

Identificação molecular de isolados de fungos de interesse médico por meio de marcadores RAPD

Anabele Azevedo Lima¹

Valdi Lopes Tutunji²

Luzia Helena Corrêa Lima³

Paulo Roberto Queiroz⁴

Resumo

Aspergillus e *Penicillium* são microrganismos capazes de provocar complicações clínicas consideráveis, principalmente em pacientes imunossuprimidos. A análise molecular é uma estratégia importante para a identificação rápida e precisa desses agentes patogênicos. Por isso, o objetivo deste trabalho é descrever padrões de marcadores RAPD específicos para a identificação de isolados de *Aspergillus* e *Penicillium* causadores de doenças de interesse médico. A análise morfológica revelou que 14 isolados eram do gênero *Aspergillus*, 7 eram *Penicillium*, 1 correspondente a *Fusarium* e 1 isolado não foi identificado. A análise por RAPD com 10(dez) iniciadores produziu fragmentos de DNA característicos para cada gênero. O dendrograma revelou grupos de isolados dentro de cada gênero de fungo de acordo com perfis de marcadores específicos, identificando isolados muito semelhantes que apresentaram alto coeficiente de similaridade. Esses dados fornecem opções para o desenvolvimento de oligonucleotídeos de PCR para a identificação de isolados específicos que ocorrem no ambiente médico-hospitalar.

Palavras-chave: Análise de DNA. *Aspergillus*. *Penicillium*. Polimorfismo.

¹ Graduada em Biologia. UniCEUB. Mestre em Biologia Molecular – UnB; e-mail: anabelebio@gmail.com

² Especialista em Saúde Pública - Fundação Oswaldo Cruz; e-mail: antibios@antibios.org

³ Ph. D Biologia Molecular. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. e-mail: luzia@cenargen.embrapa.br

⁴ Ph. D Biologia Animal. Universidade de Brasília – UnB. Professor do curso de Biomedicina UniCEUB; e-mail: pqsilva@uol.com.br.

Apoio: Projeto Institucional Vinculado ao UniCEUB

1 Introdução

O Filo Ascomycota possui 46 ordens e cerca de 6.000 gêneros, entre eles encontram-se os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. As espécies do gênero *Aspergillus* caracterizam-se por apresentarem conidióforos simples, com parede celular lisa, verrugosa, hialinos ou pigmentados. São agentes oportunistas por excelência, pois podem provocar colonização em cavidades preexistentes, infecção, processos alérgicos e intoxicações (DIAZ-GUERRA, 2000; MELLADO, 2000).

Os membros do gênero *Aspergillus* spp, por serem patógenos oportunistas, causam a maioria das infecções ocorridas em pessoas imunodeprimidas. *Aspergillus fumigatus* é um dos agentes mais comuns que causam infecções sistêmicas, seguido da espécie *Aspergillus flavus*. São fungos filamentosos que podem causar aspergilose bronquiopulmonar, aspergiloma e aspergilose invasiva. Tais condições são geralmente adquiridas pela inalação dos conidiósporos do fungo, causando infecções pulmonares ou pela ingestão de alimentos contaminados (RHAME, 1991).

A maioria das espécies do gênero *Penicillium* é saprófita, sendo encontradas no solo, em vegetais em decomposição, em sementes e em grãos (PITT, 1994). Várias espécies são conhecidas pela importância na produção de uma variedade de metabólitos secundários bioativos de importância farmacológica. Entretanto, algumas espécies são capazes de provocar doenças oportunistas em humanos, tais como, infecções no sistema nervoso central em pacientes imunossuprimidos (NORITOMI et al, 2005). A taxonomia e classificação são feitas por meio de critérios morfológicos e bioquímicos (LARSEN, 2000).

As espécies do gênero *Fusarium* possuem uma classificação baseada em características morfológicas, pigmentação, taxa de crescimento, especificidade de hospedeiros e perfil de metabólitos secundários (THRANE, 1990). Em função das variações nas características fenotípicas, a taxonomia do gênero *Fusarium*, baseada somente em conceitos morfológicos, não é totalmente satisfatória (OLIVEIRA, 2002). As espécies de *Fusarium* são patógenos oportunistas que causam micoses que podem ser fatais (HUE; HUERRE; ROUFFAUT, 1999).

Sendo assim, a análise molecular é uma ferramenta importante no estabelecimento de um sistema complementar de identificação de fungos. Estudos recentes vêm aplicando técnicas moleculares como a análise do polimorfismo do DNA amplificado ao acaso (RAPD) (WILLIAMS ., 1990) o qual tem demonstrado ser um método rápido na identificação de espécies, tais como: *A. fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium sporotrichioides* e *Penicillium expansum* (LEENDERS et al, 1996; HUE, 1999; RATH, 1999; SYMOENS, 2000; WILSON, 2004; LOURENÇO, 2007).

Os marcadores RAPD podem auxiliar na identificação de microrganismos por meio de suas diferenças genéticas, como também identificar e agrupar genótipos diferentes de várias espécies. Além disso, são procedimentos que ampliam o conhecimento da diversidade genética, contribuindo com mais um parâmetro no controle de qualidade de ambientes hospitalares e identificação de patógenos oportunistas (BERED, 1997). Ressalte-se também que, a partir de marcadores RAPD específicos para cada gênero de fungo, é possível a conversão para marcadores baseados em PCR, aumentando a precisão, a eficiência e a rapidez do processo de identificação de fungos causadores de doenças de importância médica.

