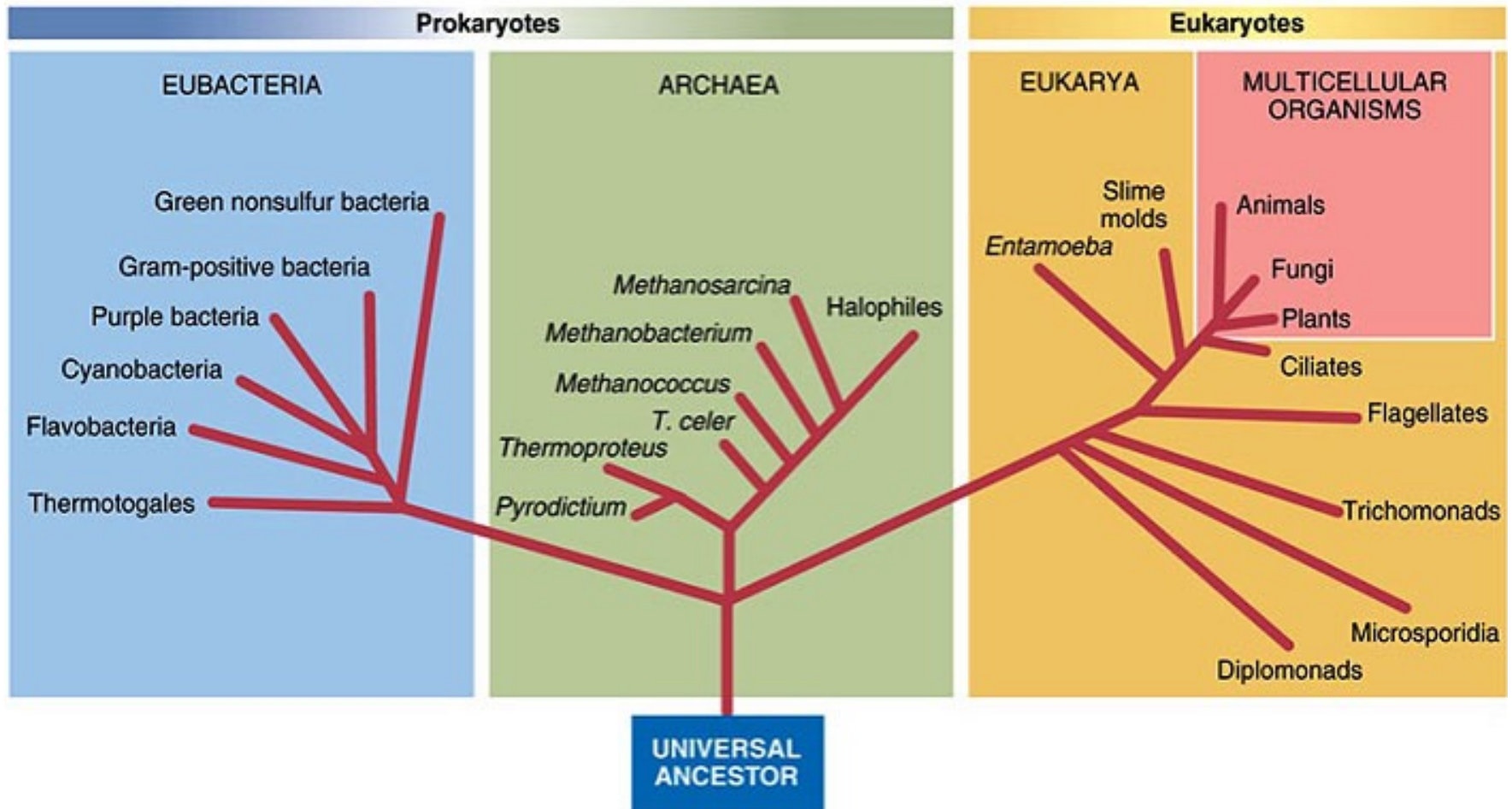


Identificação polifásica de fungos

