

SELEÇÃO DE METODOLOGIAS MOLECULARES PARA DIAGNÓSTICO DAS ESPÉCIES DE *FUSARIUM* E PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A UM NOVO COMPOSTO

Marielen Ribeiro T. da Silva (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Marina Cristina Gadêlha, Ellen Miazima, Melyssa Negri, Terezinha Inez Estivalet Svidzinski, Erika Seki Kioshima (Orientador), e-mail: marielenribeirots@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde, Maringá, PR.

Microbiologia, Micologia

Palavras-chave: *Fusarium*, DNA, diagnóstico

Resumo:

Espécies de *Fusarium* são conhecidas como fitopatógenos, entretanto nos últimos anos têm emergido como causadoras de infecções em humanos. As principais limitações de micoses por *Fusarium* spp. estão no diagnóstico, que demanda metodologias que dependem de pessoal qualificado para interpretação, além do difícil tratamento. Métodos moleculares são ferramentas importantes para identificação, pois são rápidos e sensíveis. O objetivo deste projeto foi selecionar técnicas moleculares com aplicabilidade na rotina laboratorial com foco na identificação das principais espécies de interesse clínico do gênero *Fusarium* e padronizar técnica para a extração de DNA. Na revisão de literatura foram avaliados 20 artigos, dos quais foram selecionados cinco protocolos. Duas amostras foram avaliadas: *F. solani*. (ATCC 36031) e isolado clínico. Os resultados preliminares apontam que o método com melhor resultado foi o protocolo 4, porém requer aprimoramento.

Introdução

Espécies de *Fusarium* são comumente encontradas como fitopatógenos, mas nas últimas décadas várias espécies desse fungo têm sido isoladas de unha, podendo ser porta de entrada para infecções graves e também tem causado septicemia em pacientes imunossuprimidos. O procedimento de diagnóstico ideal para infecções fúngicas deveria ser simples, específico, rápido e associado a baixos custos. No entanto, o diagnóstico laboratorial da fusariose, assim como para as demais micoses, se baseia no exame micológico direto, cultivo, identificação morfológica e bioquímica, necessitando de pessoal qualificado para leitura dos exames. Especialmente para *Fusarium* spp., estas limitações têm dificultado a identificação em nível de espécies para isolados clínicos. Nesse contexto, os principais problemas relacionados à fusariose estão no diagnóstico e difícil tratamento (Nucci *et al.*, 2015; Ninet *et al.*, 2005).

As técnicas de biologia molecular oferecem ferramentas modernas, sensíveis e rápidas para melhorar o diagnóstico microbiológico tradicional (Trubiano *et al.*, 2016). No entanto, o diagnóstico molecular também

apresenta limitações como: a falta de padronização dos métodos e protocolos de extração de DNA eficientes, o que é especialmente crítico quando se trabalha com fungos filamentosos. Há grande interesse em padronizar procedimentos que atendam a demanda da rotina laboratorial em técnicas moleculares, permitindo assim o diagnóstico precoce e mais preciso. Desta forma, o objetivo deste projeto foi selecionar técnicas moleculares com aplicabilidade na rotina laboratorial com foco na identificação das principais espécies de interesse clínico do gênero *Fusarium* e padronizar técnica para a extração de DNA.

Materiais e métodos

Revisão de literatura

Para o desenvolvimento da revisão, realizou-se a busca dos descritores (*Fusarium*, *DNA extraction*) e aplicando critérios de inclusão e exclusão (período de publicação de 2010 a 2016 e conter protocolo de extração), as informações mais relevantes foram categorizadas e organizadas em formato de tabela. Os dados foram contextualizados pelo conhecimento teórico. A pesquisa foi realizada nas bases de dados da – *Scientific and Electronic Library Online* (SciELO) e *National Center for Biotechnology Information* - NCBI, U.S. *National Library of Medicine* (PubMed).

Padronização da extração de DNA

A partir de dois artigos que contemplaram necessidades do Laboratório de Micologia Médica do LEPAC-UEM (Chang *et. al.* 2016 e Balini *et. al.* 2015) foram elaborados cinco protocolos de extração de DNA com os reagentes descritos: Protocolo 01 (P1) - Tampão de lise, tampão CTAB e proteinase K (a partir dos conídios); Protocolo 02 (P2) - Tampão CTAB e proteinase K. Protocolo 03 (P3) - Sonicação, tampão de lise, tampão CTAB e proteinase K (a partir dos conídios). Protocolo 04 (P4) - Sonicação, tampão de lise e tampão CTAB (a partir do micélio) e Protocolo 05 (P5) - *Kit* comercial.

Quantificação e análise do DNA

A quantificação e análise do DNA foram realizadas por espectrofotometria (NanoK Kasvi) e por eletroforese em gel de agarose, respectivamente.

Micro-organismos

Os protocolos de extração de DNA foram testados com cepa padrão de *Fusarium solani* ATCC (*American Type Collection Culture*) 36031 e um isolado de *F. subglutinans* de paciente atendido no LEPAC, UEM. Estes fungos estão armazenados na Micoteca do Laboratório de Micologia Médica e foram coletados obedecendo as normas da resolução 196/1996 do CNS-MS, sob à avaliação do comitê permanente de ética em pesquisa envolvendo seres humanos (COPEP), com parecer nº 615.643.

