

La micología molecular en la práctica médica del siglo XXI.

Gioconda San-Blas*.

(*) Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Centro de Microbiología y Biología Celular, Apartado 21827, Caracas 1020A, Venezuela. E-mail: sanblasg@ivic.ve

Este trabajo está basado en la conferencia: ¿Qué relación tiene la micología molecular con el manejo clínico del paciente? dictada por la autora en el marco del XI Congreso Venezolano de Bioanalistas Especialistas, realizado en Caracas entre el 10 y el 12 de mayo de 2004.

Resumen

Los métodos moleculares de diagnóstico se han empleado para la detección temprana de gran cantidad de infecciones virales, bacterianas, parasitarias y ahora también, en las fúngicas. Debido a su alta especificidad y sensibilidad, estos procedimientos se insertarán poco a poco en la rutina de los laboratorios clínicos para complementar la información proveniente de métodos más convencionales y sobre todo, para ayudar en el diagnóstico de casos dudosos. El diseño de sondas moleculares específicas, unidas a la técnica de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) tiene la especificidad y sensibilidad necesarias para identificar especies fúngicas en un mínimo de tiempo. *Candida albicans* y otras especies del género, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, son algunos de los muchos hongos estudiados bajo este punto de vista molecular en búsqueda de métodos más sensibles y específicos para la detección temprana de las micosis que ellos causan.

Palabras clave: diagnóstico molecular, micosis, *Candida albicans*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*.

The molecular mycology in medical practice of century XXI.

Abstract

Molecular diagnostic methods are currently being used for the early detection of many viral, bacterial, parasitic and fungal infections. Due to their high specificity and sensitivity, these methods will be inserted in the routine of the clinical laboratories to complement information provided by more conventional methods and above all, to help in the diagnosis of dubious cases. The design of specific probes, coupled to the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique provides the required specificity and sensitivity to identify fungal species in a short time. *Candida albicans* and other species within the genus, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, are some of the fungal species studied from a molecular point of view in search for more sensitive and specific methods for the early detection of the mycoses they produce.

Key words: molecular diagnostics, mycosis, *Candida albicans*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*.

Introducción

A medida que la investigación biomédica progresa, especialmente en el campo molecular, la brecha existente entre el investigador científico y el clínico parece agrandarse al punto de creerse que éste puede ejercer sin las informaciones provenientes de la investigación o que el científico no necesita de esa información existencial provista por el médico¹.

Las preguntas de un médico tratante se resumen principalmente en las siguientes: ¿Qué hongo está infectando a mi paciente? ¿Cómo le fue transmitido? ¿Cuál será el tratamiento más efectivo? ¿Cuán rápido puedo obtener respuesta para un tratamiento oportuno y temprano? Las respuestas a estas preguntas requieren de apoyo de investigación en diagnóstico e identificación fúngica, epidemiología, procesos de patogenicidad, respuesta del

huésped, descubrimiento y desarrollo de nuevos antibióticos, entre otros. De manera que hay que cerrar la distancia entre investigadores y clínicos para que cada uno de estos sectores se nutra del otro y formen una unidad que irá sin duda en beneficio del paciente.

La incidencia de infecciones fúngicas invasoras ha ido en aumento en las últimas décadas y es una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad en pacientes inmunocomprometidos, tales como receptores de trasplantes, pacientes bajo tratamiento quimioterapéutico o con SIDA². Los métodos clásicos de identificación como los cultivos micológicos, suelen ser lentos en su respuesta ya que requieren semanas para su crecimiento o pueden dar falsos positivos o negativos, dependiendo de diversos factores relacionados con el patógeno o el huésped (como en las reacciones inmunológicas). Todo ello incide en la eficacia de cualquier tratamiento antifúngico, para el cual se requiere de una rápida e inequívoca identificación que permita seleccionar el antibiótico adecuado para cada caso. De allí que se continúan explorando otras posibilidades diagnósticas capaces de solventar las limitaciones existentes en las técnicas en uso.

Poco a poco los métodos moleculares de identificación fúngica y diagnóstico micológico formarán parte de la rutina de laboratorio clínico, para complementar los métodos microbiológicos e inmunológicos actualmente en práctica. La reacción en cadena de polimerasa (PCR o Polymerase Chain Reaction), en combinación con las sondas moleculares adecuadas, tiene la especificidad y sensibilidad necesarias para identificar especies fúngicas en un mínimo de tiempo³. Ella también es relevante en estudios epidemiológicos moleculares, patogénesis molecular, inmunología y seguimiento de tratamientos antifúngicos en pacientes afectados¹.

