

# 6

## **O USO DE PCR NA DIAGNOSE E CARACTERIZAÇÃO DE MICROORGANISMOS**

**PATRÍCIA MESSEMBERG GUIMARÃES  
MARIA DE FÁTIMA GROSSI DE SÁ**

## 1. INTRODUÇÃO

Há milhões de anos as doenças infecciosas vêm atacando populações animais e vegetais, causando enormes desequilíbrios ambientais. O uso de métodos rápidos e eficientes na detecção de patógenos são ferramentas cruciais no controle e/ou erradicação de doenças causadas por vírus, bactérias e fungos.

Entretanto, o correto diagnóstico de doenças não é uma tarefa fácil, e na maioria dos casos, a detecção de patógenos só é possível através de métodos indiretos. Os métodos diagnósticos convencionais incluem: detecção indireta através de soroprecipitação, avaliação macroscópica de tecidos danificados e/ou síndromes e observação direta do patógeno, através do uso de meio seletivo ou hospedeiro diferencial. Esses métodos, embora de enorme valor, podem apresentar grandes limitações devido à dificuldade intrínseca na detecção precoce da infecção, o que é crítico, uma vez que uma infecção pode espalhar-se rapidamente no tempo e no espaço. Portanto, estratégias de controle eficientes devem incluir a detecção de microrganismos nos estágios iniciais da infecção, os quais freqüentemente não produzem sintomas e encontram-se em baixas concentrações, tornando a sua observação e isolamento difíceis. Desta forma, as dificuldades na obtenção de um diagnóstico precoce prejudicam o controle e a erradicação das doenças, pois impossibilitam a eliminação de novas infecções. Considerando portanto, as graves limitações das técnicas de diagnose mais comumente usadas, podemos assumir que, em muitos casos, várias doenças permanecem indetectáveis, causando subestimação do problema e, ainda mais importante, permanecendo como fonte de infecção para outros organismos.

Técnicas modernas de detecção de microrganismos, principalmente aquelas envolvendo a tecnologia de DNA, têm-se apresentado muito mais específicas, sensíveis e extremamente rápidas. Atualmente, essas técnicas têm sido usadas sozinhas ou em combinação com outras, proporcionando grande utilidade na diagnose de doenças através da detecção direta do agente causal.

Os métodos que utilizam ácidos nucleicos na detecção de microrganismos são geralmente mais específicos do que os que utilizam anticorpos, já que evitam reações cruzadas, tão comuns quando da utilização de técnicas imunológicas. Diferente das reações sorológicas, as técnicas baseadas em biologia molecular permitem a detecção direta do patógeno. São particularmente úteis em casos onde os patógenos não são fáceis de isolar ou não apresentam superfícies antigênicas, tais como, os fitoplasmas e os viróides. Em adição, estas técnicas permitem não somente a detecção rápida e precisa do patógeno, como também a quantificação do mesmo.

As técnicas moleculares e, em particular, a reação de polimerização em cadeia (PCR) vem causando enorme impacto na Ciência, sendo um dos métodos de maior aplicação nas diferentes áreas da medicina e da agricultura. Esta reação possibilita a amplificação exponencial de DNA a partir de quantidades mínimas do material alvo. Através desta técnica, seqüências de ácidos nucleicos podem ser facilmente clonadas,

analisadas ou modificadas, e mesmo seqüências raras podem ser detectadas. Desde seu desenvolvimento por Mullis & Faloona (1987), a sua especificidade, sensibilidade e rapidez possibilitaram o desenvolvimento de métodos aplicáveis em diversas áreas da pesquisa biológica envolvendo inúmeras classes de organismos.

Uma das utilizações mais importantes da técnica de PCR é na detecção de material genético patogênico, como no caso de infecção bacteriana ou viral. Testes convencionais, que envolvem a cultura de microrganismos ou o uso de anticorpos, podem levar semanas para sua detecção ou serem extremamente laboriosos. Ao contrário, a técnica de PCR é bastante flexível e de fácil execução em amostras de diferentes origens. Tem sido utilizada com sucesso em pesquisas e no diagnóstico de doenças infecciosas causadas por diferentes agentes patogênicos, tais como, bactérias, vírus, fungos, fitoplasmas, nematóides, protozoários, ovos ou larvas de insetos, entre outros.

## 2. PRINCÍPIOS DE PCR

A reação de polimerização em cadeia possibilita a multiplicação *in vitro* de fragmentos específicos de DNA (Mullis & Faloona, 1987). O método requer um molde de DNA que contenha a região "alvo" a ser amplificada, dois oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) que flanqueiam a região "alvo", e o uso de uma polimerase termoestável, como por exemplo a *Taq* polimerase, isolada de *Thermus aquaticus* (Saiki *et al.*, 1988). Todos os componentes do PCR são misturados simultaneamente e o procedimento consiste de uma sucessão de três etapas, as quais são determinadas por diferentes temperaturas: a desnaturação do DNA molde, o anelamento dos *primers* e a extensão do DNA (Figura 1). No primeiro passo, a incubação da solução de PCR a altas temperaturas (90-95°C) permite a desnaturação do DNA molde (fita dupla) em duas fitas simples. O resfriamento da solução para uma temperatura de anelamento (tipicamente 55°C), possibilita que os *primers* se anelem na posição 5' de cada fita simples do DNA molde. Para a etapa de extensão, a temperatura é elevada para 72°C e os pontos de anelamento dos *primers* servem como pontos iniciadores da síntese das novas fitas de DNA. O tempo de incubação de cada etapa é de cerca de 1 a 2 minutos. A seqüência das três etapas constitui um ciclo de reação de PCR. No segundo ciclo, as fitas de DNA recém-sintetizadas são separadas das fitas originais através de desnaturação, e cada fita serve novamente como molde nas etapas de anelamento e extensão. Teoricamente, como a seqüência demarcada pelos *primers* duplica a cada ciclo, após 30 ciclos, um fator teórico de um bilhão pode ser alcançado (Figura 1). Tipicamente, o PCR é efetuado por 30-40 ciclos. Como todos os componentes estão presentes na mistura desde o início da reação, o procedimento pode ser automatizado e conduzido em um termociclador automático, programado para aquecer e resfriar as amostras por períodos específicos.

## 3. OS COMPONENTES E AS CONDIÇÕES DA REAÇÃO DE PCR

Devido à habilidade da reação de PCR em amplificar DNA a partir de um pequeno número de moléculas, a contaminação de qualquer componente da mistura com um DNA exógeno pode levar à amplificação simultânea de mais de uma espécie

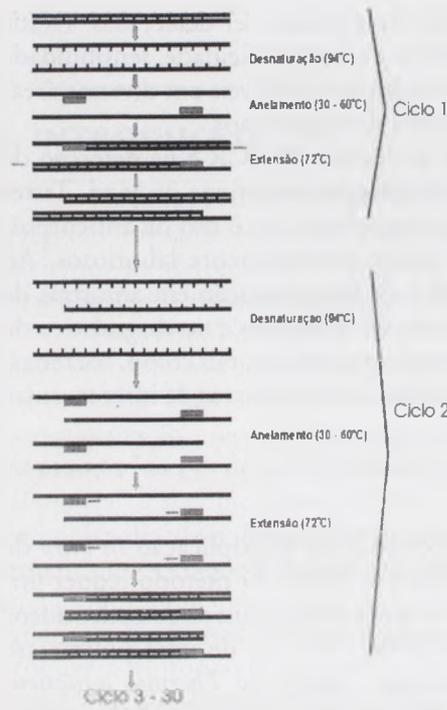


FIGURA 1. Reação de polimerização em cadeia (PCR).

de DNA. Além disso, a presença do produto de PCR e de *primers* de ampliações anteriores também podem servir como fontes de contaminação. Portanto, visando à detecção de contaminação na reação, é sempre importante a inclusão de um controle negativo em cada experimento realizado. Este controle deve conter os mesmos reagentes utilizados nas demais amostras, com exceção do DNA molde. Além deste controle, todo experimento também deve conter um controle positivo, que irá detectar a ocorrência de falso-negativos em função de problemas com o termociclador, algum reagente ou a DNA polimerase. Algumas providências sempre devem ser tomadas para minimizar problemas de contaminação, tais como: alíquotar os reagentes em pequenas quantidades, designar micropipetadores e áreas do laboratório específicos para condução da reação de PCR, sempre usar luvas descartáveis, tubos e ponteiros estéreis e preparar as amostras em câmara de fluxo laminar com luz ultravioleta.

Em uma reação de PCR, o DNA molde, os *primers*, a DNA polimerase e os deoxiribonucleotídeos trifosfatos (dNTPs) são misturados simultaneamente em tampão apropriado contendo íons magnésio ( $MgCl_2$ ). O volume da reação geralmente varia de 25µl a 100µl, e as concentrações mais comuns para cada componente estão descritas na Tabela 1. Estas condições possibilitam a amplificação da maioria das amostras, mas podem ser otimizadas para cada novo experimento de PCR. Da mesma forma, a temperatura de cada etapa, assim como a duração de cada ciclo e o número de ciclos devem ser otimizados. Em geral, a variação da temperatura de anelamento determina a especificidade da reação, com temperaturas mais altas elevando a especificidade *primer*/DNA molde.

