

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

LARISSA ISABELA OLIVEIRA DE SOUZA

**DESENVOLVIMENTO DE PCR MULTIPLEX PARA DETECTAR E IDENTIFICAR
ESPÉCIES DE *ASPERGILLUS* E *PENICILLIUM***

Maceió

2013

LARISSA ISABELA OLIVEIRA DE SOUZA

**DESENVOLVIMENTO DE PCR MULTIPLEX PARA DETECTAR E IDENTIFICAR
ESPÉCIES DE *ASPERGILLUS* E *PENICILLIUM***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Eurípedes Alves da
Silva Filho

Maceió

2013

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Fabiana Camargo dos Santos

S729d Souza, Larissa Isabela Oliveira de.
Desenvolvimento de PCR multiplex para detectar e identificar espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* / Larissa Isabella Oliveira de Souza. – 2013.
101 f. : il.

Orientadora: Eurípedes Alves da Silva Filho.
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2013.

Bibliografia: f. 83-94.

Apêndices: f. 95-97.

Anexos: f. 98-101.

1. *Aspergillus*. 2. *Penicillium*. 3. Fungos – Ambientes climatizados.
4. Fungos – Identificação convencional. 5. Reação em cadeia da polimerase.
I. Título.

CDU: 61:582.282.123

LARISSA ISABELA OLIVEIRA DE SOUZA

**DESENVOLVIMENTO DE PCR MULTIPLEX PARA DETECTAR E IDENTIFICAR
ESPÉCIES DE *ASPERGILLUS* E *PENICILLIUM***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Euripedes Alves da Silva Filho



Prof. Dr. Euripedes Alves da Silva Filho – (Orientador) UFAL

Data de Defesa: 19 de Fevereiro de 2013

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Dalmo Azevedo – (Membro Interno - Titular) UFAL



Prof^a. Dr^a. Gláucia Manoella de Souza Lima – (Membro Externo – Titular) UFPE



Prof. Dr. Luiz Carlos Caetano – (Membro Interno - Titular) UFAL



Prof. Dr. Luiz Antônio Ferreira da Silva – (Membro Interno – Suplente) UFAL

OFEREÇO

Aos amores da minha vida, meus pais (Maria Jucielma & José Marcelino), meus irmãos (Lucas Petrônio & João Marcelino) e meus anjos (Rômulo Ruan & João Rafael) pelo amor incondicional, companheirismo, alegrias e felicidades sem fim, paciência, compreensão e incentivo em todos os momentos da minha vida, por serem meus maiores motivadores e acreditarem sempre em mim.

DEDICO

Aos professores e orientadores que tive no correr da minha vida acadêmica, em especial Anilda Santos, Aldenir Feitosa, Eurípedes Alves, Fernando Wagner, Gláucia Souza, Maíza Bezerra e Marcos Leal, que acreditaram na minha capacidade e me deram oportunidade de crescimento científico.

AGRADECIMENTOS

"Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós."

Antoine de Saint-Exupéry

Esses dois anos de mestrado a árdua jornada de desafio foi suavizada pela existência de pessoas que comigo compartilharam nestes momentos. Por esse motivo, agradeço com meus mais sinceros sentimentos de gratidão a todas as pessoas que muito me encorajaram e ajudaram nesta jornada.

Primeiramente a Deus uma força que sinto presente em todos os segundos da minha vida, que me guia e me fortalece. Com a fé e amor em Cristo eu me fortaleço todos os dias.

As amigas-mestres que fiz no Laboratório de Genética e Microbiologia Aplicada (BIOGEN), Gabryelle Barbosa e Luana Pires, pelos valiosos ensinamentos, amizade verdadeira, confiança, incentivo e que mesmo ausentes se fizeram presentes.

Aos colegas-amigos do Laboratório de Ambientes Climatizados (LAC), Danielle Guimarães, Elaine Cristina, Érica Gislaine, Iara Maria, Marcos Antônio, Rodrigo Calumby, Rosana Kézia, Rita de Cássia e Silmara Almeida, pelo incentivo, momentos de descontração e aprendizagem, por acreditarem em mim, e por tornarem os dias mais fáceis principalmente com as dificuldades encontradas no meio do caminho.

Aos amigos-irmãos queridíssimos, Altair Rogério, Andresa Viviane, Luis Cláudio, Rafael Lira, Rosanne Katuska e Vanessa Costa que sempre me deram carinho, incentivo, apoio, boa conversa, abraço apertado, acreditaram em mim, me fizeram crescer como ser humano.

Ao meu orientador, prof^o. Dr^o. Eurípedes Alves da Silva Filho, pela oportunidade de realização do mestrado, por ter acreditado e investido tanto em conhecimento acadêmico quanto docente ao me oferecer o estágio docência, por ter aberto as portas desta caminhada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/ Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (CAPES/FAPEAL) pelo apoio financeiro.

Aos Professores e Discentes do programa de pós-graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) pelos ensinamentos transmitidos e o companheirismo.

A todos os colaboradores do PPGCS que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, em especial a Melânia e ao Jhonatan.

Aos funcionários do ICBS, em especial aos que atuam na manutenção do laboratório, pela cordialidade e prestatividade.

A todos do Laboratório de DNA Forense da Universidade Federal de Alagoas por me fornecer nitrogênio líquido.

Aos professores doutores Dalmo Azevedo, Francisco Tovar pela contribuição na participação da banca do exame da qualificação.

Aos professores doutores Dalmo Azevedo, Gláucia Souza, Luiz Carlos e Luiz Antônio pela participação e contribuição na banca examinadora de defesa.

Por fim, agradeço em especial aos que sempre me apoiaram incondicionalmente, que apostaram em mim de olhos fechados e que seguramente são os que mais estão felizes com essa conquista: minha amada família. Também agradeço a minha cunhada (Letícia) por me ajudar na impressão e encadernação da dissertação.

Peço para que Deus abençoe a todos que contribuíram com seu tempo, paciência e conhecimento para realização deste trabalho.

“Posso todas as coisas em Cristo que me fortalece.”

Filipenses, 4:13

RESUMO

Aspergillus e *Penicillium* são os principais gêneros de fungos isolados de ambientes climatizados e que estão associados a efeitos adversos na saúde de ocupantes destes locais. Historicamente os isolados de fungos são identificados por análise macro e microscópica de colônias obtidas, por meio de cultivo *in vitro*. Esses métodos estão entrando em desuso, uma vez que são demorados e podem apresentar resultados imprecisos. Diante dessas considerações, percebe-se a necessidade do desenvolvimento de novos métodos de identificação de fungos, mais rápidos, mais específicos e altamente sensíveis, o que motivou o objetivo da presente pesquisa: desenvolver um protocolo de PCR multiplex para identificar espécies fúngicas a partir de culturas mistas. Nesse sentido, uma reação de PCR multiplex foi padronizada, com a capacidade de identificação de quatro espécies por reação. A amostra estudada foi composta por 183 isolados fúngicos de ambientes climatizados, obtidos de coleção, os quais tiveram sua identificação por método convencional (*A. flavus* n=23, *A. fumigatus* n=20, *A. niger* n=50, *A. ochraceus* n=20, *P. citrinum* n=30, *P. chrysogenum* n=20, *P. expansum* n=20) e por PCR (*A. flavus* n=14, *A. fumigatus* n=20, *A. niger* n=28, *A. ochraceus* n=18, *P. citrinum* n=12, *P. chrysogenum* n=14, *P. expansum* n=7). Para a identificação de *A. fumigatus* e *A. ochraceus* não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$), já *A. niger*, *P. citrinum* e *P. chrysogenum* apresentaram as maiores diferenças estatísticas significantes quando os métodos de identificação foram comparados. Para o cálculo de sensibilidade e especificidade, foi escolhido como método de referência a PCR. Com exceção de *A. fumigatus*, para todas as outras espécies o método convencional obteve percentual de sensibilidade de 100%. Quanto à especificidade, *A. niger*, *P. citrinum* e *P. expansum* apresentaram baixo percentual, respectivamente 74,12%, 82,18% e 87,91%. O método de identificação convencional apresentou maior sensibilidade para as espécies de *Penicillium* e maior especificidade para as espécies de *Aspergillus*. Dos 113 isolados identificados por PCR, 61 (54%) mostraram-se potenciais produtores de micotoxinas pelo método de triagem em Ágar Leite de Coco, sendo que 54,10% destes corresponderam a potenciais produtores de ocratoxinas, 29,5% de citrinina e 16,4% de aflatoxina. Em conclusão, a PCR multiplex, com capacidade de detecção de quatro espécies por reação, mostrou ser um método rápido e de fácil realização para identificação de espécies fúngicas a partir de cultura mista advindas de ambientes climatizados, além de possuir sensibilidade e especificidade maior que os métodos convencionais. Além disto, 54% dos isolados identificados por PCR mostraram-se potenciais produtores de micotoxinas pela triagem em Ágar Leite de Coco.

Palavras-chave: *Aspergillus*. *Penicillium*. Ambientes climatizados. Identificação convencional. PCR.

ABSTRACT

Aspergillus and *Penicillium* are the main fungal genera isolated from conditioned environments and are associated with adverse health effects of occupants of these places. Historically the fungal isolates are identified by macroscopic and microscopic analysis of colonies obtained by *in vitro* culture. These methods are falling into disuse, because they are time consuming and may present inaccurate results. In face these considerations new methods are required develop the fungal identification, which are faster, more specific and more sensitive than the others. That need motivated the purpose of this research: to develop a multiplex PCR protocol for identifying fungal species from mixed cultures. In this sense, a multiplex PCR was standardized with the ability to identify four species by reaction. The sample was composed by 183 fungal isolates of conditioned environments, obtained from the collection, which had their identification by conventional method (*A. flavus* n = 23, *A. fumigatus* n = 20, *A. niger* n = 50, *A. ochraceus* n = 20, *P. citrinum* n = 30, *P. chrysogenum* n = 20 and *P. expansum* n = 20) and multiplex PCR (*A. flavus* n = 14, *A. fumigatus* n = 20, *A. niger* n = 28, *A. ochraceus* n = 18, *P. citrinum* n = 12, *P. chrysogenum* n = 14 and *P. expansum* n = 7). To identify *A. fumigatus* and *A. ochraceus* the difference wasn't statistically significant ($p > 0.05$), by the other side *A. niger*, *P. citrinum* and *P. chrysogenum* showed the greatest statistical differences when identification methods were compared. For the calculation of sensitivity and specificity, was chosen as the reference method the PCR. Except *A. fumigatus*, for all other species the conventional method was obtained the percentage of 100% sensitivity. Analyzing the specificity, *A. niger*, *P. citrinum* and *P. expansum* showed low percentage, respectively 74.12%, 82.18% and 87.91%. The identification by conventional method was more sensitive to species of *Penicillium* and greater specificity for species of *Aspergillus*. Of the 113 isolates identified by PCR, 61 (54%) were potential producers of mycotoxins by sorting Agar Coconut Milk, and accounted for 54.10% of potential producers ochratoxins, 29.5% and citrinin 16.4% of aflatoxin. In conclusion, the multiplex PCR capable of detecting four species by reaction proved to be a quick and easy to perform for the identification of fungal species from mixed culture resulting in air conditioned environments, besides having greater sensitivity and specificity than the conventional methods. Moreover, 54% of isolates identified by PCR showed up potential producers of mycotoxins by screening Agar Coconut Milk.

Keywords: *Aspergillus*. *Penicillium*. Conditioned Environments. Conventional Identification. PCR.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Cluster gênico do DNA ribossômico.....	21
Figura 2 Partículas presentes nos bioaerossóis varia de 0,3 a 100 µm em seu tamanho, estando presentes nas frações inaláveis (< 2,5 µm) e respiráveis (2,5 - 10 µm) principais responsáveis por doenças no trato respiratório, e as maiores que 10 µm estão geralmente associadas a doenças dermatológicas, infecções oculares entre outros.....	23
Figura 3 Microscopia eletrônica de varredura dos gêneros <i>Aspergillus</i> sp. e <i>Penicillium</i> sp.....	26
Figura 4 Estrutura química das Aflatoxinas B1, B2, G1 e G2.....	28
Figura 5 Ilustração da placa usada no microcultivo segundo a técnica de Ridell modificada.....	35
Figura 6 a) Colônia pura de fungo; b) cultura mista de fungo obtida pelo cultivo randômico de espécies variadas em ASD após incubação a 25 °C durante 5.....	39
Figura 7 Características morfológicas dos fungos estudados.....	45
Figura 8 Gel de agarose a 1,3% com produtos da amplificação obtidos pela PCR simplex.....	47
Figura 9 Gel de agarose a 1,3% com produtos da amplificação obtidos pela PCR Multiplex.....	48
Figura 10 Crescimento colonial e a) formação de halo de fluorescência azulado e b) esverdeada, bem como c) ausência de formação de halo de fluorescência em Agar Leite de Coco após 5 dias de crescimento a 28 °C e observados sob luz (365 nm).....	54
Figura 11 Percentual do potencial toxigênico dos isolados identificados por PCR em produzir Aflatoxina, Citrinina e Ocratoxina.....	56

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1 Efeitos deletérios associados à exposição à micotoxinas das principais espécies fúngicas toxigênicas isoladas de ambientes climatizados.....	27
Quadro 2 Chave de identificação das espécies de <i>Aspergillus</i> estudadas.....	36
Quadro 3 Chave de identificação das espécies de <i>Penicillium</i> estudadas.....	37
Quadro 4 Oligonucleotídeos iniciadores espécie - específica das espécies de <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> estudadas.....	40
Quadro 5 Protocolo da reação para amplificação com os iniciadores espécie-específicos em ensaio de PCR simplex das espécies de <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> estudadas.....	41
Quadro 6 Protocolo da reação para amplificação com os iniciadores espécie-específicos em ensaio de PCR multiplex das espécies de <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> estudadas.....	42

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 Comparação dos resultados obtidos por identificação convencional e PCR das espécies de <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> estudadas.....	51
Tabela 2 Prova diagnóstica que avalia a sensibilidade e especificidade do método de identificação convencional comparada com a PCR das espécies de <i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i> estudadas.....	53
Tabela 3 Potencial toxigênico determinado pelo método de triagem em Ágar Leite de Coco dos fungos estudados e identificados por método convencional e molecular.....	55

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASD	Agar Sabouraud Dextrose
pb	Pares de Base
CO	Monóxido de Carbono
CO₂	Dióxido de Carbono
BIOGEN	Laboratório de Genética e Microbiologia Aplicada
BSA	Albumina Sérica Bovina
DNA	Acido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Trifosfatado
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
HPA	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
H₂CO	Formaldeído
ICBS	Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
ITS	Internal Transcribed Spacer
NaCl	Cloreto de Sódio
NO	Óxido de Nitrogênio
NO₂	Dióxido de Nitrogênio
O₃	Ozônio
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RAPD	Randon Amplified Polymorphic DNA
rDNA	DNA ribossômico
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
Rn	Radônio
SED	Síndrome do Edifício Doente
SO₂	Dióxido de Enxofre
TE	TRIS/EDTA
TBE	TRIS-BORATO-EDTA
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
WHO	World Health Organization

LISTA DE SÍMBOLOS

\approx	Aproximadamente
g	Gravitacional
kD	Kilodalton
μm	Micrometro
mM	MiliMolar
N	Número amostral
ng	Nanôgrama
nm	Nanômetro
pmol	Picomol
ppb	Partes por bilhão
U	Unidade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral	18
2.2 Objetivos Específicos	18
3 REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 Fungos	19
3.1.1 Identificação Convencional de Fungos Filamentosos	20
3.1.2 Identificação Molecular de Fungos Filamentosos.....	20
3.2 Ambientes Climatizados	22
3.2.1 Risco Ocupacional da Inalação de Elementos Fúngicos.....	25
3.2.2 Risco Ocupacional da Inalação de Micotoxinas	27
4 METODOLOGIA	31
4.1 Material	31
4.1.1 Material Biológico	31
4.1.1.1 Amostras Estudadas	31
4.1.1.2 Amostras Usadas como Controle Negativo.....	31
4.1.1.3 Amostras Usadas como Controle Positivo	31
4.1.2 Meios de cultura	32
4.1.3 Reagentes	33
4.2 Métodos	34
4.2.1 Reativação e Purificação dos Isolados.....	34
4.2.2 Identificação das Colônias por Método Convencional.....	34
4.2.3 Identificação dos Isolados por PCR	38
4.2.3.1 Obtenção da massa micelial e extração do DNA total pela técnica de Raeder e Broda (1985).....	38
4.2.3.2 Seleção e Análise das Sequências iniciadoras	39
4.2.3.3 Amplificação com os Iniciadores Espécies-específicos por PCR Simplex.....	40
4.2.3.4 Amplificação com os Iniciadores Espécies-específicos por PCR Multiplex.....	41

4.2.4 Screening para Identificação de Isolados Fúngicos Potencialmente Produtores de Micotoxinas	43
4.2.5 Análise Estatística	43
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 Identificação dos Isolados por Método Convencional.....	44
5.2 Identificação dos Isolados por PCR Simplex e Multiplex	46
5.3 Comparação do Método Convencional e PCR.....	49
5.4 Screening para Identificação de Isolados Fúngicos Potencialmente Produtores de Aflatoxinas, Citrinina e Ocratoxinas	54
6 CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS.....	59
APÊNDICE A.....	92
APÊNDICE B.....	92
ANEXO A.....	95

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, com o aumento do uso de condicionadores de ar, os ambientes internos climatizados artificialmente tornaram-se importante área de pesquisa. A má qualidade do ar desses ambientes ocorre principalmente pela associação de umidade com os fungos filamentosos (WHO, 2009). Ainda que a quantidade de espécies fúngicas comprovadamente ofensivas à saúde humana seja pequena, uma maior e continuada investigação neste sentido, certamente resultará na identificação de outras espécies potencialmente patogênicas, alergênicas e toxigênicas (CURTIS et al., 2004).

Aspergillus e *Penicillium* são os principais gêneros de fungos isolados de ambientes climatizados e que estão associados a efeitos adversos na saúde de ocupantes destes locais (WU et al., 2003; MCGINNIS, 2004). Tais implicações podem incluir coceira nos olhos, constipação nasal, cefaleia, fadiga (CURTIS et al., 2004) e, em crianças, hemossiderose pulmonar idiopática (VESPER et al., 2004).

Quanto à adequada avaliação da exposição fúngica de ocupantes de locais insalubres, fazem-se necessárias a implementação e a execução de estratégias de remediação eficaz; nesse contexto é imperativo que a triagem e identificação fúngica seja realizada com rapidez e eficácia (FISCHER et al., 2006; HUNG et al., 2011).

Considerando a preocupação mundial com a qualidade do ar em ambientes climatizados, aliada à crescente utilização de aparelhos condicionadores de ar no país, o Ministério da Saúde criou a Portaria n.º 3.523/98 – dispondo medidas básicas para assegurar a qualidade do ar de interiores climatizados de uso público e coletivo, e a Resolução RE Nº9/ANVISA 2003 - a qual estabelece parâmetros e normas técnicas para a qualidade do ar interior climatizado, na qual a presença e concentração de fungos são utilizadas como marcador epidemiológico, tratando como inaceitável a presença de fungos potencialmente patogênicos e toxigênicos nestes ambientes.

É válido destacar que, historicamente os isolados de fungos são identificados por análise macro e microscópica de culturas obtidas por meio de cultivo *in vitro*. Estes métodos, apesar de ainda serem utilizados são demorados e imprecisos, além de requererem profissionais experientes, visto que em muitas situações é extremamente difícil distinguir as espécies fúngicas com base em diferenças

morfológicas. Diante dessas condições, percebe-se a necessidade do desenvolvimento de novos métodos de identificação de fungos, mais rápidos, mais específicos e altamente sensíveis (LANDLINGER et al., 2009).

Para este fim, numerosas técnicas de biologia molecular baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) têm sido desenvolvidas, as quais são capazes de identificar e quantificar as espécies fúngicas (BURIK et al., 1998; CUENCA-ESTRELLA et al., 2011). Os métodos supracitados permitem uma identificação rápida, sensível e específica de organismos fúngicos, contudo atualmente só estão sendo utilizados na identificação de organismos individuais a partir de amostras ambientais mistas.

Fungos do ambiente raramente são encontrados de maneira isolada, sendo assim, uma abordagem mais prática é a identificação de numerosos organismos de uma única amostra ambiental, com a finalidade de economizar tempo e dinheiro, mantendo elevada a especificidade e precisão (DEAN et al., 2005; ZHAO et al., 2011)

Com base no exposto, faz-se necessário o desenvolvimento de uma PCR multiplex espécie-específica para identificação em culturas mistas de espécies patogênicas e potencialmente patogênicas em humanos, isoladas com mais frequência em ambientes climatizados de uso coletivo de instituições públicas e privadas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- ✓ Desenvolver um protocolo de PCR multiplex para identificar espécies de fungos a partir de culturas mistas obtidas de ambientes climatizados de uso coletivo de instituições públicas e privadas.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Identificar pelo método convencional espécies *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. ochraceus*, *A. niger*, *Penicillium citrinum*, *P. chrysogenum* e *P. expansum* isoladas de ambientes climatizados;
- ✓ Identificar pela técnica de PCR simplex e multiplex as espécies *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. ochraceus*, *A. niger*, *Penicillium citrinum*, *P. chrysogenum* e *P. expansum* isoladas de ambientes climatizados em culturas puras e mistas;
- ✓ Comparar a identificação pela PCR multiplex com o método convencional;
- ✓ Realizar triagem de fungos potencialmente toxigênicos através do meio Ágar de Coco.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Fungos

Os fungos estão entre os organismos ecologicamente mais importantes do mundo, com aproximadamente 1,5 milhões de espécies, das quais menos de 100 mil já foram descritas (ORGIAZZI et al., 2012). São organismos eucariontes, aclorofilados, heterotróficos, uni ou multicelulares que se reproduzem sexuada ou assexuadamente, de natureza ubíqua. Possuem parede celular formada por polissacarídeo, incluindo glucanas, mananas, quitina, glicoproteínas e tem o ergosterol como o principal componente da membrana fúngica. Em sua maioria são aeróbios, podendo ser anaeróbios facultativos ou estritos. A temperatura ideal para seu crescimento é de 25 a 30 °C. Algumas espécies podem produzir estruturas de resistência (esporos) e sobreviver a condições extremas de temperatura (ALEXOPOULOS et al., 1996; LANG-YONA et al., 2012).

Embora os fungos tenham como habitat primário o ambiente externo natural, também podem ser encontrados como componentes da microbiota residente ou transitória do homem e de outros animais (LACAZ et al., 1991; SIDRIM; MOREIRA, 1999; GERRITSEN et al., 2011).