2 Objetivo

Descrever padrões de marcadores RAPD específicos para a identificação de isolados de *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* causadores de doenças de interesse médico.

3 Materiais e métodos

Isolados de fungos

Foram analisados 23 isolados de *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* (Tabela 1) previamente identificados e pertencentes à coleção de fungos do curso de biomedicina do Centro Universitário de Brasília (UniCEUB).

Crescimento dos isolados de fungos

Isolados de *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* foram crescidos previamente em frascos de vidro de 100 mL contendo 10 mL de meio BDA (Dextrose 40 g. L⁻¹; Ágar 30 g. L⁻¹; Infusão de batata q. s. p. 1000 mL) a 25°C por 72 h.

Após a esporulação, esporos foram transferidos para frascos de vidro de 100 mL contendo 20 mL de meio BDA e incubados a 25 °C por 72 h.

Em seguida, adicionou-se a cada frasco cerca de 40 mL de meio YG (Extrato de levedura 5 g. L⁻¹; Glicose 20 g. L⁻¹; Água destilada q. s. p. 1000 mL), mantendo-se a 25 °C por 5 dias, até obter uma quantidade de micélio suficiente para a extração do DNA.

Extração de DNA

Para se obter DNA genômico, utilizou-se uma adaptação da metodologia descrita por Azevedo . (2003). Após o crescimento dos fungos em meio YG, os micélios foram filtrados em papel de filtro (12,3 cm de diâmetro), lavados duas vezes com 200 mL de água destilada, identificados e armazenados a -20 °C até o momento do uso.

Com o auxílio de um bisturi, foram retirados aproximadamente 200 mg de massa micelial e transferidos para um tubo plástico de 1,5 mL onde foram maceados manualmente.

Após a maceração, adicionou-se à amostra 500 µL da solução de extração de DNA (50 mL de sacarose 2 M, 0,2 mL de β-mercaptoetanol (100%), NaCl 100 mM e SDS 0,5% e água destilada q. s. p. 200 mL). Em seguida, adicionou-se 500 µL da solução fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24: 1) em cada tubo plástico, agitando-se em vortex por 45s e armazenando-se os tubos no gelo por 5 min. Repetiu-se a agitação e submeteram-se os tubos à centrifugação de 13.000 x g por 10 min. O sobrenadante foi transferido para novos tubos plásticos de 1,5 mL, no qual foi acrescentado novamente 500 µL da solução fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, seguindo-se agitação e centrifugação a 13.000 x g por 10 minutos.

Tabela 1: Isolados de fungos utilizados na obtenção dos marcadores moleculares RAPD.

Número da amostra	Código do isolado	Gênero
1	F117	<i>Aspergillus</i> sp.
2	F123	Não identificado
3	F0099	<i>Penicillium</i> sp.
4	F132	<i>Aspergillus</i> sp.
5	F004	<i>Aspergillus</i> sp.
6	F013	<i>Penicillium</i> sp.
7	F121	<i>Aspergillus</i> sp.
8	F0065	<i>Penicillium</i> sp.
9	F135	<i>Aspergillus</i> sp.
10	P002	<i>Fusarium</i> sp.
11	F076	<i>Aspergillus</i> sp.
12	F024	<i>Aspergillus</i> sp.
13	F136	<i>Aspergillus</i> sp.
14	F133	<i>Aspergillus</i> sp.
15	F118	<i>Aspergillus</i> sp.
16	F0062	<i>Penicillium</i> sp.
17	F0002	<i>Aspergillus</i> sp.
18	F122	<i>Aspergillus</i> sp.
19	F0125	<i>Aspergillus</i> sp.
20	F0012	<i>Penicillium</i> sp.
21	F0129	<i>Penicillium</i> sp.
22	F134	<i>Aspergillus</i> sp.
23	F119	<i>Aspergillus</i> sp.

O sobrenadante foi transferido para novos tubos plásticos de 1,5 mL, sendo ajustada a concentração de NaCl do sobrenadante para 0,3 M. Em seguida, foram adicionados dois volumes de etanol 100% gelado (4 °C), incubando-se os tubos por 16 h a -20 °C.

Após a precipitação, as amostras foram centrifugadas a 13.000 x g por 5 min. O etanol foi descartado e adicionado 500 µL de etanol 70% gelado, centrifugando-se a 13.000 x g por 5 min. Em seguida, o etanol foi descartado, o processo repetido e os precipitados de ácidos nucleicos foram secos à temperatura ambiente.

Posteriormente os ácidos nucleicos totais foram ressuspensos em 200 µL de TE 1 X (Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM pH 8. 0). Adicionou-se 1 µL

de RNase A (20 mg. mL⁻¹) às amostras, mantendo-se a 37 °C por 2 h. Ao final, as amostras foram mantidas a 10 °C ou a -20 °C até o momento do uso. Para as análises por RAPD, as amostras de DNA foram diluídas para 20 ng. µL⁻¹ com TE 0,1 X (Tris-HCl 1 mM pH 8,0 e EDTA 0,1 mM pH 8. 0).