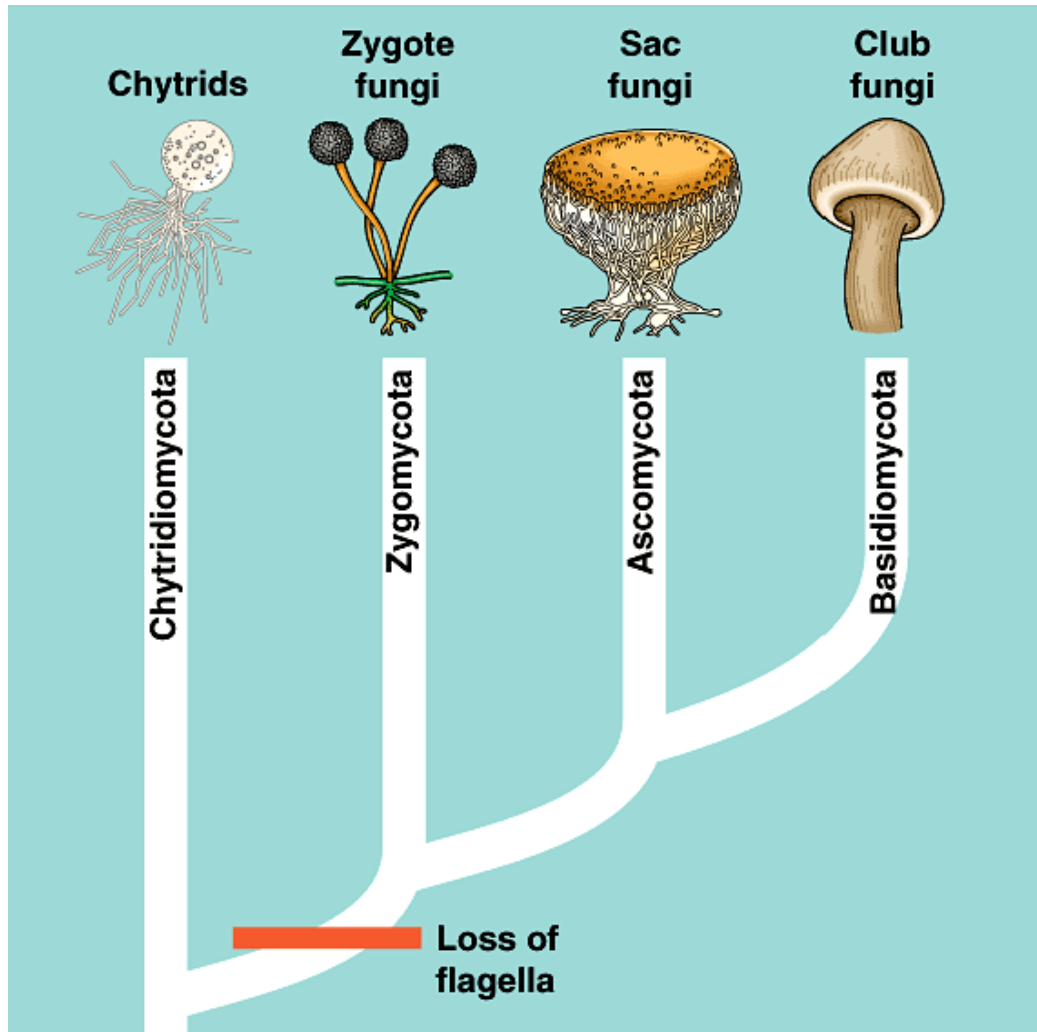
Profa. Kelly Ishida
E-mail: ishidakelly@usp.br

