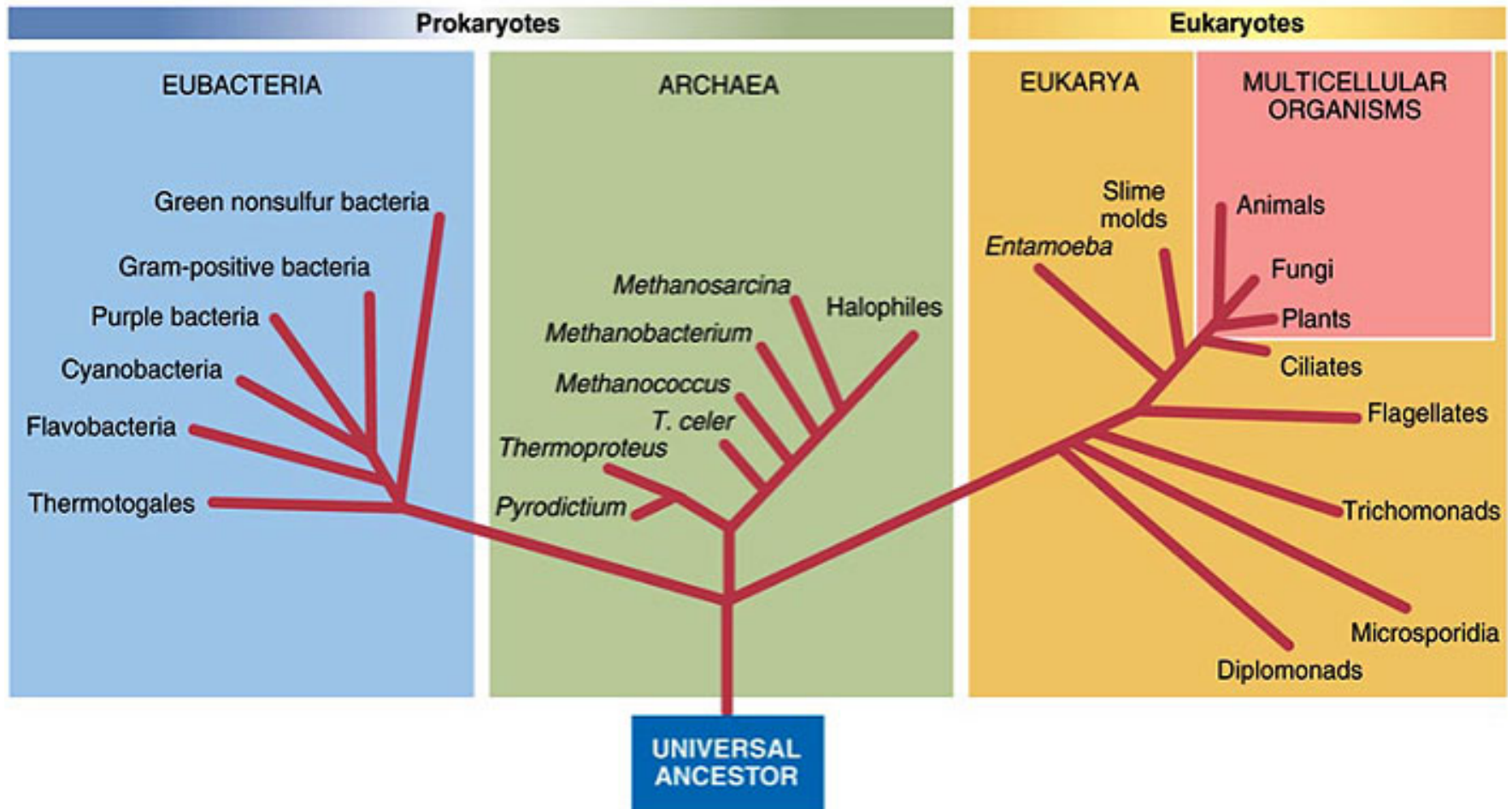


# Identificação polifásica de fungos

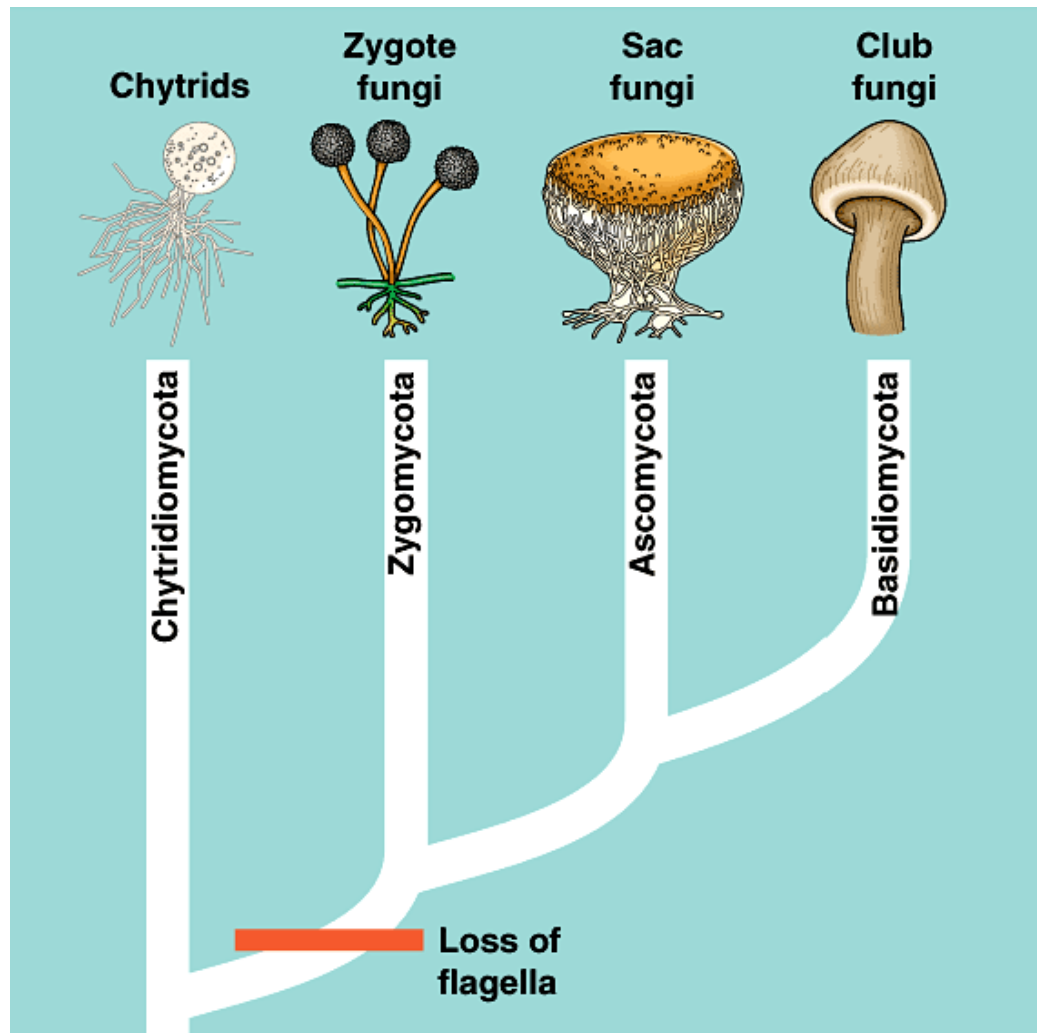
Profa. Kelly Ishida  
E-mail: [ishidakelly@usp.br](mailto:ishidakelly@usp.br)

# Woese (1977)

Baseada na sequência gênica do DNAr



# 4 filos:



Originados de um  
único ancestral



Grupo  
monofilogenético

**“Fungos  
verdadeiros”**

Atualmente...classificação está em fase de transformação!

Em 2012: International Commission on the Taxonomy of Fungi

<http://www.fungaltaxonomy.org/>

# Identificação clássica dos fungos

- Características morfológicas
- Características fisiológicas

Utilização de chaves de classificação

# Identificação polifásica de fungos

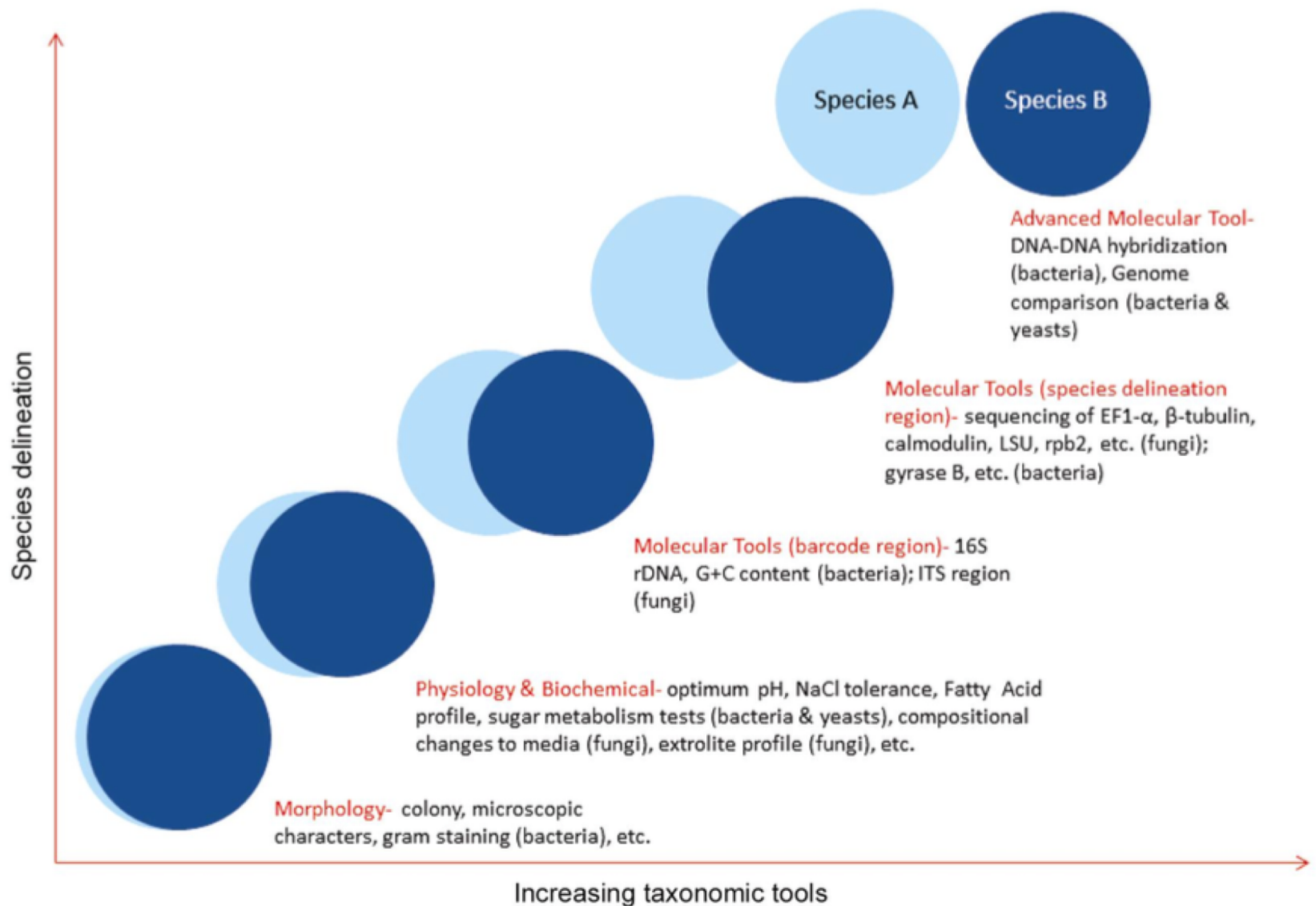
- Ecologia (local, solo, temperatura entre outras informações)
- Características morfológicas (macro- e micro-)
- Características fisiológicas (incluindo produção de extrólitos)

- **Características genéticas**

**Técnicas de biologia  
molecular**



- **Proteômica**

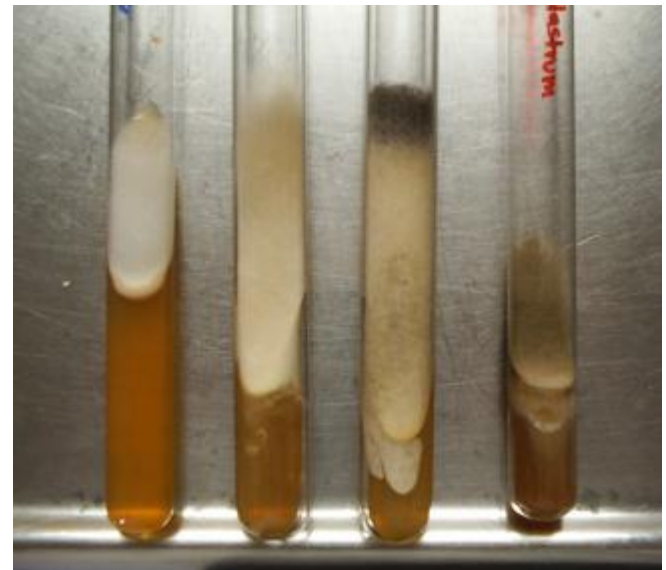


**Figure 2.** Different criteria used in species delineation of bacteria, archaea and fungi.

# Coleta e isolamento da amostra fúngica

- **Material ambiental:** ar, água, alimentos, terra, superfície entre outros.
- **Material clínico:** secreção mucosa, sangue, pus, urina, fezes, escarro, líquido, tecido entre outros.