Reações de RAPD

As reações de amplificação foram feitas em um volume total de 35 µL, contendo 24,9 µL de água milliQ, 3,0 µL de tampão 10 X (Amersham Biotech), 0,6 µL de dNTP's 10 mM (Invitrogen), 1,2 µL iniciador (Operon Technologies, CA, USA) na concentração de 10 µM, 0,3 U. µL⁻¹ *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e 5 µL do DNA (20 ng. µL⁻¹).

Foram utilizados vinte iniciadores de sequência aleatória (OPA-03: AGTCAGCCAC; OPA-04: AATCGGGCTG; OPA-10: GTGATCCGAG; OPA-11: CAATCGCCGT; OPA-12: TCGGCGATAG; OPA-13: CAGCACCCAC; OPA-15: TTCCGAACCC; OPA-17: GACCGCTTGT; OPA-18: AGGTGACCGT; OPA-20: GTTGGTGGCT; POR-01: TGCGGGTCCT; OPR-02: CACAGCTGCC; OPR-04: CCCGTAGCAC; OPR-05: GACCTAGTGG; OPR-06: GTCTACGGCA; OPR-08: CCCGTTGCCT; OPR-09: TGAGCACGAG; OPR-10: CCATTCCCCA; OPR-13: GGACGACAAG; OPR-14: CAGGATTCCC) para a obtenção dos perfis de RAPD. Ao final, adicionou-se 30 µL de óleo mineral para evitar a evaporação das amostras.

Ciclos de amplificação

As amplificações foram efetuadas em termociclador (PTC-100 MJ Research), programado para uma etapa de desnaturação inicial a 95 °C por 3 min, seguindo-se 45 ciclos a 95 °C por 1 min, 35 °C por 1 min e 72 °C por 1 min. Ao final, realizou-se uma etapa de extensão a 72 °C por 5 min.

Análise por eletroforese dos fragmentos de DNA gerados por RAPD

Os produtos de amplificação originários das reações de RAPD foram separados em gel de agarose 1,5% (Sigma) submerso em tampão TBE 1X (Tris-borato 90 mM e EDTA 1 mM, Sigma) durante 3 h a 160 V. Ao término da corrida, os géis foram corados por 30 min em uma solução corante contendo brometo de etídio ($5 \mu\text{g. mL}^{-1}$), descorados por 30 min em água destilada e fotografados sob luz ultravioleta no comprimento de onda de 300 nm. A documentação fotográfica foi feita usando-se o sistema EagleEye II still video system (Stratagene).

Em todos os géis, marcadores de massa molecular (100 bp Ladder - Invitrogen) foram usados para a determinação da massa molecular dos fragmentos amplificados pela técnica de RAPD.

Análise dos dados

As fotos das amplificações realizadas com os oligonucleotídeos selecionados foram utilizadas para a análise do polimorfismo entre os isolados analisados. Os fragmentos de DNA presentes nos géis foram considerados como marcadores RAPD. Logo após, foi gerada uma matriz de similaridade, levando-se em consideração as relações entre indivíduos iniciadores e massas moleculares dos fragmentos obtidos com um dado oligonucleotídeo. Utilizou-se o valor 1 para a presença de um marcador e 0 para a ausência. No caso de dúvida, o número 9 foi usado como padrão.

A seguir, a planilha obtida foi submetida a um programa de análise estatística multivariada para a determinação das distâncias genéticas entre os indivíduos. A matriz de similaridade foi obtida por meio do coeficiente de Jaccard (SNEATH; SOKAL, 1973) e que, por meio da análise por UPGMA - Unweighted Pair-Group Method Analysis - (SWOFFORD; OLSEN, 1990), produziu um dendrograma que evidenciou o agrupamento dos isolados, utilizando-se o programa NTSYS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) versão 2.02 pc (RHOLF, 1993).

Os valores obtidos e tabelados em uma planilha foram submetidos à análise de variância molecular (AMOVA) para a determinação estatística das possíveis origens das variabilidades encontradas nas amostras pela aplicação de algoritmos específicos pelo programa Arlequin version 2000 (SCHNEIDER, 2000).

4 Resultados e discussão

Identificação morfológica dos isolados de fungos

Observou-se que dos 23 isolados utilizados nesse estudo, 14 foram identificados como sendo do gênero *Aspergillus* (60,87%), 7 relacionados ao gênero *Penicillium* (30,43%) e 1 correspondente ao gênero *Fusarium* (4,35%). Além disso, 1 isolado (4,35%) não foi identificado pelos critérios morfológicos.

A partir dessas informações, os isolados foram submetidos à análise molecular para a confirmação das identificações pelos critérios morfológicos.