As unidades reprodutivas dos fungos filamentosos são os conídios, os quais são capazes de resistir a condições adversas, tanto ambientais quanto químicas, estes variam morfológicamente de espécie para espécie. Tais variações são em tamanho, cor, forma, e ainda, algumas espécies podem apresentar mais de um tipo de conídio (LACAZ et al., 1998).

Os fungos filamentosos são os mais adaptáveis a crescerem com pouca água, alta pressão osmótica e em muitos substratos sólidos, pois sua forma de crescimento, por meio de hifas, favorece a colonização do meio (RAIMBAULT, 1998).

Pesquisas com fungos isolados de ambientes interiores e em ar livre não são voltadas apenas para os efeitos alérgicos, mas também para riscos de infecção e propriedades alergênicas, além dos efeitos toxigênicos (ASSOULINE-DAYAN et al., 2002; FISCHER; DOLT, 2003).

A identificação de gêneros e espécies de fungos filamentosos pode ser realizada pelo estudo de suas características morfológicas baseadas em chaves de identificação e por técnicas de biologia molecular (GUARRO et al., 1999; WENGENACK; BINNICKER, 2009).

3.1.1 Identificação Convencional de Fungos Filamentosos

Para os métodos baseados nas características morfológicas são estudadas as características macroscópicas (cor, aspecto, presença de exsudatos, difusão de pigmentos, odor, quantidade de micélio aéreo) por meio da colônia do fungo crescido em diferentes meios de cultura, assim como características microscópicas pela técnica de microcultivo para visualização das estruturas reprodutivas, as quais auxiliam na distinção taxonômica em nível de gênero e espécie (RIDDELL, 1950; DODGE, 1935; KONEMAN, 2008).

A taxonomia fúngica é tradicionalmente baseada em características morfológicas comparativas. No entanto, cuidado especial deve ser tomado para a identificação quando os fungos são estreitamente relacionados ou morfológicamente semelhantes. Algumas características morfológicas são dependentes do meio de cultura bem como das condições de temperatura, luminosidade e tempo de cultivo. Além disso, os métodos convencionais não podem ser aplicados para a identificação de isolados de fungos que não esporulam em cultura, os quais são chamados de *Mycelia Sterilia* (HUANG et al., 2009).

Historicamente a identificação dos fungos filamentosos tem sido realizada com base em chaves de identificação de acordo com a morfologia comparativa das características macro e microscópicas. Esta classificação tende a entrar em desuso, pois é demorada e apresenta aplicabilidade limitada (ATKINS; CLARK, 2004; RICKERTS et al., 2007).

3.1.2 Identificação Molecular de Fungos Filamentosos

Em substituição aos métodos rotineiros de identificação dos fungos, os ensaios moleculares baseados na técnica de PCR vêm sendo promissores para identificação rápida e precisa de espécies fúngicas (MCLINTOCK; JONES, 2004;

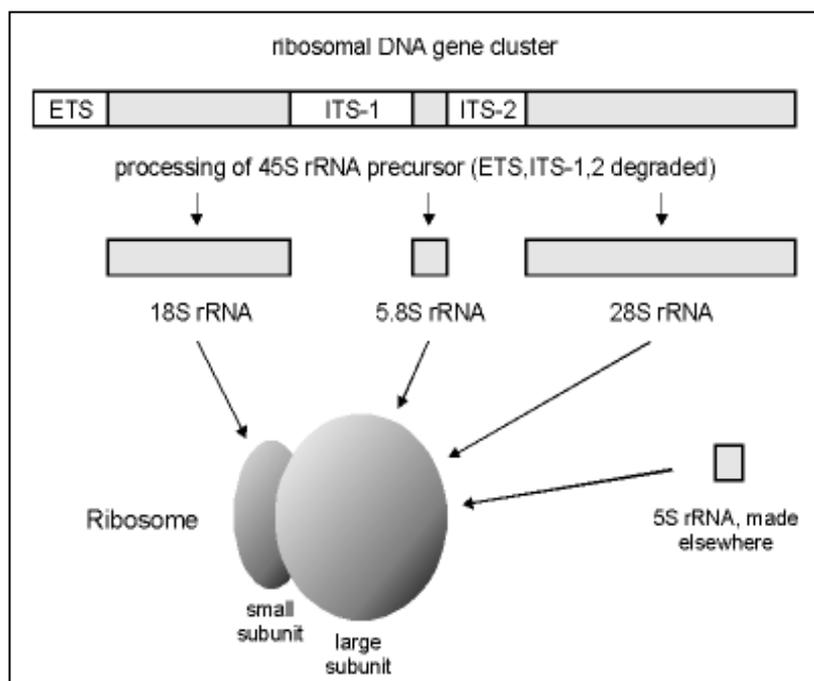
BORMAN et al., 2008; WENGENACK; BINNICKER, 2009).

Os principais métodos moleculares utilizados para a identificação de fungos filamentosos são Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA), Polimorfismo de Tamanho do Fragmento de Restrição (RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism) e Sequenciamento do DNA (XU, 2010).

O ensaio de PCR é baseado na amplificação de uma região específica do DNA, delimitada geralmente por um par de oligonucleotídeos iniciadores. Esta reação engloba três etapas: desnaturação da dupla fita de DNA; hibridização do par de oligonucleotídeos iniciadores à sequência complementar na fita de DNA; e, finalmente, a fase de extensão da fita de DNA (TANG; PROCOP; PERSING, 1997).

O sequenciamento de nucleotídeos do gene que codifica o DNA ribossomal (rDNA) têm se mostrado eficiente na identificação de fungos, tendo em vista que duas regiões que flanqueiam os genes rDNA – Espaçadores Internos Transcritos (ITS – Internal Transcribed Spacer) – permaneceram pouco conservadas no curso da evolução (**Figura 1**), sendo assim apresentam sequência de nucleotídeos que permite a distinção de gêneros e espécies de micro-organismos (FUNGARO, 2000; MENEZES et al., 2010).

Figura 1 – Cluster gênico do DNA ribossômico de célula eucarionte.



Fonte: <http://www.rzuser.uni-heidelberg.de/~bu6/Introduction11.html>

As bases de dados genômicos que fornecem informações relevantes de sequências de micro-organismos – as quais podem ser utilizadas para identificação espécie-específica, variabilidade genética, produção de proteínas, genes de resistência a antibióticos entre outros – são GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) a qual é interligada ao EMBL (www.ebi.ac.uk/embl) e DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>), além de UNITE (<http://unite.ut.ee>), Tree of Life Web Project (www.tolweb.org/tree), Myconet (www.fieldmuseum.org/myconet), Index Fungorum (www.indexfungorum.org), MycoBank (www.mycobank.org) e Environmental Protection Agency (<http://www.epa.gov/microbes/moldtech.html>).

3.2 Ambientes climatizados

Em 1902, o engenheiro norte-americano Willis Carrier inventou um processo mecânico para condicionar o ar de ambientes internos, tornando assim possível o controle do clima nesses ambientes (ABDO, 2003).

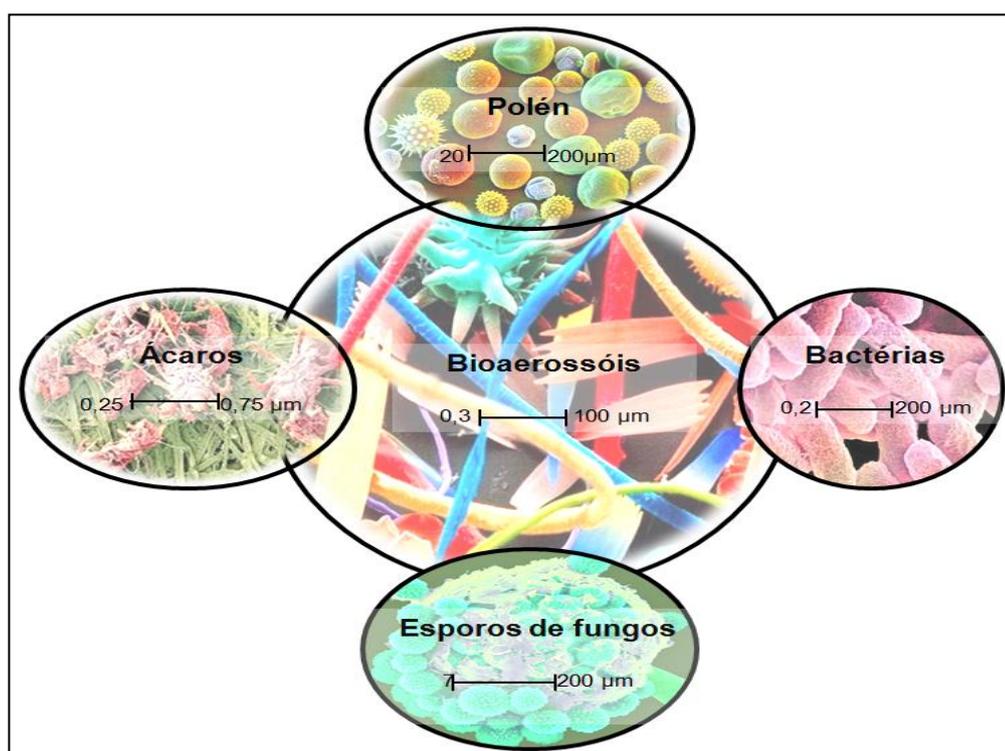
Com isso, na década de 30 surgiram os primeiros ambientes artificialmente climatizados, onde a temperatura e umidade do ar eram controladas com a finalidade de proporcionar conforto térmico para os indivíduos que ali permaneciam durante um longo tempo (ARNOLD, 1999). O funcionamento do sistema de um condicionador de ar baseia-se na mistura do ar que retorna dos ambientes climatizados com o ar externo, posterior filtração e condicionamento térmico, para ser novamente insuflado para os ambientes interiores (CALDEIRA, 2005).

As pessoas passam uma grande parte de tempo em ambientes fechados, sabe-se que a qualidade do ar interior pode ter um impacto significativo na saúde humana. O ambiente climatizado está propenso a conter inúmeras substâncias potencialmente prejudiciais como partículas alergênicas (pólen de plantas, fungos, pêlos de animais, ácaros e algas), substâncias químicas (CO_2 , CO, SO_2 , NO, NO_2 , H_2CO , HPA, O_3 , Rn entre outros) e vapores orgânicos voláteis (tintas, solventes, materiais de construção, fumaça de tabaco, entre outros) (JONES, 1999; BHATIA, 2011; VICHIT-VADAKAN; VAJANAPOOM, 2011; WHO, 2011).

Bioaerossóis são partículas vivas em suspensão (bactérias, vírus e fungos) ou de origem em organismos vivos (pólen, pêlos, partes de insetos, entre outros) também conhecidos como pó orgânico (**Figura 2**). Estão presentes no ar, em função

de sua dispersão a partir de um local de colonização ou crescimento, contribuindo com cerca de 5-34% da poluição do ar interior. Estes contaminantes biológicos podem se reproduzir na água acumulada em ductos de ar condicionado, umidificadores, telhas ou carpetes úmidos, entre outros. As condições necessárias ao crescimento de micro-organismos em ambientes climatizados podem ser oferecidas pela ventilação inadequada e o conseqüente acúmulo de umidade no interior dos recintos (BHATIA, 2011).

Figura 2 – Partículas presentes nos bioaerossóis varia de 0,3 a 100 μm em seu tamanho, estando presentes nas frações inaláveis ($< 2,5 \mu\text{m}$) e respiráveis ($2,5 - 10 \mu\text{m}$) principais responsáveis por doenças no trato respiratório, e as maiores que $10 \mu\text{m}$ estão geralmente associadas a doenças dermatológicas, infecções oculares entre outros.



Fonte: Do autor.

O interesse na exposição a bioaerossol tem aumentado ao longo das últimas décadas, principalmente porque é reconhecido que a exposição a agentes biológicos, tanto no ambiente ocupacional como no residencial, está associada a uma ampla gama de efeitos adversos para a saúde dos indivíduos e tem impacto na

saúde pública, incluindo doenças infectocontagiosas, efeitos tóxicos agudos, alergias e câncer. A climatização de edifícios combinada com má ventilação, renovação de ar insuficiente, filtragem inadequada, e manutenção precária dos condicionadores de ar, criaram ambientes que proporcionam exposições elevadas aos bioaerossóis (principalmente fungos) e vários estudos têm sugerido que a Síndrome do Edifício Doente (SED) está associada a essas exposições (DOUWES et al., 2003; ROCHA et al., 2012).

A baixa qualidade do ar de interiores tem sido relacionada com efeitos adversos à saúde humana, levando a Organização Mundial de Saúde (WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION) a classificá-la como um problema de saúde pública. Em reunião realizada em Bonn (Alemanha), em outubro de 2006, a Organização Mundial de Saúde estabeleceu orientações para qualidade do ar de ambientes internos, dentre elas, diretrizes para agentes biológicos (WHO, 2006).

No Brasil, as autoridades de saúde passaram a regulamentar o controle da qualidade do ar de ambientes climatizados, após o falecimento do ex-ministro das comunicações Sérgio Motta, em abril de 1998, causada por uma infecção generalizada induzida por micro-organismo de risco à saúde, presente no ar de seu gabinete, a *Legionella pneumophila* (GAVA; GALLO, 2002).

A Portaria n.º 3.523/98 do Ministério da Saúde aprovou um Regulamento Técnico, contendo medidas básicas para assegurar a qualidade do ar de interiores climatizados, relacionadas a medidas e procedimentos de limpeza e manutenção dos sistemas de climatização. Esta portaria foi seguida pela Resolução RE Nº9/ANVISA 2003 que estabelece padrões referenciais para a qualidade do ar de ambientes internos climatizados de uso público e coletivo.

Supõe-se que cerca de 30% dos problemas de saúde relacionados com a má qualidade do ar interior são ocasionados por fungos. A microbiota fúngica pode ser perigosa para a saúde, especialmente em ambientes climatizados, e pode gerar alergias, sintomas da SED (irritação das mucosas; má condição física; cansaço; dores de cabeça; vertigem e diminuição da concentração, da memória e da capacidade para o trabalho intelectual), dermatoses, doenças respiratórias (incluindo asma) e câncer (GREEN et al., 2005; STRYJAKOWSKA-SEKULSKA et al., 2007; LOBATO et al., 2009).

A possibilidade do indivíduo desenvolver problemas de saúde relacionados à

inalação de esporos fúngicos em ambientes climatizados, está relacionada a fatores tais como: tempo e frequência de exposição, suscetibilidade individual e interações entre agentes biológicos e químicos do ambiente (DOUWES et al., 2003).

Os fungos de dispersão aérea são chamados de anemófilos, os quais são capazes de colonizar diferentes substratos e habitats de forma eficiente, sobrevivem a grandes variações de temperatura e pH, baixa taxa de umidade, baixas concentrações de oxigênio, sendo comum em ambientes internos climatizados (FLORES; ONOFRE 2010).

O estudo da microbiota fúngica bioalérgica compreende fungos filamentosos e leveduriformes, que constituem o grupo de micro-organismos com significativa importância nas manifestações alérgicas do trato respiratório, tais como rinite, sinusite alérgica não invasiva, asma e alveolite alérgica extrínseca (GOMES et al., 2008; CHAUDHARY; MARR, 2011).

3.2.1 Risco Ocupacional da Inalação de Elementos Fúngicos

A umidade e o mofo em edifícios climatizados artificialmente têm sido associados em muitos estudos com efeitos adversos ao sistema respiratório, tais como tosse seca, chiado, asma, dispneia e infecções respiratórias (FISK et al., 2007; FISK; ELISEEVA; MENDELL, 2010).

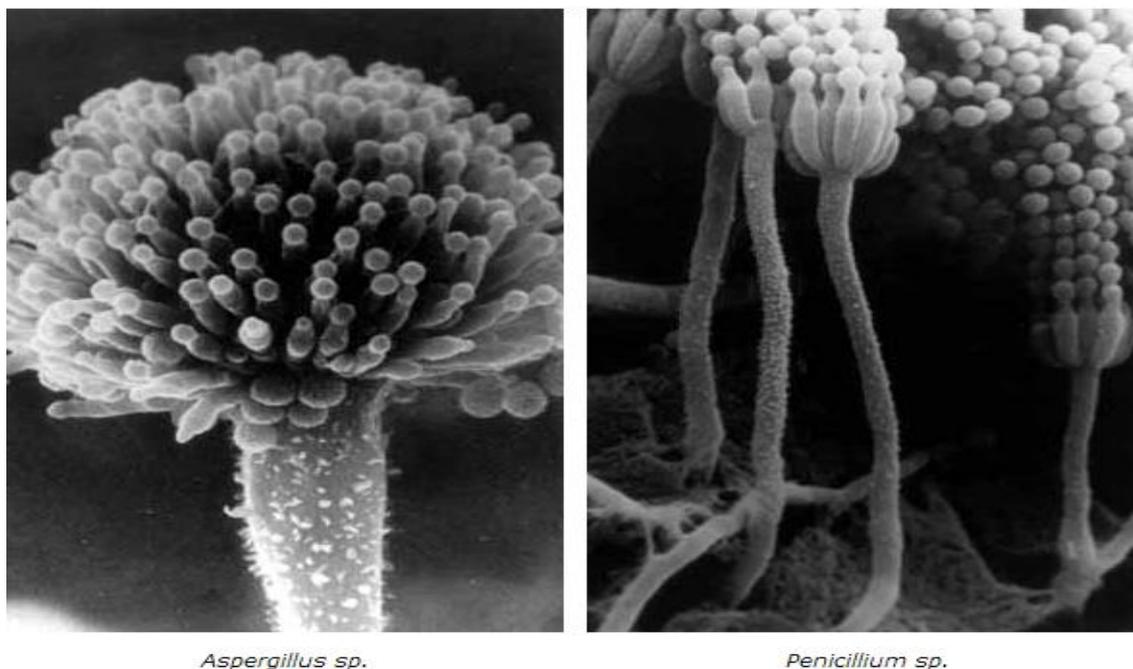
Os elementos fúngicos encontrados no ar atmosférico são os esporos (propágulos), considerados aeroalergênicos que, quando inalados, podem ser responsáveis por manifestações respiratórias alérgicas, como asma e rinite (MEZZARI et al., 2003; EDUARD, 2009; BACKES et al., 2011).

O filo Ascomycota possui 46 ordens e cerca de 6.000 gêneros, entre eles encontram-se os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (DE HOOG et al., 2001). Os propágulos produzidos por algumas espécies destes gêneros podem ter ação patogênica, toxigênica e alérgica (FISCHER et al., 2000; CAI et al., 2011), além de serem os mais comumente isolados de ambientes interiores climatizados artificialmente (HORNER et al., 1995; HUSSIN et al., 2011).

Aspergillus e *Penicillium* (**Figura 3**) são fungos que se destacam por sua ubiquidade. A grande maioria das espécies destes gêneros são saprófitas, geralmente encontrados no solo, vegetação em decomposição, sementes e grãos.

Poucas espécies são reconhecidas como importantes patógenos de seres humanos ou animais domésticos (PITT, 1994).

Figura 3 – Microscopia eletrônica de varredura dos gêneros *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp.



Fonte: <http://www.fiocruz.br/~ccs/fungo.htm>

O gênero *Aspergillus* é representado por cerca de 132 espécies distribuídas mundialmente, sendo que 20 destas espécies têm sido reportadas por serem agentes de infecções oportunistas, estado alérgico e toxicoses em humanos. *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus ochraceus* são as espécies mais comumente encontradas em ambientes climatizados, que além de serem produtoras de metabólitos tóxicos também são associados com doença alérgica broncopulmonar, ceratite micótica, otomicose, sinusite, infecção invasiva, onicomiose, sinusite nasal, aspergilose cerebral, meningites, endocardites, miocardites, aspergilose pulmonar, osteomielite, aspergilose cutânea, aspergilose hepatoesplênica e doenças nosocomiais (BHETARIYA et al., 2011; GEHLOT et al., 2011).

Penicillium é um grande gênero fúngico com mais de 200 espécies descritas, de ocorrência generalizada na maioria dos ambientes terrestres (PETIT et al., 2009). Em anos recentes, infecção fúngica por espécies de *Penicillium* tornou-se cada vez

mais corriqueira. Um amplo espectro de entidades clínicas tem sido descritas, sendo que as doenças alérgicas e micoses superficiais são as mais comuns (NORITOMI et al., 2005). Outro fato peculiar ao gênero é a produção de metabólitos tóxicos, como a Citrinina, que pode ser produzida por espécies de *Penicillium citrinum*, *Penicillium chrysogenum* e *Penicillium expansum* (FRISVAD et al., 2004).

3.2.2 Risco Ocupacional da Inalação de Micotoxinas

Alguns fungos são capazes de produzir metabólitos secundários que são tóxicos; estes fungos são classificados como toxigênicos e os metabólitos são denominados micotoxinas (DEL FIOREA et al., 2010). Esses organismos, em sua maioria são ubíquos e adaptados para colonizar, crescer e produzir toxinas em diferentes substratos, quando encontram condições favoráveis de temperatura e umidade (BENNETT; KLICH, 2003; LANG-YONA et al., 2012).

Os principais gêneros fúngicos associados com a produção de micotoxinas (**Quadro 1**) são *Aspergillus* e *Penicillium* (BRYDEN, 2007; HALSTENSEN, 2008) e estão amplamente distribuídos no ecossistema brasileiro (BUGNO et al., 2006).

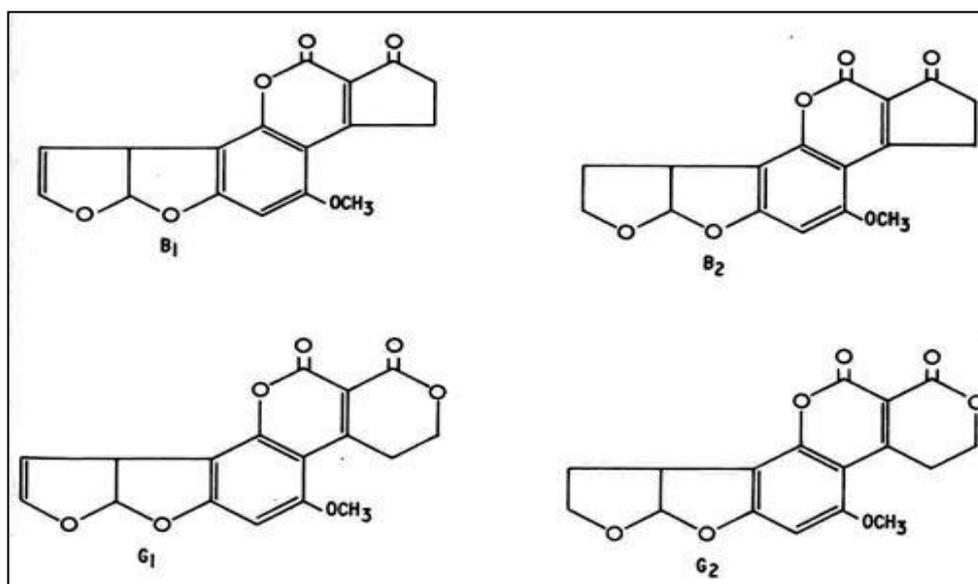
Quadro 1 – Efeitos deletérios associados à exposição a micotoxinas das principais espécies fúngicas toxigênicas isoladas de ambientes climatizados.