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.**

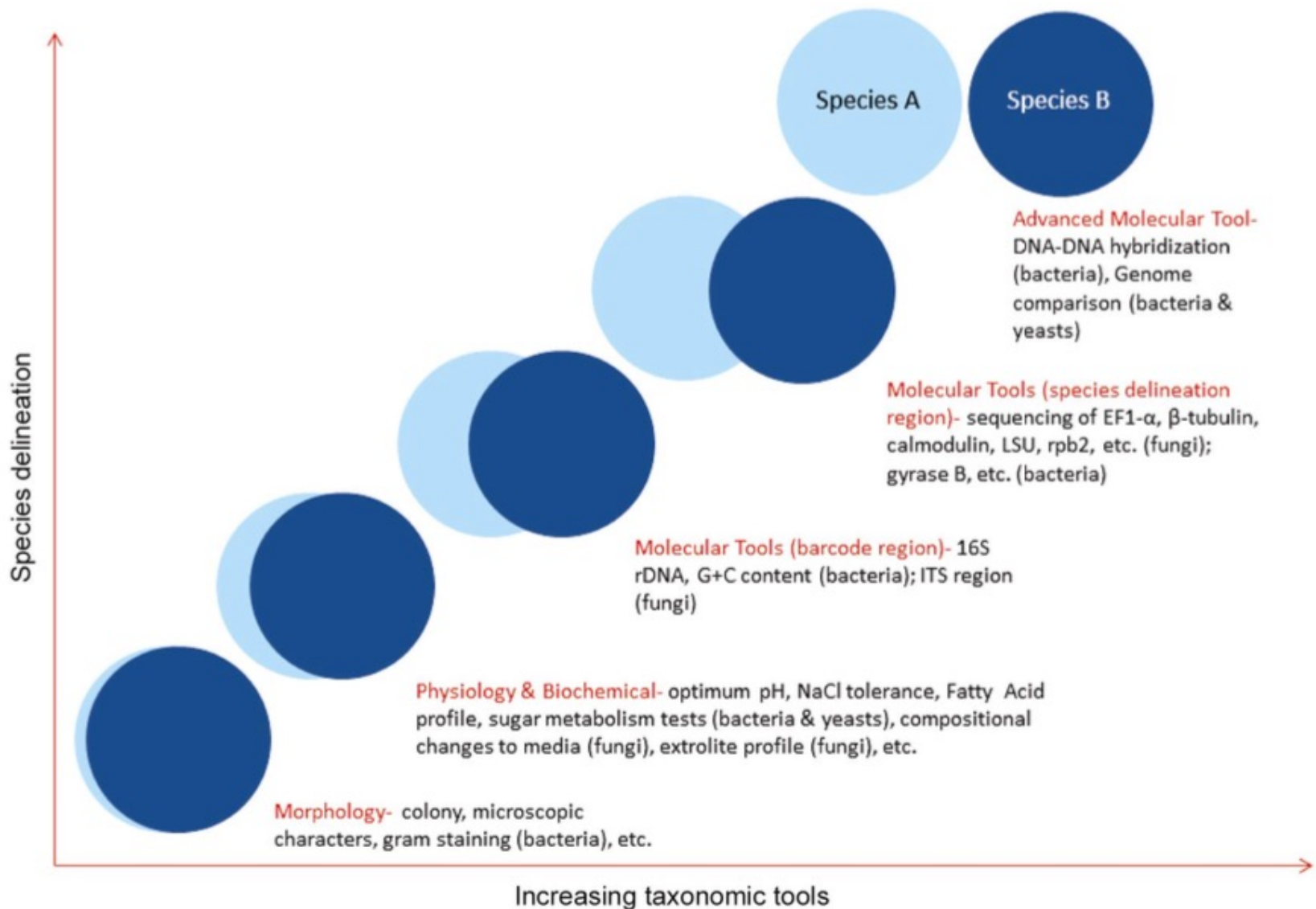
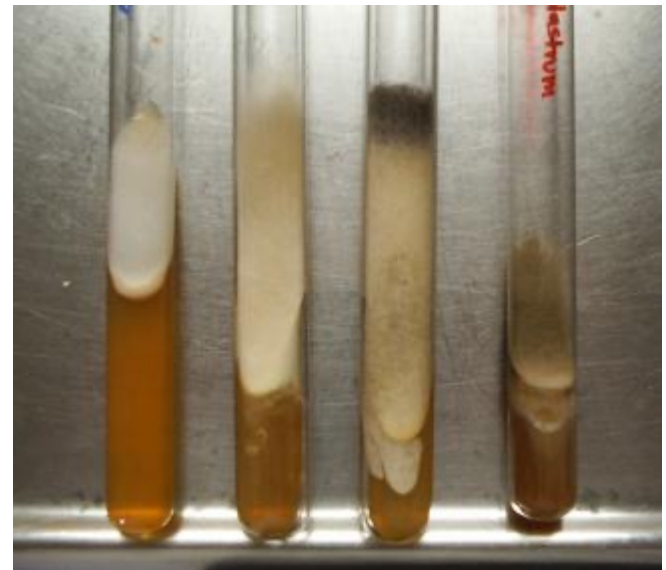


Figure 2. Different criteria used in species delineation of bacteria, archaea and fungi.

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.