Metodologia de obtenção de ácidos nucleicos de fungos

As adaptações do protocolo de extração de DNA, baseado em Azevedo . (2003), produziram DNA em quantidade e qualidade suficientes para se aplicar a técnica de RAPD, levando-se em consideração algumas modificações como a não utilização do nitrogênio líquido e outras soluções como o tampão de espermidina 10 X (Espermidina 40 mM; Na₂EDTA 100 mM; Tris-base 100 mM, pH 8,5), o tampão TNE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM, pH 8,0; NaCl 100 mM) e triton X-100 10% (p/v). A partir dessas adaptações, obteve-se em torno de 1 µg.mL⁻¹ de DNA por amostra, ou seja, reduziu-se o custo operacional garantindo-se a viabilidade da metodologia quanto à sua função.

Oligonucleotídios de RAPD

Dentre os oligonucleotídios testados, dez deles apresentaram sucesso na amplificação dos fragmentos de DNA (OPA-03, OPA-04, OPA-10, OPA-11, OPA-13, OPR-02, OPR-04, OPR-06, OPR-09 e OPR-10), enquanto dez não produziram perfis que pudessem ser considerados para as análises moleculares (OPA-12, OPA-15, OPA-17, OPA-18, OPA-20, OPR-01, OPR-05, OPR-08, OPR-13 e OPR-14).

Os dez oligonucleotídios de RAPD selecionados produziram um total de 136 fragmentos de amplificação com uma média de $13,6 \pm 3,13$ marcadores por iniciador (Tabela 2).

Tabela 2: Número total de fragmentos produzidos por 10 iniciadores de RAPD utilizados na análise dos isolados pertencentes a três gêneros de fungos. D. P. Desvio padrão

Iniciador de RAPD	Fragmentos gerados por iniciador
OPA-03	16
OPA-04	16
OPA-10	14
OPA-11	16
OPA-13	16
OPR-02	9
OPR-04	16
OPR-06	8
OPR-09	14
OPR-10	11
Total	136
Média	13,6
D. P.	3,13

Observou-se que os oligonucleotídios OPA-03, OPA-04, OPA-11, OPA-13 e OPR-04 produziram o maior número de fragmentos de DNA por iniciador, enquanto os oligonucleotídios OPR-06 e OPR-02 produziram o menor número de produtos de amplificação por RAPD.

Os 10 iniciadores de RAPD selecionados produziram perfis eletroforéticos para a identificação dos isolados relacionados aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (Tabela 3).

Tabela 3: Tipos de fragmentos gerados por 10 iniciadores de RAPD utilizados na identificação molecular e análise filogenética de *Aspergillus* e *Penicillium*.

Fragmentos de DNA	Iniciador de RAPD										Total
	OPA					OPR					
	03	04	10	11	13	02	04	06	09	10	
Específicos para <i>Aspergillus</i>	3	4	0	3	3	0	0	0	0	2	15
Específicos para <i>Penicillium</i>	2	4	0	0	3	0	1	0	5	0	15
Isomórficos <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i>	0	2	11	0	2	0	0	0	0	0	15
Polimórficos <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i>	11	6	3	13	8	9	15	8	9	9	91
Total	16	16	14	16	16	9	16	8	14	11	136

Os oligonucleotídeos OPA-11 e OPR-10 produziram fragmentos de RAPD específicos para *Aspergillus* (3,7%), enquanto os iniciadores OPR-04 e OPR-09 geraram produtos de RAPD específicos para a identificação de *Penicillium* (4,4%).

Observou-se também que os iniciadores OPA-04, OPA-10 e OPA-02 geraram fragmentos de DNA comuns a ambos os gêneros (11,0%). Os iniciadores da série OPR não geraram qualquer fragmento isomórfico relacionados aos fungos em questão.

Quanto à obtenção de fragmentos de RAPD polimórficos, os oligonucleotídeos OPR-04 e OPA-11 geraram o maior número de produtos de amplificação correspondendo a 20,6%.

Em seguida, analisou-se a porcentagem de cada oligonucleotídeo na obtenção de perfis eletroforéticos relacionados para cada gênero de isolado, incluindo aquele não identificado (Tabela 4).

Tabela 4: Porcentagem de fragmentos de DNA (%) gerados por oligonucleotídeos de RAPD na identificação de isolados de fungos de interesse médico.

Gênero	Fragmentos de DNA gerados por oligonucleotídio de RAPD (%)										Total (%)
	OPA					OPR					
	03	04	10	11	13	02	04	06	09	10	
<i>Aspergillus</i>	14,4	13,3	10,4	12,9	7,7	17,7	4,9	8,4	6,2	4,2	100
<i>Penicillium</i>	10,3	12,4	9,8	13,5	9,8	17,7	4,4	12,4	7,2	2,6	100
<i>Fusarium</i>	5,9	11,8	7,4	11,8	11,8	20,6	7,4	5,9	13,2	4,4	100
Não identificado	9,7	19,4	12,9	29	22,6	0	0	6,5	0	0	100

Observou-se que o iniciador OPR-02 foi responsável por 17,7% da geração de fragmentos de RAPD nos isolados dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, como também para *Fusarium*, com 20,6%. Para o isolado não identificado observou-se que o iniciador OPA-11 correspondeu a 29% na obtenção dos fragmentos de RAPD.

Contudo, o iniciador OPR-10 gerou as menores porcentagens de produção de fragmentos de RAPD para a análise dos isolados de *Fusarium* (4,4%), *Aspergillus* (4,2%) e *Penicillium* (2,6%).