ESPÉCIES FÚNGICAS PRODUTORAS	PRINCIPAIS MICOTOXINAS	EFEITOS DELETÉRIOS	REFERÊNCIA
<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. nomius</i> e <i>A. parasiticus</i>	Aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2)	Carcinogenicidade e hepatotóxicidade	ZUO et al., 2012
<i>Penicillium citrinum</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i> e <i>Penicillium expansum</i>	Citrinina	Nefrotoxicidade, carcinogenicidade	FRISVAD et al., 2004; YAO et al., 2011
<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. glaucus</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>A. alliaceus</i>	Ocratoxina A e B	Nefrotoxicidade, carcinogenicidade, teratogenicidade e imunotoxicidade.	FIGUEROA et al., 2012
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Gliotoxin	Efeitos citotóxicos, imuno-inibitórios e apoptótico	CARBERRY et al., 2012

Fonte: Do autor.

O termo micotoxina surgiu em 1962 no Reino Unido, devido á morte de 100.000 perus que consumiram alimentos contaminados por aflatoxina (**Figura 4**) (RAI et al., 2012).

Figura 4 – Estrutura química das Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂.



Fonte: <http://www.icrisat.org/aflatoxin/aflatoxin.asp>

As micotoxinas são produtos químicos sintetizados através do metabolismo secundário de fungos filamentosos, possuem baixo peso molecular, e podem estar presentes no micélio ou nos esporos do fungo produtor, causando efeitos deletérios a saúde humana e animal (NIELSEN, 2003; WANG; WANG, 2008; ROSEANU et al., 2010).

Existem mais de 400 tipos de micotoxinas, divididas em pelo menos 21 classes, sendo produzidas por cerca de 350 espécies fúngicas diferentes (HAMEED et al., 2012). São compostos orgânicos complexos de 200 a 800 kDa, não voláteis a temperaturas ambientes (TUOMI et al., 2000), que apenas auxiliam os fungos na competitividade dentro de seu nicho ecológico, não sendo necessárias para o crescimento e desenvolvimento da espécie fúngica produtora (BUGNO et al., 2006).

Nem todas as espécies fúngicas são produtoras de micotoxinas, e sua presença não implica na presença de micotoxinas, isto porque sua produção depende de condições favoráveis (pH, atividade em água e temperatura) e de fatores intrínsecos relacionados ao genoma do fungo (MANAL et al., 2012). Não obstante, a ausência de fungos toxigênicos não é um indicativo da inexistência de

micotoxinas, já que estas podem persistir mesmo que o fungo produtor não esteja mais presente no local (KWIATKOWSKI; ALVES, 2007).

Atualmente, a principal via de exposição à micotoxinas é a ingestão de produtos contaminados, contudo a exposição dérmica e inalatória são vias importantes a serem consideradas, principalmente ao se tratar de exposições ocupacionais (PERAICA et al., 1999; ROBBINS et al., 2000; BENNETT; KLICH, 2003; ANYANWU, 2008; MAYER et al., 2008).

Os gêneros fúngicos considerados principais produtores de micotoxinas, são encontrados em áreas úmidas de edificações e a exposição crônica às suas micotoxinas tem sido estudada em ambientes internos (JARVIS; MILLER, 2005).

O envenenamento por micotoxinas é chamado de micotoxicose, sendo o fígado, rins, cérebro, músculos e sistema nervoso os órgãos mais afetados. Os sintomas variam de brandos, como náuseas e vômitos, a sintomas graves como falta de coordenação dos movimentos e morte (PERAICA et al., 1999).

Algumas micotoxinas, especificamente aflatoxinas e ocratoxinas, podem ser detectadas em tecido humano e fluidos corporais de pacientes que foram expostos a ambientes contaminados com fungos toxigênicos (BRERA et al., 2002; HOOPER et al., 2009).

O crescente foco em micotoxinas, particularmente na indústria de produção de grãos, juntamente com a exposição ao pó inevitável durante o manuseio da cultura, levou a uma crescente preocupação com a exposição por inalação ocupacional de micotoxinas (AMADI; ADENIYI, 2009). Em 1981, Burg et al., nos estudos da mensuração de micotoxinas na poeira, puderam constatar que a inalação durante o manuseamento de produtos contaminados também representam potencialmente uma via de exposição à micotoxinas.

Os problemas de saúde causados por micotoxinas inaladas tendem a ser mais graves do que aqueles causados por micotoxinas absorvidas através do trato digestivo e da pele, já que elas podem ser 10 vezes mais tóxicas através da inalação, do que por ingestão oral. Em contra partida, nenhuma avaliação de risco foi realizada até agora para a exposição a micotoxinas por inalação humana (MAYER et al., 2008; POLIZZI et al., 2009).

Apenas algumas micotoxinas foram encontradas em aerossóis, incluindo a aflatoxina, alguns tricotecenos, zearalenona, ocratoxina e ácido secalonic D. Isto é

devido a propriedades, tais como, não ser volátil e possuir baixo peso molecular. A exposição por inalação provavelmente ocorre através da inalação de partículas transportadas pelo ar que contenham micotoxinas, tais como poeira e componentes de fungos (KUHN; GHANNOUM, 2003; NIELSEN, 2003; BLOOM et al., 2007).

Estudos apontam que existe uma correlação significativa entre a incidência de níveis elevados de esporos de fungos no ar contendo micotoxinas em edifícios com o estado geral de saúde dos ocupantes, dentre eles, doenças respiratórias, sintomas alérgicos, e outras, incluindo náuseas e vômitos (ROWAN et al., 1999; ROBBINS et al., 2000; KUHN; GHANNOUM, 2003).

4 METODOLOGIA

4.1 Material

4.1.1 Material Biológico

4.1.1.1 Amostras estudadas

Como objeto de estudo foram avaliados 183 isolados, que incluíram *Aspergillus flavus* (23), *Aspergillus fumigatus* (20), *Aspergillus niger* (50), *Aspergillus ochraceus* (20), *Penicillium citrinum* (30), *Penicillium chrysogenum* (20) e *Penicillium expansum* (20) pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Ambientes Climatizados do Setor de Genética e Biologia Molecular/ICBS-UFAL. As amostras foram isoladas de ambientes climatizados de escolas, universidades, aeroportos, hospitais, clínicas, shoppings, repartições públicas e privadas. Os critérios de escolha das espécies foram baseados na frequência em ambientes climatizados e sua potencial ação patogênica, alergênica e toxigênica.

4.1.1.2 Amostras Usadas como Controle Negativo

Foram utilizadas as espécies *Aspergillus granulatus*, *Aspergillus ustus*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium spinulosum*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Sacharomyces cereviseae*, pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Ambientes Climatizados do Setor de Genética e Biologia Molecular/ICBS-UFAL como controle negativo para a identificação molecular.

4.1.1.3 Amostras Usadas como Controle Positivo

Aspergillus flavus (URM 6442), *Aspergillus fumigatus* (URM 5601), *Aspergillus niger* (URM 6329), *Aspergillus ochraceus* (URM 5609), *Penicillium citrinum* (URM 6224), *Penicillium chrysogenum* (URM 5892) e *Penicillium expansum* (URM 4024)

provenientes da coleção de culturas da Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE foram utilizados para validação dos primers.

4.1.2 Meios de Cultura

Ágar Sabouraud Dextrose – ASD	
Glicose_____	40 g
Peptona_____	10 g
Ágar_____	15 g
Água destilada_____	1000 mL
pH: 5,6	
Autoclavou-se por 15 min/121 °C	

Ágar Lactrimel	
Farinha de trigo_____	20 g
Leite_____	200 mL
Agar_____	20 g
Mel de abelha_____	7 g
Água destilada_____	800 mL
pH: 6,6	
Autoclavou-se por 15 min/121 °C (o leite separado)	

Ágar Leite de Coco	
Ágar_____	16 g
Leite de coco_____	200 mL
Água destilada_____	600 mL
pH: 6,9	
Autoclavou-se por 15 min/121 °C	

Caldo Sabouraud	
Glicose _____	40 g
Peptona _____	10 g
Água destilada _____	1000 mL
pH: 5,6	
Autoclavou-se por 15 min/121 °C	

4.1.3 Reagentes

Lactofenol de Amann	
Ácido láctico _____	10 g
Ácido fênico _____	10 g
Glicerina _____	20 g
Água destilada _____	10 mL

TE	
TRIS/HCL _____	10 mM
EDTA _____	1 mM
pH: 8	

Tampão de extração	
Tris-HCl pH 8,0 _____	200 mM
NaCl _____	250 mM
EDTA _____	25 mM
SDS (p/v) _____	1%

Clorofil	
Clorofórmio _____	96 mL
Álcool isoamílico _____	4 mL

Clorofane	
Fenol equilibrado e clorofórmio p.a. (1:1)	

TBE 5X	
TRIS/base_____	54 g
Ácido bórico_____	27,5 g
EDTA 0,5M_____	20 mL
Água miliQ_____	1000 mL

TBE 0,5 X	
TBE 5X_____	100 mL
Água miliQ_____	1000 mL

4.2 Métodos

4.2.1 Reativação e Purificação dos Isolados

Os isolados mantidos em conservação pelo método Castellani (1939) modificado (suspensão de esporos em água destilada mantida a temperatura ambiente em microtubos) foram reativados através de semeio radial de 200 μ L da suspensão de esporos na superfície de placas de Petri contendo o meio de cultura ASD – Ágar Sabouroud Dextrose, acrescido de 50 mg.L^{-1} de cloranfenicol, as quais foram mantidas em estufa a 28 °C por cinco dias.

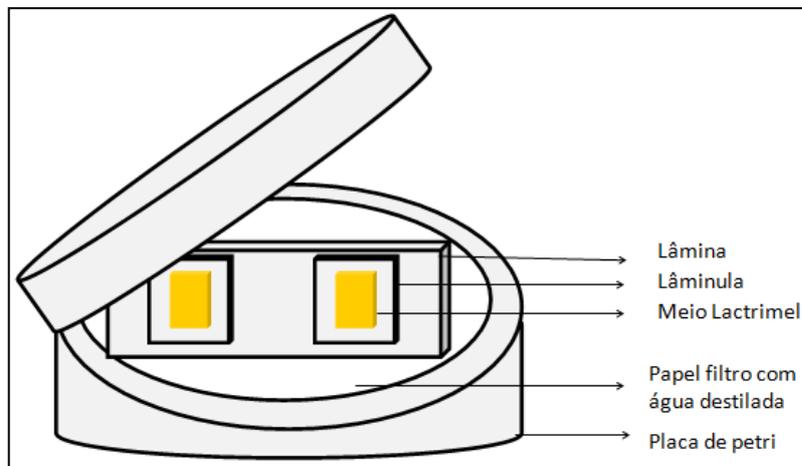
Após o período de incubação, foram preparadas suspensões das colônias fúngicas em 2 mL de água destilada e esterilizada adicionada de 50 mg.L^{-1} de cloranfenicol. Em seguida, 200 μ L foram semeados por esgotamento na superfície de uma placa de Petri contendo o meio de cultura ASD acrescido de 50 mg.L^{-1} de cloranfenicol, as quais foram incubadas a 28 °C por cinco dias. Posteriormente foi realizada identificação das espécies fúngicas estudadas pelos métodos convencional e molecular.

4.2.2 Identificação das Colônias por Método Convencional

As características macroscópicas como cor, superfície e textura do verso e do reverso de cada gênero foram observadas através da cultura de três pontos em ASD acrescido de mg.L^{-1} de cloranfenicol (LACAZ et al., 2002).

Já para as características microscópicas foi realizado o microcultivo pela técnica de Ridell, 1950 (**Figura 5**) onde foram utilizadas placas de Petri esterilizadas, contendo em seu interior suporte para três lâminas e um papel filtro. Dois cubos de aproximadamente um cm³ de meio de cultura Lactrimel foram cortados e colocados sobre a lâmina suspensa por um suporte contido no interior da placa. Inoculou-se o isolado em todos os lados do cubo de meio de cultura, o qual posteriormente foi coberto por uma lamínula esterilizada. O papel filtro no interior foi umedecido com 2 mL de água destilada esterilizada e a placa incubada em estufa por 7 dias, a 28 °C. Após o tempo de incubação, a lamínula foi retirada e colocada sobre outra lâmina limpa contendo uma gota de Lactofenol de Amann, sendo as bordas vedadas com esmalte incolor. As lâminas preparadas foram observadas ao microscópio óptico em aumento de 40 e 100x para a visualização das características microscópicas do fungo.

Figura 5 – Ilustração da placa usada no microcultivo segundo a técnica de Ridell (1950) modificada.



Fonte: Do autor.

As espécies fúngicas foram identificadas através de suas características morfológicas seguindo os critérios adotados nas chaves de identificação (**Quadro 2 e 3**) de Raper; Fennell (1973), Pitt (1979), Frisvad et al. (1990), Hoog et al. (2000) e Gugnani (2003).

Quadro 2 - Chave de identificação das espécies de *Aspergillus* estudadas.

Chave de identificação - <i>Aspergillus</i>	Espécie
1. AUSÊNCIA DE ASCOMATA EM COLÔNIA	
1.1 COLÔNIAS COM TONS VERDES	
1.1.1 Vesículas na maioria não clavadas	
1.1.1.1 Células conidiogênicas estritamente bisseriados ou pelo menos em parte bisseriados	
1.1.1.1.1 Células em conidiogênese bisseriadas e unisseriadas	
1.1.1.1.2 Colônias amarelas-esverdeadas ou amarelas-oliváceas	
1.1.1.1.3 Conídios espiculados	<i>Aspergillus flavus</i>
1.1.1.2 Células em conidiogênese estritamente unisseriada	
1.1.1.2.1 Conídios esféricos	<i>Aspergillus fumigatus</i>
1.2 COLÔNIAS COM OUTRAS COLORAÇÕES	
1.2.1 Células conidiogênicas estritamente bisseriados	
1.2.1.1 Colônias pretas	<i>Aspergillus niger</i>
1.2.1.2 Colônias não pretas	
1.2.1.2.1 Conídios lisos de parede finamente áspera	
1.2.1.2.2 Cabeças dos conídios de irradiais para frouxamente colunar	
1.2.1.2.3 Colônias amarelas, conidióforo áspero ou espiculado	
1.2.1.2.4 Esclerócios rosa á roxo vináceo	<i>Aspergillus ochraceus</i>

Fonte: RAPER; FENNELL (1973), PITT (1979), FRISVAD et al. (1990), HOOG et al. (2000) e GUGNANI (2003)

Quadro 3 - Chave de identificação das espécies de *Penicillium* estudadas.

Chave de identificação - <i>Penicillium</i>	Espécie
1. CONIDIÓFOROS RAMIFICADOS PELO MENOS UMA VEZ	
1.1 PENICILLI PREDOMINANTEMENTE BIVERTICILADO	
1.2 FIÁLIDES DILATADAS E CONÍDIOS ESFÉRICOS PARA SUBESFÉRICOS	<i>Penicillium citrinum</i>
2. CONIDIÓFOROS RAMIFICADOS BI OU TRIVERTICILADOS	
2.1 FIÁLIDES MAIS LONGAS, COM O PENICILLI PREDOMINANTEMENTE TRIVETICILADO;	
2.2 CONIDIÓFORO E CONÍDIOS LISOS	
2.2.1 Conídios azuis ao azul-verdeados, exsudato e pigmento amarelo brilhante e solúvel	<i>Penicillium chrysogenum</i>
2.2.2 Conídios verdes com presença ou ausência de exsudato e pigmentos solúveis de coloração pálida a marrom	<i>Penicillium expansum</i>

Fonte: RAPER; FENNELL (1973), PITT (1979), FRISVAD et al. (1990), HOOG et al. (2000) e GUGNANI (2003).

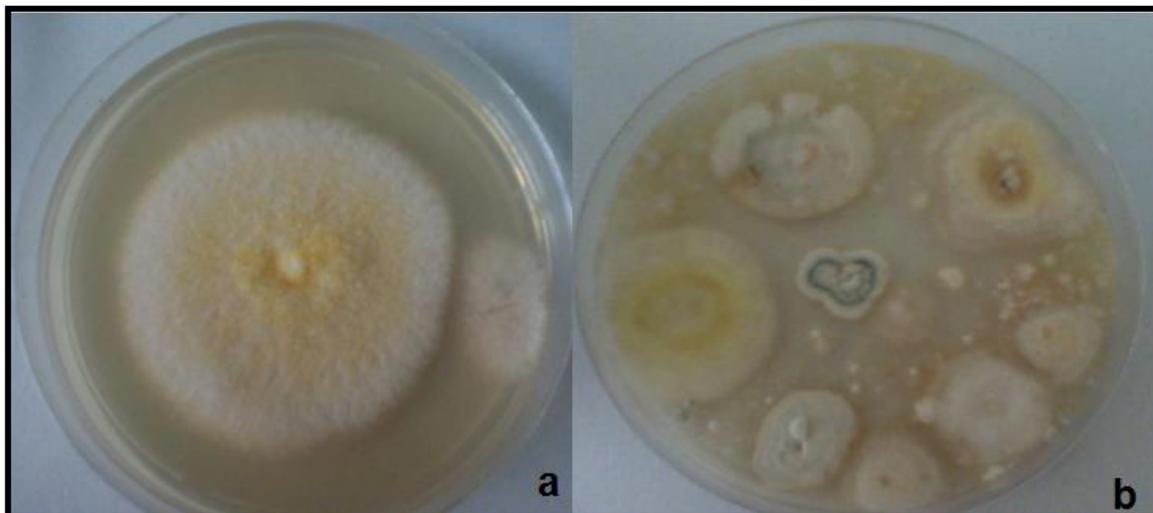
4.2.3 Identificação dos Isolados por PCR

4.2.3.1 Obtenção da Massa Micelial e Extração do DNA Total

Os isolados foram cultivados puros (**Figura 6.a**) e em conjunto (cultivo por conveniência dos isolados estudados, controle positivo e controle negativo) (**Figura 6.b**) no meio de cultura ASD, incubados em estufa a 28 °C durante 5 dias. Após o aparecimento de colônias, uma alíquota de um mL de suspensão de esporos em solução salina 0,85% com 0,1% de Tween 20, na concentração de 10^5 esporos.mL⁻¹ foi transferida para 50 mL de caldo Sabouraud e incubadas sob condições de agitação contínua a 110 revoluções/minuto durante 72 horas. A massa micelial foi filtrada com auxílio de papel filtro estéril e lavada em água destilada estéril, em seguida foi submetida ao método de extração de DNA total pela técnica modificada

de Raeder e Broda (1985), sendo macerada em gral e pistilo estéreis com nitrogênio líquido, 500 μL do macerado foi transferido para tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL ao qual se adicionou 1000 μL de água destilada estéril submetido a centrifugação a 500 g por três minutos, o sobrenadante foi descartado, este procedimento foi realizado por três vezes a fim de remover impurezas da amostra. Ao lavado foi adicionado 600 μL de tampão de extração, procedendo-se a agitação em vortex. Foi incubado em Banho- Maria por 30 minutos a 65 $^{\circ}\text{C}$, com agitação por inversão a cada 5 min. Após incubação foram adicionados 600 μL de clorofane, com posterior centrifugação por 10 minutos a 12.000 g . Foi transferido 500 μL do sobrenadante para outro microtubo, aos quais adicionou-se 500 μL de clorofil, sendo o precipitado submetido à centrifugação por 10 minutos a 12.000 g . Em seguida 400 μL do sobrenadante foram novamente transferido para outro microtubo ao qual foram adicionados 800 μL de etanol absoluto gelado. Após leve agitação, as amostras foram colocadas em freezer a - 20 $^{\circ}\text{C}$ overnight para precipitação do DNA. Após a precipitação as amostras foram centrifugadas por 12 minutos a 12.000 g com posterior descarte do sobrenadante. O centrifugado foi lavado com 400 μL de etanol a 70% por duas vezes e após desidratação à temperatura ambiente o DNA foi ressuspendido em 100 μL de TE pH 8.0. As amostras de DNA ressuspendidas foram submetidas ao tratamento com 20 μL de RNase 20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 2 horas, posteriormente foram conservadas em freezer -20 $^{\circ}\text{C}$ até o momento de uso. Para confirmação do DNA extraído, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1% (10 $\text{volts}\cdot\text{cm}^{-1}$), coradas com brometo de etídeo e visualizadas em luz ultravioleta a 312 nm.

Figura 6 – Culturas de fungo em Agar Sabouraud Dextrose após incubação a 25 °C durante 5 dias a) Colônia pura e b) cultura mista de fungo obtida pelo cultivo randômico de espécies.



Fonte: Do autor.

4.2.3.2 Seleção e Análise das Sequências de Inicializadores

As sequências de iniciadores espécie-específicos publicados (<http://www.epa.gov/microbes/moldtech.htm>) e contidos no **quadro 4** foram analisadas pelo programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e validados por PCR com o controle positivo (**item 4.1.1.3**) e negativo (**item 4.1.1.2**).

Quadro 4 – Oligonucleotídeos iniciadores espécie-específica das espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* estudadas.

Espécie	Oligonucleotídeos iniciadores	pb
<i>A. flavus</i>	Aflav F1: 3'-CGA GTG TAG GGT TCC TAG CGA-5' Aflav R1: 3'-CCG GCG GCC ATG AAT-5'	89
<i>A. fumigatus</i>	Afumi F1: 3'-GCC CGC CGT TTC GAC-5' Afumi R1: 3'-CCG TTG TTG AAA GTT TTA ACT GAT TAC-5'	136
<i>A. niger</i>	Anigr F1: 3'-GCC GGA GAC CCC AAC AC-5' Anigr R1: 3'-TGT TGA AAG TTT TAA CTG ATT GCA TT-5'	79
<i>A. ochraceus</i>	Aochr F1: 3'-AAC CTC CCA CCC GTG TAT ACC-5' Aochr R1: 3'-CCG GCG AGC GCT GTG-5'	260
<i>P. citrinum</i>	Pcitr F: 3'-CCG TGT TGC CCG AAC CTA-5' Pcitr R: 3'-TTG TTG AAA GTT TTA ACT AAT TTC GTT ATA G-5'	128
<i>P. chrysogenum</i>	Pchry F1: 3'-CGG GCC CGC CTT AAC-5' Pchry R1: 3'-GAA AGT TTT AAA TAA TTT ATA TTT TCA CTC AGA GT-5'	300
<i>P. expansum</i>	Pexpa F1: 3'-TTA CCG AGT GAG GGC CGT T-5' Pexpa R1: 3'-GCC CGC CGA AGC TAC G-5'	560

Legenda: pb – pares de bases.