El desarrollo de la tecnología PCR se basa en tres pasos fundamentales:

1. la selección de una región blanco específica de DNA/RNA para identificar el hongo;
2. la extracción completa del DNA/RNA de la muestra clínica o ambiental;
3. un método para identificar la presencia de la región blanco en la muestra³.

Selección del blanco de DNA

Esto puede hacerse por selección de secuencias específicas tomadas de los bancos de datos genómicos, a partir de los cuales se diseñan sondas (primers) específicas, o por clonación y secuenciación de regiones arbitrarias del genoma fúngico. La zona más utilizada para el diseño de sondas específicas de diagnóstico es la referente a los genes ribosomales ya que estos se encuentran en todos los organismos y en número elevado de copias, lo que ayuda a una mejor detección del hongo y una mayor sen-

sibilidad de la reacción de PCR. El DNA ribosomal (rDNA) consta de tres genes: la subunidad larga 25S, la subunidad pequeña 18S y el gen 5.8S, los cuales están separados por las regiones espaciadoras (internal transcribed spacer o ITS), todos conformados en una unidad que se repite muchas veces. En general, estas subunidades tienen secuencias conservadas que permiten el diseño de sondas universales, mientras que la región ITS es de gran variabilidad, lo que permite el diseño de sondas específicas para especies.

Tomando en cuenta que el rDNA se encuentra en todos los organismos, algunos autores consideran que hay un alto riesgo de contaminación de muestras, por lo que prefieren usar otros genes más específicos, con la misma metodología PCR³ (Fig. 1).

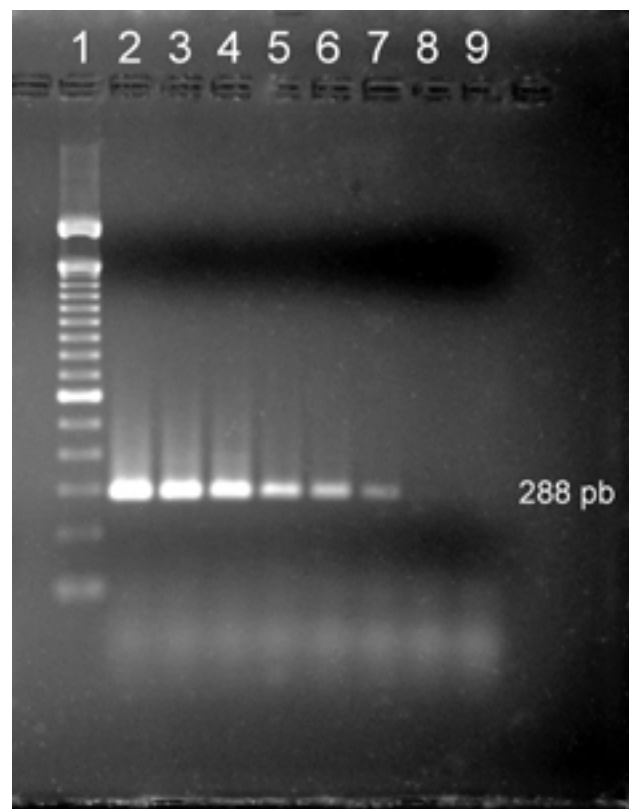


Fig. 1. Prueba de sensibilidad en PCR con primers MG2(2)F/MG2(2)R usados con DNA de *P. brasiliensis*, a partir de fragmentos generados por RAPD30. Las ampliaciones fueron detectados en electroforesis con geles de agarosa al 2% y teñidos con bromuro de etidio. Carril 1: Escalera de estándares de peso molecular 100 pb (Gibco Life Technologies); carril 2, 5ng de DNA genómico de *P. brasiliensis*; carril 3, 1ng; carril 4, 500 pg; carril 5, 100 pg; carril 6, 50 pg; carril 7, 10 pg; carril 8, 1 pg. El carril 9 es el control negativo (muestra sin DNA). (Niño-Vega et al., resultados inéditos).

Sondas universales y específicas para la identificación de numerosos hongos patógenos

Sandhu et al.⁴ desarrollaron 21 sondas específicas cuyo blanco era la subunidad grande de rRNA de 5 especies del género *Aspergillus*, 8 especies de *Candida*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Pseudallescheria boydii* y *Sporothrix schenckii*. Para ello, secuenciaron una sección del gen 28S de unos 100 hongos, secuencias que fueron utilizadas para el desarrollo de las sondas universales (a partir de las secuencias comunes) y sondas específicas (a partir de las secuencias específicas de cada especie). Cada sonda fue específica en reconocer su correspondiente organismo y no ocurrieron falsos positivos. Además, las pruebas fueron exitosas en muestras clínicas cuyos agentes patógenos se identificaron previamente por métodos tradicionales.

