

JANAINA CORREIA

**Clonagem e sequenciamento de um fragmento de DNA
específico de um isolado virulento de
Paracoccidioides brasiliensis.**

RECIFE

2004

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Micologia
Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos

Clonagem e sequenciamento de um fragmento de DNA específico de um isolado virulento de *Paracoccidioides brasiliensis*.

Por

Janaina Correia

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Biologia de Fungos na área de concentração de Micologia Aplicada.

Orientadores:

Dr. Marcos Antônio de Morais Jr, Departamento de Genética, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE.

Dra. Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva, Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), FIOCRUZ, Recife, PE.

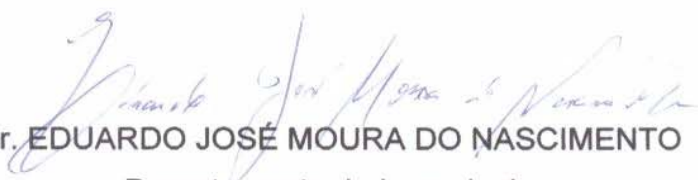
Dra. Cíntia de Moraes Borba, Departamento de Micologia, Instituto Oswaldo Cruz (IOC), FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ.

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Departamento de Micologia
Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos

Esta dissertação intitulada *Clonagem e sequenciamento de um fragmento de DNA específico de um isolado virulento de Paracoccidioides brasiliensis*, apresentada por Janaina Correia, foi defendida e avaliada publicamente em 05 de Março de 2004 diante da banca examinadora composta pelos seguintes membros:


Dr. MARCOS ANTÔNIO DE MORAIS JR.
Departamento de Genética
Universidade Federal de Pernambuco


Dra. NEIVA TINTI DE OLIVEIRA
Departamento de Micologia
Universidade Federal de Pernambuco


Dr. EDUARDO JOSÉ MOURA DO NASCIMENTO
Departamento de Imunologia
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-FIOCRUZ

Ofereço

Ao meu esposo Renato, pelo amor, carinho e compreensão ao longo de todo o caminho.

Dedico

A minha mãe Lourdes e a minha avó Soledade pelo apoio fundamental em todos os momentos da minha vida.

*A verdadeira viagem de descobertas
não consiste em procurar novos
horizontes, mas em ter novos olhos...*

(Marcel Proust)

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por me ajudar a manter acesa a luz da determinação ao longo da minha vida e por me ajudar a concretizar idéias.

Agradeço a Universidade Federal de Pernambuco e a Pós-Graduação em Biologia de Fungos pela oportunidade concedida em consolidar meus conhecimentos acerca deste tão fascinante reino, o reino Fungi.

Agradeço ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) o financiamento da minha bolsa de mestrado.

Agradeço especialmente a Dr^a. Norma Lucena do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, por ter confiado em mim e no meu trabalho, pela oportunidade única de aprender o “estado da arte” de *Paracoccidoides brasiliensis*, por ter me inserido nos estudos de biologia molecular e por ter me orientado com paciência e dedicação ao longo de todo o caminho.

Agradeço ao Prof. Marcos Morais do Departamento de Genética da Universidade Federal de Pernambuco, por ter me aceitado para orientar-me, pela confiança em mim e pela compreensão.

Agradeço a Dr^a. Cíntia de Moraes Borba, do Departamento de Micologia do Instituto Oswaldo Cruz, pela especial colaboração e interesse no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço carinhosamente a Ester Augusta Vinhas que me inseriu e me orientou sempre que possível nas práticas de biologia molecular.

Agradeço carinhosamente a Prof^a. Lusinete Aciole de Queiroz, Oliane Magalhães, Rejane Neves e Armando Mardsen, do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, por me iniciarem nos estudos de micologia médica, estudos estes que jamais esquecerei.

Não poderia deixar de agradecer com carinho a todos os meus amigos do Laboratório de Imunoepidemiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães pelos momentos de descontração, pelo ambiente de trabalho, pelo espírito de coletividade e pela grande ajuda nas horas necessárias.

E por fim, agradeço ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães pela estrutura concedida, que possibilitou a realização deste trabalho.

Muito Obrigada.

RESUMO

Paracoccidioides brasiliensis é um fungo dimórfico e agente etiológico da paracoccidioidomicose, uma micose sistêmica de evolução aguda ou crônica que se não diagnosticada e tratada a tempo pode ser fatal. Um método molecular para caracterização e detecção de *P. brasiliensis* foi desenvolvido a partir da clonagem e do sequenciamento de um fragmento de DNA de ~750 pb, obtido por RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), presente em isolados virulentos e ausente em isolados avirulentos deste fungo. Uma região interna do fragmento de DNA seqüenciado foi usada para desenhar *primers* que posteriormente foram utilizados em uma reação de *hemi-nested PCR* em tubo único. A reação de PCR específica foi capaz de amplificar DNA de três isolados de *P. brasiliensis* reconhecidamente virulentos e três isolados recentemente obtidos de pacientes com paracoccidioidomicose. A especificidade desta PCR foi confirmada pela ausência de produtos amplificados com DNA genômico de isolados de *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Sporothrix schenckii*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Leishmania braziliensis*, *Trypanosoma cruzi*, *Schistosoma mansoni*, DNA genômico humano (leucócitos) e de isolados de *P. brasiliensis* reconhecidamente avirulentas. A amplificação de cDNA de um isolado virulento sugere tratar-se de um gene expresso. A detecção específica de isolados virulentos de *P. brasiliensis* sugere ser este um candidato a marcador de virulência para este fungo. O potencial diagnóstico da PCR específica foi verificado com DNA extraído de aspirado de linfonodo de um paciente com paracoccidioidomicose.

ABSTRACT

Paracoccidioides brasiliensis is a dimorphic fungus and the etiologic agent of paracoccidioidomycosis, a systemic mycosis of acute or chronic evolution, which can be fatal if not diagnosed and treated. A molecular method for characterization and detection of *P. brasiliensis* was developed from cloning and sequencing of a DNA fragment of ~750 bp obtained by *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) methodology and presenting in virulent and not avirulent fungi strains. An internal region of the sequenced fragment was used to draw *primers* that were utilized in a new PCR test. A specific PCR reaction was capable of amplifying DNA from three virulent strains well characterized and three isolates recently obtained from patients with paracoccidioidomycosis. The PCR specificity was determined by the absence of amplified products with genomic DNA from *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Sporothrix schenckii*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Leishmania braziliensis*, *Trypanosoma cruzi*, *Schistosoma mansoni*, human genomic DNA (leukocytes) and four *P. brasiliensis* avirulent strains. The PCR fragment amplified from cDNA of virulent sample suggested that it is an expressed gene. The fact that the PCR product was obtained only with genetic material from virulent isolates of *P. brasiliensis* suggested this partial amplified gene might be a marker of virulence for this fungus. The diagnostic potential of this PCR was confirmed by the successful amplification of this fragment with genomic DNA obtained in lymph node aspirate from a patient with paracoccidioidomycosis.

LISTA DE TABELAS

| | Página |
|--|--------|
| Tabela 1. Identificação e origem dos isolados fúngicos | 18 |
| Tabela 2. Condições de cultivo dos isolados fúngicos | 19 |
| Tabela 3. Seqüência dos <i>primers</i> homólogos à seqüência CEJA-1 de <i>P. brasiliensis</i> . | 24 |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|---|--------|
| Figura 1. Micromorfologia de um isolado virulento de <i>P. brasiliensis</i> com morfologia normal crescida em PYG ágar à temperatura de 23°C. | 7 |
| Figura 2. Micromorfologia de um isolado virulento de <i>P. brasiliensis</i> com morfologia normal crescida em PYG ágar à temperatura de 36°C. | 7 |
| Figura 3. Micromorfologia de um isolado avirulento “mutante” de <i>P. brasiliensis</i> com morfologia alterada crescida em PYG ágar à temperatura de 23°C. | 8 |
| Figura 4. RAPD de isolados virulentos e avirulentos de <i>P. brasiliensis</i> . | 8 |
| Figura 5. PCR dos clones de <i>E. coli</i> DH5- α usando <i>primers</i> homólogos à seqüência do vetor para verificação da inserção dos fragmentos de RAPD-PCR de <i>P. brasiliensis</i> (Pb IOC 3698 e Pb 339) no plasmídeo. | 32 |
| Figura 6. Eletroferograma parcial da seqüência CEJA-1 de <i>P. brasiliensis</i> gerada com <i>primer</i> do vetor. | 33 |
| Figura 7. Eletroferograma parcial da seqüência CEJA-2 de <i>P. brasiliensis</i> gerada com <i>primer</i> do vetor. | 33 |
| Figura 8. Seqüência CEJA-1 do clone 7 de Pb IOC 3698. | 34 |
| Figura 9. Seqüência de DNA CEJA-2 do clone 3 de Pb 339. | 34 |

| | Página |
|--|--------|
| Figura 10. Análise da similaridade da seqüência CEJA-1 com as seqüências depositadas no programa BLAST. | 35 |
| Figura 11. Análise da similaridade da seqüência CEJA-2 com as seqüências de nucleotídeos depositadas no programa BLAST. | 35 |
| Figura 12. Resultado da similaridade entre as seqüências CEJA-2 de Pb IOC 3698 (<i>Query</i>) e CEJA-2 de Pb 339 (<i>Sbjct</i>), mostrando 100% de homologia. | 36 |
| Figura 13. Otimização da temperatura de anelamento dos <i>primers</i> PBEXF e PBEXR, homólogos à seqüência CEJA-1. | 37 |
| Figura 14. Otimização da concentração de magnésio da PCR “PBEXF/PBEXR”. | 38 |
| Figura 15. Determinação do limite de detecção de DNA genômico da PCR “PBEXF/PBEXR”. | 38 |
| Figura 16. PCR “PBEXF/PBEXR” com isolados reconhecidamente virulentos e avirulentos de <i>P. brasiliensis</i> , bem como com isolados de <i>P. brasiliensis</i> recentemente obtidos de pacientes | 39 |
| Figura 17. PCR com <i>primers</i> universais ITS1 e ITS4 específicos para fungos, em presença de DNA genômico de fungos. | 40 |
| Figura 18. PCR com <i>primers</i> universais ITS1 e ITS4 específicos para fungos em presença de DNA genômico de isolados virulentos e avirulentos de <i>P. brasiliensis</i> . | 41 |

| | Página |
|---|--------|
| Figura 19. PCR “PBEXF/PBEXR” com de cDNA de um isolado virulento e um avirulento de <i>P. brasiliensis</i> . | 41 |
| Figura 20. Esquema da reação de <i>hemi-nested</i> PCR para detecção de <i>P. brasiliensis</i> . | 42 |
| Figura 21. Otimização das temperaturas de anelamento da PCR “PBEXF-2/PBEXR-2” (gel superior) e da PCR “PBEXF-2/PBINR-2” (gel inferior) usadas na primeira e na segunda reação de <i>hemi-nested</i> PCR, respectivamente. | 43 |
| Figura 22. Otimização das temperaturas de anelamento da PCR simples com os <i>primers</i> PBEXF-2 e PBINR-2 para detecção da seqüência CEJA-1 de <i>P. brasiliensis</i> a partir do produto da PCR com os <i>primers</i> externos (PBEXF-2 e PBEXR-2). | 44 |
| Figura 23. Determinação do limite de detecção de DNA genômico da PCR “PBEXF-2/PBINR-2”. | 45 |
| Figura 24. Especificidade da <i>hemi-nested</i> PCR com os <i>primers</i> PBEXF-2 e PBINR-2. | 46 |
| Figura 25. <i>Hemi-nested</i> PCR em tubo único para o diagnóstico molecular da paracoccidiodomicose. | 46 |
| Figura 26. Exame direto a fresco da amostra de aspirado de linfonodo do paciente com paracoccidiodomicose. | 47 |

LISTA DE ABREVIÇÕES

BLAST = *Basic Local Alingment Search Tool*

BLASTn = *Basic Local Alingment Search Tool nucleotides*

DNA* = ácido desoxirribonucléico

CCF = coleção de cultura de fungos

CEJA-1 = fragmento ou seqüência de DNA de *P. brasiliensis*

CEJA-2 = fragmento ou seqüência de DNA de *P. brasiliensis*

cDNA* = ácido desoxirribonucléico complementar

DEPC = dietilpirocarbonato

dNTP's = desoxinucleosídeos trifosfatos

EDTA* = ácido etilenodiaminotetracético

ESTs = *Expressed Sequence Tags*

gp43 = glicoproteína de 43 kDa

ID = Imunodifusão Dupla

IOC = Instituto Oswaldo Cruz

kDa = 10^3 Daltons

L = leveduriforme

M = micelial

OPF = *Operon Technologies* kit F de *primers* arbitrários

pb = pares de base

P. = *Paracoccidioides*

Pb = *Paracoccidioides brasiliensis*

Pb IOC = cepa de *P. brasiliensis* preservada na CCF-IOC

pH = potencial hidrogeniônico

PBS* = salina tamponada

PCR* = reação em cadeia da polimerase

PYG = meio de cultura (peptona + extrato de levedura + glicose)

RAPD* = DNA polimórfico amplificado ao acaso

RNA* = ácido ribonucléico

SDS* = dodecil sulfato de sódio

SIDA = síndrome da imunodeficiência adquirida

TAE = tris base + ácido acético + EDTA

Taq = *Thermus aquaticus*

UV = ultravioleta

T_m* = temperatura de fusão

® = marca registrada

* Abreviatura em inglês

As unidades de medida utilizadas no texto seguem a nomenclatura do Sistema Internacional de Unidades (SI).

SUMÁRIO

| | Página |
|---|--------|
| INTRODUÇÃO | 1 |
| OBJETIVOS | 3 |
| REVISÃO DA LITERATURA | 4 |
| I. <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> | 4 |
| II. Ecologia | 10 |
| III. Epidemiologia | 11 |
| IV. Paracoccidioidomicose | 12 |
| V. Diagnóstico | 14 |
| MATERIAIS E MÉTODOS | 17 |
| I. Isolados fúngicos | 17 |
| II. Amostra clínica | 17 |
| III. Pré-inóculo | 18 |
| IV. Extração de DNA | 19 |
| V. Extração de RNA total e obtenção de cDNA | 20 |
| VI. PCR “ <i>All Fungi</i> ” | 21 |
| VII. RAPD com isolados virulentos de <i>P. brasiliensis</i> | 22 |
| VIII. Clonagem | 22 |
| IX. Identificação do inserto no plasmídeo | 23 |
| X. Sequenciamento de DNA | 24 |
| XI. Desenho dos <i>primers</i> | 24 |
| XII. Otimização das condições da PCR para identificação da seqüência CEJA-1 de <i>P. brasiliensis</i> | 25 |
| XIII. Desenvolvimento de teste molecular para diagnóstico da paracoccidioidomicose | 27 |
| XIV. Exame direto e cultura | 30 |
| RESULTADOS | 31 |
| DISCUSSÃO | 48 |
| CONCLUSÕES | 52 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 53 |
| ANEXO | |

INTRODUÇÃO

Paracoccidioides brasiliensis é um fungo anamorfo, dimórfico e agente etiológico da paracoccidioidomicose, uma micose sistêmica de evolução aguda ou crônica que freqüentemente afeta os pulmões podendo se disseminar para outros órgãos e sistemas, manifestando-se também sob as formas assintomáticas ou frustras. A paracoccidioidomicose é uma micose restrita a América Latina, onde existem regiões de alta endemicidade (LACAZ, 1982; BRUMMER *et al.*, 1993). Está estimado que aproximadamente 90 milhões de pessoas vivem em áreas endêmicas e que 10 milhões podem estar infectadas com *P. brasiliensis* (RESTREPO *et al.*, 2001).

P. brasiliensis é um fungo que apresenta forma filamentosa à temperatura ambiente ($\pm 23^{\circ}\text{C}$) e forma leveduriforme a $36\text{-}37^{\circ}\text{C}$ e em tecidos do hospedeiro. A infecção é adquirida pela inalação de conídios que ao atingirem os alvéolos pulmonares transformam-se na forma parasitária. A variabilidade fenotípica da morfogênese em fungos patogênicos dimórficos tem sido por longo tempo correlacionada com a virulência, mas os mecanismos moleculares e genéticos estão sendo descobertos apenas recentemente (SAN-BLAS *et al.*, 2000). A patogenicidade de *P. brasiliensis* parece estar intimamente ligada à transição dimórfica, uma vez que isolados que são incapazes de se transformar em leveduras são avirulentos (BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002). Mendes da Silva *et al.* (1994), estudando a viabilidade e alterações morfológicas de 70 isolados de *P. brasiliensis* preservados sob óleo mineral por longo período de tempo, identificaram isolados que foram incapazes de crescer e completar o processo de dimorfismo térmico à temperatura de 37°C , permanecendo num estágio morfológico de transição. Borba & Schäffer (2002), examinando a virulência desses isolados de *P. brasiliensis*, que realizam e não o dimorfismo térmico, em camundongos BALB/c machos, caracterizaram cepas virulentas e avirulentas “mutantes” de *P. brasiliensis*. Recentemente, Borba (2002), estudando a variabilidade genética destes isolados virulentos e avirulentos de *P. brasiliensis* através da técnica de RAPD identificou um fragmento de DNA de aproximadamente 750 pb presente apenas nos isolados virulentos e concluiu, desta forma, que a preservação sob óleo mineral por longos períodos de tempo alterou o dimorfismo e a virulência destas amostras, pela diminuição da atividade metabólica, que pode ter propiciado o acúmulo de metabólitos tóxicos e estes terem exercido uma ação mutagênica sobre os isolados

estudados. Cepas mutantes de *P. brasiliensis*: avirulentos, virulentos ou virulentos apenas após passagem no hospedeiro mamífero, e com morfologia alterada (p. ex.: levedura a temperatura ambiente e conteúdo reduzido de α -glucana) são importantes na comparação da expressão gênica e na identificação de genes de virulência relacionados com a transição para a forma leveduriforme (BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002).

Um método molecular rápido e eficiente, para identificar e distinguir diferentes isolados de *P. brasiliensis*, poderá ser usado para diagnóstico, investigações epidemiológicas e determinação dos mecanismos de infecção e patogenicidade (GOLDANI *et al.*, 1995).

O diagnóstico da paracoccidiodomicose é obtido tanto por visualização, isolamento e identificação do fungo através de técnicas microbiológicas e histopatológicas (BRUMMER *et al.*, 1993), bem como por detecção de anticorpos ou antígenos circulantes específicos de *P. brasiliensis* através de técnicas sorológicas (ORTIZ *et al.*, 1998; SALINA *et al.*, 1998; DÍEZ *et al.*, 2003). Métodos moleculares baseados em ensaios de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) têm sido desenvolvidos para detecção de *P. brasiliensis* tanto a partir de cultura (GOLDANI *et al.*, 1995; IMAI *et al.*, 2000; MOTOYAMA *et al.*, 2000) como a partir de amostras clínicas (BIALEK *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 2000). Os métodos moleculares são úteis ao diagnóstico, atendendo os requisitos de sensibilidade, especificidade e rapidez (CISALPINO & TRAVASSOS, 2000).

OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos caracterizar o fragmento de RAPD de 750 pb detectado por Borba (2002), específico de isolados virulentos de *P. brasiliensis*, bem como desenvolver um teste molecular de *hemi-nested PCR* em tubo único para o diagnóstico da paracoccidiodomicose.

REVISÃO DA
LITERATURA

I. *Paracoccidioides brasiliensis*

Paracoccidioides brasiliensis (Splendore) Almeida, 1930, é um fungo dimórfico, que se caracteriza por apresentar uma fase leveduriforme (L) a temperatura de 37°C e em tecidos do hospedeiro, e uma fase filamentosa ou micelial (M) a temperatura ambiente (LACAZ *et al.*, 2002). É um fungo anamorfo, uma categoria taxonômica artificial que compreende os fungos de estágio meiótico desconhecido. Seu estágio sexual teleomórfico ainda não foi determinado (SAN-BLAS *et al.*, 2002).

Na fase leveduriforme, as colônias são de cor creme, consistência cremosa e de aspecto cerebriforme, sendo visualizadas após 10 a 15 dias de incubação. As colônias são compostas de células de levedura de diferentes tamanhos (4-30 µm), usualmente ovais, multiplicando-se por brotamento simples ou múltiplo, muitas vezes idênticas às formas observadas no tecido. A fase filamentosa ou micelial cresce lentamente (20 a 30 dias a 20-26°C), produz colônias brancas, de aspecto cotonoso, semelhantes a pêlos de rato branco. Microscopicamente são observadas hifas hialinas, delicadas e septadas, clamidosporos intercalares laterais ou terminais e aleuroconídeos também podem ser observados, de acordo com a composição do meio (BRUMMER *et al.*, 1993; LACAZ *et al.*, 1998). A forma micelial de *P. brasiliensis* é convertida em leveduriforme via clamidosporo e este processo de conversão é dependente da temperatura, porém existem relatos de que fatores nutricionais também são importantes (SALAZAR & RESTREPO, 1984; MIYAJI *et al.*, 2003). A inibição da transição do conídio de *P. brasiliensis* para levedura por estrógenos tem sido descrita *in vitro* (SALAZAR *et al.*, 1988) e *in vivo* (ARISTIZABAL *et al.*, 1998).

O dimorfismo também é observado em outros fungos patogênicos, agentes etiológicos de micoses profundas, como *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii* e *Coccidioides immitis* (KUROKAWA *et al.*, 1998).

Os eventos metabólicos e os mecanismos regulatórios envolvidos durante a transição M⇌L ainda não estão compreendidos. Eventos relacionados à síntese e montagem da parede celular fúngica têm sido o foco de pesquisas para a elucidação dos aspectos moleculares do dimorfismo em *P. brasiliensis* (SAN-BLAS, 1993; SAN-BLAS *et al.*, 2002).

A quitina é o principal componente estrutural da parede celular de fungos. As paredes celulares da forma leveduriforme e filamentosa de *P. brasiliensis* diferem quanto à espessura e quanto à composição e estruturação dos polissacarídeos glucanas. Na fase leveduriforme a parede apresenta espessura de 200 a 600 nm e é constituída de 95% de α -1,3-glucana e 5% de β -1,3-glucana, enquanto que na fase filamentosa a espessura da parede varia de 80 a 150 nm e é composta quase que exclusivamente pela forma de β -glucana. Outros polissacarídeos também podem ser encontrados em quantidades pequenas (SAN-BLAS & SAN-BLAS, 1982). Estudos de bioquímica da síntese de glucanas e mais recentemente, de sequenciamentos de genes que codificam glucana e quitina sintetases têm sido realizados para vários patógenos fúngicos (SAN-BLAS *et al.*, 2002).

O gene *fksb1* de *P. brasiliensis*, homólogo ao gene da β -1,3-glucana sintetase de *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus nidulans*, respectivamente *fks1* e *fks2*, foi sequenciado (PEREIRA *et al.* 2000). Este gene foi interpretado como sendo importante no processo de transição dimórfica que ocorre no estabelecimento da infecção no hospedeiro. Estes autores também encontraram dois outros fragmentos de DNA que podem corresponder a genes que codificam glucana sintetases diferentes. Essa possível ocorrência de mais de um *fks* homólogo em *P. brasiliensis* pode sugerir regulação gênica diferencial em uma família *fks* deste patógeno. Também é possível considerar que uma destas seqüências seja de uma α -1,3-glucana sintetase, embora o gene da α -1,3-glucana sintetase não tenha sido relatado em *P. brasiliensis*. Sabe-se que um gene chamado *mok1* + (21) é essencial no processo de fissão da levedura *Schizosaccharomyces pombe* e que a proteína traduzida deste gene, de peso molecular 272 kDa, consiste de dois prováveis domínios catalíticos para a montagem de α -glucana e um domínio que contribui com o transporte deste polissacarídeo através da membrana (SAN-BLAS *et al.*, 2002).

A composição genética de *P. brasiliensis* é pouco conhecida. O estado de ploidia de *P. brasiliensis* não é completamente conhecido, mas dados disponíveis sugerem que o fungo é diplóide e que possui de quatro a cinco cromossomos, variando no tamanho de 2-10 Mb. O tamanho do genoma está estimado em 23-30 Mb, indicando a presença de 10.000 a 15.000 genes (CANO *et al.*, 1998; MONTROYA *et al.*, 1999). Isolados haplóides existem e a existência de isolados anaplóides de *P. brasiliensis* deve ser considerada (FEITOSA *et al.* 2003).