Os *primers* contêm em geral de 10 a 20 pares de bases e são complementares as seqüências que flanqueiam a região alvo a ser amplificada. A eficiência e a especificidade da amplificação devem ser levadas em consideração quando do seu desenho. Além disso, é importante não haver complementaridade entre as extremidades 3' dos *primers* para evitar a formação de dímeros que diminuiriam a produção final da seqüência alvo. Algumas variações de protocolos incluem a inclusão de um componente da reação somente após o primeiro ciclo (*hot-start*), o decréscimo na temperatura de anelamento a cada ciclo (*touchdown*), ou mesmo a utilização de polimerases de alta fidelidade (com atividade exonuclease 3'-5'), visando ao aumento da produção ou da especificidade das seqüências amplificadas (Edel, 1998).

TABELA 1. Componentes da reação de PCR.

Componente	Concentração
DNA molde	10-100 ng
Tampão(KCl(500mM),Tris-HCl(100mM), MgCl <sub>2</sub> (15 mM),Triton X-100(0,01 g/mL))	1/10 do vol. da reação (tampão10X)
MgCl <sub>2</sub>	0,5-5 Mm
DNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	20-200 µM
Primers	0,1-0,5 µM cada
Enzima ( <i>Taq</i> )	0,5-2,5 unidades
Água	Até completar o volume final

Desde sua primeira descrição, a reação de polimerização em cadeia tem sofrido várias modificações. A sensibilidade e especificidade das amplificações têm sido melhoradas através de técnicas tais como o *nested* PCR, na qual o produto do PCR é submetido a uma segunda rodada de amplificação com um segundo conjunto de *primers* localizados mais internamente que o primeiro par (Dieffenbach *et al.*, 1993). Já o *quantitative PCR* permite uma estimativa da quantidade de moléculas-alvo iniciais, através da utilização de um padrão interno de comparação (Cross, 1995), enquanto que o RT-PCR possibilita a amplificação de RNA viral ou mRNA através da utilização da transcrição reversa (produção de uma fita de cDNA a partir de RNA através da utilização da enzima transcriptase reversa) (Kawasaki, 1990). A utilização de *primers* randômicos (RAPD) na amplificação de regiões de seqüência previamente desconhecidas tem possibilitado a identificação de polimorfismos entre organismos próximos e o desenvolvimento de marcadores e mapas genéticos (Williams *et al.*, 1990), enquanto que o PCR *in situ* (Long *et al.*, 1993) combina a alta sensibilidade e especificidade do PCR, com a capacidade da hibridização *in situ* de detectar pequenas quantidades de ácidos nucléicos dentro das células, possibilitando a localização de seqüências raras de RNA e DNA.

A versatilidade, praticidade, especificidade e sensibilidade da técnica de PCR têm possibilitado a sua aplicação, sob as mais variadas formas, no estudo de microrganismos, incluindo a sua genética, sistemática, ecologia, biologia e fisiologia.

#### 4. ESTRATÉGIAS DE DESENVOLVIMENTO DE *PRIMERS* DE PCR

Embora muitas variáveis necessitem ser otimizadas no desenvolvimento de protocolos de PCR, normalmente o parâmetro mais crítico é o desenho dos *primers*, que freqüentemente determina o sucesso da amplificação por PCR. Nenhuma regra absoluta pode garantir a amplificação do segmento desejado, mas algumas estratégias podem ser utilizadas no desenho de pares de *primers*, tais como: o comprimento dos *primers* deve ser em torno de 15-30 bases e o conteúdo de resíduos GC deve ser ao redor de 50%, sendo que estes nucleotídeos devem ser randomicamente distribuídos dentro do *primer*. O desenho cuidadoso dos *primers* leva ainda a uma economia considerável de tempo e custos, já que os mesmos representam os componentes mais caros na técnica de PCR. Além da obtenção de produtos específicos, o desenho dos

*primers* possibilita ainda a introdução de mutações que resultarão em variações genéticas de um produto. Desta forma, produtos de PCR específicos contendo características engenhasdas podem ser produzidos.

A especificidade de um teste de PCR pode variar de acordo com o propósito para o qual o teste está sendo aplicado. Isto é feito através da seleção apropriada da seqüência alvo do genoma a ser amplificada. A especificidade é determinada pelo grau de homologia entre a seqüência alvo e o DNA de diferentes gêneros e espécies. Por exemplo, uma região altamente conservada de um gene universal entre fungos é um alvo ideal para o desenvolvimento de um teste de PCR, que poderá indicar se uma determinada infecção é causada por bactéria ou fungo. Esta estratégia tem sido utilizada por diversos grupos que utilizam seqüências universais, como a do RNA ribossomal (rRNA) como alvo para amplificação.

Além da aplicação na identificação de espécies, a região espaçadora entre os genes ribossomais 16S e 23S do rRNA, também tem sido alvo de muitos estudos visando à caracterização e o desenvolvimento de marcadores moleculares em procaríotos e eucariotos (Jensen *et al.*, 1993). O grande interesse por esta região deve-se principalmente a dois fatores: a) os três genes que codificam para as subunidades ribossomais estão contidos em um único loco, o qual ocorre várias vezes num único genoma; b) a existência de regiões variáveis flanqueadas pelas regiões codificantes, conhecidas como região intergênica (IGS) e região espaçadora transcrita (ITS). Estas têm sido úteis na diferenciação entre espécies e gêneros (Goebel *et al.*, 1987; Edel, 1998) (Figura 2). O seqüenciamento das regiões variáveis (ITS) de espécies afins e a identificação de regiões polimórficas a serem utilizadas no desenvolvimento de sondas ou oligonucleotídeos de PCR específicos é uma estratégia recente que tem sido aplicada no desenvolvimento de um método extremamente sensível para o diagnóstico de *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* em batata (Li & De Boer, 1995), entre outros. Makimura *et al.* (1994) desenvolveram um teste de PCR baseado na região 18S rRNA que é capaz de amplificar várias cepas das 25 espécies de fungos mais importantes do ponto de vista de clínica médica. Hopfer *et al.* (1993) utilizaram um conjunto de oligonucleotídeos descrito a partir do rRNA de fungos (White *et al.*, 1990) para amplificar uma seqüência de 306pb a 311pb de 42 espécies de fungos diferentes. Os amplicons foram submetidos a digestão enzimática com a enzima *Hae* III e separados através de eletroforese. O perfil de DNA (*fingerprint*) resultante foi utilizado para diferenciar diversos fungos patogênicos, incluindo *Candida* spp. e *Aspergillus* spp.

Alternativamente, a utilização de regiões altamente variáveis proporciona uma maior especificidade, possibilitando a identificação de um gênero ou espécie em particular. Em geral, quanto mais variável a região, mais discriminatório o PCR

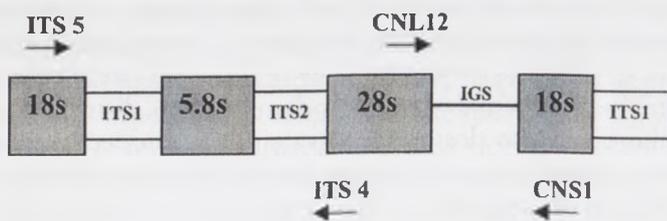


FIGURA 2. Representação esquemática da região codificadora para o RNA ribossomal em eucariotos e alguns conjuntos de *primers* utilizados para amplificação das regiões variáveis.

(Mitchell *et al.*, 1993). Tang *et al.* (1993) descreveram um teste de PCR para detectar o gene da protease alcalina de *Aspergillus fumigatus* e *A. flavus*; sendo que, a distinção da espécie foi possível através do tamanho do fragmento amplificado. Este teste possibilitou o aumento de sensibilidade em até 100 vezes quando comparado com metodologias anteriormente utilizadas.

Além do objetivo do teste, as estratégias utilizadas no desenvolvimento de *primers* de PCR dependem das características do patógeno e do prévio conhecimento de sua variabilidade genética e de sua biologia molecular. Uma das estratégias mais utilizadas no desenvolvimento de oligonucleotídeos de PCR específicos é aquela conhecida como *shot-gun* ou randômica, na qual pouco ou nenhum conhecimento prévio sobre o genoma do patógeno é necessário (Rasmussen & Reeves, 1992). Neste caso, fragmentos de DNA do organismo clonado são avaliados quanto à sua especificidade e, a única informação necessária ao desenvolvimento desta estratégia é o relacionamento taxonômico do patógeno com os demais organismos que dividem o mesmo habitat. No entanto, esta metodologia é muito trabalhosa e demorada pois, geralmente, envolve a varredura de um grande número de clones e o uso de radioisótopos.

