

Detecção molecular de *Paracoccidioides brasiliensis* por PCR

Molecular detection of *Paracoccidioides brasiliensis* by PCR

Denise Honda Kitamura¹, Andrea Cristine Koishb², Emerson José Venancio³

Resumo

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica causada pelo fungo termo-dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*. O fungo é encontrado na forma de micélio à temperatura ambiente e na forma de levedura em fluidos e tecidos biológicos. O diagnóstico laboratorial da PCM apresenta limitações como a dificuldade de cultivo, a semelhança de *P. brasiliensis* com outros fungos patogênicos e a dependência da resposta imune do hospedeiro. Neste trabalho uma reação em cadeia da polimerase (PCR) foi desenvolvida para a detecção molecular do fungo *P. brasiliensis* utilizando oligonucleotídeos específicos baseados no fragmento de DNA ESTM-Y6 descrito por Evangelista (2005). Nas condições ideais, uma sensibilidade de 2,5 pg para *P. brasiliensis* foi observada e nenhuma reação cruzada com DNA de outros organismos foi detectada. Esse teste de PCR pode ser útil para diagnóstico e estudos epidemiológicos da PCM.

Palavras-chave: Paracoccidioidomicose, *Paracoccidioides brasiliensis*, ESTM-Y6, PCR.

Abstract

Paracoccidioidomycosis (PCM) is a systemic mycosis caused by the thermomorphous fungus *Paracoccidioides brasiliensis* that is found as mycelium at room temperature and as yeast-like cell in the fluid and biologic tissues.

¹ Graduanda do Curso de Farmácia – Bolsista CNPq de Iniciação Científica – Universidade Estadual de Londrina. E-mail: de_kitamura@yahoo.com.br

² Mestranda do Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental – Universidade Estadual de Londrina. E-mail: dea_koishi@yahoo.com.br

³ Docente do Departamento de Ciências Patológicas – CCB – Universidade Estadual de Londrina. E-mail: emersonj@uel.br

The diagnosis of PCM has limitations as difficulty of culture and similarity of *P. brasiliensis* with others fungi. In this work, a polymerase chain reaction (PCR) was standardized for molecular detection of the fungus *P. brasiliensis* with specific primers designed on ESTM-Y6 fragment described by Evangelista (2005). A sensibility of 2,5 pg of DNA from *P. brasiliensis* was observed and no cross-reaction with DNA from other organisms was detected. This PCR assay could be useful for diagnosis and epidemiological studies of PCM.

Key words: Paracoccidioidomicose, *Paracoccidioides brasiliensis*, ESTM-Y6, PCR.

INTRODUÇÃO

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica causada pelo fungo termo-dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*. A PCM é uma das mais importantes micoses sistêmicas na América Latina ⁽¹⁾. No Brasil ela é freqüente nas regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste e as maiores taxas de mortalidade são registradas nos estados de São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro ⁽²⁾.

O diagnóstico da PCM baseia-se nos sintomas clínicos e em testes laboratoriais como a identificação direta por microscopia óptica, cultivo *in vitro*, exames histopatológicos ou testes sorológicos. A identificação direta e o cultivo *in vitro* apresentam limitações como a dependência da experiência e habilidade dos técnicos do laboratório em identificar o fungo e o grande tempo necessário para que o fungo cresça *in vitro* ⁽³⁾. Por outro lado, o exame histopatológico é frequentemente usado para o diagnóstico da PCM, entretanto, ele apresenta algumas limitações como a não observação do agente etiológico devido ao pequeno tamanho da amostra analisada, e a possibilidade do fungo ser confundido com outros fungos dimórficos como *Histoplasma capsulatum* ou *Coccidioides immitis* ⁽⁴⁾.

Para os casos em que o fungo *P. brasiliensis* não é observado na identificação direta ou no exame histopatológico, testes imunoenzimáticos têm sido desenvolvidos. Dentre os teste imunoenzimáticos, o *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) é muito utilizado em especial para a detecção e a quantificação de anticorpos anti-gp-43, o principal antígeno de *P. brasiliensis*. A reação de ELISA tem uma alta sensibilidade, porém, essa sensibilidade não é necessariamente acompanhada de uma alta especificidade. Além disso, esta reação pode ser influenciada por outros fatores, como as características individuais de cada amostra de soro, dos níveis de produção de antígenos do isolado do fungo que causou a doença, e da resposta imune do paciente ⁽⁵⁾.