A tipagem molecular de isolados de *P. brasiliensis* é especialmente importante e vem sendo aplicada tanto em estudos de diversidade genética quanto na caracterização de genes diferencialmente expressos (McEWEN *et al.*, 2000; VENÂNCIO *et al.*, 2002). A técnica de RAPD tem sido freqüentemente utilizada para revelar importantes características intrínsecas e extrínsecas de *P. brasiliensis* associadas com origem geográfica, tempo de isolamento, tipo de amostra clínica, forma clínica da doença, virulência e avirulência, susceptibilidade *in vitro* e *in vivo* a drogas antimicrobianas e antifúngicas (SOARES *et al.*, 1995; CALGANO, *et al.*, 1998; MOTTA *et al.*, 2002; HAHN *et al.*, 2003). A utilização de *primers* arbitrários escolhidos aleatoriamente para a distinção de isolados virulentos e avirulentos de *P. brasiliensis* não tem tido sucesso (MOTTA *et al.* 2002). Entretanto, Borba (2002) identificou um fragmento de DNA presente em isolados de *P. brasiliensis* virulentos com morfologia normal (Figura 1 e 2) e ausente em isolados de *P. brasiliensis* avirulentos com morfologia alterada (Figura 3), a partir de tipagem por RAPD (Figura 4). Abordagens moleculares de cepas mutantes avirulentas são estratégias alternativas de análise da virulência do *P. brasiliensis* e extremamente úteis para o entendimento dos fatores associados com a invasão e com o processo de infecção desse fungo, abrindo novas perspectivas no desenvolvimento de novas terapias (BORBA, 2002).

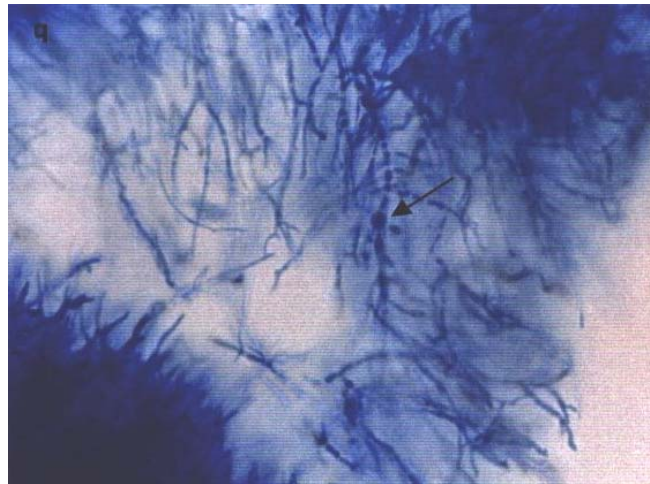


Figura 1. Micromorfologia de um isolado virulento de *P. brasiliensis* com morfologia normal crescida em PYG ágar à temperatura de 23°C. Presença de filamentos delgados e espessos com dilatações intercalares ao longo das hifas (→). Aumento original 400 x. Foto cedida por Dra. Cintia de Moraes Borba, IOC, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ.

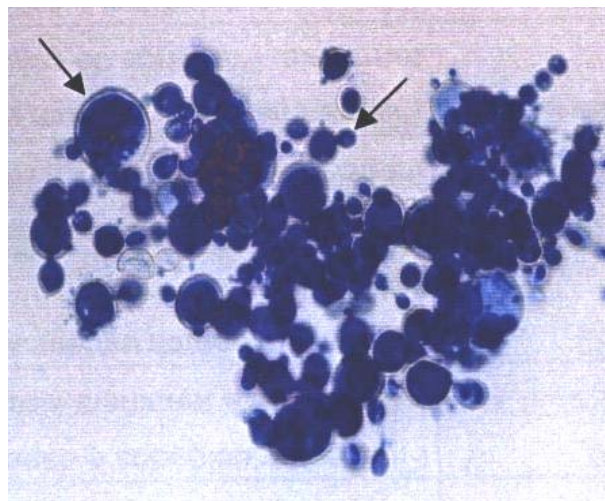


Figura 2. Micromorfologia de um isolado virulento de *P. brasiliensis* com morfologia normal crescida em PYG ágar à temperatura de 36°C. Presença de células leveduriformes apresentando uni e multibrotamentos (→). Aumento original 400 x. Foto cedida por Dra. Cintia de Moraes Borba, IOC, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ.

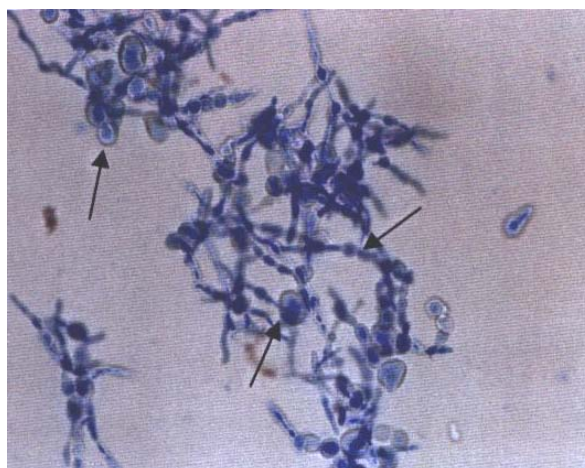


Figura 3. Micromorfologia de um isolado avirulento “mutante” de *P. brasiliensis* com morfologia alterada crescida em PYG ágar à temperatura de 23°C. Presença de filamentos espessos e grande quantidade de células leveduriformes (→). À temperatura de 36-37°C não há crescimento. Aumento original 400 x. Foto cedida por Dra. Cintia de Moraes Borba, IOC, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ.

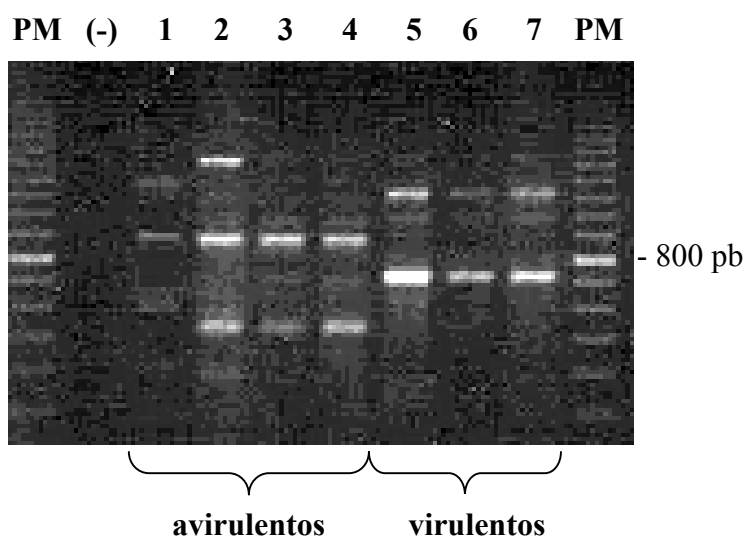


Figura 4. RAPD dos isolados virulentos e avirulentos de *P. brasiliensis*. Avirulentos: Pb IOC 1059 (1); Pb IOC 1208 (2); Pb IOC 1210 (3) e Pb IOC 1099 (4). Virulentos: Pb 339 (5); Pb 18 (6) e Pb IOC 3698 (7). (-) indica controle negativo e PM indica marcador de peso molecular de 100 pb. Ladder. Foto cedida por Dra. Cintia de Moraes Borba, IOC, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ.

Nos últimos anos, genes diferencialmente expressos na fase leveduriforme e filamentosa de *P. brasiliensis*, bem como envolvidos no processo de transição, têm sido freqüentemente isolados e identificados (SILVA *et al.*, 1999; NIÑO-VEGA *et al.*, 2000; VENANCIO *et al.*, 2002; FELIPE *et al.*, 2002; GOLDMAN *et al.*, 2003). Um mapa parcial do transcriptoma do fungo foi gerado e foi identificado um total de 2.160 genes de *P. brasiliensis*, que possivelmente representa 1/4 do repertório de genes neste fungo (FELIPE *et al.*, 2002). Atualmente (última análise em 29/02/2004), estão depositadas no GenBank 17.598 seqüências de nucleotídeos e 142 seqüências de proteínas de *P. brasiliensis* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

A identificação de características e genes de virulência e patogenicidade em *P. brasiliensis* tem sido realizada e freqüentemente relacionada a outros fungos que apresentam mudanças morfológicas (GOLDMAN *et al.*, 2003). Estudos realizados com isolados mutantes de *Candida albicans* incapazes de formar hifa e avirulentos em modelo murino de candidíase disseminada, sugerem que a mudança na forma de levedura para hifa, e não necessariamente a forma do fungo, é importante para a virulência (ROMANI *et al.* 2002). Desta forma, a caracterização molecular de isolados mutantes de *P. brasiliensis* no processo de transição dimórfica pode ser particularmente importante.

A virulência de *P. brasiliensis* tem sido estudada sob diferentes aspectos, tais como: composição de lipídeos (MANOCHA *et al.*, 1980), síntese de proteínas (SALEM-IZACC *et al.*, 1997), análise bioquímica de antígenos (HAMDAN *et al.*, 1992) e, mais recentemente, habilidade em produzir condroitinase e hialuronidase, enzimas que são consideradas fatores de virulência (ASSIS *et al.*, 2003).

P. brasiliensis apresenta uma complexa composição antigênica. A glicoproteína de massa 43kDa (gp43), reconhecida como o principal exoantígeno de *P. brasiliensis* e marcador molecular deste fungo, vem sendo amplamente caracterizada (PUCCIA *et al.*, 1986; MENDES-GIANINI *et al.*, 1990; MORAIS *et al.*, 2000). O gene da gp43 foi clonado e seqüenciado mostrando homologia de 56 e 58% com exo- α -1,3-D-glucanases de *S. cerevisiae* e *C. albicans*, respectivamente (CISALPINO *et al.*, 1996). Este antígeno é considerado um imunógeno e tem sido associado com a patogênese do fungo (TABORDA *et al.*, 1998). O antígeno protéico 27 kDa, além de outros, também vêm sendo caracterizados (ORTIZ *et al.*, 1998, 2003). Seis novos antígenos de *P. brasiliensis* associados com a resposta imune no hospedeiro foram identificados. Esses antígenos foram caracterizados como sendo

catalase, aldolase, duas isoformas de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, malato desidrogenase e triosefosfato isomerase, respectivamente. Entre os possíveis papéis desses antígenos em *P. brasiliensis*, destacam-se: catalase, que tem função de neutralizar os efeitos oxidativos da célula hospedeira trabalhando como fator de virulência; gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, que é considerado um antígeno em *C. albicans* e também o principal antígeno de superfície em *Schistosoma mansoni*, estando também associado com resistência na esquistosomose. O antígeno triosefosfato isomerase tem sido descrito como imunógeno de *S. japonicum* (FONSECA *et al.* 2001).

II. ECOLOGIA

Algumas características podem favorecer o desenvolvimento de *P. brasiliensis* na natureza, tais como temperatura entre 17 e 24°C, pluviosidade anual oscilando entre 500 e 2500 mm, altitude de 400-1200 m acima do nível do mar, alta umidade relativa do ar, presença de florestas tropicais ou subtropicais, pH do solo ligeiramente ácido e existência de plantações de café e cana-de-açúcar (CALLE *et al.*, 2001).

P. brasiliensis já foi isolado do solo de várias regiões endêmicas, de ração para caninos, de tatus da espécie *Dasytus novemcinctus* e de fezes de pingüim excretadas na Antártica uruguaia (GARCIA *et al.*, 1993; SILVA-VERGARA *et al.*, 1998; BAGAGLI *et al.*, 1998; FRANCO *et al.*, 2000), entretanto o habitat de *P. brasiliensis* e seus possíveis nichos ecológicos mais restritos (reservárias) ainda não estão definidos. As tentativas de reisolamento do fungo das fontes onde foram inicialmente coletadas as amostras não têm tido muito sucesso. Os métodos convencionais freqüentemente utilizados no isolamento deste fungo podem não ser apropriados. A aplicação de técnicas baseadas na amplificação de DNA pode ajudar a estabelecer o preciso habitat de *P. brasiliensis* (DÍEZ *et al.*, 1999; FRANCO *et al.*, 2000; RESTREPO *et al.*, 2001).

Nada se conhece sobre a forma em que *P. brasiliensis* se encontra na natureza (LACAZ *et al.*, 2002). *P. brasiliensis* pode ser encontrado tanto em solo pobre quanto em solo rico em nutrientes. A forma micelial com predominância de

clamidosporos ocorre em um solo rico em nutrientes, ao passo que, em um solo pobre em nutrientes, micélio com aleuriosporos podem ser encontrados. O desflorestamento e as mudanças ocorridas na agricultura podem ter mudado a composição do solo e desta maneira ter intensificado a formação de clamidosporos; isto pode ser a razão de trabalhadores rurais em plantações de café no Brasil sofrerem de paracoccidiodomicose (MIYAJI *et al.*, 2003).

III. EPIDEMIOLOGIA

Uma das mais notáveis características da paracoccidiodomicose é sua distribuição geográfica. A paracoccidiodomicose é autóctone e restrita a América Latina. Esta micose se estende do México a Argentina, onde os países mais afetados são Brasil, Colômbia e Venezuela, sendo o Brasil responsável por 80% dos casos. A doença não tem sido relatada nas ilhas caribenhas, Nicarágua, Suriname, Guianas e Chile (RESTREPO, 1994; BRUMMER *et al.*, 1993). Existem casos que ocorre como micose de exportação (HORRÉ *et al.*, 2002). A maioria dos casos no Brasil provém das regiões sul, sudeste e centro-oeste (MONTENEGRO *et al.*, 1996; MALUF *et al.*, 2003). Casos de paracoccidiodomicose no norte (FORJAZ *et al.*, 1999; VALLE *et al.*, 1991) e no nordeste (MAGALHÃES, 1994) têm sido relatados, porém, uma vez que a paracoccidiodomicose não é uma doença de notificação compulsória, a real prevalência e incidência nas regiões citadas não podem ser calculadas.

O sexo masculino corresponde a aproximadamente 90% dos casos. A idade mais acometida é aquela entre os 30 e 50 anos, porém ocorre também em crianças. Severo *et al.* (1998), estudando a ocorrência da micose em mulheres com sinais e sintomas de menopausa constataram a importância dos hormônios femininos contra a invasão tecidual de *P. brasiliensis*. Quando se analisam os dados de incidência no sexo feminino, acrescidos daqueles que mostram índices de infecção semelhantes entre os dois sexos e dos relativos à investigação laboratorial hormonal, reúnem-se fortes indícios que os níveis de estrógenos da mulher adulta a protegem da evolução para a paracoccidiodomicose. O trabalhador ou o ex-trabalhador rural são expressiva maioria nas amostragens, porém não é possível afirmar que atividades

de lazer em parques e terrenos baldios, e que a prática de jardinagem nas áreas urbanas sejam isentas de risco (GONÇALVES *et al.*, 1998; MARQUES & CAMARGO, 1998; BLOTTA *et al.*, 1999).

IV. PARACOCCIDIOIDOMICOSE

Paracoccidiodomicose é uma micose sistêmica de característica granulomatosa que freqüentemente acomete os pulmões, podendo se disseminar para outros órgãos e sistemas. Esta micose foi observada pela primeira vez por Adolpho Lutz, em 1908, o qual chamou atenção para lesões encontradas na boca dos pacientes (LACAZ *et al.*, 2002). Acreditava-se que a aquisição da paracoccidiodomicose era feita exclusivamente por inoculação traumática primária, devido às numerosas manifestações de pele e de mucosa observadas. Foi verificado através de evidências clínicas e histopatológicas, que a infecção se dá pela inalação de conídios liberados da forma filamentosa, resultando na formação do complexo pulmonar primário (FRANCO *et al.* 1986). Hoje se sabe que a infecção se faz, sobretudo, por via aerógena, com a inalação de conídios da forma filamentosa de *P. brasiliensis*, e que a maioria das lesões de pele e mucosa são manifestações cutâneas secundárias, resultantes da disseminação da doença. Mesmo assim, lesões de pele e mucosas podem existir como resultado de inoculação traumática primária (SIDRIM & OLIVEIRA, 1999).

P. brasiliensis tem habilidade para iniciar a infecção após longos períodos de dormência. A patogênese da paracoccidiodomicose não está precisamente definida. Duas formas clínicas são distinguidas: a forma aguda ou sub-aguda (tipo juvenil) e a forma crônica (tipo adulto), contudo a forma clínica e o curso da doença variam de paciente para paciente. Em ambos os casos, a mortalidade é alta na ausência de terapia específica. A doença pode evoluir do foco primário, sem o período de latência ou, como ocorre mais freqüentemente, pela reativação do foco quiescente. Uma vez estabelecida, a micose adota uma das formas clínicas, infecção ou doença (BRUMMER *et al.*, 1993; BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002).

A paracoccidiodomicose-infecção corresponde àqueles pacientes que são paracoccidiodina-positivos nos testes de intradermoreação e que não apresentam

sinais clínicos e laboratoriais da doença. Nesta fase ocorre o desenvolvimento do complexo pulmonar primário. A paracoccidiodomicose-doença decorre da reativação do complexo primário, da reativação do foco quiescente ou, ainda, de reinfeção exógena, sendo que a forma aguda ou subaguda representa até 15,5% dos casos, enquanto que a forma crônica ocorre em mais de 80% dos pacientes. A doença na forma crônica progride lentamente, podendo levar vários anos para se estabelecer completamente. Manifestações pulmonares são evidentes em 90% dos casos, sendo que os sinais e sintomas respiratórios não são específicos desta micose (BRUMMER *et al.*, 1993; MARQUES E CAMARGO *et al.*, 1998).

É possível considerar a existência de duas formas polares na paracoccidiodomicose: *pólo anérgico* (negativo) e *pólo hiperérgico* (positivo), ocorrendo entre esses dois pólos toda uma gama de quadros clínicos intermediários. Algumas características do pólo anérgico nesta micose são a presença de lesões sistêmicas disseminadas, negatividade a paracoccidiodina e a outros antígenos no estudo da imunidade celular, altos títulos de anticorpos circulantes, quadro histopatológico com lesões necrosantes e riqueza de parasitos nas lesões. Enquanto que, as características do pólo hiperérgico são: presença de lesões localizadas ou generalizadas, mas com preservação do estado geral do paciente, prova de paracoccidiodina positiva, quadro histopatológico com pobreza de parasitos ou ausência dos mesmos e anticorpos específicos geralmente não demonstrados por provas sorológicas, salvo os casos de paracoccidiodomicose (LACAZ *et al.*, 1982).

Onze casos de paracoccidiodomicose no trato genital feminino foram relatados (SEVERO *et al.* 2000). A co-existência da paracoccidiodomicose e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) tem sido relatada. No Brasil, até dezembro de 1999, foram publicados 44 casos de paracoccidiodomicose associados com SIDA. A estimativa da ocorrência da paracoccidiodomicose no período de agosto de 1980 a agosto de 1999 foi de 0,02%. Em comparação, a incidência da histoplasmose, micose sistêmica comum em pacientes imunodeprimidos, para o mesmo período, foi de 1,4% (MARQUES *et al.* 2000).

V. DIAGNÓSTICO

O “padrão ouro” do diagnóstico da paracoccidiodomicose firma-se ao se demonstrar seu agente etiológico ao exame microscópico, seguindo-se seu isolamento e posterior identificação. As formas parasitárias mais comumente encontradas são: células pequenas, isoladas, medindo de 1 a 5 μm e células em processo de gemulação simples ou múltipla, que apresentam parede com contorno birrefringente. A exoesporulação múltipla de *P. brasiliensis* que confere as formas de “roda-de-leme” e catenuladas (cadeia de três ou mais células), é a única forma que caracteriza o fungo em sua vida parasitária. No entanto, esta forma nem sempre está presente na amostra clínica do paciente. O isolamento de *P. brasiliensis* é relativamente fácil quando o material semeado não está contaminado com bactérias (p. ex.: pus ganglionar de gânglios não fistulizados). Porém, em se tratando da maioria dos tipos de amostras clínicas, como escarro, lavado brônquico e material de lesões de pele e mucosa, mesmo adicionando-se antibióticos ao meio, o cultivo é lento e os resultados nem sempre satisfatórios. A identificação de *P. brasiliensis* a partir da cultura está baseada nas características macro e microscópicas da colônia. *P. brasiliensis* é de crescimento lento, e as culturas são mantidas três a quatro semanas antes de serem descartadas. A conversão da fase (M \leftrightarrow L) é recomendada para confirmar o diagnóstico. Todo este procedimento pode ser bastante laborioso (BRUMMER *et al.*, 1993; LACAZ *et al.*, 1998; GOMES *et al.*, 2000; LACAZ *et al.*, 2002).

O diagnóstico clínico é inconclusivo, uma vez que os sinais e sintomas apresentados pelos pacientes não são específicos desta micose. Portanto, a paracoccidiodomicose pode ser facilmente confundida com outras doenças granulomatosas, tais como tuberculose, leishmaniose, outras micoses sistêmicas e até neoplasias (LACAZ *et al.*, 1982; MARQUES & CAMARGO, 1998). Isto pode ser uma das principais causas, pelas quais, pacientes considerados de áreas “não-endêmicas” são diagnosticados tardiamente.

Testes sorológicos têm sido utilizados para auxiliar o diagnóstico e o tratamento de pacientes com paracoccidiodomicose (SALINA *et al.*, 1998). A técnica sorológica mais comumente utilizada para pesquisa de anticorpos anti-*P. brasiliensis* é a Imunodifusão Dupla (ID). Neste teste são empregados exoantígenos de *P.*

brasiliensis obtidos de filtrado de cultura, sendo a gp43 o antígeno imunodominante no filtrado e responsável pela principal linha de precipitação no teste. O teste de ID possui sensibilidade de 84% e especificidade de 98%, porém pode apresentar resultados falso-negativos. Uma das razões para este fato é a variabilidade antigênica da gp43, visto que este antígeno pode apresentar diferentes isoformas, cujos componentes variam em seus pontos isoelétricos. O exoantígeno purificado de 43 kDa (gp43) específico de *P. brasiliensis* representa o componente antigênico mais importante e vem sendo comumente utilizado para o diagnóstico e prognóstico da paracoccidiodomicose em diversas técnicas sorológicas (CAMARGO *et al.*, 1988). Os resultados falso-negativos de ID podem estar relacionados à produção de imunoglobulina G tipo 2 (IgG2) de baixa avidéz (NEVES *et al.*, 2003). Díez *et al.* (1998, 2003) apontam para os problemas na reprodutibilidade dos testes inter e intralaboratoriais e para a dificuldade na padronização dos vários testes e reagentes utilizados no sorodiagnóstico da paracoccidiodomicose, tais como preparações antigênicas de *P. brasiliensis*, e propõem o uso de antígenos recombinantes no sorodiagnóstico desta micose. Contudo, os resultados de Díez *et al.* (1998) apresentaram baixa sensibilidade (73,4%) e reações cruzadas significativas de 73,3 e 40% com soros de pacientes com histoplasmose e aspergilose, respectivamente. Enquanto que, Díez *et al.* (2003) demonstraram uma sensibilidade de 92% usando uma combinação de antígenos recombinantes.