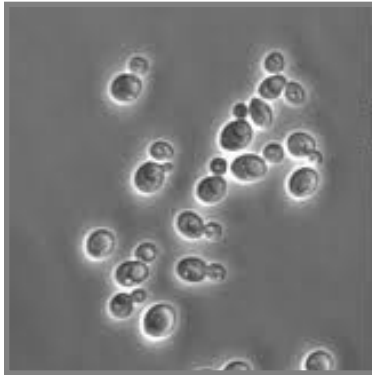
# Coleta e isolamento da amostra fúngica



# Morfologia

## Características macroscópicas da colônia fúngica

- Unicelulares → fungos leveduriformes

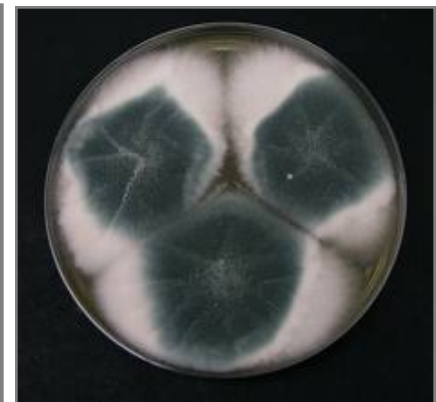


Ex. *Saccharomyces cerevisiae*

- Pluricelulares → fungos filamentosos (“bolor”)

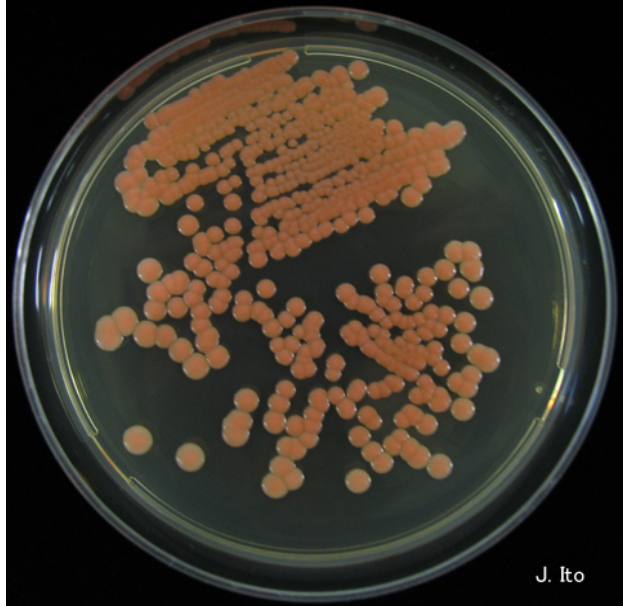
- Hifa – unidade básica do fungo
- Micélio – conjunto de hifas

Ex. *Aspergillus fumigatus*



# LEVEDURAS

## Coloração e Consistência



J. Ito

Forma, superfície, margem, coloração, aspecto (seco, úmido), Tamanho – dependem do tempo de incubação, meio e temperatura

### FORM



Punctiform



Circular



Filamentous



Irregular



Rhizoid



Spindle

### ELEVATION



Flat



Raised



Convex



Pulvinate



Umbonate

### MARGIN



Entire



Undulate



Lobate



Erose

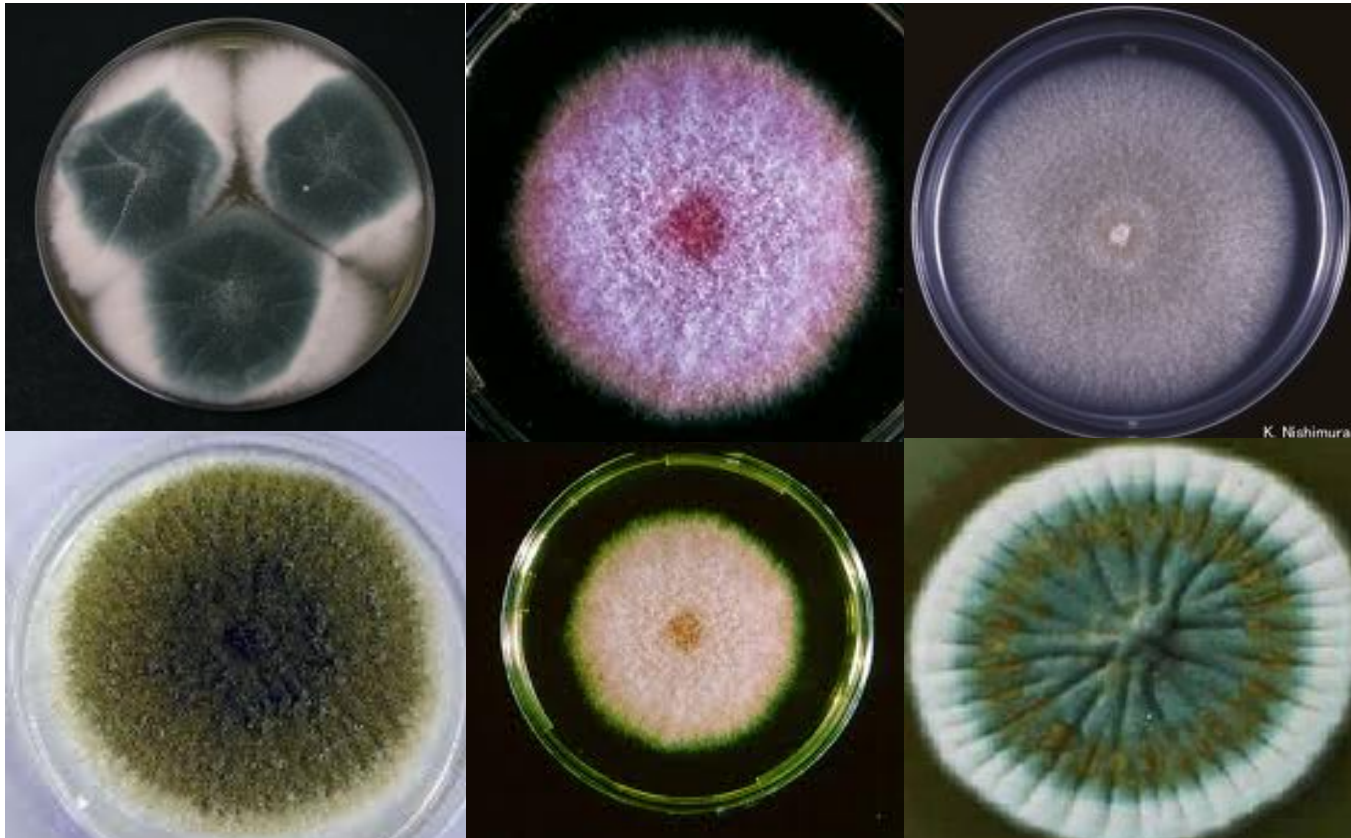


Filamentous



Curled

## FUNGOS FILAMENTOSOS



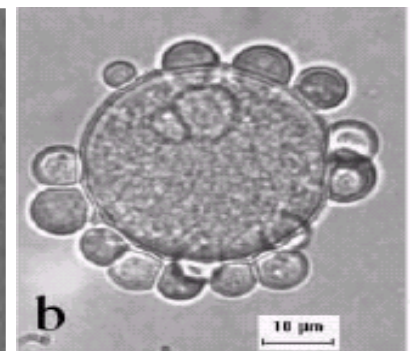
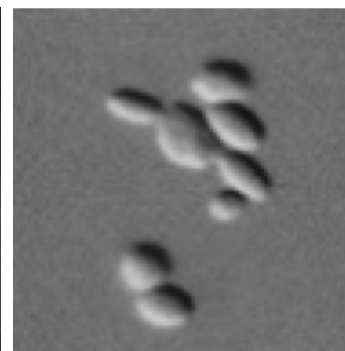
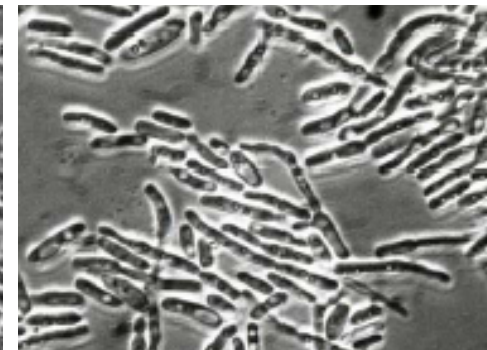
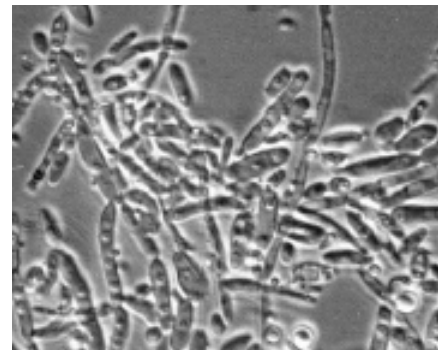
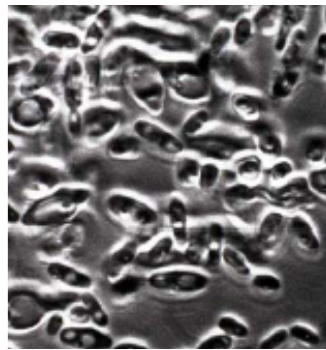
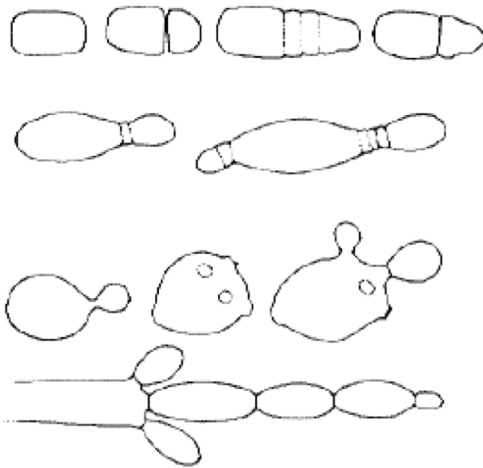
Forma, superfície, margem, coloração verso e reverso, aspecto (seco, úmido), tamanho – dependem do tempo de incubação, meio e temperatura

# **Técnica da Colônia Gigante – avaliar as características macroscópicas das colônias**

# Morfologia

## Características microscópicas dos fungos

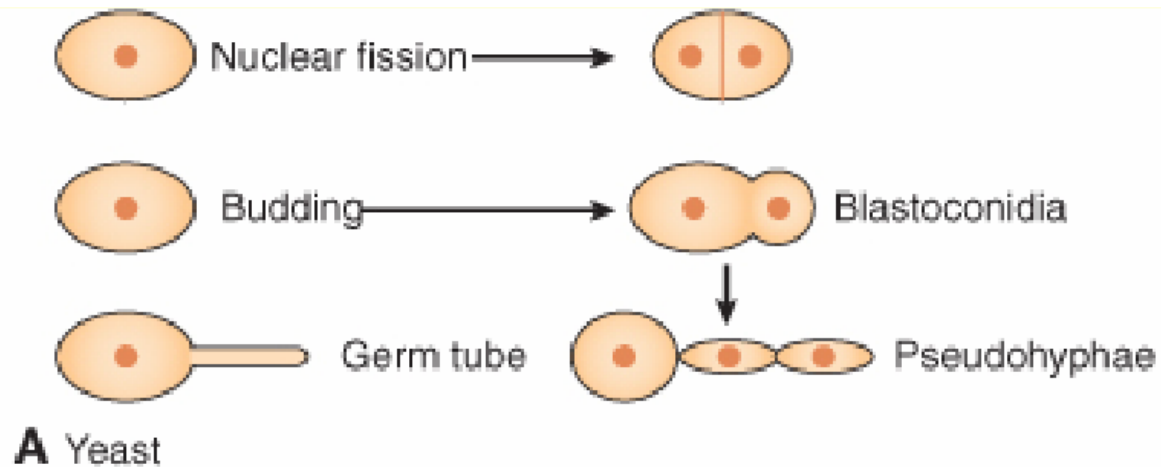
### LEVEDURAS



# LEVEDURAS

## Reprodução assexuada – Formação Blástica

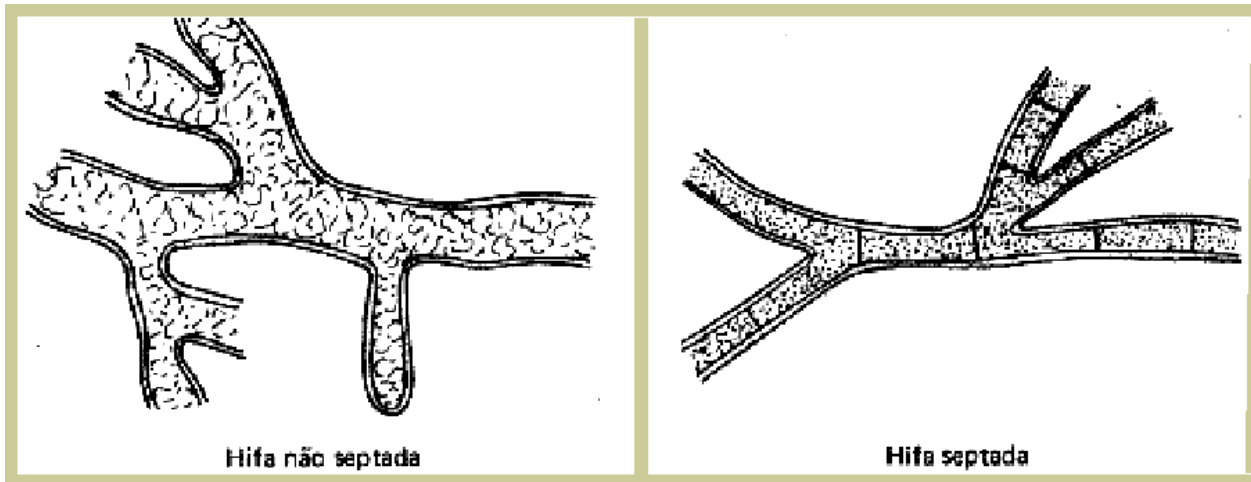
### Brotamento / fissão binária



# FUNGOS FILAMENTOSOS

## Característica microscópica

- Hifa
  - Micélio (conjunto de hifa)
- Vegetativo**  
**Reprodutivo**

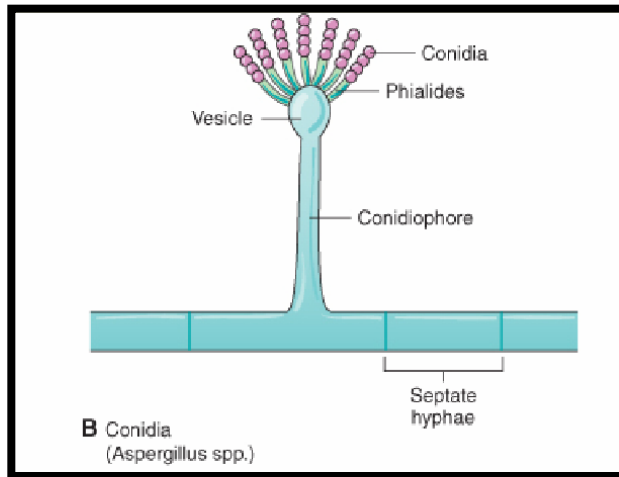


- Septadas x Não-septadas /Contínuas/Cenocíticas
- Hialino X Demáceo
- Espessa X Delgada

