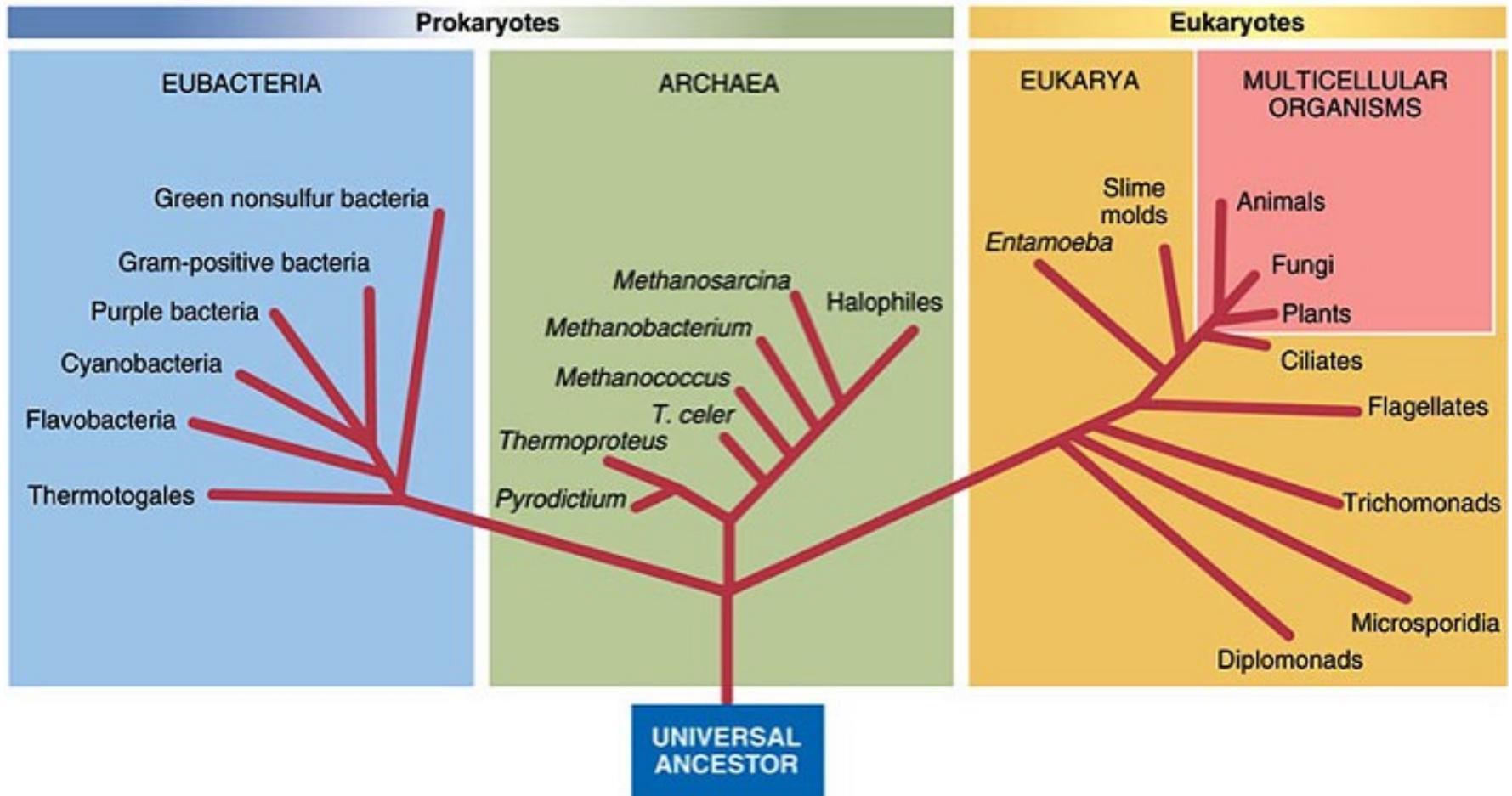


Identificação polifásica de fungos

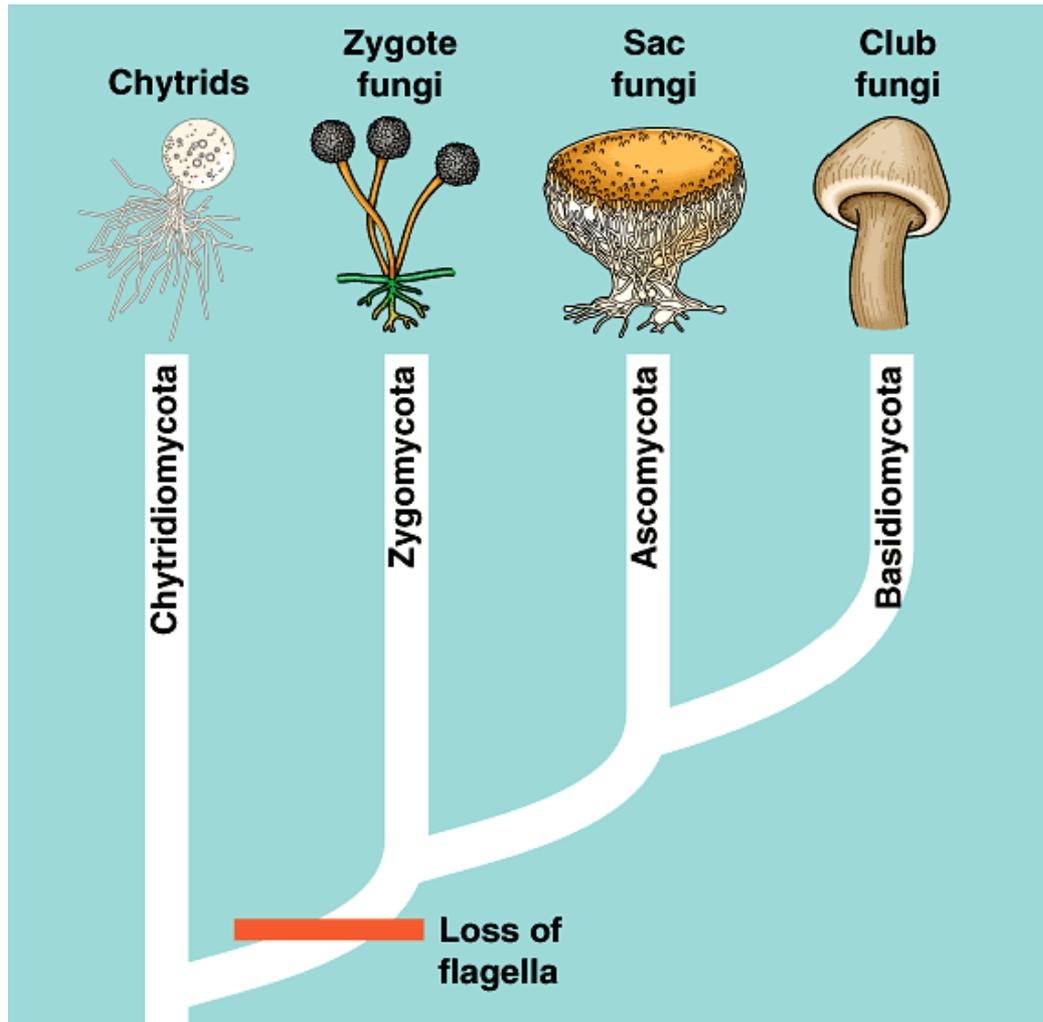
Profa. Kelly Ishida
E-mail: ishidakelly@usp.br

Woese (1977)

Baseada na sequência gênica do DNAr



4 filios:



Originados de um
único ancestral



Grupo
monofilogenético

Atualmente...classificação
está em fase de
transformação!

Identificação clássica dos fungos

Métodos Fenotípicos

- **Morfologia:**
 - Macroscópica (colônia gigante);
 - Microscópica:
 - Exame direto (KOH ou tinta nanquim);
 - Microcultivo em lâmina (azul de algodão/lactofenol).
- **Fisiologia:**
 - Auxanograma (assimilação de diferentes fontes de C e N);
 - Zimograma (fermentação de açúcares).
- **Marcadores bioquímicos** (urease).

“Polifásico”

- Colwell (1970):
 - *Polyphasic taxonomy*;
 - Classificações baseadas no consenso de todos os métodos disponíveis:
 - Fenotípicos;
 - Genotípicos (genômicos);
 - **Proteômicos.**

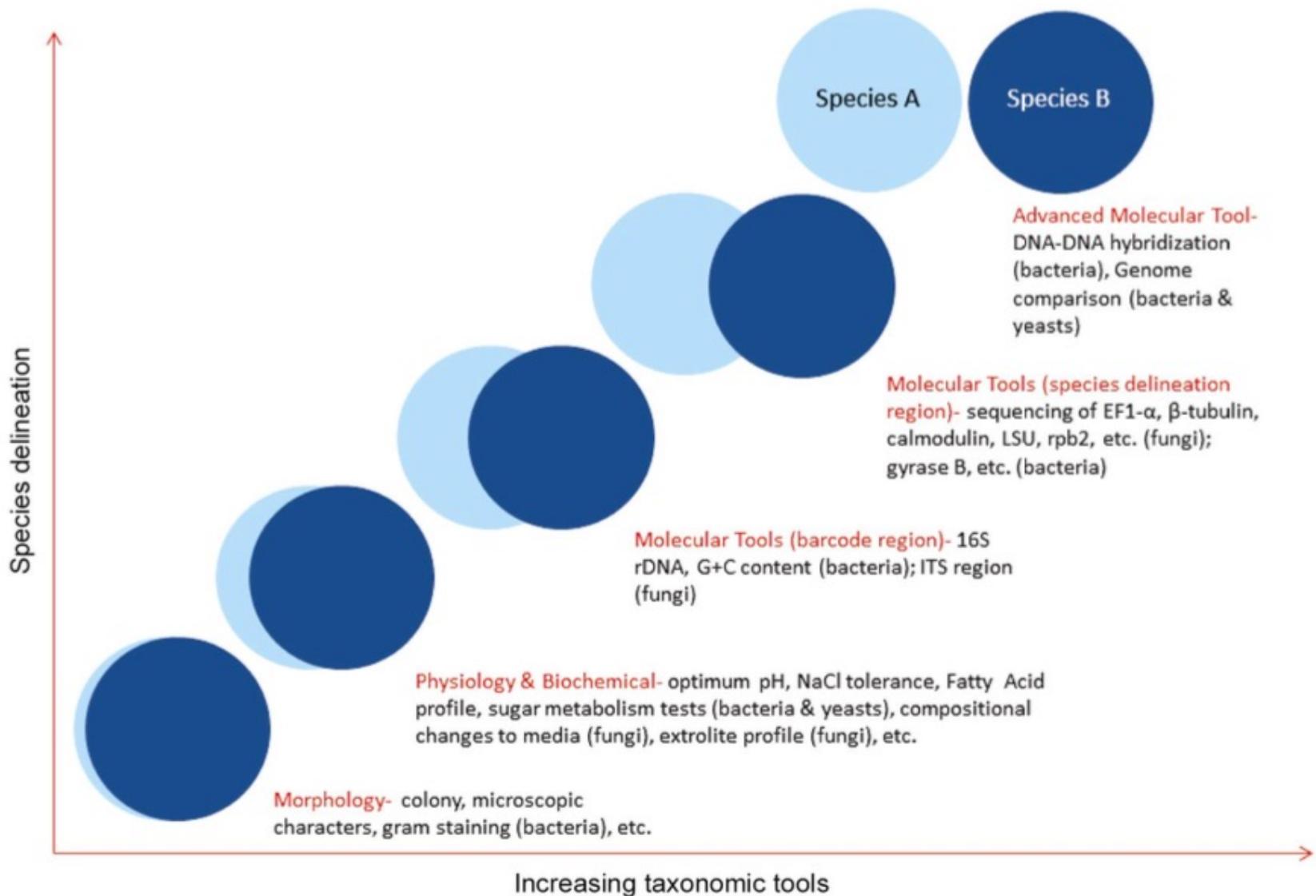


Figure 2. Different criteria used in species delineation of bacteria, archaea and fungi.