Outra estratégia bastante eficiente é a utilização da própria reação de PCR para produzir *fingerprints* que revelam polimorfismos de DNA que podem ser utilizados posteriormente na construção de oligonucleotídeos específicos a serem empregados na detecção e identificação de várias espécies. O uso de oligonucleotídeos arbitrários (RAPD) e da reação de PCR têm possibilitado a produção de *fingerprints* genômicos para várias espécies de microrganismos (Welsh & McClelland, 1990; Reeves & Ball, 1991; Gancheva *et al.*, 1999; Toth *et al.*, 1999), possibilitando a identificação de fragmentos específicos para bactérias de importância fitopatológica, como *Erwinia stewartii* (Blakemore *et al.*, 1992) e *Pseudomonas syringae* pv. *pisii* (Rasmussen & Wulff, 1990) e *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Toth *et al.*, 1999).

Além de estratégias randômicas, regiões específicas do genoma, como plasmídeos ou genes diretamente ligados ao processo de patogenicidade (Kobayashi *et al.*, 1989; Xu *et al.*, 1988; Leite Jr. *et al.*, 1994), podem ser utilizadas no desenvolvimento de *primers* específicos. Em alguns casos, o processo de patogenicidade é determinado por um grupo de genes, os quais constituem regiões específicas do genoma que têm sido utilizadas no desenvolvimento de sondas de DNA (Rasmussen & Reeves, 1992; Xanthopoulos *et al.*, 1999). Alguns destes genes foram identificados em bactérias fitoparasitas e utilizados na construção de métodos diagnósticos (Kobayashi *et al.*, 1989; Xu *et al.*, 1988; Leite Jr. *et al.*, 1994). No entanto, a análise da especificidade e a conservação destes genes têm demonstrado que os mesmos não são subespécie-específicos, o que geralmente se faz necessário. Exemplo disto, foi a utilização de regiões codantes necessárias a interação patógeno-hospedeiro de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* para construção de *primers* específicos na identificação do patógeno em sementes, e que produziu reações inespecíficas quando testadas contra diferentes patovares de *P. syringae* (Lindgren *et al.*, 1988). Cuppels *et al.* (1990) utilizaram um fragmento de DNA que carrega o gene para produção de coronatina como sonda para detecção de *P. syringae* pv. *tomato* em sementes de tomateiro e observaram que esta sonda produziu reação inespecífica com outras cepas de *P. syringae* produtoras de coronatina, como *P. syringae* pv. *glycinea*.

No entanto, esta mesma estratégia foi aplicada com sucesso no desenvolvimento de *primers* de PCR específicos para *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Neste caso, além de se utilizar a região do DNA relacionada à reação de hipersensibilidade e patogenicidade (*hrp*) da bactéria, promoveu-se a digestão da região amplificada com diferentes enzimas de restrição, possibilitando a eficaz identificação do patógeno (Leite Jr. *et al.*, 1995). Adicionalmente, observou-se que utilizando diferentes oligonucleotídeos dentro desta região, diferentes níveis de especificidade poderiam ser obtidos (Leite Jr. *et al.*, 1994; 1995), demonstrando a possibilidade de se encontrar regiões específicas para os diversos grupos de *X. vesicatoria* e de se utilizar esta estratégia na identificação de outras bactérias.

## 5. PCR NA DIAGNOSE DE DOENÇAS HUMANAS E ANIMAIS

A precisa identificação de um patógeno ao nível de espécie e/ou cepa tem grandes implicações em vários aspectos da medicina, incluindo diagnóstico, tratamento e prevenção de doenças. O método de PCR possibilita acessar diretamente o genótipo dos microrganismos, e tem sido utilizado de forma crescente na diagnose e na análise epidemiológica de diferentes espécies (Randles *et al.*, 1996; Sander & Penno, 1999; Walter *et al.*, 2000). Esta técnica tem possibilitado um aumento significativo na qualidade do diagnóstico de doenças, devido à sua habilidade discriminatória, sua reprodutibilidade e aumento na sensibilidade de detecção (Versalovic *et al.*, 1993). A sensibilidade deste método é muitas ordens de magnitude maior do que a da hibridização direta com sonda de DNA, de forma que apenas 10 moléculas de DNA são capazes de gerar um produto detectável em gel de agarose corado com brometo de etídio (Randles *et al.*, 1996; Engelbrecht *et al.*, 2000; Ozbel *et al.*, 2000).

Grande parte dos métodos tradicionais de identificação de microrganismos patogênicos são caros, lentos e apresentam baixa sensibilidade quando amostras com reduzido número de microrganismos são analisadas. Um caso típico é a diagnose de tuberculose que é feita tradicionalmente através da detecção do *Mycobacterium tuberculosis* em amostras clínicas, ou desenvolvimento de sintomas no hospedeiro. O desenvolvimento de *primers* de PCR específicos para detecção de *M. tuberculosis*, a partir de uma seqüência específica e repetitiva (IS 6110) em isolados do complexo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* e *M. microti*), possibilitou um incremento substancial na rapidez, especificidade e sensibilidade do método, possibilitando a diagnose do patógeno, diretamente através da saliva (Eisenach *et al.*, 1993).

Até recentemente, o teste de laboratório mais comumente utilizado no diagnóstico de *Yersinia pestis* (peste) em pulgas de rato *Xenopsylla cheopis* (transmissor da bactéria) incluía o isolamento da bactéria de hospedeiros mortos, seguida da inoculação do organismo em cobaias e o reisolamento do organismo seguido de testes bacteriológicos (Hinnebusch & Schawn, 1993). Além de laboriosa, esta metodologia é de baixa sensibilidade, demorada e sujeita a escapes, principalmente quando se objetiva a detecção no vetor. O desenvolvimento de uma sonda de DNA para detecção do patógeno em *X. cheopis* apresentou uma sensibilidade inúmeras vezes maior que a técnica anterior ( $10^5$  a  $10^6$  células da bactéria). *Primers* de PCR

específicos desenhados a partir do plasmídeo bacteriano (9,5 Kb plasmídeo pesticina), possibilitaram um incremento ainda maior na sensibilidade do diagnóstico, viabilizando a detecção de até 10 células da bactéria em vetores infectados (Hinnebusch & Schawn, 1993).

Pacientes submetidos a terapias imunossupressivas, como no tratamento do câncer e nos transplantes de órgãos e medula, apresentam alta taxa de contaminação por fungos invasivos, como *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Cryptococcus neoformans*. A taxa de contaminação de pacientes transplantados por estes organismos é de até 50%, sendo que 80% destes não sobrevivem. A diagnose rápida e nos estágios iniciais da infecção são fatores determinantes para o sucesso do processo terapêutico (Hughes *et al.*, 1998). Até hoje, a diagnose destes fungos é pouco sensível e demorada, freqüentemente gerando resultados falso-positivos. Para detecção de candidíase, vários conjuntos de *primers* já foram desenvolvidos. Alguns foram desenhados a partir de genes específicos como o que codifica para o citocromo P<sub>450</sub> lanosterol-14 $\beta$ -demetilase (L1A1) de *Candida* spp., para a síntese da actina, da quitina (CH1S) e a partir de uma região duplicada do DNA cromossomal (EO3). Estes protocolos têm apresentado resultados promissores e, paulatinamente, estão sendo incorporados a rotina de detecção destes organismos em diferentes amostras (tecido infectado, sangue, secreção pulmonar) de pacientes imunossuprimidos (Hughes *et al.*, 1998; Morace *et al.*, 1999). Além disso, outras importantes doenças fúngicas como aquelas causadas por *Cryptococcus neoformans*, *Pneumocystis carinii*, já podem ser diagnosticadas de forma rápida e sensível. Para isso são utilizados *primers* de PCR construídos a partir de regiões semi-conservadas do gene que codifica para o RNA ribossomal (Mitchell *et al.*, 1993; Kawamura *et al.*, 1999).

A detecção de inúmeras viroses humanas, tais como o vírus da hepatite B, hepatite C, herpes, influenza A, B e C, rubéola e papilomavirus (Persing *et al.*, 1993), tem sido realizada através da técnica de PCR ou RT-PCR (no caso de vírus de RNA) com enorme sucesso (Wilber *et al.*, 1993). A utilização desta técnica na diagnose da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) tem sido particularmente útil, principalmente em indivíduos com resultados sorológicos indeterminados, como recém-nascidos de mães contaminadas que podem apresentar anticorpos maternos de 6 a 15 meses após o parto (Lynch *et al.*, 1992), e indivíduos infectados que ainda não apresentam reação sorológica. Além disso, possibilita o estudo da variabilidade do vírus e de mutações associadas ao tratamento com drogas específicas (Kwok & Sninsky, 1993).