A partir del gen 18S rRNA, Einsele et al.⁵ desarrollaron otras sondas que fueron probadas en su especificidad y sensibilidad contra 134 especies fúngicas y 85 no fúngicas. El ensayo se aplicó a 601 muestras de sangre de un grupo control (A; n=35), pacientes con neutropenia febril, sin colonización fúngica (B; n=86) o con colonización fúngica (C; n=36) y pacientes con infección fúngica invasora documentada (D; n=21). El ensayo detectó e identificó la mayoría de las especies relevantes de *Candida* y *Aspergillus* a un límite de 1 unidad formadora de colonia por ml de sangre. La amplificación fue 100% sensible para todos los hongos probados, con la excepción de *H. capsulatum* que fue la única especie no-*Aspergillus* que hibridó con la sonda de este hongo. Ninguno de los pacientes del grupo A y solo 3 de los grupos B y C fueron positivos, mientras que la especificidad entre los pacientes del grupo D fue de 98%.

Particularmente interesante fue el hecho de que con estas sondas, los autores pudieron seguir el curso del tratamiento antifúngico en estos pacientes. En los casos de aspergilosis invasora, de 88 muestras positivas al inicio del tratamiento, sólo quedaron 22 a las tres semanas, figuras que se repitieron de manera similar en los casos de candidiasis invasora.

Candida spp

Candida albicans es el patógeno más común entre las especies de *Candida*. Sin embargo, en los últimos años se ha observado un desplazamiento en el espectro de especies de este género hacia *Candida* no-*albicans* en aislamientos clínicos⁶, particularmente candidemias causadas por *Candida parapsilosis* y *Candida glabrata*⁷, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii* o *Candida lusitanae*⁸. *Candida dubliniensis* se ha encontrado asociada a infecciones por HIV y SIDA⁹, aunque actualmente también se ha encontrado en pacientes HIV-negativos, lo cual refuerza la necesidad de encon-

trar métodos rápidos y específicos de identificación, en vista de las dificultades existentes en la correcta identificación de estas especies por métodos convencionales de cultivo o inmunológicos.

Varios procedimientos se han propuesto para la identificación de especies de *Candida* a partir de amplificaciones por PCR. Además de los genes ribosomales descritos en la sección anterior⁵, otros han sido publicados basados en secuencias ITS^{10,11} con resultados satisfactorios en cuanto a especificidad y sensibilidad. En combinación con PCR, Trost et al.⁶ usaron la técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) a partir de la cual el DNA es fragmentado en sitios diferentes según la enzima de restricción que se use. Una vez lograda la fragmentación, los segmentos son separados por electroforesis y las bandas producidas originan perfiles particulares para determinadas especies o aislamientos. De esta manera, los autores identificaron 16 especies de levaduras de importancia clínica, entre ellas *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* y *C. glabrata*, especies de difícil identificación por métodos tradicionales. En un trabajo subsiguiente, los mismos autores¹² lograron la diferenciación de *C. dubliniensis* y *C. albicans*.

Histoplasma capsulatum

La histoplasmosis es una micosis sistémica causada por *H. capsulatum* var. *capsulatum*, que representa un problema mundial de salud. A pesar de que la mayoría de los casos son moderados, alrededor de 5% de los pacientes desarrollan compromisos pulmonares o extrapulmonares que requieren tratamiento rápido una vez identificado el agente causal. El diagnóstico se basa en evaluación clínica, cultivo del organismo y pruebas inmunológicas de laboratorio como la fijación de complemento y pruebas de precipitina que detecta anticuerpos contra el principal marcador serodiagnóstico, el antígeno M.

Estos métodos tienen limitaciones asociadas a falsos positivos originados en las reacciones cruzadas de epítopes comunes a otros hongos patógenos. El gen que codifica para el antígeno M se ha secuenciado y presenta una gran homología con genes de catalasas fúngicas. Guedes et al.¹³ tomaron las regiones del gen del antígeno M con poca o ninguna homología para diseñar cuatro secuencias oligonucleotídicas que permitieran la identificación y diferenciación de *H. capsulatum* var. *capsulatum*.