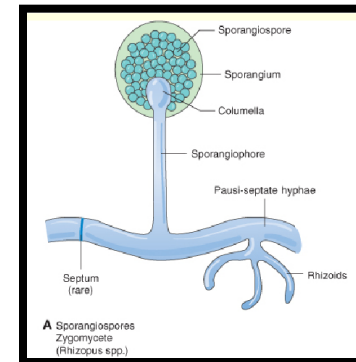
# FUNGOS FILAMENTOSOS

## Reprodução assexuada – Micélio reprodutivo

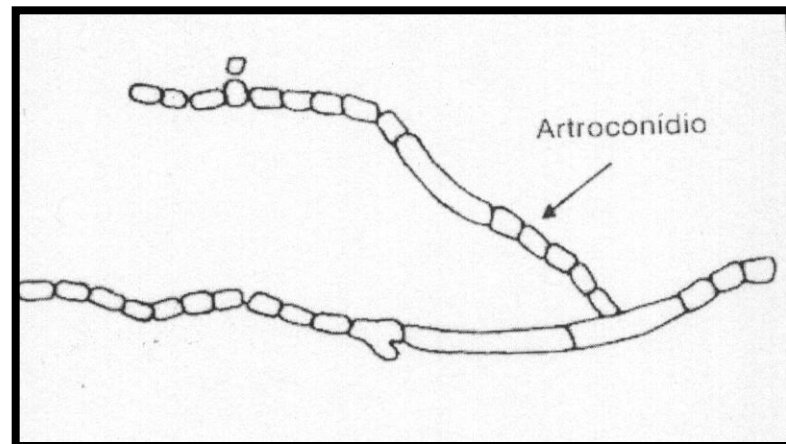
- Formação Blástica (Ascomicetos)



- Formação de Esporângios (Zigomicetos)

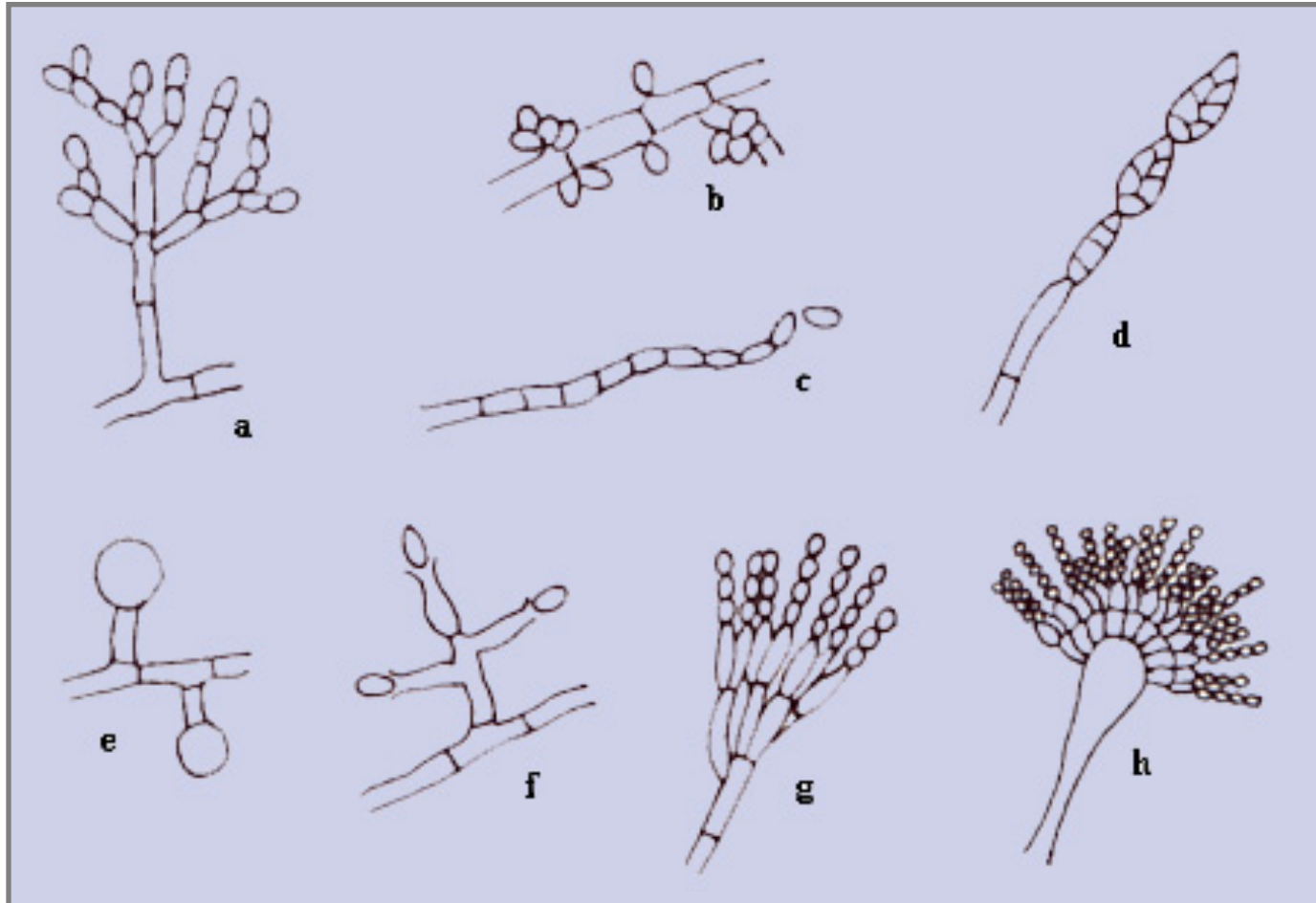


- Formação Tática  
Artroconídios



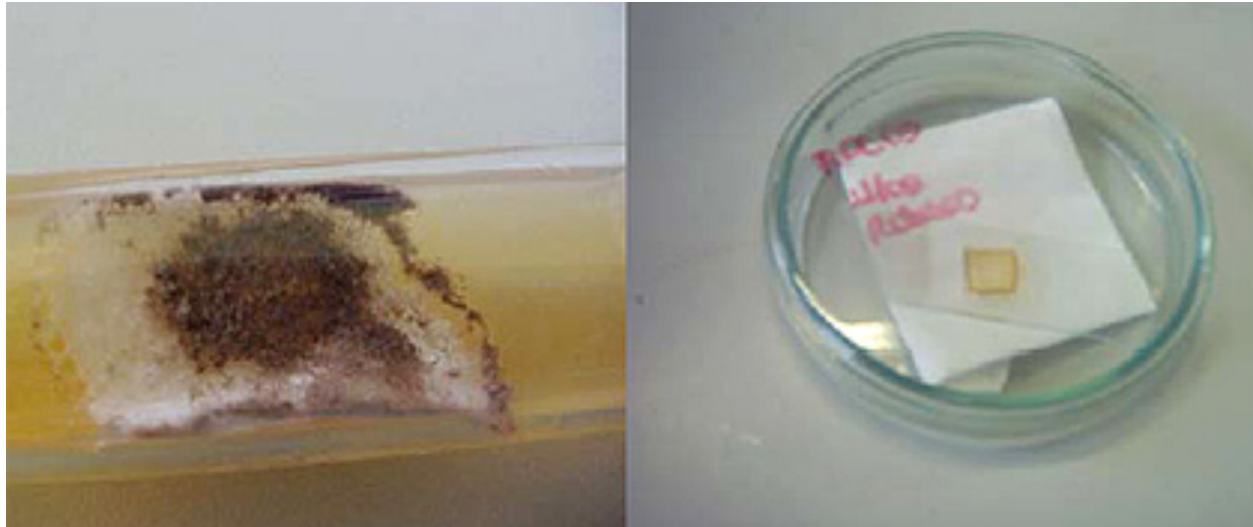
# FUNGOS FILAMENTOSOS

## Estruturas de reprodução assexuada



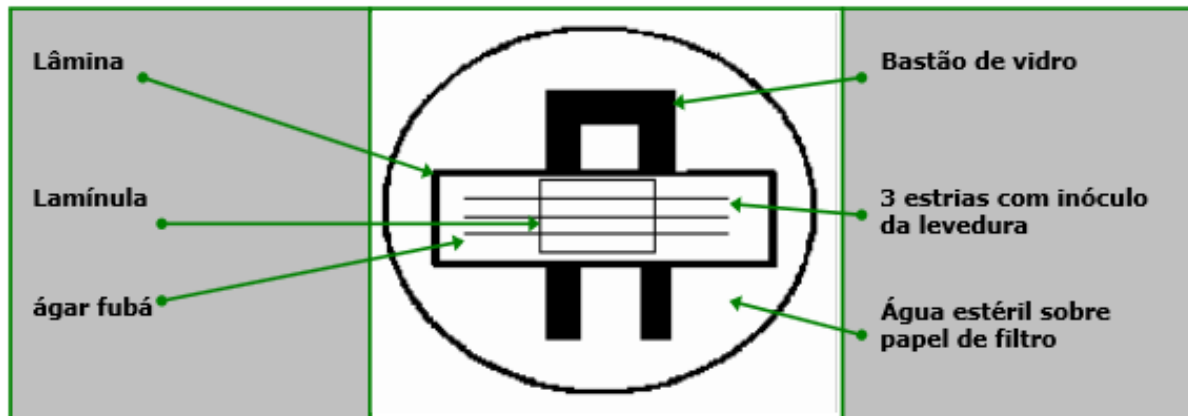
- Técnica de Microcultivo em lâmina

Fungo  
Filamentoso



Cultivo em lâmina para prova de filamentação e clamidósporo

Levedura



# Testes Bioquímicos

- Urease
- Auxanograma – assimilação de fontes de carbono e nitrogênio
- Zimograma – fermentação de açúcares

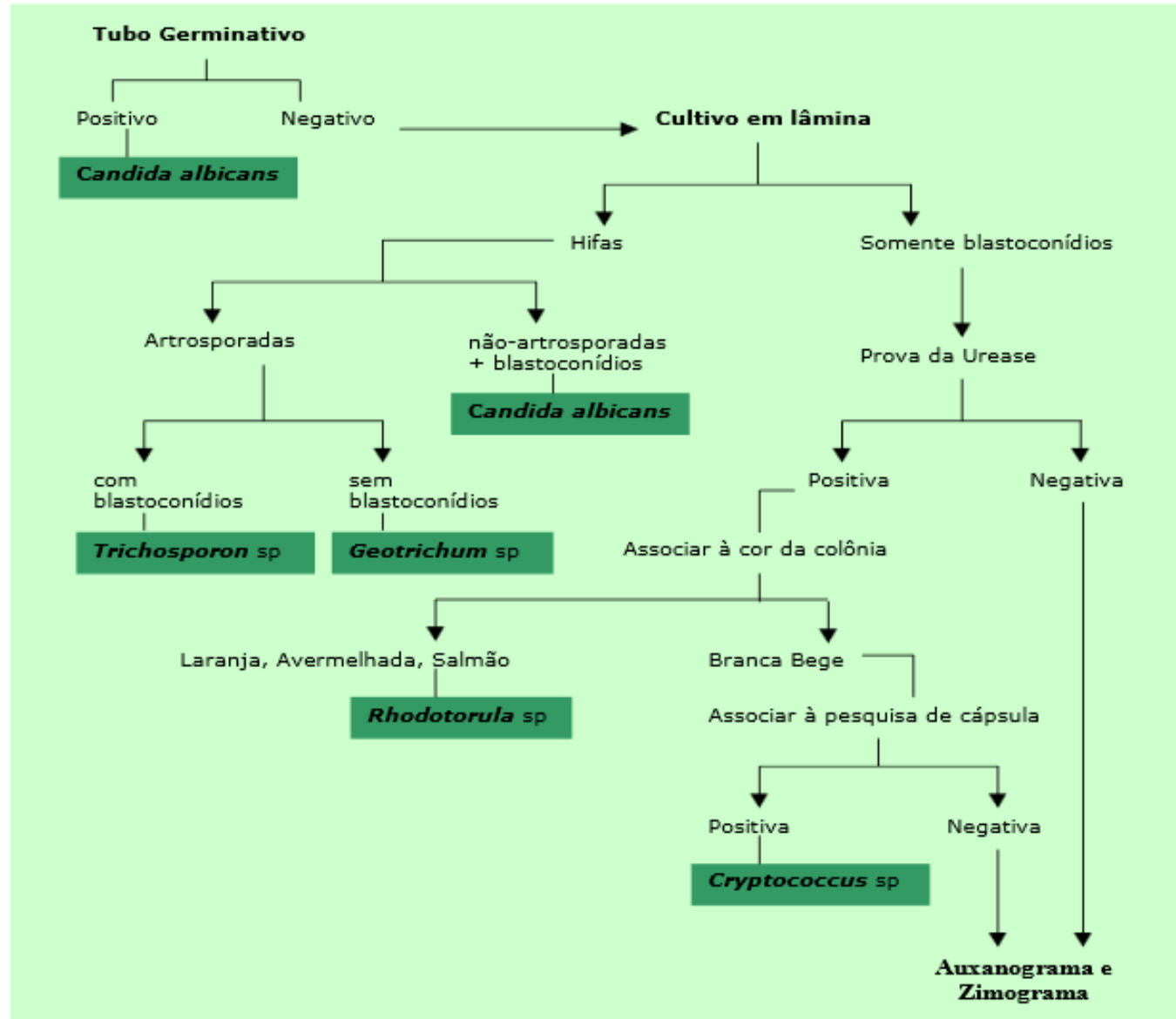
## Identificação clássica de fungos

**Fungos Filamentosos** – aspectos morfológicos e **alguns** testes bioquímicos

**Leveduras** – aspectos morfológicos e testes bioquímicos

## Por exemplo:

Esquema simplificado para identificação de alguns gêneros de leveduras de interesse médico