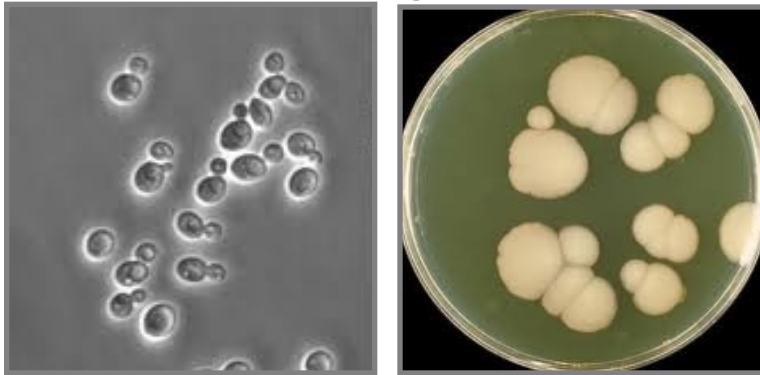
Coleta e isolamento da amostra fúngica



Morfologia

Características macroscópicas da colônia fúngica

- Unicelulares → fungos leveduriformes

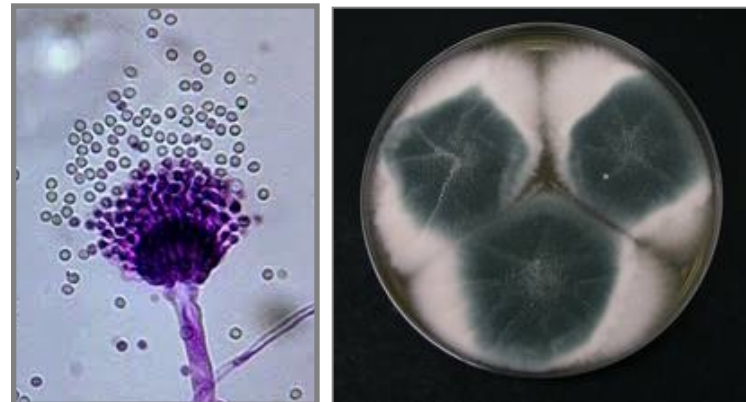


Ex. *Saccharomyces cerevisiae*

- Pluricelulares → fungos filamentosos (“bolor”)

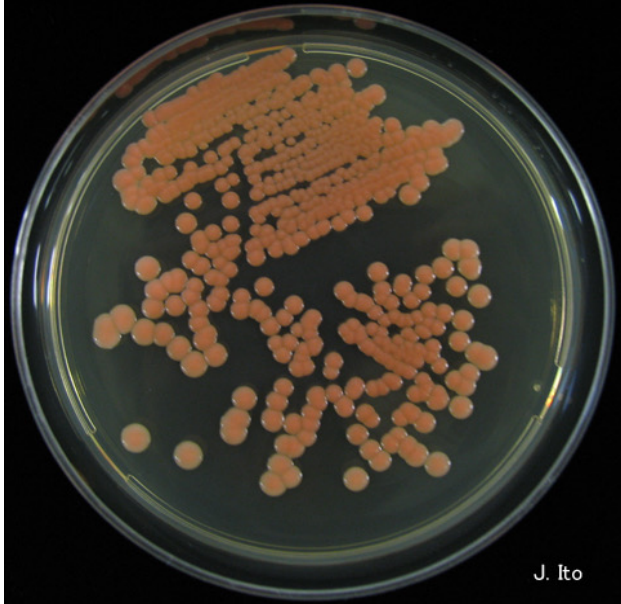
- Hifa – unidade básica do fungo
- Micélio – conjunto de hifas