Métodos novos e rápidos vêm sendo desenvolvidos para o diagnóstico de fungos. Estes incluem a tecnologia de sondas DNA/RNA e a reação em cadeia da polimerase (PCR). Em contraste com métodos convencionais, a PCR é uma reação rápida, muito específica e pode ser usada para detectar quantidades muito pequenas de DNA. Além disso, a PCR pode ser realizada como rotina e não exige um alto nível de perícia para a interpretação dos resultados ⁽⁵⁾.

Para auxiliar no diagnóstico da PCM e nos estudos sobre a ecologia de *P. brasiliensis* diversas técnicas moleculares têm sido desenvolvidas. Os métodos moleculares podem ser agrupados em duas categorias: as reações de hibridação e as reações de polimerização. Nas primeiras são usadas sondas específicas para evidenciar a presença do DNA do fungo (6). Enquanto, nas reações de polimerização há amplificação de um região específica do DNA do fungo usando oligonucleotídeos iniciadores (oligos) ^(7, 8, 9, 10, 11).

Apesar da existência de vários trabalhos relacionados à detecção molecular do fungo por PCR, ainda é necessária uma técnica de PCR específica para *P. brasiliensis* e capaz de

auxiliar no diagnóstico da PCM. O presente trabalho apresenta a padronização de uma PCR para a detecção do fungo *P. brasiliensis* usando oligonucleotídeos iniciadores específicos para fragmento MY6, identificado inicialmente pela técnica *Differential Display Reverse Transcriptase-PCR* ⁽¹²⁾.

MATERIAIS E MÉTODOS

Desenho de oligonucleotídeos iniciadores específicos para o fungo P. brasiliensis

Para o desenho de oligonucleotídeos iniciadores para *P. brasiliensis* foi selecionado o fragmento de DNA ESTM-Y6 (nº de acesso EY254601 , 12), cuja sequência foi analisada pelo programa computacional Oligo Analyzer 1.1.2. Os oligonucleotídeos foram sintetizados por Invitrogen Life Technologies, USA.

Amostras de fungos

Como DNA molde foram utilizadas amostras de DNA de *P. brasiliensis* (cepas LDR 1 e Pb18), *Sporotrix schenckii*, *H. capsulatum*, *Candida albicans* (cepa CR15), humano e de camundongo. As duas cepas de *P. brasiliensis* foram mantidas em meio ágar Sabouraud dextrose a 37°C. Os demais fungos foram cultivados em meio ágar Sabouraud dextrose a 22°C.

Extração de DNA

A extração de DNA total dos fungos foi feita pelo método de maceração em nitrogênio líquido e tratamento com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico, seguido de precipitação do DNA com acetato de sódio e etanol absoluto gelado, como descrito anteriormente ⁽¹³⁾. O DNA de humano e de camundongo foram extraídos a partir de amostras de

sangue com o sistema de purificação de DNA GFX Genomic blood DNA purification, seguindo as orientações do fabricante. (Amersham Biosciences, USA).

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As reações foram feitas em um volume final de 25 μ L, contendo 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), tampão de reação 1x (20mM Tris-HCL, pH 8,4, 50mM KCl), 0,25 mM de cada dNTP, 2,5 mM de Mg²⁺ e 0,2 μ M de cada oligo. O programa utilizado foi denaturação inicial a 95°C por 2 min; seguida de 35 ciclos de denaturação a 95°C por 30 seg, anelamento dos oligonucleotídeos a 60°C por 30 seg, extensão a 72°C por 1 min; e extensão final a 72°C por 5 min.

Determinação da Especificidade da PCR

Para investigar a especificidade desta reação para o fungo *P. brasiliensis*, os oligonucleotídeos MY6F e MY6R foram testados na presença de DNA genômico dos fungos *S. schenckii*, *H. capsulatum* e *C. albicans*, além de DNA humano e de camundongo.