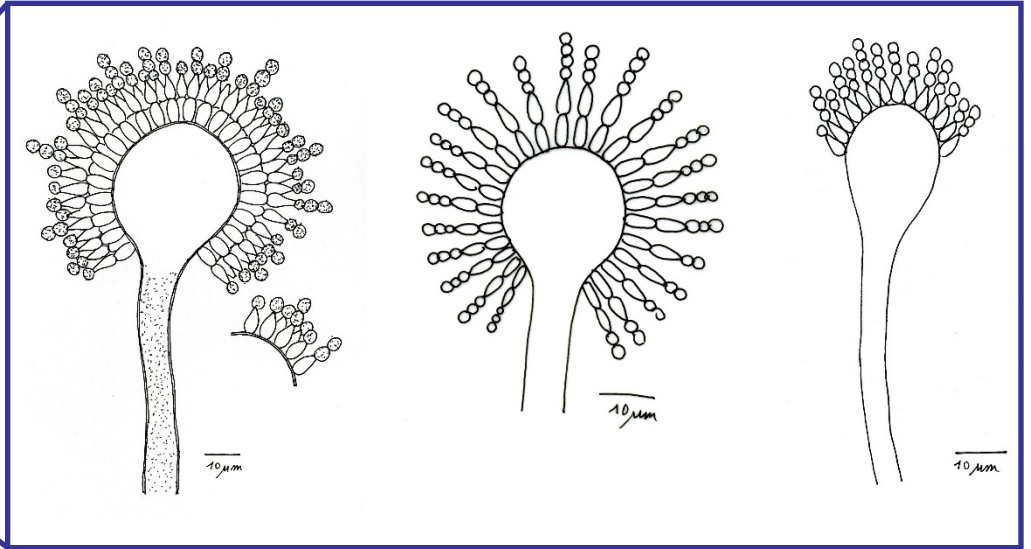
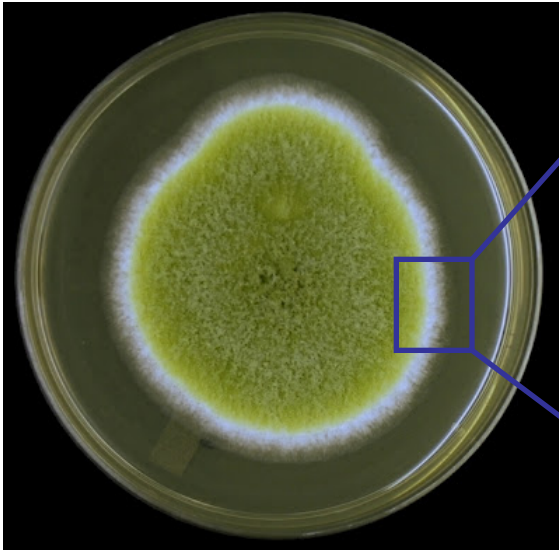


## Identificação das principais leveduras de interesse médico

| Levedura                 | Tg | Cultivo em lâmina |    | Ur | Assimilação |    |    |    |    |    |   |   |                 | Fermentação |    |    |    |    |    |
|--------------------------|----|-------------------|----|----|-------------|----|----|----|----|----|---|---|-----------------|-------------|----|----|----|----|----|
|                          |    | Hifa              | Ar |    | Sa          | Ma | La | Ce | Tr | Ra | X | I | NO <sub>3</sub> | Gl          | Sa | Ma | La | Ra | Tr |
| <i>C. albicans</i>       | +  | +                 | -  | -  | +           | +  | -  | -  | +  | +  | + | - | -               | +           | -  | +  | -  | -  | V  |
| <i>C. tropicalis</i>     | -  | +                 | -  | -  | +           | +  | -  | V  | +  | +  | + | - | -               | +           | V  | +  | -  | -  | +  |
| <i>C. parapsilosis</i>   | -  | +                 | -  | -  | +           | +  | -  | V  | +  | +  | + | - | -               | +           | -  | -  | -  | -  | V  |
| <i>C. krusei</i>         | -  | +                 | -  | -  | -           | -  | -  | -  | -  | -  | - | - | -               | +           | -  | -  | -  | -  | -  |
| <i>C. guilliermondii</i> | -  | +                 | -  | -  | +           | +  | -  | +  | +  | +  | + | - | -               | +           | +  | -  | -  | +  | V  |
| <i>C. glabrata</i>       | -  | -                 | -  | -  | -           | -  | -  | -  | +  | -  | - | - | -               | +           | -  | -  | -  | -  | +  |
| <i>C. neoformans</i>     | -  | -                 | -  | +  | +           | +  | -  | V  | +  | V  | + | + | -               | -           | -  | -  | -  | -  | -  |
| <i>Geotrichum</i>        | -  | +                 | +  | -  | -           | -  | -  | -  | -  | -  | + | - | -               | V           | -  | -  | -  | -  | -  |
| <i>Trichosporon</i>      | -  | +                 | +  | V  | +           | +  | +  | +  | V  | V  | + | V | -               | -           | -  | -  | -  | -  | -  |
| <i>Rhodotorula sp</i>    | -  | -                 | -  | +  | +           | V  | -  | V  | +  | +  | + | - | -               | -           | -  | -  | -  | -  | -  |
| <i>Saccharomyces</i>     | -  | -                 | -  | -  | +           | +  | -  | -  | V  | +  | - | - | -               | +           | +  | +  | -  | +  | V  |

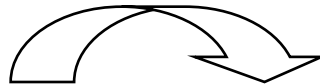
Tg = tubo germinativo, Ar = artrósporo, Ur= urease, Sa = sacarose, Ma=maltose, La = lactose, Ce = celubiose, Tr = trealose, Ra = rafinose, X = xilose, I = inositol, NO<sub>3</sub> = nitrato, Gl = glicose, + = pos, - = neg, V= variável

# Identificação clássica de fungos – uso de chaves de identificação



**Diferenças morfológicas extremamente difíceis de serem detectadas**

**Muitas espécies  
possuem  
morfologia similar**



**Identificação  
molecular**

- Problemas com a identificação fenotípica:
  - Variabilidade de critérios em diferentes chaves de identificação
  - Alta subjetividade na caracterização de algumas estruturas/espécies
  - Variação das características fenotípicas
  - Necessidade de micologistas com experiência em taxonomia

# Métodos moleculares na identificação de fungos

Caracterização molecular: RAPD,  
RFLP, AFLP, e outros

Identificação molecular de fungos



2 principais procedimentos:

**PCR específico**



1 "primer"



1 espécie

**Sequenciamento de DNA**



Genes: DNAr (ITS), TEF-1,  
Calmodulina, Tubulina



Identificação de qualquer  
espécie de fungo

- RAPD** - Random Amplified Polymorphic DNA
- RFLP** - Restriction Fragment Length Polymorphism
- AFLP** - Amplified fragment length polymorphism (DNA fingerprint)
- PCR** – Polymerase Chain Reaction

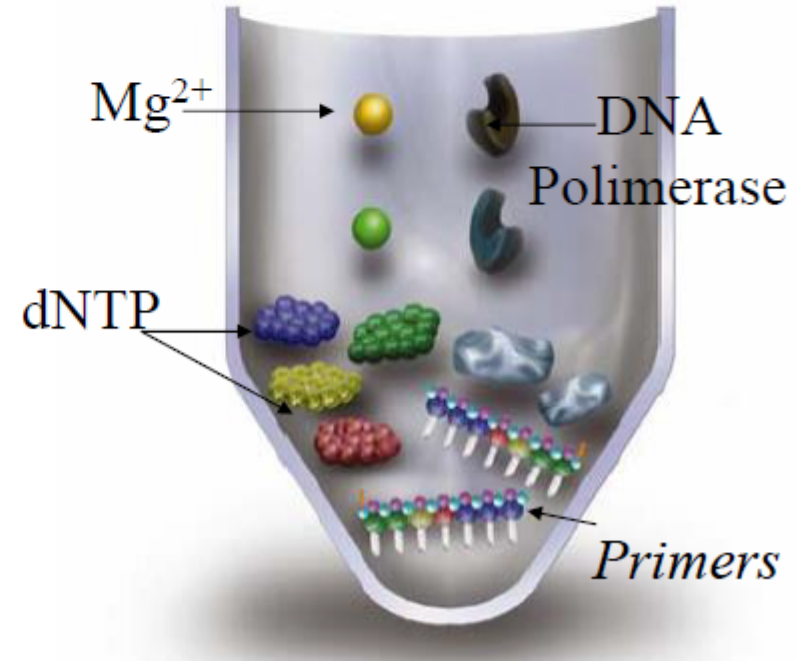
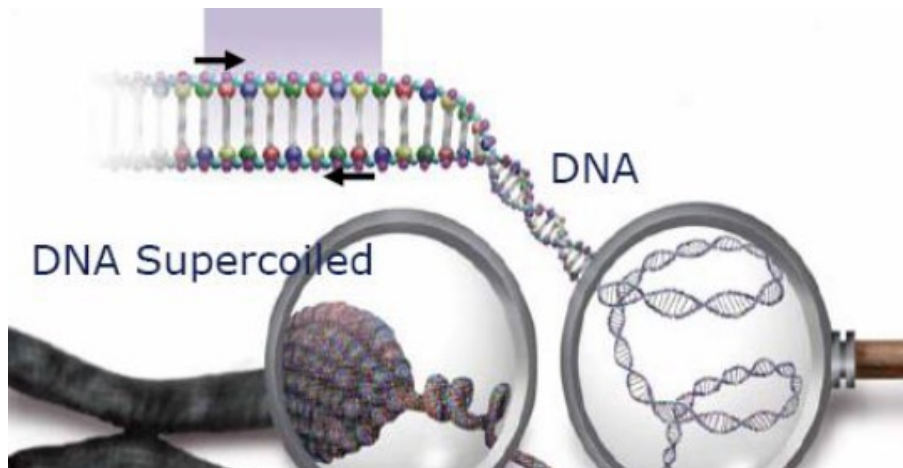
Esses métodos visam a obtenção de Marcadores moleculares do fungo



- **Construção de mapa genético**
- **Deteção de variabilidade**
  - **Digital Genômica**

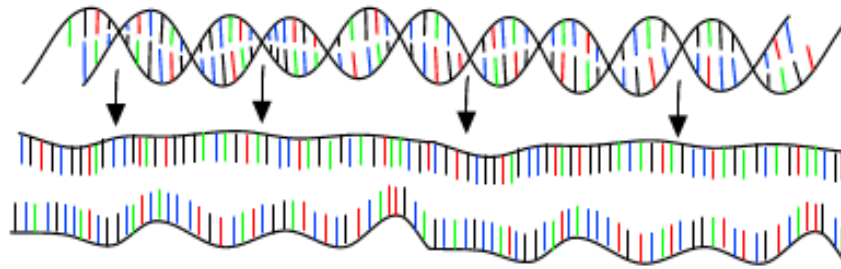
# PCR

- Reação em cadeia da polimerase
- Consiste em fazer cópias “in vitro” de uma sequência de DNA



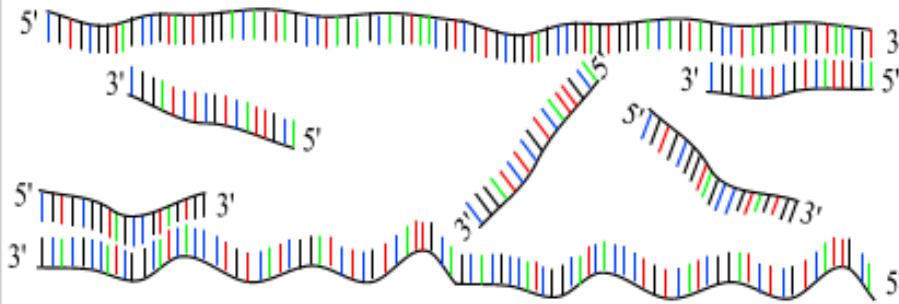
# PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :



**Step 1 : denaturation**

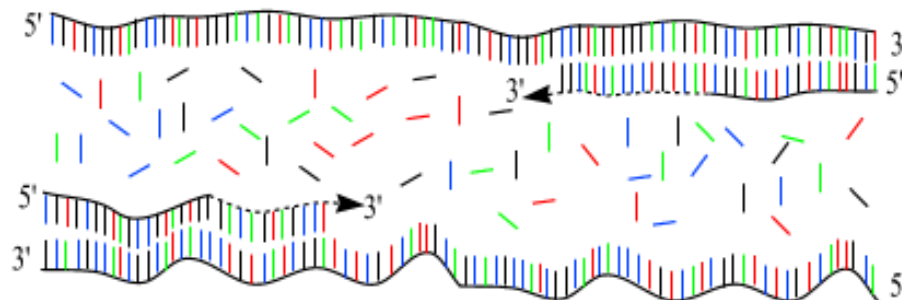
1 minut 94 °C



**Step 2 : annealing**

45 seconds 54 °C

forward and reverse  
primers !!!