El método fue capaz de identificar correctamente 31 cepas del hongo aisladas de pacientes, animales o suelo, en cantidades tan bajas como 1 pg de DNA; además identificó una cepa de *H. capsulatum* var. *duboisii*, que aunque es morfológica y epidemiológicamente distinta a la var. *capsulatum*, puede ser cruzada sexualmente con ésta. Sin embargo, las sondas fueron incapaces de detectar *H. capsulatum* var. *farciminosum*, una variedad que causa lesiones sólo en caballos y mulas.

Cryptococcus neoformans

C. neoformans es un hongo cosmopolita, causante de la criptococosis en humanos y animales. Su incidencia en pacientes inmunosuprimidos ha ido en aumento en la última década. Con base en la composición antigénica de su cápsula polisacáridica y otras diferencias biológicas, *C. neoformans* ha sido subdividido en dos variedades y cinco serotipos: *C. neoformans* var. *gatii* (serotipos B y C) y *C. neoformans* var. *neoformans* (Serotipos A, D, y AD). El serotipo A está distribuido alrededor del mundo y es el predominante en pacientes con SIDA¹⁴. El serotipo B tiene una distribución más restringida, encontrándose fundamentalmente en países tropicales o subtropicales. El análisis por RAPD permite la distinción entre serotipos A, B, D, o AD¹⁵. Aoki et al. desarrollaron exitosamente sondas para la rápida identificación específica de serotipos A o B¹⁶.

Una modificación de la técnica de PCR es el PCR anidado (nested PCR), que consiste en el uso de sondas externas en una primera ronda de PCR y luego sondas internas en la segunda. La criptococosis pulmonar y la meningitis criptococal han sido detectadas en estadios primarios a través de la técnica de PCR anidado^{17,18}. Usando sondas deducidas del gen URA5, Tanaka et al.¹⁷ lograron detectar 10 pg de DNA de *C. neoformans*, sin que hubiese reacción cruzada con DNA de otros hongos patógenos y bacterias. En muestras clínicas la reacción fue positiva en 4 de los 5 esputos de pacientes con criptococosis y negativa en todas las muestras de pacientes con otras etiologías.

Rappelli et al.¹⁸, en cambio, usaron sondas originadas de la región ITS de DNA ribosomal para la detección de *C. neoformans* en fluido cefalorraquídeo. Se obtuvieron reacciones positivas en las 21 muestras clínicas de pacientes previamente diagnosticados con meningitis criptococal y reacciones negativas en los 19 controles. La sensibilidad fue elevada, ya que pudo detectarse DNA correspondiente a 10 células. Al comparar los resultados obtenidos por PCR anidado y aquellos provenientes de técnicas convencionales, los autores notaron que a lo largo de terapia antifúngica los títulos de antígenos decrecían lentamente en suero y en líquido cefalorraquídeo, a pesar de que no se detectaban células en cultivos ni en la reacción de PCR, lo que indicaba una persistencia de la respuesta antigénica, mayor de cinco meses, más allá de la existencia de células viables (invisibles al microscopio e indetectables por PCR luego de un mes de terapia). Como quiera que los médicos tratantes mantuvieron su tratamiento mientras duró la respuesta antigénica, se concluyó que el tratamiento podría ser abreviado a favor del paciente, una vez comprobada la negatividad de las pruebas de PCR.

Coccidioides immitis y Coccidioides posadasii

La coccidioidomicosis es una micosis sistémica, endémica exclusivamente en zonas semiáridas del continente americano. Su agente etiológico es *C. immitis*, que vive bajo la forma de artroconidias en la tierra, en su forma saprofita. Al ser inhaladas, las artroconidias se transforman en esférulas que producen endosporas por invaginación de su pared celular. Al romperse, las esférulas liberan alrededor de 800 endosporas. Con base en polimorfismos de nucleótidos simples y tamaño de microsátélites, lo que antes se conocía como cepas californianas y cepas no californianas fueron divididas recientemente en dos especies, *C. immitis* y *C. posadasii*¹⁹.

El diagnóstico se hace por serología, histopatología y cultivo, métodos de baja sensibilidad y largo tiempo de resolución. De manera que en tiempos recientes se ha explorado la posibilidad de usar los nuevos métodos moleculares de diagnóstico para aplicarlos a la coccidioidomicosis. Peng et al.²⁰ describieron la presencia de un antígeno rico en prolina como candidato a ser usado como vacuna contra *C. immitis*, por cuanto dicho antígeno se encuentra en alto estado de conservación en muchas de las cepas estudiadas. A partir de la secuencia de nucleótidos del gen que codifica esta proteína, Bialek et al.²¹ diseñaron dos pares de sondas para usarlas con la técnica de PCR anidado en la identificación específica de 120 cepas clínicas de *C. posadasii*. La sensibilidad de la prueba fue de 1 fg, equivalente a 1-10 copias genómicas.