A técnica de PCR também tem sido amplamente utilizada na detecção de vários patógenos causadores de doenças tropicais, tais como *Plasmodium falciparum* (Mills *et al.*, 1999; Farnet *et al.*, 1999), vírus da dengue (Yamada *et al.*, 1999) e *Leishmania braziliensis* (Avilles *et al.*, 1999; Rodriguez *et al.*, 1999).

No caso da doença de Chagas, a utilização de PCR tem contribuído para a diagnose precoce da doença, já que a técnica é capaz de detectar o *Trypanosoma cruzi* em amostras de sangue quando anticorpos específicos contra o patógeno ainda não podem ser detectados através de ELISA (Antas *et al.*, 1999; Chiaramonte *et al.*, 1999).

## 6. PCR NA DIAGNOSE DE DOENÇAS DE PLANTAS

A necessidade de maior especificidade, segurança e rapidez na diagnose de patógenos de plantas, principalmente em inspeções quarentenárias e na certificação de sementes, tem estimulado o desenvolvimento e o uso crescente da reação de PCR na detecção e identificação destes organismos.

Um exemplo clássico é o desenvolvimento de *primers* de PCR específicos para detecção de *Clavibacter sepedonicus* subsp. *sepedonicus*, agente causador da podridão anelar da batata, a partir de uma seqüência de DNA específica oriunda de um plasmídeo altamente conservado dentro da espécie. Esta tecnologia possibilitou a detecção de até  $10^3$  ufc/ml, o que torna o método 100 vezes mais sensível do que outros até então utilizados, tais como sorologia e sondas de DNA (Firrao & Locci, 1994). Da mesma forma, a utilização de *primers* específicos para detecção de *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* possibilitou a detecção de até  $10^4$  ufc/ml, o que constitui o método mais sensível para detecção do patógeno em mudas de cana-de-açúcar até hoje desenvolvido (Chung *et al.*, 1994).

O cancro cítrico é considerado a doença mais importante dos citrus no mundo, causando prejuízos enormes em várias regiões produtoras, restringindo o comércio internacional do produto e causando a erradicação de milhões de árvores. *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* é o patógeno causador da doença, a qual se dissemina a longas distâncias através de mudas infectadas. Hartung *et al.* (1996) desenvolveram *primers* de PCR específicos a partir de seqüências isoladas de um plasmídeo conservado dentro da espécie, possibilitando o aumento da sensibilidade de detecção do patógeno em até 100 vezes. Uma das doenças mais importantes das rosáceas, incluindo ameixeiras, pessegueiros, macieiras e pereiras é a escaldadura das rosáceas. Esta é causada pela bactéria *Erwinia amylovora*. A detecção da bactéria em material de plantio ou em pomares é tradicionalmente feita através de sorologia (ELISA e imunofluorescência). Em alguns casos esses métodos podem ser pouco sensíveis ou apresentar problemas de falso-positivos. O desenvolvimento de *primers* de DNA específicos para o gene *ams* envolvido na síntese de exopolissacarídeos pela bactéria, foi capaz de identificar  $10^3$  células do patógeno, enquanto que *primers* derivados a partir de uma seqüência do plasmídeo pEA29, que ocorre em grande número de cópias no genoma da bactéria, detectou apenas 50 células do patógeno (Bereswill *et al.*, 1995). Hilber *et al.* (1999) demonstraram que a utilização de PCR é até quatro vezes mais sensível na detecção de *E. amylovora* em estacas de maçã do que o método de isolamento em meio de cultura seletivo.

Vários outros relatos de *primers* de PCR desenvolvidos para diferentes bactérias fitopatogênicas, como *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* (Samac *et al.*, 1998), *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (George *et al.*, 1996), *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Audy *et al.*, 1996), *Erwinia stewartii* (Blakemore *et al.*, 1992), *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Prossen *et al.*, 1991), *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Rademaker *et al.*, 1992) e *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Parente *et al.*, 1996), comprovam a praticidade, sensibilidade e eficiência do método.

Inúmeras espécies de fungos são transmitidas através de sementes, tornando-se esta, a principal fonte de inóculo do patógeno no campo. No entanto, são relativamente poucos os métodos baseados em tecnologia de DNA já desenvolvidos

visando a detecção destes organismos na semente. Smith *et al.* (1996) desenvolveram *primers* de PCR específicos para a detecção de *Tilletia indica*, o agente causador do carvão do trigo, a partir de fragmentos do DNA mitocondrial do fungo. Isso possibilitou a detecção de até 5 teliósporos em 50 g de sementes. Outros fungos transmitidos por sementes como espécies de *Pyrenophora*, *Fusarium moniliforme*, *Stenocarpella maydis* e *Phomopsis/ Diaporthe*, *Fusarium poae* (Parry & Nicholson, 1996), *Pyrenopeziza brassicae* (Foster *et al.*, 1999), *Septoria tritici* (Fraaije *et al.*, 1999) e *Phytophthora* spp. (Olsson, 1999), também já podem ser detectados através de PCR com alta sensibilidade (1% de taxa de contaminação), possibilitando ainda, a detecção do patógeno na presença de outros fungos contaminantes.

Viroses, como a do amarelecimento e enrolamento da folha do tomateiro (*tomato yellow leaf curl virus* – TYLCV), podem ser detectadas com alta precisão através de PCR, os quais passam despercebidos em testes sorológicos, possibilitando uma seleção muito mais eficaz de mudas sadias (Pico *et al.*, 1999). A detecção de fitoplasmas causadores da doença conhecida como “amarelo” em estacas de *Prunus salicina*, *P. domestica* e *P. armeniaca*, é a principal forma de controle de disseminação da doença. A detecção do patógeno em níveis muito baixos em diferentes partes da planta é de extrema importância, principalmente para o diagnóstico do patógeno no inverno, quando a parte aérea da planta é bastante reduzida. A utilização de PCR possibilitou a detecção do fitoplasma com altos níveis de sensibilidade em diferentes tecidos da planta, inclusive na raiz, apresentando-se como excelente ferramenta para o monitoramento de mudas. A mesma estratégia também tem sido utilizada para a caracterização do fitoplasma causador da *black wood* da videira (Osti & Triolo, 1999).

Outras importantes viroses como a tristeza do citrus (Aredia & Caruso, 1999), o *Rupestris stem pitting*, vírus causador da rugose da videira (Meng-BaoZhong *et al.*, 1999), têm sido diagnosticadas por este mesmo método.

## 7. VARIAÇÕES DA REAÇÃO DE PCR NA DIAGNOSE DE MICRORGANISMOS

Desde sua descrição, várias modificações da reação original de PCR têm sido feitas no sentido de aumentar sua sensibilidade e especificidade. Estas variações possibilitaram um aumento considerável no espectro de aplicação desta tecnologia. Um exemplo clássico é o de PCR reverso (RT-PCR), o qual utiliza RNA como molécula molde ao invés de DNA, possibilitando a detecção de inúmeros vírus de RNA, assim como a detecção de transcritos raros de mRNA. A técnica baseia-se na transcrição reversa do RNA em cDNA através da ação da enzima transcriptase reversa, seguida da amplificação do fragmento recém-sintetizado pela *Taq* polimerase (Kawasaki, 1990). Esta técnica tem possibilitado a detecção de inúmeras viroses humanas e de plantas (Wetzel *et al.*, 1991; Lynch *et al.*, 1992; Persing *et al.*, 1993; Aredia & Caruso, 1999; Pico *et al.*, 1999).

Significativo aumento na sensibilidade e especificidade do PCR pode ser obtido através da técnica de *nested PCR*. Nesta técnica, o produto de PCR amplificado é submetido a uma segunda rodada de amplificação, utilizando-se um segundo par de oligonucleotídeos, localizados mais internamente que os primeiros (Dieffenbach *et al.*, 1993). Hartung *et al.* (1996) observaram um aumento significativo na

sensibilidade de detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, utilizando esta técnica associada a técnica de imunocaptura (concentração das bactérias de amostras diluídas através de captura eletromagnética).

O PCR competitivo (Hu *et al.*, 1995), por sua vez, consiste na utilização de um controle interno de DNA, que é amplificado pelo mesmo conjunto de oligonucleotídeos que amplifica o microrganismo alvo, e tem sido utilizado como controle no sucesso da amplificação e na comprovação da ausência de inibidores na reação. Além disso, este método possibilita uma estimativa da quantidade de DNA amplificada, já que a intensidade da banda pode ser comparada com a do controle. Esta estratégia tem sido largamente utilizada na detecção e na estimativa do tamanho de populações de *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* em tubérculos de batata, e comprovou ser 10 vezes mais sensível que a técnica tradicionalmente utilizada (imunofluorescência), possibilitando a detecção de até 100 células por amostra.