Fonte: Do autor.

4.2.3.3 Amplificação com os Iniciadores Espécies-específicos por PCR Simplex

A reação de amplificação por PCR simplex foi realizada utilizando-se iniciadores espécie-específicos, descritos no **quadro 4** e o DNA total extraído (**item 4.2.3.1**). Essa reação foi realizada em volume final de 20 µL em termociclador MJ – BIOCYCLER®, de acordo com o protocolo descrito no **quadro 5**. Foi utilizado como molde o DNA de culturas puras e mistas.

Os ciclos de amplificação foram programados para um ciclo de desnaturação inicial de 5 minutos, a 96 °C, seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 96 °C, por 30

segundos, hibridização a 58° C, por 30 segundos, extensão a 72 °C, por 30 segundos, e com extensão final a 72 °C, por 15 minutos.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,3% e submetidos a uma tensão de 10 volts.cm⁻¹, por 90 minutos, em tampão TBE 0,5X. O gel foi corado com brometo de etídio (0,1 µg.mL⁻¹), visualizado em transiluminador e fotografado em sistema de fotodocumentação Vilber Lourmat modelo Doc-Print II®.

Quadro 5 - Protocolo da reação para amplificação com os iniciadores espécie-específicos em ensaio de PCR simplex das espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* estudadas.

Componentes	Concentração final
Água MiliQ estéril	-
*Tampão PCR	1,25X
BSA (Soro Albumina Bovina)	0,031 µg/µL
*Mistura de dNTP's	0,25 mM
Iniciador 1	0,78 µM
Iniciador 2	0,78 µM
*MgCl ₂	3,75 µM
*Taq Polimerase	0,025 U/µL
DNA	2,5 ng/µL

* Invitrogen, USA®

Fonte: Do autor.

4.2.3.4 Amplificação com os Iniciadores Espécies-específicos por PCR Multiplex

Os procedimentos foram realizados conforme o item anterior (item 4.2.3.3) alterando apenas o protocolo da reação de amplificação para o descrito no **quadro**

6. Foram utilizados em cada ensaio quatro pares de iniciadores, sendo assim, cada reação possibilita a identificação de até quatro espécies diferentes.

Quadro 6 - Protocolo da reação para amplificação com os iniciadores espécie-específicos em ensaio de PCR multiplex das espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* estudadas.

Componentes	Concentração final
Água MiliQ estéril	-
*Tampão PCR	1,25X
BSA (Soro Albumina Bovina)	0,031 µg/µL
*Mistura de dNTP's	0,25 mM/µL
Iniciador 1	0,5 µM
Iniciador 2	0,5 µM
Iniciador 3	0,5 µM
Iniciador 4	0,5 µM
Iniciador 5	0,5 µM
Iniciador 6	0,5 µM
Iniciador 7	0,5 µM
Iniciador 8	0,5 µM
*MgCl ₂	3,75 µM
* <i>Taq</i> Polimerase	0,025 U/µL
DNA	2,5 ng/µL

* Invitrogen, USA®

Fonte: Do autor.

4.2.4 Screening para Identificação de Isolados Fúngicos Potencialmente Produtores de Micotoxinas

A triagem de fungos toxigênicos foi realizada pelo método previamente descrito por Lin e Dianese (1976), onde um cm³ de cada colônia dos isolados purificados no **item 4.2.1** foi inoculado no centro de uma placa de Petri contendo meio Ágar Leite de Coco. As placas foram incubadas por 7 dias a 28 °C no escuro. O verso e o reverso da colônia foram observados a cada 24 horas por até 7 dias sob luz ultravioleta (365 nm), para verificar a presença de um halo fluorescente azulado ou esverdeado, o qual indica a possível presença de aflatoxinas, citrinina ou ocratoxinas. O Ágar Leite de Coco foi o meio de cultura de escolha, já que além de fornecer os nutrientes necessários para o crescimento fúngico e produção de metabólitos secundários, possui a transparência que permite a dispersão da luz ultravioleta.

4.2.5 Análise Estatística

Após a realização dos experimentos, foi construído um banco de dados no Programa Microsoft Office Excel[®] com a tabulação dos dados relacionados a todos os isolados estudados e os percentuais foram aferidos. Após a digitação, os dados foram conferidos por no mínimo duas pessoas. Para mensuração do grau de concordância foi aplicado o teste de Kappa, considerando segundo Landis e Koch (1977): concordância quase perfeita (0,81-1,00), substancial (0,61-0,80), moderada (0,41-0,60), razoável (0,21-0,40), ruim (< 0,20), além disso, foi aplicado o teste de McNemar para verificar a direção (tendência) da discordância, adotando-se nível de significância estatística de 5%, ambos os testes foram realizados no programa GraphPad Prism 5[®]. Foram realizados testes para a obtenção de sensibilidade e especificidade descritos no **Apêndice B**.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

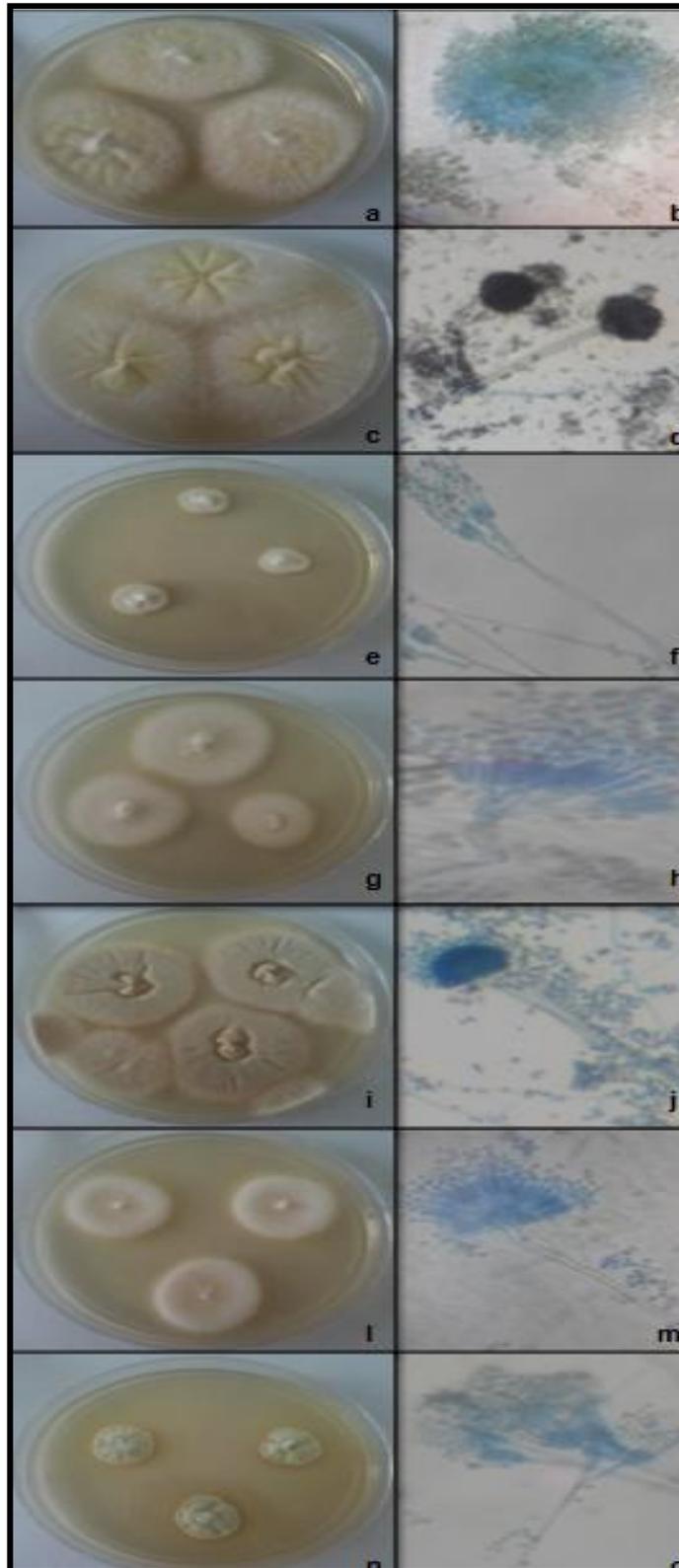
5.1 Identificação das Culturas pelo Método Convencional

A abordagem clássica ou convencional usada por micologistas na identificação de fungos é a particularidade morfológica (fenótipo) de cada espécie, na qual, os estágios sexuais constituem o alicerce da taxonomia e nomenclatura dos fungos (GUARRO et al., 1999).

A identificação de fungos baseada na morfologia de suas colônias é geralmente considerada difícil, não confiável e que leva a resultados inconsistentes, isto se deve ao fato de que, as características usadas para a delimitação de espécies dentro de um gênero, muitas vezes, mostram pequenas diferenças, as quais só podem ser confiavelmente avaliadas por micologistas experientes, além disso, estirpes de uma mesma espécie podem apresentar ligeiras diferenças em sua morfologia (BANDH et al., 2011).

As 183 culturas puras citadas no item 5.1 foram submetidas à reidentificação pelo método convencional (**Figura 7**) por, no mínimo, duas pessoas capacitadas para identificação de fungos.

Figura 7 – Características morfológicas dos fungos estudados, respectivamente macro e microscópica a, b) *Aspergillus flavus*; c, d) *A. niger*; e, f) *Penicillium citrinum*; g, h) *P. expansum*; i, j) *A. fumigatus*; l, m) *A. ochraceus* e n, o) *P. chrysogenum*.



Fonte: Do autor.

Aspergillus e *Penicillium* são gêneros fúngicos clinicamente importantes, assim, a identificação precisa em nível de espécie, mesmo não sendo fácil, é essencial. Embora os métodos moleculares, bioquímicos e fisiológicos sejam importantes para a sistemática de *Aspergillus* e *Penicillium* sp., propriedades morfológicas são mais comumente utilizadas para identificação (ASAN, 2004; ILHAN et al., 2005).

5.3 Identificação dos Isolados por PCR Simplex e Multiplex

Atualmente existem cerca de 172.000 sequências fúngicas depositadas no maior banco de dados genômicos do mundo, o GenBank, provenientes de mais de 11.500 estudos científicos, publicados em 500 revistas, essas sequências são constituídas de aproximadamente 15.500 espécies e 2.500 gêneros. A maioria delas foi obtida através de isolados ambientais (SCHOCH et al., 2012). Esses dados encorajam o desenvolvimento de protocolos, a fim de padronizar a identificação de fungos por métodos de biologia molecular.

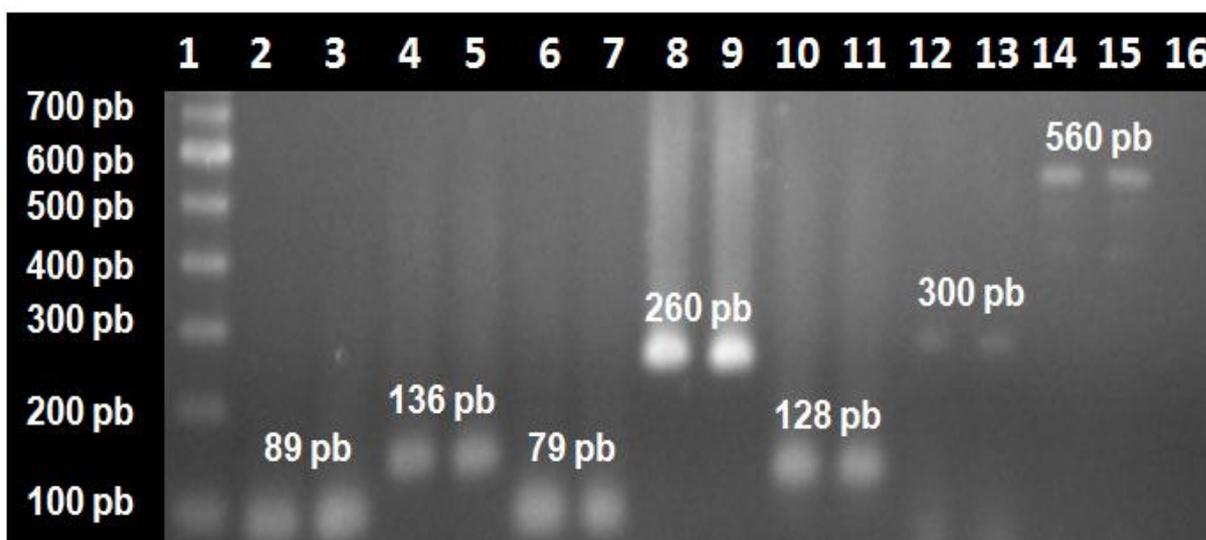
A otimização do ensaio de PCR multiplex objetiva o desenvolvimento de um protocolo que permite identificar até quatro organismos, utilizando os exatos componentes da reação e programa de amplificação, além de evitar o aparecimento de bandas espúrias (GUNSON et al., 2003).

Sendo assim, para a normalização da amplificação do DNA das espécies por PCR vários testes (gradientes dos reagentes, concentração de DNA, temperatura de hibridização dos iniciadores e tempos de amplificação) foram realizados. A validação foi obtida utilizando iniciadores específicos para amplificação do DNA de cepas controles, obtidas de coleção de referência, e a não amplificação dos controles negativos, bem como produção dos amplicons dos tamanhos esperados (*Aspergillus flavus* 89 pb, *Aspergillus fumigatus* 136 pb, *Aspergillus niger* 79 pb, *Aspergillus ochraceus* 260 pb, *Penicillium citrinum* 128 pb, *Penicillium chrysogenum* 300 pb e *Penicillium expansum* 560 pb).

Cada par de iniciadores específicos da espécie foi testado em ensaios simplex e multiplex de PCR. As 183 culturas puras identificadas por métodos convencionais, foram submetidas à reidentificação por PCR simplex e multiplex em duplicata (**Figura 8**). Além disso, foram realizados ensaios de PCR com DNA

extraído de culturas mistas (culturas contendo diferentes espécies, sendo elas, amostras em estudo, controles positivo e controles negativo).

Figura 8 – Gel de agarose a 1,3% com produtos da amplificação obtidos pela PCR simplex. (1) Marcador de peso molecular de 100 pb, (2) *Aspergillus flavus* URM 6442, (3) isolado *Aspergillus flavus*, (4) *Aspergillus fumigatus* URM 5601, (5) isolado *Aspergillus fumigatus*, (6) *Aspergillus niger* URM 6329, (7) isolado *Aspergillus niger*, (8) *Aspergillus ochraceus* URM 5609, (9) isolado *Aspergillus ochraceus*, (10) *Penicillium citrinum* URM 6224, (11) isolado *Penicillium citrinum*, (12) *Penicillium chrysogenum* URM 5892, (13) isolado *Penicillium chrysogenum*, (14) *Penicillium expansum* URM 4024, (15) isolado *Penicillium expansum*, (16) Controle negativo.



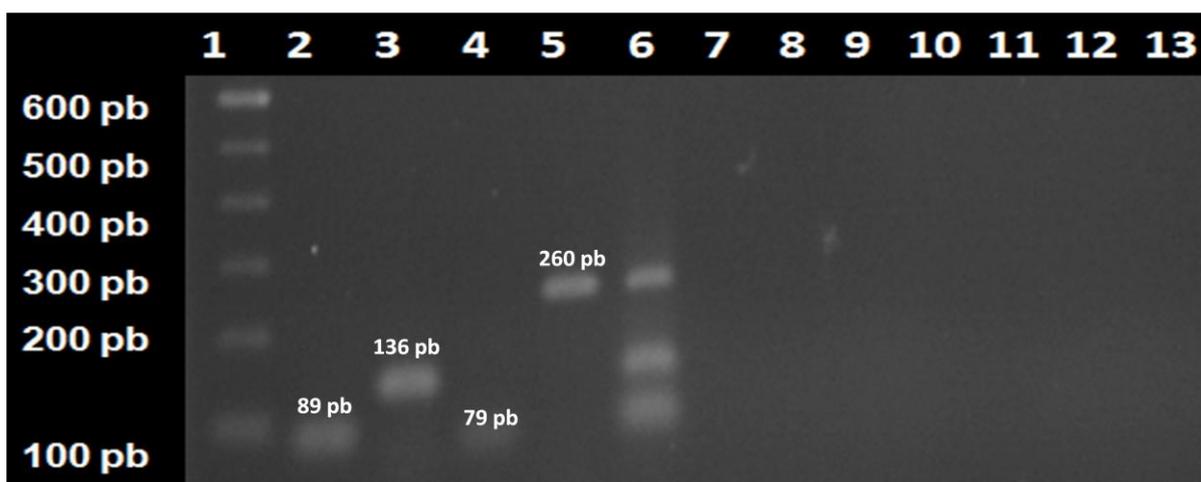
Fonte: Do autor.

Todas as culturas estudadas apresentaram o mesmo resultado na PCR simplex e multiplex, tanto para culturas puras como para culturas mistas, mostrando que o método é reprodutível. Para que cada reação fosse considerada válida três critérios foram adotados: amplificação do controle positivo, não amplificação do controle negativo e amplicon de tamanho esperado.

Métodos moleculares baseados em PCR, como o desenvolvido na presente pesquisa, são universalmente aplicáveis e, dados detalhados sobre sua utilização em sistemática de fungos são abrangentes na literatura, independentemente do fato de o fungo ter sido isolado a partir de seres humanos (VANITTANAKOM et al., 2002; TELL, 2005; ZENG et al., 2009) ou de seu hábitat natural (CHEW et al., 2006; TSUI et al., 2011; CORNELISON et al., 2012; XU; YAO, 2012).

Na PCR multiplex, todos os pares de iniciadores utilizados produziram os fragmentos amplificados de tamanho esperado, quando comparados com os fragmentos obtidos pela PCR simplex em culturas puras e mistas.

Figura 9 – Gel de agarose a 1,3% com produtos da amplificação obtidos pela PCR Multiplex para as quatro espécies de *Aspergillus*. (1) Marcador de peso molecular de 100bp, (2) *Aspergillus flavus*, (3) *Aspergillus fumigatus*, (4) *Aspergillus niger*, (5) *Aspergillus ochraceus*, (6) Cultura mista 1 - (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*), (7) Cultura mista 2 - (*Penicillium citrinum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*), (8) *Aspergillus ustus*, (9) *Aspergillus granulorum*, (10) *Penicillium spinulosum*, (11) *Candida albicans*, (12) Cultura mista 3 - (Controle negativo - *Aspergillus granulorum*, *Aspergillus ustus*, *Cladosporium cladosporioides* e *Penicillium spinulosum*) e (13) Controle negativo – Água MiliQ.



Fonte: Do autor.

Para que sejam identificadas as espécies fúngicas em cultura mista através do protocolo de PCR multiplex padronizado no presente estudo, se faz necessário que o tamanho dos amplicons sejam diferentes o bastante para que as bandas não sejam sobrepostas e, assim, seja possível a correta identificação. Na figura 9 na PCR multiplex para as quatro espécies de *Aspergillus*, não foi possível a diferenciação dos amplicons produzidos pelo *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger* na cultura mista.

Contemporaneamente, os métodos moleculares baseados em PCR têm sido utilizados para identificar espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* (KANBE et al., 2002; LI et al., 2004; TSUI et al., 2011; PETERSON, 2012). Inclusive, para a identificação

de outras espécies fúngicas, ensaios de PCR multiplex análogos ao desta pesquisa já foram desenvolvidos (ISIK et al., 2003; SUGITA et al., 2004; DEAN et al., 2005; LOGOTHETI et al., 2009; VÁZQUEZ-EUÁN et al., 2012).

A PCR multiplex apresentada neste estudo, mostrou-se eficaz para identificar sete espécies de fungos presentes no ar ambiente, os quais são de preocupação para a saúde pública, sendo que o protocolo de reação desenvolvido acopla quatro espécies diferentes por reação.

Os iniciadores espécie-específicos não identificaram outros fungos filamentosos e leveduriformes, os quais foram aqui chamados de controle de validação (controle positivo e controle negativo), e que também são frequentemente isolados do ar ambiente.

O método de PCR multiplex é uma alternativa útil aos métodos tradicionais para a identificação de fungos, além de ser mais rápido e mais barato do que os protocolos de PCR simplex, uma vez que permitem a detecção simultânea de mais de um isolado (LUQUE et al., 2012).

Neste trabalho, um método rápido, sensível e específico de PCR multiplex foi desenvolvido. Nenhuma outra pesquisa foi encontrada, através de levantamento bibliográfico, que fosse capaz de identificar até quatro espécies em culturas mistas, o que é importante ao se tratar de identificação de fungos em amostras de ambientes, em especial aquelas capazes de causar patologias em humanos, sendo esse provavelmente o primeiro relato.

5.4 Comparação Entre os Métodos Convencional e PCR

Classicamente, os estudos sobre evolução de fungos foram executados com base na morfologia comparativa, composição da parede celular, características celulares, ultraestrutura e metabolismo celular. Mais recentemente, o advento de abordagens cladísticas e moleculares mudou a situação existente e forneceu novas pistas sobre evolução de fungos. É evidente que, em um futuro próximo, as modernas técnicas moleculares permitirão que a maioria dos fungos, especialmente os patógenos oportunistas, seja identificada com agilidade (ZAIN et al., 2009).

Apesar da biologia molecular ter avançado com maior precisão, a taxonomia clássica é ainda importante, as duas deverão seguir conjuntamente para a identificação correta da espécie. Para descrever uma espécie nova é necessário

utilizar a taxonomia clássica como ferramenta valiosa para descrever as características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas.

A identificação presuntiva pelo método convencional identificou os 183 (89,27%) isolados estudados, enquanto, o método considerado de maior acurácia, a reação em cadeia da polimerase (PCR) identificou 61,75% (n=113) do total (**Tabela 1**).

Essa discrepância dos resultados obtidos pelos métodos estudados é justificada pelo fato da identificação morfológica ser ambígua, tendo em vista que as características analisadas por estes métodos são instáveis, alguns fungos podem apresentar formas atípicas, esporulação lenta e conidióforos aberrantes (BALAJJE et al., 2007). A identificação das espécies dos gêneros em análise no presente estudo é complexa e permanece difícil devido à sobreposição de características morfológicas e bioquímicas (HEDAYATI et al., 2007).

Para a identificação das espécies *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus ochraceus* não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre as metodologias de identificação fúngica. As espécies *Aspergillus niger*, *Penicillium citrinum* e *Penicillium chrysogenum* apresentaram diferenças estatísticas significantes, quando os métodos de identificação estudados foram comparados pelo teste de McNemar (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Comparação dos resultados obtidos por identificação convencional e PCR simplex das espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* estudadas.