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.

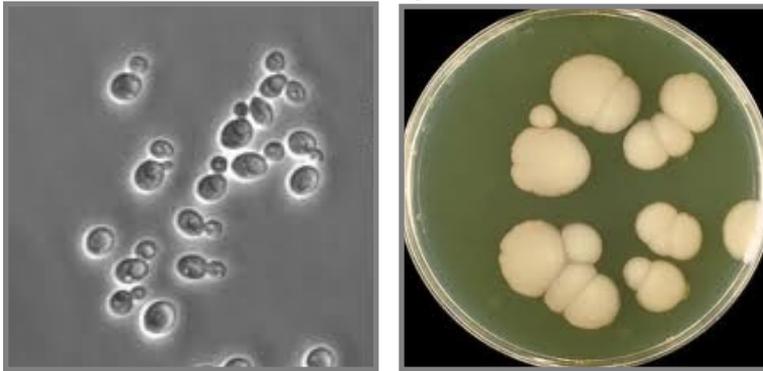
Coleta e isolamento da amostra fúngica



Morfologia

Características macroscópicas da colônia fúngica

- Unicelulares → fungos leveduriformes

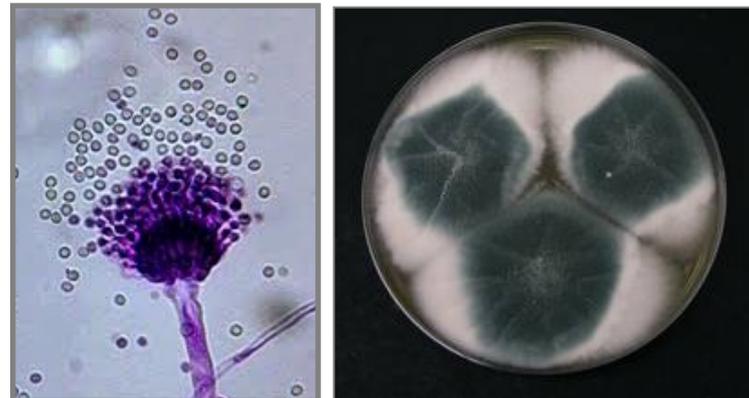


Ex. *Saccharomyces cerevisiae*

- 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

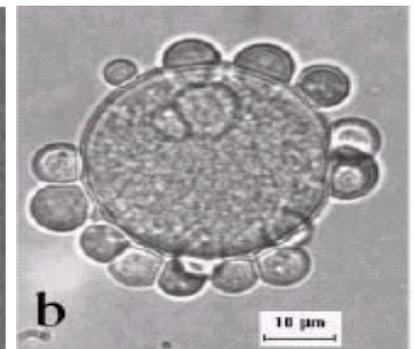
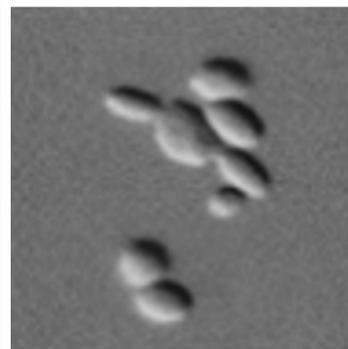
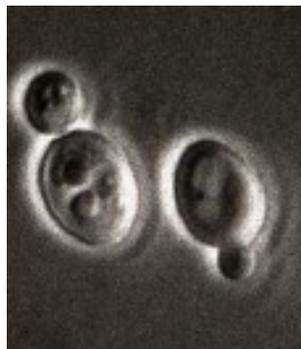
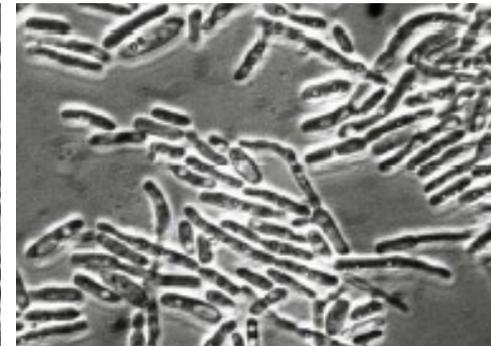
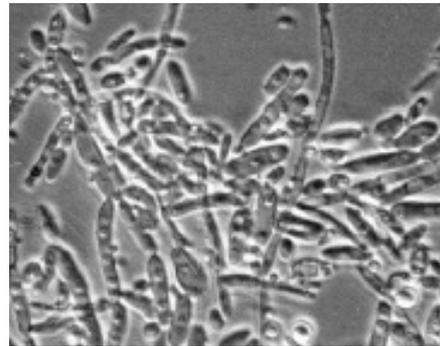
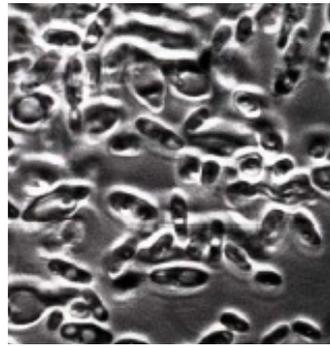
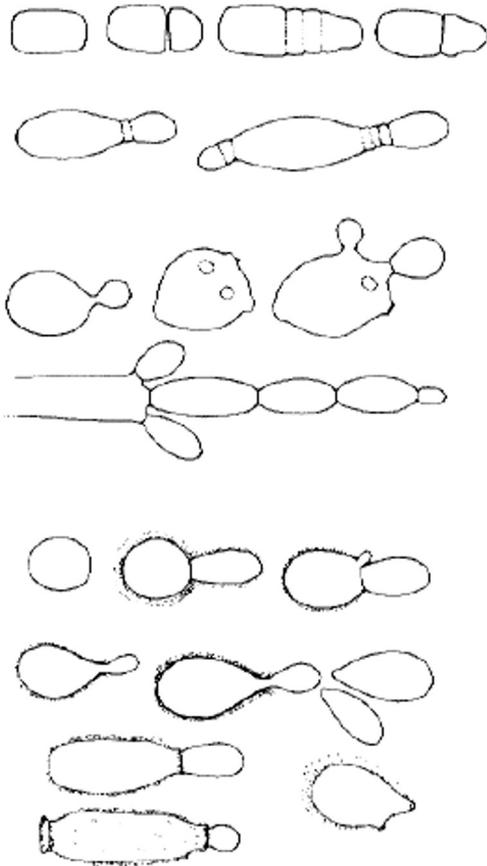


Forma, superfície, margem, coloração verso e reverso, aspecto (seco, úmido), tamanho – dependem do tempo de incubação, meio e temperatura

Morfologia

Características microscópicas dos fungos

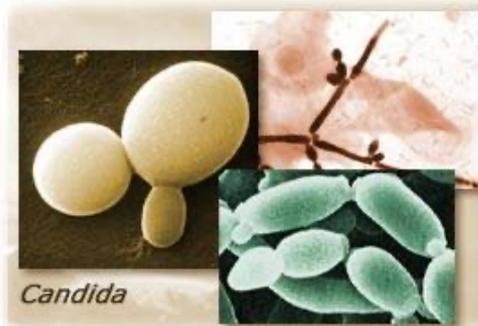
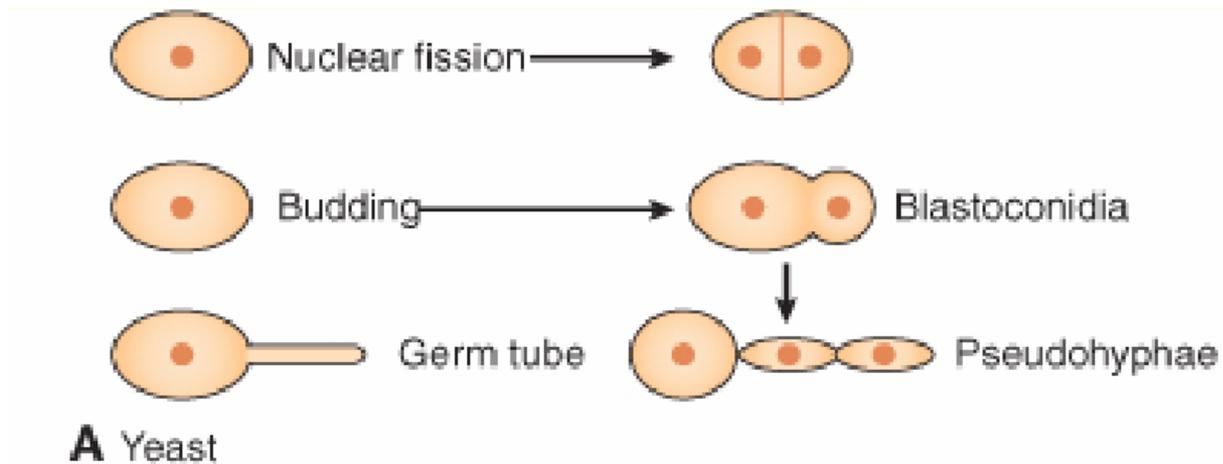
LEVEDURAS



LEVEDURAS

Reprodução assexuada – Formação Blástica

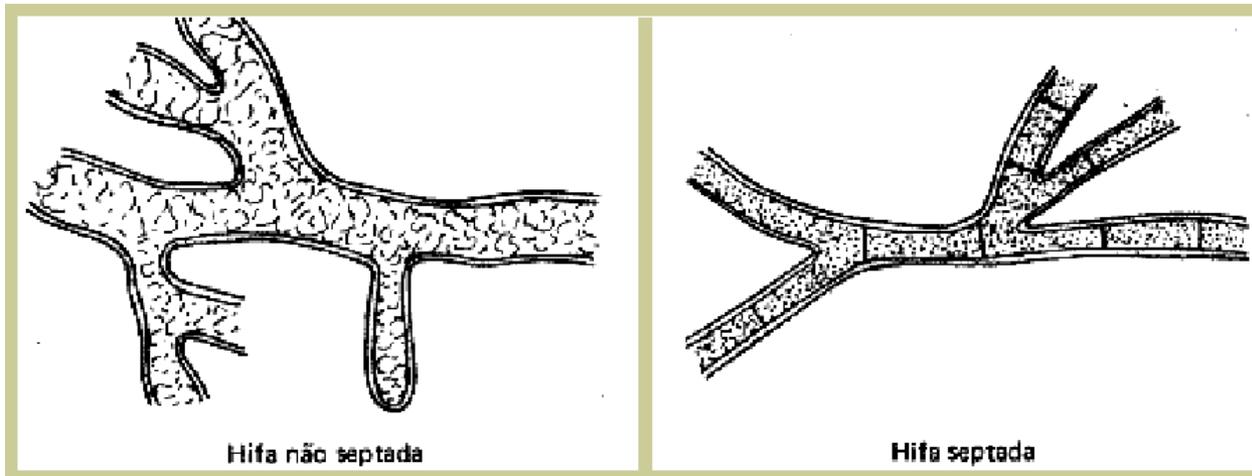
Brotamento / fissão binária



FUNGOS FILAMENTOSOS

Característica microscópica

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

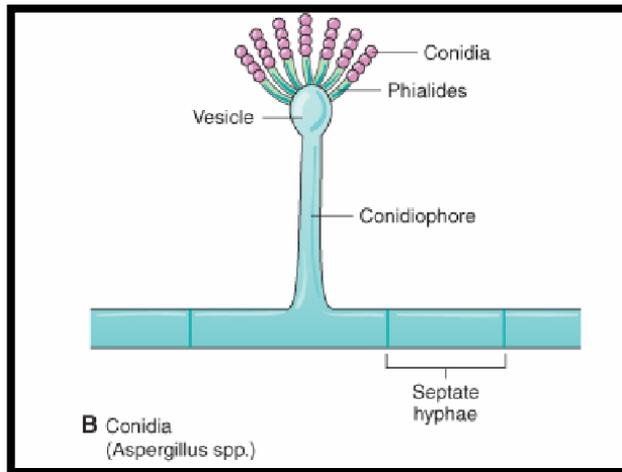


- Septadas x Não-septadas /Contínuas/Cenocíticas
- Hialino X Demáceo
- Espessa X Delgada