**Step 3 : extension**

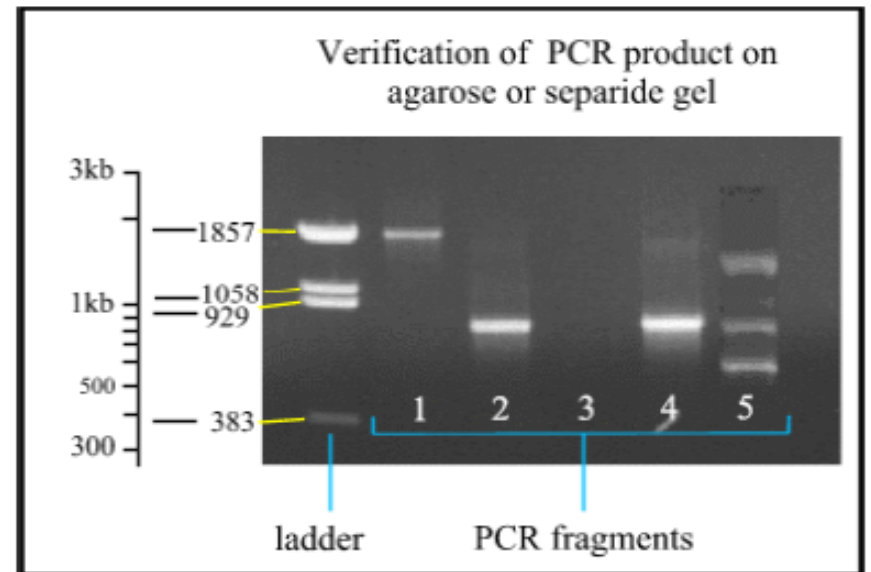
2 minutes 72 °C

only dNTP's



## Transiluminador

Fragmentos da PCR revelados  
pelo brometo de etídio ou  
nitrato de prata.

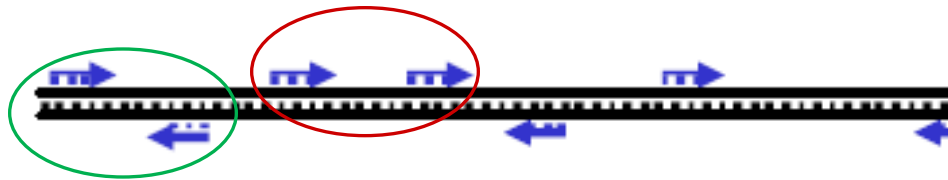


## Visualização dos produtos de PCR

# RAPD

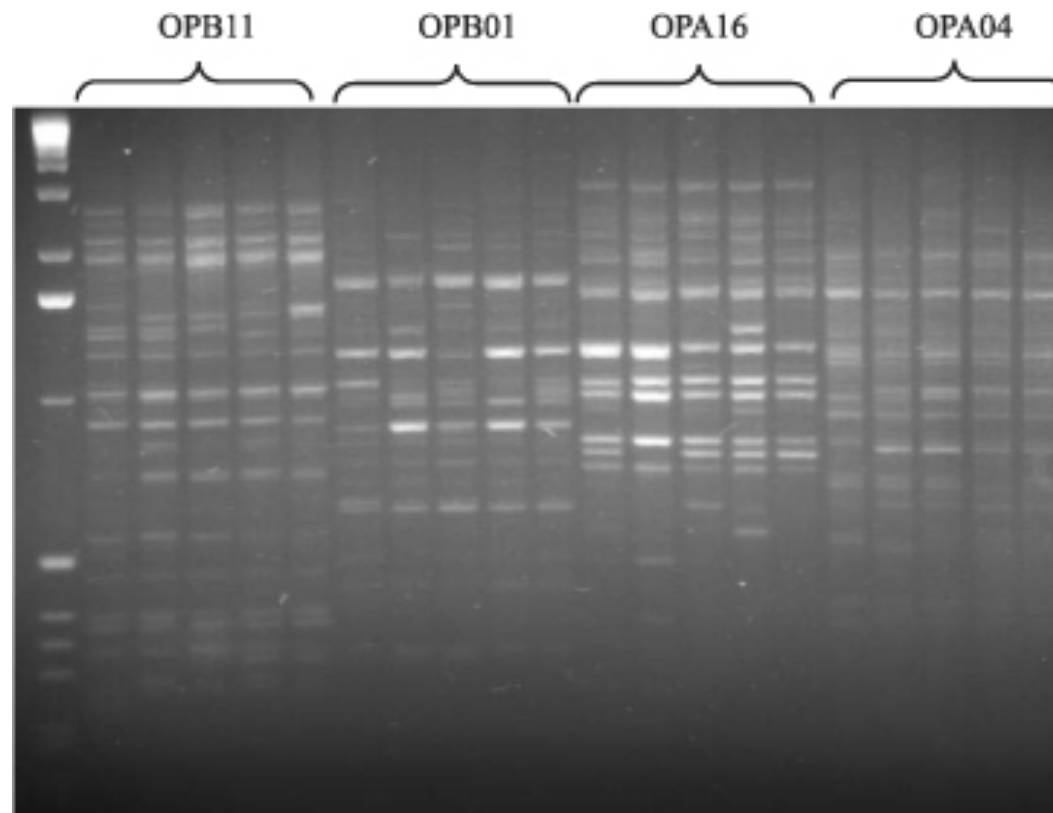
(DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso)

- Consiste na amplificação de sequência de DNA aleatório
- Primer de sequência aleatório – 10 nucleotídeos
- Método: Extração do DNA – PCR – eletroforese



 **Primer se liga a muitos locais no DNA**

- **Aplicação do método:**  
Tipagem de micro-organismos  
Identificação de espécies



**Figura 1.** Triagem de oligonucleotídeos iniciadores mostrando diferentes padrões de amplificação.

### **Como avaliar?**

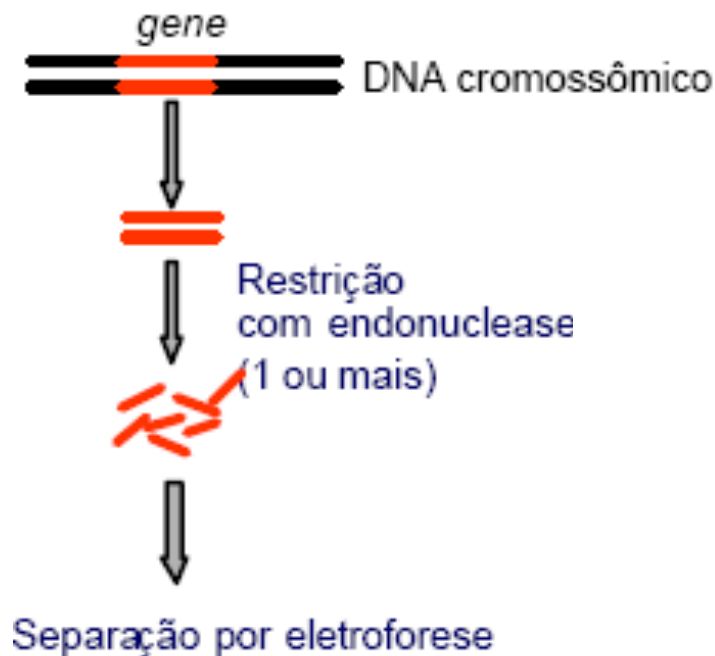
Similaridade das bancas

Construção de um dendograma

Uso de programas de computador

# PCR-RFLP - *restriction fragment length polymorphism*

(Polimorfismo de fragmentos de restrição)



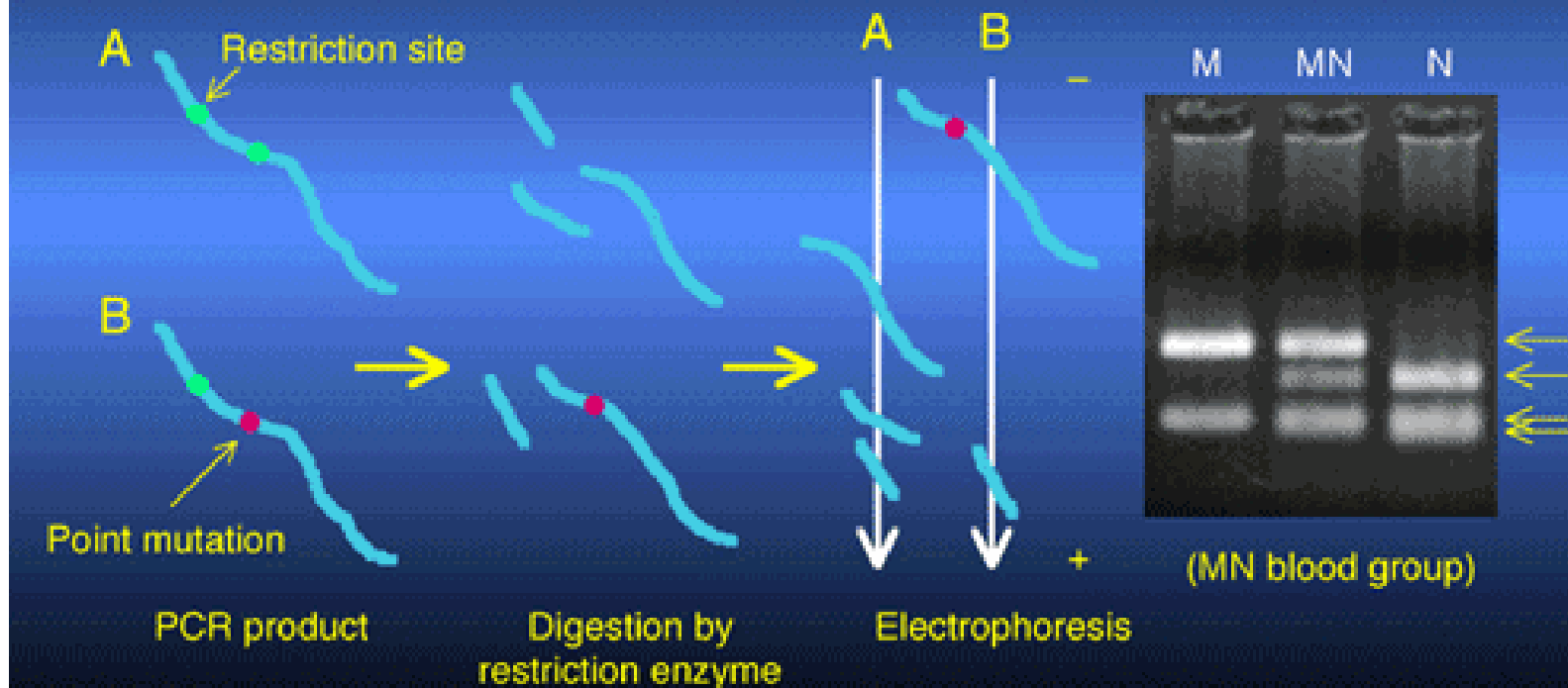
- Consiste
  - amplificação de uma região de um gene pela PCR
  - Seguida de digestão da sequência com enzimas de restrição
  - Objetivo: identificação de polimorfismos de tamanho dos fragmentos.
- Enzima de restrição – cada enzima reconhece um sítio específico
- Fragmentam o DNA em determinadas sequências – normalmente curtas (4-8 pb).