Com relação ao isolado não identificado, observou-se que os oligonucleotídeos OPR-02, OPR-04, OPR-09 e OPR-10 não produziram fragmentos de RAPD que permitissem a sua identificação. Com relação à série R, apenas o oligonucleotídio OPR-06 gerou fragmentos de amplificação (6,5%).

Perfis eletroforéticos de RAPD

O padrão de fragmentos de DNA obtido para cada um dos isolados analisados permitiu identificar marcadores moleculares específicos para os gêneros de acordo com o oligonucleotídio utilizado (Figura 1).

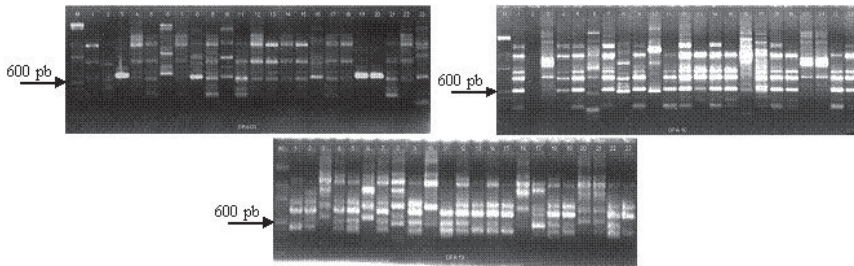


Figura 1: Perfis eletroforéticos de isolados de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, produzidos pela utilização de vários oligonucleotídeos de RAPD. A letra M indica o marcador de massa molecular 100 pb ladder. Os números de acordo com a Tabela I indicam: 1, 4, 5, 7, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 23 e 24, isolados do gênero *Aspergillus*; 3, 6, 8, 17, 20, 21 e 22, isolados de *Penicillium*; 11, isolado pertencente ao gênero *Fusarium*; 2, isolado de fungo não identificado.

O iniciador OPA-03 produziu fragmentos isomórficos de 650 pb, 950 pb e 1500 pb nos isolados de *Aspergillus*. Para os isolados de *Penicillium*, observou-se um fragmento comum de aproximadamente 500 pb.

Para os isolados de *Aspergillus* o iniciador OPA-10 produziu fragmentos comuns de 650 pb, 850 pb, 1000 pb e 1550 pb. Entretanto, o isolado 17, no gel de agarose, produziu um perfil diferente dos demais. Em *Penicillium* foram observados genótipos diferenciados. Os isolados 3, 20 e 21 apresentaram o mesmo padrão de fragmentos de RAPD enquanto os isolados 6, 8 e 16 apresentaram perfis distintos entre si, reforçando a presença de genótipos diferentes entre os isolados desse gênero.

O iniciador OPA-13 produziu um padrão de fragmentos de RAPD comum à maioria dos isolados de *Aspergillus*, exceto para o isolado 17. Em *Penicillium*, observou-se perfil similar de marcadores para os isolados 3, 20 e 21. Contudo, para os isolados 6, 8 e 16 os padrões apresentaram variação, sugerindo a presença de genótipos diferentes.

O isolado não identificado apresentou padrão de fragmentos similar aos genótipos de *Aspergillus*. Entretanto, a diferença foi relacionada à presença de fragmentos que não foram encontrados em nenhum isolado de *Aspergillus*.

As reações de amplificação de RAPD apresentaram reprodutibilidade nas triplicatas para cada iniciador. Segundo Cruz e Milach (1998), a reprodutibilidade está

fortemente associada à qualidade do DNA e à padronização das condições de reação. O número de fragmentos amplificados normalmente é, em função da espécie, do oligonucleotídeo e das condições da amplificação. Em reações de RAPD, normalmente são amplificados fragmentos entre 500 pb a 2500 pb (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). No presente trabalho, a maior parte dos marcadores obtidos ficou no intervalo de 200 pb a 1300 pb.

Vários estudos demonstraram a viabilidade do emprego, ainda da técnica de RAPD, na identificação de fungos de interesse médico. Linhagens de *A. fumigatus* isoladas de 4 pacientes hospitalares foram discriminadas pelo emprego da técnica de RAPD utilizando o iniciador R108 (SEMIGHINI; DELMAS; PARK, 2001). Essa metodologia também foi aplicada na diferenciação de *F. sporotrichioides* e *Fusarium langsethiae* (WILSON; SIMPSON; CHANDLER., 2004). Cardoso, Queiroz e Pereira (2007) testaram 78 iniciadores de RAPD e 8 apresentaram diferenças no padrão de fragmentos, com 54% de polimorfismo. A partir desses estudos, foram obtidos 2 fragmentos de 600 pb e 594 pb para a identificação de *P. expansum* e *Penicillium griseoroseum*. Nesse trabalho, com o emprego de apenas 10 iniciadores de RAPD obteve-se 67% de polimorfismo entre os isolados dos dois gêneros de fungos.