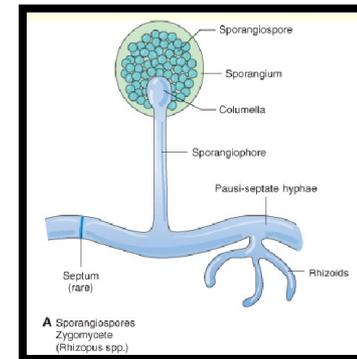
FUNGOS FILAMENTOSOS

Reprodução assexuada – Micélio reprodutivo

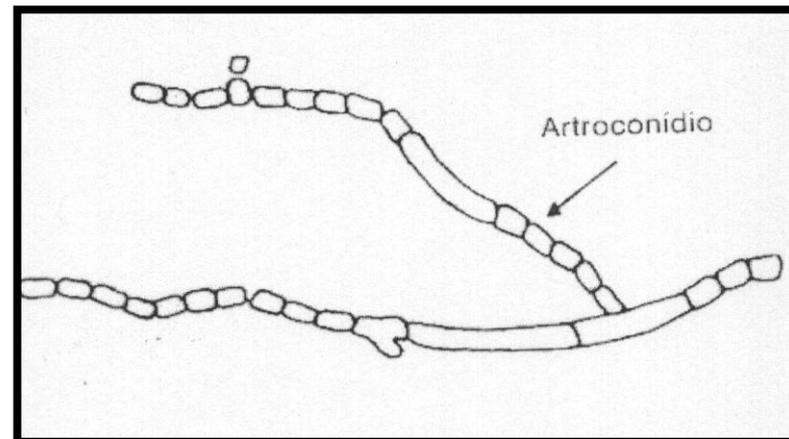
- Formação Blástica (Ascomicetos)



- Formação de Esporângios (Zigomicetos)



- Formação Tática
Arthroconídios



Testes Bioquímicos

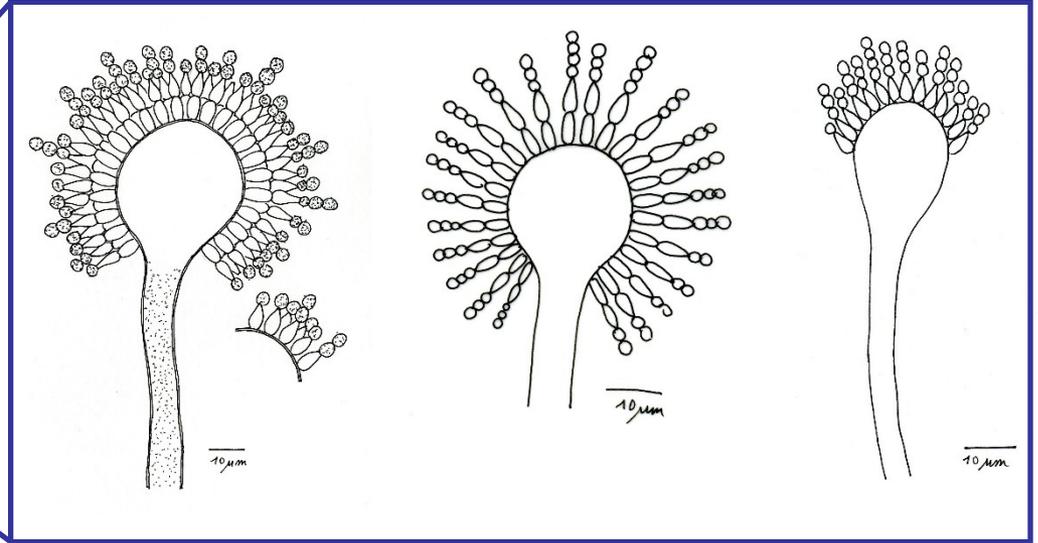
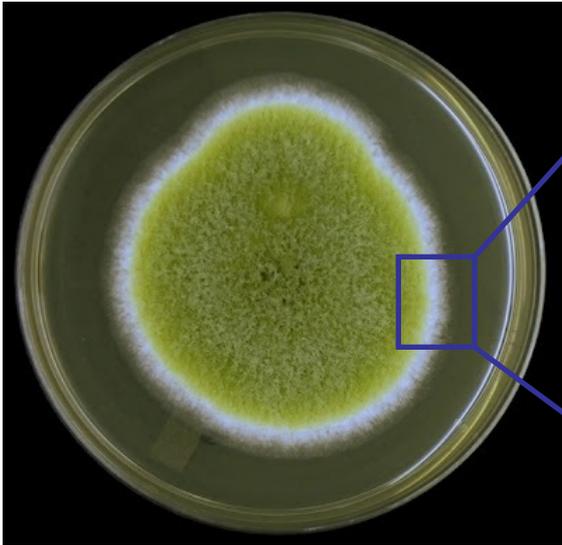
- Urease
- Auxanograma – assimilação de fontes de carbono e nitrogênio
- Zimograma – fermentação de açúcares

Identificação clássica de fungos

Fungos Filamentosos – aspectos morfológicos e **alguns** testes bioquímicos (Ex. urease)

Leveduras – aspectos morfológicos e testes bioquímicos

Identificação clássica de fungos – uso de chaves de identificação



Diferenças morfológicas extremamente difíceis de serem detectadas

Muitas espécies
possuem
morfologia similar



**Identificação
molecular**

Identificação fenotípica

- Desvantagens e dificuldades:
 - 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



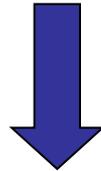
Genes: DNAr (ITS), TEF-1,
Calmodulina, Tubulina



**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

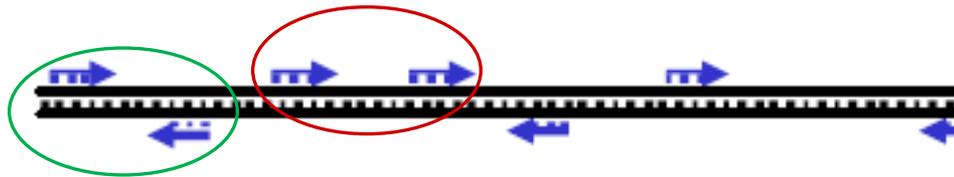


- **Construção de mapa genético**
- **Detecção de variabilidade**
 - **Digital Genômica**

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

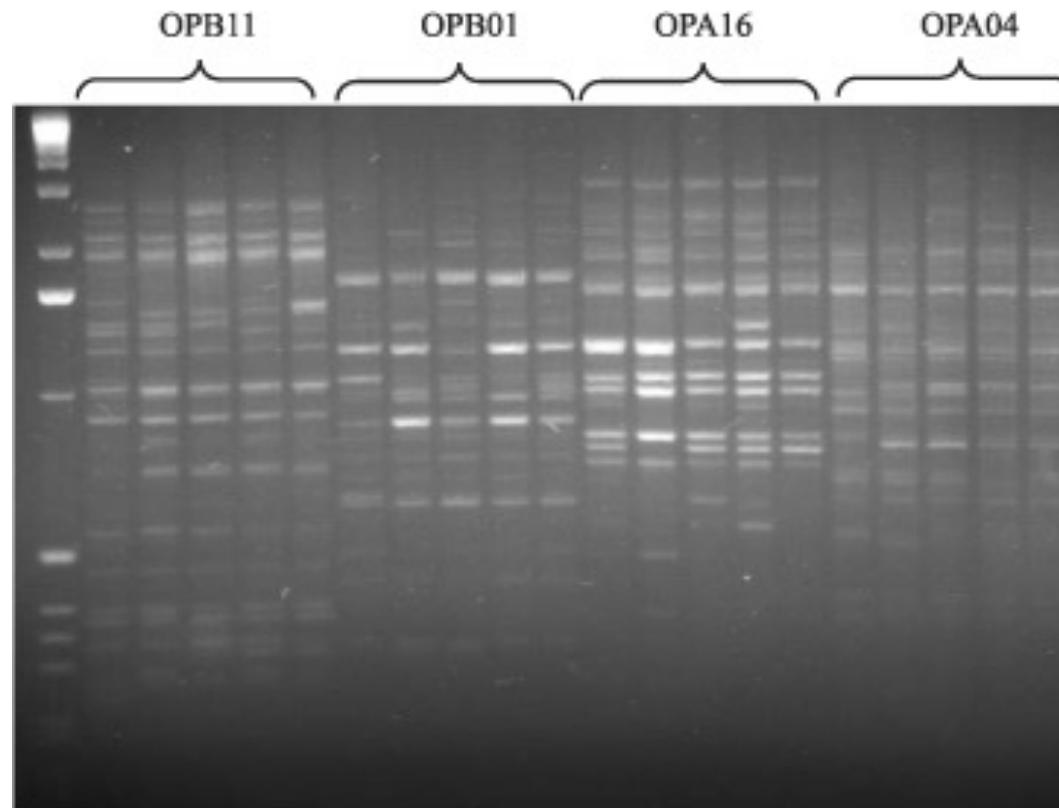


Figura 1. Triagem de oligonucleotídeos iniciadores mostrando diferentes padrões de amplificação.

Como avaliar?

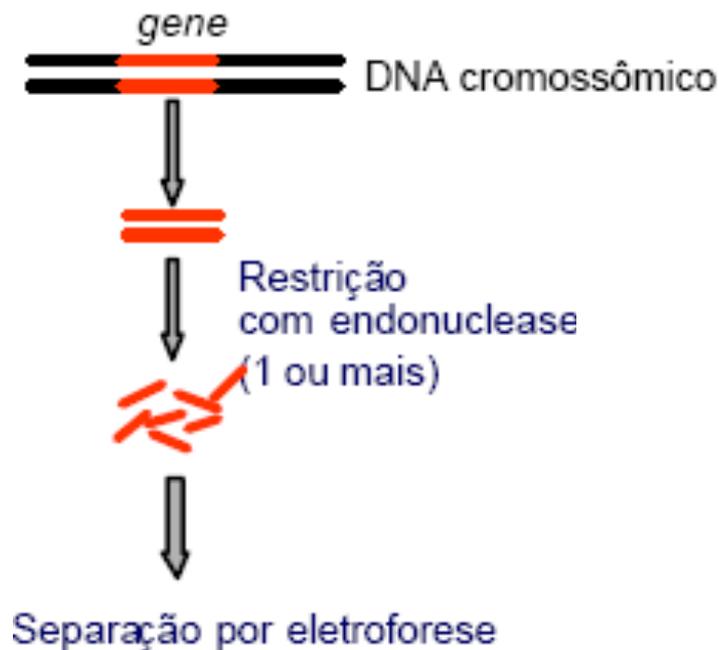
Similaridade das bandas

Construção de um dendograma

Uso de programas de computador

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).