# Detecção de mutação no gene de interesse

## Analysis of DNA polymorphism (6)

### PCR (4)

### Restriction fragment length polymorphism (RFLP)



## Exemplo: Tipagem molecular de *C. neoformans*

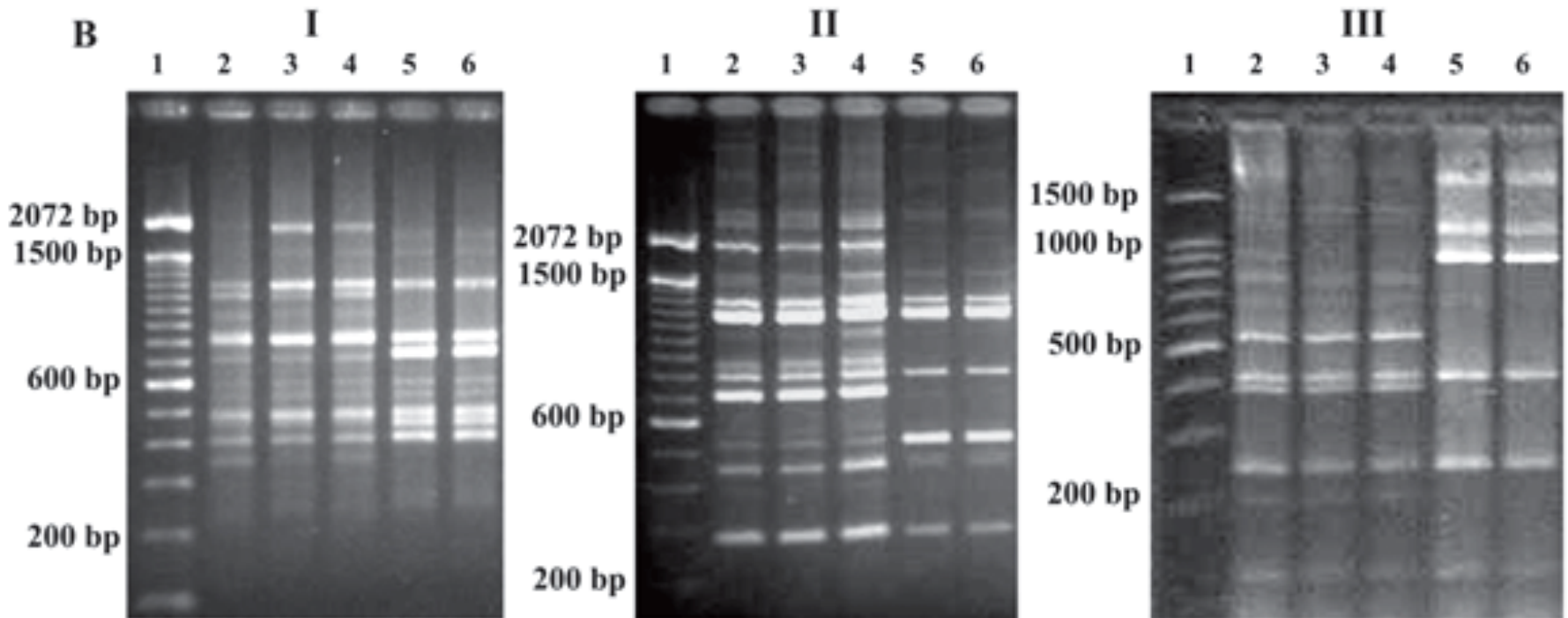
2,3 e 4 – VNI

5 e 6 - VNII

PCR: Primer GACA

Primer 6-RAPD

PLB1-RFLP



**Fig. 2 - A.** PCR fingerprinting with primer (GACA)<sub>4</sub> (AI) and PLB1-RFLP with *Ava*I (AII) patterns of *C. neoformans*. Lane 1\*, molecular weight marker; 2-5, molecular types VNI, VNII, VNIII, VNIV; 6-9, molecular types VGI, VGII, VGIII, VGIV – **B.** Representative gel of (GACA)<sub>4</sub>-PCR fingerprinting (BI), Primer 6-RAPD (BII) and PLB1-RFLP (BIII) from clinical isolates of *C. neoformans*. Lane 1\*, molecular weight marker; 2-4, clinical isolates 377, 379 and 387 (molecular type VNI, serotype A); 5-6, clinical isolates 382 and 384 (molecular type VNII, serotype A). \* Molecular weight marker (Gibco 100bp) to the (GACA)<sub>4</sub>-PCR fingerprinting (AI and BI) and Primer 6-RAPD (BII). Molecular weight marker (Promega 100bp) to the PLB1-RFLP (AII and BIII).

- **PCR específico**

- **Utilização da sequência do DNA ribossomal para distinção de espécies**

- Ribossomos: organelas citoplasmáticas observadas em procariotos e eucariotos.
- Os ribossomos estão envolvidos com a tradução do mRNA.
- Os genes de rDNA possui muitas cópias gênicas que estão separadas por regiões espaçadoras conservadas na espécie
- Há 3 tipos de RNAs:
  - 18S, 5.8S e 28S
  - Regiões transcritas internamente (ITS)
  - Regiões transcritas externamente (ETS)

**Essas regiões espaçadoras são variáveis e discriminam as espécies**

3' 5.8S → 5' 28S rDNA (CTSF e CTSR), incluindo a região ITS2

**Iniciadores Universais – gênero *Candida* spp.**

Iniciador dianteiro: CTSF 5'-TCGCATCGAT GAAGAACGCAGC-3'

Iniciador reverso: CTSR 5'-TCTTTTCCTCCGCTTAT TGATATGC-3'

**Iniciadores espécie-específico de *Candida* spp.**

| Espécie                | Sequência do iniciador              |
|------------------------|-------------------------------------|
| <i>C. albicans</i>     | 5'-ATTGCTTGCGGCGGTAAACGTCC-3'       |
| <i>C. glabrata</i>     | 5'-TAGGTTTTACCAAC TCGGTGTT-3'       |
| <i>C. parapsilosis</i> | 5'-TCTTTTCCTCCGCTTAT<br>TGATATGC-3' |
| <i>C. tropicalis</i>   | 5'-ATTTTGCTAGTGGCC-3'               |

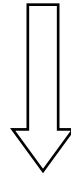
Ishida et al. Characterization of *Candida* spp. isolated from vaginal fluid: identification, antifungal susceptibility, and virulence profile. Acta Scientiarum, 35: 1-8, 2013.

# **Taxonomia de Fungos**

## **Filogenia**



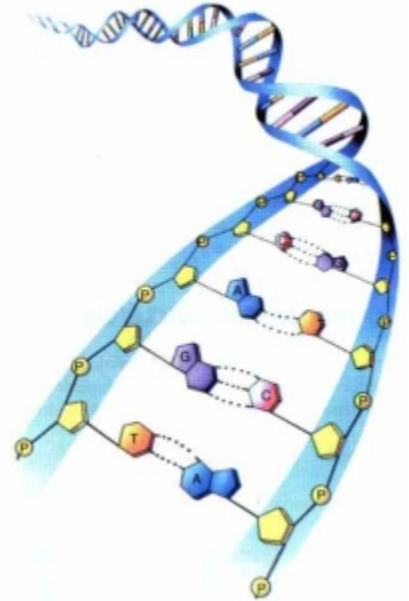
## **Sequenciamento do DNA**



**Determinar sequência de nucleotídeos do DNA**



**Seqüenciamento de rDNA (ITS), TEF-1 $\alpha$ , calmodulina e  $\beta$ -tubulina  
(genes “keephousing”)**

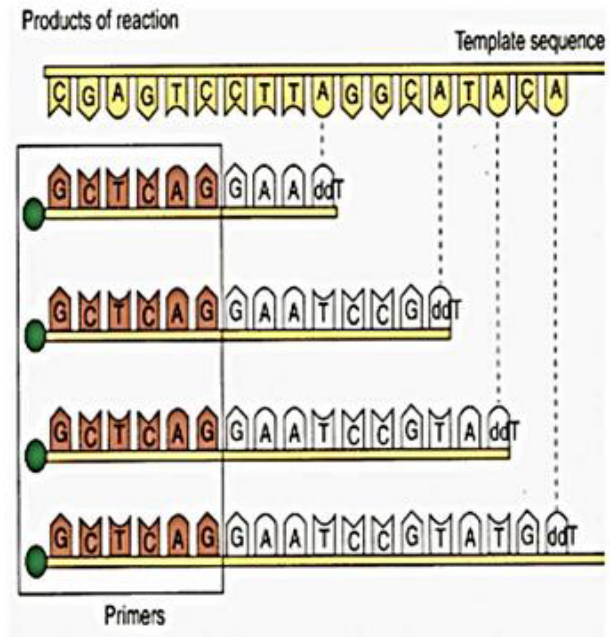


# Sequenciamento de DNA

## Método de Sanger

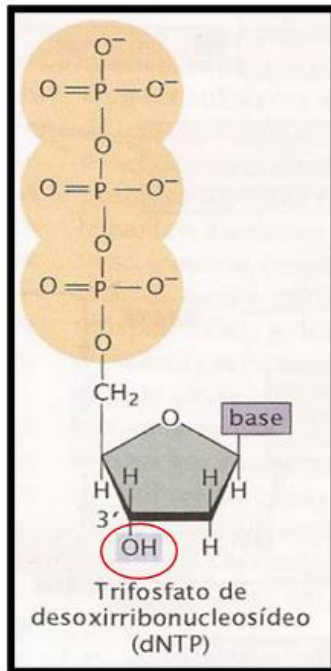
### *Método de Didesóxinucleotídeos ou Terminação em Cadeia*

Descrito por Sanger et al., 1977

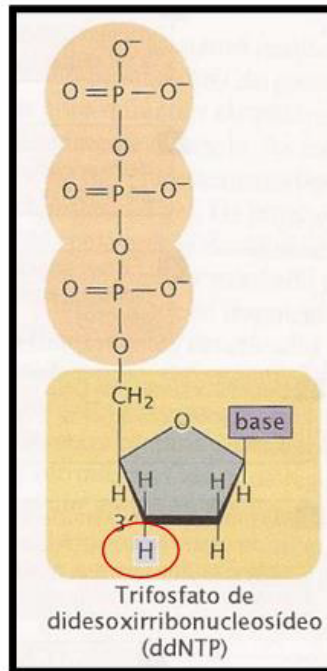


# Método de Sanger

- ✓ Substrato especial para síntese de DNA



LIGAÇÃO FOSFODIESTER



Finalizam a síntese de DNA

ddNTP

- ✓ São incorporados na cadeia crescente de DNA

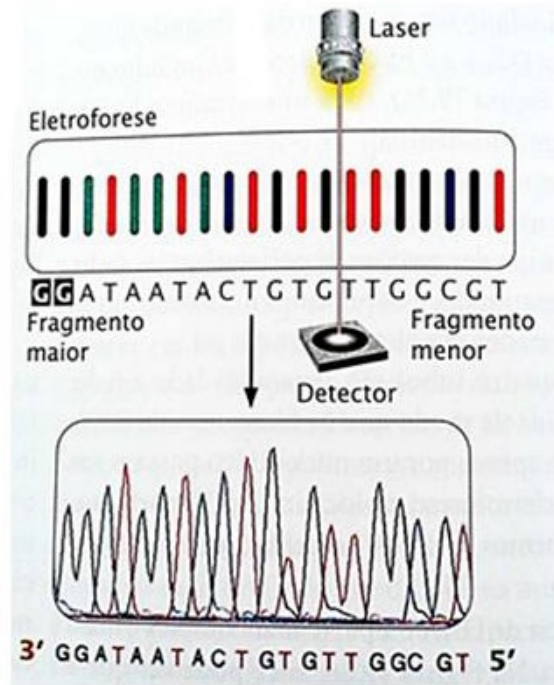
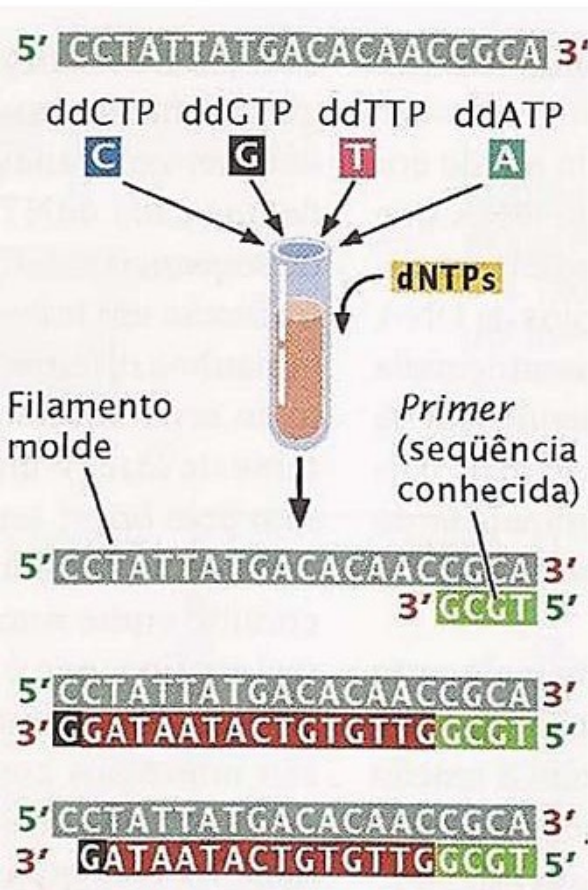