Os resultados desse trabalho produziram 15 potenciais fragmentos de DNA capazes de discriminar, de forma rápida, os isolados de *Aspergillus* e *Penicillium* por RAPD. Os iniciadores OPA-03, OPA-04 e OPA-13 podem ser simultaneamente usados para a discriminação desses dois gêneros de fungos. Confirmou-se pela estratégia adotada que o isolado F123 pertence a outro gênero de fungo, uma vez que o iniciador OPA-11 foi o responsável pela maior parte do polimorfismo para esse isolado, diferentemente do oligonucleotídeo OPR-02 que foi o maior responsável pela geração de variabilidade entre os demais isolados de fungos. Em *Penicillium*, provavelmente, existem genótipos diferentes. Os iniciadores OPA-04, OPA-10 e OPA-13 mostram o potencial em gerar fragmentos de DNA para a discriminação desses genótipos. Por essa estratégia, ainda se questionou a identificação do isolado P002 como sendo pertencente ao gênero *Fusarium*.

Esses procedimentos moleculares simples podem ser usados na triagem de pacientes acometidos por alguma infecção fúngica, reduzindo os custos operacionais

de identificação do patógeno e aumentando a eficiência do procedimento de identificação, não necessitando o desenvolvimento de sistemas de PCR multiplex.

Dendrograma

Os dados obtidos por 10 iniciadores de RAPD selecionados foram utilizados para gerar um dendrograma, que demonstrou a formação de vários agrupamentos entre os isolados de fungos analisados (Figura 2).

Os isolados de *Aspergillus* apresentaram 46% de similaridade em relação aos de *Penicillium*. Dentro do agrupamento de *Aspergillus* foram encontrados dois clados (A1 e C1) com 53% de similaridade. No clado A1 foram encontrados 6 isolados. Dentro do clado C1 ocorreu uma subdivisão (B1) apresentando 60% de similaridade. No clado B1 foram encontrados cinco isolados e no C1 outros quatro isolados. Entre os isolados de *Aspergillus* a similaridade genética variou de 53% a 76%.

Os isolados de *Penicillium* formaram dois clados (A2 e B2) com 53% de similaridade. No clado A2 foram encontradas duas subdivisões com 55% de similaridade e no clado B2 foi agrupado o isolado P002, inicialmente definido como *Fusarium*. A similaridade entre os isolados de *Penicillium* variou de 53% a 70%. Os dados moleculares indicam a necessidade de reclassificação do isolado P002, uma vez que este isolado apresenta 70% de similaridade com o isolado F0062 de *Penicillium*. Esses dados sugerem que os isolados P002 e F0062 sejam um mesmo tipo de genótipo de *Penicillium*.

O isolado F123 apresentou 25% de similaridade em relação aos demais isolados utilizados nesse estudo indicando, provavelmente, que este isolado pertença a outro gênero de fungo.

Associou-se o perfil de fragmentos de RAPD gerado pelo oligonucleotídeo OPA-04 ao dendrograma, observando-se três grupos distintos (A1, B1 e C1) para *Aspergillus*. Para *Penicillium*, foram obtidos dois grupos distintos (A2 e B2), sugerindo genótipos diferentes entre os isolados desse gênero de fungo. Além disso, o isola-

do P002, identificado como *Fusarium*, apresentou um perfil de fragmentos de DNA semelhante ao isolado F0062 de *Aspergillus*. Essa informação indica que uma nova avaliação deverá ser feita no que concerne à identificação do isolado de *Fusarium*.

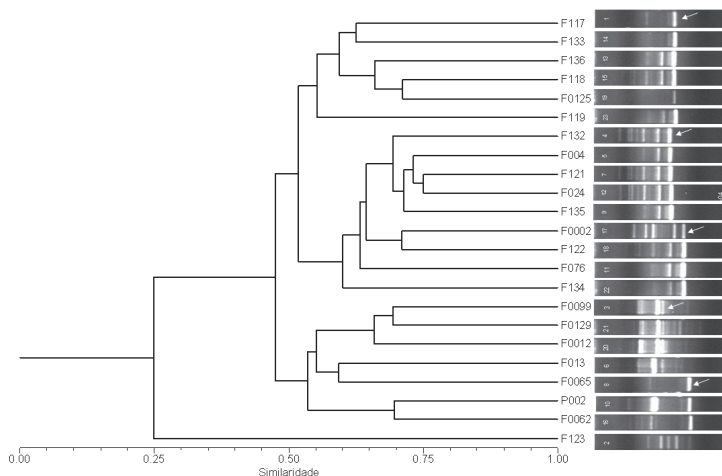


Figura 2: Dendrograma e padrão de fragmentos obtidos por 10 iniciadores de RAPD a partir de 23 isolados de fungos. Os códigos indicam: F117, F132, F004, F121, F120, F135, F076, F024, F136, F133, F118, F002, F122, F134 e F119, isolados de *Aspergillus*; F0099, F013, F0065, F0062, F0125 e F0012, isolados de *Penicillium*; P002, *Fusarium*; F123, isolado de fungo não identificado. A seta branca indica o fragmento de RAPD característico de cada grupo.

O isolado F123 apresentou um perfil de fragmentos diferente dos demais isolados, sugerindo que o mesmo pertence a outro isolado de fungo.

Esses dados reforçam que a reação de amplificação por RAPD é um método sensível e eficiente na identificação de isolados muito semelhantes, que apresentem alto coeficiente de similaridade.