Exemplo: Tipagem molecular de *C. neoformans*

2,3 e 4 – VNI

5 e 6 - VNII

PCR: Primer GACA

Primer 6-RAPD

PLB1-RFLP

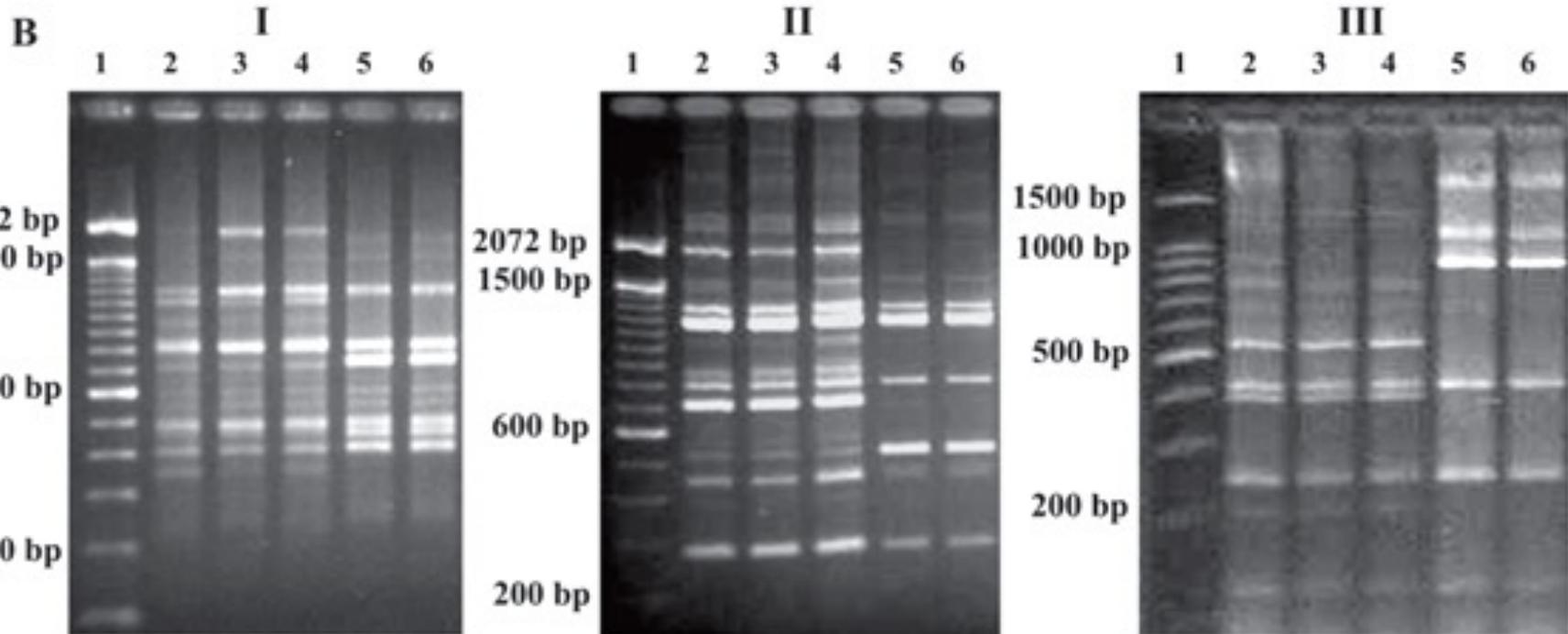


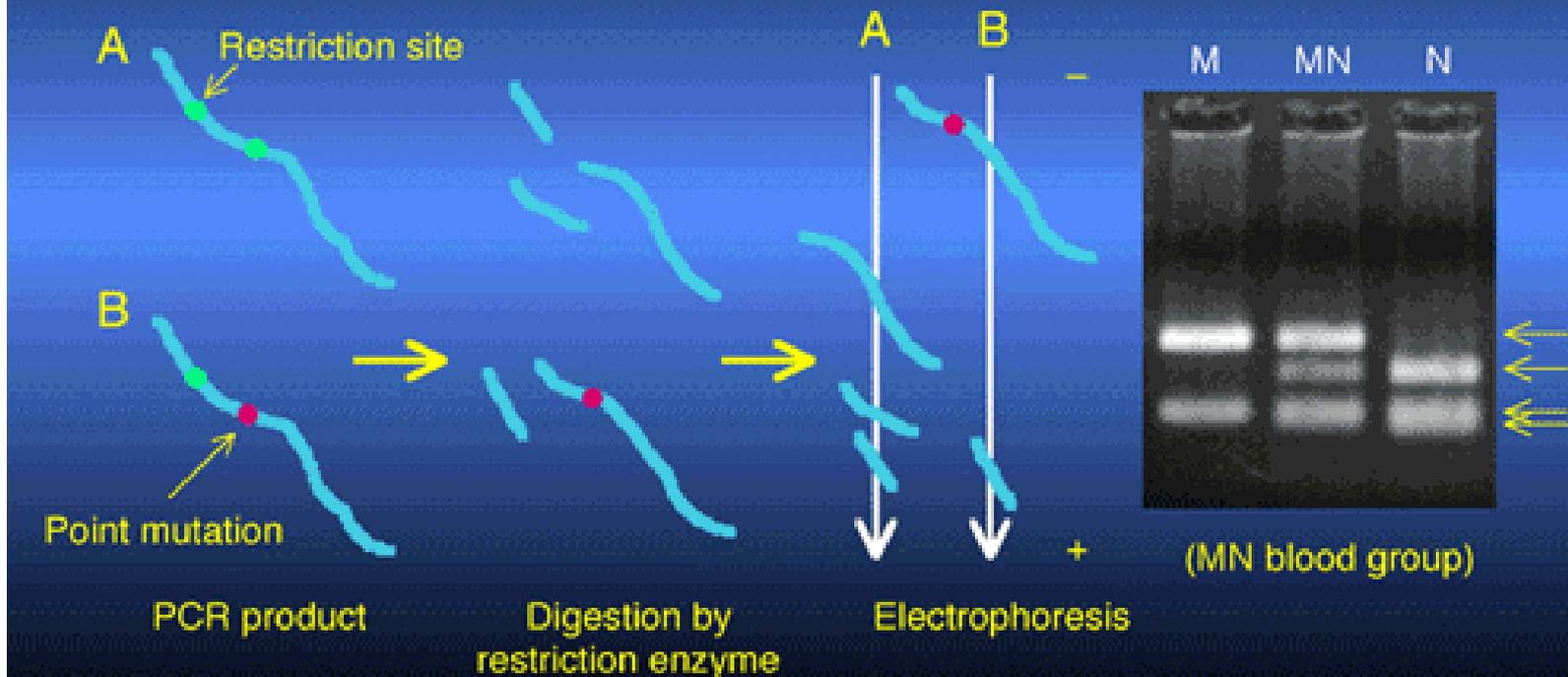
Fig. 2 - A. PCR fingerprinting with primer (GACA)₄ (AI) and PLB1-RFLP with *Ava*I (AII) patterns of *C. neoformans*. Lane 1*, molecular weight marker; 2-5, molecular types VNI, VNII, VNIII, VNIV; 6-9, molecular types VGI, VGII, VGIII, VGIV – **B.** Representative gel of (GACA)₄-PCR fingerprinting (BI), 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)₄-PCR fingerprinting (AI and BI) and Primer 6-RAPD (BII). Molecular weight marker (Promega 100bp) to the PLB1-RFLP (AII and BIII).

Detecção de mutação no gene de interesse

Analysis of DNA polymorphism (6)

PCR (4)

Restriction fragment length polymorphism (RFLP)



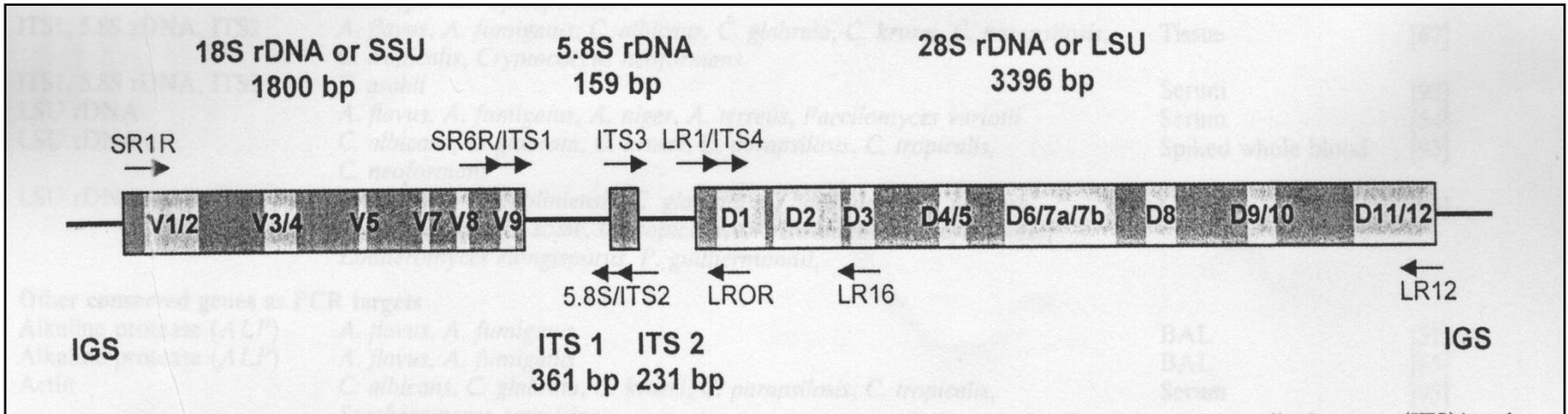
- **PCR específico**

- **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

Representação esquemática do rDNA

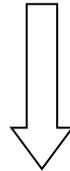


Taxonomia de Fungos

Filogenia



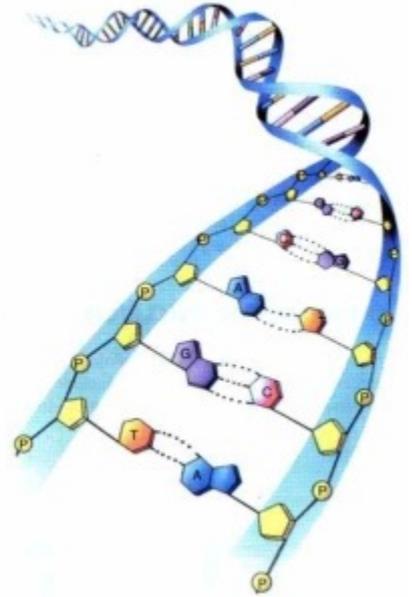
**Sequenciamento do
DNA**



Determinar sequência de nucleotídeos do DNA



**Seqüenciamento de rDNA (ITS), TEF-1 α , calmodulina e β -tubulina
(genes “keephousing”)**

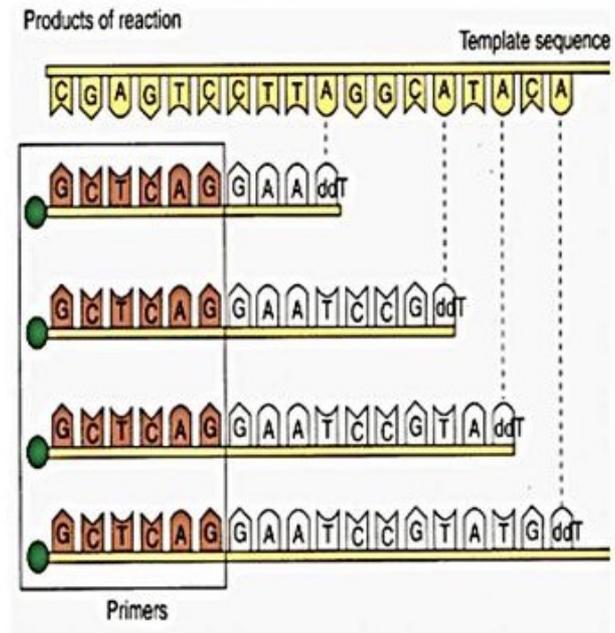
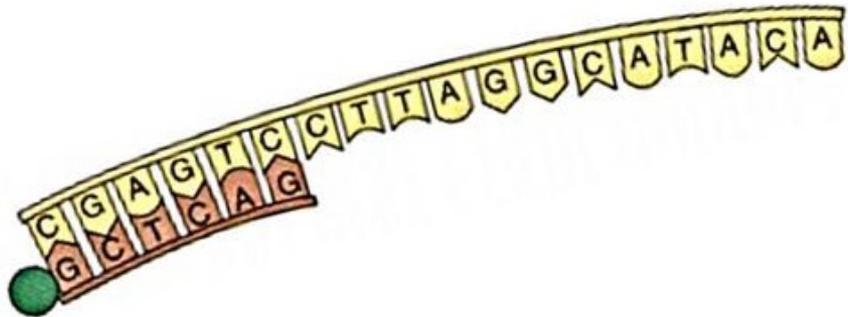