Métodos moleculares para o diagnóstico da paracoccidiodomicose vêm sendo recentemente desenvolvidos. Foram construídos *Primers* baseados na seqüência do gene da gp43 derivados de regiões que não mostraram homologia de 56 e 58% com *exo- α -1,3-D-glucanases* de *S. cerevisiae* e de *C. albicans*, respectivamente. Amostras de esputo de 11 pacientes com paracoccidiodomicose crônica foram submetidas a uma *Nested-PCR* em tubos separados. Em todos os casos, uma banda de 0,6 kb específica da seqüência da gp43 foi produzida (GOMES *et al.* 2000). Também foi desenvolvido um teste de *Nested-PCR* em tubos separados para detecção de *P. brasiliensis* em amostras de tecidos de camundongos BALB/c, usando a seqüência do gene da gp43 como alvo. Um fragmento de 196 pb foi produzido com 21 das 23 amostras de tecido pulmonar que foram positivos na cultura (BIALEK *et al.*, 2000). Algumas seqüências do gene da gp43, usadas para a construção dos *primers* por estes autores foram posteriormente estudadas e foi mostrada a presença de substituições nucleotídicas, quando

seqüências deste gene obtidas de 17 isolados diferentes de *P. brasiliensis* foram comparadas, mostrando um alto polimorfismo gênico (MORAIS *et al.*, 2000). Alguns *primers* usados por Gomes *et al.* e Bialek *et al.*, foram escolhidos de regiões susceptíveis a mudanças e foi sugerido checar a universalidade espécie-específica desses *primers* com vários outros isolados do fungo (SAN-BLAS *et al.* 2002)

Atualmente poucas informações estão disponíveis sobre alterações causadas em isolados de *P. brasiliensis* que levam a perda de fatores que são fundamentais no processo de invasão e estabelecimento da doença. Microrganismos mutantes com virulência atenuada ou avirulentos são úteis em estudos moleculares para o entendimento de sua patogênese. Um método molecular baseado em PCR para identificar e distinguir diferentes isolados de *P. brasiliensis*, poderá ser usado para o diagnóstico, investigações epidemiológicas e determinação dos mecanismos de infecção e patogenicidade. Assim, este trabalho se propõe a sequenciar e caracterizar um fragmento de DNA gerado por RAPD específico de isolados virulentos de *P. brasiliensis*, e a partir desta seqüência desenvolver um teste molecular para o diagnóstico da paracoccidiodomicose.

MATERIAIS E MÉTODOS

I. ISOLADOS FÚNGICOS

Sete isolados de *P. brasiliensis*, sendo três virulentos e quatro avirulentos (Borba & Schäffer, 2002), um de *B. dermatitidis*, um de *C. albicans* e um de *S. schenckii* foram obtidos da Coleção de Cultura de Fungos (CCF-IOC) do Departamento de Micologia da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ. Amostras de DNA de *C. immitis* e *C. neoformans* foram cedidas pelo Laboratório de Micologia do Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas da FIOCRUZ, RJ. Um isolado de *H. capsulatum* e um de *A. fumigatus* foram obtidos da Coleção de Cultura de Fungos da Micoteca URM do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE. Além disso, três isolados de *P. brasiliensis* recentemente obtidos de pacientes com paracoccidioidomicose e mantidos por repiques sucessivos, foram gentilmente cedidas pela Dra. Liline Maria Soares Martins do Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella (IDTNP), Teresina, PI (Tabela 1). Todos esses isolados fúngicos foram identificados por métodos micológicos convencionais.

Em adição, foram testadas amostras de DNA de *Mycobacterium tuberculosis* (TB2545), *Leishmania braziliensis* (LBB 2903), *Trypanosoma cruzi* (cepa Y), *Schistosoma mansoni* (sem identificação) e de leucócitos de indivíduo saudável, obtidas no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Recife, PE.

II. AMOSTRA CLÍNICA

Uma amostra de aspirado de linfonodo obtida de um paciente com paracoccidioidomicose confirmada através de exame direto e cultura foi gentilmente cedida pela Dra. Liline Maria Soares Martins do Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella (IDTNP), Teresina, PI.

Tabela 1. Identificação e origem dos isolados fúngicos.

| Fungo | Identificação | Origem |
|---|---------------|--------|
| <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> ^a | Pb 18 | Humano |
| <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> ^a | Pb 339 | Humano |
| <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> ^a | Pb IOC 3698 | Humano |
| <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> ^b | Pb IOC 1059 | Humano |
| <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> ^b | Pb IOC 1124 | Humano |
| <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> ^b | Pb IOC 1208 | Humano |
| <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> ^b | Pb IOC 1210 | Humano |
| <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> ^c | Fc/Te | Humano |
| <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> ^c | Fs/Te | Humano |
| <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> ^c | Ed/Te | Humano |
| <i>Blastomyces dermatitidis</i> | Bd IOC 1298-1 | Humano |
| <i>Sporothrix schenckii</i> | Ss IOC 2855-2 | Humano |
| <i>Histoplasma capsulatum</i> | 4547 | Humano |
| <i>Coccidioides immitis</i> | 64-6776 | Humano |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> | 111 | Humano |
| <i>Candida albicans</i> | Ca IOC 3780 | Humano |
| <i>Aspegillus fumigatus</i> | 2603 | Ave |

a: caracterizado como virulento (Borba & Schäffer, 2002)

b: caracterizado como avirulento (Borba & Schäffer, 2002)

c: recentemente isolados de pacientes com paracoccidioidomicose

III. PRÉ-INÓCULO

Frascos de Erlenmeyer de 250 ml contendo 100 ml de meio foram utilizados para inoculação dos fungos listados na Tabela 1 e em seguida incubados a temperaturas adequadas sob agitação de 120 oscilações/min em shaker digital modelo HS 501 IKA (Labortechnik). As condições de cultivo estão descritas na Tabela 2. Após o período de incubação as culturas foram inativadas pela adição de timerosal (0,2g/l) e deixadas em repouso por 30 min. A biomassa foi separada do sobrenadante da cultura por filtração a vácuo usando papel de filtro esterilizado, transferida para tubos de liofilização e liofilizadas overnight em um freezer dryer

modelo L4KR, 156 (Edwards). Com exceção dos isolados de *A. fumigatus* e *H. capsulatum* que não foram submetidos à liofilização.

Tabela 2. Condições de cultivo dos isolados fúngicos.

| Isolado | Meio | Temperatura de incubação | Tempo de incubação (dias) |
|------------------------|-----------|--------------------------|---------------------------|
| <i>P. brasiliensis</i> | PYG | 23 e 36°C | 13-20 |
| <i>B. dermatitidis</i> | ME | 23°C | 13 |
| <i>S. schenckii</i> | ME | 23°C | 13 |
| <i>H. capsulatum</i> | Sabouraud | 23°C | 13 |
| <i>C. albicans</i> | Sabouraud | 23°C | 5 |
| <i>A. fumigatus</i> | Sabouraud | 23°C | 5 |

PYG (bacto-peptone 5 g/l; extrato de levedura 5 g/l e glicose 20 g/l)

ME (extrato de malte 20g/l; peptona 1g/l e glicose 20 g/l)

Sabouraud (peptona 10g/l e glicose 20 g/l)

IV. EXTRAÇÃO DE DNA

a) Dos fungos

50 mg de liofilizado das amostras fúngicas foram macerados separadamente em nitrogênio líquido com ajuda de almofariz e pistilo de porcelana, até formar um pó fino. Em seguida, o pó foi transferido para um tubo Eppendorf e ressuspensionado em 350 µl de tampão de extração (Tris-HCl 200 mM pH 8,5; NaCl 250 mM; EDTA 25 mM; SDS 0,5%), e agitado por 2 min. Uma solução de RNase (concentração final de 0,1 µg/ml) foi adicionada e o tubo incubado por 15 min a 37°C. Os ácidos nucleicos foram extraídos pela adição de 1 ml de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) (v/v). A solução foi centrifugada a 12.000 x g por 5 min. A fase aquosa foi removida e o DNA precipitado com 2 volumes de etanol absoluto gelado. Após lavagem com etanol a 70%, o *pellet* de DNA foi seco por inversão do tubo em papel absorvente e em seguida foi adicionado 50 µl de água mili-Q esterilizada. O DNA foi

quantificado em espectrofotômetro e a qualidade determinada pela visualização em agarose a 1%.

b) Da amostra clínica

500 µl da amostra de aspirado ganglionar foram transferidos para um tubo Eppendorf esterilizado e 500 µl de tampão PBS pH 7,2 foram adicionados. A mistura foi centrifugada por 5 min a 4.000 x g para obtenção de um *pellet*. Este *pellet* foi novamente lavado com 500 µl de tampão PBS pH 7,2 e centrifugado por 5 min a 4.000 x g. Em seguida o *pellet* foi gentilmente ressuspensionado em 1 ml de DNAzol® (Invitrogen) para extração do DNA, segundo as orientações do fabricante. O DNA foi quantificado em espectrofotômetro e a qualidade determinada pela visualização em agarose a 1%.

c) Da amostra de leucócitos e das formas epimastigotas de *T. cruzi*

Para extração de DNA das amostras de leucócitos e de *T. cruzi* foi utilizado Genomic Prep™ Cells and Tissue DNA Isolation Kit (Amersham Pharmacia Biotech) segundo as orientações do fabricante. O DNA foi quantificado em espectrofotômetro e a qualidade determinada pela visualização em agarose a 1%.

V. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E OBTENÇÃO DE cDNA

Para extração de RNA total de dois isolados de *P. brasiliensis*, sendo um virulento (Pb IOC 3698) e o outro avirulento (Pb IOC1059), foram pesados 50 mg de amostra liofilizada que foram macerados separadamente em nitrogênio líquido com ajuda de almofariz e pistilo de porcelana até formar um pó fino. O pó foi transferido para um tubo Eppendorf e ressuspensionado em 80 µl de água DEPC (Dietilpirocarbonato) e 1 µl de RNase out (Gibco). Esta solução foi homogeneizada

com um Vortex e deixada por 5 min à temperatura ambiente. Foram adicionados 750 µl de Trizol® (Gibco) e a solução foi novamente homogeneizada e deixada por 5 min a temperatura ambiente. Em seguida, 200 µl de clorofórmio foram adicionados e a solução foi deixada por 10 min a temperatura ambiente. A solução foi centrifugada a 8.000 x g por 15 min a 4°C. 500 µl de sobrenadante foram retirados e o RNA precipitado com 1 volume de isopropanol absoluto. A solução foi deixada *overnight* a -20°C para precipitação dos ácidos nucléicos e no dia seguinte foi centrifugada a 6.000 x g por 10 min a 4°C. Após lavagem com etanol a 75%, o *pellet* de RNA foi seco na centrífuga a vácuo por 5 min. O *pellet* foi ressuspenso em 50 µl de água DEPC, aquecido a 55°C por 10 min e estocado a -70°C com 1 µl de RNase out. O RNA foi quantificado em espectrofotômetro e a quantidade determinada pela visualização em agarose/formamida a 1%.

O cDNA de cada isolado foi construído a partir de uma concentração de 0,05 µg de RNA total, sendo realizada uma etapa inicial de tratamento com DNase (Gibco) conforme as orientações do fabricante. Depois as amostras foram aquecidas a 95°C por 5 min e colocadas em banho de gelo. Uma mistura de reação foi preparada com a seguinte composição: 2,2 µl dNTPs a 0,2 mM, 2,2 µl de DTT (ditiotreitól) a 0,1 mM, 2 µl de tampão 10X, 0,2 µl de Rtsuperscript (1 unidade), 2 µl do *primer* T₁₂MG (TTTTTTTTTTTTMG) a 0,25 µM e 0,8 µl de água DEPC. As amostras foram incubadas por 1 hora; centrifugadas por 5 seg a 4°C e foram estocadas a -70°C até o uso.

VI. PCR “ALL FUNGI”

A PCR foi realizada num volume de 25 µl, contendo tampão 1 X, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP's, 25 pmoles do *primer* senso ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e do *primer* anti-senso ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) específicos para as seqüências M27607 e D89886 depositadas no GenBank, 0,5 unidade de *Taq* polymerase (invitrogen), 25 ng de DNA de cada isolado fúngico (Tabela 1), cobertos com 30 µl de óleo mineral esterilizado. O controle negativo consiste numa mistura da reação descrita acima sem amostra de DNA. O programa de amplificação utilizado consistiu de 40 ciclos de

94°C por 30 seg, 58°C por 30 seg e 72°C por 2 min, realizado no termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf). Os fragmentos de PCR foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 1% preparado com tampão TAE (Tris-acetato 40 mM; EDTA 1mM, pH 7,5) contendo 0,05 µg/ml de brometo de etídio e, em seguida, fotografados com auxílio de um transiluminador de luz UV usando filme Polaroid.

VII. RAPD COM ISOLADOS VIRULENTOS DE *P. brasiliensis*

O RAPD foi realizado num volume de 25 µl, contendo tampão 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 16 µM de dNTP's, 50 pmoles de *primer* randômico OPF-08 (GGGATATCGG), 1 unidade de Taq polymerase, 30 ng de DNA dos isolados virulentos Pb 339 e Pb IOC 3698, respectivamente, cobertos com 30 µl de óleo mineral esterilizado. O controle negativo consiste numa mistura da reação descrita acima sem amostra de DNA. O programa de amplificação utilizado consistiu de 30 ciclos de 94°C por 1 min, 36°C por 1 min, 72°C por 2 min, realizado no termociclador Perkin-Elmer (Perkin-Elmer). Os *amplicons* foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 2% preparado com tampão TAE contendo 0,05 µg/ml de brometo de etídio e visualizados sob luz UV.

Os fragmentos de PCR dos isolados virulentos Pb IOC 3698 e Pb 339 de aproximadamente 750 pb, gerados por RAPD, foram cortados do gel de agarose sob exposição à luz UV com lâmina de bisturi esterilizada e, em seguida, transferidos separadamente para um tubo Eppendorf esterilizado. Os fragmentos foram purificados com um kit de purificação de DNA em gel: *Concert Gel Extraction Systems* (Gibco) segundo as orientações do fabricante.

VIII. CLONAGEM

Os fragmentos de DNA purificados, gerados por RAPD, dos isolados virulentos Pb IOC 3698 e Pb 339 foram ligados em um vetor TA, o PinPoint™ Xa-1 T-Vector (Promega), pela seguinte reação: tampão 1X, 50 ng de plasmídeo, 50 ng de inserto e 1-3 unidades de DNA ligase em um volume final de 10 µl. A mistura foi

incubada a 15°C *overnight* e, em seguida, 5 µl da reação de cada reação de ligação foram utilizados para a transformação de células competentes de *Escherichia coli* linhagem DH5-α, separadamente. O plasmídeo utilizado tem um gene que confere resistência ao antibiótico ampicilina. Uma alíquota de 200 µl de células competentes previamente preparadas foi descongelada em banho de gelo e em seguida recebeu de 5 µl de cada reação de ligação. A mistura foi incubada em banho de gelo por 30 minutos e, posteriormente, recebeu um choque térmico a 42°C por 1 minuto e 30 segundos. Em seguida as células foram imediatamente incubadas em banho de gelo por 5 minutos e 1 ml de meio LB (10 g/l de triptona; 5 g/l de extrato de levedura; 5 g/l de NaCl; 1 ml/l de NaOH) foi adicionado às células transformadas as quais foram incubadas por 1 hora a 37°C. Alíquotas desta cultura foram semeadas em placas de Petri contendo LB acrescido de 7,5 g/l de ágar e de ampicilina na concentração final de 100 µg/ml. As placas foram incubadas por 18 horas a 37°C para obtenção dos clones recombinantes de *E. coli*.

IX. IDENTIFICAÇÃO DO INSERTO NO PLASMÍDEO

Para identificar a ligação do inserto de Pb IOC 3698 e de Pb 339 ao plasmídeo foi realizada uma PCR usando *primers* homólogos ao sítio de clonagem do vetor e uma suspensão de cada clone de Pb IOC 3698 e Pb 339. A PCR foi realizada num volume de 25 µl, contendo tampão 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP's, 25 pmoles de *primer* senso TAF (CGAAGGTCGCGAAGCTTCAGC) e anti-senso TAR (GATCGCGGCCGCCCGGGAG), complementares às posições 381 a 401 e 445 a 426 da seqüência do vetor depositada no *GenBank* respectivamente, e que, neste caso, geram um produto de aproximadamente 850 pb, 1 unidade de *Taq* polymerase e 5µl da suspensão de *E. coli* transformada, cobertos com 30µl de óleo mineral. O controle negativo foi uma mistura da reação descrita acima com uma suspensão de *E. coli* não transformada. O programa de amplificação foi constituído de 30 ciclos de 94°C por 30 seg, 60°C por 30 seg, 72°C por 2 min, realizado no termociclador Perkin-Elmer. Os fragmentos de PCR foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 1% preparado com tampão TAE contendo 0,05

$\mu\text{g/ml}$ de brometo de etídio e fotografados com auxílio de um transiluminador de luz UV usando filme Polaroid.

Em seguida, os fragmentos de DNA de aproximadamente 850 e 800 pb foram cortados do gel de agarose sob exposição à luz UV com lâmina de bisturi esterilizada, e transferidos separadamente para um tubo Eppendorf esterilizado. Os fragmentos de DNA foram purificados com um kit de purificação de DNA em gel: *Concert Gel Extraction Systems* (Gibco), segundo as orientações do fabricante.

X. SEQUENCIAMENTO DE DNA

Os fragmentos de DNA purificados de 850 e 800 pb foram seqüenciados nas duas direções com o *Thermo Sequenase Cy5 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (Amersham Pharmacia Biotech) utilizando os primers do vetor (TAF e TAR), de acordo com a orientação do fabricante. Os produtos da reação de sequenciamento foram analisados em um gel de poliacrilamida no *ALFexpress II sequencer* (Amersham Pharmacia Biotech). Para análise e alinhamento das seqüências nucleotídicas dos fragmentos de 850 e 800 pb, as quais denominamos respectivamente, CEJA-1 e CEJA2, foi utilizado o programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

XI. DESENHO DE PRIMERS

Foram desenhados *primers* para caracterização das seqüências CEJA-1 de *P. brasiliensis* com o auxílio do programa Oligos, versão 4.0 (Tabela 3).

Tabela 3. Seqüência dos *primers* homólogos à seqüência CEJA-1 de *P. brasiliensis*

| Nome | Seqüência | Posição | Tamanho (pb) |
|---------|----------------------------|---------|--------------|
| PBEXF | GCGGGTCCCCAAAAGGATCTGGC | 118-140 | |
| PBEXR | AAAAGATTGCTCTCCTGGACGCGTCG | 499-473 | 407 |
| PBEXF-2 | AGGCATGCGGGTCCCCAAAAGG | 124-139 | |
| PBEXR-2 | AAGATTGCTCTCCTGGACG | 511-528 | 413 |
| PBINR-2 | GCGTGTAGATCTAAGTCAAACGGT | 281-298 | 172 |

XII. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DA PCR PARA IDENTIFICAÇÃO DA SEQÜÊNCIA CEJA-1 DE *P. brasiliensis*

- *Determinação da melhor temperatura de anelamento dos primers PBEXF e PBEXR.*

A reação foi testada sob quatro condições de temperatura de anelamento diferentes. A PCR foi realizada num volume de 25 µl, contendo tampão 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP's, 25 pmoles de *primer* PBEXF e PBEXR, 1 unidade de *Taq* polymerase, 25 ng de DNA genômico de Pb IOC 3698, cobertos com 30µl de óleo mineral. O controle negativo foi uma mistura da reação descrita acima sem amostra de DNA. O programa de amplificação consistiu de 30 ciclos de 94°C por 30 seg, diferentes temperaturas de anelamento por reação: 58, 63, 68 e 70°C por 1 min, 72°C por 1 min, realizado no termociclador Mastercycler gradient. Os fragmentos de PCR foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 1,5% preparado com tampão TAE contendo 0,05 µg/ml de brometo de etídio e fotografados com auxílio de um transiluminador de luz UV usando filme Polaroid.

- *Determinação da melhor concentração de magnésio*

Foram testadas cinco diferentes concentrações de magnésio. A reação de PCR foi realizada num volume de 25 µl, contendo tampão 1X, diferentes concentrações de magnésio por reação: 0,5 mM, 1,0 mM, 1,5 mM, 2,0 mM e 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP's, 25 pmoles de *primer* PBEXF e PBEXR, 1 unidade de *Taq* polymerase, 25 ng de DNA do isolado virulento Pb IOC 3698, cobertos com 30µl de óleo mineral. O controle negativo foi uma mistura da reação descrita acima sem amostra de DNA. O programa de amplificação consistiu de 30 ciclos de 94°C por 30 seg, 68°C por 1 min, 72°C por 1 min, realizado no termociclador Mastercycler gradient. Os fragmentos de PCR foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 1,5% preparado com tampão TAE contendo 0,05 µg/ml de brometo de etídio e fotografados com auxílio de um transiluminador de luz UV usando filme Polaroid.

➤ *Determinação do limite de detecção de DNA.*

Foram feitas diluições seriadas de razão 10 em água mili-Q esterilizada a partir do estoque (25ng/ μ l) de DNA genômico do isolado virulento Pb IOC 3698 até a obtenção de uma concentração de DNA de 2,5 fg/ μ l. A reação de PCR foi realizada num volume de 25 μ l, contendo 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP's, 25 pmoles de *primer* PBEXF e PBEXR, 1 unidade de *Taq* polymerase, diferentes concentrações de DNA por reação: 25 ng, 250 pg, 25 pg, 2,5 pg, 250 fg, 25 fg e 2,5 fg de DNA de Pb IOC 3698, cobertos com 30 μ l de óleo mineral esterilizado. O controle negativo foi uma mistura da reação descrita acima sem amostra de DNA. O programa de amplificação consistiu de 30 ciclos de 94°C por 30 seg, 68°C por 1 min, 72°C por 1 min, realizado no termociclador Mastercycler gradient. Os fragmentos de PCR foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 1,5% preparado com tampão TAE contendo 0,05 μ g/ml de brometo de etídio e fotografados com auxílio de um transiluminador de luz UV usando filme Polaroid.

➤ *Especificidade dos primers PBEXF e PBEXR com outros fungos e organismos*

A reação de PCR foi realizada num volume de 25 μ l, contendo tampão 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP's, 25 pmoles de *primer* PBEXF e PBEXR, 1 unidade de *Taq* polymerase, 25 ng de DNA genômico de *B. dermatitidis*, *H. capsulatum*, *S. schenckii*, *C. immitis*, *C. neoformans*, *C. albicans*, *A. fumigatus*, *M. tuberculosis*, *L. braziliensis*, *T. cruzi*, *S. mansoni*, e de leucócitos, respectivamente. O controle positivo foi uma mistura da reação descrita acima com 25 ng de DNA de Pb IOC 3698 e o controle negativo foi uma mistura da reação descrita acima sem amostra de DNA. A PCR foi realizada no termociclador Mastercycler gradient e o programa de amplificação consistiu de 30 ciclos de 94°C por 30 seg, 68°C por 1 min, 72°C por 1 min. Os fragmentos de PCR foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 1,5% preparado com tampão TAE contendo 0,05 μ g/ml de brometo de etídio e visualizados sob luz UV.

- *Especificidade dos primers PBEXF e PBEXR para os isolados de P. brasiliensis virulentos*

A reação de PCR foi realizada num volume de 25 µl, contendo tampão 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP's, 25 pmoles de *primer* PBEXF e PBEXR, 1 unidade de *Taq* polymerase, 25 ng de amostra de DNA genômico e/ou cDNA de isolados virulentos (Pb 18, Pb 339 e Pb IOC 3698), avirulentos (Pb IOC 1059, Pb IOC 1124, Pb IOC 1208 e Pb IOC 1210) e recentemente isolados de pacientes (Fc/Te, Fs/Te e Ed/Te), respectivamente, cobertos com 30 µl de óleo mineral esterilizado. O controle negativo foi uma mistura da reação descrita acima sem a adição de DNA. A PCR foi realizada no termociclador Mastercycler gradient e o programa de amplificação consistiu de 30 ciclos de 94°C por 30 seg, 68°C por 1 min, 72°C por 1 min. Os fragmentos de PCR foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 1,5% preparado com tampão TAE contendo 0,05 µg/ml de brometo de etídio e fotografados com auxílio de um transiluminador de luz UV usando filme Polaroid.