Resultados e Discussão

Um total de 20 artigos que continham informações sobre extração de DNA e identificação de *Fusarium* spp. foram analisados. Destes, cinco

foram selecionados com metodologias de extração de DNA a partir de kits comerciais, sendo que um deles utilizou dois kits distintos e cinco que utilizaram protocolo manual. Os seis kits comerciais foram utilizados: *DNeasy Plant Minikit* (Qiagen); *DNeasy tissue kit* (Qiagen); *E.Z.N.A. Fungal DNA Mini Kit* (Omega Bio-tek); *QIAamp Mini Kit* (Qiagen); *NucleoSpin® Blood QuickPure Extraction Kit* (Macherey-Nagel) e; *DNA IQ™ System* (Promega). As vantagens mencionadas foram maior facilidade na extração, menor desperdício, tempo e maior número de amostras processadas em paralelo. Além disso, não mencionam o uso de solventes orgânicos como fenol e clorofórmio, o que pode ser visto como positivo já que são tóxicos (Oliveira *et al.*, 2007).

Já as principais diferenças nos protocolos de extração manual consistem no uso de diferentes métodos e reagentes na etapa de extração de DNA, como uso de tampão de lise, maceração com nitrogênio, tampão CTAB, método em sílica e proteinase K. Os protocolos não diferem muito nas etapas posteriores de purificação, precipitação e quantificação do DNA. Embora haja algumas vantagens na utilização de *kits* comerciais para extração de DNA, um aspecto que tem que ser levado em consideração é o custo desses kits, enquanto que, nos métodos manuais, vários reagentes utilizados na extração de DNA já fazem parte da rotina laboratorial, representando uma economia para laboratório.

Tabela 01. Análise do DNA de *Fusarium* sp. obtidos a partir dos cinco protocolos

Protocolo	Espécies							
	<i>F. subglutinans</i>				<i>F. solani</i>			
	OD 260	OD 280	260/280	DNA (ng/μl)	OD 260	OD280	260/280	DNA (ng/μl)
P1	0,72	0,43	1,66	35,90	0,144	0,18	0,72	7,2
P2	0,06	0,034	1,71	2,9	-	-	-	-
P3	-	-	-	-	0,15	0,08	1,93	7,5
P4	-	-	-	-	1,27	0,53	2,4	63,63
P5	0,11	0,08	1,41	5,55	-	-	-	-

(OD) Densidade óptica. P1 - Tampão de lise, CTAB, proteinase K (a partir dos conídios). P2 - Tampão CTAB, proteinase K. P3 - Sonicação, tampão de lise, CTAB, proteinase K (a partir dos conídios). P4 - Sonicação, tampão de lise e CTAB (a partir do micélio). P5 - Kit comercial. “-” = testes não realizados.

Na sequência, foram selecionados dois artigos que atendiam às necessidades do Laboratório de Micologia Médica do LEPAC-UEM e a partir dos artigos: Chang *et. al.* 2016 e Balini *et. al.* 2015 foram selecionados 4 protocolos (P1, P2, P3, P4) de extração manual de DNA e um *kit* comercial (*QIamp DNA mini kit*). Como é possível observar na Tabela 1 que mostra a quantificação do DNA e pela presença de banda no gel de agarose (Figura 1), os protocolos mais eficientes para extração do DNA foram o P1 e P4. No entanto, o processo de sonicação, presente no protocolo P4, embora aumente a quantidade de DNA promoveu degradação

do mesmo (Figura 1, poço 4). Além disso, o protocolo P1 mostrou-se eficiente para a espécie *F. subglutinans*, mas não para *F. solani*.

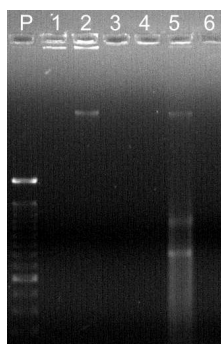


Figura 01 – Gel da eletroforese do DNA total extraído de *Fusarium* sp. nos protocolos P1, P2, P3, P4 e P5. P = Padrão de 100pb; 1 = *F. solani* (P1); 2 = *F. subglutinans* (P1); 3 = *F. subglutinans* (P2); 4 = *F. solani* (P3); 5 = *F. solani* (P4); 6 = *F. subglutinans* (P5).

Conclusões

Em acordo com os artigos levantados na revisão bibliográfica, pode-se concluir que há vários métodos para extração de DNA de *Fusarium* e identificação, porém há a necessidade de padronização e otimização destes métodos para prática clínica. Dentre os protocolos avaliados, dois se mostram promissores, porém ainda demandam modificações.

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq, às professoras orientadoras Melyssa Negri, Erika Seki Kioshima e a todos do laboratório de Micologia Médica da UEM.

Referências

BALINI, L. C. *et al.* Identificação pela técnica de PCR-RFLP de *Aspergillus* spp. isolados de grãos de soja e milho. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 4, n. 2, 2015.

CHANG, S. *et al.* Polyphasic approach including MALDI-TOF MS/MS analysis for identification and characterisation of *Fusarium verticillioides* in Brazilian corn kernels. **Toxins**, v. 8, n. 3, p. 54, 2016.

NUCCI, F. *et al.* Fusariosis. **Seminars in respiratory and critical care medicine**, v. 36, n. 5, p. 706-14, Oct 2015.

OLIVEIRA, M. C. S. *et al.* Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase. **Embrapa Pecuária Sudeste**, v. 7, 2007

TRUBIANO, J. A. *et al.* Clinical utility of panfungal polymerase chain reaction for the diagnosis of invasive fungal disease: a single center experience. **Medical Mycology**, v. 54, n. 2, p. 138-46, Feb 1 2016.