Espécie	Identificação por Método Convencional		Identificação por PCR		Teste de McNemar valor de p
	n	%	n	%	
<i>A. flavus</i>	23	12,60	14	7,65	0,0077*
<i>A. fumigatus</i>	20	10,90	20	10,93	0,6831
<i>A. niger</i>	50	27,30	28	15,30	0,0001*
<i>A. ochraceus</i>	20	10,90	18	9,84	0,4795
<i>P. citrinum</i>	30	16,40	12	6,56	0,0001*
<i>P. chrysogenum</i>	20	10,90	14	7,65	0,0412*
<i>P. expansum</i>	20	10,90	7	3,82	0,0001*
Não identificados	0	0	70	38,25	-

Teste de McNemar: Intervalo de Confiança de 95%.

*estatisticamente significante ($p < 0,05$).

Fonte: Do autor.

Fungos intimamente relacionados podem diferir em seus efeitos patológicos, produtos toxigênicos, propriedades benéficas e nichos ecológicos. Sendo assim é bastante importante a identificação correta ao nível de espécie. Identificação morfológica de fungos intimamente relacionados é uma incógnita, devido à escassez e ambiguidade de caracteres diagnósticos, além disso, a identificação com base na morfologia é impossível para muitas espécies que não podem ser cultivadas (ROE et al., 2010).

Para o cálculo de sensibilidade e especificidade foi escolhido como método de referência a PCR (**APÊNDICE A**), já que foi validado pelos controles positivos e negativos, e seus resultados foram mais reprodutíveis que os da identificação convencional.

Sendo assim, utilizando os critérios descritos por GADDIS; GADDIS (1990) e tomando o método de PCR como referência, podemos considerar no presente

estudo que a sensibilidade da identificação convencional é entendida como a capacidade desse método em identificar corretamente a espécie identificada pela PCR (verdadeiro positivo), já especificidade é a capacidade desse método em descartar corretamente (em comparação a PCR) aqueles que não pertencem a dada espécie (falso negativo).

Com maior clareza, os verdadeiros positivos são aqueles que foram positivos para uma espécie na identificação convencional e PCR, e os falsos negativos foram aqueles que foram negativos para dada espécie tanto no método convencional como na PCR.

A alta sensibilidade da PCR em relação a técnicas convencionais já foi reportada por LOHMAN et al. (1998), ANAND et al. (2001) e TARAI et al. (2006). De acordo com CHEN et al. (2011), a identificação baseada no fenótipo pode ser subjetiva, ademais, os métodos convencionais em comparação com ensaios moleculares demonstram imprecisão (ANAND et al., 2001; TARAI et al., 2006).

Em consonância com o exposto na **tabela 2**, podemos observar que, com exceção de *Aspergillus fumigatus*, para todas as outras espécies o método convencional obteve percentual de sensibilidade de 100%. O caso excepcional, ocorreu devido ao fato de que três culturas identificadas a princípio como *Aspergillus flavus* pelo método convencional, quando submetidos a ensaios de PCR foi verificado que, em verdade, tais isolados pertenciam à espécie *Aspergillus fumigatus*, caso posteriormente corroborado pela reidentificação convencional. Essa confusão pode ter ocorrido devido as características macroscópicas e microscópicas destas espécies serem bastante semelhantes.

Quanto à especificidade (**tabela 2**) *Aspergillus niger*, *Penicillium citrinum* e *Penicillium expansum* apresentaram baixo percentual, respectivamente 74,12%, 82,18% e 87,74%; estes valores estão em consenso com o grau de concordância obtido pelo teste de Kappa, o qual, de acordo com a classificação de LANDIS; KOCH (1977) apresentou valor moderado de concordância para estas três espécies.

Ainda na **tabela 2** podemos observar que, o método de identificação convencional apresentou maior sensibilidade para as espécies de *Penicillium* e maior especificidade para as espécies de *Aspergillus*. Ao comparar o método de PCR multiplex aqui desenvolvido com os métodos convencionais, o primeiro mostrou-se mais preciso. A discrepância dos resultados obtidos por comparação

destes métodos já foi observada em estudos anteriores (WILLINGER et al., 2003; SCHABEREITER-GURTNER et al., 2007; ZHAO et al., 2011).

Tabela 2 - Prova diagnóstica que avalia a sensibilidade e especificidade do método de identificação convencional comparada com a PCR simplex das espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* estudadas.

Espécie	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Valor de concordância
<i>Aspergillus flavus</i>	100	90,90	0,712**
<i>Aspergillus fumigatus</i>	85	96,77	0,818*
<i>Aspergillus niger</i>	100	74,12	0,587***
<i>Aspergillus ochraceus</i>	100	97,90	0,937*
<i>Aspergillus sp.</i>	96,25	90,32	0,745**
<i>Penicillium citrinum</i>	100	82,18	0,495***
<i>Penicillium chrysogenum</i>	100	93,94	0,793**
<i>Penicillium expansum</i>	100	87,74	0,475***
<i>Penicillium sp.</i>	100	87,91	0,586***
<i>Aspergillus sp. e Penicillium sp.</i>	97,34	89,23	0,688**

*Kappa 0,81 – 1,00: quase perfeita; **Kappa 0,61 – 0,80: substancial; ***Kappa: 0,41 – 0,60 moderado.

Fonte: Do autor.

Apesar do método baseado na morfologia da macroscopia e microscopia das colônias ter se mostrado capaz de identificar todos os isolados estudados, isso não corresponde a alta sensibilidade do método, já que sensibilidade corresponde a capacidade de identificar corretamente a espécie; bem como alta especificidade, já que esta corresponde a capacidade do método em descartar a possibilidade de não identificar o isolado como não sendo da espécie a qual ele realmente não é.

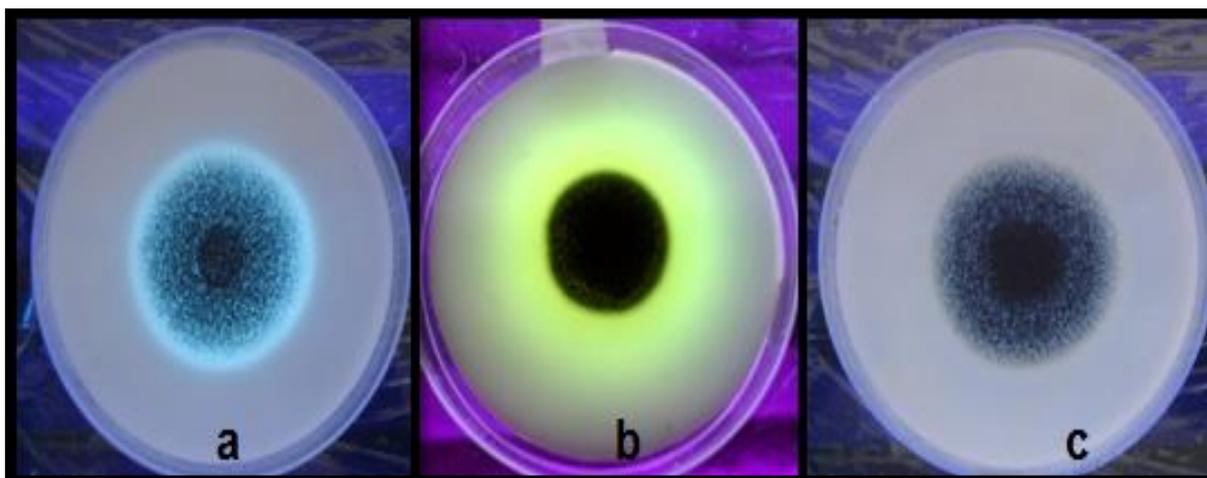
O método de extração de DNA apresentado na presente pesquisa embora seja de baixo custo, é relativamente demorado e precisa da cultura, mesmo assim ainda é mais rápido que os métodos convencionais de identificação. Além do mais, existem métodos otimizados e padronizados que encurtam o tempo de extração do DNA de fungos filamentosos (YAMAMOTO et al., 2010)

5.5 Screening para Identificação de Isolados Fúngicos Potencialmente Produtores de Aflatoxinas, Citrinina e Ocratoxinas

A triagem em Ágar Leite de Coco desenvolvida por LIN; DIANESE (1976), para avaliar se o fungo é um potencial produtor de aflatoxinas é bastante empregada e vem sendo utilizada também para a detecção de outras micotoxinas, como citrinina e ocratoxinas (BUGNO et al., 2006; ZAINI et al., 2009; YAZDANI et al., 2010).

Na presente pesquisa, dos 183 isolados estudados e identificados por métodos convencionais, 48,64% mostraram ser potenciais produtores de micotoxinas através da formação do halo de fluorescência esverdeado ou azulado (Figura 10).

Figura 10 – Crescimento colonial e a) formação de halo de fluorescência azulado e b) esverdeado e c) ausência de formação de halo em Ágar Leite de Coco após 5 dias de crescimento a 28 °C e observados sob luz (365 nm).



Fonte: Do autor.

Todos os isolados pertencentes ao gênero *Penicillium* identificados por método molecular mostraram-se potenciais produtores de micotoxinas em Ágar Leite de Coco. Segundo HOUBRAKEN et al. (2011) essas espécies possivelmente produziram citrinina. Enquanto que, para *Aspergillus fumigatus* o percentual do potencial toxigênico em Ágar Leite de Coco foi nulo (Tabela 3).

Tabela 3 – Potencial toxigênico determinado pelo método de triagem em Ágar Leite de Coco dos fungos estudados e identificados por método convencional e molecular.

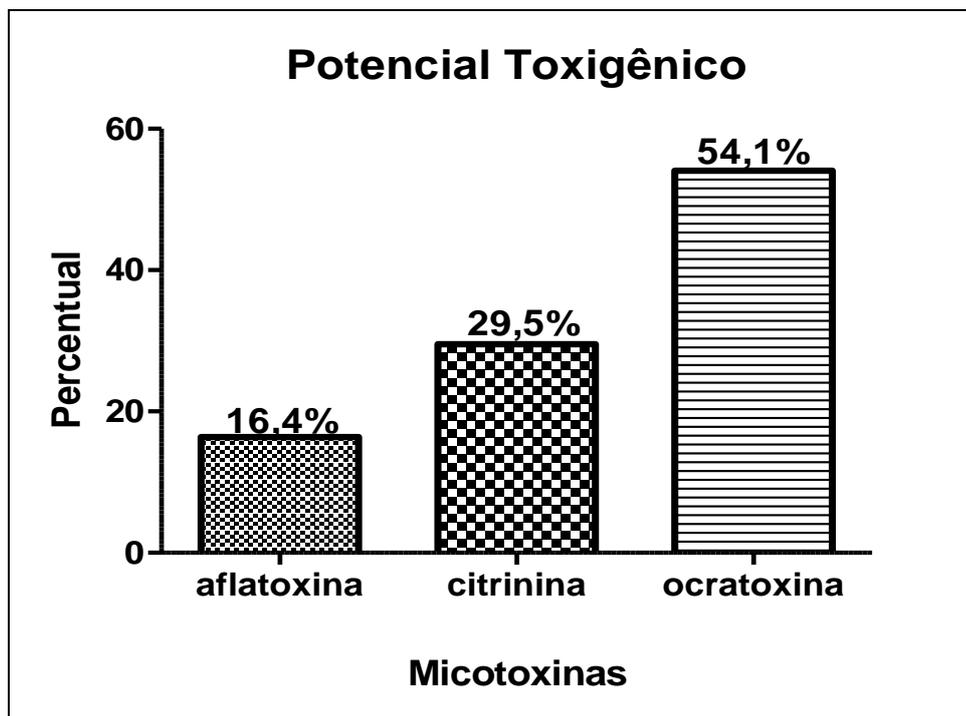
Provável Micotoxina	Espécie	Potencialmente toxigênico			
		IC		IM	
		n	%	n	%
Aflatoxinas	<i>Aspergillus flavus</i>	10/23	43,48	10/14	71,43
-	<i>Aspergillus fumigatus</i>	0/20	0	0/20	0
Ocratoxinas	<i>Aspergillus niger</i>	18/50	36	12/28	42,86
	<i>Aspergillus ochraceus</i>	6/20	30	6/18	33,33
Citrinina	<i>Penicillium citrinum</i>	24/30	80	12/12	100
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	18/20	90	14/14	100
	<i>Penicillium expansum</i>	13/20	13	7/7	100
Total		89/183	48,64	61/113	54

Legenda: IC – Identificação Convencional, IM – Identificação Molecular.

Fonte: Do autor.

Dos 113 isolados identificados por PCR, 61 (54%) mostraram-se potenciais produtores de micotoxinas pelo método de triagem em Ágar Leite de Coco, sendo que 54,10% destes corresponderam a potenciais produtores de ocratoxinas (espécies fúngicas estudadas na presente pesquisa e que são potenciais produtoras de ocratoxinas são *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus niger*) (**Figura 11**).

Figura 11 – Percentual do potencial toxigênico dos isolados identificados por PCR em produzir aflatoxina, citrinina e ocratoxina.



Fonte: Do autor.

No trabalho desenvolvido por COSTA; SCUSSEL (2002), que também utilizaram o método de triagem Ágar Leite de Coco, para avaliar o potencial toxigênico de isolados fúngicos de feijão oriundos do Estado de Santa Catarina, obtiveram percentuais de fungos potencialmente toxigênico menores do que os da presente pesquisa, para Aflatoxinas 8,7% e Ocratoxinas 3,5%, em contrapartida os resultados para Citrinina foram semelhantes, 25,4%.

Na pesquisa publicada por RODRIGUES et al. (2007) – avaliação micotoxicológica de pólen, assim como no presente estudo, todas as cepas de *P. citrinum* isoladas mostraram-se produtoras de citrinina, já os *A. flavus* nenhum produziu Aflatoxina, enquanto que 40% (percentual semelhante desta pesquisa – 42,82%) dos isolados de *A. niger* foram produtoras de ocratoxina.

De acordo com dados da literatura, a triagem em Ágar Leite de Coco possui alta especificidade, ou seja, fungo não produtor não apresenta fluorescência (DEGOLA et al., 2007; YAZDANI et al., 2010), porém o fungo pode não produzir fluorescência em Ágar Leite de Coco e ser produtor de micotoxina (QUEIROZ et al., 2005; ZAINI et al., 2009).

A identificação da microbiota fúngica contaminante do ambiente, bem como suas características fisiológicas, nutricionais e toxigênicas têm importância para a análise do risco de exposição do homem a estes fungos e seus produtos tóxicos (KUHN; GHANNOUM, 2003).

Tendo em vista a existência de pesquisas que associam a inalação ocupacional de micotoxinas presentes na poeira de ambientes com efeitos adversos na saúde dos ocupantes destes locais, bem como já fora possível identificar micotoxinas em amostras de tecido e fluidos corporais desses indivíduos, é de importância para a saúde pública não só a identificação dos fungos em ambientes climatizados, mas também o potencial destes em produzir micotoxinas que são altamente tóxicas por via inalatória e dérmica e que estão associados a doenças em humanos.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão:

- ✓ Foi possível identificar por método convencional em nível de espécie os isolados estudados;
- ✓ Foi desenvolvido um único protocolo de reação de PCR para amplificar corretamente o DNA de todas as espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* estudadas (em culturas puras e mistas);
- ✓ Os resultados obtidos validaram o ensaio de PCR multiplex capaz de identificar (em culturas puras ou mistas) até quatro espécies por reação, o que otimiza a identificação de fungos em amostras de origem ambiental;
- ✓ No estudo, foi possível verificar maior sensibilidade e especificidade nos ensaios de PCR que em métodos de identificação com base nas características morfológicas;
- ✓ 61 de 113 isolados identificados por PCR simplex mostraram-se potenciais produtores de micotoxinas pela triagem em Ágar Leite de Coco, havendo maior frequência dos produtores de Citrinina.

REFERÊNCIAS

- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. New York: John Wiley & Sons; 1996, 865p.
- ABDO, N.G. **Finanças em empresas familiares e de médio porte: uma abordagem sobre as instaladoras de ar condicionado central**. 2003. 48 f. Monografia (Especialização em Docência do Ensino Superior) Universidade Candido Mendes.
- AMADI, J.E.; ADENIYI, D.O. Mycotoxin production by fungi isolated from stored grains. **African Journal of Biotechnology**. v. 8, p. 1219-21, 2009.
- ANAND, A.R.; MADHAVAN, H.N.; NEELAM, V.; LILY, T.K. Use of polymerase chain reaction in the diagnosis of fungal endophtalmitis. **Ophthalmology**. v. 108, p. 326-30, 2001.
- ANYANWU, E.C. The validity of the environmental neurotoxic effects of toxigenic molds and mycotoxins. **The Internet Journal of Toxicology**. v. 5, 2008. doi: 10.5580/209b.
- ARNOLD, D. The evolution of modern office buildings and air conditioning. **Ashrae Journal**. v. 41, p. 40-54, 1999.
- ASAN, A. *Aspergillus*, *Penicillium* and related species reported from Turkey. **Mycotaxon**. v. 89, p. 155-7, 2004.
- ASSOULINE-DAYAN, Y.; LEONG, A.; SHOENFELD, Y.; GERSHWIN, E. Studies of sick building syndrome. IV. Mycotoxicosis. **Journal of Asthma**. v. 39, p. 191-201, 2002.
- ATKINS, S.D.; CLARK, I.M. Fungal molecular diagnostics: a mini review. **Journal Applied Genetics**. v. 45, p. 3-15, 2004.
- BACKES, L.R.H.; NAUMANN, V.L.D.; CALIL, L.N. Isolamento de fungos anemófilos em biblioteca e prevalência de alergias respiratórias. **Revista Panamericana de Infectologia**. v. 13, p. 19-25, 2011.
- BALAJEE, S.A.; HOUBRAKEN, J.; VERWEIJ, P.E.; HONG, S-B.; YAGHUCHI, T.; VARGA, J.; SAMSON, R.A. *Aspergillus* species identification in the clinical setting. **Studies in Mycology**. v. 59, p. 39-46, 2007.
- BANDH, S.A.; KAMILI, A.N.; GANAI, B.A. Identification of some *Penicillium* species by traditional approach of morphological observation and culture. **African Journal of Microbiology Research**. v. 5, p. 3493-6, 2011.
- BENNETT, J.W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 16, 497-516, 2003.

BHATIA, L. Impact of bioaerosol on indoor air quality - a growing concern. **Advances in bioresearch**. v. 2, p. 120-3, 2011.

BHETARIYA, P.J.; MADAN, T.; BASIR, S.F.; VARMA, A.; USHA, S.P. Allergens/Antigens, Toxins and Polyketides of Important *Aspergillus* Species. **Indian Journal de Clinical Biochemistry**, v. 26, p. 104-19, 2011.

BLOOM, E.; BAL, K.; NYMAN, E.; MUST, A.; LARSSON, L. Mass Spectrometry-Based Strategy for Direct Detection and Quantification of Some Mycotoxins Produced by *Stachybotrys* and *Aspergillus* spp. in Indoor Environments. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 73, p. 4211-7, 2007.

BORMAN, A.M.; LINTON, C.J.; MILES, S.J.; JOHNSON, E.M. Molecular identification of pathogenic fungi. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 61, p. 7-12, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **PORTARIA GM/MS nº 3.523, de 28 de agosto de 1998**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/3523_98.htm. Acesso em: 10 de dezembro de 2012.

BRASIL. **Resolução - RE nº. 176, de 24 de outubro de 2000**. Diário Oficial da União, Brasília, p. 35-37, 20 de janeiro de 2003.

BRERA, C.; CAPUTI, R.; MIRAGLIA, M.; IAVICOLI, I.; SALERNO, A.; CARELLI, G. Exposure assessment to mycotoxins in workplaces: aflatoxins and ochratoxin A occurrence in airborne dusts and human sera. **Microchemical Journal**. v. 73, p. 167-73, 2002.

BRYDEN, W.L. Mycotoxins in the food chain: human health implications. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**. v. 16, p. 95-101, 2007.

BUGNO, A.; ALMODOVAR, A.A.B.; PEREIRA, T.C.; PINTO, T.J.A.; SABINO, M. Occurrence of toxigenic fungi in herbal drugs. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 37, p. 47-51, 2006.

BURG, W.A.; SHOTWELL, O.L.; SALTZMAN, B.E. Measurements of airborne aflatoxins during the handling of contaminated corn. **American Industrial Hygiene Association Journal**. v. 42, p. 1-11, 1981.

BURIK, J.V.; MYERSON, D.; SCHRECKHISE, R.W.; BOWDEN, R.A. Panfungal PCR Assay for Detection of Fungal Infection in Human Blood Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 36, p. 1169-75, 1998.

CAI, G.; HASHIM, J.H.; HASHIM Z.; ALI, F.; BLOOM, E.; LARSSON, L.; LAMPA, E.; NORBÄCK, D. Fungal DNA, allergens, mycotoxins and associations with asthmatic symptoms among pupils in schools from Johor Bahru, Malaysia. **Pediatric Allergy and Immunology**. v. 22, p. 290-7, 2011.

- CALDEIRA, L.P.R.D. **Análise de Redes Hidrônicas em Sistemas de Condicionamento de Ar**. 2005. 118 f. Dissertação. (Mestrado em Ciências em engenharia mecânica) Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- CARBERRY, S.; MOLLOY, E.; HAMMEL, S.; O'KEEFFE, G.; JONES, G.W. Gliotoxin effects on fungal growth: Mechanisms and exploitation. **Fungal Genetics and Biology**. v. 49, p. 302-12, 2012.
- CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 42, p. 225-6, 1939.
- CHAUDHARY, N.; MARR, J.A. Impact of *Aspergillus fumigatus* in allergic airway disease. **Clinical and Translational Allergy**. v. 1, p. 1-7, 2011. doi:10.1186/2045-7022-1-4.
- CHEN, Y.; PRIOR, B.A.; SHI, G.; WANG, Z. A rapid PCR-based approach for molecular identification of filamentous fungi. **The Journal of Microbiology**. v. 49, p. 675-9, 2011.
- CHEW, G.L.; WILSON, J.; RABITO, F.A.; GRIMSLEV, F.; IGBAL, S.; REPONEN, T.; MUILENBERG, M.L.; THORNE, P.S.; DEARBORN, D.G.; MORLEY, R.L. Mold and endotoxin levels in the aftermath of Hurricane Katrina: a pilot project of homes in New Orleans undergoing renovation. **Environmental Health Perspectives**. v. 114, p. 1883-9, 2006.
- CORNELISON, C.T.; STUBBLEFIELD, B.; GILBERT, E.; CORVO JR, S.A. Recurrent *Aspergillus* contamination in a biomedical research facility: a case study. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v.39, p. 329-35, 2012.
- CUENCA-ESTRELLA, M.; BASSETTI, M.; LASS-FLÔRL, C.; RÁCIL, Z.; RICHARDSON, M.; ROGERS, T.R. Detection and investigation of invasive mould disease. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 66, p. 15-24, 2011.
- CURTIS, L.; LIEBERMAN, A.; STARK, M.; REA, W.; VETTER, M. Adverse health effects of indoor molds. **Journal of Nutritional & Environmental Medicine**. v. 14, p. 261-74, 2004.
- DE HOOG, G.S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUERAS, M.J. **Atlas of clinical fungi**. 2 nd ed. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2001.
- DEAN, T.R.; ROOP, B.; BETANCOURT, D.; MENETREZ, M.Y. A simple multiplex polymerase chain reaction assay for the identification of four environmentally relevant fungal contaminants. **Journal of Microbiological Methods**. v. 61, p. 9-16, 2005.
- DEGOLA, F.; BERNI, E.; DALL'ASTA, C.; SPOTTI, E.; MARCHELLI, R.; FERRERO, I.; RESTIVO, F.M. A multiplex RT-PCR approach to detect aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus*. **Journal of Applied Microbiology**. v. 103, p. 409-17, 2007.
- DEL FIOREA, A.; REVERBERIB, M.; RICELLIC, A.; PINZARID, F.; SERRANTIE, S.; FABBRIB, A.A.; BONIFAZIE, G.; FANELLIB, C. Early detection of toxigenic fungi on

maize by hyperspectral imaging analysis. **International Journal of Food Microbiology**. v. 144, p. 64–71, 2010.