XIII. DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE MOLECULAR PARA DIAGNÓSTICO DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE

a. Otimização da *Hemi-nested PCR* em tubo único

- *Verificação das melhores temperaturas de anelamento dos primers PBEXF-2/PBEXR-2 (reação 1) e PBEXF-2/PBINR-2 (reação 2).*

A primeira reação é resultante do anelamento dos *primers* PBEXF-2 (senso) e PBEXR-2 (anti-senso) e a segunda reação é resultante do anelamento dos *primers* PBEXF-2 (senso) e PBINR-2 (anti-senso). As temperaturas testadas para as duas combinações de *primers* foram: 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68 e 70°C. As duas reações de PCR foram realizadas separadamente num volume de 25 µl, contendo tampão 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP's 25 pmoles dos *primers* que participa da primeira reação (PBEXF-2 e PBEXR-2) e da segunda reação (PBEXF-2 e PBINR-2), respectivamente, 1 unidade de *Taq* polymerase, 25 ng de

DNA do isolado virulento Pb IOC 3698, cobertos com 30 μ l de óleo mineral. Da mesma forma, um gradiente de temperatura para a segunda reação foi feito com o produto da primeira PCR. Os controles negativos foram as reações descritas acima sem amostra de DNA. A PCR foi realizada no termociclador Mastercycler gradient e o programa de amplificação para as duas reações consistiu de 30 ciclos de 94°C por 30 seg, diferentes temperaturas de anelamento por reação conforme acima mencionado, por 1 min, 72°C por 1 min. Os fragmentos de PCR foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 1,5% preparado com tampão TAE contendo 0,05 μ g/ml de brometo de etídio e fotografados com auxílio de um transiluminador de luz UV usando filme Polaroid.

➤ *Determinação do limite de detecção de DNA na segunda reação.*

Foram feitas diluições seriadas de razão 10 em água mili-Q esterilizada a partir do estoque (25ng/ μ l) de DNA genômico do isolado virulento Pb IOC 3698 até a obtenção de uma concentração de DNA de 2,5 fg/ μ l. A reação de PCR foi realizada num volume de 25 μ l, contendo tampão 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP's, 25 pmoles de *primer* PBEXF e PBEXR, 1 unidade de *Taq* polymerase, diferentes concentrações de DNA por reação: 25 ng, 250 pg, 25 pg, 2,5 pg, 250 fg, 25 fg e 2,5 fg de DNA de Pb IOC 3698, cobertos com 30 μ l de óleo mineral esterilizado. O controle negativo foi uma mistura da reação descrita acima sem amostra de DNA. O programa de amplificação consistiu de 30 ciclos de 94°C por 30 seg, 60°C por 30 seg, 72°C por 45 seg, realizado no termociclador Mastercycler gradient. Os fragmentos de PCR foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 1,5% preparado com tampão TAE contendo 0,05 μ g/ml de brometo de etídio e fotografados com auxílio de um transiluminador de luz UV usando filme Polaroid.

➤ *Especificidade da PCR PBEXF-2/PBINR-2 com outros fungos e organismos*

A reação de PCR foi realizada num volume de 25 µl, contendo tampão 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 0,02 mM de dNTP's, 25 pmoles de *primer* PBEXF-2 e PBINR-2, 1 unidade de *Taq* polymerase, 25 ng de DNA genômico de *B. dermatitidis*, *H. capsulatum*, *S. schenckii*, *C. immitis*, *C. neoformans*, *C. albicans*, *A. fumigatus*, *M. tuberculosis*, *L. braziliensis*, *T. cruzi*, *S. mansoni*, e de leucócitos respectivamente. O controle positivo foi uma mistura da reação descrita acima com 25 ng de DNA de Pb IOC 3698 e o controle negativo foi uma mistura da reação descrita acima sem amostra de DNA. A PCR foi realizada no termociclador Mastercycler gradient e o programa de amplificação consistiu de 30 ciclos de 94°C por 30 seg, 60°C por 30 seg, 72°C por 45 seg. Os fragmentos de PCR foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 1,5% preparado com tampão TAE contendo 0,05 µg/ml de brometo de etídio e fotografados com auxílio de um transiluminador de luz UV usando uma câmara digital.

b. *Hemi-nested PCR* em tubo único para detecção de DNA de *P. brasiliensis* na amostra clínica

A reação de PCR foi realizada num volume de 25 µl, contendo tampão 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP's, 25 pmoles de *primer* PBEXF-2, PBEXR-2 e PBINR-2, 1 unidade de *Taq* polymerase, 5 µl de DNA da amostra clínica, cobertos com 30 µl de óleo mineral esterilizado. O controle negativo foi uma mistura da reação descrita acima sem amostra de DNA. O programa de amplificação foi 15 ciclos de 94°C por 30 seg, 52°C por 30 seg, 72°C por 45 seg, seguidos por 30 ciclos de 94°C por 30 seg, 66°C por 30 seg, 72°C por 45 seg. O fragmento de PCR foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose a 1,5% preparado com tampão TAE contendo 0,05 µg/ml de brometo de etídio e fotografado com auxílio de um transiluminador de luz UV usando filme Polaroid.

XIV. EXAME DIRETO E CULTURA DA AMOSTRA CLÍNICA

O exame direto foi realizado a fresco entre lâmina e lamínula. Para obtenção de cultura, a amostra clínica foi semeada em duplicata em placa de Petri contendo ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol, sendo que uma placa foi mantida a temperatura ambiente ($\pm 23^{\circ}\text{C}$) e a outra foi mantida a 37°C .

RESULTADOS

1. Clonagem dos fragmentos de DNA de *P. brasiliensis* gerado por RAPD-PCR

O RAPD realizado com isolados de *P. brasiliensis* usando o *primer* OPF-08 revelou o fragmento de DNA de ~750 pb específico de cepas virulentas.

A clonagem do fragmento de 750 pb de Pb IOC 3698 deu origem a sete clones recombinantes de *E. coli* DH5- α , enquanto que a clonagem do fragmento de 750 pb de Pb 339 deu origem a quatro clones.

Com o objetivo de identificar a presença do inserto no plasmídeo, os clones de *E. coli* crescidos em meio seletivo foram submetidos a uma PCR usando *primers* homólogos às seqüências do vetor, próximas ao sítio de clonagem. A PCR dos clones gerou um fragmento de aproximadamente 850 pb, em cinco dos sete clones de Pb IOC 3698, denominado de CEJA-1, que corresponde a 750 pb e resíduos do vetor. Porém, em dois clones de Pb IOC 3698 e nos quatro clones de Pb 339, a PCR do vetor gerou um fragmento de DNA de aproximadamente 800 pb, denominado de CEJA-2, e outros dois fragmentos menores (Figura 5).

2. Sequenciamento dos fragmentos de DNA CEJA-1 e CEJA-2 de *P. brasiliensis*

O sequenciamento de DNA das seqüências CEJA-1 (Figura 5, linhas 3, 4 e 7) revelou uma seqüência de nucleotídeos de aproximadamente 700 pb (com qualidade). O sequenciamento das seqüências CEJA-2 dos clones 1 e 2 de Pb IOC 3698 (Figura 5, linhas 1 e 2) e dos clones 3 e 4 de Pb 339 (Figura 5, linhas 3a e 4a) revelou uma seqüência de nucleotídeos de aproximadamente 570 pb (com qualidade). A qualidade das seqüências está demonstrada num eletroferograma (Figura 6 e 7). Nos trechos mostrados, a qualidade do sequenciamento é alta, com espaçamento regular dos picos (que indica espaçamento regular das bandas) e picos agudos. Os picos representam os nucleotídeos. Quanto mais altos e agudos, melhor a sua qualidade, isto é, maior será a probabilidade de que a base registrada esteja correta. As seqüências de nucleotídeos estão demonstradas nas Figuras 8 e 9.

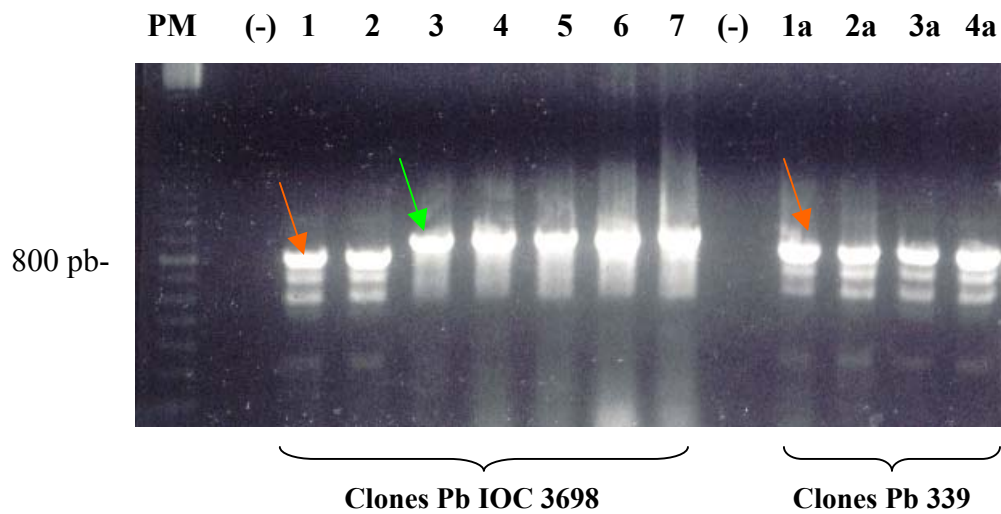


Figura 5. PCR dos clones de *E. coli* DH5- α usando *primers* homólogos à seqüência do vetor para verificação da inserção dos fragmentos de RAPD-PCR de *P. brasiliensis* (Pb IOC 3698 e Pb 339) no plasmídeo: clones 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 de Pb IOC 3698 (**linha 1 a 7, respectivamente**) e clones 1, 2, 3 e 4 de Pb 339 (**linha 1a a 4a, respectivamente**). (-) indica controle negativo e PM indica marcador de peso molecular de 100 pb Ladder. A seta verde aponta para o fragmento CEJA-1 e as setas laranjas indicam o fragmento CEJA-2.

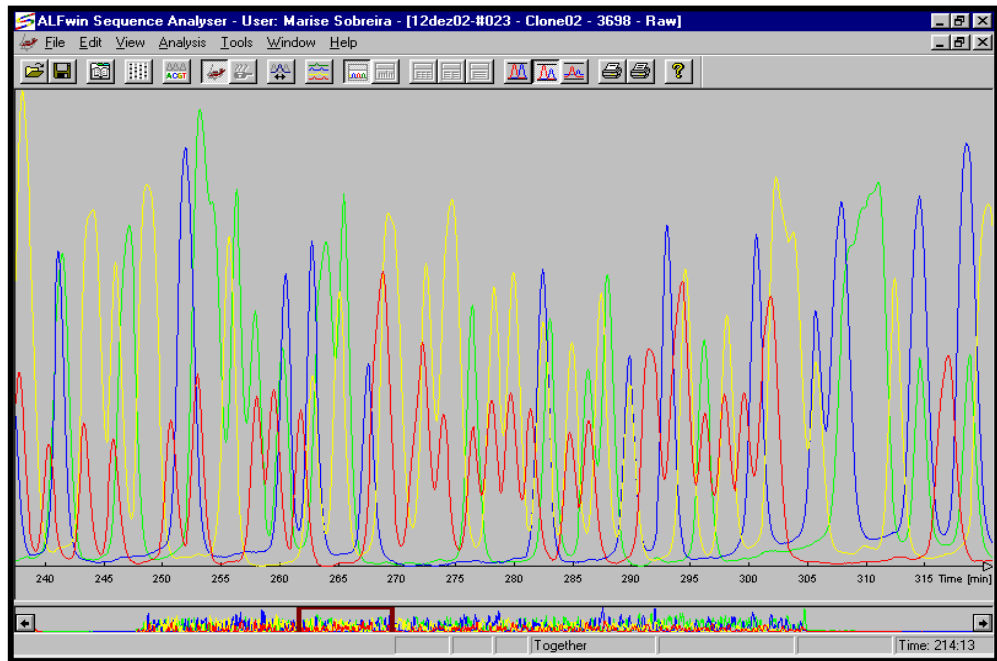


Figura 6. Eletroferograma parcial da seqüência CEJA-1 gerada com *primer* do vetor.

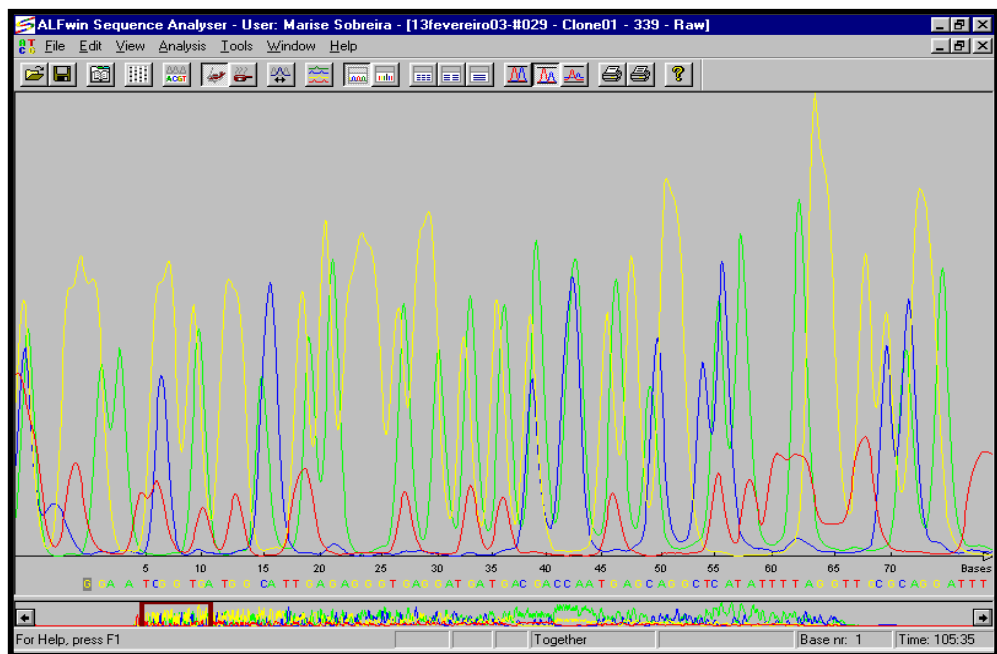


Figura 7. Eletroferograma parcial da seqüência CEJA-2 gerada com *primer* do vetor.

```

1      GGGAGATCGG ATAATGCGGT TAGATATGCG ACGTCATGTC CAGACTGGGg ATGCACCAAA
61     ACATCAACGC TGCTAGCAGA ATCGAGTGTC TTTGGCTGCC TTTCAAAATT TTGAAGTGGA
121    ATAGCGGGTC CCCAAAAGGA TCTGGCCCTC TGGTAACGGA GGCTGGGTTT GTTATTAATT
181    CCCGTTTCAT TAATCAATTT TTTTGTGAG AATATGTCTT ATTGCTCAAC CGAGATGTGG
241    TCCCATAGCT AAGGAGCCAT TTCCGTTATC CCTCTTGTG ACCGTTTTGA CTTAGATCGG
301    ATTTTCGAAT ATACACTGTA CTCCTCAAGG TATGTTGTA GTCATCTGTA TGTAGATTCT
361    CCCGATATAC GTTGATCATG TTAAACCCCA AACGCCTCAG GATCCATAGG GAAATCACTG
421    AATCCGTATG TTCCAGTTAA GCTAGTTATT TGAGAACAGT CCAGAATACA ACCATTCTTG
481    CGCCCACATA CCACATATTG ATGACGACGC GTCCAGGAGA GCAATCTTTT TGGATGAAGA
541    AACGTCTAGA TATGTGTTTA TCATAACTAG CCTATTTACA CGTGAGGTAT TGGATTTtCA
601    GAAAATCATC CCTAWTTTAA TAWTCAAATT GACTTAGAAa GGGCGTTARA aGTGAAGTKT
661    TAAGTTGGAA CTGTATTGRA TTGAATTTGA AAATWGAAGA CTTTGCCCTCA ACGGKTCCAA
721    CGAWYACCAA ATCTGGCACT tTCAGGAAAT CMTAACTtGG GGTTCGGGA aTAAAgGTTT
781    ATCSRAGTCY GGGCCCSCT ARGTCTCCYC GAWATTCCMA ATCGGgAACG GAATCCAGCT
841    GAAGBTTTTC ACYTTSGArR anSTBTGtnG ndWKtGAGAG AGAGAGAGAG TGAGAGGCGA
901    ARTGWCGAKA GAGWCTRRRT RGAGAACRTR AGRRKtAGTG ATGWGAGTGA GWGTGATKAD
961    AWAG

```

Figura 8. Seqüência CEJA-1 do clone 7 de Pb IOC 3698.

```

1      AWTCGGTGAT GGCCATTGAG AGGGTGAGGA TGATGACGAC CAATGAGCAG GCTCATATTT
61     TAGGTTGCGC AGGATTTTTT TGCTCTTGTT CTGCGAAGGT GTGGATGTGG ATGTGGATGT
121    GGATATATAT CGAGTGGAGG CATTGAGGGT TTTGTGGCGG GTAACCCAAG TTATGTGCGC
181    AGAGGCATTG TAAGGGGAAC TAAGGATTCT GTGAATGCCA TTGAGACTCT GAGGAGGCAT
241    CTATGAATAA CGCCTGATCA GCAAGATCCA AACCAGATCG GTTAATACCG ATGTGAAAGT
301    AGGCCCTTGA GGAGGATTTT AGTTTACCTG GGGTTTGAAG GCGAGCCTCA GTATATCTGA
361    GCACTGTGTA CATGAGTGCC TTGAAGACAT TGTCGGTTAG ATGGAAGGGG AAAACTATTA
421    TTATAATTAT TACTATTACT ATTATTATCA TTTAAGAAGA AGAAGAAGAA GAGAAGAAGT
481    TGAAGAAGAT AGAATGATGT CAAAGCATTG AGTGATCGTA ATATTTCTGT GAAGCGAAAG
541    TTGCGATATG ATGTTTGCAC TGTTTGCCTG CGACSTAGg STGCTCCTGA aCGAmCTTTC
601    GCTGTTTCATG AwCTTTTAAAC TAGTGAACAA GGGAAATTWG TTGGAAAATC SCTGCAAAAT
661    ACCTGGATGA AATTAATTTT AATTGCGGGG AAWAWTTtAC GGTGGAATGG ACTATTTwAT
721    GKGGCCATAT tCCCATCCGT AACCGADYCC CMCYTAGYTT CcRACTTKGR RARRaGTCTC
781    TGATCTCTCA YTTYTTTTCA AATCCCTTMT CCCCYTCAYC CyTtYCCcAK TBATMCTCYC

```

Figura 9. Seqüência CEJA-2 do clone 3 de Pb 339.

As seqüências CEJA-1 e CEJA-2 foram submetidas à análise do tipo BLASTn. A análise da similaridade das seqüências CEJA-1 e CEJA-2 com outras seqüências depositadas no GenBank está demonstrada na Figura 10 e 11, respectivamente. Houve similaridade entre as seqüências CEJA-2 de Pb IOC 3698 e as seqüências CEJA-2 de Pb 339 (Figura 12). Não houve similaridade entre as seqüências CEJA-1 e CEJA-2 de *P. brasiliensis*.

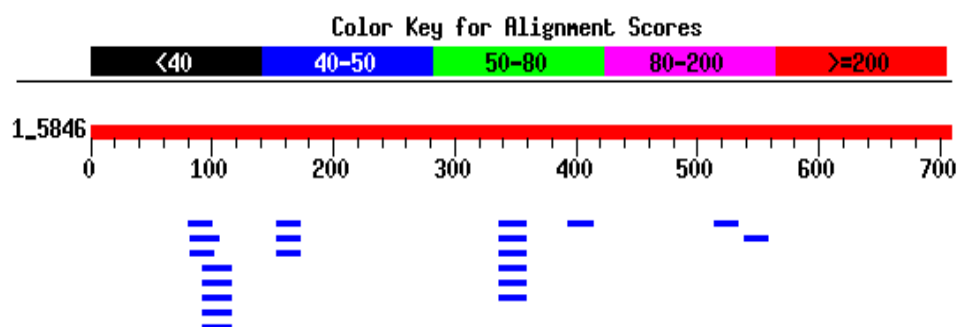


Figura 10. Análise da similaridade da seqüência CEJA-1 com as seqüências depositadas no programa BLAST. A seqüência CEJA-1 é representada pela barra vermelha numerada. As barras em azul indicam baixa similaridade de seqüências.

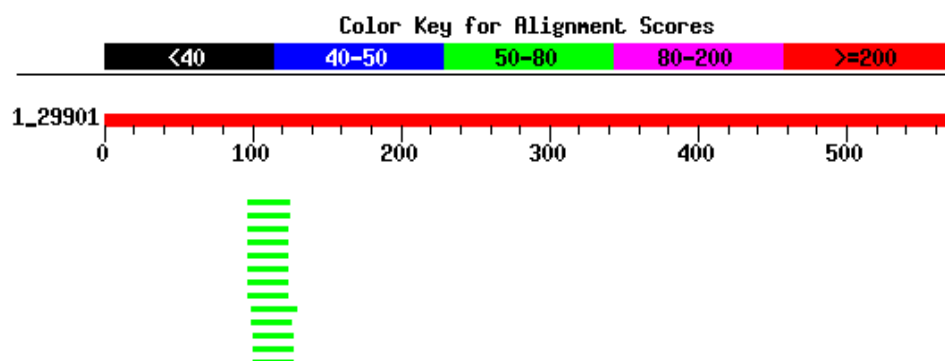


Figura 11. Análise da similaridade da seqüência CEJA-2 com as seqüências depositadas no programa BLAST. A seqüência CEJA-2 é representada pela barra vermelha numerada. As barras em verde indicam baixa similaridade de seqüências.

```

Query: 1 awtcggtgatggcattgagaggggtgaggatgatgacgaccaatgagcaggctcatattt 60
Sbjct: 1 awtcggtgatggcattgagaggggtgaggatgatgacgaccaatgagcaggctcatattt 60

Query: 61 taggttgcgcaggatTTTTctcttTgttctgcgaaggTgtggatgtggatgtggatgt 120
Sbjct: 61 taggttgcgcaggatTTTTctcttTgttctgcgaaggTgtggatgtggatgtggatgt 120

Query: 121 ggatataTatcgagTggaggcattgagggTTTTgtggcgggtaaccaagTtatgtgcgc 180
Sbjct: 121 ggatataTatcgagTggaggcattgagggTTTTgtggcgggtaaccaagTtatgtgcgc 180

Query: 181 agaggcattgtaaggggaactaaggattctgtgaatgccattgagactctgaggaggcat 240
Sbjct: 181 agaggcattgtaaggggaactaaggattctgtgaatgccattgagactctgaggaggcat 240

Query: 241 ctatgaataacgcctgatcagcaagatccaaaccagatcggTtaataccgatgtgaaagt 300
Sbjct: 241 ctatgaataacgcctgatcagcaagatccaaaccagatcggTtaataccgatgtgaaagt 300

Query: 301 aggcccttgaggaggattcagttacctggggTttgaaggcgagcctcagtatatctga 360
Sbjct: 301 aggcccttgaggaggattcagttacctggggTttgaaggcgagcctcagtatatctga 360

Query: 361 gcactgtgtacatgagTgcctgaagacattgtcggttagatggaaggggaaa 413
Sbjct: 361 gcactgtgtacatgagTgcctgaagacattgtcggttagatggaaggggaaa 413

```

Figura 12. Resultado da similaridade entre as seqüências CEJA-2 de Pb IOC 3698 (*Query*) e CEJA-2 de Pb 339 (*Sbjct*), mostrando 100% de homologia.

As seqüências CEJA-1 e CEJA-2 de *P. brasiliensis* também foram submetidas ao BLASTn de seqüências ESTs de fungos. Houve pequena similaridade, de apenas 17 a 18 nucleotídeos, entre a seqüência CEJA-1 e uma seqüência EST de *Agaricus bisporus*, uma de *Paracoccidioides brasiliensis* e várias de *Magnaporthe grisea*.

O BLASTn de seqüências ESTs de fungos com CEJA-2 também revelou pequena similaridade, de apenas 17 a 38 nucleotídeos, com seqüências de *Laccaria bicolor*, *Neurospora crassa*, *Mycosphaerella graminicola*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Aspergillus nidulans*, *Ustilago maydis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Fusarium graminearum*, *Verticillium dahliae*, onze seqüências ESTs de *Paracoccidioides brasiliensis* e várias de *Trichoderma reesei*, depositadas no GenBank.