Recentemente, métodos colorimétricos e sorológicos têm sido acoplados à reação de PCR visando aumentar ainda mais a sua sensibilidade, praticidade e acuidade. Estes métodos não só aumentam dramaticamente a sensibilidade de detecção, como também possibilitam uma redução na estringência da reação de PCR. Isso possibilita a detecção de microrganismos que apresentam múltiplas variantes. Este é o caso de viroses causadas por vírus de RNA em geral e pelo vírus da imunodeficiência adquirida em particular, os quais variam de seqüência em um mesmo indivíduo e entre indivíduos diferentes. Nesses casos, é importante utilizar temperaturas de anelamento de reação de PCR de baixa estringência (em torno de 37°C), possibilitando a amplificação de diferentes variantes do organismo alvo, além de seqüências adicionais. A hibridização deste produto com sondas frias ou isotopicamente marcadas, possibilitará a detecção do organismo alvo em baixíssimas concentrações (White, 1993).

Um método semi-quantitativo baseado em PCR e um ensaio imunoenzimático (EIA) têm sido utilizados na detecção de *Bartonella henselae* e *Bartonella quintana* (Sander & Penno, 1999). Neste caso, seqüências nucleotídicas internas derivadas da amplificação da região do 16S rRNA são utilizadas para o desenvolvimento de sondas específicas para as diferentes espécies. Os produtos de PCR marcados com biotina são imobilizados em placas de ELISA, previamente sensibilizadas com estreptavidina, hibridizados com uma sonda marcada com digoxigenina e revelados através da utilização de um conjugado de antidigoxigenina-peroxidase. Este ensaio mostrou-se tão sensível quanto um *dot-blot*, e cerca de 10 vezes mais sensível que a visualização normal em gel de agarose, possibilitando a detecção de até  $10^3$  ufc/ml.

Holland *et al.* (1992) utilizaram a atividade de exonuclease 5'-3' de algumas polimerases termoestáveis para gerar um sinal a partir de uma sonda seqüência-específica durante a reação de PCR. Durante cada ciclo de amplificação, a enzima degrada a sonda e libera um pequeno fragmento fluorescente, o qual é separado da sonda não clivada e detectado através da medição de sua fluorescência no próprio tubo em que a reação de PCR ocorreu. Este método permite a análise quantitativa da reação, além de possibilitar a utilização de várias sondas marcadas, diferencialmente em cada reação, permitindo a análise múltipla de vários agentes.

## 8. CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS

Existem uma série de situações clínicas e epidemiológicas onde a discriminação entre organismos estreitamente relacionados se faz necessária. Por exemplo, em surtos de uma determinada doença, é importante esclarecer se as várias infecções envolvendo uma mesma espécie de microrganismo são provenientes de uma única fonte ou foram introduzidas separadamente. Além disso, muito freqüentemente faz-se necessário distinguir entre cepas de um mesmo organismo que podem diferir quanto a sua disseminação, resistência a antibióticos, círculo de hospedeiros etc., implicando em diferentes medidas de controle. A diferenciação de indivíduos muito próximos requer a utilização de métodos altamente discriminatórios, tais como, seqüenciamento do genoma, análise isoenzimática, perfil de restrição enzimático, eletroforese de campo pulsado ou *fingerprint* genômico através da utilização de *primers* aleatórios (RAPD), seqüências repetitivas (REP, VNRTs, SSR), polimorfismo de fragmentos amplificados (AFLP) etc.

Além do alto polimorfismo, dos vários componentes utilizados na caracterização de microrganismos, o DNA cromossômico é o único que não se apresenta suscetível a mudanças devido às condições de crescimento. A quantidade desta molécula flutua com a taxa de crescimento do organismo, mas a composição da mesma se manterá instável, constituindo a molécula mais estável através da qual a maior variedade de microrganismos pode ser comparada e classificada. O cromossomo pode ser analisado em diferentes níveis: em primeiro lugar quanto a sua composição geral, em termos das quatro bases nucleotídicas; em segundo lugar quanto ao grau de homologia, baseada na taxa de renaturação das moléculas de DNA em experimentos de reassociação e pareamento; e, finalmente, através da análise da conservação desta homologia (sítios de restrição ou padrão de bandas) ou comparando diretamente a seqüência de genes de diferentes organismos.

*Fingerprints* de DNA produzidos através de PCR têm sido largamente utilizados como marcadores genéticos na medida da diversidade de microrganismos (Leach *et al.*, 1990; McMillin & Muldrow, 1992; Leach *et al.*, 1992; Barbut *et al.*, 1993; Jensen *et al.*, 1993; Van Lith & Aarts, 1994; Smith *et al.*, 1995). A utilização de *primers* arbitrários de PCR (RAPD – *Random Amplified Polimorphic DNA*) tem possibilitado a diferenciação de indivíduos com apenas uma base nucleotídica distinta. Esta técnica tem sido utilizada na caracterização e identificação de bactérias, fungos, plantas, animais, insetos e humanos (Gancheva *et al.*, 1999; Toth *et al.*, 1999; Adams, 2000; Audisio *et al.*, 2000; Hsiang *et al.*, 2000; Misawa *et al.*, 2000; Wet *et al.*, 2000).

Outra aplicação da técnica de PCR na caracterização de microrganismos é a análise da dispersão de seqüências altamente repetitivas e conservadas no genoma, tais como, regiões que correspondem a minissatélites (VNRTs) e microssatélites (SSRP). A função destas regiões no genoma ainda é um enigma. No entanto, alguns autores especulam que sua função pode estar relacionada a estabilização de mRNA, acoplamento transducional entre genes, recombinação homóloga, organização cromossômica e ligação de histonas ao DNA (Brujin, 1992). É importante salientar no entanto, que nenhuma destas funções explica, separadamente, sua conservação e freqüência no genoma.

Considerando que a organização destas seqüências no genoma é definida através de seleção e que sua dispersão pode ser um indicativo da sua estrutura e evolução, especula-se que cada linha especializada possua uma única distribuição e arranjo (Louws *et al.*, 1994). No caso de bactérias, famílias de DNA repetitivo estão dispersas ao longo do genoma de diversas espécies (Louws *et al.*, 1994). Três famílias, não relacionadas quanto a seqüência de DNA, têm sido estudadas em mais detalhe, conhecidas como a seqüência REP (*repetitive extragenic palindromic sequence*) de 35-40 pb (Gilson *et al.*, 1984), ERIC (*enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence*) de 124-127 pb (Hulton *et al.*, 1991), e o elemento BOX de 154 pb (Martin *et al.*, 1992). O uso de PCR com *primers* correspondentes a estas seqüências tem sido utilizado para gerar perfis de DNA utilizados tanto na caracterização como no diagnóstico de bactérias de importância médica e fitopatogênica tais como *Xanthomonas* e *Pseudomonas* (Louws *et al.*, 1994), *Rhizobium meliloti* (Brujin, 1992), *Rhodococcus galegae* (Nick & Lindstrom, 1994), *Salmonella thyphimurium* (Hulton *et al.*, 1991), *X. oryzae* pv. *oryzae* (Leach *et al.*, 1992), *Ralstonia solanacearum* (Smith *et al.*, 1995) e *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Parente *et al.*, 1996) (Figura 3).

O rRNA é um loco genético de grande interesse evolucionário já que é encontrado tanto em organismos eucarióticos como procarióticos. Na realidade, acredita-se haver conservação suficiente neste loco para que o mesmo seja utilizado no estudo das relações evolucionárias entre organismos de taxa distantes (Jensen *et al.*, 1993).

O uso destas seqüências como ferramentas taxonômicas tem sido demonstrado em diferentes espécies, onde a análise da seqüência do 16S rRNA tem possibilitado uma redefinição das relações filogenéticas previamente tão dependentes do metabolismo celular. Em adição as regiões altamente conservadas utilizadas no estudo da variabilidade entre organismos de taxa distantes, o 16S rRNA contém regiões variáveis, que são as regiões espaçadoras entre os genes ribossomais, as quais são extremamente úteis na diferenciação de gêneros e espécies (Miller *et al.*, 1999).

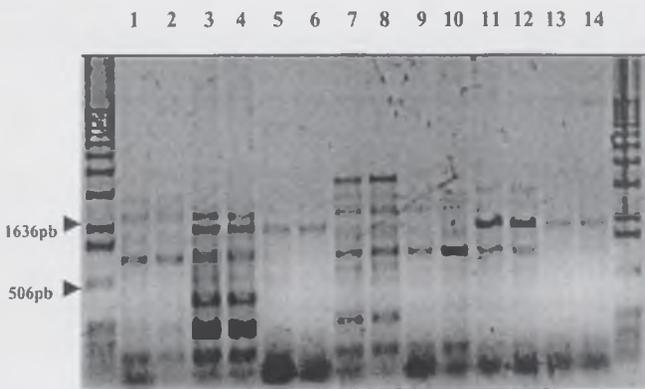


FIGURA 3. Variabilidade genética de diferentes patovares de *Curtobacterium flaccumfaciens* utilizando REP-PCR. ( $\lambda$ /Hind III; 1-4 C. f. pv. *flaccumfaciens*; 5-8 C. f. pv. *poinsettiae*; 9-12 C. f. pv. *oortii*; 13-14 C. f. pv. *betae*;  $\lambda$ /Hind III).