DODGE, C.W. **Medical mycology; fungous diseases of men and other mammals**. St. Louis: Mosby Company, 1935, 855p.

DOUWES, J.; THORNE, P.; PEARCE, N.; HEEDERIK, D. Bioaerosol health effects and exposure assessment: progress and prospects. **The Annals of Occupational Hygiene**. v. 47, p. 187–200, 2003.

EDUARD, W. Fungal spores: A critical review of the toxicological and epidemiological evidence as a basis for occupational exposure limit setting. **Critical Reviews in Toxicology**. v. 39, p. 799-864, 2009.

FIGUEROA, S.; CENTENO, S.; CALVO, M.A.; RENGEL, A.; ADELANTADO, C. Mycobiota and Concentration of Ochratoxin A in Concentrated Poultry Feed from Venezuela. **Pakistan Journal of Biological Sciences**. v. 12, p. 589-94, 2012.

FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A.; STOLK, A.C. Notes on the typification of some species of *Penicillium*. **Persoonia**. v. 14, p. 193-202, 1990.

FISCHER, G.; BRAUN, S.; THISSEN, R.; DOTT, W. FT-IR spectroscopy as a tool for rapid identification and intra-species characterization of airborne filamentous fungi. **Journal of Microbiological Methods**. v. 64, p. 63–77, 2006.

FISCHER, G.; DOLT, W. Relevance of airborne fungi and their secondary metabolites for environmental, occupational and indoor hygiene. **Archives of Microbiology**. v. 179, p. 75-82, 2003.

FISCHER, G.; MÜLLER, T.; SCHWALBE, R.; OSTROWSKI, R.; DOTT, W. Exposure to airborne fungi, MVOC, and mycotoxins in biowaste-handling facilities. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**. v. 203, p. 97-104, 2000.

FISK, W.J.; ELISEEVA, E.A.; MENDELL, M.J. Association of residential dampness and mold with respiratory tract infections and bronchitis a meta-analysis. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**. v. 2010, p. 9:72, 2010.

FISK, W.J.; LEI-GOMEZ, Q.; MENDELL, M.J. Meta-analyses of the associations of respiratory health effects with dampness and mold in homes. **Indoor Air**. v. 17, p. 284–96, 2007.

FLORES, L.H.; ONOFRE, S.B. Determinação da presença de fungos anemófilos e leveduras em unidade de saúde da cidade de Francisco Beltrão – PR. **Revista de Saúde e Biologia**. v. 5, p. 22-6, 2010.

FRISVAD, J.C.; SMEDSGAARD, J.; LARSEN, T.O.; SAMSON, R.A. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. **Studies in Mycology**. v. 49; p. 201-41, 2004.

FUNGARO, M.H.O. PCR na micolotia. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. v. 3, p. 12- 6, 2000.

GAVA, M.A.; GALLO, C.R. **Desempenho de diferentes meios de cultura utilizados na avaliação de fungos presentes em ambientes de produção de alimentos**. 2002. 65p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. Piracicaba. 2002.

GEHLOT, P.; PUROHIT, D.K.; SINGH, S.K. Molecular diagnostics of human pathogenic *Aspergillus* species. **Indian Journal of Biotechnology**. v. 11, p. 207-11, 2011.

GERRITSEN, J.; SMIDT, H.; RIJKERS, G.T.; DE VOS, W.M. Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. **Genes & Nutrition**. v. 6, p. 209-40, 2011.

GOMES, V.A.F.L.; SOUZA, F.E.A.; VIEIRA, M.K.V. Isolamento e identificação da microbiota fúngica anemófila em diversos setores do Centro de Ciências e Biológicas e da Saúde da Universidade Estadual da Paraíba. **Revista de Biologia e Farmácia**. p. 31-39, 2008.

GREEN, B.J.; SCHMECHEL, D.; SERCOMBE, J.K.; TOVEY, E.R. Enumeration and detection of aerosolized *Aspergillus fumigatus* and *Penicillium chrysogenum* conidia and hyphae using a novel double immunostaining technique. **Journal of Immunological Methods**. v. 307, p. 127-34, 2005.

GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A.M. Developments in Fungal Taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 12, p. 454-500, 1999.

GUGNANI, H.C. Ecology and taxonomy of pathogenic *Aspergilli*. **Frontiers in Bioscience**. v. 8, p. 346-57, 2003.

GUNSON, R.; GILLESPIE, G.; CARMAN, W.F. Optimisation of PCR reactions using primer chessboarding. **Journal of Clinical Virology**. v. 26, p. 369– 73, 2003.

HALSTENSEN, A S. Species-specific Fungal DNA in Airborne Dust as Surrogate for Occupational Mycotoxin Exposure? **International Journal of Molecular Sciences**. v. 9, p. 2543-58, 2008.

HAMEED, A.A.A.; AYESH, A.M.; MOHAMED, M.A.R.; MAWLA, H.F.A. Fungi and some mycotoxins producing species in the air of soybean and cotton mills: a case study. **Atmospheric Pollution Research**. v. 3, p. 126-31, 2012.

HOOPER, D.G.; BOLTON, V.E.; GUILFORD, F.T.; STRAUS, D.C. Mycotoxin Detection in Human Samples from Patients Exposed to Environmental Molds. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 10, p. 1465–75, 2009.

HORNER, W.E.; HELBLING, A.; SALVAGGIO, J.E.; LEHRER, S.B. Fungal allergens. **Clinical Microbiology Reviews**. p. 161–79, 1995.

HOUBRAKEN, J.; FRISVAD, J.C.; SAMSON, R.A. Taxonomy of *Penicillium* section *Citrina*. **Studies in Mycology**. v. 70, p. 53-138, 2011.

HUANG, W.Y.; CAI, Y.Z.; SURVESWARAN, S.; HYDE, K.D.; CORKE, H.; SUN, M. Molecular phylogenetic identification of endophytic fungi isolated from three *Artemisia* species. **Fungal Diversity**. v. 36, p. 69-88, 2009.

HUSSIN, N.M.M.; SANN, L.M.; SHAMSUDIN, M.N.; HASHIM, Z. Characterization of Bacteria and Fungi Bioaerosol in the Indoor Air of selected Primary Schools in Malaysia. **Indoor and Built Environment**. v. 20, p. 607-17, 2011.

HUNG, W.; SU, S.; SHIU, L.; CHANG, T.C. Rapid identification of allergenic and pathogenic molds in environmental air by an oligonucleotide array. **BMC Infectious Diseases**. v. 2011, p. 11-91, 2011.

HEDAYATI, M.T.; PASQUALOTTO, A.C.; WARN, P.A.; BOWYER, P.; DENNING, D.W. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. **Microbiology**. v. 153, p. 1677-92, 2007.

ILHAN, S.; DEMIREL, R.; ASAN, A.; BAYÇU, C.; KINACI, E. Colonial and Morphological Characteristics of Some Microfungal Species Isolated from Agricultural Soils in Eskisehir Province (Turkey). **Turkish Journal of Botany**. v. 30, p. 95-104, 2006.

ISIK, N.; WHITE, L.; BARNES, R.; POYNTON, C.J.; MILLS, K.I. A simple PCR/RFLP analysis can differentiate between *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, and *Aspergillus fumigatus*. **Molecular Biotechnology**. v. 24, p. 229 – 32, 2003.

JARVIS, B.B.; MILLER, J.D. Mycotoxins as harmful indoor air contaminants. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 66, p. 367-72, 2005.

JONES, A.P. Indoor air quality and health. **Atmospheric Environment**. v. 3, p. 4535-64, 1999.

KANBE, T.; YAMAKI, K.; KIKUCHI, A. Identification of the pathogenic *Aspergillus* species by nested PCR using a mixture of specific primers to DNA topoisomerase II gene. **Microbiology and Immunology**. v. 46, p. 841-8. 2002.

KONEMAN, E.W. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1565 p.

KUHN, D.M.; GHANNOUM, M.A. Indoor Mold, Toxigenic Fungi, and *Stachybotrys chartarum*: Infectious Disease Perspective. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 16, p. 144–72, 2003.

KWIATKOWSKI, A.; ALVES, A.P.F. Importância da detecção e do controle de aflatoxina em alimentos. **Revista de Saúde e Biologia**. v. 2, p. 45-54, 2007.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. **Guia para identificação: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. São Paulo: Sarvier, 1998.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C. **Micologia Médica**. São Paulo: Sarvier; 1991.

LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**. v. 33, p. 159-74, 1977.

LANDLINGER, C.; PREUNER, S.; WILLINGER, B.; HABERPURSCH, B.; RACIL, Z.; MAYER, J.; LION, T. Species-Specific Identification of a Wide Range of Clinically Relevant Fungal Pathogens by Use of Luminex xMAP Technology. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 47, p. 1063-73, 2009.

LANG-YONA, N.; DANNEMILLER, K.; YAMAMOTO, N.; BURSHTAIN, N.; PECCIA, J.; YARDEN, O.; RUDICH, Y. Annual distribution of allergenic fungal spores in atmospheric particulate matter in the eastern mediterranean; a comparative study between ergosterol and quantitative PCR analysis. **Atmospheric Chemistry and Physics**. v. 12, p. 2681-90, 2012.

LI, R.Y.; LI, D.M.; YU, J.; LIU, W.; JI, Z.H.; WANG, D.L. Application of molecular biology techniques in the identification of pathogenic fungi and the diagnosis of fungal infection. **Journal of Peking University**. v. 36, p. 536-9, 2004.

LIN, M.T.; DIANESE, J.C. A Coconut-Agar Medium for Rapid Detection of Aflataxin Production by *Aspergillus* spp. **Techniques**. v. 66, p. 1466-9, 1976.

LOBATO, R.C.L.; VARGAR, V.S.; SILVEIRA, E.S. Sazonalidade e prevalência de fungos anemófilos em ambiente hospitalar no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista da Faculdade de Ciências Médica**. v. 11, p. 21-8, 2009.

LOGOTHETI, M.; KOTSOVILI-TSELENI, A.; ARSENIS, G.; LEGAKIS, N.I. Multiplex PCR for the discrimination of *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* and *A. terreus*. **Journal of Microbiological Methods**. v. 76, 209-11, 2009.

LUQUE, M.I.; ANDRADE, M.J.; RODRÍGUEZ, A.; BERMÚDEZ, E.; CÓRDOBA, J.J. Development of a Multiplex PCR Method for the Detection of Patulin-, Ochratoxin A- and Aflatoxin-Producing Moulds in Foods. **Food Analytical Methods**. v. 2012, p. 1-9, 2012. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.01.007.

MANAL, M.Z.; EL-MIDANY, S.A.; SHAHEEN, H.M.; RIZZI, L. Mycotoxins in animals: occurrence, effects, prevention and management. **Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences**. v. 4, p. 13-28, 2012.

MAYER, S.; ENGELHART, S.; KOLK, A.; BLOME, H. The significance of mycotoxins in the framework of assessing workplace related risks. **Mycotoxin Research**. v. 24, p. 151-64, 2008.

MCGINNIS, M.R. Pathogenesis of indoor fungal diseases. **Medical Mycology**. v. 42, p. 107-17, 2004.

MCLINTOCK, L.A.; JONES, B.L. Advances in the molecular and serological diagnosis of invasive fungal infection in haematooncology patients. **British Journal of Haematology**. v. 126, p. 289-97, 2004.

MENEZES, J.P.; LUPATINI, M.; ANTONIOLLI, Z.I.; BLUME, E.; JUNGES, E.; MANZONI, C.G. Variabilidade genética na região ITS do rDNA de isolados de *Trichoderma* spp. (Biocontrolador) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *Chrysanthemi*. **Ciências e agrotecnologia**. v. 34, p. 132-9, 2010.

MEZZARI, A.; PERIN, C.; SANTOS JÚNIOR, S.A.; BERND, L.A.G.; GESU, G. Os fungos anemófilos e sensibilização em indivíduos atópicos em Porto Alegre, RS. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 49, p. 270-3, 2003.

NIELSEN, K.F. Mycotoxin production by indoor molds. **Fungal Genetics and Biology**. v. 39, p. 103-17, 2003.

NORITOMI, D.T.; BUB, G.L.; BEER, I.; SILVA, A.S.F.; DE CLEVA, R.; GAMA-RODRIGUES, J.J. Multiple brain abscesses due to *Penicillium* spp infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**. v. 47, p. 167-70, 2005.

ORGIAZZI, A.; LUMINI, E.; NILSSON, R.H.; GIRLANDA, M.; VIZZINI, A.; BONFANTE, P.; BIANCIOTTO, V. Unravelling Soil Fungal Communities from Different Mediterranean Land-Use Backgrounds. **PLoS ONE**. v. 7, p. 1-9, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0034847.

PERAICA, M.; RADIC, B.; LUCIC, A.; PAVLOVIC, M. Toxic effects of mycotoxins in humans. **Bulletin of the World Health Organization**. v. 77, p. 754-66, 1999.

PETERSON, S.W. *Aspergillus* and *Penicillium* identification using DNA sequences: barcode or MLST? **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 95, p. 339-44. 2012.

PETIT, P.; LUCAS, E.M.F.; ABREU, L.M.; PFENNING, L.H.; TAKAHASHI, J.A. Novel antimicrobial secondary metabolites from a *Penicillium* sp. isolated from Brazilian cerrado soil. **Electronic Journal of Biotechnology**. v. 12, p. 1-9, 2009.

PITT, J.L. **The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces***. Academic: London; 1979.

PITT, J.L. The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**. v. 32, p. 17-32, 1994.

POLIZZI, V.; DELMULLE, B.; ADAMS, A.; MORETTI, A.; SUSCA, A.; PICCO, A.M.; ROSSEEL, Y.; KINDT, R.; VAN BOCXLAER, J.; DE KIMPE N.; VAN PETEGHEM, C.; DE SAEGER, S. Fungi, mycotoxins and microbial volatile organic compounds in mouldy interiors from water-damaged buildings. **Journal of Environmental Monitoring**. v. 11, p. 1849–58, 2009.

QUEIROZ, B. D.; KELLER, K. M.; KELLER, L. A. M.; RIBEIRO, J. M. M.; ROSA, C. A. R. Avaliação de substratos vegetais destinados à alimentação animal como suportes para a produção de ochratoxina A por espécies do gênero *Aspergillus* Fr. **Revista Universidade Rural**. v. 25, p. 64-70, 2005.

RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**. v. 1, p. 17-20, 1985.

RAI, M.K.; BONDE, S.R.; INGLE, A.P.; GADE, A.K. Mycotoxin: rapid detection, differentiation and safety. **Journal of Pharmaceutical Education and Research**. v. 13, p. 22-34, 2012.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Journal of Biotechnology**. v. 1, p. 174-88; 1998.

RAPER, K.B.; FENNELL, D.I. **The genus *Aspergillus***. Krieger R.E. company: New York; 1973.

RICKERTS, V.; MOUSSET, S.; LAMBRECHT, E.; TINTELNOT, K.; SCHWERDTFEGER, R.; PRESTERL, E.; JACOBI, V.; JUST-NUBLING, G.; BIALEK, R. Comparison of histopathological analysis, culture, and polymerase chain reaction assays to detect invasive mold infections from biopsy specimens. **Clinical Infectious Diseases**. v. 44, p. 1078-83, 2007.

RIDDELL, R.W. Permanent stained mycological preparation obtained by slide culture. **Mycologia**. v. 42, p. 265-70, 1950.

ROBBINS, C.A.; SWENSON, L.J.; NEALLEY, M.L.; GOTS, R.E.; KELMAN, B.J. Health Effects of Mycotoxins in Indoor Air: A Critical Review. **Applied Occupational and Environmental Hygiene**. v. 15, p. 773-84, 2000.

ROCHA, C.A.; SILVA, R.J.; MONZÓN, A.E.; ALFONZO, J. Characterization of Indoor Air Bioaerosols in an Electrical Headquarter Building. **Indoor and Built Environment**. 2012. doi: 10.1177/1420326X12462911.

RODRIGUES, M.A.A.; KELLER, K.M.; KELLER, L.A.M.; OLIVEIRA, A.A.; ALMEIDA, T.X.; MARASSI, A.C.; KRÜGER, C.D.; BARBOSA, T.S.; LORENZON, M.C.A.; ROSA, C.A.R. Avaliação micológica e micotoxicológica do pólen da abelha jataí (*Tetragonisca angustula*) proveniente de Ilha Grande, Angra dos Reis, RJ. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v. 30, p. 249-53, 2008.

ROE, A.D.; RICE, A.V.; BROMILOW, S.E.; COOKE, J.E.K.; SPERLING, F.A.H. Multilocus species identification and fungal DNA barcoding: insights from blue stain

fungal symbionts of the mountain pine beetle. **Molecular Ecology Resources**. v. 2010, p. 1-14, 2010. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02844.x.

ROSEANU, A.; JECU, L.; BADEA, M.; EVANS, R.W. Mycotoxins: an overview on their quantification methods. **Romanian Journal of Biochemistry**. v. 47, p. 79-86, 2010.

ROWAN, N.J.; JOHNSTONE, C.M.; MCLEAN, R.C.; ANDERSON, J.G.; CLARKE, J.A. Prediction of Toxigenic Fungal Growth in Buildings by Using a Novel Modelling System. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 65, p. 4814-21, 1999.

SCHABEREITER-GURTNER, C.; SELITSCH, B.; ROTTER, M.L.; HIRSCHL, A.M.; WILLINGER, B. Development of Novel Real-Time PCR Assays for Detection and Differentiation of Eleven Medically Important *Aspergillus* and *Candida* Species in Clinical Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 45, p. 906-14, 2007.

SCHOCH, C.L.; SEIFERT, K.A.; HUHDORF, S.; ROBERT, V.; SPOUGE, J.; LEVESQUE, C.A.; CHEN, W. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 109, p. 6241-6, 2012.

SIDRIM, J.C.; MOREIRA, J.L.B. **Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro; 1999.

STRYJAKOWSKA-SEKULSKA, M.; PIOTRASZEWSKA-PAJAŁ, A.; SZYSZKA, A.; NOWICKI, M.; FILIPIAK, M. Microbiological Quality of Indoor Air in University Rooms. **Polish Journal of Environmental Studies**. v. 16, p. 623-32, 2007.

SUGITA, C.; MAKIMURA, K.; UCHIDA, K.; YAMAGUCHI, H.; NAGAI, A. PCR identification system for the genus *Aspergillus* and three major pathogenic species: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*. **Medical Mycology**. v. 42, p. 433-7, 2004.

TANG, Y.W.; PROCOP, G.W.; PERSING, D.H. Molecular diagnostics of infectious diseases. **Clinical Chemistry**. v. 43, 2021-38, 1997.

TARAI, B.; GUPTA, A.; RAY, P.; SHIVAPRAKASH, M.R.; CHAKRABARTI, A. Polymerase chain reaction for early diagnosis of post-operative fungal endophthalmitis. **Indian Journal of Medical Research**. v. 123, p. 671-8, 2006.

TELL, L.A. Aspergillosis in mammals and birds: impact on veterinary medicine. **Medical Mycology**. v. 43, p. 71-3, 2005.

THRASHER, J.D.; GRAY, M.R.; KILBURN, K.H.; DENNIS, D.P.; YU, A. A Water-Damaged Home and Health of Occupants: A Case Study. **Journal of Environmental and Public Health**. v. 2012, p. 1-9, 2012. doi:10.1155/2012/312836.

TSUI, C.K.M.; WOODHALL, J.; CHEN, W.; LÉVESQUE, C.A.; LAU, A.; SCHOEN, C.D.; BASCHIEN, C.; NAJAFZADEH, M.J. HOOG, S. Molecular techniques for

pathogen identification and fungus detection in the environment. **Ima Fungus**. v. 2, p. 177-9, 2011.

TUOMI, T.; REIJULA, K.; JOHNSON, T.; HEMMINKI, K.; HINTIKKA, E.L.; LINDROOS, O.; KALSO, S.; KOUKILA-KÄHKÖLÄ, P.; MUSSALO-RAUHAMAA, H.; HAAHTELA, T. Mycotoxins in Crude Building Materials from Water-Buildings. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 66, p. 1899–904, 2000.

VÁZQUEZ-EUÁN, R.; GRIJALVA-ARANGO, R.; CHI-MANZANERO, B.; TZEC-SILMÁ, M.; ISLAS-FLORES, I.; RODRÍGUEZ-GARCÍA, C.; PERAZA-ECHEVERRÍA, L.; JAMES, A.C.; MANZO-SÁNCHEZ, G.; CANTO-CANCHÉ, B. Direct colony polymerase chain reaction (PCR): An efficient technique to rapidly identify and distinguish *Mycosphaerella fijiensis* and *Mycosphaerella musicola*. **African Journal of Biotechnology**. v. 11, p. 8172-8180, 2012.

VANITTANAKOM, N.; VANITTANAKOM, P.; HAY, R.J. Rapid Identification of *Penicillium marneffeii* by PCR-Based Detection of Specific Sequences on the rRNA Gene. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, p. 1739-42, 2002.

VESPER, S.J.; VARMA, M.; WYMER, L.J.; DEARBORN, D.G.; SOBOLEWSKI, J.; HAUGLAND, R.A. Quantitative polymerase chain reaction analysis of fungi in dust from homes of infants who developed idiopathic pulmonary hemorrhaging. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**. v. 46, p. 596-601, 2004.

VICHIT-VADAKAN, N.; VAJANAPOOM, N. Health impact from air pollution in Thailand: current and future challenges. **Environmental Health Perspectives**. v. 119, 197–8, 2011.