3. Otimização das condições da PCR para identificação da seqüência CEJA-1 de *P. brasiliensis*

Foram construídos *primers* específicos para a caracterização da seqüência CEJA-1 de *P. brasiliensis*. Inicialmente foram analisadas as condições de temperatura de anelamento, concentração de magnésio, sensibilidade e especificidade da reação de PCR.

Em todas as quatro temperaturas de anelamento testadas apareceu apenas uma banda específica de 407 pb (Figura 13). Foi escolhida como temperatura de anelamento para as próximas reações a temperatura de 68°C.

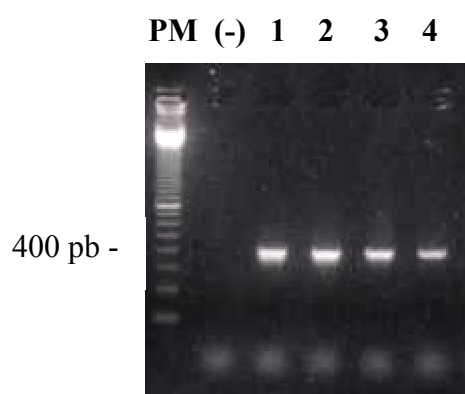


Figura 13. Otimização da temperatura de anelamento dos *primers* PBEXF e PBEXR, homólogos à seqüência CEJA-1: 58°C (1); 63°C (2); 68°C (3) e 70°C (4). (-) indica controle negativo e PM indica marcador de peso molecular de 100 pb Ladder.

Em todas as concentrações de magnésio testadas com os *primers* PBEXF e PBEXR pode-se visualizar uma banda de 407 pb (Figura 14). Ficou determinada a concentração de 1,5 mM de cloreto de magnésio para as próximas reações.

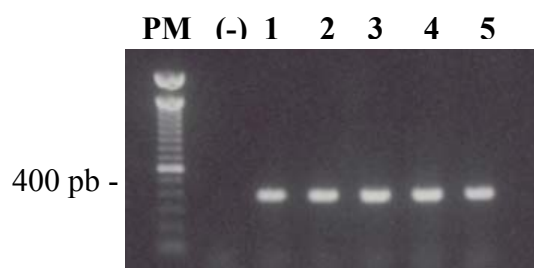


Figura 14. Otimização da concentração de magnésio da PCR “PBEXF/PBEXR”: 0,5 mM (1); 1,0 mM (2); 1,5 mM (3); 2,0 mM (4) e 2,5 mM (5). (-) indica controle negativo e PM indica marcador de peso molecular de 100 pb Ladder.

O limite de detecção de DNA da PCR “PBEXF/PBEXR” foi de 25 pg de DNA genômico (Figura 15).

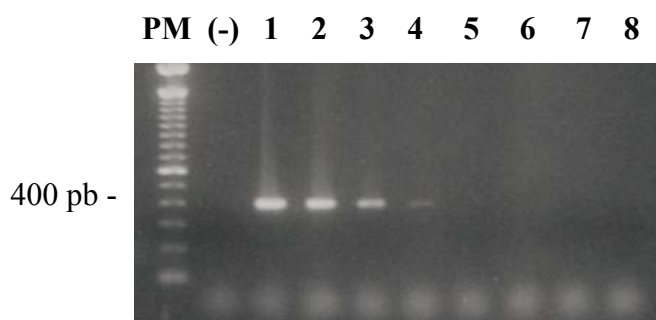


Figura 15. Determinação do limite de detecção de DNA da PCR “PBEXF/PBEXR”: 25 ng (1); 2,5 ng (2); 250 pg (3); 25 pg (4); 2,5 pg (5); 250 fg (6); 25 fg (7) e 2,5 fg (8). (-) indica controle negativo e PM indica marcador de peso molecular de 100 pb Ladder.

A especificidade desses *primers* foi inicialmente testada com DNA das cepas reconhecidamente virulentas e avirulentas de *P. brasiliensis*, bem como de isolados recentemente obtidos de pacientes com paracoccidioidomicose. A especificidade também foi testada com DNA de outros fungos de interesse médico, dimórficos e não dimórficos. Houve amplificação do fragmento de 407 pb nos isolados virulentos do fungo e nos isolados recentemente obtidos de pacientes, além disso não foi possível amplificar esta seqüência a partir do DNA genômico de cepas avirulentas de *P. brasiliensis* caracterizadas previamente quanto à morfologia, bioquímica e patogenia (Figura 16).

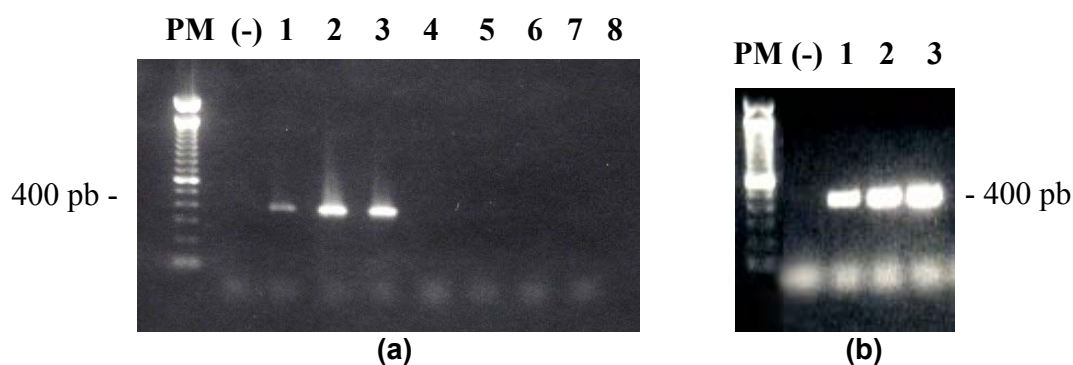


Figura 16. PCR “PBEXF/PBEXR” com isolados reconhecidamente virulentos e avirulentos de *P. brasiliensis*, bem como com isolados de *P. brasiliensis* recentemente obtidos de pacientes. Em (a): cepa virulenta Pb 18 (**1**); cepa virulenta Pb 339 (**2**); cepa virulenta Pb IOC 3698 (**3**); cepas avirulentas Pb IOC 1059, Pb IOC 1208, Pb IOC 1210, Pb IOC 1099 (**4 a 7, respectivamente**). A Figura 13 (b) mostra o resultado da PCR com os isolados de *P. brasiliensis* recentemente obtidos de pacientes do Piauí: Pb Ed/Te (**1**); Pb Fs/Te (**2**) e Pb Pc/Te (**3**). (-) indica controle negativo e PM indica marcador de peso molecular de 100 pb Ladder.

A especificidade desta PCR foi confirmada pela ausência de produtos amplificados com DNA genômico de: *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Sporotrix schenckii*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Leishmania braziliensis*, *Trypanosoma cruzi*, *Schistosoma mansoni* e DNA genômico humano (leucócitos) (dados não mostrados).

Amostras de DNA de fungos foram submetidas à reação de PCR utilizando os *primers* universais ITS1 e ITS4 para detecção de elemento genético característicos dos fungos, de 500 a 800 pb (Figura 17 e 18). A reação de PCR com a presença de DNA genômico de *Coccidioides immitis* e *Sporothrix schenkii* negativas foram repetidas com amostras de DNA recém- extraídas. Amostras de DNA genômico de isolados virulentos e avirulentos de *P. brasiliensis* também foram submetidas à reação de PCR com *primers* para detecção do elemento genético de fungos, confirmando que apesar das amostras de DNA dos isolados avirulentos não serem amplificadas com *primers* específicos para CEJA-1, as mesmas são amplificadas com *primers* específicos para elementos genéticos de fungos em geral, sendo portanto, o controle positivo externo da reação da PCR com os *primers* PBEXF e PBEXR. Este resultado sugere que o gene *CEJA-1* pode ser um fator de virulência.

Culturas da cepa virulenta Pb IOC 3698 e da cepa avirulenta Pb IOC 1059 foram submetidas à extração de RNA total e síntese de cDNA pelo método do Trizol® e a PCR específica utilizando os *primers* PBEXF e PBEXR. O produto de PCR amplificado a partir do cDNA da cepa virulenta apresentou o mesmo peso molecular do produto de PCR amplificado a partir de DNA genômico (Figura 19).

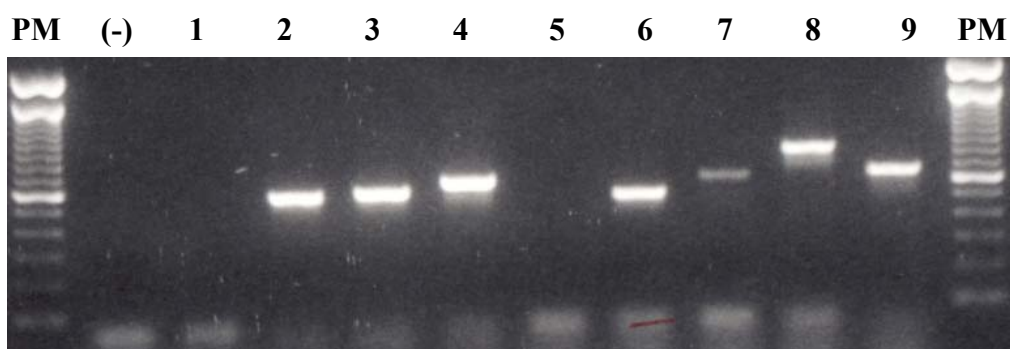


Figura 17. PCR com *primers* universais ITS1 e ITS4 específicos para fungos em presença de DNA genômico de fungos: *Coccidioides immitis* (1); *Cryptococcus neoformans* (2); *Blastomyces dermatitidis* (3) *Histoplasma capsulatum* (4); *Sporothrix schenkii* (5); *Candida albicans* (6); *Aspergillus fumigatus* (7); *Sacharomyces cerevisiae* (8) e *Paracoccidioides brasiliensis* (cepa virulenta Pb 18) (9). (-) indica controle negativo e PM indica marcador de peso molecular de 100 pb.

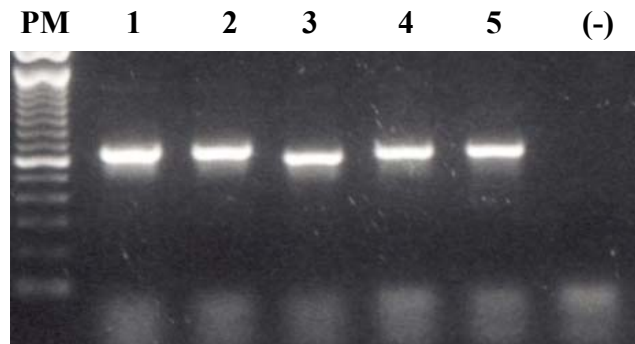


Figura 18. PCR com *primers* universais ITS1 e ITS4 específicos para fungos em presença de DNA genômico de isolados virulentos e avirulentos de *P. brasiliensis*: Pb 339 (1); Pb IOC 3698 (2); Pb IOC 1059 (3); Pb IOC 1124 (4) Pb IOC 1208 (5). (-) indica controle negativo e PM marcador de peso molecular de 100 pb.

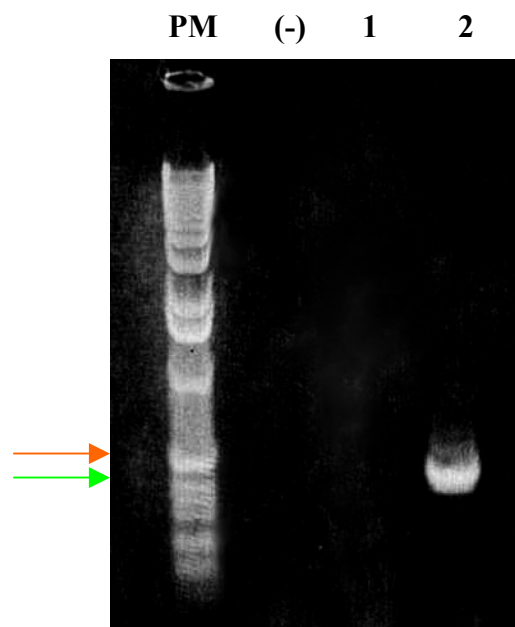


Figura 19. PCR “PBEXF/PBEXR” específica com de cDNA de uma isolado virulento e um avirulento de *P. brasiliensis*: isolado avirulento Pb IOC 1059 (1) e isolado virulento Pb IOC 3698 (2). (-) indica controle negativo e PM marcador de peso

molecular de 1 kb Ladder (Gibco), onde a seta laranja corresponde a 506 pb e a seta verde a 396 pb.

4. Desenvolvimento de teste molecular para o diagnóstico da paracoccidiodomicose

Foram construídos três *primers* para o desenvolvimento de uma *hemi-nested PCR* em tubo único para detecção de *P. brasiliensis* a partir de amostras clínicas. O esquema da reação de PCR está representado na Figura 20. Os *primers* externos *sense* (PBEXF-2) e *anti-sense* (PBEXR-2) foram construídos na mesma região dos *primers* anteriormente utilizados (PBEXF e PBEXR), com pequenas modificações. O PBEXF-2 difere do *primer sense* anterior por apresentar menor seqüência de homologia com o fragmento CEJA-1 e possuir uma pequena seqüência de nucleotídeos não homólogos ao fragmento na extremidade 5', diminuindo a temperatura de anelamento deste *primer* na primeira reação da PCR e aumentando-a na segunda reação a partir do produto da primeira reação.

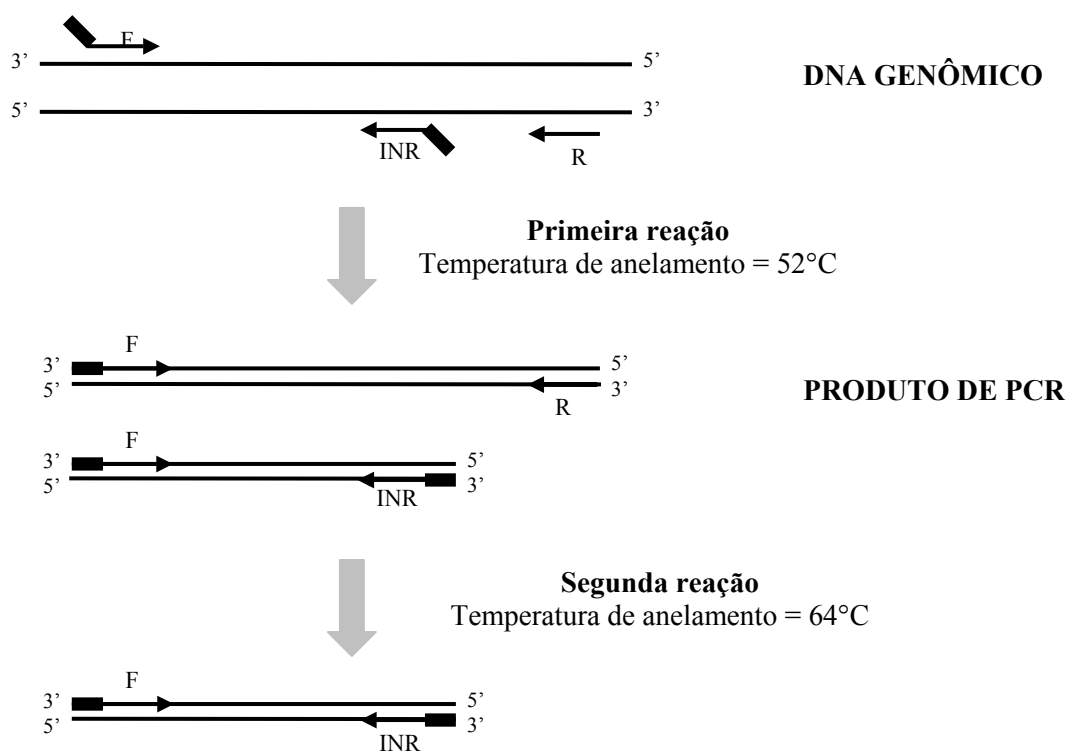


Figura 20. Esquema da reação de *hemi-nested PCR* em tubo único para detecção de *P. brasiliensis*. A 64°C a segunda reação amplifica apenas o produto de PCR produzido na primeira reação.

Da mesma forma, o *primer* interno PBINR-2 possui uma cauda de nucleotídeos não homólogos que visa aumentar a especificidade da segunda reação para o produto da PCR da primeira reação, evitando assim, que a reação ao ser desenvolvida em tubo único não seja evidenciada a partir de DNA genômico, o que consistiria em uma reação *multiplex* e não *hemi-nested*.

Inicialmente as temperaturas de anelamento dos *primers* da primeira e da segunda reação foram otimizadas. Os resultados da Figura 21 indicam que a primeira reação foi positiva em temperatura de até 52°C, enquanto que a segunda reação foi positiva em temperatura de até 62°C.

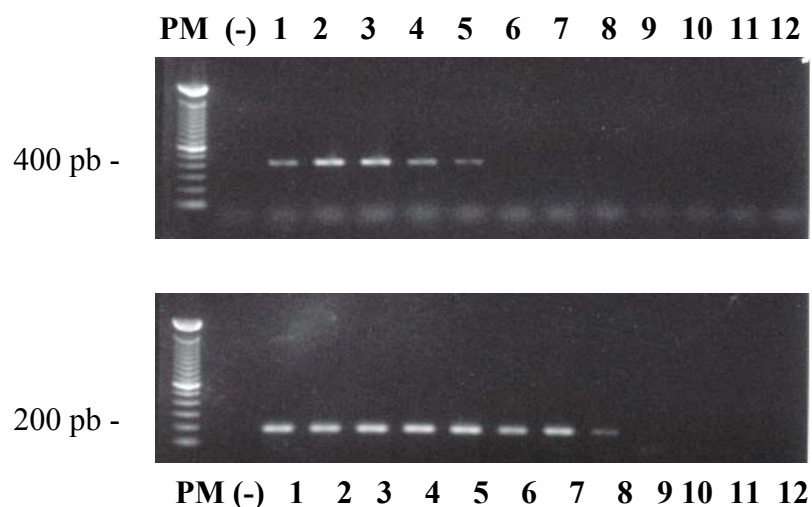


Figura 21. Otimização das temperaturas de anelamento da PCR “PBEXF-2/PBEXR-2” (gel superior) e da PCR “PBEXF-2/PBINR-2” (gel inferior) usadas na primeira e na segunda reação da *hemi-nested PCR*, respectivamente: 48°C (1); 50°C (2); 52°C (3); 54°C (4); 56°C (5); 58°C (6); 60°C (7); 62°C (8); 64°C (9); 66°C (10); 68°C (11) e 70°C (12). (-) indica controle negativo e PM indica marcador de peso molecular de 100 pb Ladder.

A temperatura de anelamento da reação de PCR simples com os *primers* PBEXF-2 e PBINR-2, para detecção da seqüência CEJA-1 de *P. brasiliensis* a partir do fragmento da PCR produzida com os *primers* externos (PBEXF-2 e PBEXR-2) foram analisadas conforme mostrado na Figura 22. Considerando que a maior temperatura de fusão do *primer* PBEXF-2 e PBINR-2 foi de 62°C, conclui-se que a temperatura de fusão do *primer* PBEXR-2 foi a limitante na reação de PCR com os *primers* (PBEXF-2 e PBEXR2) que apresentou a maior temperatura de anelamento possível de 52°C (Figura 21). Baseado no fato que a cauda de nucleotídeos acrescida à extremidade 5' do *primer* PBEXF-2 promove um incremento na maior temperatura possível para hibridização do *primer* ao molde de DNA, conclui-se que o fragmento de 172 pb será produzido apenas a partir do produto de PCR da primeira reação com os *primers* externos (PBEXF2 e PBEXR-2) a temperatura de 64°C. Aumentos progressivos de temperatura de anelamento a partir de 66°C tornam a reação da PCR com *primers* PBEXF-2 e PBINR-2 menos eficiente, permitindo, desta forma, a síntese do fragmento de PCR da primeira reação com maior eficiência devido à limitação da temperatura de fusão do *primer* senso PBEXF-2 agora na segunda reação com 100% de homologia com a seqüência nucleotídica da cauda.

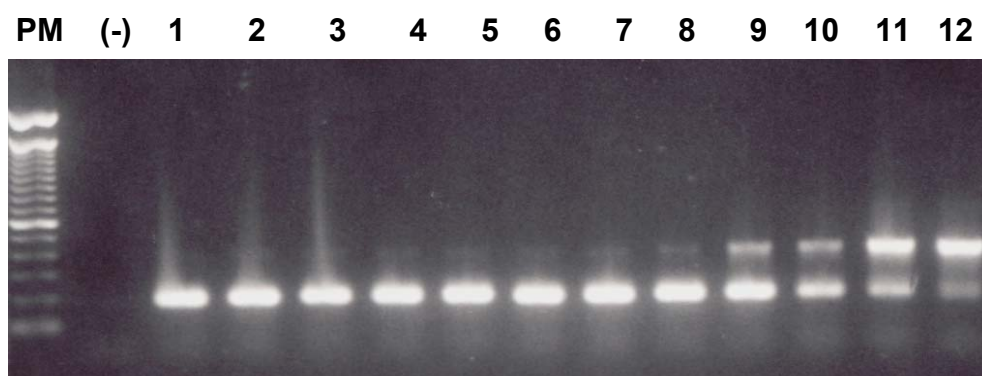


Figura 22. Otimização das temperaturas de anelamento da PCR simples com os *primers* PBEXF-2 e PBINR-2 para detecção da seqüência CEJA-1 de *P. brasiliensis* a partir do produto da PCR com os *primers* externos (PBEXF-2 e PBEXR-2): 48°C (1); 50°C (2); 52°C (3); 54°C (4); 56°C (5); 58°C (6); 60°C (7); 62°C (8); 64°C (9); 66°C (10); 68°C (11) e 70°C (12). (-) indica controle negativo e PM indica marcador de peso molecular de 100 pb Ladder.

O limite de detecção de DNA da PCR simples com os *primers* da segunda reação (PBEXF-2 e PBINR-2) foi de 250 pg de DNA genômico (Figura 23).

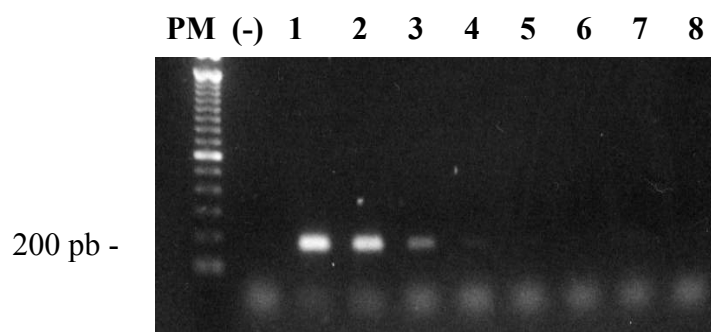


Figura 23. Determinação do limite de detecção de DNA genômico na reação de PCR simples com os *primers* PBEXF-2 e PBINR-2: 25 ng (1); 2,5 ng (2); 250 pg (3); 25 pg (4); 2,5 pg (5); 250 fg (6); 25 fg (7) e 2,5 fg (8). (-) indica controle negativo e PM indica marcador de peso molecular de 100 pb Ladder.

A especificidade da *hemi-nested PCR* usando os *primers* PBEXF-2 e PBINR-2 foi confirmada pela ausência de produtos amplificados com DNA genômico de isolados de: *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Sporothrix schenckii*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Leishmania braziliensis*, *Trypanosoma cruzi*, *Schistosoma mansoni* e DNA genômico humano (leucócitos) (Figura 24).

O potencial diagnóstico da *hemi-nested PCR* foi verificado com DNA extraído de amostra clínica de um paciente com paracoccidiodomicose. Foi realizado o teste de *hemi-nested PCR* em tubo único para a detecção molecular de *P. brasiliensis* na amostra de aspirado de linfonodo do paciente com paracoccidiodomicose confirmada através de exame direto e cultura. Como pode ser visualizado na Figura 25, houve a formação da banda de 172 pb específica de *P. brasiliensis*.