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

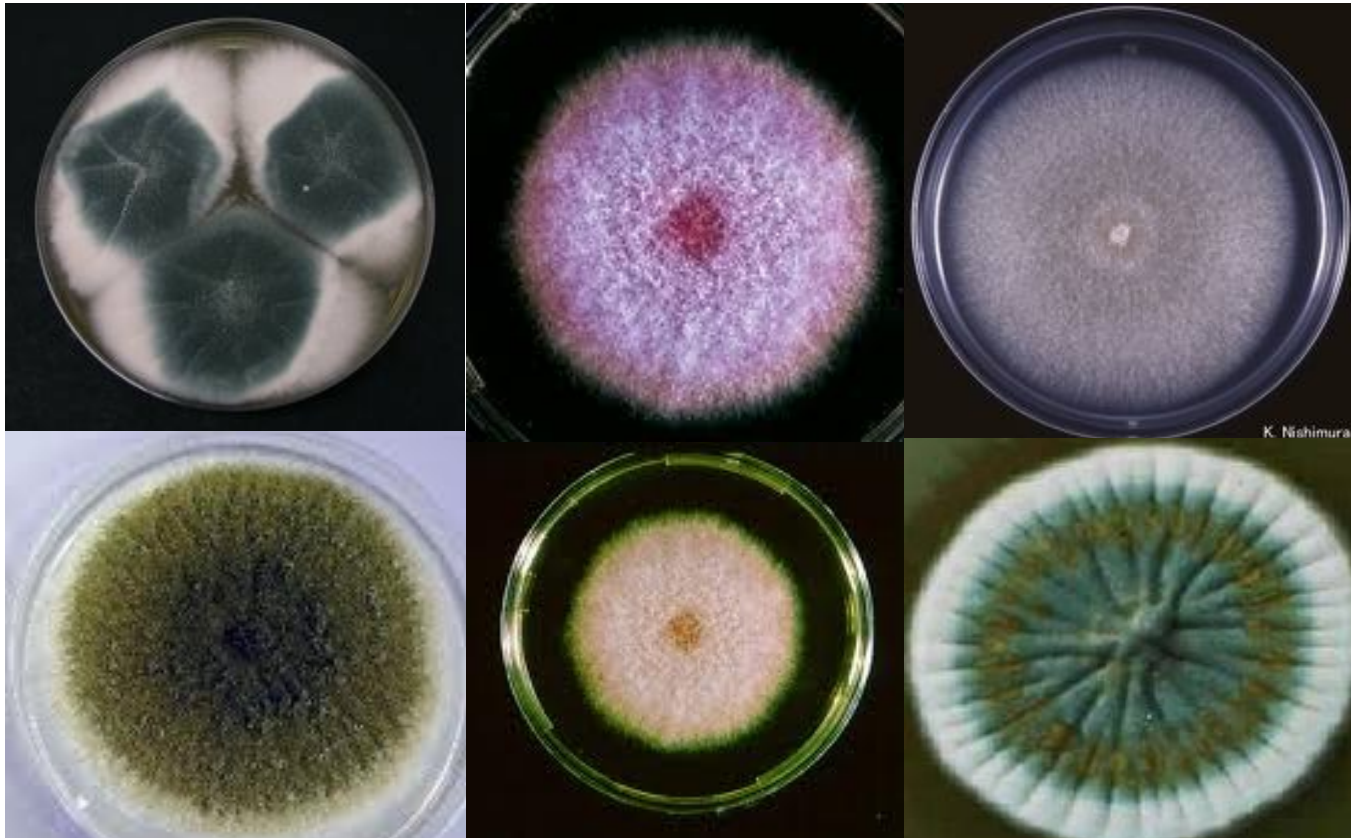


Filamentous



Curled

FUNGOS FILAMENTOSOS

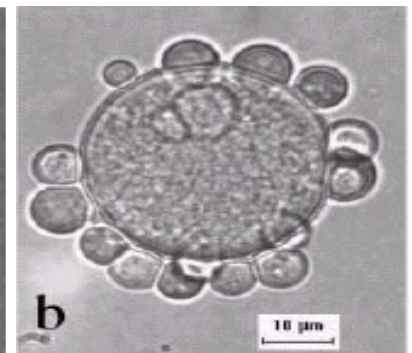
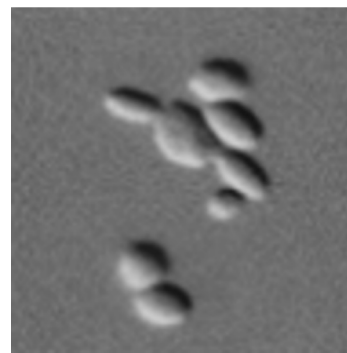
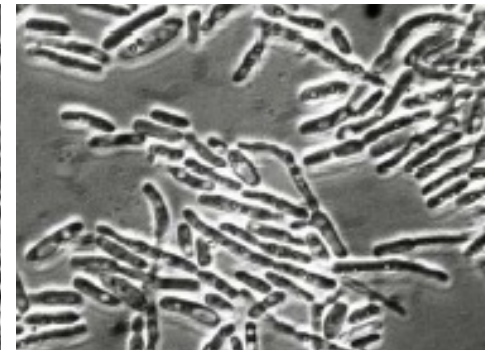