- ✓ Nenhum outro dNTP é adicionado



~~LIGAÇÃO FOSFODIESTER~~

## Reação de sequenciamento baseada no Método de Sanger



## Elektroforese

*fragmentos migram de acordo  
com seu tamanho*



O corante fluorescente no DNA  
é detectado

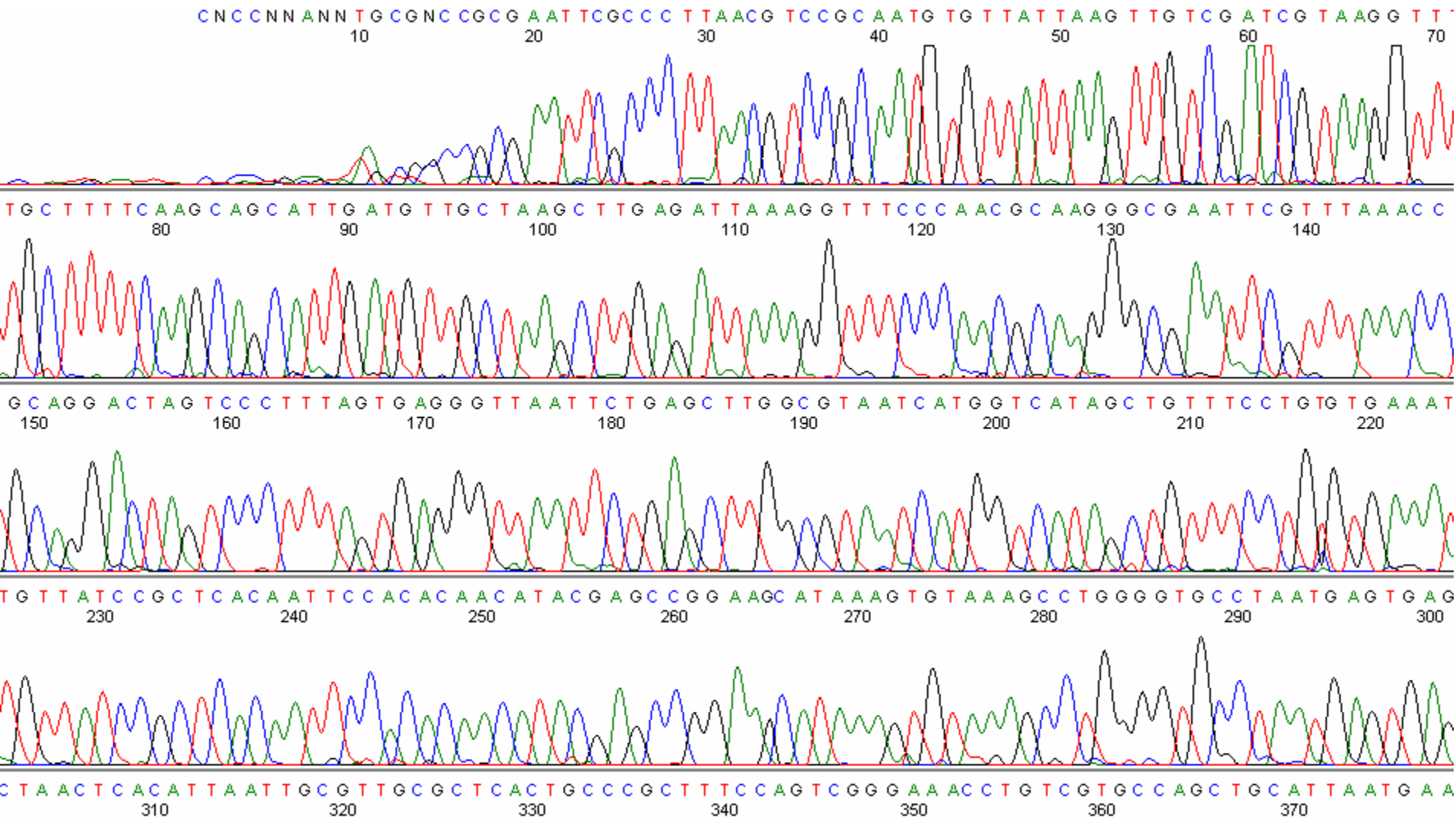


Cada fragmento aparece como um pico, sendo que a cor do pico indica a base representada

Sequência complementar a  
sequência alvo é lida  
diretamente pelo computador

# Sequência de DNA

pico – fragmento de DNA,  
cor - nucleotídeo



# **A sequência de DNA obtida é comparada com outras depositadas no GeneBank (Pubmed – ferramenta BLAST)**

**Regiões variáveis do DNAr (região ITS) ou outros genes (calmodulina,  $\beta$ -tubulina, actina, TEF-1 $\alpha$ ) podem ser utilizadas para estabelecer relações filogenéticas entre diferentes grupos fúngicos.**

- Alinhamento das seqüências (ClustalW)
- Construção de árvore filogenética (MEGA 4.0, PHILIP, ou PAUP, ARB)

## Calmodulina

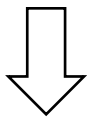
## EF1-α

Até 2007:

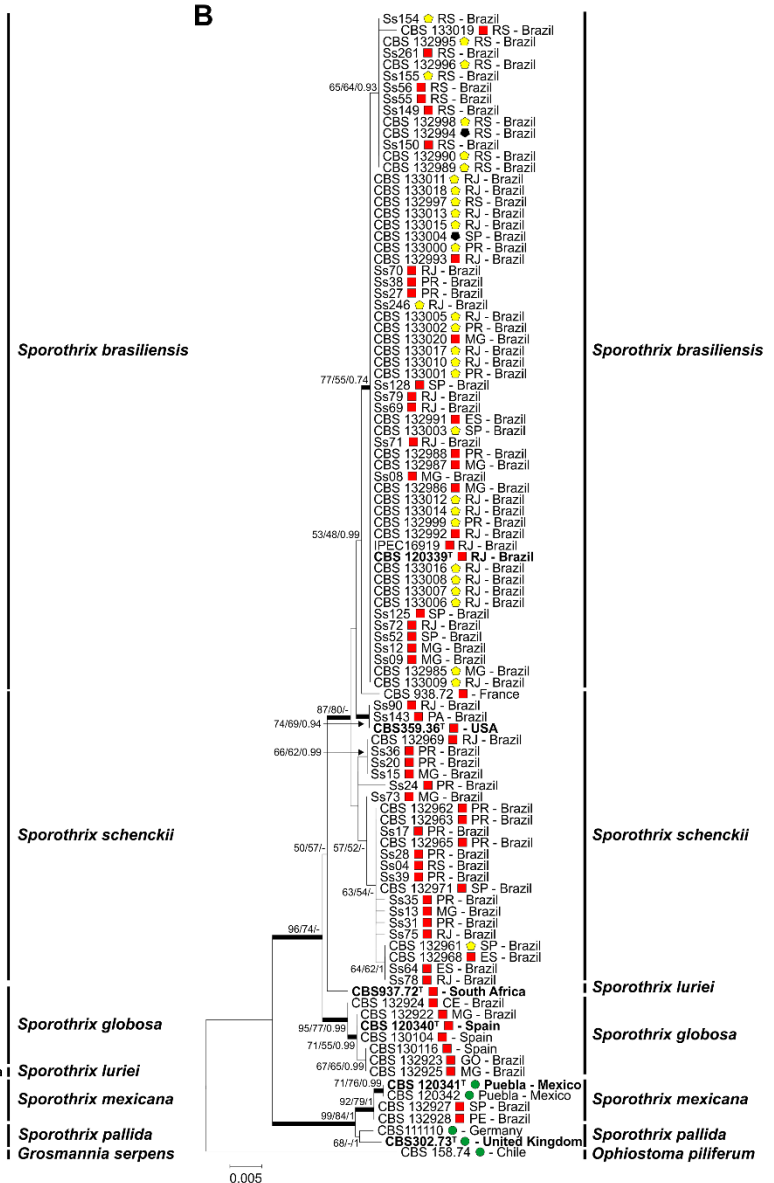
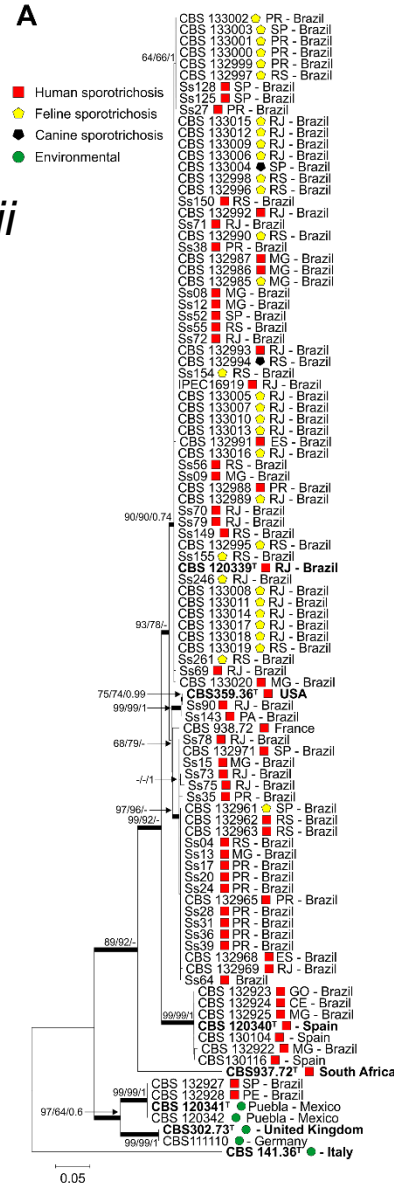
Todos isolados eram classificados como *S. schenckii*

Diferenças morfológicas sutis (colônia, micélio reprodutivo e leveduras)

**Análise molecular!**



Complexo de espécies *S. schenckii*  
7 espécies *Sporothrix*



# MALDI-TOF ICMS – gera uma “digital” do fungo

- É uma técnica moderna de espectrometria de massas.
- O que é espectrometria de massas?

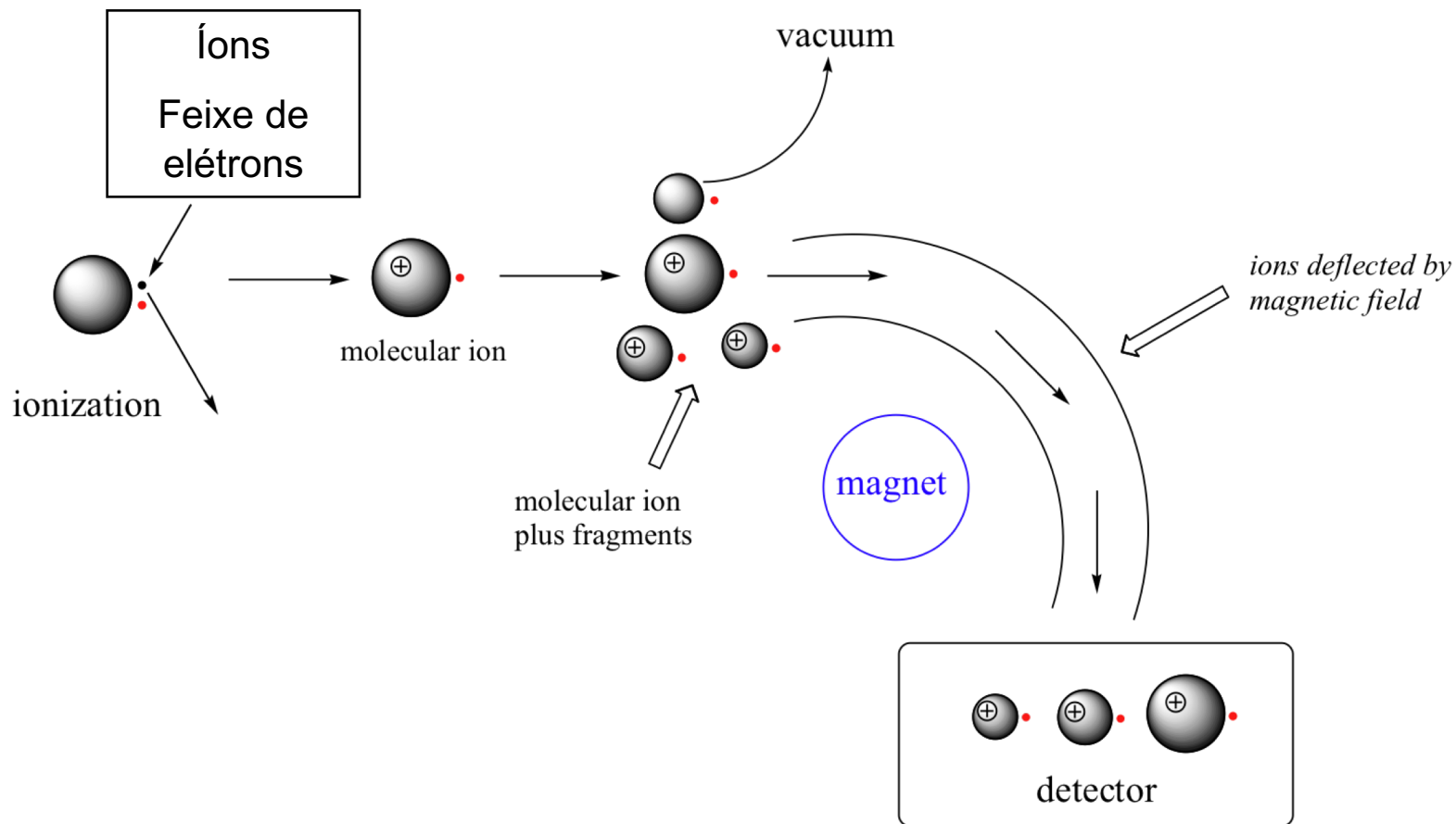
“Balança molecular”