Determinação da Sensibilidade da PCR

Para determinar o limite mínimo de detecção pela PCR, foram realizadas reações utilizando DNA de *P. brasiliensis* LDR 1 nas seguintes concentrações 2,5 ng, 0,25 ng, 25 pg, 2,5 pg, 0,25 pg, 25 fg, 2,5 fg e 0,25 fg.

Detecção dos produtos da PCR

Os produtos das reações de PCR foram analisados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo 0,5 μ g/ml por 15 minutos. Para análise da sensibilidade da reação, além da detecção em gel de agarose, os produtos da reação de PCR foram analisados em gel de poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata.

RESULTADOS

Desenho de oligonucleotídeos iniciadores específicos para P.brasiliensis

Baseado na seqüência do fragmento ESTM-Y6, os oligonucleotídeos MY6F (sense) e MY6R (anti-sense) foram sintetizados e estão mostrados na Figura 1. O produto de amplificação gerado pelos oligonucleotídeos MY6F/MY6R é de 388pb. O oligonucleotídeo MY6F (5'-CTTTGACGAGTGACAATGATACC-3') tem 23pb, 43,5% de conteúdo de CG e TA de 60,99; já o oligonucleotídeo MY6R (5'-GAGTCAAATTCTGCTGGGTAG-3') tem 21pb, 47,6% de conteúdo de CG e TA de 60,61.

MY6F

```
1  CATAATTAACTCTTTGACGAGTGACAATGATACCCATATATAGCCAAAGGAAAAGAAAAAACTGAGAAAATT
71  GTTTCCCAAATGACATCAAGATTTACAGTTGGCTATAAAATGAGCAGTGGCTTCTGTGTGCTCTTTCAA
141 TTTGCAATTATCTTAAATATCCGAAAATAACATAAAACGATTTCCACGAACGGCAATTTTGGGGGTTGGGT
211 ACCGTTTATGGCTTATTCCTTTTAAATGCCAGGGGCCAAAGTAAAAATTGACATCGGATTTTATATATC
281 ATTATTATTATTACAATGCAAAAATTAOGCAGGTAATTAGCTATCCACCCTGGTACGTTGTGAGATTTGC
351 ATCTGAAGTTATCCTGTATATGGAGAACTACCAGCAGAATTGACTCTTATCTCTCTCC
```

MY6R

Figura 1. Sequência do fragmento de DDRT-PCR ESTM-Y6 (EY254601) selecionada para o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores. Os oligonucleotídeos MY6F e MY6R estão destacados em negrito.

Especificidade da reação de PCR

A especificidade da reação de PCR foi determinada usando como molde DNA genômico dos fungos *S. schenckii*, *H. capsulatum* e *C. albicans*, além de DNA humano e de camundongo. A Figura 2 mostra a amplificação de um fragmento de 388 pb a partir do DNA genômico de duas cepas de *P. brasiliensis*. Nenhum fragmento foi produzido utilizando DNA genômico de outros fungos.

Sensibilidade da reação de PCR

O limite mínimo de detecção da PCR foi determinado com DNA genômico de *P. brasiliensis* LDR1 com concentrações variando de 2,5 ng a 0,25 fg. A sensibilidade do método foi de 25 pg quando o produto da PCR foi detectado em gel de agarose 1% (Figura 3). Em gel de poliacrilamida a 8% a sensibilidade foi para 2,5 pg como mostrado na Figura 4.

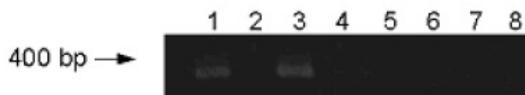


Figura 2. Especificidade da PCR para DNA de *P. brasiliensis* em gel de agarose 1% corado brometo de etídeo 0,5 mg/ml. 1. Controle positivo (DNA de *P. brasiliensis* LDR1); 2. Controle negativo (sem DNA); 3. DNA de *P. brasiliensis* Pb 18; 4. DNA de *H. capsulatum*; 5. DNA de *S. schenckii*; 6. DNA de *C. albicans* CR15; 7. DNA humano; 8. DNA de camundongo.