Otro estudio, llevado a cabo por Johnson et al.²², permitió la detección de 10 fg de DNA de *C. immitis* o *C. posadasii*, con sondas diseñadas a partir de secuencias ITS de DNA ribosomal de *C. immitis*. De las muestras negativas contra el antígeno coccídico, varias resultaron positivas en la reacción molecular. Al repetir los ensayos, un mes más tarde, las pruebas antigénicas también resultaron positivas con lo cual se pudo establecer la precocidad de la prueba molecular en predecir la infección, cuando otros métodos no la detectaban.

Paracoccidioides brasiliensis

El diagnóstico concluyente de paracoccidioidomicosis ha residido tradicionalmente en la identificación del hongo en pacientes y en diagnósticos serológicos que dependen en la detección de anticuerpos. Entre éstos, el antígeno gp43 es el más importante y se ha convertido en el antígeno de referencia en la paracoccidioidomicosis²³. Sin embargo, gp43 puede desaparecer de la circulación durante el tratamiento²⁴, o puede producir falsos negativos²⁵, y ocasionales reacciones cruzadas²⁶, probablemente debidas al polimorfismo presentado por gp43²⁷. Actualmente se están desarrollando una serie de métodos moleculares que faciliten el diagnóstico de la paracoccidioidomicosis. De manera relevante, se han escogido las regiones ITS²⁸ o gp43²⁹ para diseñar primers específicos, con éxito en la identificación específica de *P. brasiliensis*. Usando sondas derivadas de gp43, Gomes et al.²⁹

demonstraron la presencia de *P. brasiliensis* en muestras de esputo de pacientes con paracoccidioidomicosis.

En nuestro laboratorio hemos desarrollado un método diagnóstico molecular, basado en dos fragmentos (0,72 y 0,83 kb) que generan los DNA de todas las cepas de *P. brasiliensis* hasta ahora estudiadas, cuando son sometidos a la técnica de RAPD usando como primer OPG18 (Operon)³⁰. A partir de esos dos fragmentos se han generado sondas, de las cuales se ha escogido un par proveniente del fragmento más grande, que ha resultado específico para *P. brasiliensis*, capaz de detectar hasta 10 pg de DNA fúngico (Niño-Vega et al., resultados inéditos). Actualmente se está probando con esputos y lavados broncoalveolares de pacientes con paracoccidioidomicosis, a los efectos de explorar su posible uso clínico en el diagnóstico de esta micosis (Fig. 1).

Comentarios finales

En la actualidad los métodos moleculares de diagnóstico se emplean para la detección temprana de gran cantidad de infecciones virales, bacterianas, parasitarias y ahora también, fúngicas. Debido a su alta especificidad y sensibilidad, estos métodos poco a poco se insertarán en la rutina de los laboratorios clínicos para complementar la información proveniente de métodos más convencionales y sobre todo, para ayudar en el diagnóstico de casos dudosos.

En estos tiempos de inmunosupresión frecuente en la población por diversas causas, la emergencia de nuevas micosis y la agresividad inédita de las viejas son publicadas constantemente en la literatura científica. Esto hace imperativo para el personal clínico y de laboratorio la disponibilidad de métodos de diagnóstico efectivos y rápidos, como los de origen molecular que aquí hemos descrito.