WANG, X., WANG, S. Sensors and Biosensors for the Determination of Small Molecule Biological Toxins Sensors. v. 8, p. 6045–54, 2008.

WENGENACK, N.L.; BINNICKER, M.J. Fungal molecular diagnostics. **Clinics In Chest Medicine**. v. 30, p. 391–408, 2009.

WHO. **WHO guidelines for indoor air quality: dampness and mould**. WHO Regional Office for Europe: Copenhagen; 2009, 228 p.

WHO Regional Office for Europe. **Development of WHO guidelines for indoor air quality: report on a working group meeting, Bonn, Germany**. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2006.

WHO. **Air quality and health - Ficha nº 313**. 2011. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs313/en/index.html>. Acesso em: 10 de dezembro de 2012.

WILLINGER, B.; OBRADOVIC, A.; SELITSCH, B.; BECK-MANNAGETTA, J.; BUZINA, W.; BRAUN, H.; APFALTER, P.; HIRSCHL, A.M.; MAKRISTATHIS, A.; ROTTER, M. Detection and identification of fungi from fungus balls of the maxillary sinus by molecular techniques. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 41, p. 581-5, 2003.

- WU, Z.; TSUMURA, Y.; BLOMQUIST, G.; RU, X. 18S rRNA Gene Variation among Common Airborne Fungi, and Development of Specific Oligonucleotide Probes for the Detection of Fungal Isolates. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 69, p. 5389-97, 2003.
- XU, J. Fundamentals of Fungal Molecular Population Genetic Analyses. **Current Issues in Molecular Biology**. v. 8, p. 75–90, 2010.
- XU, Z.; YAO, M. Monitoring of bioaerosol inhalation risks in different environments using a six-stage Andersen sampler and the PCR-DGGE method. **Environmental Monitoring and Assessment**. v. 2012, p. 1-11, 2012.
- YAMAMOTO, N.; KIMURA, M.; MATSUKI, H.; YANAGISAWA, Y. Optimization of a real-time PCR assay to quantitate airborne fungi collected on a gelatin filter. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 109, p. 83-8, 2010.
- YAO, G.; SEBISUBI, F.M.; VOO, L.Y.C.; HO, C.C.; TAN, G.T.; CHANG, L.C. Citrinin Derivatives from the Soil Filamentous Fungus *Penicillium* sp. H9318. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 22, p. 1125-29, 2011.
- YAZDANI, D.; ZAINAL ABIDIN, M.A.; TAN, Y.H.; KAMARUZAMAN, S. Evaluation of the detection techniques of toxigenic *Aspergillus* isolates. **African Journal of Biotechnology**. v. 9, p. 7654-9, 2010.
- ZAIN, M.E.; RAZAK, A.A.; EL-SHEIKH, H.; SOLIMAN, H.G.; KHALIL, A.M. Influence of growth medium on diagnostic characters of *Aspergillus* and *Penicillium* species. **African Journal of Microbiology Research**. v. 3, p. 280-6, 2009.
- ZAINI, F.; YOUSEFI, S.; DAGDAR, S.; SAFARA, M. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* isolates from green– tiger shrimps (*Penaeus semisulcatus*). **Iranian Journal of Microbiology**. v. 1, p. 18-22, 2009.
- ZENG, H.; LI, X.; CHEN, X.; ZHANG, J.; DOM, J.; XI, L. Identification of *Penicillium marneffe* in Paraffin-Embedded Tissue Using Nested PCR. **Mycopathologia**. v. 168, p. 31-5, 2009.
- ZHAO, Z.; LI, L.; WAN, Z.; CHEN, W.; LIU, H.; LI, R. Simultaneous detection and identification of *Aspergillus* and *Mucorales* species in tissues collected from patients with fungal rhinosinusitis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 49, p. 1501–7, 2011.
- ZUO, R.; CHANG, J.; YIN, Q.; WANG, P.; CHENG, W.; WANG, X.; LIU, J.; ZHENG, Q. Inhibiting *Aspergillus flavus* growth and degrading aflatoxin B1 by combined beneficial microbes. **African Journal of Biotechnology**. v. 11, p. 12903-9, 2012.

APÊNDICE A - ARTIGO

Prévia do Artigo que será submetido à Revista *Genetics and Molecular Biology*
(normas da revista no Anexo A)

Título do trabalho

Identificação de espécies patogênicas de *Aspergillus* e *Penicillium* isolados de ambientes climatizados por PCR e Identificação Convencional

Autores e Instituição

Larissa Isabela Oliveira de Souza, Euripedes Alves da Silva Filho[#]

Setor de Genética, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde – Universidade Federal de Alagoas, Maceió-Alagoas, Brasil.

Título corrente

Comparação entre PCR multiplex e características morfológicas para identificação de espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*

[#]Endereço de correspondência

(Setor de Genética do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas – alvessf@gmail.com)

Resumo

Aspergillus e *Penicillium* são os principais gêneros de fungos isolados de ambientes climatizados que causam efeitos adversos na saúde. Objetivando desenvolver um protocolo de PCR multiplex para identificar espécies de fungos a partir de culturas mistas e comparar com os resultados da identificação convencional, uma reação de PCR multiplex foi padronizada para as espécies estudadas, com a capacidade de identificação de quatro espécies por reação. A amostra estudada foi composta por 183 isolados fúngicos de ambientes climatizados, obtidos de coleção, os quais tiveram sua identificação por método convencional e PCR multiplex. Dos 183 isolados (*A. flavus* n=23, *A. fumigatus* n=20, *A. niger* n=50, *A. ochraceus* n=20, *P. citrinum* n=30, *P. chrysogenum* n=20, *P. expansum* n=20) identificados por métodos convencionais, 61,75% foram confirmados por PCR multiplex. Para a identificação de *A. fumigatus* e *A. ochraceus* não houve diferença estatística significativa, já *A. niger*, *P. citrinum* e *P. chrysogenum* apresentaram as maiores diferenças estatísticas significantes quando os métodos de identificação foram comparados. O método de identificação convencional apresentou maior sensibilidade para as espécies de *Penicillium* e maior especificidade para as espécies de *Aspergillus*. Em conclusão a PCR multiplex com capacidade de identificar quatro espécies por reação mostrou ser um método rápido e de fácil realização para identificação de espécies fúngicas a partir de cultura mista, além de possuir sensibilidade e especificidade maior que os métodos convencionais.

Palavras-chave: *Aspergillus*. *Penicillium*. Ambientes climatizados. Identificação convencional. PCR.

Introdução

Nos últimos anos, com o aumento do uso de condicionadores de ar, os ambientes internos climatizados artificialmente tornaram-se importante área de pesquisa. A má qualidade do ar desses ambientes ocorre principalmente a partir da associação de umidade com fungos filamentosos (WHO, 2009).

Aspergillus e *Penicillium* são os principais gêneros de fungos isolados de ambientes climatizados e que estão associados a efeitos adversos na saúde de ocupantes destes locais (Wu et al., 2003; McGinnis, 2004). Tais implicações podem incluir coceira nos olhos, constipação nasal, cefaleia, fadiga (Curtis et al., 2004) e, em crianças, hemossiderose pulmonar idiopática (Vesper et al., 2004).

Quanto à adequada avaliação da exposição fúngica de ocupantes de locais insalubres, fazem-se necessárias implementação e execução de estratégias de remediação eficaz; nesse contexto é imperativo que a triagem e identificação fúngica seja realizada com rapidez e eficácia (Fischer et al., 2006; Hung et al., 2011).

É válido destacar que, historicamente os isolados de fungos são identificados por análise macro e microscópica de colônias obtidas por meio de cultivo *in vitro*. Estes métodos estão entrando em desuso, uma vez que são demorados e imprecisos, além de requererem profissionais experientes, visto que é extremamente difícil distinguir as espécies fúngicas com base em diferenças morfológicas. Diante dessas condições, percebe-se a necessidade do desenvolvimento de novos métodos de identificação de fungos, mais rápidos, mais específicos e altamente sensíveis (Landlinger et al., 2009).

Para este fim, numerosas técnicas de biologia molecular baseadas em Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) têm sido desenvolvidas (Burik et al., 1998;

Cuenca-Estrella et al., 2011), e mostram-se promissoras, uma vez que permitem uma identificação rápida, sensível e específica de organismos fúngicos.

Fungos do ambiente raramente são encontrados de maneira isolada, sendo assim, uma abordagem mais prática é a identificação de numerosos organismos de uma única amostra ambiental, com a finalidade de economizar tempo e dinheiro, mantendo elevada a especificidade e precisão (Dean et al., 2005; Zhao et al., 2011).

Com base no exposto, o objetivo da presente pesquisa é o desenvolvimento de uma PCR multiplex espécie-específica para identificar em culturas mistas as principais espécies isoladas de ambientes climatizados bem como a comparação com os resultados obtidos por identificação convencional.

Material e Métodos

Isolados fúngicos

Foram estudados um total de 183 isolados (*Aspergillus flavus* n=23, *Aspergillus fumigatus* n=20, *Aspergillus niger* n=50, *Aspergillus ochraceus* n=20, *Penicillium citrinum* n=30, *Penicillium chrysogenum* n=20, *Penicillium expansum* n=20) reativos e puros obtidos da Coleção de Cultura do Laboratório de Ambientes Climatizados – UFAL (identificados por métodos convencionais). As amostras foram isoladas de ambientes climatizados de escolas, universidades, aeroportos, hospitais, clínicas, shoppings, repartições públicas e privadas. Espécies de fungos filamentosos (*Aspergillus granulatus*, *Aspergillus ustus*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium spinulosum*) e leveduras (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Sacharomyces cereviseae*) foram utilizadas

para fins de controle. Cepas fúngicas da micoteca da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) foram usadas como controles positivos para a validação dos primers (*Aspergillus flavus* - URM 6442, *Aspergillus fumigatus* - URM 5601, *Aspergillus niger* - URM 6329, *Aspergillus ochraceus* - URM 5609, *Penicillium citrinum* - URM 6224, *Penicillium chrysogenum* - URM 5892 e *Penicillium expansum* - URM 4024).

Cultura primária e identificação fúngica com base em características taxonômicas

As espécies de fungos foram reidentificadas com base nas características macroscópicas e microscópicas, para confirmação das espécies. As estirpes foram inoculadas em três posições pontuais em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD), as características de crescimento foram determinados após um período de incubação de 5 dias a 28 °C (Lacaz et al., 1998). Identificações foram posteriormente confirmados pelas características microscópicas através do microcultivo com Ágar Lactrimel (Ridell, 1950). Para identificação utilizou-se os critérios adotados por Raper e Fennell (1973), Pitt (1979), Frisvad et al. (1990), Hoog et al. (2000) e Gugnani (2003).

Extração de DNA (Método de Raeder e Broda, 1985)

Culturas puras (cultivo de um único isolado) e mistas (cultivo por conveniência dos isolados estudados, controle positivo e controle negativo) foram realizadas em ASD e incubadas a 25 °C durante 48 horas. Após o aparecimento de colônias, uma alíquota de 1 mL de suspensão de esporos em solução salina 0,85% com 0,1% de

Tween 20 (10^5 esporos.mL⁻¹) foi transferido para 50 mL de caldo Sabouraud e incubadas sob condições de agitação contínua (110 revoluções.minuto⁻¹) durante 72 horas. A massa micelial foi recolhida por filtração, lavada com água destilada estéril. Para a extração do DNA genômico, o micélio foi macerado em nitrogênio líquido e suspenso em 600 µL de tampão de extração (200 mM Tris-HCl pH 8,0, 250 mM NaCl, 25 mM de EDTA 1% de SDS). Após a homogeneização, os tubos foram incubados por 30 min a 65 °C. As amostras de DNA foram purificadas com volumes iguais de fenol: clorofórmio (1:1) (1 X) e mistura de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) (1X), precipitado com 2 volumes de etanol a -20 °C durante 24 horas. Os tubos foram centrifugados a 12000 g durante 10 min e o pellet de DNA foi lavado com etanol 70% (2X), seco ao ar, suspensas em tampão TE (pH 8,0), tratados com 20 µL de RNase (20 mg.mL⁻¹) a 35 °C por 2 horas e armazenado a 4 °C até o momento de uso.

PCR multiplex

Iniciadores publicados (<http://www.epa.gov/microbes/moldtech.htm>) foram utilizados para a detecção específica de *Aspergillus flavus* (F: 5'-GTG TAG GGT CGA TCC CGA TAG-3' e R: 5'-CCG GCG CGC ATG AAT-3'), *Aspergillus fumigatus* (F: 5'-GCC CGC CGT TTC GAC-3' e R: 5'-CGT TGA TGT AAG TTT TAA CTG ATT AC-3'), *Aspergillus niger* (F : 5'-GCC GGA GAC CCC AAC AC-3' e R: 5'-TGA TGT AAG TTT TAA CTG ATT GCA TT-3'), *Aspergillus ochraceus* (F: 5'-AAC CTC CCA CCA GTG TAT ACC-3' e R': 5'-CCG GCG AGC TGC GTG-3'), *Penicillium citrinum* (F: 5'-CCG CCG AAC TGC TGT CTA-3' e R: 5'-TTG TTG AAA GTT TTA ACT AAT TTC ATA GTT G-3'), *Penicillium chrysogenum* (F: 5'-CGG GCC CGC CTT AAC-3' e R: 5'-GAA

AGT TTT TTT AAA ATA ATA TTT TCA AGA CTC GT-3 ') e *Penicillium expansum* (F: 5'-TTA GAG CCG GGC CGT AGT T-3 'e R: 5'-TTA GAG CCG GGC CGT AGT T-3'). Com fragmentos de amplificação de 89, 136, 79, 260, 128, 300 e 560 pb respectivamente. A PCR multiplex com volume de 20 µL (2,5 µL de tampão de PCR 10X, 0,75 µL de MgCl₂ 25 mM, 2,5 µL de dNTP's 2 mM, 0,8 µL de cada iniciador 12,5 pmol, 0,10 µL de Taq polimerase 5 U/µL (Invitrogen Ltd, Paisley, UK), 1 µL de molde de DNA extraído e 3,5 µL de água MiliQ) foi submetida a amplificação com um total de 40 ciclos (desnaturação inicial a 96 °C durante 5 min, desnaturação a 96 °C por 30 s, hibridização a 58 °C por 30s, extensão a 72 °C por 30 s e extensão final a 72 °C por 15 min). Os produtos de amplificação foram sujeitas a eletroforese em gel de agarose 1,3% (Invitrogen Ltd, Paisley, UK) com 0,5 x TBE (45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA) e coradas com brometo de etídio. Cada ensaio foi realizado em duplicata e a PCR multiplex realizada com quatro pares de primers diferentes por reação.

Análise Estatística

Para mensuração do grau de concordância foram aplicados os testes de Kappa, além disso, foi aplicado o teste de McNemar para verificar a direção (tendência) da discordância, adotando-se nível de significância estatística menor que 5%, ambos os testes foram realizados no programa GraphPad Prism 5[®].

Resultados

PCR multiplex

Os 183 isolados reativos e puros identificados por métodos convencionais, foram submetidos a PCR simplex e multiplex em duplicata (Figura 1).

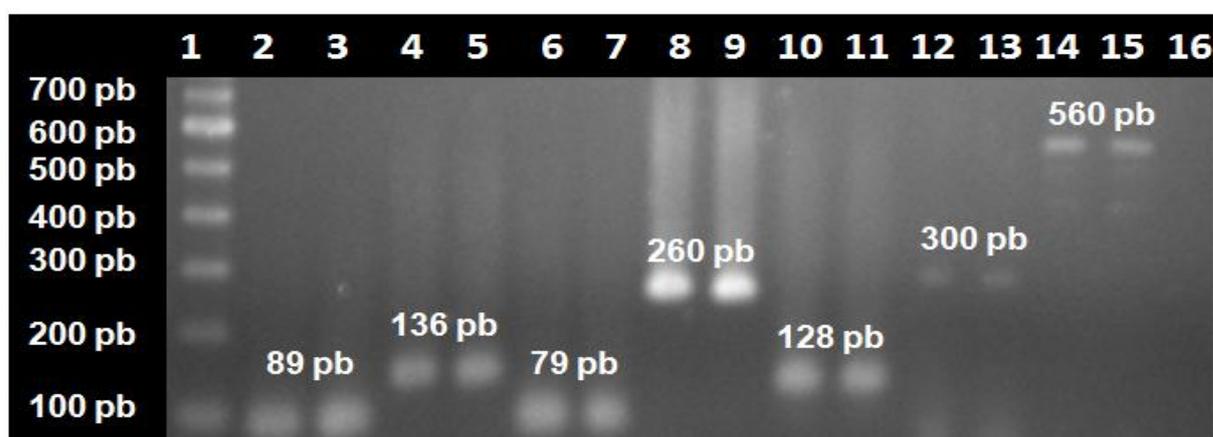


Figura 1 – Gel de agarose a 1,3% com produtos da amplificação obtidos pela PCR simplex. (1) Marcador de peso molecular de 100 pb, (2) padrão *Aspergillus flavus*, (3) isolado *Aspergillus flavus*, (4) padrão *Aspergillus fumigatus*, (5) isolado *Aspergillus fumigatus*, (6) padrão *Aspergillus niger*, (7) isolado *Aspergillus niger*, (8) padrão *Aspergillus ochraceus*, (9) isolado *Aspergillus ochraceus*, (10) padrão *Penicillium citrinum*, (11) isolado *Penicillium citrinum*, (12) padrão *Penicillium chrysogenum*, (13) isolado *Penicillium chrysogenum*, (14) padrão *Penicillium expansum*, (15) isolado *Penicillium expansum*, (16) Controle negativo.

Na PCR multiplex todos os pares de iniciadores utilizados produziram os amplicons de tamanho esperado. Amplificação não preferencial pôde ser obtida por ensaios de PCR multiplex utilizando vários templates contendo DNA extraído partir de culturas puras e mistas.

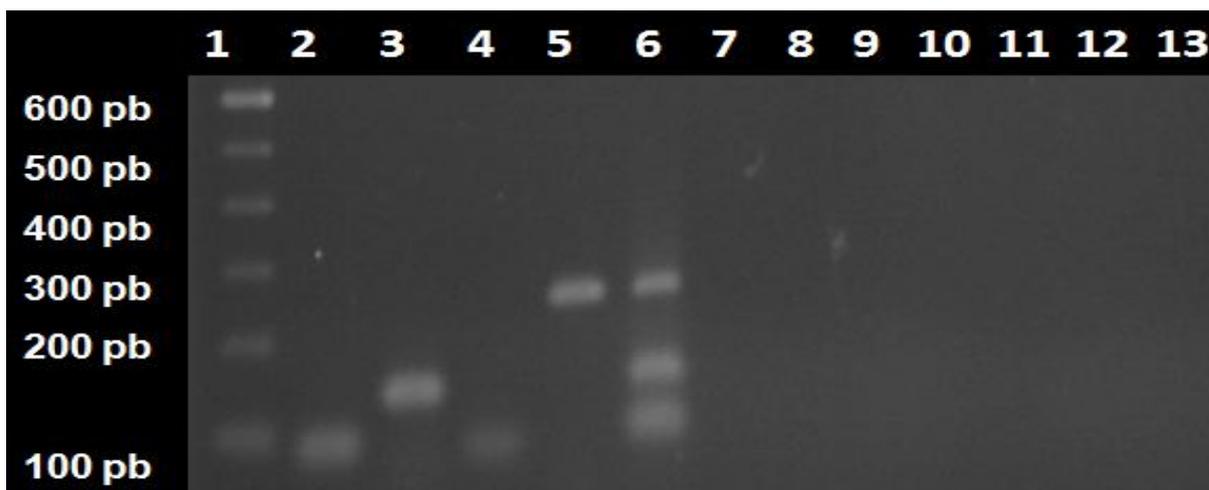


Figura 2 – Gel de agarose a 1,3% com produtos da amplificação obtidos pela PCR Multiplex para as quatro espécies de *Aspergillus*. (1) Marcador de peso molecular de 100pb, (2) *Aspergillus flavus*, (3) *Aspergillus fumigatus*, (4) *Aspergillus niger*, (5) *Aspergillus ochraceus*, (6) Cultura mista 1 - (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*), (7) Cultura mista 2 - (*Penicillium citrinum*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*), (8) *Aspergillus ustus*, (9) *Aspergillus granulorum*, (10) *Penicillium spinulosum*, (11) *Candida albicans*, (12) Cultura mista 3 - (Controle negativo - *Aspergillus granulorum*, *Aspergillus ustus*, *Cladosporium cladosporioides* e *Penicillium spinulosum*) e (13) Controle negativo – Água MiliQ.

Para que sejam identificadas as espécies fúngicas em cultura mista através do protocolo de PCR multiplex padronizado no presente estudo, se faz necessário que o tamanho dos amplicons sejam diferentes o bastante para que as bandas não sejam sobrepostas e, assim, seja possível a correta identificação. Na figura 2 na PCR multiplex para as quatro espécies de *Aspergillus*, não foi possível a diferenciação dos amplicons produzidos pelo *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger* na cultura mista.

Identificação com Base em Características Taxonômicas x Identificação por PCR Multiplex

A identificação presuntiva pelo método convencional identificou 183 isolados estudados, em contrapartida, o método considerado de maior acurácia, a Reação em cadeia da Polimerase (PCR) identificou 61,75% (n=113) destes.

Para a diferenciação das espécies *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus ochraceus* não houve diferença estatística ($p > 0,05$). As espécies *Aspergillus niger*, *Penicillium citrinum* e *Penicillium chrysogenum* apresentaram diferenças estatísticas significantes quando em comparação os métodos de identificação estudados (Tabela I).

Tabela I – Comparação dos resultados obtidos por identificação convencional e PCR das espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* estudadas após a reativação.

Espécie	Identificação por Método Convencional		Identificação por PCR		Teste de McNemar valor de p
	n	%	n	%	
<i>A. flavus</i>	23	12,60	14	7,65	0,0077*
<i>A. fumigatus</i>	20	10,90	20	10,93	0,6831
<i>A. niger</i>	50	27,30	28	15,30	0,0001*
<i>A. ochraceus</i>	20	10,90	18	9,84	0,4795
<i>P. citrinum</i>	30	16,40	12	6,56	0,0001*
<i>P. chrysogenum</i>	20	10,90	14	7,65	0,0412*
<i>P. expansum</i>	20	10,90	7	3,82	0,0001*
Não identificados	0	0	70	38,25	-

Teste de McNemar: Intervalo de Confiança de 95%.

*estatisticamente significante ($p \leq 0,05$).

De acordo com o exposto na tabela II, podemos observar que, com exceção de *Aspergillus fumigatus*, para todas as outras espécies o método convencional obteve percentual de sensibilidade de 100%. Quanto à especificidade (tabela II) *Aspergillus niger*, *Penicillium citrinum* e *Penicillium expansum* apresentaram baixo percentual, respectivamente 74,12%, 82,18% e 87,91%.