Sequenciamento de DNA

Método de Sanger

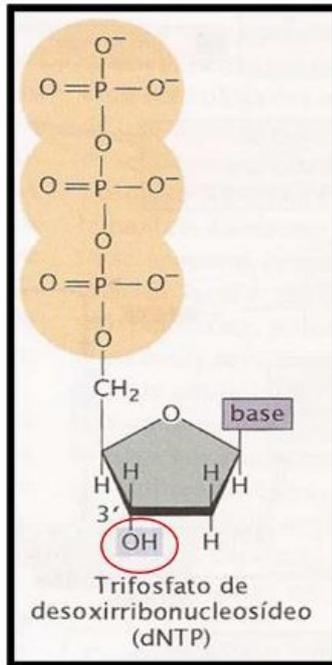
Método de Didesóxinucleotídeos ou Terminação em Cadeia

Descrito por Sanger et al., 1977

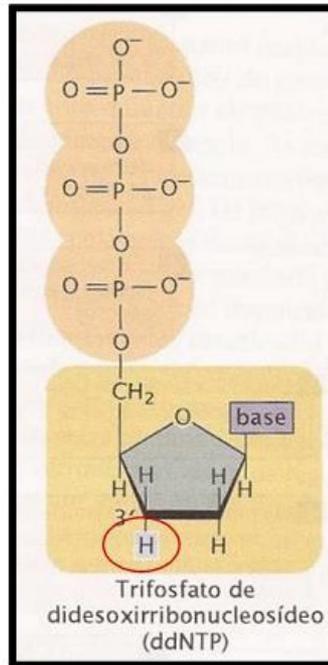


Método de Sanger

- ✓ Substrato especial para síntese de DNA



LIGAÇÃO FOSFODIESTER



Finalizam a síntese de DNA

ddNTP

- ✓ São incorporados na cadeia crescente de DNA

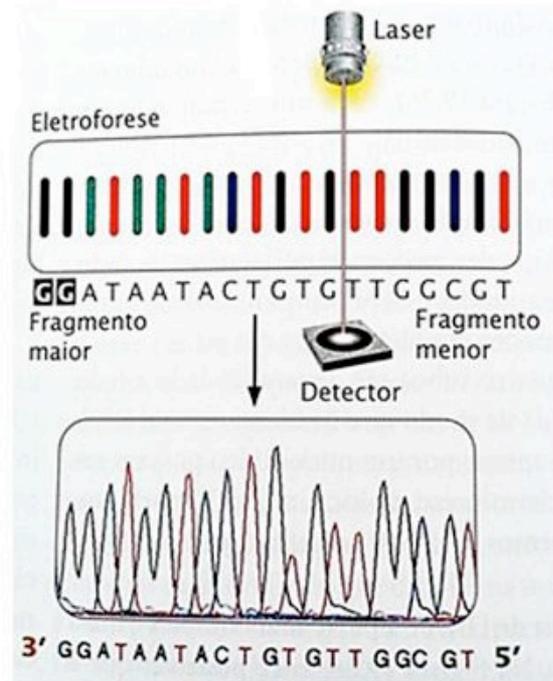
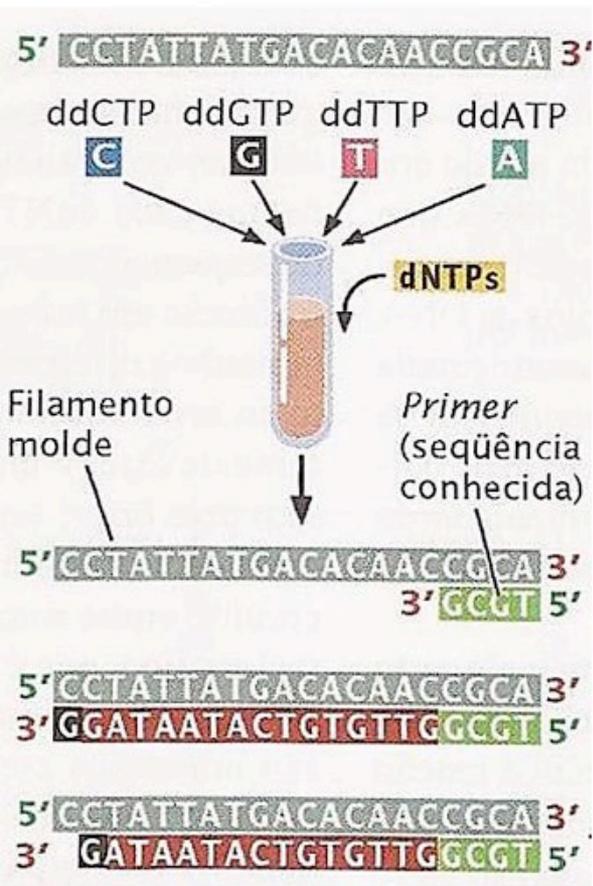


- ✓ Nenhum outro dNTP é adicionado



~~LIGAÇÃO FOSFODIESTER~~

Reação de sequenciamento baseada no Método de Sanger



Eletroforese

fragmentos migram de acordo com seu tamanho



O corante fluorescente no DNA é detectado

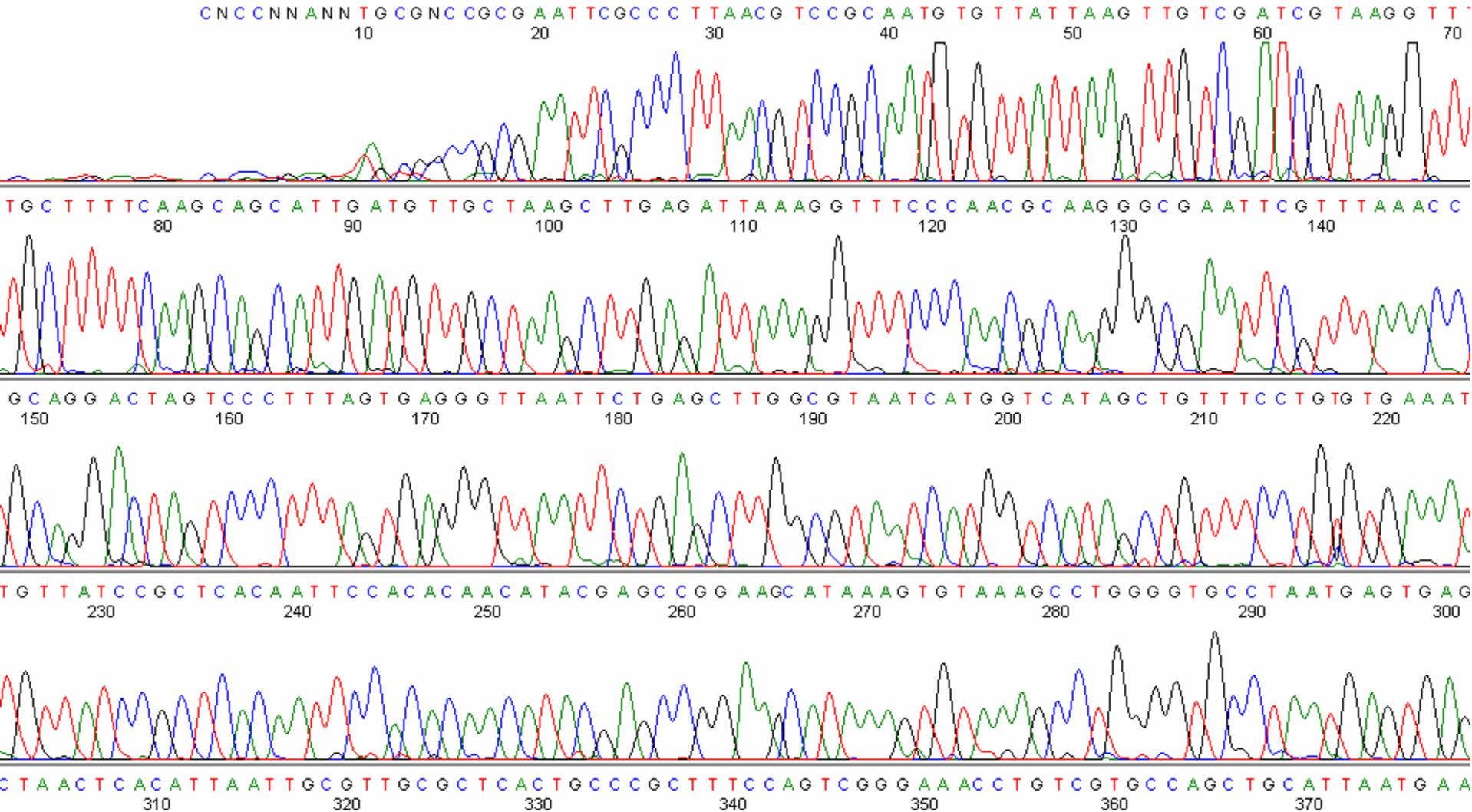


Cada fragmento aparece como um pico, sendo que a cor do pico indica a base representada

Seqüência complementar a seqüência 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, β -tubulina, actina, TEF-1 α) podem ser utilizadas para estabelecer relações filogenéticas entre diferentes grupos fúngicos.