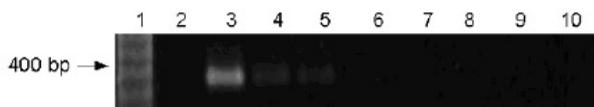


Figura 3. Sensibilidade da PCR para DNA de *P. brasiliensis* em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo 0,5 mg/ml. 1. Marcador molecular 100-pb; 2. Controle negativo (sem DNA); 3, 2,5 ng; 4, 0,25 ng; 5, 25 pg; 6, 2,5 pg; 7, 0,25 pg; 8, 25 fg; 9, 2,5 fg; 10, 0,25 fg .

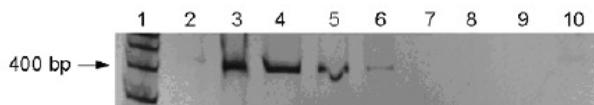


Figura 4. Sensibilidade da PCR para DNA de *P. brasiliensis* em gel de poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata. 1. Marcador molecular 100-pb; 2. Controle negativo (sem DNA); 3, 2,5 ng; 4, 0,25 ng; 5, 25 pg; 6, 2,5 pg; 7, 0,25 pg; 8, 25 fg; 9, 2,5 fg; 10, 0,25 fg .

DISCUSSÃO

O diagnóstico microbiológico tem sofrido profundas mudanças devido ao aparecimento dos métodos moleculares para a detecção e caracterização de microrganismos. Dentre os métodos moleculares, e a técnica de PCR tem se destacado ⁽¹⁴⁾. Estudos sobre a detecção molecular de *P. brasiliensis* por PCR já foram descritos em amostras clínicas de escarro ⁽¹⁵⁾, fluido cérebro espinhal ⁽¹¹⁾ e também para detecção do fungo em tecidos de animais experimentalmente infectados ^(7, 16). Porém, até o momento nenhuma das técnicas descritas tem sido utilizada rotineiramente para a detecção do fungo.

O método de PCR descrito neste trabalho mostrou-se eficiente na detecção de *P. brasiliensis*, não gerando produtos de amplificação quando na presença de DNA de outros fungos patogênicos, inclusive de *H. capsulatum*. A reação cruzada entre *P. brasiliensis* e *H. capsulatum* é freqüentemente observada em testes sorológicos ⁽⁵⁾ e mesmo em testes moleculares, como pode ser observado em um estudo sobre o desenvolvimento de uma reação de *semi-nested* PCR utilizando o oligonucleotídeo iniciador OL5. A reação de *semi-nested* PCR com o oligonucleotídeo OL5, em conjunto com o oligonucleotídeo ITS1, gerou um produto de amplificação de 496 pb com DNA de *P. brasiliensis* e um produto de 500 pb com DNA de *H. capsulatum*. Por outro lado, nenhum produto de amplificação foi produzido com DNA dos fungos *Aspergillus fumigatus*, *C. albicans*, *C. immitis* e *Saccharomyces cerevisiae* ⁽¹⁰⁾.

Nesse estudo a sensibilidade da reação foi de 25 pg em gel de agarose a 2% e 2,5 pg em gel de poliacrilamida. O limite de sensibilidade da reação está próximo ao obtido por outros estudos que utilizaram a PCR para detectar a presença do DNA de *P. brasiliensis* e que obtiveram um limite de detecção de até 10 pg de DNA do fungo em gel de agarose ^(7, 11).

Por outro lado, a sensibilidade da técnica descrita nesse trabalho foi inferior a obtida em outros estudos onde foram utilizadas as técnicas de *nested* PCR ou *semi-nested* PCR para a detecção de DNA de fungos. De um modo geral, as reações de *nested* PCR e *semi-nested* PCR têm um limite de detecção entre 40 a 2,5 fg ^(13, 17). A *nested* e a *semi-nested* PCR são variações da técnica PCR que se caracterizam pela realização de duas reações de PCR consecutivas, sendo a primeira com um par de oligonucleotídeos externos enquanto que a segunda com oligonucleotídeos internos. O fragmento maior produzido na primeira reação é utilizado como molde para a segunda, e o resultado pode ser 1000 vezes mais sensível que a PCR padrão ⁽¹⁸⁾.