Em procariotos, os três genes que compõem o rDNA (16S, 23S e 5S) são repetidos inúmeras vezes no mesmo genoma. Estes genes estão separados por regiões espaçadoras que variam quanto a seqüência e ao tamanho dependendo do gênero e da espécie (Jensen *et al.*, 1993). Os *primers* desenhados a partir das regiões conservadas que

flanqueam regiões variáveis têm sido muito utilizados na identificação de gêneros e espécies de bactérias e fungos (Vilgalys & Hester, 1990; Barry *et al.*, 1991; Gardes *et al.*, 1991; Miller *et al.*, 1999; Hsiang *et al.*, 2000). Informações adicionais inerentes ao caráter polimórfico do produto amplificado podem ser acessadas através da digestão do produto de PCR com enzimas de restrição (Matar *et al.*, 1993).

Esta técnica foi utilizada para diferenciar 300 cepas de bactérias pertencentes a 28 espécies ou sorotipos, incluindo *Listeria*, *Staphylococcus* e *Salmonella* e espécies adicionais relacionadas a estes organismos (Jensen *et al.*, 1993). Além disso, o método tem sido utilizado na subtipagem de *Rochalimaea* (Matar *et al.*, 1993) e na identificação de espécies de *Clostridium* (Barry *et al.*, 1991). Li & De Boer (1995) amplificaram e seqüenciaram a região entre os genes 16S e 23S do rRNA de diferentes subespécies de *Clavibacter michiganensis*, a fim de obter seqüências específicas para *C. michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Estas seqüências específicas foram utilizadas com sucesso como *primers* de PCR na identificação e detecção do patógeno.

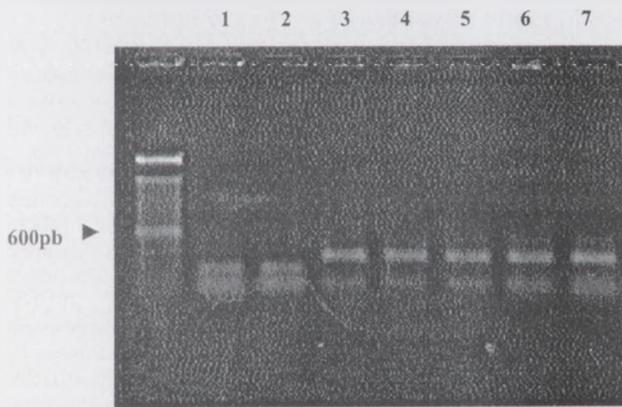


FIGURA 4. Variabilidade genética de diferentes isolados de *Fusarium* utilizando a região ITS do rDNA. (100pb marker; 1-2 *Fusarium oxysporum*; 3-7 *Fusarium solani*).

Miller *et al.* (1999) utilizaram a região espaçadora intergênica (IGS) e as regiões espaçadoras internas (ITS 1 e ITS 2) (Figura 2) do rDNA para estudar a variabilidade genética existente entre isolados de *Fusarium* spp. Esta técnica possibilitou a diferenciação entre *F. solani* e *F. oxysporum* e entre isolados de *F. solani* causadores de murcha de eumartii e de podridão seca (Figura 4).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R.P. Systematic of smooth leaf margin *Juniperus* of the western hemisphere based on leaf essential oils and RAPD DNA. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.28, p.149-162, 2000.
- ANTAS, P.R.Z.; MEDRANO, M.N.; TORRICO, E.; UGARTE, F.R.; GOMEZ, F.; OLIVEIRA, R.C.; CHAVES, A.C.L. Early, intermediate, and late acute stages in Chagas' disease: a study combining anti-galactose IgG, specific serodiagnosis, and polymerase chain reaction analysis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.61, p.308-314, 1999.
- AREDDIA, R.; CARUSO, A. Diagnostic methods for citrus tristeza virus. **Informatore-Fitopatologico**, v.49, p.11-16, 1999.
- AUDISIO, P.; BIASE, A.; ROMANELLI, P.; ANGELIC, M.C.; KETMAIER, V.; MATTHAEIS, E.; BIASE, A.; MATTHAEIS, E. Molecular re-examination of the taxonomy of the *Meligethes viridescens* species complex (Coleoptera-Nitidulidae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.28, p.1-13, 2000.
- AUDY, P.; BRAAT, C.E.; SAINDON, G.; HUANG, H.C.; LAROCHE, A. A rapid and sensitive PCR-based assay for concurrent detection of bacteria causing common and halo blights in bean seeds. **Phytopathology**, v.86, p.361-366, 1996.
- AVILLES, H.; BELLI, A.; ARMIJOS, R.; MONROY, F.P.; HARRIS, E. PCR detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical methods. **Journal of Parasitology**, v.85, p.181-187, 1999.

- BARRY, T.; COLLERAN, G.; GLENNON, M.; DUNICAN, L.K.; GANNON, F. The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *PCR Methods and Applications*, v.1, p.51-56, 1991.
- BARBUT, F.; MARIO, N.; DELMEE, M.; GOZIAN, J.; PETIT, J. Genomic fingerprinting of *Clostridium difficile* isolates by using a random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay. *FEMS Microbiology Letters*, v.114, p.161-166, 1993.
- BERESWILL, S.; BUGERT, P.; BRUCHMULLER, I.; GEIDER, K. Identification of the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*, by PCR assays with chromosomal DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, v.61, p.2636-2642, 1995.
- BLAKEMORE, E.J.A.; REEVES, J.C.; BALL, S.F.L. Polymerase chain reaction used in the development of a DNA probe to identify *Erwinia stewartii*, a bacterial pathogen of maize. *Seed Science and Technology*, v.20, p.331-335, 1992.
- BRUJIN, E.J. Use of Repetitive (Repetitive Extragenic Palindromic and Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) Sequences and the Polymerase Chain Reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v.58, p.2180-2187, 1992.
- CHIARAMONTE, M.G.; FRANK, F.M.; FURER, G.M.; TARANTO, N.J.; MARGNI, R.A.; MALCHIODI, E.L. Polymerase chain reaction reveals *Trypanosoma cruzi* infection suspected by serology in cutaneous and mucocutaneous leishmania patients. *Acta Tropica*, v.72, p.295-308, 1999.
- CHUNG, C.H.; LIN, C.P.; CHEN, C.T. Development and application of cloned DNA probes for *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, the causal agent of sugarcane ratoon stunting. *Journal of Phytopathology*, v.141, p.293-301, 1994.
- CROSS, N.C.P. Quantitative PCR techniques and applications. *British Journal of Haematology*, v.89, p.693-697, 1995.
- CUPPELS, D.A.; MOORE, R.A.; MORRIS, V.L. Construction and use of a nonradioactive DNA hybridisation probe for detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on tomato plants. *Applied and Environmental Microbiology*, v.56, p.1743-1749, 1990.
- DIEFFENBACH, C.W.; LOWE, T.M.J.; DVEKSLER, G.S. General concepts for PCR primer design. *PCR Methods and Applications*, v.3, p.30-37, 1993.
- EDEL, V. Polymerase Chain Reaction in Mycology: an Overview. In: BRIDGE, P.D.; ARORA, D.K.; REDDY, C.A.; ELANDER, R.P. *Applications of PCR in Mycology*. New York: CAB International, 1998. p.267-287.
- EISENACH, K.D.; CAVE, M.D.; CRAWFORD, J.T. PCR detection of *Mycobacterium tuberculosis*. In: PERSING, D.H.; SMITH, T.F.; TENOVER, F.C.; WHITE, T.J. (Ed.) *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications*. Washington: American Society for Microbiology, 1993. p.191-196.
- ENGELBRECHT, F.; TOGEL, E.; BECK, H.P.; ENWEZOR, F.; FELGER, I. Analysis of *Plasmodium falciparum* infections in a village community in northern Nigeria: determination of msp2 genotypes and parasite-specific IgG responses. *Acta Tropica*, v.74, p.63-71, 2000.
- FARNET, A.; AREZ, A.P.; CORREIA, A.T.; BJORKMAN, A.; SNOUNOU, G.; ROSARIO, V. DO ROSARIO Sampling and storage of blood and the detection of malaria parasites by polymerase chain reaction. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.93, p.50-53, 1999.
- FIRRAO, G.; LOCCI, R. Identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* using the polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Microbiology*, v.40, p.148-151, 1994.
- FOSTER, S.J.; SINGH, G.; FITT, B.D.; ASHBY, A.M. Development of PCR based diagnostic techniques for the two mating types of *Pyrenopeziza brassicae* (light leaf spot) on winter oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v.55, p.111-119, 1999.
- FRAAJIE, B.A.; LOVELL, D.J.; ROHEL, E.A.; HOLLOMON, D.W. Rapid detection and diagnosis of *Septoria tritici* epidemics in wheat using a polymerase chain reaction/PicoGreen assay. *Journal of Applied Microbiology*, v.86, p.701-708, 1999.
- GANCHEVA, A.; POT, B.; VANHONACKER, K.; HOSTE, B.; KERSTERS, K. A polyphasic approach towards the identification of strains belonging to *Lactobacillus acidophilus* and related species. *Systematic and Applied Microbiology*, v.22, p.573-585, 1999.
- GARDES, M.; WHITE, T.J.; FORTIN, J.A.; BRUNS, T.D.; TAYLOR, J.W. Identification of indigenous and introduced symbiotic fungi in ectomycorrhizae by amplification of nuclear and mitochondrial DNA. *Canadian Journal of Botany*, v.69, p.180-190, 1991.
- GEORGE, M.L.C.; QUINTO, V.; VILLAMAYOR, M.; NELSON, R.J. A simple and rapid method for isolation of bacterial genomic DNA. *International Rice-Research-Notes*, v.21, p.84, 1996.
- GILSON, E.; PERRIN, D.; HOFNUNG, M. A family of dispersed repetitive extragenic palindromic DNA sequences in *E. coli*. *EMBO Journal*, v.3, p.1417-1421, 1984.
- HARTUNG, J.S.; PRUVOST, O.P.; VILLEMOT, I.; ALVAREZ, A. Rapid and sensitive colorimetric detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by immunocapture and a nested-polymerase chain reaction assay. *Phytopathology*, v.86, p.95-101, 1996.
- HILBER, B.M.; HASLER, T.; HILBER, U. Diagnosis of fire blight *Erwinia amylovora* using polymerase chain reaction PCR. *Obst-und-Weinbau*, v.135, p.492-494, 1999.
- HINNEBUSCH, J.; SCHWAN, T.G. PCR detection of *Yersinia pestis* in fleas. In: PERSING, D.H.; SMITH, T.F.; TENOVER, F.C.; WHITE, T.J. (Ed.) *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications*. Washington: American Society for Microbiology, 1993. p.218-223.