Análise de Variância Molecular (AMOVA)

Analisando-se a variabilidade de todos os isolados observou-se que 26,43% eram provenientes de variações entre os gêneros de fungos e 73,57% provenientes de variações que ocorriam dentro de cada gênero de fungo ($F_{ST} = 0,26430$). A partir da

análise comparativa entre os isolados de *Aspergillus* e *Penicillium*, observou-se que 23,44% da variabilidade era devido a variações entre os gêneros e 76,56% , de variações entre os isolados de um mesmo gênero (FST = 0, 23437). Comparando-se o isolado não identificado com os isolados dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, obteve-se que, 22,50% da variação era devido a variações entre os grupos e que 77,50% dela devia-se a variações relacionadas a cada grupo analisado (FST = 0, 22497). A comparação entre o isolado previamente identificado como *Fusarium* e os demais isolados de *Aspergillus* indicou que 43,07% da variação foram provenientes de diferenças entre os grupos e 56,93% relacionadas a variações dentro de cada gênero analisado (FST = 0,43070).

Portanto, a maior fonte de variabilidade genética deveu-se a variações entre os isolados de cada gênero de fungo, ou seja, isolados fenotipicamente semelhantes de uma mesma espécie apresentam variações genotípicas que estão relacionadas aos seus respectivos gêneros.

Entretanto, para o isolado previamente identificado como sendo pertencente ao gênero *Fusarium*, há a necessidade de revisão taxonômica, uma vez que este se agrupou no mesmo clado dos isolados de *Aspergillus* e a análise de AMOVA sugere que as diferenças genéticas não são tão acentuadas para se considerar um gênero diferente de *Aspergillus*. Provavelmente o isolado P002 seja um genótipo diferente de *Aspergillus*. Essa evidência é reforçada pelo dendrograma, visto que aquele isolado agrupou-se com o isolado F0062 identificado previamente como *Aspergillus*. Condições do meio de cultura, tais como, pH, distribuição de fontes de carbono e nitrogênio, suplemento vitamínico e temperatura exercem efeitos pronunciados na fisiologia e morfologia dos fungos, o que poderia explicar o possível equívoco na identificação do isolado P002.

A partir dessa situação, a técnica de RAPD associada às análises de variância molecular reforça a praticidade e a importante contribuição dos marcadores moleculares na identificação e reclassificação de isolados de fungos. Essa abordagem é particularmente importante quando há dúvidas a respeito das características morfológicas de um isolado que possa interferir na sua correta classificação, podendo interferir decisivamente na abordagem clínica.

Rath (2002) usaram marcadores RAPD para a análise de 21 isolados de *Aspergillus usutus* divididos em 11 linhagens de referência e 10 linhagens isoladas a partir de amostras de pacientes em ambientes hospitalares. As reações de RAPD discriminaram-se entre todas as linhagens de referência. Além disso, a comparação entre as linhagens de hospital mostrou padrões de RAPD idênticos com algumas amostras isoladas de pacientes. Essa mesma estratégia foi usada por Baddley (2003) em testes clínicos para o monitoramento e detecção de isolados de *A. terreus* resistentes à anfotericina em pacientes atendidos em um hospital universitário.

Portanto, os resultados gerados pelos marcadores RAPD confirmaram a ocorrência de uma considerável variabilidade genética entre os isolados de fungos estudados, fornecendo ainda dados moleculares complementares mais precisos, visando à identificação de fungos. Isso é particularmente importante, quando a descrição morfológica não fornece dados completos para a identificação desses isolados, como o ocorrido para o isolado P002, confirmando mais uma vez que os marcadores RAPD podem ser utilizados para diagnóstico molecular de isolados de gêneros de fungos de importância médica.

A partir do estabelecimento de uma estratégia rápida e em pequena escala para a obtenção de DNA com quantidade e qualidade para as análises por marcadores RAPD, fragmentos específicos a um dado gênero/espécie de fungo obtido neste trabalho, poderão ser utilizados no desenvolvimento de oligonucleotídeos de PCR para a identificação específica de isolados de *Aspergillus* e *Penicillium* ocorrendo no ambiente médico-hospitalar.

Molecular identification of fungi strains of medical interest by RAPD markers

Abstract

Aspergillus and *Penicillium* are microorganisms able to produce severe clinical complications, mainly in immunosuppressed patients. The molecular analysis is an important strategy to quickly and precisely identify these pathogenic agents. The objecti-

ve of this work was to describe specific RAPD molecular patterns to identify isolates of *Aspergillus* and *Penicillium* which produce diseases of medical relevance. The morphological analyses revealed 14 isolates were *Aspergillus*, 7 were *Penicillium*, one isolate was *Fusarium* and only one isolate was unknown. The RAPD analyses using ten primers produced DNA fragments specific to each genera. The dendrogram showed groups of isolates inside each fungus genera and these groups were identified by specific DNA molecular markers. Besides, these groups of isolates showed high similarity coefficient. These data revealed potential DNA fragments able to be converted to specific DNA primers to identify one specific fungus isolate occurring in the hospital environment.

Keywords: DNA analyses. *Aspergillus*. *Penicillium*. Polymorphism.