Nesse trabalho foi desenvolvida uma PCR para a detecção do fungo *P. brasiliensis* com os oligonucleotídeos MY6F e MY6R que foram construídos a partir da sequência do fragmento de DDRT-PCR MY6. A reação desenvolvida foi eficiente para a detecção do DNA do fungo *P. brasiliensis* e pode ser utilizada para a detecção de *P. brasiliensis* em material biológico.

AGRADECIMENTOS

Ao programa de iniciação científica (PROIC) da Universidade Estadual de Londrina na modalidade PIBIC/CNPq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Almeida OP, Jacks Jr, Scully C. Paracoccidioidomycosis of the mouth: an emerging deep mycosis. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.*, 14: 377-383, 2003.

2. Coutinho ZF, Silva D, Lazéra M, Petri V, Oliveira RM, Sabroza PC, Wanke B. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad. Saúde Pública*, 18: 1441-1454, 2002.
3. Atkins SD, Clark IM. Fungal molecular diagnostics: a mini review. *J. Appl. Genet.*, 45: 3-15, 2004.
4. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin. Microbiol. Rev.*, 6: 89-117, 1993.
5. Albuquerque CF, Marques da Silva SH, Camargo ZP. Improvement of the specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *J. Clin. Microbiol.*, 43: 1944-1946, 2005.
6. Sandhu GS, Aleff RA, Kline BC, Lacaz CS. Molecular detection and identification of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Clin. Microbiol.*, 35: 1894-1896, 1997.
7. Goldani LZ, Sugar AM. Short report: Use of the polymerase chain reaction to detect *Paracoccidioides brasiliensis* in murine paracoccidioidomycosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 58: 152-153, 1998.
8. Diez S, Garcia EA, Pino PA, Botero S, Corredor GG, Peralta LA, Castano JH, Restrepo A, Mcewen JG. PCR with *Paracoccidioides brasiliensis* specific primers: potential use in ecological studies. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.*, 41: 351-358, 1999.
9. Silva-Vergara ML, Martinez R. Role of the armadillo *Dasybus novemcintus* in the epidemiology of paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*, 144: 131-133, 1999.
10. Motoyama AB, Venancio EJ, Brandao O, Petrofeza-Silva S, Pereira IS, Soares CM, Felipe MS. Molecular identification of *Paracoccidioides brasiliensis* by PCR amplification of ribosomal DNA. *J. Clin. Microbiol.*, 38: 3106-3109, 2000.
11. San-Blas G, Nino-Veja G, Barreto I, Hebelbarbosa F, Bagagli E, Olivero de Briceno R, Mendes RP. Primers for clinical detection of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Clin. Microbiol.*, 43: 4255-4257, 2005.
12. Evangelista AF. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Estadual de Londrina, 2005.

13. Koishi AC. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Estadual de Londrina, 2006.
14. Speers DJ. Clinical applications of molecular biology for infectious diseases. *Clin Biochem Rev*, 27:9-51, 2006.
15. Gomes GM, Cisalpino PS, Taborda CP, Camargo ZP. PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *J. Clin. Microbiol.*, 38: 3478-3480, 2000.
16. Itano EN, Uno J, Sano A, Yarita K, Kamei K, Miyaji M, Nishimura K, Mikami Y. Detection of the gp43 gene and (1 β 3) - β - D-glucan of *Paracoccidioides brasiliensis* in the blood of experimentally infected mice. *J. Med. Mycol.*, 43: 29-35, 2002.
17. Hu S, Chung WH, Hung SI, Ho HC, Wang ZW, Chen CH, Lu SC, Kuo TT, Hong HS. Detection of *Sporothrix schenckii* in clinical samples by a Nested PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, 41: 1414-1418, 2003.
18. McPherson MJ, Quirke P, Taylor GR. PCR a practical approach. New York: Oxford University, 1994.