- HOLLAND, P.M.; ABRAMSON, R.D.; WATSON, R.; WILL, S.; SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Clinical Chemistry*, v.38, p.462-463, 1992.
- HOPFER, R.L.; WALDEN, P.; SETTERQUIST, S.; HIGSMITH, W.E. Detection and differentiation of fungi in clinical specimens using PCR amplification and restriction enzyme analysis. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, v.31, p.65-75, 1993.
- HSIANG, T.; CHUNDREN, W.; WU, C. Genetic relationships of pathogenic *Typhula* species assessed by RAPD, ITS-RFLP and ITS sequencing. *Mycological Research*, v.104, p.16-22, 2000.
- HU, X.; LAI, M.F.; REDDY, A.S.N.; ISHIMARU, C.A. Quantitative detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by competitive polymerase chain reaction. *Phytopathology*, v.85, p.1468-1473, 1995.
- HUGHES, T.; ROGERS, T.R.; HAYNS, K. PCR diagnostics in medical mycology. In: BRIDGE, P.D.; ARORA, D.K.; REDDY, C.A.; ELANDER, R.P. *Applications of PCR in Mycology*. London: CAB International, 1998. p.267-287.
- HULTON, C.S.J.; HIGGINS, C.F.; SHARP, P.M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enteric bacteria. *Molecular Microbiology*, v.5, p.825-834, 1991.
- JENSEN, M.A.; WEBSTER, J.A.; STRAUS, N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Applied and Environmental Microbiology*, v.59, p.945-952, 1993.
- KAWAMURA, S.; MAESAKI, S.; OMAGARI, K.; HASHIGUCHI, K.; TOMONO, K.; TASHIRO, T.; KOHNO, S. Invasive pulmonary aspergillosis diagnosed early by polymerase chain reaction assay. *Internal-Medicine-Tokyo*, v.38, p.744-746, 1999.
- KAWASAKI, E.S. Amplification of RNA. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Ed.) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press, 1990. p.21-27.
- KOBAYASHI, D.J.; TAMAKI, S.J.; KEEN, N.T. Cloned avirulence genes from the tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* confer cultivar specificity on soybean. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, v.86, p.157-161, 1989.
- KWOK, S.; SNINSKY, J.J. PCR detection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Proviral DNA sequences. In: PERSING, D.H.; SMITH, T.F.; TENOVER, F.C.; WHITE, T.J. (Ed.) *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications*. Washington: American Society for Microbiology, 1993. p.309-315.
- LEACH, J.E.; WHITE, F.F.; RHOADS, M.L.; LEUNG, H. A repetitive DNA sequence differentiates *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* from other pathovars of *X. campestris*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.3, p.238-246, 1990.
- LEACH, J.E.; RHOADS, M.L.; VERA CRUZ, C.M.; WHITE, F.F.; MEW, T.W.; LEUNG, H. Assessment of genetic diversity and population structure of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* with a repetitive DNA element. *Applied and Environmental Microbiology*, v.58, p.2188-2195, 1992.
- LEITE JR., R.P. Detection and identification of phytopathogenic *Xanthomonas* strains by amplification of DNA sequences related to the hrp genes of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.60, p.1068-1077, 1994.
- LEITE JR., R.P. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* associated with pepper and tomato seed by DNA amplification. *Plant Disease*, v.79, p.917-922, 1995.
- LI, X.; DE BOER, S.H. Selection of polymerase chain reaction primers from an RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Phytopathology*, v.85, p.837-842, 1995.
- LONG, A.A.; KOMMINOTH, P.; LEE, E.; WOLFE, H.F. A comparison of indirect and direct in-situ polymerase chain reaction in cell preparations and tissue sections. Detection of viral DNA, gene rearrangements and chromosomal translocations. *Histochemistry*, v.99, p.151-162, 1993.
- LYNCH, C.E.; MADEJ, R.; LOUIE, P.; RODGERS, G. Detection of HIV-1 DNA by PCR: evaluation of PCR primer pair concordance and sensitivity of a single primer pair. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome*, v.5, p.433-440, 1992.
- LINDGREN, P.B.; PANOPOULOS, N.J.; STASKAWICZ, B.J.; DAHLBECK, D. Genes required for pathogenicity and hypersensitivity are conserved and interchangeable among pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Molecular and General Genetics*, v.211, p.499-506, 1988.
- LOUWS, F.; FULLBRIGHT, D.W.; STEPHENS, C.T.; DE BRUJIN, F.J. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, v.60, p.2286-2295, 1994.
- MAKIMURA, K.; MURAYAMA, S.Y.; YAMAGUCHI, H. Detection of a wide range of medically important fungi by PCR. *Journal of Medical Microbiology*, v.40, p.358-364, 1994.
- MATAR, G.M.; SWAMINATHAN, B.; HUNTER, S.B.; SLATER, I.N.; WELCH, D.F. Polymerase Chain Reaction-Based Fragment Length Polymorphism Analysis of a fragment of the ribosomal operon from *Rochalimaea* species for subtyping. *Journal of Clinical Microbiology*, v.31, p.1730-1734, 1993.