Referencias

- Odds FC. Reflections on the question: What does molecular mycology have to do with the clinician treating the patient? *Med Mycol* 2003;41:1-6.
- Martin GS, Mannino DM, Eaton S et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003;348:1546-1554.
- Atkins SD, Clark IM. Fungal molecular diagnostics: a mini review. *J Appl Genet* 2004;45:3-15.
- Sandhu GS, Kline BC, Stockman L, Roberts GD. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *J Clin Microbiol* 1995;33:2913-2919.
- Einsele H, Hebart H, Roller G, et al. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol* 1997;35:1353-1360.
- Trost A, Graf B, Eucker J et al. Identification of clinically relevant yeasts by PCR/RFLP. *J Microbiol Meth* 2004;56:201-211.
- Malani PN, Bradley SF, Little RS et al. Trends in species causing fungaemia in a tertiary care medical centre over 12 years. *Mycoses* 2001;44:446-449.
- Kao AS, Brandt ME, Pruitt WR et al. The epidemiology of candidemia in two United States cities: results of a population-based active surveillance. *Clin Infect Dis* 1999;29:1164-1170.
- Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, et al. *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals. *Microbiology* 1995;141:1507-1521.
- Lindsley MD, Hurst SF, Iqbal NJ et al. Rapid identification of dimorphic and yeast-like fungal pathogens using specific DNA probes. *J Clin Microbiol* 2001;39:3505-3511.
- Selvarangan R, Limaye AP, Cookson BT. Rapid identification and differentiation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by capillary-based amplification and fluorescent probe hybridisation. *J Clin Microbiol* 2002;40:4308-4312.
- Graf B, Trost A, Eucker J et al. Rapid and simple differentiation of *C. dubliniensis* from *C. albicans*. *Diag Microbiol Infect Dis* 2004;48:149-151.
- Guedes HLM, Guimaraes AJ, Muniz MM et al. PCR assay for identification of *Histoplasma capsulatum* based on the nucleotide sequence of the M antigen. *J Clin Microbiol* 2003;41:535-539.
- Kwon-Chung KJ, Wickes BL, Stockman L et al. Virulence, serotype, and molecular characteristics of environmental strains of *Cryptococcus neoformans* var. *Gatii*. *Infect Immun* 1992;60:1869-1874.
- Ruma P, Chen SC, Sorrell TC et al. Characterization of *Cryptococcus neoformans* by random DNA amplification. *Lett Appl Microbiol* 1996;23:312-316.
- Aoki FH, Imai T, Tanaka R et al. New PCR primer pairs specific for *Cryptococcus neoformans* serotype A or B prepared on the basis of random amplified polymorphic DNA fingerprint pattern analyses. *J Clin Microbiol* 1999;37:315-320.
- Tanaka K, Miyazaki T, Maesaki S et al. Detection of *Cryptococcus neoformans* gene in patients with pulmonary cryptococcosis. *J Clin Microbiol* 1996;34:2826-2828.
- Rapelli P, Are R, Casu G et al. Development of a nested PCR for detection of *Cryptococcus neoformans* in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol* 1998;36:3438-3440.
- Fisher MC, Koenig GL, White TJ et al. Molecular and phenotype description of *Coccidioides posadasii* sp. nov., previously recognized as the non-Californian population of *Coccidioides immitis*. *Mycologia* 2002;94:73-84.
- Peng T, Orsborn KI, Orbach MJ et al. Proline-rich vaccine candidate antigen of *Coccidioides immitis*: conservation among isolates and differential expression with spherule maturation. *J Infect Dis* 1999;179:518-521.
- Bialek R, Kern J, Herrman T et al. PCR assays for identification of *Coccidioides posadasii* based on the nucleotide sequence of the antigen2/proline-rich antigen. *J Clin Microbiol* 2004;42:778-783.
- Johnson S, Simmons KA, Pappagianis D. Amplification of coccidioidal DNA in clinical specimens by PCR. *J Clin Microbiol* 2004;42:1982-1985.
- San-Blas G, Niño-Vega G, Iturriaga T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: Molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med Mycol* 2002;40:225-242.
- Mendes-Gianinni MJS, Bueno JP, Shikanai-Yashuda MA et al. Detection of 43,000-molecular-weight glycoprotein in sera of patients with paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol* 1989;27:2842-2845.
- Del Negro GMB, Benard G, Assis CM et al. Lack of reactivity of paracoccidioidomycosis sera in the double immunodiffusion test with the gp43 antigen: report of two cases. *J Med Vet Mycol* 1995;33:113-116.
- Puccia R, Travassos LR. 43-kilodalton glycoprotein from *Paracoccidioides brasiliensis*: immunological reactions with sera from patients with paracoccidioidomycosis, histoplasmosis and Jorge Lobo disease. *J Clin Microbiol* 1991;29:1610-1615.
- Morais FV, Barros TF, Fukada MK et al. Polymorphism in the gene coding for the immunodominant antigen gp43 from the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Clin Microbiol* 2000;38:3960-3966.
- Imai T, Sano A, Miyami Y et al. 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;38:323-326.
- Gomes GM, Cisalpino PS, Taborda CP et al. PCR for diagnosis of paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol* 2000;38:3478-3480.
- Calcagno AM, Niño-Vega G, San-Blas F et al. Geographic discrimination of *Paracoccidioides brasiliensis* strains by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol* 1998;36:1733-1736.