- Alinhamento das seqüências (ClustalW ou MUSCLE)
- Construção de árvore filogenética (MEG-X, PHILIP, ou PAUP, ARB)

Calmodulina

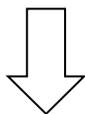
EF1-α

Até 2007:

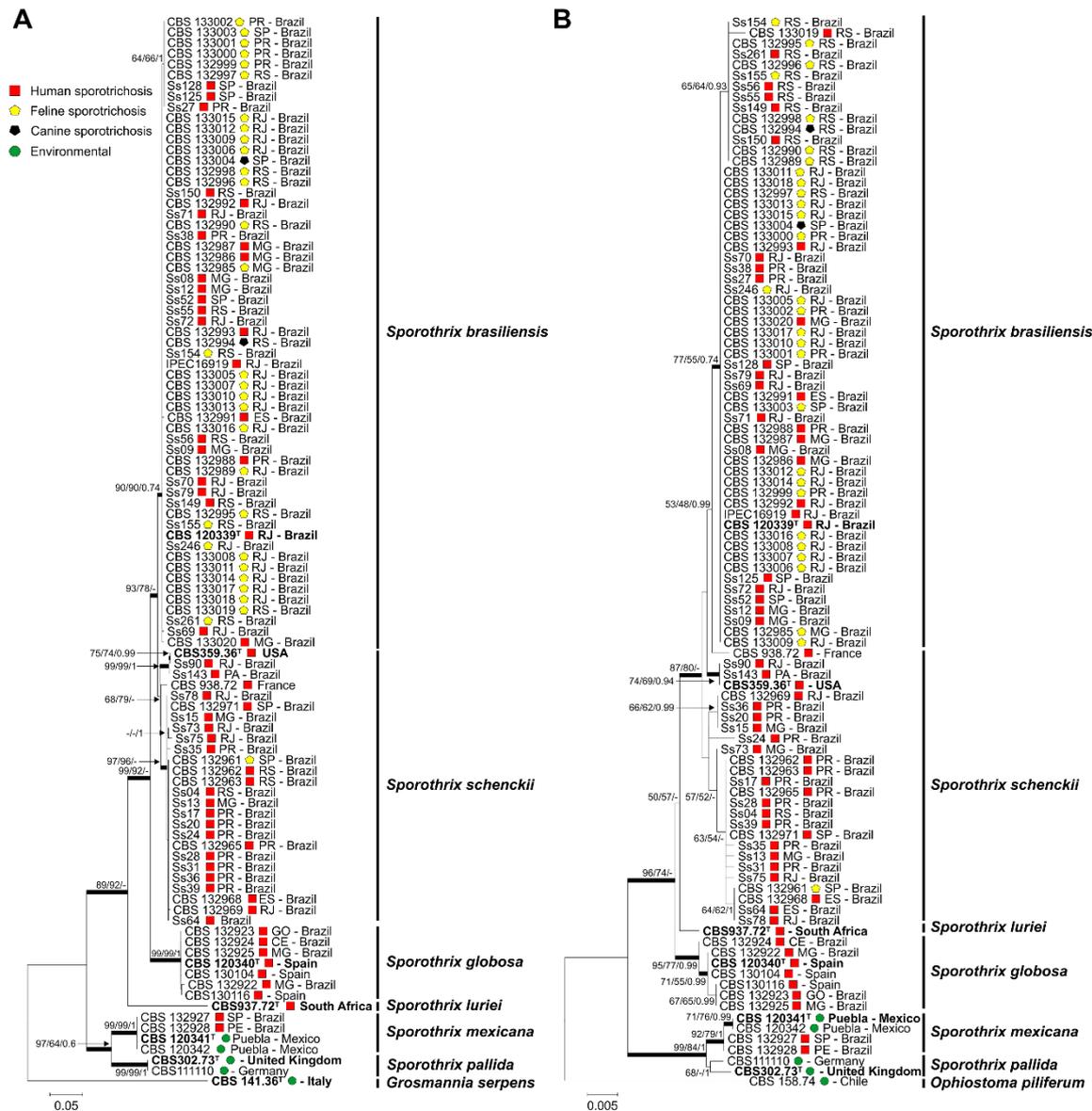
Todos isolados eram classificados como *S. schenckii*

Diferenças morfológicas sutis (colônia, micélio reprodutivo e leveduras)

Análise molecular!



Sporothrix spp.



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

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

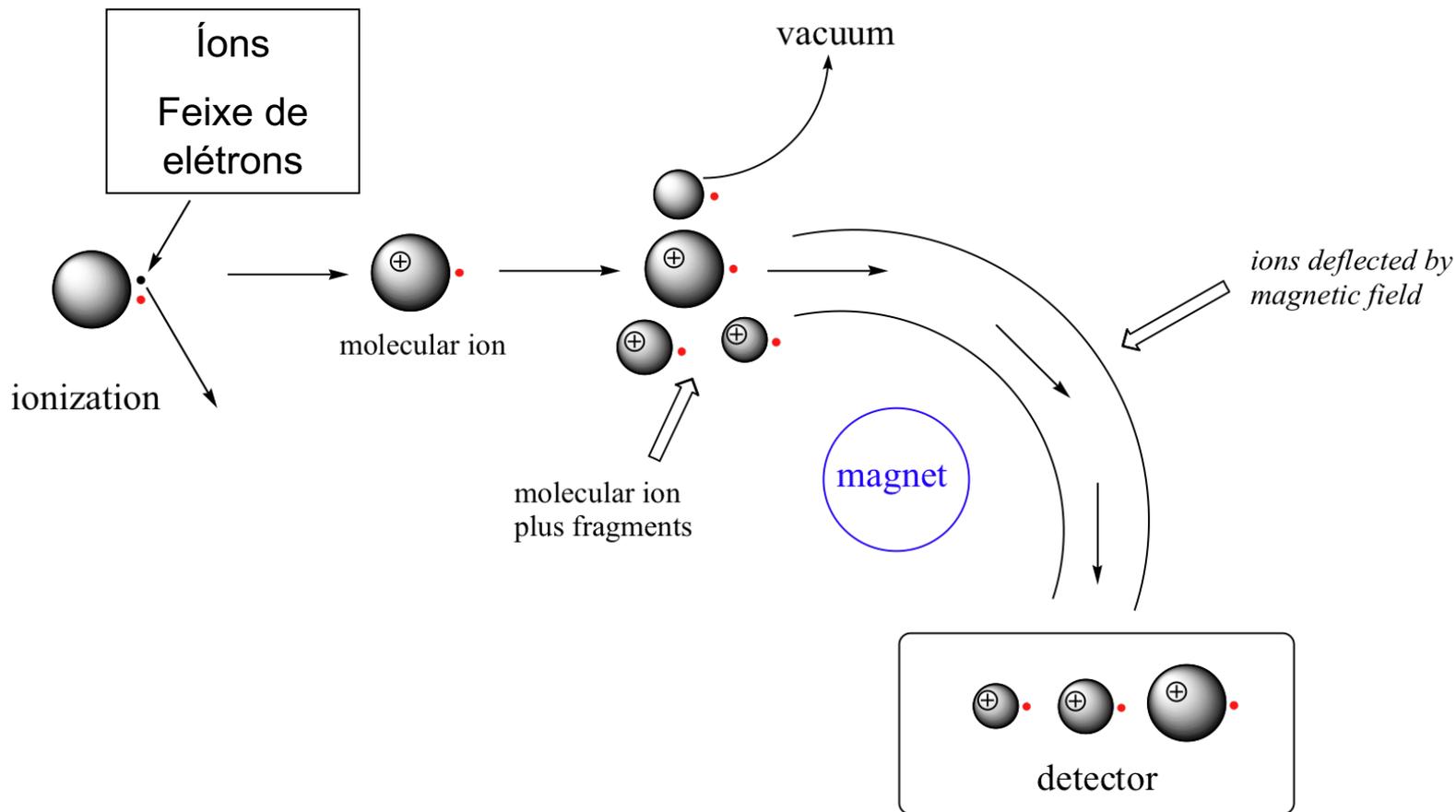
“Balança molecular”



Daltons (Da) = u =
unidade de massa
atômica

O que é espectrometria de massas?

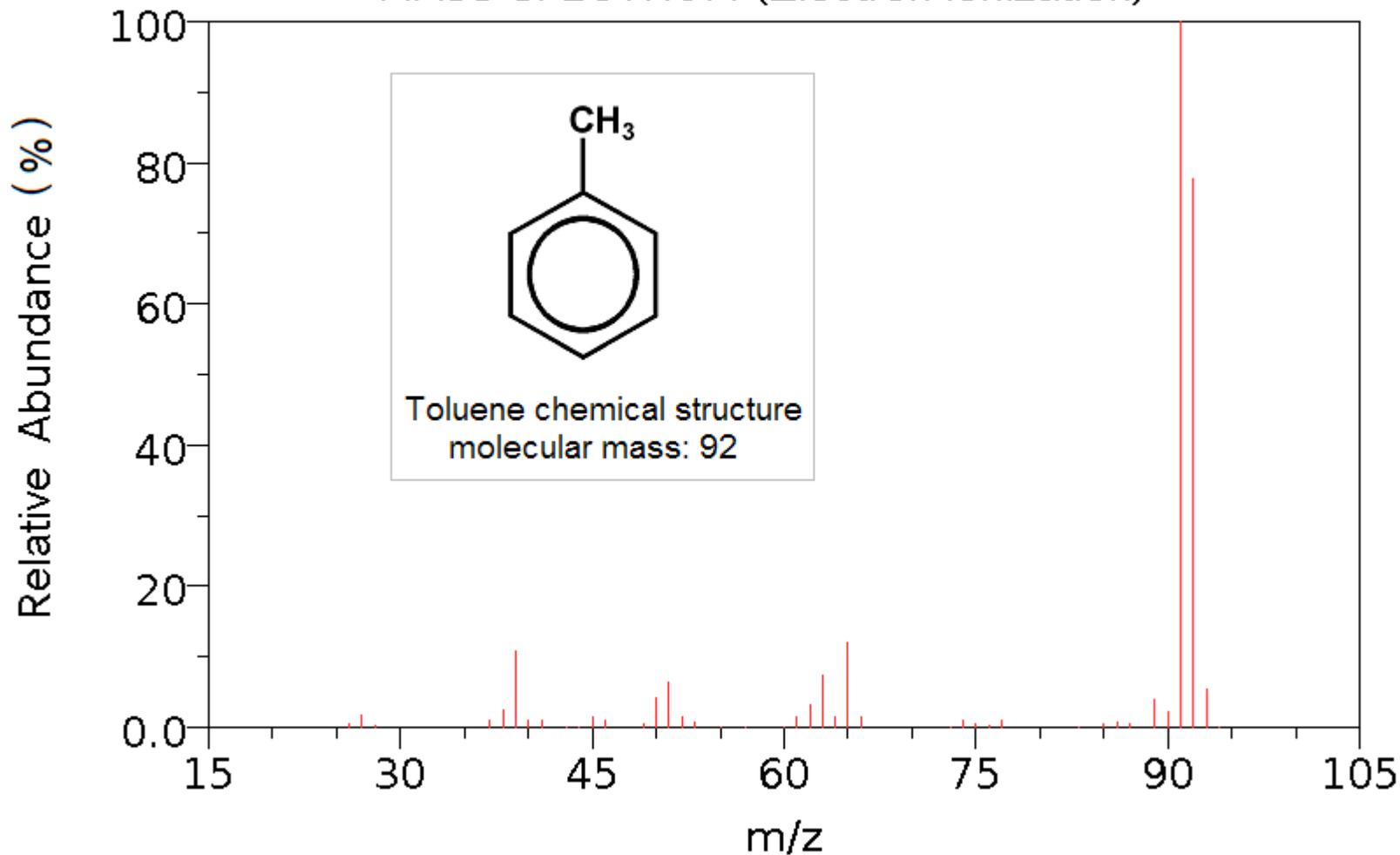
- Técnica analítica em que todos os átomos ou moléculas de uma amostra são ionizados (Feixe de íons ou elétrons) – gera fragmentos - separados de acordo com suas massas (m/z) - detectados e quantificados.
- É uma ferramenta analítica utilizada para medir a massa molecular de uma amostra. Cada molécula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