Ainda na tabela II podemos observar que o método de identificação convencional apresentou maior sensibilidade para as espécies de *Penicillium* e maior especificidade para as espécies de *Aspergillus*.

Tabela II - Prova diagnóstica que avalia a sensibilidade e especificidade do método de identificação convencional comparada com a PCR das espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* estudadas após a reativação, bem como o grau de concordância dos testes.

Espécie	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Valor de concordância
<i>Aspergillus flavus</i>	100	90,90	0,712**
<i>Aspergillus fumigatus</i>	85	96,77	0,818*
<i>Aspergillus niger</i>	100	74,12	0,587***
<i>Aspergillus ochraceus</i>	100	97,90	0,937*
<i>Aspergillus sp.</i>	96,25	90,32	0,745**
<i>Penicillium citrinum</i>	100	82,18	0,495***
<i>Penicillium chrysogenum</i>	100	93,94	0,793**
<i>Penicillium expansum</i>	100	87,74	0,475***
<i>Penicillium sp.</i>	100	87,91	0,586***
<i>Aspergillus sp. e Penicillium sp.</i>	97,34	89,23	0,688**

*Kappa 0,80 – 1,00: quase perfeita; **Kappa 0,60 – 0,79: substancial; ***Kappa: 0,41 – 0,59 moderado.

Discussão

Atualmente existem cerca de 172.000 sequências fúngicas depositadas no maior banco de dados genômicos, GenBank, sendo aproximadamente 15.500 referente a espécies e 2.500 a gêneros, oriundos de 11.500 estudos científicos publicados em 500 revistas. A maioria destas sequências foi obtida de amostras ambientais (Schoch et al., 2012). Isto encoraja o desenvolvimento de protocolos para a padronização da identificação de fungos por métodos de biologia molecular.

Para a normalização da amplificação do DNA das espécies por PCR vários testes (gradientes dos reagentes, concentração de DNA, temperatura de hibridização dos iniciadores e tempos de amplificação) foram realizados. A validação foi obtida utilizando iniciadores específicos para amplificação do DNA de cepas controles, obtidas de coleção de referência (cepas de coleção referência - URM), e a não amplificação dos controles negativos, bem como produção dos amplicons dos tamanhos esperados (*Aspergillus flavus* 89 pb, *Aspergillus fumigatus* 136 pb, *Aspergillus niger* 79 pb, *Aspergillus ochraceus* 260 pb, *Penicillium citrinum* 128 pb, *Penicillium chrysogenum* 300 pb e *Penicillium expansum* 560 pb).

A PCR multiplex apresentada neste estudo mostrou-se eficaz para identificar sete espécies de fungos presentes no ar ambiente, os quais são de preocupação para a saúde pública, sendo que o protocolo de reação desenvolvido acopla quatro espécies diferentes por reação.

Métodos moleculares baseados em PCR são universalmente aplicáveis e, dados detalhados sobre sua utilização em sistemática de fungos são abrangentes na literatura, independentemente do fato do fungo ter sido isolado a partir de seres

humanos (Vanittanakom et al., 2002; Tell, 2005; Zeng et al., 2009) ou do habitat natural (Chew et al., 2006; Tsui et al., 2011; Cornelison et al., 2012; Xu e Yao, 2012).

Atualmente, PCR multiplex tem sido utilizada para identificar fungos filamentosos (Isis et al., 2003; Dean et al., 2005; Logotheti et al., 2009; Vázquez-Euán et al., 2012). Este método é uma alternativa útil aos métodos tradicionais para a identificação de fungos, além de ser mais rápido e mais barato do que os protocolos de PCR simplex, permitem a detecção simultânea de mais de um isolado (Luque et al., 2012).

Classicamente, os estudos sobre evolução de fungos foram com base na morfologia comparativa, composição da parede celular, características celulares, ultraestrutura e metabolismo celular. Mais recentemente, o advento de abordagens cladísticas e moleculares mudou a situação existente e forneceu novas pistas sobre evolução de fungos. É evidente que, em um futuro próximo, as modernas técnicas moleculares permitirá que a maioria dos fungos, especialmente os patógenos oportunista, seja identificada com agilidade e precisão (Zain et al., 2009).

De acordo com Chen et al. (2011), a identificação baseada no fenótipo pode ser subjetiva, além disso, os métodos convencionais demonstraram imprecisão quando em comparação com ensaios moleculares.

Para o cálculo de sensibilidade e especificidade foi escolhido como método de referência a PCR, já que foi validada pelos controles positivos e negativos, bem como seus resultados foram mais reprodutíveis que os da identificação convencional.

Aspergillus fumigatus apresentou sensibilidade inferior a 100% (85%), a justificativa deste evento excepcional é de que três estirpes identificadas a principio como *Aspergillus flavus* pelo método convencional, quando submetidos a ensaios de

PCR foi verificado que, em verdade, pertenciam à espécie *Aspergillus fumigatus*, fato posteriormente corroborado por novas análises convencionais.

Os percentuais de especificidade das espécies *Aspergillus niger* (74,12%), *Penicillium citrinum* (82,18%) e *Penicillium expansum* (87,91%) estão em consonância com o grau de concordância obtido pelo teste de Kappa, os quais, de acordo com a classificação de Landis e Koch (1977) apresentaram valores moderados de concordância.

Apesar do método baseado na morfologia da macroscopia e microscopia das colônias ter se mostrado capaz de identificar todos os isolados estudados, isso não corresponde a alta sensibilidade do método, já que sensibilidade corresponde a capacidade de identificar corretamente a espécie; bem como alta especificidade, já que esta corresponde a capacidade do método em descartar a possibilidade de não identificar o isolado como não sendo da espécie a qual ele realmente não é.

Ao comparar o método de PCR multiplex aqui descrito com os métodos convencionais, o primeiro mostrou-se mais preciso. A discrepância dos resultados obtidos por comparação destes métodos já foi reportada em estudos anteriores (Willinger et al., 2003; Schabereiter-Gurtner et al., 2007; Zhao et al., 2011).

Neste trabalho, um método rápido, sensível e específico de PCR multiplex foi desenvolvido. Nenhuma outra pesquisa foi encontrada, através de levantamento bibliográfico, que fosse capaz de identificar até quatro espécies em culturas mistas, o que é importante ao se tratar de identificação de fungos em amostras de ambientes, em especial aquelas capazes de causar patologias em humanos, sendo esse provavelmente o primeiro relato.

A identificação da microbiota fúngica contaminante do ambiente, em especial o ambiente climatizado artificialmente por se tratar de um ambiente concentrador de

microorganismos, têm importância para a análise do risco de exposição ocupacional do homem a estes fungos e seus produtos tóxicos (KUHN; GHANNOUM, 2003).

Conclusão

Em conclusão a PCR multiplex com capacidade de quatro espécies por reação mostrou ser um método rápido e de fácil realização para identificação de espécies fúngicas a partir de cultura mista, além de possuir sensibilidade e especificidade maior que os métodos convencionais.

Referências

- Burik, J.V., Myerson, D., Schreckhise, R.W. e Bowden, R.A. (1998). Panfungal PCR Assay for Detection of Fungal Infection in Human Blood Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 36: 1169–75.
- Chen, Y., Prior, B.A., Shi, G. e Wang, Z. (2011). A rapid PCR-based approach for molecular identification of filamentous fungi. *The Journal of Microbiology*. 49: 675-9.
- Chew, G.L., Wilson, J., Rabito, F.A., Grimslev, F., Igbal, S., Reponen, T., Muilenberg, M.L., Thorne, P.S., Dearborn, D.G. e Morley, R.L. (2006) Mold and endotoxin levels in the aftermath of Hurricane Katrina: a pilot project of homes in New Orleans undergoing renovation. *Environmental Health Perspectives*. 114: 1883-9.
- Cornelison, C.T., Stubblefield, B., Gilbert, E. e Corvo Jr, S.A. (2012). Recurrent *Aspergillus* contamination in a biomedical research facility: a case study. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 39: 329-35.

Cuenca-Estrella, M., Bassetti, M., Lass-Flôrl, C., Ráčil, Z., Richardson, M. e Rogers, T.R. (2011). Detection and investigation of invasive mould disease. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 66: 15-24.

Curtis, L., Lieberman, A., Stark, M., Rea, W. e Vetter, M. (2004). Adverse health effects of indoor molds. *Journal of Nutritional & Environmental Medicine*. 14: 261-74.

de Hoog, G.S., Guarro, J., Gené, J. e Figueras, M.J. (2001). *Atlas of clinical fungi*. American Society for Microbiology, Washington.

Dean, T.R., Roop, B., Betancourt, D. e Menetrez, M.Y. (2005). A simple multiplex polymerase chain reaction assay for the identification of four environmentally relevant fungal contaminants. *Journal of Microbiological Methods*. 61: 9-16.

Fischer, G., Braun, S., Thissen, R. e Dott, W. (2006). FT-IR spectroscopy as a tool for rapid identification and intra-species characterization of airborne filamentous fungi. *Journal of Microbiological Methods*. 64: 63–77.

Frisvad, J.C., Samson, R.A. e Stolk, A.C. (1990). Notes on the typification of some species of *Penicillium*. *Persoonia*. 14: 193-202.

Gaddis, G.M. e Gaddis, M.L. (1990). Introduction to Biostatistics: Part 3, Sensitivity, Specificity, Predictive Value, and Hypothesis Testing. *Annals of Emergency Medicine*. 19: 591-597.

Gugnani, H.C. Ecology and taxonomy of pathogenic *Aspergilli*. (2003). *Frontiers in Bioscience*. 8: 346-57.

Hung, W., Su, S., Shiu, L. e Chang, T.C. (2011). Rapid identification of allergenic and pathogenic molds in environmental air by an oligonucleotide array. *BMC Infectious Diseases*. 2011: 11-91.

- Isik, N., White, L., Barnes, R., Poynton, C.J. e Mills, K.I. (2003). A simple PCR/RFLP analysis can differentiate between *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, and *Aspergillus fumigatus*. *Molecular Biotechnology*. 24: 229 – 32.
- Lacaz, C.S., Porto, E., Heins-Vaccari, E.M. e Melo, N.T. (1998). *Guia para identificação: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico*. São Paulo, Sarvier.
- Landlinger, C., Preuner, S., Willinger, B., Haberpursch, B., Racil, Z., Mayer, J. e Lion, T. (2009). Species-Specific Identification of a Wide Range of Clinically Relevant Fungal Pathogens by Use of Luminex xMAP Technology. *Journal of Clinical Microbiology*. 47: 1063-73.
- Landis, J.R., Koch, G.G. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 33: 159-74.
- Logotheti, M., Kotsovili-Tseleni, A., Arsenis, G. e Legakis, N.I. (2009). Multiplex PCR for the discrimination of *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* and *A. terreus*. *Journal of Microbiological Methods*. 76: 209–11.
- Luque, M.I., Andrade, M.J., Rodríguez, A., Bermúdez, E. e Córdoba, J.J. (2012). Development of a Multiplex PCR Method for the Detection of Patulin-, Ochratoxin A- and Aflatoxin-Producing Moulds in Foods. *Food Analytical Methods*. 155: 10-18.
- McGinnis, M.R. (2004). Pathogenesis of indoor fungal diseases. *Medical Mycology*. 42: 107-17.
- Pitt, J.L. (1979). *The genus Penicillium and its teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces*. Academic, London.
- Raeder, U. e Broda, P. (1985). Rapid preparation of DNA filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*. 1: 17-20.
- Raper, K.B. e Fennell, D.I. (1973). *The genus Aspergillus*. Krieger R.E. company, New York.

Riddell, R.W. (1950). Permanent stained mycological preparation obtained by slide culture. *Mycologia*. 42: 265-70.

Schabereiter-Gurtner, C., Selitsch, B., Rotter, M.L., Hirschl, A.M. e Willinger, B. (2007). Development of Novel Real-Time PCR Assays for Detection and Differentiation of Eleven Medically Important *Aspergillus* and *Candida* Species in Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 45: 906-14.

Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J., Levesque, C.A. e Chen, W. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109: 6241-6.

Tell, L.A. (2005). Aspergillosis in mammals and birds: impact on veterinary medicine. *Medical Mycology*. 43: 71-3.

Tsui, C.K.M., Woodhall, J., Chen, W., Lévesque, C.A., Lau, A., Schoen, C.D., Baschien, C., Najafzadeh, M.J. e Hoog, S. (2011). Molecular techniques for pathogen identification and fungus detection in the environment. *Ima Fungus*. 2: 177-9.

Vanittanakom, N., Vanittanakom, P. e Hay, R.J. (2002). Rapid Identification of *Penicillium marneffe* by PCR-Based Detection of Specific Sequences on the rRNA Gene. *Journal of Clinical Microbiology*. 40: 1739-42.

Vázquez-Euán, R., Grijalva-Arango, R., Chi-Manzanero, B., Tzec-Silmá, M., Islas-Flores, I., Rodríguez-García, C., Peraza-Echeverría, L., James, A.C., Manzo-Sánchez, G. e Canto-Canché, B. (2012). Direct colony polymerase chain reaction (PCR): An efficient technique to rapidly identify and distinguish *Mycosphaerella fijiensis* and *Mycosphaerella musicola*. *African Journal of Biotechnology*. 11: 8172-80.

- Vesper, S.J., Varma, M., Wymer, L.J., Dearborn, D.G., Sobolewski, J. e Haugland, R.A. (2004). Quantitative polymerase chain reaction analysis of fungi in dust from homes of infants who developed idiopathic pulmonary hemorrhaging. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*. 46: 596-601.
- WHO. (2009). *WHO guidelines for indoor air quality: dampness and mould*. WHO Regional Office for Europe, Copenhagen.
- Willinger, B., Obradovic, A., Selitsch, B., Beck-Mannagetta, J., Buzina, W., Braun, H., Apfalter, P., Hirschl, A.M., Makristathis, A. e Rotter, M. (2003). Detection and identification of fungi from fungus balls of the maxillary sinus by molecular techniques. *Journal of Clinical Microbiology*. 41: 581-5.
- Wu, Z., Tsumura, Y., Blomquist, G. e Ru, X. (2003). 18S rRNA Gene Variation among Common Airborne Fungi, and Development of Specific Oligonucleotide Probes for the Detection of Fungal Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 5389-97.
- Xu, Z. e Yao, M. (2012). Monitoring of bioaerosol inhalation risks in different environments using a six-stage Andersen sampler and the PCR-DGGE method. *Environmental Monitoring and Assessment*. doi: 10.1007/s10661-012-2844-1.
- Zain, M.E., Razak, A.A., El-Sheikh, H., Soliman, H.G. e Khalil, A.M. (2009). Influence of growth medium on diagnostic characters of *Aspergillus* and *Penicillium* species. *African Journal of Microbiology Research*. 3: 280-6.
- Zeng, H., Li, X., Chen, X., Zhang, J., Dom, J. e Xi, L. (2009). Identification of *Penicillium marneffeii* in Paraffin-Embedded Tissue Using Nested PCR. *Mycopathologia*. 168: 31-5.

Zhao, Z., Li, L., Wan, Z., Chen, W., Liu, H. e Li, R. (2011). Simultaneous detection and identification of *Apergillus* and *Mucorales* species in tissues colleted from patients with fungal rhinosinusitis. *Journal of Clinical Microbiology*. 49: 1501–7.

APÊNDICE B – TESTE DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADES

MODELO DO TESTE DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE

<i>Espécie</i>	Identificação			Testes	
	Positivo na PCR	Negativo em PCR	Total		
Positivo no método convencional	Verdadeiro positivo	Falso positivo		Sensibilidade	(Verdadeiro positivo/Total de positivos na PCR)*100
Negativo no método convencional	Falso negativo	Verdadeiro negativo		Especificidade	(Verdadeiro negativo/Total de negativos na PCR)*100
Total	Total de positivos na PCR	Total de negativos na PCR			

APLICAÇÃO DO TESTE

<i>Aspergillus flavus</i>	Identificação			Testes	
	Positivo	Negativo	Total		
Positivo	14	9	23	Sensibilidade	100
Negativo	0	90	90	Especificidade	90,9
Total	14	99	113		

<i>Aspergillus fumigatus</i>	Identificação			Testes	
	Positivo	Negativo	Total		
Positivo	17	3	20	Sensibilidade	85
Negativo	3	90	93	Especificidade	96,77
Total	20	93	113		

<i>Aspergillus niger</i>	Identificação			Testes	
	Positivo	Negativo	Total		
Positivo	28	22	50	Sensibilidade	100
Negativo	0	63	63	Especificidade	74,11
Total	28	85	113		

<i>Aspergillus ochraceus</i>	Identificação			Testes	
	Positivo	Negativo	Total		
Positivo	18	2	20	Sensibilidade	100
Negativo	0	93	93	Especificidade	97,9
Total	18	95	113		

<i>Aspergillus</i> sp.	Identificação			Testes	
	Positivo	Negativo	Total		
Positivo	77	36	113	Sensibilidade	96,25
Negativo	3	336	339	Especificidade	90,32
Total	80	372	452		

<i>Penicillium citrinum</i>	Identificação			Testes	
	Positivo	Negativo	Total		
Positivo	12	18	30	Sensibilidade	100
Negativo	0	83	83	Especificidade	82,18
Total	12	101	113		

<i>Penicillium chrysogenum</i>	Identificação			Testes	
	Positivo	Negativo	Total		
Positivo	14	6	20	Sensibilidade	100
Negativo	0	93	93	Especificidade	93,94
Total	14	99	113		

<i>Penicillium expansum</i>	Identificação			Testes	
	Positivo	Negativo	Total		
Positivo	7	13	20	Sensibilidade	100
Negativo	0	93	93	Especificidade	87,74
Total	7	106	113		

<i>Penicillium</i> sp.	Identificação			Testes	
	Positivo	Negativo	Total		
Positivo	33	37	70	Sensibilidade	100
Negativo	0	269	269	Especificidade	87,91
Total	33	306	339		

<i>Aspergillus e Penicillium</i>	Identificação			Testes	
	Positivo	Negativo	Total		
Positivo	110	73	183	Sensibilidade	97,34
Negativo	3	605	608	Especificidade	89,23
Total	113	678	791		

ANEXO A – Normas da revista para submissão do artigo

Brazilian Journal of
GENETICS

ISSN 0100-8455 *versão impressa*
ISSN 1678-4502 *versão online*

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- [Política editorial](#)
- [Apresentação de manuscritos](#)

Política editorial

Em 1998, a **Brazilian Journal of Genetics** - ISSN 0100-8455 - muda seu título para Genetics and Molecular Biology - ISSN 1415-4757, mantendo a seqüência de sua numeração, ou seja, inicia em março de 1998, vol. 21, número 1.

A revista não cobra taxas pela publicação de artigos. Para cada artigo publicado, são fornecidas automaticamente 100 separatas a um custo que será informado oportunamente. Cópias adicionais não poderão ser fornecidas.

É condição fundamental que os manuscritos submetidos à apreciação da **Brazilian Journal of Genetics** não foram nem serão publicados simultaneamente em outro lugar. Com a aceitação de um manuscrito para publicação, os editores adquirem amplos e exclusivos direitos sobre o artigo para todas as línguas e países. A menos que os editores concedam permissão especial, não é permitida nenhuma reprodução fotográfica ou em microformas ou qualquer outra reprodução de natureza similar, seja da revista, seja de contribuições individuais retiradas da revista ou de excertos.

O uso de nomes ou marcas registradas etc. nesta publicação não implica, mesmo na ausência de uma declaração específica, que tais nomes estejam isentos das leis e regulamentações de proteção pertinentes e, dessa forma, livres para uso geral.

A revista é publicada a cada três meses, de acordo com o material recebido. De modo geral, quatro fascículos constituem um volume.

Apresentação de manuscritos

1. Os manuscritos devem ser apresentados em inglês. Devem ser digitados com espaço duplo e com margens de 2,5 cm em papel de boa qualidade, e apresentados em três cópias, incluindo ilustrações, desenhos etc. Todas as cópias de ilustrações, especialmente as fotografias, devem ser de boa qualidade.

2. O manuscrito deve ser organizado na seguinte ordem, tendo todas as páginas numeradas seqüencialmente:

- folha de rosto, resumo, introdução, material e métodos, resultados, discussão, agradecimentos, resumo em português (a tradução do resumo será providenciada pela revista para os autores que não falam português), referências, legendas das ilustrações e tabelas.

A folha de rosto deve incluir:

- título do trabalho
- nomes dos autores
- instituição onde o trabalho foi desenvolvido
- título corrente (sem exceder 72 letras e espaços)
- qualquer nota de rodapé referente ao título
- endereço ao qual as provas deverão ser enviadas.

3. A bibliografia deve incluir somente os trabalhos mencionados no texto. As referências bibliográficas devem ser ordenadas alfabeticamente sob o nome do primeiro autor, seguindo as determinações que seguem:

- **artigos de revista:** sobrenomes e iniciais de todos os autores, ano, título completo do trabalho, título abreviado da revista de acordo com o padrão do *Index Medicus*, volume, página inicial e final.
- **livros:** nomes dos autores, ano, título completo do livro, edição, casa publicadora, local de publicação.

- **trabalhos publicados em anais:** nomes dos autores, ano, título completo do trabalho, título completo da publicação, nomes dos editores entre parênteses, casa publicadora, local de publicação, página inicial e final.

Exemplos:

Searle, S.R. (1961). Variance components in the unbalanced 2-way nested design. *Ann. Math. Statist.* 32: 1161-1166.

Comstock, R.E., Kelleher, T. and Morrow, E.B. (1958). Genetic variation in an asexual species, the garden strawberry. *Genetics* 43: 634-646.

Mather, K. (1949). *Biometrical Genetics*. Methuen, London.

Rhoades, M.M. (1968). Studies on the cytological basis of crossing over. In: *Replication and Recombination of Genetic Material*(Peacock, W.J. and Brock, R.D., eds.). Australian Academy of Science, Canberra, pp. 229-241.

4. As citações no texto devem incluir o nome do autor e o ano entre parênteses, por exemplo (Searle, 1961) ou (King and Wilson, 1975). Quando um trabalho com mais de dois autores for citado, somente o primeiro autor deve ser mencionado, por exemplo (Comstock et al, 1958).

5. As notas de rodapé devem ser numeradas consecutivamente, com exceção das notas referentes ao título do manuscrito ou às fórmulas, que devem ser identificadas por asteriscos.

6. As tabelas devem ser numeradas em algarismos romanos, e as ilustrações, em algarismos arábicos.

7. Os manuscritos devem ser enviados ao [editor](#) no [endereço abaixo](#).

Resumos de teses

Os resumos de teses devem ser submetidos em inglês e

na língua original (se o autor não for de língua inglesa). Os dados bibliográficos, como título original, ano, instituição, endereço, número de páginas e nome do professor orientador devem ser incluídos.