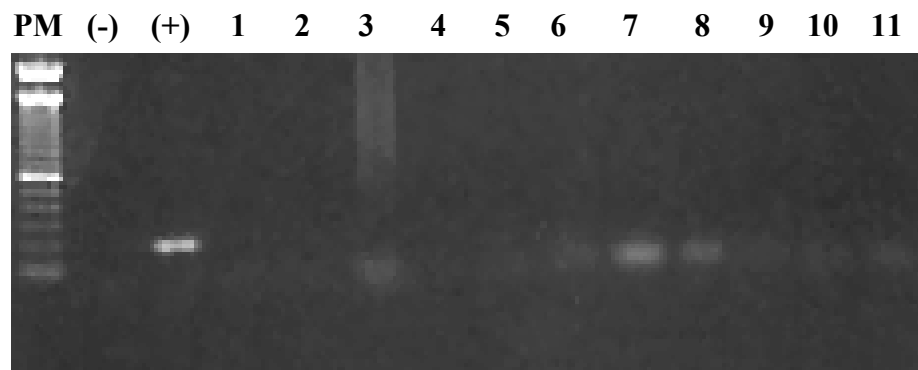


Figura 24. Especificidade da *hemi-nested PCR* com os *primers* PBEXF-2 e PBINR-2: *Blastomyces dermatitidis* (1); *Histoplasma capsulatum* (2); *Sporothrix schenckii* (3); *Coccidioides immitis* (4); *Candida albicans* (5); *Aspergillus fumigatus* (6); *Mycobacterium tuberculosis* (7); *Leishmania braziliensis* (8); *Trypanosoma cruzi* (9); *Schistosoma mansoni* (10) e leucócitos humano (11). (-) indica controle negativo, (+) indica controle positivo e PM indica marcador de peso molecular de 100 pb Ladder.



Figura 25. *Hemi-nested PCR* em tubo único para diagnóstico molecular da paracoccidioidomicose: *Hemi-nested PCR* em tubo único com 5 µl de DNA da amostra clínica (1). (-) indica controle negativo, (+) indica controle positivo e PM indica marcador de peso molecular de 100 pb Ladder.

O exame direto da amostra clínica revelou a presença de células leveduriformes com contorno birrefringente, com brotações simples e múltiplas, típicas de *P. brasiliensis* (Figura 26).

Após 14 dias de cultivo a cultura da amostra clínica começou a apresentar um resultado “positivo”, porém o resultado conclusivo foi obtido após 25 dias de cultivo a temperatura de 37°C. A conversão das fases (L↔M) da cultura foi realizada para a correta identificação de *P. brasiliensis*.

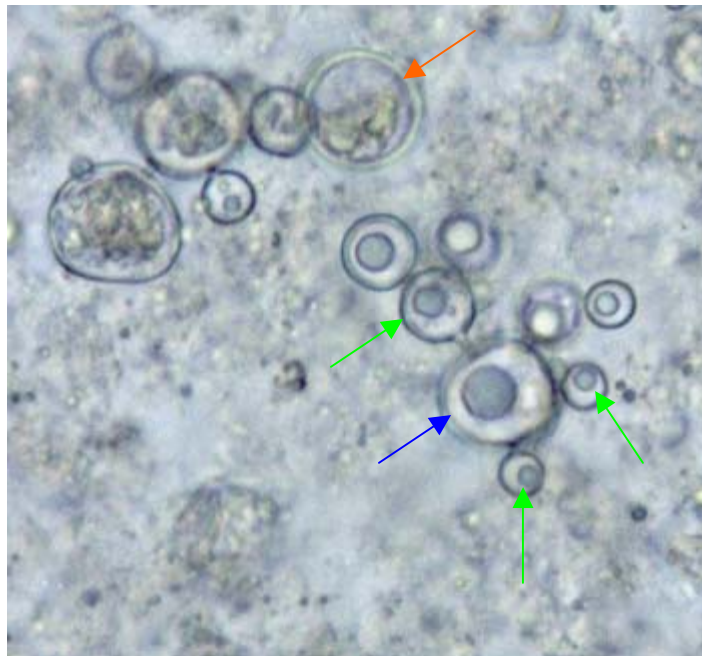


Figura 26. Exame direto a fresco do aspirado de linfonodo do paciente com paracoccidioidomicose. A seta laranja mostra uma célula leveduriforme apresentando o contorno da parede celular birrefringente. As setas verdes apontam para células filhas originadas a partir de uma célula mãe (seta azul), indicando a presença de exoesporulação múltipla, típica de *Paracoccidioides brasiliensis*.

DISCUSSÃO

O principal objetivo deste trabalho foi sequenciar e caracterizar um fragmento de DNA de 750 pb específico de isolados virulentos de *P. brasiliensis*. Para obtenção do fragmento detectado por Borba (2002) foi feita uma reação de RAPD utilizando o *primer* OPF-08 com isolados virulentos do fungo. A técnica de RAPD tem sido freqüentemente utilizada para revelar importantes características intrínsecas e extrínsecas de *P. brasiliensis*, revelando-se como uma ferramenta poderosa para estudos epidemiológicos deste fungo (HAHN *et al.*, 2003). Porém, as tentativas de amplificação de DNA por RAPD utilizada com a finalidade de distinguir isolados de *P. brasiliensis* com diferentes graus de virulência não foram bem sucedidas. Motta *et al.* (2002) não tiveram sucesso usando a técnica de RAPD na discriminação de isolados de *P. brasiliensis* apresentando diferentes graus de virulência, bem como com isolados obtidos de pacientes com diferentes manifestações clínicas. Entretanto, Borba (2002) foi capaz de distinguir molecularmente isolados virulentos e avirulentos de *P. brasiliensis* usando RAPD. Em estudos anteriores, estes isolados virulentos e avirulentos “mutantes” quanto à capacidade de realizar o dimorfismo, bem como quanto às características de virulência e patogenicidade em camundongo BALB/c, foram morfologicamente distinguidos (BORBA & SCHÄFFER, 2002).

A amplificação de DNA apenas dos isolados reconhecidamente virulentos e dos recentemente obtidos de pacientes do Piauí, indica ser este um possível marcador de virulência para *P. brasiliensis*. Além disso, a PCR específica com amostra de cDNA de um isolado virulento utilizando os *primers* homólogos à seqüência CEJA-1 sugere tratar-se de um gene expresso. Abordagens moleculares utilizando cepas mutantes avirulentas são estratégias alternativas de análise da virulência do *P. brasiliensis* e extremamente úteis para o entendimento dos fatores associados com a invasão e com o processo de infecção desse fungo, abrindo novas perspectivas no desenvolvimento de novas terapias (BORGES-WALMSLEY *et al.*, 2002).

Métodos moleculares vêm sendo intensivamente desenvolvidos para o diagnóstico de importantes doenças infecciosas como a tuberculose (RODRIGUEZ *et al.*, 1997; GARCÍA-QUINTANILLA *et al.*, 2000), bem como para outras patologias, dentre elas, de etiologia fúngica. A detecção molecular de fungos é uma prática que vem cada vez mais se consolidando como uma ferramenta alternativa e útil no diagnóstico de micoses superficiais e sistêmicas. Destacam-se a detecção molecular

de *Histoplasma capsulatum* (RICKERTS *et al.*, 2002; BRACCA *et al.*, 2003; GUEDES *et al.*, 2003), de *Blastomyces dermatitidis* (BIALEK *et al.*, 2003), de *Paracoccidioides brasiliensis*, tanto a partir de cultura (GOLDANI *et al.*, 1995; MOTOYAMA *et al.*, 2000; IMAI *et al.*, 2000) como a partir de amostras clínicas (GOMES *et al.*, 2000; BIALEK *et al.*, 2000), de espécies de *Trichosporon* (NAGAI *et al.*, 1999), do gênero *Fonsecaea* (ABLIZ *et al.*, 2003), de espécies de *Aspergillus* (SKLANDNY *et al.*, 1999), bem como o uso de *Multiplex* PCR para a detecção molecular simultânea de espécies de *Candida* e *Cryptococcus neoformans* (LUO & MITCHELL, 2002).

Os métodos moleculares para o diagnóstico da paracoccidioidomicose desenvolvidos por Gomes *et al.* (2000) e Bialek *et al.* (2000) tiveram como base a seqüência do gene da gp43. Algumas seqüências do gene da gp43, usadas para desenho dos *primers* por estes autores, foram posteriormente estudadas (MORAIS *et al.*, 2000) e foi mostrada a presença de substituições nucleotídicas quando seqüências deste gene obtidas de 17 isolados diferentes de *P. brasiliensis* foram comparadas, mostrando um alto polimorfismo gênico. San-Blas *et al.* (2002) mostraram que alguns *primers* usados por Gomes *et al.* e Bialek *et al.*, foram escolhidos de regiões susceptíveis a mudanças e sugere checar a universalidade espécie-específica desses *primers* com vários outros isolados do fungo.

O diagnóstico molecular de doenças infecciosas baseado na detecção do genoma do patógeno através da PCR simples requer um outro método confirmatório que pode ser uma hibridização com uma sonda homóloga ao fragmento amplificado (RODRIGUEZ *et al.*, 1997; VAN BURIK *et al.*, 1999), sequenciamento do fragmento sintetizado (GUEDES *et al.*, 2003; HU *et al.*, 2003) ou uma segunda reação de PCR com par de *primers* homólogos a regiões internas do fragmento amplificado na primeira reação da PCR chamada “*nested* PCR” (SKLANDNY *et al.*, 1999; BIALEK *et al.*, 2003; BRACCA *et al.*, 2003). Quando se utiliza apenas um *primer* interno mantendo-se o externo para a fita oposta igual ao da primeira reação se fala em “*hemi-nested* PCR”. Métodos diagnósticos que utilizam duas reações de PCR aninhadas, além de aumentar a especificidade da reação, tem mostrado aumentar em pelo menos uma ordem a sensibilidade da reação quando examinada a partir de material de cultura (BRACCA *et al.*, 2003; HU *et al.*, 2003). No desenvolvimento de um método de diagnóstico baseado em PCR vários parâmetros devem ser otimizados visando maximizar a sensibilidade da reação (HUGHES *et al.*, 1998).

A temperatura e o tempo de anelamento dos *primers* ao molde de DNA é uma etapa crucial e dependem da composição da seqüência do *primer*, mais especificamente, do seu tamanho e da proporção entre os nucleotídeos “C” e “G” (formadores de três pontes de hidrogênio) contra os nucleotídeos “A” e “T” (formadores de apenas duas pontes de hidrogênio). Temperatura de anelamento de *primers* entre 55 e 72°C geralmente rendem melhores resultados (INNIS & GELFAND, 1990). Outro aspecto importante para o desenho do *primer* é o tipo de reação da PCR que se deseja. As seqüências de nucleotídeos das extremidades 3’ do par de *primers* utilizado não devem ser complementares entre si, desta forma a evitar formação de “*dimers*”, ou seja, a extensão dos *primers* anelados. O cuidado deve ser maior quando mais de um par de *primers* fazem parte da reação da PCR, como nas suas variantes *multiplex* e PCR aninhadas. O desenho dos *primers* e, por conseguinte, a temperatura de anelamento é muito importante no estabelecimento de temperaturas diferenciais para o anelamento dos *primers* nas duas reações da PCR aninhadas, de forma que o fragmento final seja produzido apenas a partir do produto da primeira PCR. Este fato é mais relevante quando a metodologia utilizada é uma PCR aninhada em um único tubo, devendo-se pois, evitar que a segunda reação tenha origem a partir do DNA genômico também. Nagai *et al.* (1999), Bialek *et al.* (2000) e Hu *et al.* (2003), têm utilizado PCR aninhadas em tubos separados, onde uma alíquota do produto de uma primeira reação simples é utilizada como molde para uma segunda PCR simples. A maior desvantagem desta estratégia é a manipulação de *amplicons* na preparação da segunda PCR, aumentando a possibilidade de contaminação das amostras negativas. Outras abordagens mais recentes têm sido avaliadas (GARCÍA-QUINTANILLA *et al.*, 2000).

A concentração de *primers* entre 0,1 e 0,5 μM são geralmente ótimas. Altas concentrações de *primers* podem promover a acumulação de produtos inespecíficos e pode aumentar a probabilidade de formar artefato “*primer-dimer*” que são substratos para a PCR e competem com o produto desejado pelos componentes da mistura de reação, resultando em um baixo rendimento do produto desejado (INNIS & GELFAND, 1990).

A concentração de magnésio também pode afetar todas as etapas da reação de PCR: anelamento de *primers*, especificidade do produto, formação de artefatos “*primer-dimer*” (dimerização), fidelidade e atividade da enzima. O número de ciclos

da PCR depende da concentração do DNA alvo quando outros parâmetros estão otimizados.

O limite de detecção da primeira PCR a partir de DNA genômico obtido de cultura de *P. brasiliensis* foi de 25 pg.

As condições otimizadas estabelecidas para um teste molecular baseado na reação da PCR a partir da cultura de um patógeno podem diferir na prática clínica, quando o teste é empregado em amostras biológicas variadas. Dois aspectos importantes são, a natureza da amostra clínica e o conteúdo do DNA genômico do patógeno na preparação de DNA que também contém DNA humano e, dependendo da natureza da amostra e de outros patógenos presentes. Os resultados preliminares do teste molecular aqui proposto para diagnóstico da paracoccidiodomicose com DNA extraído de amostra clínica (aspirado de linfonodo de paciente com paracoccidiodomicose) foram promissores. Os resultados de exame direto confirmaram a positividade da amostra para paracoccidiodomicose. A identificação de *P. brasiliensis* a partir da cultura está baseada nas características macro e microscópicas da colônia. Todo este procedimento pode ser bastante laborioso uma vez que *P. brasiliensis* é de crescimento lento, e as culturas são mantidas até quatro semanas antes de serem descartadas.

A próxima etapa no desenvolvimento deste teste é a determinação da acurácia do teste, o estabelecimento da sensibilidade, valor preditivo positivo e negativo do teste em um maior número de amostras clínicas sabidamente positivas e negativas (Fase IIB) e posteriormente, a determinação em amostras clínicas suspeitas sem confirmação microbiológica prévia (Fase III).

CONCLUSÕES

1. Os *primers* PBEXF e PBEXR construídos a partir da seqüência CEJA-1, obtida por análise de RAPD e específica de isolados de *P. brasiliensis* reconhecidamente virulentos, foram capazes de amplificar de maneira específica o DNA dos isolados virulentos Pb 18, Pb 339 e Pb IOC 3698 e dos isolados Fc/Te, Fs/Te e Ed/Te, recentemente obtidos de pacientes, indicando que podemos estar diante de um possível marcador de virulência para o *P. brasiliensis*.
2. A amplificação de um fragmento de aproximadamente 400 pb com os *primers* PBEXF e PBEXR, a partir de amostra de cDNA de um isolado virulento de *P. brasiliensis*, sugere que a seqüência CEJA-1 faz parte de um gene expresso.
3. O baixo nível de homologia das seqüências CEJA-1 e CEJA-2 de *P. brasiliensis* em relação às seqüências depositadas no GenBank, bem como a ausência de amplificação de DNA nos testes de especificidade realizados com os *primers* PBEXF-2 e PBINR-2, construídos a partir da seqüência CEJA-1, permitiram o desenvolvimento de um teste molecular específico para detecção do fungo.
4. A partir da temperatura de 64°C os *primers* PBEXF-2 e PBINR-2 amplificam apenas o produto de PCR formado na primeira reação de *hemi-nested*. Isto foi particularmente importante porque evitou que a reação desenvolvida em tubo único fosse evidenciada a partir de DNA genômico, o que consistiria em uma reação *multiplex* e não *hemi-nested*.
5. A amplificação de DNA de *P. brasiliensis* a partir de amostra clínica, através de um teste de *hemi-nested PCR* em tubo único, representa um avanço no diagnóstico da paracoccidioidomicose.

REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

ABLIZ, P.; FUKUSHIMA, K.; TAKIZAWA, K.; NIEDA, N.; MIYAJI, M.; NISHIMURA, K. Rapid identification of the genus *Fonsecaea* by PCR with specific oligonucleotide primers. **Journal of Clinical Microbiology**, 41 (2): 873-876, 2003.

ARISTIZABAL, H. B.; CLEMONS, K. V.; STEVENS, D. A.; RESTREPO, A. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: in vivo inhibition in females. **Infection and Immunity**, 66 (11): 5587-5591, 1998.

ASSIS, C. M.; GANDRA, R. F.; GAMALE, W.; SHIMIZU, M. T.; PAULA, C. R. Biosynthesis of chondroitinase and hyaluronidase by different strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Medical Microbiology**, 52: (6) 479-481, 2003.

BAGALI, E.; SANO, A.; COELHO, K. I.; ALQUATI, S.; MIYAJI, M.; 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. **American Journal of Tropical Medical and Hygien**, 58 (4): 505-512, 1998.

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**, 38 (8): 2940-2942, 2000.

BIALEK, R.; CIRERA, A. C.; HERRMANN, T.; AEPINUS, C.; SHEARN-BOCHSLER, V. I.; LEGENDRE, A. M. Nested PCR assays for detection of *Blastomyces dermatitidis* DNA in paraffin-embedded canine tissue. **Journal of Clinical Microbiology**, 41 (1): 205-208, 2003.

BLOTTA M. H.; MAMONI R. L.; OLIVEIRA S. J.; NOUER S. A.; PAPAIOORDANOU 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. **American Journal of Tropical Medical and Hygien**, 61(3): 390-394. 1999.

BORBA, C. M. **Análise morfológica, bioquímica e molecular de cepas de *Paracoccidioides brasiliensis* exibindo diferenças na patogenicidade.** 2002. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular), Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2002.

BORBA, C. M. & SCHAFFER, G. M. V. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and an attempt to induce the dimorphic process with fetal calf serum. **Mycoses**, 45: 174-179, 2002.

BORGES-WALMSLEY, M. I.; CHEN, D.; SHU, X.; WALMSLEY, A. R. The pathobiology of *Paracoccidioides brasiliensis*. **TRENDS in Microbiology**, 10 (2): 80-87, 2002.

BRACCA, A.; TOSELLO, M. E.; GIRARDINE, J. E.; AMIGOT, S. L.; GÓMEZ, C.; SERRA, E. Molecular detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* in human clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, 41 (4): 1753-1755, 2003.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: an update. **Clinical Microbiology Reviews**, 6 (2): 89-117, 1993.

CALGANO, A. M.; NIÑO-VEGA, G.; SAN-BLAS, F.; SAN-BLAS, G. Geographic discrimination of *Paracoccidioides brasiliensis* strains by Randomly Amplified Polymorphic DNA analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, 36 (6): 1733-1736, 1998.

CALLE, D.; ROSERO, D. S.; OROZCO, L. C.; CAMARGO, D.; CASTAÑEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis in Colombia: an ecological study. **Epidemiology Infectious**, 126: (2) 309-315, 2001.

CAMARGO, Z. P.; UNTERKIRCHER, C.; CAMPOY, S. P.; TRAVASSOS, L. R. Production of *Paracoccidioides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion tests. **Journal of Clinical Microbiology**, 26 (10): 2147-2151, 1998.

CANO, M. I. N.; CISALPINO, P. S.; GALINDO, I.; RAMÍREZ, J. L.; MORTARA, R. A.; SILVEIRA, J. F. Electrophoretic Karyotypes and genome sizing of the pathogenic Fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, 36 (3): 742-747, 1998.

CISALPINO, P. S.; PUCCIA, R.; YAMAUCHI, L. M.; CANO, M. I. N.; FRANCO, J.; TRAVASSOS, L. R. Cloning, Characterization and epitope expression of the major diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal Biology Chemistry**, 271(8): 4553-4560, 1996.

CISALPINO, S. P. & TRAVASSOS, L. R. Aplicação da biologia molecular à caracterização e Identificação de fungos e ao diagnóstico de infecções fúngicas. In: Lacaz, C. S.; Porto, E.; Martins, J. E. C.; Heins-Vaccari, E. M. & Melo, N. T. **Tratado de Micologia Médica**. São Paulo: Sarvier Editora de Livros Médicos, 2002.

DÍEZ, S.; GARCIA, E. A.; PINO, P. A.; BOTERO, S.; CORREDOR, G. G.; PERALTA, L. A.; CASTAÑO, L. A.; RESTREPO, A.; MCEWEN, J. G. PCR with *Paracoccidioides brasiliensis* specific primers: potential use in ecological studies. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 41(6): 351-357, 1999.

DÍEZ, S.; GOMEZ, B. L.; MCEWEN, J. G.; RESTREPO, A.; HAY, R. J.; HAMILTON, A. J. Combined use of *Paracoccidioides brasiliensis* recombinant 27-kilodalton and purified 87-kilodalton antigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, 41(4): 1536-1542, 2003.

FEITOSA L. S.; CISALPINO, P. S.; SANTOS, M. R.; MORTARA, R. A.; BARROS, T. F.; MORAIS, F. V.; PUCCIA, R.; SILVEIRA, J. F.; CAMARGO, Z. P. Chromosomal polymorphism, syntenic relationships, and ploidy in the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genetics and Biology** 39 (1): 60-69, 2003.

FELIPE, M. S.; ANDRADE, R. V.; PETROFEZA, S. S.; MARANHÃO, A. Q.; TORRES, F. A.; ALBUQUERQUE, P.; ARRAES, F. B.; ARRUDA, M.; AZEVEDO, M. O.; BAPTISTA, A. J.; BATAUS, L. A.; BORGES, C. L.; CAMPOS, E. G.; CRUZ, M.

R.; DAHER, B. S.; DANTAS, A.; FERREIRA, M. A.; GHIL, G. V.; JESUÍNO, R. S.; KYAW, C. M.; LEITÃO, L.; MARTINS, C. R.; MORAES, L. M.; NEVES, E. O.; NICOLA, A. M.; ALVES, E. S.; PARENTE, J. A.; PEREIRA, M.; POCAS-FONSECA, M. J.; RESENDE, R.; RIBEIRO, B. M.; SALDANHA, R. R.; SANTOS, S. C.; SILVA-PEREIRA, I.; SILVA, M. A.; SILVEIRA, E.; SIMÕES, I. C.; SOARES, R. B.; SOUZA, D. P.; DE-SOUZA, M. T.; ANDRADE, E. V.; XAVIER, M. A.; VEIGA, H. P.; VENÂNCIO, E. J.; CARVALHO, M. J.; OLIVEIRA, A. G.; INOUE, M. K.; ALMEIDA, N. F.; WALTER, M. E.; SOARES, C. M.; BRIGIDO, M. M. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. **Yeast**, 20 (3): 263-271, 2002.

FONSECA, C. A.; JESUÍNO, R. S.; FELIPE, M. S.; CUNHA, D. A.; BRITO, W. A.; SOARES, C. M. Two-dimensional electrophoresis and characterization of antigens from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes and Infection**, 3 (7): 535-542, 2001.

FORJAZ M. H.; FISCHMAN O.; DE CAMARGO Z. P.; VIEIRA FILHO J. P.; COLOMBO A. L. Paracoccidioidomycosis in Brazilian Indians of the Surui tribe: clinical-laboratory study of 2 cases. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 32 (5): 571-575, 1999.

FRANCO, M.; BAGAGLI, E.; SCAPOLIO, S.; LACAZ, C. S. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. **Medical Microbiology**, 38 (3): 185-191, 2000.

GARCIA, N. M.; DEL NEGRO, G. M. B.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T.; ASSIS, C. M.; LACAZ, C. S. *Paracoccidioides brasiliensis*, nova amostra isolada de fezes de um pingüim (*Pygoscelis adeliae*). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 35 (3): 227-235, 1993.

GARCÍA-QUINTANILLA, A.; GARCIA L.; TUDÓ, G.; NAVARRO, M.; GONZÁLEZ J.; ANTA, M. T. J. Single-tube balanced heminested PCR for detecting *Mycobacterium tuberculosis* in smear-Negatives samples. **Journal of Clinical Microbiology**, 38 (3): 1166-1169, 2002.

GOLDANI, L. Z.; MAIA, A. L.; SUGAR A. M. Cloning and nucleotide sequence of a specific DNA fragment from *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, 33 (6): 1652-1654, 1995.

