEAT, L.J.; FREIFELD, A.G.; KLEIMAN, M.B.; BADDLEY, J.W.; MCKINSEY, D.S.; LOYD, J.E.; KAUFFMAN, C.A. Clinical practice guidelines for the management of patients with Histoplasmosis. **Clinical Infectious Diseases**, v.45, n.4, p.807-825, 2007.

HITE, P.L; PERRY, M.D; BARNES, R.A. An update on the Molecular Diagnosis of Invasive Fungal Disease. **FEMS Microbiology Letters**, v.32, n.296, p.1-10, 2009.

WHITE, T.J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A. et al. **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. San Diego: Academic Press, p.315-322, 1990.

WOODS, J.P. *Histoplasma capsulatum* molecular genetics, pathogenesis and responsiveness to its environment. **Fungal Genetics and Biology**, v.35, n.9, p.81-97, 2002.

YLITALO, N.; BERGSTROM, T.; GYLLENSTEN, U. Detection of Human Papillomavirus by Single-Tube Nested PCR and Type-Specific Oligonucleotide Hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, n.7, p.1822-1828, 1995.

ZHOU, J.; BRUNS, M.A.; TIEDJE, J.M. DNA recovery from soils of diverse composition. **Applied and environmental microbiology**, v.62, n.2, p.316-322, 1996.