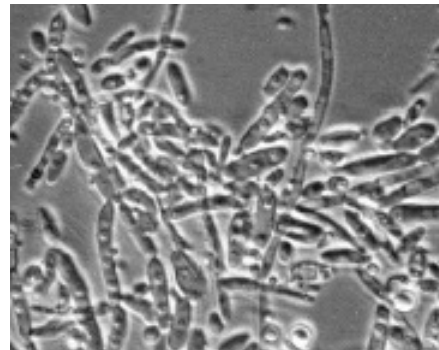
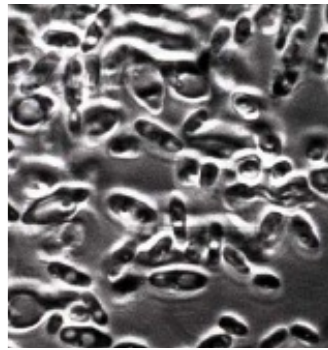
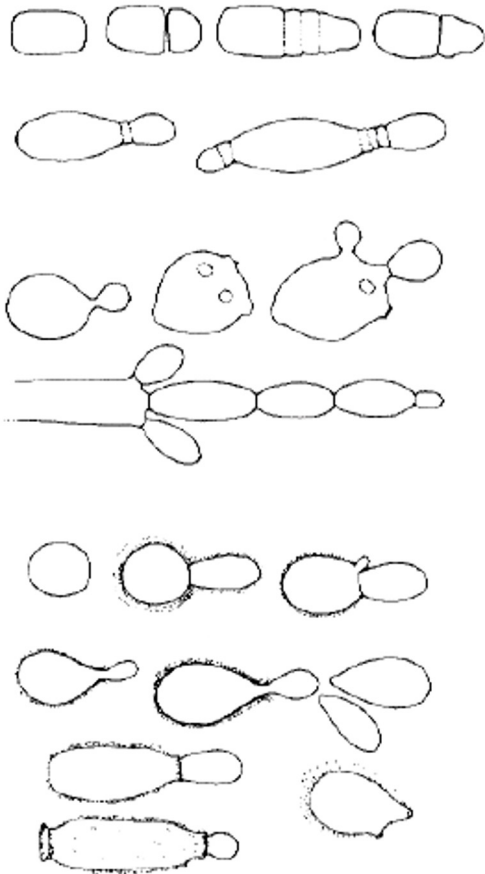


Forma, superfície, margem, coloração verso e reverso, aspecto (seco, úmido), tamanho – dependem do tempo de incubação, meio e temperatura