GOLDMAN, G. H.; MARQUES, E. R.; RIBEIRO, D. C. D.; BERNARDES, L. A. S.; QUIAPIN A. C.; VITORELLI, P. M.; SAVOLDI, M.; SEMEGHINI, C. P.; OLIVEIRA, R. C.; NUNES, L. R.; TRAVASSOS, L. R.; PUCCIA, R.; BATISTA, W. L.; FERREIRA, L. E.; MOREIRA, J. C.; BOGOSSIAN A. P.; TEKAIA F.; NOBREGA, P. M.; NOBREGA, F. G.; GOLDMAN, M. H. S. Expressed sequence Tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence and pathogenicity genes. **Eukaryotic Cell**, 2 (1): 34-48, 2003.

GOMES, G. M.; CISALPINO, P. S.; TABORDA, C. P.; CAMARGO, Z. P. PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, 38 (9): 3478-3480, 2000.

GONÇALVES, A. J. R.; LONDERO, A. T.; TERRA, G. M. F.; ROZENBAUM, R.; ABREU, T. F.; NOGUEIRA, A. S. Paracoccidioidomycosis in children in the state of rio de Janeiro (Brazil). Geogriphic distribution and the study of a "reservarea". **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 40 (1): 11-13, 1998.

GUEDES, H. L. M.; GUIMARÃES, A. J.; MUNIZ, M. M.; PIZZINI, C. V.; HAMILTON, A. J.; PERALTA, J. M.; DEEPE, G. S. JR.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. PCR assay for detection of *Histoplasma capsulatum* based on the nucleotide sequence of the M antigen. **Journal of Clinical Microbiology**, 41 (2): 535-539, 2003.

HAHN, R. C.; MACEDO, A. M.; FONTES, C. J. F.; BATISTA, R. D.; SANTOS, N. L.; HAMDAN, J. S. Randomly amplified polymorphic DNA as a valuable tool for epidemiological studies of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Clinical Microbiology**. 41(7): 2849-2854, 2003.

HAMDAN, J. S.; RESENDE, M. A.; FRANZOT, S. P.; CISALPINO, E. O. Biochemical analysis of the methylic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Revista do Instituto de medicina Tropical de São Paulo**, 34 (6): 511-516, 1992.

HORRÉ, R.; SCHUMACHER, G.; ALPERS, K.; SEITZ, H. M.; ADLER, S.; LEMMER, K.; HOOG, G. S.; SCHAAL, K. P.; TINTELNO, K. A case of imported Paracoccidioidomycosis in a German legionnaire. **Medical Mycology**, 40 (2): 213-216, 2002.

HU, S.; CHUNG, W.; HUNG, S.; HO, H.; WANG, Z.; CHEN, C.; LU, S.; KUO, T.; HONG, H. Detection of *Sporothrix schenckii* in clinical samples by a nested PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, 41 (4): 1414-1418, 2003.

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 the internal transcribed spacers (ITS) and 5.8S regions. **Medical Mycology**, 38 (4): 323-326, 2000.

INNIS, M. A. & GELFAND, D. H. Optimizations of PCR. In: **PCR protocols: a guide to methods and applications**, Academic Press, p 3-20, 1990.

KUROKOWA, C. S.; SUGIZAKI, M. F.; PERAÇOLI, M. T. S. Virulence factors in fungi of systemic mycosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 40 (3): 125-135, 1998.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de Micologia Médica**. São Paulo: Sarvier Editora de Livros Médicos, 2002.

LACAZ, C. S. Evolução dos conhecimentos sobre a paracoccidioidomicose. Um pouco de sua história. In: Del Negro, G.; Lacaz, C. S. & Fiorillo, A. M. **Paracoccidioidomicose. Blastomicose Sul-americana**. São Paulo: Sarvier-EDUSP, 1982. p1-6.

LUO, G. & MITCHELL, G. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, 40 (8): 2860-2865, 2002.

MALUF, M. L. F.; PEREIRA, S. R. C.; TAKAHACHI, G.; SVIDZINSKI, T. I. E. Prevalência de paracoccidiodomicose-infecção determinada através de teste sorológico em doadores de sangue na região noroeste do Paraná, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 36 (1): 11-16, 2003.

MARQUES, S. A. & CAMARGO, R. M. P. Paracoccidiodomicose. In: ZAITZ, C.; MARQUES, S. A.; RUIZ, L. R.. B.; SOUZA, V. M. **Compêndio de Micologia Médica**. Rio de Janeiro: Medsi, 1998. p231-264.

MAGALHÃES, O. M. C. **Paracoccidiodomicose, aspergilose e colonização por *Candida* (Berkhout) em pacientes internos no setor de pneumologia do Hospital Geral Otávio de Freitas (Sancho), Recife, Pernambuco**. 1994. Tese (Dissertação de Mestrado em Criptógamos), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1994.

MARQUES S. A.; ROBLES A. M.; TORTORANO A. M.; TUCULET M. A.; NEGRONI R.; MENDES R. P. Mycoses associated with AIDS in the Third World. **Medical Mycology**, 38 (1): 269-279, 2000.

MANOCHA, M, S.; SAN-BLAS, G.; CENTENO, S. Lipid composition of *Paracoccidioides brasiliensis*: possible correlation with virulence of different strains. **Journal of General Microbiology**, 117 (1): 147-154, 1980.

MCEWEN, J. G.; TAYLOR, J. W.; CARTER, D.; XU, J.; FELIPE, M. S.; VILGALYS, R.; MITCHELL, T. G.; KASUGA, T.; WHITE, T.; BUI, T.; SOARES, C. M. Molecular typing of pathogenic fungi. **Medical Mycology**, 38 (1): 189-197, 2000.

MENDES-GIANNINI, M. J. S.; MORAES, R. A.; RICCI, T. A. Proteolytic activity of the 43,000 molecular weight antigen secreted by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 32 (5): 384-385, 1990.

MENDES DA SILVA, A. M.; BORBA, C. M.; OLIVEIRA, P. C. Viability and morphological alterations of *Paracoccidioides brasiliensis* strains preserved under mineral oil for long periods of time. **Mycoses**, 37 (5-6): 165-169, 1994.

MIYAJI, M.; SANO, A.; SHARMIN, S.; KAMEI, K.; NISHIMURA, K.; NIPPON, I. G. Z. The role of chlamydospores of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi**, 44 (2): 133-138, 2003.

MONTENEGRO, M. R.; MIYAJI, M.; FRANCO, M.; NISHIMURA, K.; COELHO, K. I.; HORIE, Y.; MENDES, R. P.; SANO, A.; FUKUSHIMA, K.; FECCHIO, D. Isolation of fungi from nature in the region of Botucatu, state of São Paulo, Brazil, an endemic area of paracoccidioidomycosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 91 (6): 665-670, 1996.

MONTOYA, A. E.; MORENO, M. N.; RESTREPO, A.; MCEWEN JG. Electrophoretic karyotype of clinical isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Fungal Genetic Biology**, 21(2): 223-227, 1999.

MOTOYAMA, A. B.; VENÂNCIO, E. J.; BRANDÃO, G. O.; PETROFEZA-SILVA, S.; PEREIRA, I. S.; SOARES, C. M.; FELIPE, M. S. Molecular identification of *Paracoccidioides brasiliensis* by PCR amplification of ribosomal DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, 38 (8): 3106-3109, 2000.

MORAIS, F. V.; BARROS, T. F.; FUKADA, M. K.; CISALPINO, P. S.; PUCCIA R. Polymorphism in the gene coding for the immunodominant antigen gp43 from the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Clinical Microbiology**, 38 (11): 3960-3966, 2000.

MOTTA, T. R.; MOREIRA-FILHO, C. A.; MENDES, R. P.; SOUZA, L. R.; SUGIZAK, M. F.; BAUEB, S.; CALICH, V. L. G.; VAZ, A. C. A. Evaluation of DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers (RAPD) as genetically associated elements to differentiate virulent and non-virulent *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. 33: 151-157, 2002.

NAGAI H.; YAMAKAMI, Y.; HASHIMOTO, A.; TOKIMATSU, I.; NASU, M. PCR detection of DNA specific for *Trichosporon* species in serum of patients with disseminated trichosporonosis. **Journal of Clinical of Microbiology**, 37 (3): 694-699, 1999.

NEVES, A. R.; MAMONI, R. L.; ROSSI, C. L.; CAMARGO, Z. P. & BLOTTA, M. H. Negative immunodiffusion test results obtained with sera of paracoccidioidomycosis patients may be related to low-avidity immunoglobulin G2 antibodies directed against carbohydrate epitopes. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, 10 (5): 802-807, 2003.

NINO-VEGA, G. A.; MUNRO, C. A.; SAN-BLAS, G.; GOODAY, G. W.; GOW, N. A.; Differential expression of chitin synthase genes during temperature-induced dimorphic transitions in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Medical Mycology**, 38 (1): 31-39, 2000.

ONO, M. A.; ITANO, E. N.; MIZUNO, L. T.; MIZUNO, E. H.; CAMARGO, Z. P. Inhibition of *Paracoccidioides brasiliensis* by pesticides: is this a partial explanation for the difficulty in isolating this fungus from the soil? **Medical Mycology**, 40 (5): 493-499, 2002.

ORTIZ, B. L.; DÍEZ, S.; URAN, M. E.; RIVAS, J. M.; ROMERO, M.; CAICEDO, V.; RESTREPO, A.; MCEWEN, J. G. Use of the 27-kilodalton recombinant protein from *Paracoccidioides brasiliensis* in serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, 5 (6): 826-830, 1998.

PUCCIA, R.; SCHENKMAN, S.; GORIN, P. A.; TRAVASSOS, L. R. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. **Infection and Immunity**, 53 (1): 199-206, 1986.

RESTREPO, A.; MCEWEN, J. G.; CASTAÑEDA, E. The Habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Medical Mycology**, 39 (3): 233-241, 2001.

RICKERTS V.; BIALEK R.; TINTELNOT K.; JACOBI V.; JUST-NUBLING G. Rapid PCR-based diagnosis of disseminated histoplasmosis in an AIDS patient. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, 21(11): 821-823, 2002.

ROMANI, L.; BISTONI, F.; PUC CETTI, P. Fungi, dendritic cells and receptors: a host perspective of fungal virulence. **TRENDS in Microbiology**, 10 (11): 508-514, 2002.

RODRIGUEZ, J. C.; FUENTES, E.; ROYO, G. Comparison of two different PCR detection methods. Application to the diagnosis of pulmonary tuberculosis. **APMIS**, 105: 612-616, 1997.

RODRIGUES, M. C.; CASSAGUERRA, C. M.; LACAZ, C. S. Atigenemia in Paracoccidioidomycosis. Probable demonstration of circulating antigen by couterimmuno-electrophoresis test. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 26 (5): 285-287, 1984.

SALAZAR M. E.; RESTREPO A.; STEVENS D. A. Inhibition by estrogens of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infection and Immunity**, 56 (3): 711-713, 1988.

SALAZAR M. E. & RESTREPO, A. Morphogenesis of the mycelium to yeast transformation in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Sabouraudia**, 23 (1): 7-11, 1985.

SALEM-IZACC, S. M.; JESUÍNO, R. S. A.; BRITO, W. A.; PEREIRA, M.; FELIPE, M. S. S.; SOARES, C. M. A. Protein synthesis patterns of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in stage-specific forms and during cellular differentiation. **Journal of Medical & Veterinary Mycology**, 35 (3): 205-211, 1997.

SILVA-VERGARA, M. L.; MARTINEZ, R.; CHADU, A.; MADEIRA, M. FREITAS-SILVA, G.; LEITE MAFFEI, C. M. Isolation of a *Paracoccidioides brasiliensis* strain from the soil of a coffee plantation in Ibiá, State of Minas Gerais, Brazil. **Medical Mycology**, 36 (1): 37-42, 1998.

SAN-BLAS, G.; TRAVASSOS, L. R.; FRIES, B. C.; GOLDMAN, D. L.; CASADEVALL, A.; CARMONAS, A. K.; BARROS, T. F.; PUCCIA, R.; HOSTETTERS, M. K.; SHANKS, S. G.; COPPIN, V. M. S.; KNOX, Y.; GOW, N. A. R. Fungal morphogenesis and virulence. **Medical Mycology**, 38 (1): 70-86, 2000.

SAN-BLAS, G. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, 31(2): 99-113, 1993.

SAN-BLAS, G.; NIÑO-VEGA, G.; ITURRIAGA T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Medical Mycology**, 40 (3): 225-245, 2002.

SEVERO, L. C.; ROESCH, E. W.; OLIVEIRA, E. A.; ROCHA, M. M.; LONDERO, A. T. Paracoccidioidomycosis in women. **Revista Iberoamericana de Micología**, 15: 88-89, 1998.

SALINA, M. A.; SHIKANI-YASUDA, M. A.; MENDES, R. P.; BARRAVIERA, B.; MENDES-GIANNINI, M. J. S. M. Detection of Circulating *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in urine of paracoccidioidomycosis patients before and during treatment. **Journal of Clinical Microbiology**, 36 (6): 1723-1728, 1998.

SEVERO, L. C.; KAUER, C. L.; OLIVEIRA, F. M.; RIGATI, R. A.; HARTMANN, A. A.; LONDERO, A. T. Paracoccidioidomycosis of the male genital tract. Report of eleven cases and a review of Brazilian literature. **Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo**, 42 (1): 37-40, 2000.

SIDRIM, J. J. C & OLIVEIRA, F. G. M. Micoses profundas. In: Sidrim, J. J. C & OLIVEIRA, F. G. M. **Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica**. Editora Guanabara Koogan, p. 152-170, 1999.

SILVA, S. P.; BORGES-WALMSLEY, M. I.; PEREIRA, I. S.; SOARES, CMA.; WALMSLEY, AR.; FELIPE, MSS. Differential expression of the *hsp70* gene during transition from the mycelial to the infective yeast form of the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Molecular Microbiology**, 31 (4): 1039-1050, 1999.

SKLANDY, H.; BUCHHEIDT, D.; BAUST, C.; KIREG-SCHNEIDER, F.; SIFATH, W.; LEIB-MOSCH, C.; HEHLMANN, R. Specific detection of *Aspergillus* species in blood and bronchoalveolar lavage samples of immunocompromised patients by two-step PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, 37 (12): 3865-3871, 1999.

SOARES, C. M. A.; MOLLINARI MADILUN, E. E. W. I.; SILVA, S. P.; PEREIRA, M.; FELIPE, M. S. S. Characterization of *Paracoccidioides brasiliensis* isolates by

random amplified polymorphic DNA analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, 33 (2): 505-507, 1995.

TABORDA, C. P.; JULIANO, M. A.; PUCCIA, R.; FRANCO, M.; TRAVASSOS, L. R. Mapping of the T-Cell epitope in the Major 43-kilodalton glycoprotein of *Paracoccidioides brasiliensis* which induces a Th-1 response Protective against Fungal Infection in Balb/c mice. **Infection and Immunity**, 66 (2): 786-793, 1998.

VALLE, A. C. F.; COIMBRA JR, C. E. A.; LLENARES, F. I. B.; MONTEIRO, C. F.; GUIMARÃES, M. G. C. Paracoccidioidomicose entre o grupo indígena Suruí de Rondônia, Amazônia, Brasil. Registro de caso. **Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo**. 33 (5): 407-411, 1991.

VAN-BURIK, J. A.; MYERSON, D.; SCHRECKHISE, R. W.; BOWDEN, R. A. panfungal PCR Assay for Detection of Fungal Infection in Human Blood Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, 36 (5): 1169-1175, 1999.

VENANCIO, E. J.; KYAW, C. M.; MELLO, C. V.; SILVA, S. P.; SOARES, C. M. A.; FELIPE M.; SILVA-PEREIRA, I. Identification of differentially expressed transcripts in the human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by differential display. **Medical Mycology**, 40 (1): 45-51, 2002.

ANEXO

Este manuscrito foi submetido para a revista *Medical Mycology*

Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* by a Hemi-nested PCR Assay in a Single-Tube Based in a DNA Specific Sequence of Virulent Strains

Short Title: A new PCR assay for *Paracoccidioides brasiliensis* detection

J. CORREIA¹, C. M. BORBA² and N. LUCENA-SILVA^{1*}

¹*Virology and Experimental Therapy Laboratory, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Recife, Brazil and* ²*Departament of Mycology, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil.*

SUMMARY

We developed a two-step PCR assay that amplifies a region of the *ceja-1* sequence, specific for *Paracoccidioides brasiliensis* virulent strains. An internal region of the *ceja-1* sequence was chosen to design primers that were utilized in a hemi-nested PCR (HN-PCR) in a single tube. The HN-PCR was capable of amplifying DNA from six virulent strains. The PCR specificity was determined by the absence of amplified products with genomic DNA from *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Sporothrix schenckii*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Leishmania braziliensis*, *Trypanosoma cruzi*, *Schistosoma mansoni*, human genomic DNA (leukocytes) and four *P. brasiliensis* non-virulent strains. The fact that the PCR product was obtained only with genetic material from virulent isolates of *P. brasiliensis* suggested that this partial amplified sequence might be a marker of virulence for this fungus. The diagnostic potential of this PCR was confirmed by the successful amplification of this fragment with genomic DNA obtained in lymph node aspirate from a patient with paracoccidioidomycosis.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*, virulence, hemi-nested PCR

* Correspondence:

Dra. Norma Lucena-Silva

Laboratório de Virologia e Terapia Experimental, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

Rua Moraes Rego, S/N, Recife, PE, 50.670-420, Brazil

E-mail: nlucena@cpqam.fiocruz.br

Tel: +55-81-2101-2618; Fax: +55-81-2101-2618

INTRODUCTION

Paracoccidioides brasiliensis is the etiological agent of paracoccidioidomycosis, a systemic mycosis of acute or chronic evolution, which frequently affects the lungs but can subsequently disseminate to other organs or systems [1]. The paracoccidioidomycosis is one of the most prevalent human deep mycosis in Latin America. It is estimated that ten million individuals are infected with *P. brasiliensis* [2, 3].

P. brasiliensis is a dimorphic fungus that grows as a mold form (M) at $\pm 25^{\circ}\text{C}$ and as a yeast form (Y) in host tissues and *in vitro* at 37°C . The diagnosis of paracoccidioidomycosis is routinely made by visualization, isolation and identification of the fungus through microbiological and histopathological methods. The fungus is characterized in its parasitary life by the unique structural form of the multi budding yeast, however in most cases this can not be observed. Culture is necessary in all cases when the microscopic search for multi budding yeast is negative. However, since *P. brasiliensis* has a slow growth rate 20 to 30 days it is recommended even though it is time consuming to induce *in vitro* structural form conversion ($M \Leftrightarrow Y$) to confirm the diagnosis [1, 4].

The search of antibodies and/or specific antigens of *P. brasiliensis* have been largely studied, usually using mycosis diagnosis. Since, serological methods show impairment due to the sensitivity and specificity of the assay [5, 6, 7, 8].

In recent years, molecular methods based in PCR assays have been used for identification of *P. brasiliensis* [9, 10, 11, 12]. Primers for the gene encoding the gp43 specific-antigen of *P. brasiliensis* were used to detect the fungus in *P. brasiliensis*-infected mice samples and sputum samples from patients with paracoccidioidomycosis [9, 10]. The gp43 gene has been shown to be polymorphic, which may be considered when designing primers for diagnosis [13, 14]. The authors, studying *P. brasiliensis* strains stored under mineral oil for more than 40 years, discovered strains not capable of growth at 37°C [15]. These mutants impair the dimorphism process and are non-pathogenic to male BALB/c mice [16]. Recently, two new nucleotide sequences ceja-1 and ceja-2 (gene bank accession numbers: AY665294 and AY675239 respectively) present only in virulent *P. brasiliensis* strains, were obtained by RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) [C. M. Borba, unpublished results].

Compared with conventional single-step PCR, the amplification of DNA based in two-step HN-PCR (hemi-nested polymerase chain reaction) enhances specificity and sensitivity albeit with a risk of contamination due to the manipulation of the PCR products. The use of a single tube HN-PCR diminishes the possibility of contamination of the amplicons.

In order to obtain a sensitive, specific and rapid test for *P. brasiliensis* detection, we have developed a new molecular method of hemi-nested PCR in a single tube based on the amplification of the ceja-1 DNA sequence, specific to *P. brasiliensis* virulent strains.

MATERIALS AND METHODS

Fungal Strains. The following fungal strains were obtained from the Culture Collection (CCF-IOC) of the Department of Mycology, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil: *P. brasiliensis* virulent strains (Pb 18, Pb 339 and Pb IOC 3698) and non-virulent strains (Pb IOC 1059, Pb IOC 1124, Pb IOC 1208 and Pb IOC 1210) [16], *Blastomyces dermatitidis* (Bd IOC 1298-1), *Candida albicans* (Ca IOC 3780) and *Sporothrix schenckii* (Ss IOC 2855-2) strains. The Culture Collection Fungi URM of the Department of Mycology, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil supplied *Histoplasma capsulatum* (4547) and *Aspergillus fumigatus* (2603) strains. Finally, three *P. brasiliensis* strains (Fc/Te, Fs/Te and Ed/Te) recently isolated from patients with

paracoccidioidomycosis were kindly provided by Dr. Liliane Maria Soares Martins from the Natan Portella Institute for Tropical Diseases, Teresina, PI, Brazil. All these isolates were first identified by conventional mycological methods.

DNA samples of *Coccidioides immitis* (64-6776) and *Cryptococcus neoformans* (111) were provided by the Laboratory of Mycology of the Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas Clinical Research Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

In addition, DNA samples of *Mycobacterium tuberculosis* (TB2545), *Leishmania braziliensis* (LBB 2903), *Trypanosoma cruzi* (strain Y), *Schistosoma mansoni* (regional strain SLM) and human leukocytes were obtained in our laboratory at the Aggeu Magalhães Research Center FIOCRUZ, Recife, PE, Brazil.

DNA extraction. 250 ml Erlenmeyer flasks containing 100 ml medium were inoculated with fungi strains as shown in Table 1 and incubated in an orbital shaker (model HS 501 digital, IKA Labor Technik, Stanfen, Germany) at 120 oscillations/min. The biomass was separated from the culture supernatant by vacuum filtration using a sterile filter paper (Reagen), and held in a continuous vacuum until dry. The cellular mat was transferred into a clean tube and lyophilized overnight in a freeze dryer (model L4KR 156, Edwards, São Paulo, Brazil). A total of 50 mg of each dried mycelium was grounded in liquid nitrogen and suspended in 350 µl of extraction buffer (200 mM Tris-HCL pH 8.5; 250 mM NaCl, 25 mM EDTA and 0.5% SDS). RNase solution (0.1 µg/ml final concentration) was added and the tube incubated for 15 min at 37°C. Nucleic acids were then immediately extracted with 1 ml of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1), by brief vortex and centrifugation at 12,000 x g for 5 min (this step was repeated twice). The upper aqueous phase was removed and the DNA precipitated with absolute ethanol at 4°C overnight. After centrifugation at 12,000 x g for 20 min, the pellet was washed with 70% ethanol and suspended in 50 µl of sterile Milli-Q water. DNA was quantified in a spectrophotometer (Ultrospec® 3000, UV/visible Spectrophotometer, Amersham Pharmacia Biotech, New Jersey, USA).

DNA extraction from the clinical samples was obtained by placing an aliquot of 100 µl of lymph node aspirate obtained from the patient with disseminated paracoccidioidomycosis into a 1.5 ml tube containing 350 µl of extraction buffer and submitted to DNA extraction as described above.

Primer design. Oligonucleotide primers were designed based on the nucleotide sequence of ceja-1 from *P. brasiliensis* (GenBank accession no. AY665294). Alignments were made with the OLIGOS program (version 4.0). Table 2 show the primer sequences, their homologous positions on the ceja-1 sequence and the predicted sizes of the amplified products.

PCR. The reaction mix of the first PCR was performed with 25 ng of genomic DNA from the Pb IOC 3698 virulent strain in a 25 µl reaction volume consisting of PCR buffer (10 mM Tris-HCL, 50 mM KCl), 1.5 mM MgCl₂, 200 µM deoxynucleoside triphosphates, 25 pmol of the primers sense PBEXF-2 and anti-sense PBEXR-2 and 1 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, Sao Paulo, Brazil). The second PCR was identical, except that 25 pmol of the internal anti-sense primer PBINR-2 was used with the primer PBEXF-2. Moreover, the second reaction was performed using as template 1 µl of 1:100 dilution of the PCR product from the first reaction and to determine the limit of DNA detection of the one-step PCR, this PCR was also carried out with serially diluted genomic DNA from the Pb IOC 3698 virulent strain (25 ng to 2.5 fg). The amplification condition was 30 cycles of 30 sec at 94°C, 1 min at different annealing temperatures (48 to 70°C) and 1 min at 72°C, followed by a single terminal extension at 72°C for 7 min, performed in a Mastercycler gradient (Eppendorf, Germany).