Referências

AZEVEDO, O. M.; FELIPE, S. S. M.; BRIGIDO, M. M. **Técnicas básicas em biologia molecular**. Brasília: Universidade de Brasília, 2003.

BERED, F.; BARBOS, N. J. F.; CARVALHO, F. I. F. Marcadores moleculares e sua aplicação no melhoramento genético de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 27, p. 13-520, 1997. doi:10.1590/S0103-84781997000300026.

BADDLEY, J. W. Epidemiology of *Aspergillus terreus* at a university hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, p. 5525–5529, 2003. doi:10.1128/JCM.41.12.5525-5529.2003

CARDOSO, P. G.; QUEIROZ, M. V.; PEREIRA, O. L. Morphological and molecular differentiation of the pectinase producing fungi *Penicillium expansum* and *Penicillium griseoroseum*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, p. 71-77, 2007. doi:10.1590/S1517-83822007000100015.

CRUZ, R. P.; MILACH, S. C. K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998.

DIAZ-GUERRA, M. T.; MELLADO, E.; CUENCA-ESTRELLA, M. Genetic similarity among one *Aspergillus flavus* strain isolated from a patient whounderwent heart surgery and two environmental strains obtained from the operation room. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, p. 2419-2422, 2000.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998.

HUE, F. X.; HUERRE, M.; ROUFFAULT, M. A. Specific detection of *Fusarium* species in blood and tissues by a PCR technique. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, p. 2434-2438, 1999.

LARSEN, T. O.; FRYDENVANG, K.; FRISVAD, J. C. UV- guided screening for benzodiazepine producing species in *Penicillium*. **Biochemistry and Systematic Ecology**, San Francisco, v. 28, p. 881-886, 2000. doi:10.1016/S0305-1978(99)00126-X

LEENDERS, A. et al. Molecular epidemiology of an apparent outbreak of invasive aspergillosis en a hematology ward. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, p. 345-351, 1996.

LOURENÇO, A.; DURIGON, E. L.; ZANOTTO, P. Genetic diversity of environmental *Aspergillus flavus* strains in the state of São Paulo, Brazil by random amplified polymorphic DNA. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 102, p. 687-692, 2007. doi:10.1590/S0074-02762007005000102.

MELLADO, E.; DIAZ-GUERRA, T. M.; CUENCA-ESTRELLA. Characterization of a possible nosocomial Aspergillosis outbreak. **Clinical Microbiology and Infection**, New York, v. 6, p. 543-548, 2000. doi:10.1046/j.1469-0691.2000.00154.x.

NORITOMI, D. T. et al. Multiple brain abscesses due to *Penicillium* spp infection. **Revista Instituto de Medicina tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 47, p. 167-170, 2005. doi: 10.1590/S0036-46652005000300010

OLIVEIRA, C. V.; COSTA, S. L. J. Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ANDRA) pode diferenciar *Fusarium solani* f. sp. phaseoli de *F. solani* f. sp. I. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 631-634, 2002. doi:10.1590/S0100-41582002000600013.

PITT, J. I. The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, [S.l.], v. 3, p. 17-32, 1994. doi:10.1080/02681219480000701.

RATH, P. M.; ANSORG, R. Value of environmental sampling and molecular typing of *aspergilli* to assess nosocomial sources of aspergillosis. **Journal of Hospital Infection**, San Francisco, v. 37, p. 47-53, 1997. doi:10.1016/S0195-6701(97)90072-4.

RHOLF, F. J. NTSYSpc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2. 0. **Exeter Software Setauket**, New York, 1993.

RHAME, F. S. Prevention of nosocomial aspergillosis. **Journal of Hospital Infection**, San Francisco, v. 18, p. 466-472, 1991. doi:10.1016/0195-6701(91)90058-G.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin Version 2000**: a software for populations genetics data analysis. Switzerland: Genetics and biometry laboratory of University of Geneva, 2000.

SEMIGHINI, C. P.; DELMAS, G.; PARK, S. New restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers for *Aspergillus fumigatus*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Baltimore, v. 31, p. 15-19, 2001. doi:10.1111/j.1574-695X.2001.tb01580.x.

SNEATH, P. A.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy**. San Francisco: Freeman, 1973.

SWOFFORD, D. L. **PAUP. Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods)**: version 4. 0b4a. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1998.

SYMOENS, E.; BOUCHARA, J-P.; HEINEMANN, S. Molecular typing of *Aspergillus terreus* isolates by random amplification of polymorphic DNA. **Journal of Hospital Infection**, San Francisco, v. 44, p. 273-280, 2000. doi:10.1053/jhin.1999.0707.

THRANE, U. Grouping *Fusarium* section *discolor* isolates by statistical analysis of quantitative high performance liquid chromatographic data on secondary metabolite production. **Journal of Microbiological Methods**, San Francisco, v. 12, p. 23-39, 1990. doi:10.1016/0167-7012(90)90004-P.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 18, p. 6531-6535, 1990. doi:10.1093/nar/18.22.6531.

WILSON, A.; SIMPSON, D.; CHANDLER, E. Development of PCR assays for the detection and differentiation of *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium langsethiae*. **FEMS Microbiological Letters**, Baltimore, v. 233, p. 69-76, 2004. doi:10.1016/j.femsle.2004.01.040.