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

Toluene C₇H₈

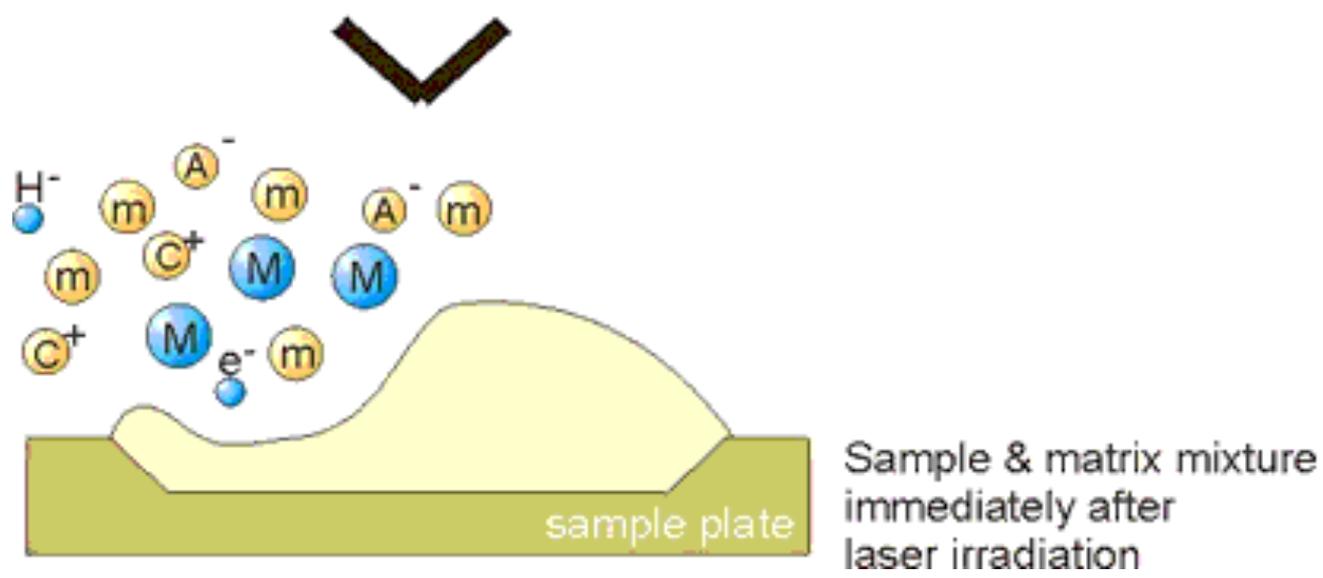
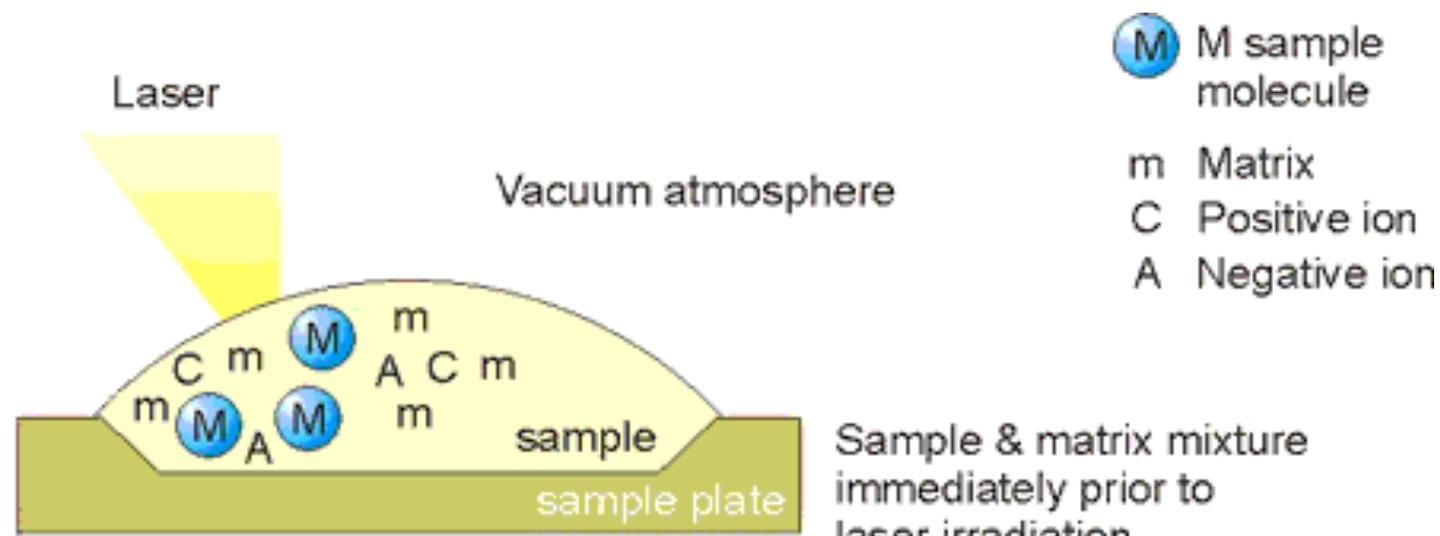
MASS SPECTRUM (Electron Ionization)



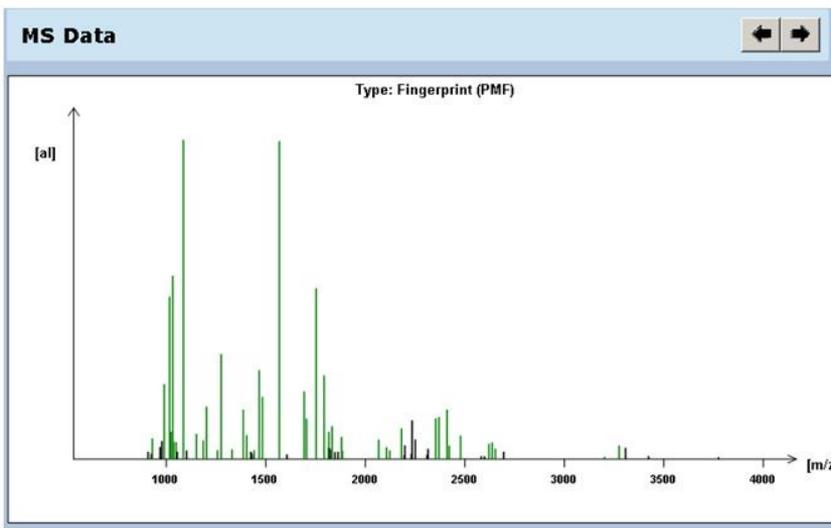
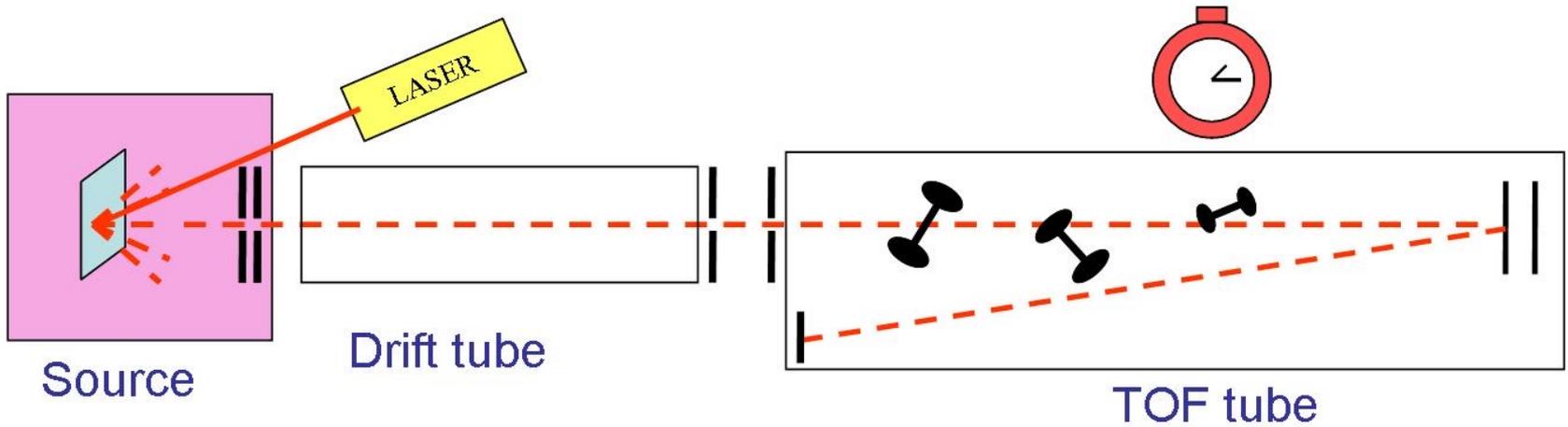
NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

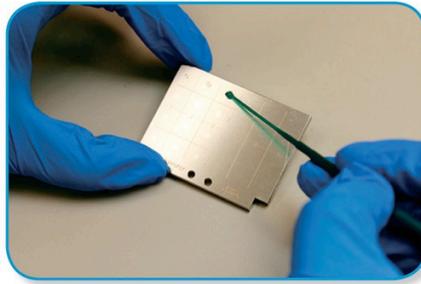
MALDI

- ***“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





**Add Formic Acid
and Matrix and Dry**



Not occupied
 Prepared
 Aborted
 Measured
 Zeroline spectrum
 Measured, classified green
 Measured, classified yellow
 Measured, classified red
 Zeroline spectrum, not classified

ID	Position	Detected Species	Score
BTS	A1	Escherichia coli	2.375
POS CONT	A2	Candida krusei	2.308
NEG CONT	A3	no peaks found	
5902095623	A4	Candida parapsilosis	2.218



**Mayo Clinic
Laboratory Services Report**

MICROBIOLOGY

Fungal Culture, Routine FINAL 07/25/2012 14:42 MCR

CANDIDA PARAPSILOSIS Many
Identified by mass spectrometry.

MCR Mayo Clinic Dept. of Laboratory Medicine and Pathology, 200 First Street SW, Rochester, MN 55905 Franklin K. Cockerill, M.D., Lab Director



Espectro de massas
Digital do fungo



Candida auris: A drug-resistant germ that spreads in healthcare facilities

Candida auris (also called *C. auris*) is a fungus that causes serious infections. Patients with *C. auris* infection, their family members and other close contacts, public health officials, laboratory staff, and healthcare workers can all help stop it from spreading.

Why is *Candida auris* a problem?



It causes serious infections. *C. auris* can cause bloodstream infections and even death, particularly in hospital and nursing home patients with serious medical problems. More than 1 in 3 patients with invasive *C. auris* infection (for example, an infection that affects the blood, heart, or brain) die.



It's often resistant to medicines. Antifungal medicines commonly used to treat *Candida* infections often don't work for *Candida auris*. Some *C. auris* infections have been resistant to all three types of antifungal medicines.



It's becoming more common. Although *C. auris* was just discovered in 2009, it has spread quickly and caused infections in more than a dozen countries.



It's difficult to identify. *C. auris* can be misidentified as other types of fungi unless specialized laboratory technology is used. This misidentification might lead to a patient getting the wrong treatment.



It can spread in hospitals and nursing homes. *C. auris* has caused outbreaks in healthcare facilities and can spread through contact with affected patients and contaminated surfaces or equipment. Good hand hygiene and cleaning in healthcare facilities is important because *C. auris* can live on surfaces for several weeks.