HN-PCR. The HN-PCR reaction was performed in a 25 µl reaction volume, consisting of a PCR buffer (10 mM Tris-HCL, 50 mM KCl), 1.5 mM MgCl₂, 200 µM

deoxynucleoside triphosphates, 25 pmol of primer PBEXF-2, PBEXR-2 and PBINR-2, 1 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen) and 25 ng of genomic DNA of fungi or 5 μ l of clinical sample DNA. The amplification condition was 15 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at 52°C, 45 sec at 72°C, followed by 30 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at 64°C and 45 sec at 72°C, and a single terminal extension at 72°C for 7 min, performed in a Mastercycler gradient (Eppendorf, Germany). In order to determine the limit of DNA detection, a HN-PCR in a single tube was carried out with serially diluted genomic DNA from the Pb IOC 3698 virulent strain (25 ng to 2.5 fg). The universal primers ITS1 and ITS4, derived from highly conserved regions of the fungal rRNA gene, were used as an external PCR control in order to verify the accuracy of the test and to ensure that PCR inhibitors were absent [17].

Electrophoresis. Fifteen microliters of the amplified product was electrophoresed on a 1.5% agarose gel dissolved in Tris-acetate-EDTA buffer. The gel was stained with 0.5 μ g of ethidium bromide per ml and the fragment visualized under UV light.

RESULTS

Strategy for primer design. A hemi-nested PCR in a single tube requires three primers homologous to the genomic DNA of *P. brasiliensis*. Comparing the sequence of the primer PBEXR-2 that acts only in the first reaction, the primers PBEXF-2 and PBINR-2 have less homology with the *ceja-1* sequence and have a small non-homologous “tail” at their 5’ end. This strategy allows the improvement of the annealing temperature of the primer PBEXF-2 in the second reaction because the fragment produced in the first reaction includes the complete sequence of the primer. The 5’ end tail of the intern primer PBINR-2 also acts to improve the specificity and accuracy of the second PCR cycle (Figure 1).

Initially, the annealing temperatures of the first and second reaction were analyzed in separate by to allow the optimization of the annealing temperature for both reaction of the HN-PCR. Figure 2 shows that the first reaction amplifies a 404-bp product up to 56°C, while the second reaction produces a 174-bp fragment up to 62°C from genomic DNA template. Figure 3 shows the optimal annealing temperature of the second reaction performed using the PCR product from the first reaction (PCR with set of primers PBEXF-2 and PBEXR-2) as template. The 174-pb PCR product was amplified throughout the temperature gradient examined. The optimal annealing temperature to obtain the amplification exclusively from the PCR fragment produced in the first reaction of the HN-PCR was found to be 64°C since we have shown that this fragment can be produced directly from the genomic DNA up to the annealing temperature of 62°C. The product of the first HN-PCR reaction was also re-amplified at low efficiency up to 66°C. At the annealing temperature of 68°C there is an inversion on the efficiency of the fragments produced, because the second reaction of the HN-PCR is less efficient due to the melting temperature (T_m) of the primer PBINR. Thus, the PBEXF-2, which has its T_m improved by the addition of the non-homologous tail to its 5’ end turns more efficient the re-amplification of the 404-bp fragment produced in the first reaction of the HN-PCR.

HN-PCR in a single tube. The specificity of the primers was tested with the DNA of the virulent strains and non-virulent *P. brasiliensis*. The specificity was also tested with the DNA of others fungi and organisms. The specificity HN-PCR showed an amplification fragment of 174-pb for virulent strains of *P. brasiliensis*, moreover it was not possible to amplify this sequence from the genomic DNA of the non-virulent strains of *P. brasiliensis*. The specificity of this PCR was confirmed by the absence of amplified products with the genomic DNA of *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Sporothrix schenckii*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Leishmania braziliensis*, *Trypanosoma cruzi*, *Schistosoma*

mansoni and human genomic DNA (leukocytes). Genomic fungal DNA samples were submitted to PCR reaction using, as an external control, the universal primers ITS1 and ITS4 to detect a specific genetic element of fungi. Although the genomic DNA of *P. brasiliensis* non-virulent isolates were not amplified with the specific primers to *ceja-1* they are amplified with specific primers to fungal genetic elements (Figure 4). This suggests that the *ceja-1* gene can be a virulence factor of *P. brasiliensis*. The detection limits of the one-step PCR with primers PBEXF-2 and PBINR-2 as well as the limit of the HN-PCR assay in a single tube were evaluated by using 10-fold serial dilutions of genomic DNA extracted from a *P. brasiliensis* culture. The detection limit of *P. brasiliensis* target *ceja-1* with ethidium bromide staining by one-step PCR was 25 pg, whereas as little as 2.5 fg could be detected by the HN-PCR. The potential diagnosis of this HN-PCR in a single tube was confirmed by the successful amplification of the 174-bp fragment with genomic DNA obtained in the lymph node aspirate from a patient with paracoccidioidomycosis (Figure 5).

DISCUSSION

This work reports a molecular test using primers that selectively amplify DNA from virulent strains of *P. brasiliensis* albeit not from non-virulent strains. The primers were designed based on a RAPD genotyping of wild type and mutant strains of *P. brasiliensis* and thus, the amplified fragment might be a possible marker for virulence (patent pending PI0400742-5). The diagnosis of paracoccidioidomycosis has traditionally relied on the identification of *P. brasiliensis* from lesions found in infected patients, however the direct examination, in some cases, is not conclusive and the culture process is laborious. The molecular detection of fungi is proposed as an alternative tool for the diagnosis of the mycosis [18, 19, 20, 21, 22, 23]. Recently, PCR assays for the detection of *P. brasiliensis* in cultures of clinical and environmental isolates [11, 12] and in clinical samples [9, 10] have been developed. The *gp43* gene is by far the most studied gene of *P. brasiliensis*, and is a target for diagnosis. Gomes and coworkers showed a positive amplification of the *gp43* gene sequence using five different primers in 42 isolates [10]. PCR assay based on multi copy rRNA genes is also used to increase sensitivity. However, the conserved nature of the rRNA genes may cause nonspecific amplifications. Motoyama and coworkers reported the amplification of the ribosomal 5.8S region of *P. brasiliensis* with the set of primers OL5 and ITS1 and a cross-reaction with *H. capsulatum*. It was not clear why it was suggested to perform in parallel (instead of in substitution) another one-step PCR with primers OL3 and UNI-R, homologous to the ribosomal 28S region, to distinguish *P. brasiliensis* from *H. capsulatum* [12].

Molecular diagnosis of infectious diseases based on the detection of the pathogen genome by PCR has been used in combination with sequencing, hybridization or a second PCR [24, 25, 26, 27].

Nested PCR is defined as second PCR reaction performed with primers homologous to the internal region of an amplified PCR product used as a template. When the second PCR uses only one internal primer keeping the external to opposite strand the same from the first reaction, it is known as hemi-nested PCR (HN-PCR). The strategy of combining two successive PCRs has been widely studied for molecular diagnosis of viruses [28], fungi [9, 22, 29] and parasites [30]. Imai and coworkers [11] described a PCR using specific primers for the internal transcribed spacer (ITS) regions of *P. brasiliensis*. Although the reaction was 100% specific, it was suggested the use of nested PCR with the universal primers ITS1 and ITS4 for detection of the fungus in environmental samples.

Diagnosis methods using a combination of two PCR reactions have been shown to improve specificity and the limit of detection of the test. Gomes and coworkers have reported a nested PCR able to detect the 0.6-kb fragment of the *gp43* gene sequence in a 10 cells

seeded per ml of sputum from an unrelated patient. However, detection in clinical samples was instead performed using a single PCR with the internal primers of the nested PCR instead [10]. The sensitivity of both PCR strategies were said to be the same, but it was not clear if they had analyzed smaller cell concentrations. Another nested PCR test performed in two tubes was shown to amplify the 196-pb fragment within the *gp43* gene sequence in 21 out of 23 lung tissues from *P. brasiliensis* infected BALB/c mice. The detection limit was 0.5 fg of DNA using *gp43*-encoding plasmid DNA as a template [9]. Using a single PCR strategy we were able to detect 25 pg of *P. brasiliensis* genomic DNA in cell culture. Furthermore, the nested PCR increases 10^4 fold the limit of detection that represents 2.5 fg of DNA.

The annealing temperature of the primer-template complex is a crucial step and depends on the primer sequence, more specifically, its size and C + G contents. In a multiplex PCR, several sets of primers are used to perform DNA amplification in the same conditions. In a nested PCR, the fragment of interest has to be amplified from the PCR product of the first reaction, therefore the condition of both reactions have to be different to ensure that this fragment will not be amplified from the genomic DNA. This fact is more important when performing a nested PCR in a single tube. A nested PCR in separate tubes is feasible however it is easier to get cross contamination leading to false positive results.

We have shown the accuracy of a molecular test for *P. brasiliensis* detection based on a hemi-nested PCR in a single tube using the genomic DNA of laboratory strains. We also demonstrated the feasibility of using this protocol in specimens from patients with paracoccidioidomycosis.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the supplier of the fungi strains kindly provided for Culture Collection (CCF-IOC) of the Department of Mycology, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, Dr. Liline Maria Soares Martins from the Natan Portella Institute for Tropical Diseases, Teresina, PI, Brazil and the Culture Collection Fungi URM of the Department of Mycology, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil.

REFERENCES

1. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev* 1993; **6** (2): 89-117.
2. Blotta MH, Mamoni RL, Oliveira SJ, Nouer SA, Papaiordanou PM, Goveia A, Camargo ZP. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. *Am J Trop Med Hyg* 1999; **61** (3): 390-394.
3. Restrepo A, McEwen JG, Castañeda E. The Habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? *Medical Mycology* 2001; **39** (3): 233-241.
4. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. Tratado de Micologia Médica, 9th edn. São Paulo, SP: Sarvier Editora de Livros Médicos, 2002.
5. Freitas da Silva G, Roque-Barreira MC. Antigenemia in paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol* 1992; **30**: 381-385.
6. Gómez BL, Figueroa JI, Hamilton AJ, Ortiz B, Robledo MA, Hay RJ, Restrepo A. Use of monoclonal antibodies in diagnosis of paracoccidioidomycosis: new strategies for detection of circulating antigens. *J Clin Microbiol* 1997; **35**:3278-3283.
7. Neves AR, Mamoni RL, Rossi CL, Camargo ZP, Blotta MH. Negative immunodiffusion test results obtained with sera of paracoccidioidomycosis patients may be related to low-avidity immunoglobulin G2 antibodies directed against carbohydrate epitopes. *Clin Diag Lab Immunol* 2003; **10** (5): 802-807.

8. Ortiz BL, Díez S, Uran ME, Rivas JM, Romero M, Caicedo V, Restrepo A, McEwen JG. Use of the 27-kilodalton recombinant protein from *Paracoccidioides brasiliensis* in serodiagnosis of paracoccidioidomycosis. *Clin Diag Lab Immunol* 1998; **5** (6): 826-380.
9. Bialek R, Ibricevic A, Aepinus C, Najvar LK, Fothergill AW, Knobloch J, Graybill JR. Detection of *Paracoccidioides brasiliensis* in tissue samples by a nested PCR assay. *J Clin Microbiol* 2000; **38** (8): 2940-2942.
10. Gomes GM, Cisalpino PS, Taborda CP, Camargo ZP. PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol* 2000; **38** (9): 3478-3480.
11. Imai T, Sano A, Mikami Y, Watanabe K, Aoki FH, Branchini ML, Negroni R, Nishimura K, Miyaji M. A new PCR primer for the identification of *Paracoccidioides brasiliensis* based on rRNA sequences coding the internal transcribed spacers (ITS) and 5.8S regions. *Med Mycol* 2000; **38** (4): 323-326.
12. Motoyama AB, Venâncio EJ, Brandão GO, Petrofeza-Silva S, Pereira IS, Soares CM, Felipe MS. Molecular identification of *Paracoccidioides brasiliensis* by PCR amplification of ribosomal DNA. *J Clin Microbiol* 2000; **38** (8): 3106-3109.
13. Morais FV, Barros TF, Fukada MK, Cisalpino PS, Puccia R. Polymorphism in the gene coding for the immunodominant antigen gp43 from the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol* 2000; **38** (11): 3960-3966.
14. San-Blas G, Niño-Vega G, Iturriaga T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol* 2002; **40** (3): 225-242.
15. Mendes da Silva AM, Borba CM, Oliveira PC. Viability and morphological alterations of *Paracoccidioides brasiliensis* strains preserved under mineral oil for long periods of time. *Mycoses* 1994; **37** (5-6): 165-169.
16. Borba CM, Schaffer GMV. *Paracoccidioides brasiliensis*: virulence and an attempt to induce the dimorphic process with fetal calf serum. *Mycoses* 2002; **45**: 174-179.
17. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsk JJ, White TJ, eds. PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications. San Diego, CA: Academic Press, Inc, 1990: 315-322.
18. Abliz P, Fukushima K, Takizawa K, Nieda N, Miyaji M, Nishimura K. Rapid identification of the genus *Fonsecaea* by PCR with specific oligonucleotide primers. *J Clin Microbiol* 2003; **41** (2): 873-876.
19. Bracca A, Tosello ME, Girardine JE, Amigot SL, Gómez C, Serra E. Molecular detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* in human clinical samples. *J Clin Microbiol* 2003; **41** (4): 1753-1755.
20. Hu S, Chung W, Hung S, Ho H, Wang Z, Chen C, Lu S, Kuo T, Hong H. Detection of *Sporothrix schenckii* in clinical samples by a nested PCR assay. *J Clin Microbiol* 2003; **41** (4): 1414-1418.
21. Luo G, Mitchell G. Rapid identification of pathogenic fungi directly from cultures by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2002; **40** (8): 2860-2865.
22. Sklady H, Buchheidt D, Baust C, Kireg-Schneider F, Sifath W, Leib-Mosch C, Hehlmann R. Specific detection of *Aspergillus* species in blood and bronchoalveolar lavage samples of immunocompromised patients by two-step PCR. *J Clin Microbiol* 1999; **37** (12): 3865-3871.
23. Van-Burik JA, Myerson D, Schreckhise RW, Bowden RA. Panfungal PCR Assay for Detection of Fungal Infection in Human Blood Specimens. *J Clin Microbiol* 1999; **36** (5): 1169-1175.
24. Mikhailovich V, Lapa S, Gryadunov D, Sobolev A, Strizhkov B, Chernych N, Skotnikova O, Irtuganova O, Moroz A, Litvinov V, Vladimirskiy M, Perelman M, Chernousova L,

25. Erokhin V, Zasedatelev A, Mirzabekov A. Identification of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by hybridization, PCR, and ligase detection reaction on oligonucleotide microchips. *J. Clin Microbiol* 2001; **39** (7): 2531-2540.
26. García-Quintanilla A, Garcia L, Tudó G, Navarro M, González J, Anta MTJ. Single-tube balanced heminested PCR for detecting *Mycobacterium tuberculosis* in smear-Negatives samples. *J Clin Microbiol* 2002; **38** (3): 1166-1169.
27. Brown JM, Pham KN, McNeil MM, Lasker BA. Rapid identification of *Nocardia farcinica* clinical isolates by a PCR assay targeting a 314-base-pair species-specific DNA fragment. *J Clin Microbiol* 2004; **42** (8): 3655-60.
28. Santos C, Teixeira F, Vicente A, Astolfi-Filho S. Detection of *Chlamydia trachomatis* in endocervical smears of sexually active women in Manaus-AM, Brazil, by PCR. *Braz J Infect Dis* 2003; **7** (2): 91-95.
29. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; **30** (3): 545-551.
30. Nagai H, Yamakami Y, Hashimoto A, Tokimatsu I, Nasu M. PCR detection of DNA specific for *Trichosporon* species in serum of patients with disseminated trichosporonosis. *J Clin Microbiol* 1999; **37** (3): 694-699.
31. Rodrigues EH, Felinto de Brito ME, Mendonca MG, Werkhauser RP, Coutinho EM, Souza WV, Militao de Albuquerque M de F, Jardim ML, Abath FG. Evaluation of PCR for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity in northeastern Brazil. *J Clin Microbiol* 2002; **40** (10): 3572-3576.

TABLE 1. Culture conditions of the fungi isolates.

| Isolate | Broth | Incubate temperature (°C) | Period of incubation (days) |
|------------------------|-----------|---------------------------|-----------------------------|
| <i>P. brasiliensis</i> | PYG | 23 and 36 | 13-20 |
| <i>B. dermatitidis</i> | ME | 23 | 13 |
| <i>S. schenckii</i> | ME | 23 | 13 |
| <i>H. capsulatum</i> | Sabouraud | 23 | 13 |
| <i>C. albicans</i> | Sabouraud | 23 | 5 |
| <i>A. fumigatus</i> | Sabouraud | 23 | 5 |

PYG (bacto-peptone 5 g/l; yeast extract 5 g/l and glucose 20 g/l)

ME (malt extract 20g/l; peptone 1g/l and glucose 20 g/l)

Sabouraud (peptone 10g/l and glucose 20 g/l)

TABLE 2. Primer sequences

| Name | DNA sequence (5'-3') | Location | Amplicon size (pb) |
|---------|--------------------------|----------|--------------------|
| PBEXF-2 | AGGCATGCGGGTCCCCAAAAGG | 124-139 | |
| PBEXR-2 | AAGATTGCTCTCCTGGACG | 510-528 | 413 |
| PBINR-2 | GCGTGTAGATCTAAGTCAAACGGT | 281-298 | 172 |

FIGURE 1.

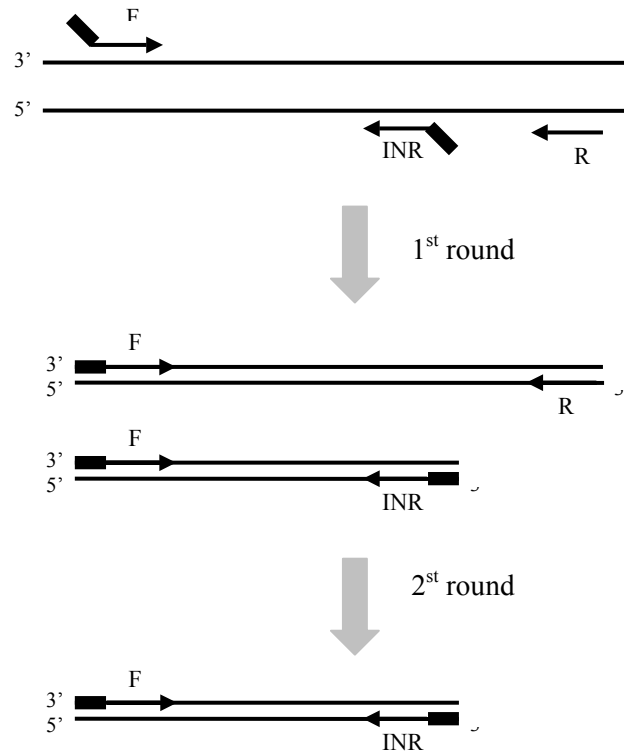


FIG 1. Diagram of the HN-PCR amplification scheme. Primer F (PBEXF-2) hybridizes to the 3'-5' strand. Primer R (PBEXR-2) and INR (PBINR-2) hybridize to the 5'-3' strand. During the first round of HN, outer and inner primers anneal. During the second round, the annealing temperature is higher than in the first round, and the outer primer "F" hybridizes with more efficiency. The outer primer "R" can not hybridize due to its low T_m .

FIGURE 2.

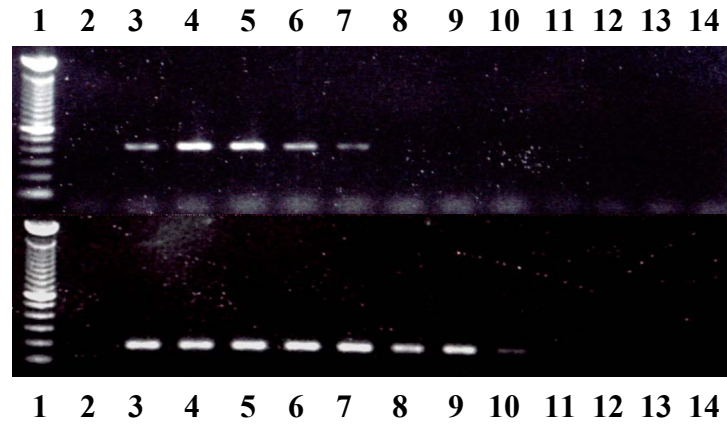


FIG 2. Annealing temperature optimization of the first and second round of HN-PCR. PCR with outer primers (Higher gel) and with outer and inner primers (Inferior gel). Lanes: 1, 100 pb Ladder; 2, Negative control; Lanes 3 to 14, 48°C, 50°C, 52°C, 54°C, 56°C, 58°C, 60°C, 62°C, 64°C, 66°C, 68°C and 70°C. The first reaction amplifies a 404-bp product up to 56°C, while the second reaction produces a 174-bp fragment up to 62°C from genomic DNA template.

FIGURE 3.

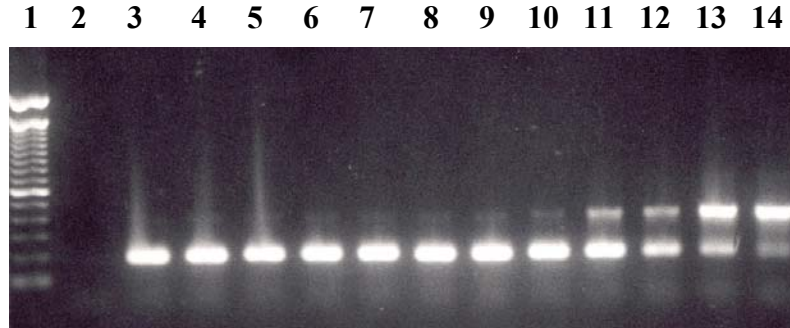


FIG 3. Annealing temperature optimization of the second round PCR with primers PBEXF-2 and PBINR-2 from the PCR product of the first round. Lanes: 1, 100 pb Ladder; 2, Negative control; Lanes 3 to 14, 48°C, 50°C, 52°C, 54°C, 56°C, 58°C, 60°C, 62°C, 64°C, 66°C, 68°C and 70°C. The 174-pb PCR product was amplified in all temperatures.

FIGURE 4.

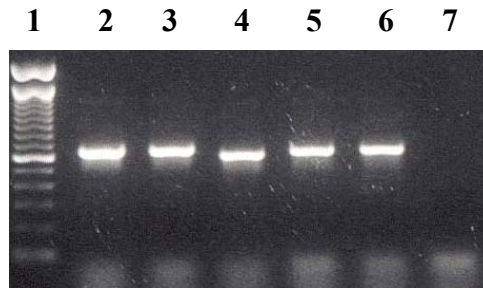


FIG 4. PCR with universal primers ITS1 and ITS4 specific for fungi in the presence of virulent and non-virulent isolates of *P. brasiliensis* genomic DNA. Lanes: 1, 100 bp Ladder; 2, Pb 339 (virulent); 3, Pb IOC 3698 (virulent), Lanes 4 to 6 (non-virulent): 4, Pb IOC 1059; 5, Pb IOC 1124; 6, Pb IOC 1208 and 7, Negative control. The genomic DNA of *P. brasiliensis* virulent and non-virulent isolates was amplified with specific primers for fungus genetic elements.

FIGURE 5.



FIG 5. HN-PCR in a single tube for paracoccidioidomycosis molecular diagnosis. Lanes: 1, 100 bp Ladder; 2, Negative control; 3, Positive control and 4, Clinical sample. An aliquot of 5 μ l of lymph node aspirate DNA from a patient with paracoccidioidomycosis confirmed by direct examination and cell was utilized in a HN-PCR reaction with primers PBEXF-2, PBEXR-2 and PBINR-2 using respectively 52°C and 64°C as the annealing temperatures in the first and second round respectively.