Daltons (Da) = u =  
unidade de massa  
atômica

# O que é espectrometria de massas?

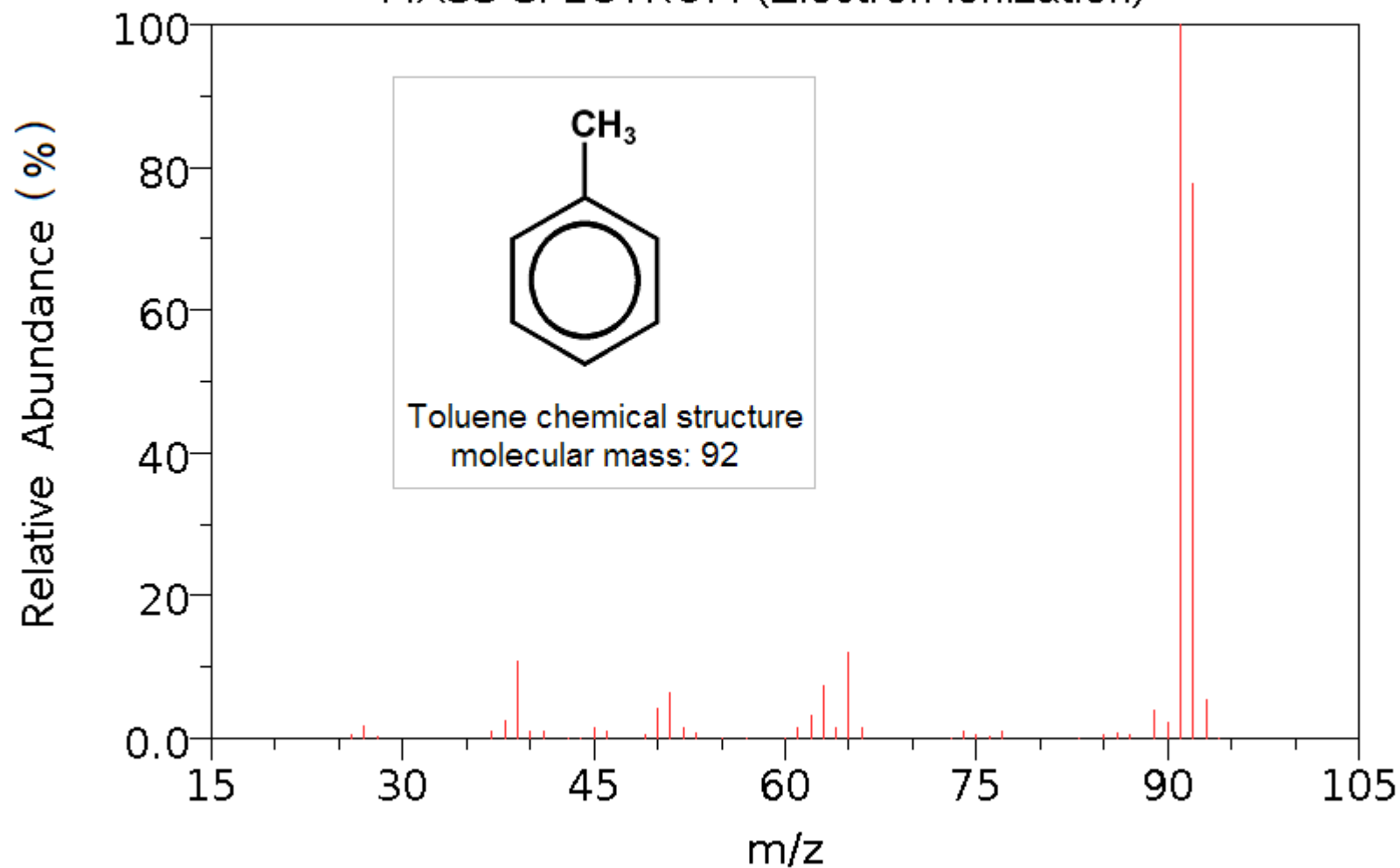
- Técnica analítica em que todos os átomos ou moléculas de uma amostra são ionizados (Feixe de íons ou elétrons) – gera fragmentos - separados de acordo com suas massas ( $m/z$ ) - detectados e quantificados.
- É uma ferramenta analítica utilizada para medir a massa molecular de uma amostra. Cada molécula possui um perfil de fragmentação.



**O campo magnético separa os íons em um padrão chamado espectro de massa.**

Toluene C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>

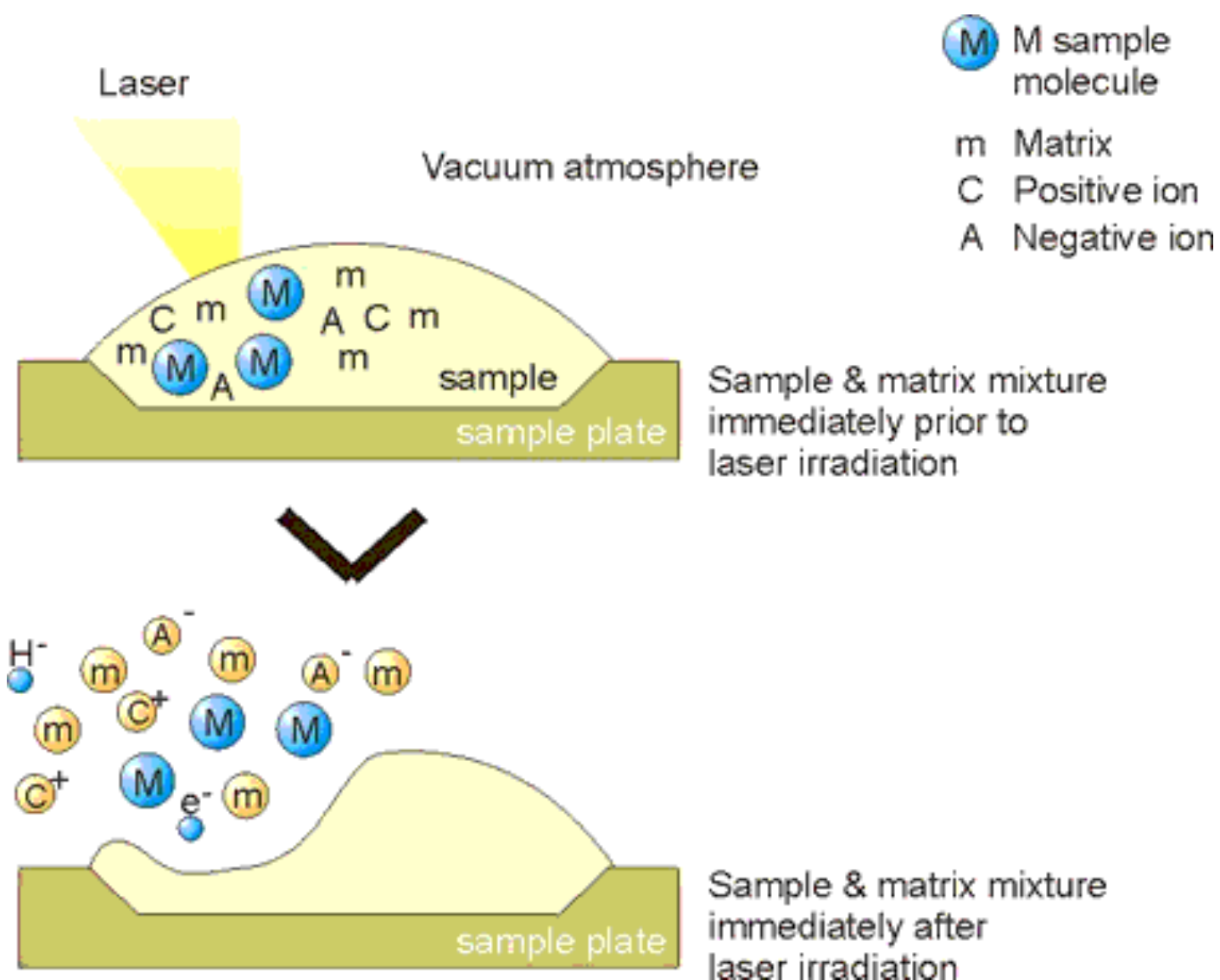
MASS SPECTRUM (Electron Ionization)



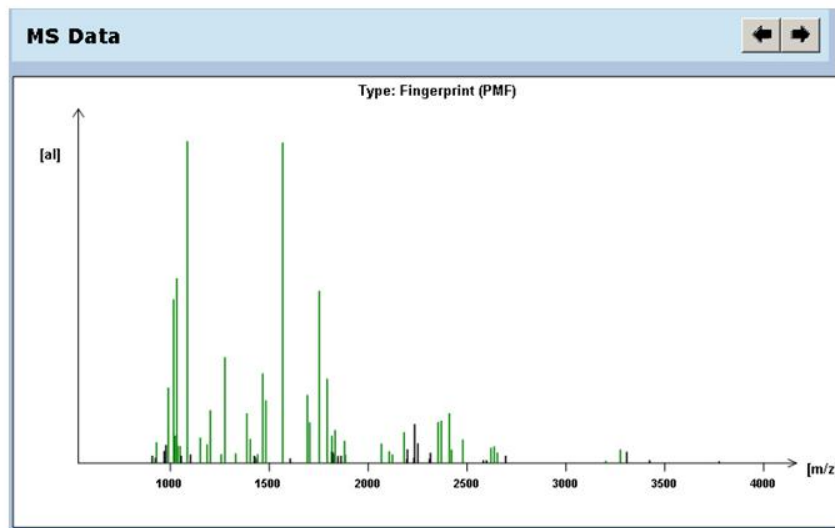
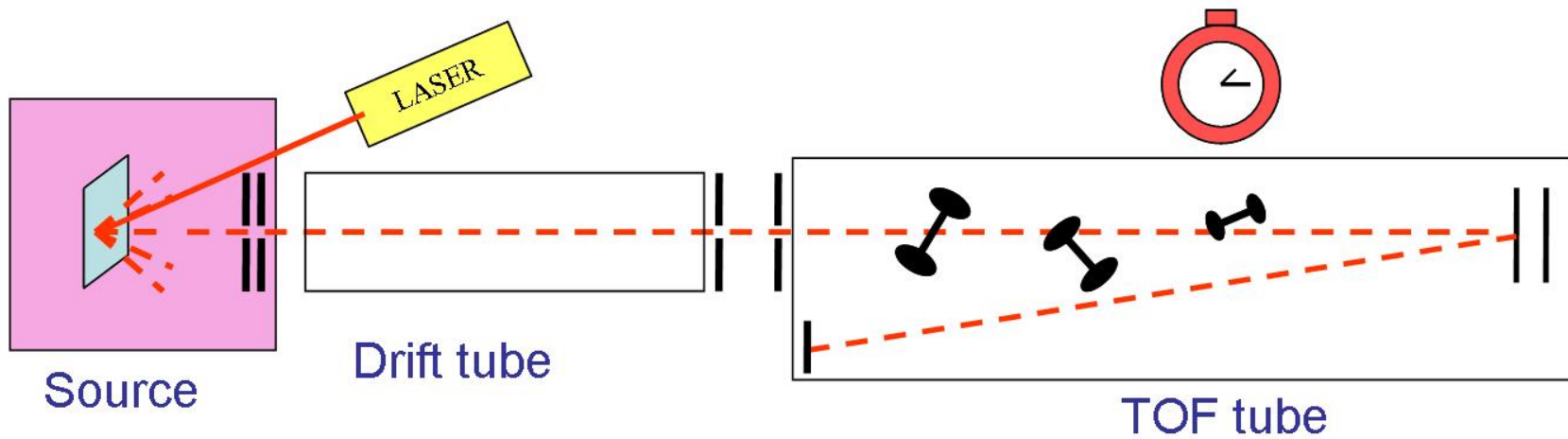
NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

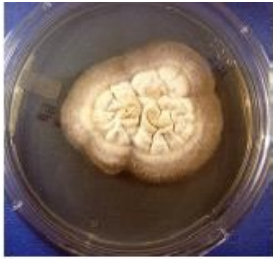
# MALDI

- ***“matrix-assisted laser desorption/ionization”***
- ***Ionização e Desabsorção a Laser Assistida por Matriz***
- Espectrometria de massa de ionização mais branda, permitindo a análise de biomoléculas (proteínas, açúcares, DNA) e moléculas orgânicas grandes
- Gera poucos fragmentos – em geral o íon molecular

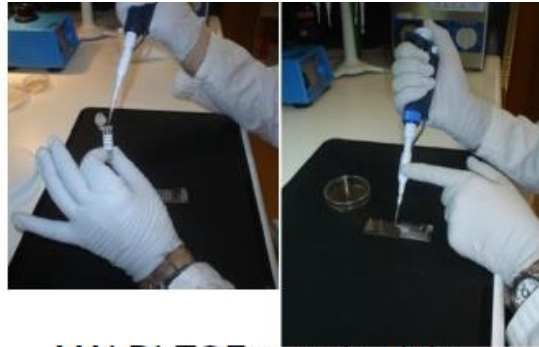


# MALDI – TOF





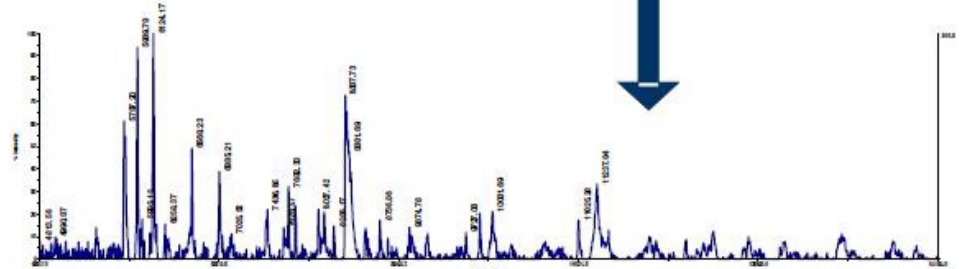
Microbial sample (1)



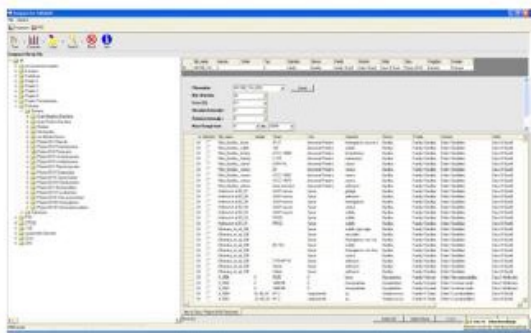
MALDI-TOF sample plate (2)



MALDI-TOF sample plate (3)



MALDI-TOF ICMS spectrum (4)



Microorganism identification on SARAMIS database (4)



Espectro de massas = digital do fungo