- MARTIN, B.; HUMBERT, O.; CAMARA, M.; GUENZI, E.; WALKER, J.; MITCHELL, T.; ANDREW, P.; PRUDHOMME, M.; ALLOING, G.; HAKENBECK, R.; MORRISON, D.A.; BOULNOIS, G.J.; CLAVERYS, A.G.. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Research*, v.20, p.3479-3483, 1992.
- MCMILLIN, D.E.; MULDROW, L.L. Typing of toxic strains of *Clostridium difficile* using DNA fingerprints generated with arbitrary polymerase chain reaction primers. *FEMS Microbiology Letters*, v.92, p.5-10, 1992.
- Meng-BaoZhonG; Johnson, R.; Peressini, S.; Forsline, P.L.; Gonsalves, D.; Meng, B.Z. Rupestris stem pitting associated virus-1 is consistently detected in grapevines that are infected with rupestris stem pitting. *European Journal of Plant Pathology*, v.105, p.191-199, 1999.
- MILLS, C.D.; BURGESS, D.C.H.; TAYLOR, H.J.; KAIN, K.C. Evaluation of a rapid and inexpensive dipstick assay for the diagnosis of *Plasmodium falciparum malaria*. *Bulletin of the World Health Organization*, v.77, p.553-559, 1999.
- MISAWA, N.; SHINOHARA, S.; SATOH, H.; ITOH, H.; SHINOHARA, K.; KONDO, F.; ITOH, K. Isolation of *Campylobacter* species from zoo animals and polymerase chain reaction-based random amplified polymorphism DNA analysis. *Veterinary Microbiology*, v.71, p.59-68, 2000.
- MITCHELL, T.G.; FREEDMAN, E.Z.; MEYER, W.; WHITE, T.J.; TAYLOR, J.W. PCR detection of *Cryptococcus neoformans*. In: PERSING, D.H.; SMITH, T.F.; TENOVER, F.C.; WHITE, T.J. (Ed.) *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications*. Washington: American Society for Microbiology, 1993. p.431-436.
- MILLER, R.N.G.; QUEZADO-SOARES, A.M.; LOPES, C.A. Molecular-genetic differentiation of *Fusarium* pathogens of potato in Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, v.24, p.149-155, 1999.
- MORACE, G.; PAGANO, L.; SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; MELE, L.; EQUITANI, F.; D'AMORE, G.; LEONE, G.; FADDA, G. PCR-restriction enzyme analysis for detection of *Candida* DNA in blood from febrile patients with hematological malignancies. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, p.1871-1875, 1999.
- MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology*, v.55, p.335-350, 1987.
- NICK, G.; LINDSTROM, K. Use of repetitive sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomic DNA of *Rhizobium galegae* strains and to identify the DNA obtained by sonicating the liquid cultures and root nodules. *Systematic and Applied Microbiology*, v.17, p.265-273, 1994.
- OLSSON, C.H.B. Diagnosis of root-infecting *Phytophthora* spp. *Acta Universitatis Agriculturae Sueciae Agraria*, v.161, p.100, 1999.
- OSTI, M.; TRIOLO, E. Foci of black wood on grapes in Tuscany. *Informatore Agrario*, v.55, p.77-78, 1999.
- OZBEL, Y.; OSKAM, L.; OZENSOY, S.; TURGAY, N.; ALKAN, M.Z.; JAFFE, C.L.; OZCEL, M.A. A survey on canine leishmaniasis in western Turkey by parasite, DNA and antibody detection assays. *Acta Tropica*, v.74, p.1-6, 2000.
- PARRY, D.W.; NICHOLSON, P. Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* in wheat. *Plant Pathology*, v.45, p.383-391, 1996.
- PERSING, D.H.; SMITH, T.F.; TENOVER, F.C.; WHITE T.J. *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications*. (Ed.) Washington: American Society for Microbiology, 1993. 629p.
- PROSSEN, D.; HATZILIOUKAS, E.; PANOPOULOS, N.J.; SCHAAD, N.W. Direct detection of the halo blight pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seeds by DNA amplification. (Abstract) *Phytopathology*, v.81, p.1159, 1991.
- PARENTE, P.M.G.; SADDLER, G.S.; GROSSI DE SA, M.F. Identification of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* by a homologous DNA probe. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 9., Madras 1996. *Annals*. Madras: International Society for Plant Pathology, 1996. p.25.
- PICO, B.; DIEZ, M.J.; NUEZ, F. Improved diagnostic techniques for tomato yellow leaf curl virus in tomato breeding programs. *Plant Disease*, v.83, p.1006-1012, 1999.
- RADEMAKER, J.L.W.; THALEN, M.; JANSE, J.D. Experiences with DNA-hybridisation using a biotinylated probe against *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Medici Faculty landbouwwerg Universit Gent*, v.57, p.263-268, 1992.
- RANDLES, J.W.; HODGSON, R.A.J.; WEFELS, E. The rapid and sensitive detection of plant pathogens by molecular methods. *Australasian Plant Pathology*, v.25, p.71-85, 1996.
- RASMUSSEN, O.F.; WULFF, B.S. Identification and use of DNA probes for plant pathogenic bacteria. In: EUROPEAN CONGRESS ON BIOTECHNOLOGY, 5., Munksgaards, 1990. *Proceedings*. Munksgaards, 1990. p.9.
- RASMUSSEN, O.F.; REEVES, J.C. DNA probes for the detection of plant pathogenic bacteria. *Journal of Biotechnology*, v.25, p.203-220, 1992.
- REEVES, J.C.; BALL, S.F.L. Preliminary results on the identification of *Pyrenophora* species using DNA polymorphisms amplified from arbitrary primers. *Plant Varieties and Seeds*, v.11, p.185-189, 1991.
- RODRIGUEZ, N.; AGUILAR, C.M.; BARRIOS, M.A.; BAKER, D.C. Detection of *Leishmania braziliensis* in naturally infected individual sandflies by the polymerase chain reaction. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.93, p.47-49, 1999.

- SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. *Science*, v.239, p.487-491, 1988.
- SAMAC, D.A.; PAUL, S.; NIX, R.J.; OLESON, A.E. Transmission frequency of *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* to alfalfa seed and identification of the bacterium by PCR. *Plant Disease*, v.82, p.1362-1367, 1998.
- SANDER, A.; PENNO, S. Semiquantitative species-specific detection of *Bartonella henselae* and *Bartonella quintana* by PCR-enzyme immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology*, v.37, p.3097-3101, 1999.
- SMITH, J.J.; OFFORD, L.C.; HOLDERNESS, M.; SADDLER, G.S. Genetic diversity of *Burkholderia solanacearum* (Synonym *Pseudomonas solanacearum*) Race 3 in Kenya. *Applied and Environmental Microbiology*, v.61, p.4263-4268, 1995.
- SMITH, O.P.; PETERSON, G.L.; BECK, R.J.; SCHAAD, N.W.; BONDE, M.R. Development of a PCR-based method for identification of *Tilletia indica*, causal agent of Karnal bunt of wheat. *Phytopathology*, v.86, p.115-122, 1996.
- TANG, C.M.; HOLDEN, D.W.; AUFUVRE-BROWN, A.; COHEN, J. Diagnosing fungal infections in immunocompromised hosts. *Journal of Clinical Pathology*, v.45, p.1-5, 1993.
- TOTH, I.K.; BERTHEAU, Y.; HYMAN, L.J.; LAPLAZE, L.; LOPEZ, M.M.; MCNICOL, J.; NIEPOLD, F.; PERSON, P.; SALMOND, G.P.C.; SLETTEN, A.; WOLF, J.M.; VAN DER PEROMBELON, M.C.M.; VAN DER WOLF, J.M. Evaluation of phenotypic and molecular typing techniques for determining diversity in *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Journal of Applied Microbiology*, v.87, p.770-781, 1999.
- VAN LITH, L.A.J.T.; AARTS, H.J.M. Polymerase chain reaction identification of *Salmonella* serotypes. *Letters in Applied Microbiology*, v.19, p.273-276, 1994.
- VERSALOVIC, J.; WOODS, C.R.; GEORGHIOU, P.R.; HAMIL, R.J.; LUPSKI, J.R. DNA-based identification and epidemiologic typing of bacterial pathogens. *Archives of Pathological and Laboratory Medicine*, v.117, p.1088-1098, 1993.
- VILGALYS, R.; HESTER, M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology*, v.172, p.4238-4246, 1990.
- WALTER, J.; TANNOCK, G.W.; TILSALA-TIMISJARVI, A.; RODTONG, S.; LOACH, D.M.; MUNRO, K.; ALATOSSAVA, T. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific primers. *Applied and Environmental Microbiology*, v.66, p.297-303, 2000.
- WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, v.18, p.7213-7218, 1990.
- WET, J. de; WINGFIELD, M.J.; COUTINHO, T.A.; WINGFIELD, B.D.; DE WET, J. Characterization of *Sphaeropsis sapinea* isolates from South Africa, Mexico, and Indonesia. *Plant Disease*, v.84, p.151-156, 2000.
- WETZEL, T.; CANDRESSE T.; RAVELONANDRO, M.; DUNEZ, J.A. Polymerase chain reaction assay adapted to plum pox potyvirus detection. *Journal of Virological Methods*, v.33, p.355-365, 1991.
- WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J.W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. (Ed.) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. (Ed.) San Diego: Academic Press, 1990. p.315-322.
- WHITE, T.J. Amplification product detection methods. In: PERSING, D.H.; SMITH, T.F.; TENOVER, F.C.; WHITE, T.J. (Ed.) *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications*. Washington: American Society for Microbiology, 1993. p.309-315.
- WILBER, J. C.; JOHNSON, P.J.; URDEA, M.S. Reverse transcriptase-PCR for hepatitis C virus RNA. In: PERSING, D.H.; SMITH, T.F.; TENOVER, F.C.; WHITE, T.J. (Ed.) *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications*. Washington: American Society for Microbiology, 1993. p.327-331.
- WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, v.18, p.6531-6535, 1990.
- YAMADA, K.I.; TAKASAKI, T.; NAWA, M.; KURANE, I. Laboratory diagnosis of imported dengue cases. *Japanese Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.27, p.75-77, 1999.
- XANTHOPOULOS, V.; ZTALIOU, I.; GAIER, W.; TZANETAKIS, N.; LITOPOULOU, T.E. Differentiation of *Lactobacillus* isolates from infant faeces by SDS-PAGE and rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Journal of Applied Microbiology*, v.87, p.743-749, 1999.
- XU, P.; LEONG, S.; SEQUEIRA, I. Molecular cloning of genes that specify virulence in *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Bacteriology*, v.170, p.617-622, 1988.