<http://www.cdc.gov/>

- Recomendações do CDC:
 - Notificação
 - **Diagnóstico** —
 - MALDI-TOF pode diferenciar *C.auris*
 - *Métodos moleculares*: Sequenciamento da região D1-D2 (ITS) do 28s rDNA
 - Controle de Infecção
 - Desinfecção do ambiente

Reclassification of the *Candida haemulonii* Complex as *Candida haemulonii* (*C. haemulonii* Group I), *C. duobushaemulonii* sp. nov. (*C. haemulonii* Group II), and *C. haemulonii* var. *vulnera* var. nov.: Three Multiresistant Human Pathogenic Yeasts

E. Cendejas-Bueno,^a A. Kolecka,^b A. Alastruey-Izquierdo,^a B. Theelen,^b M. Groenewald,^b M. Kostrzewa,^c M. Cuenca-Estrella,^a A. Gómez-López,^a and T. Boekhout^{b,d}

Servicio de Micología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda (Madrid), Spain^a; CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Yeast and Basidiomycete Research, Utrecht, The Netherlands^b; Bioanalytical Development, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany^c; and Department of Internal Medicine and Infectious Diseases, University Medical Center, Utrecht, The Netherlands^d

- **Complexo de espécies *Candida haemulonii***
 - *C. haemulonii*
 - *C. pseudohaemulonii*
 - *C. duobushaemulonii*
- *C. auris*

Sequenciamento da região D1/D2 (ITS)

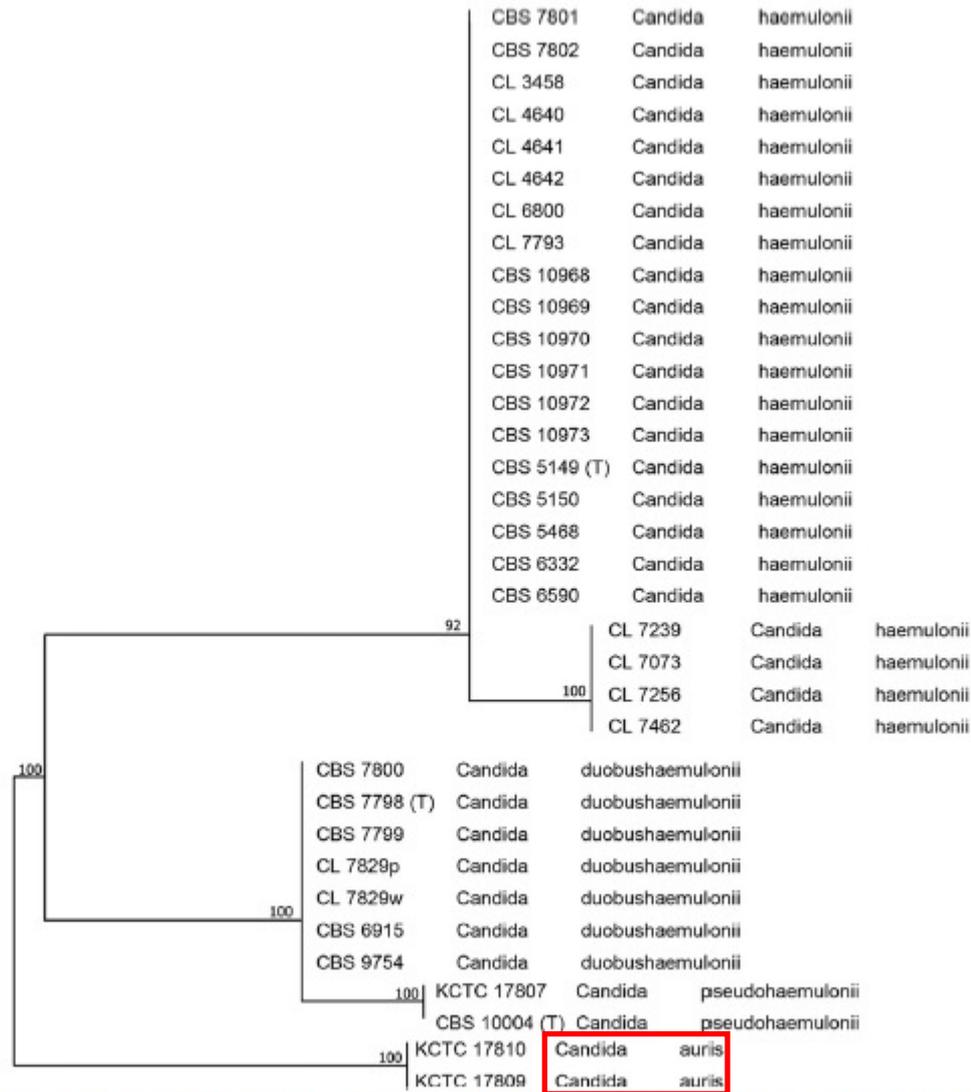
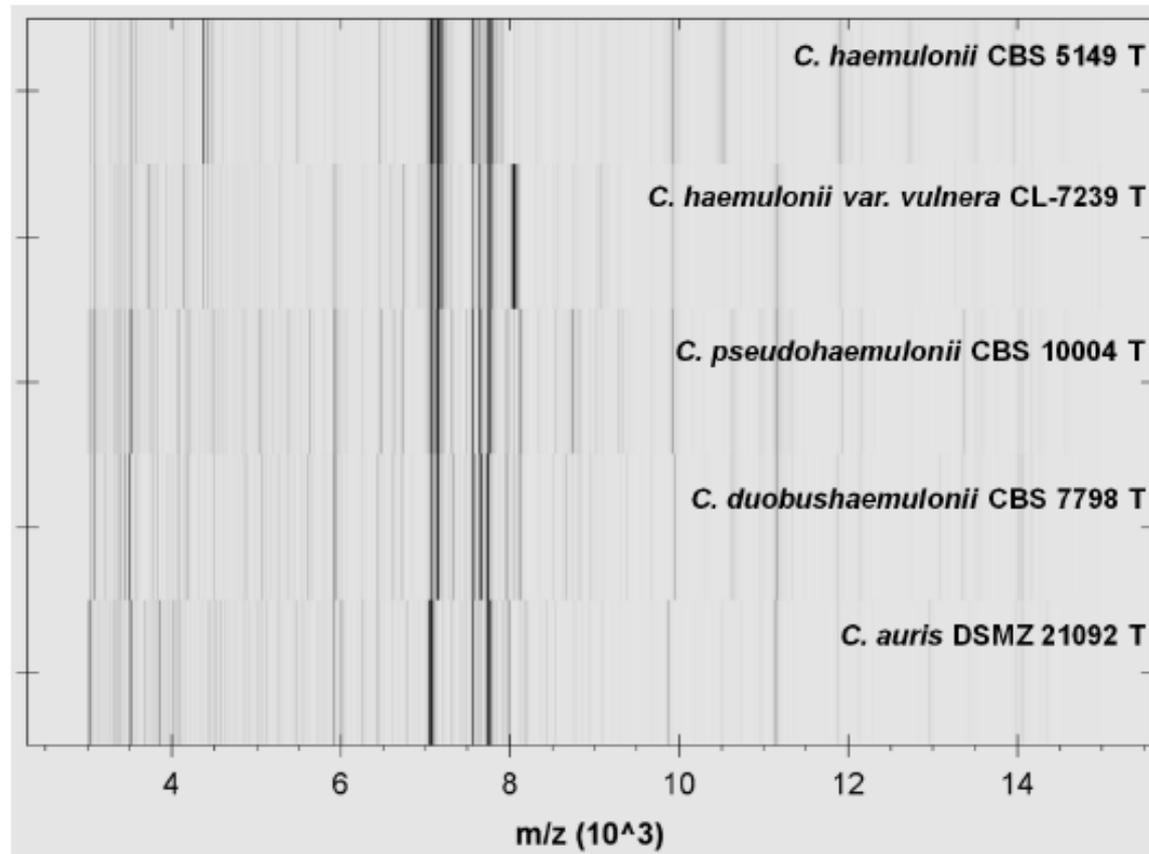


FIG 1 Phylogenetic tree of isolates of the *C. haemulonii* complex obtained by using maximum-likelihood phylogenetic analyses and 2,000 bootstrap simulations based on ITS sequences.

MALDI-TOF – Espectro de massas

Figure S4. Artificial gel view of MALDI-TOF mass spectra obtained for type strains of the *C. haemulonii* complex species.



MALDI-TOF

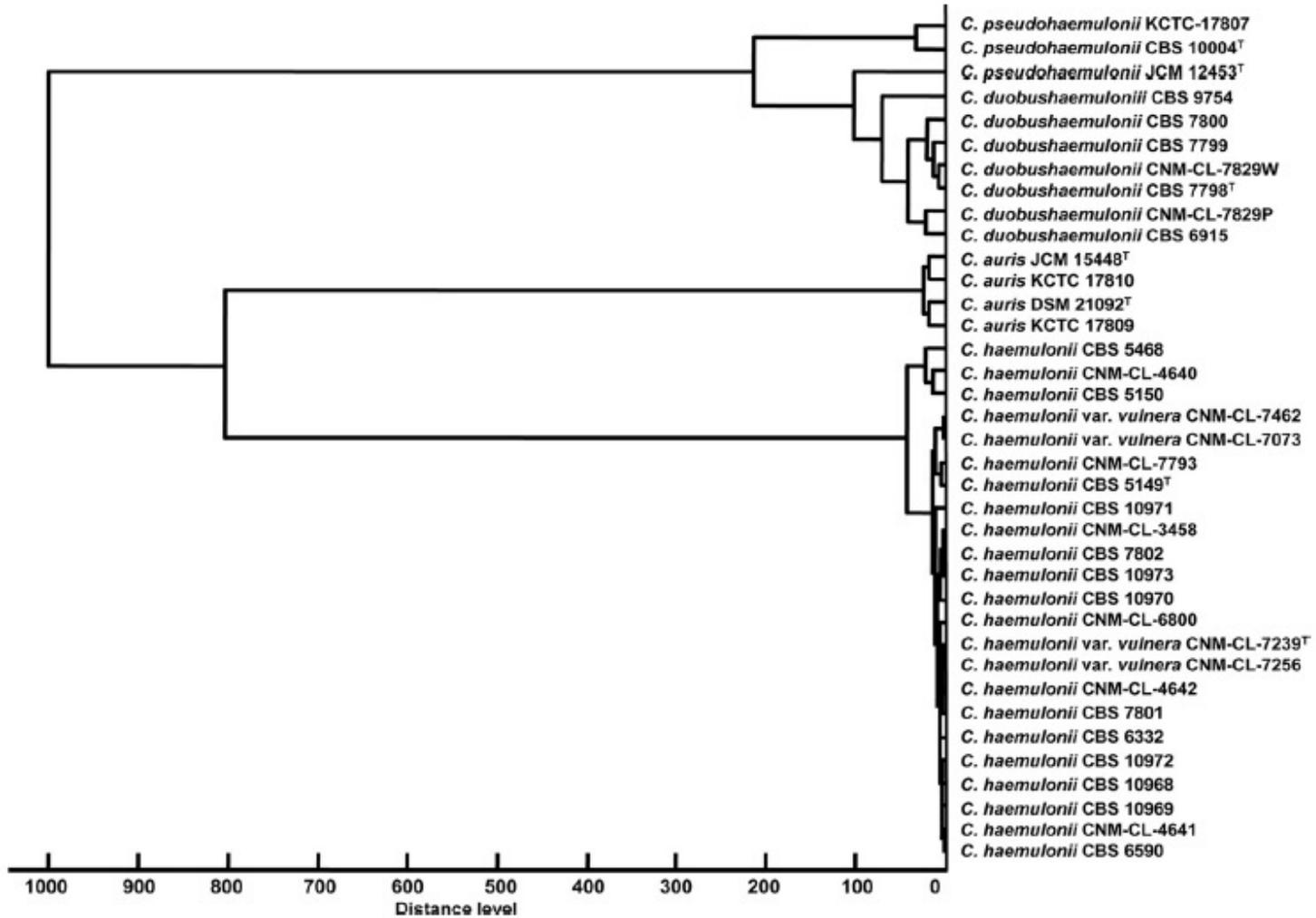


FIG 2 Dendrogram clustering the MALDI-TOF MSP obtained from at least 20 mass spectra of strains belonging to the *C. haemulonii* complex species and related species. *C. auris* JCM 15448^T and DSM 21092^T and *C. pseudohaemulonii* JCM 12453^T were added to make the sampling in MALDI-TOF MS more robust.