Morfologia

Características microscópicas dos fungos

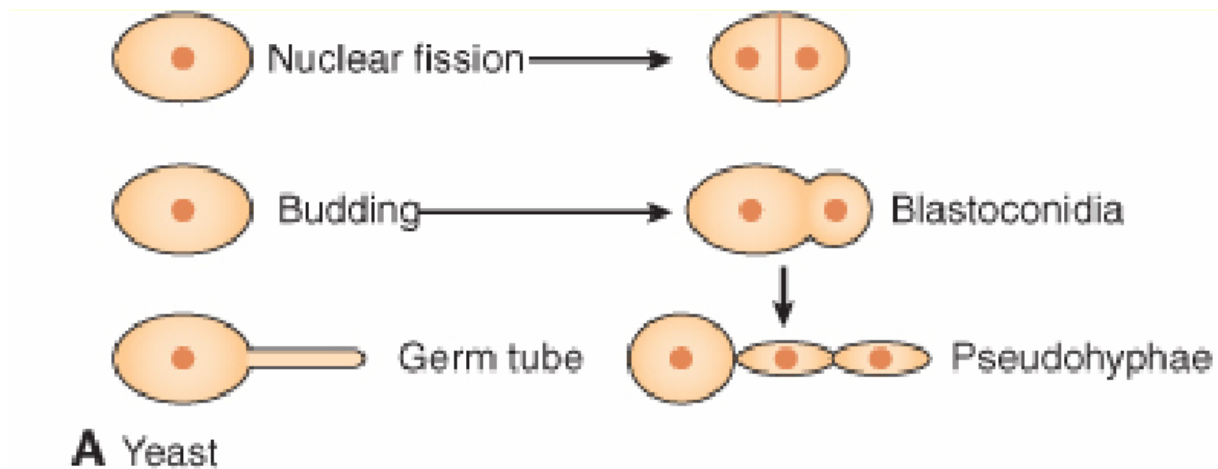
LEVEDURAS



LEVEDURAS

Reprodução assexuada – Formação Blástica

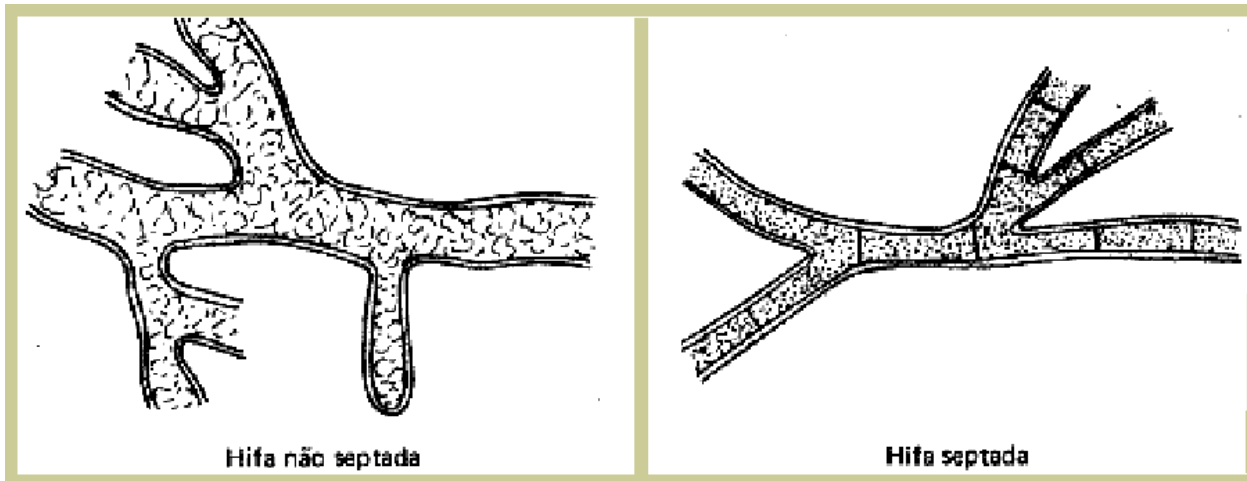
Brotamento / fissão binária



FUNGOS FILAMENTOSOS

Característica microscópica

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

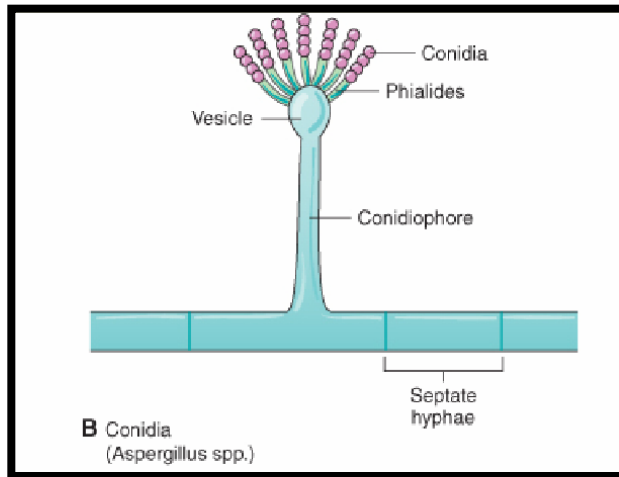


- Septadas x Não-septadas /Contínuas/Cenocíticas
- Hialino X Demáceo
- Espessa X Delgada

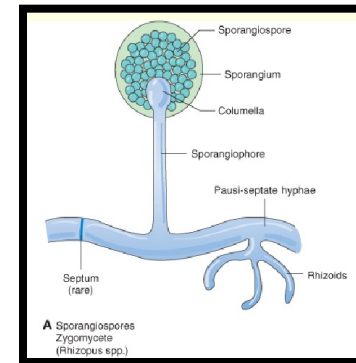
FUNGOS FILAMENTOSOS

Reprodução assexuada – Micélio reprodutivo

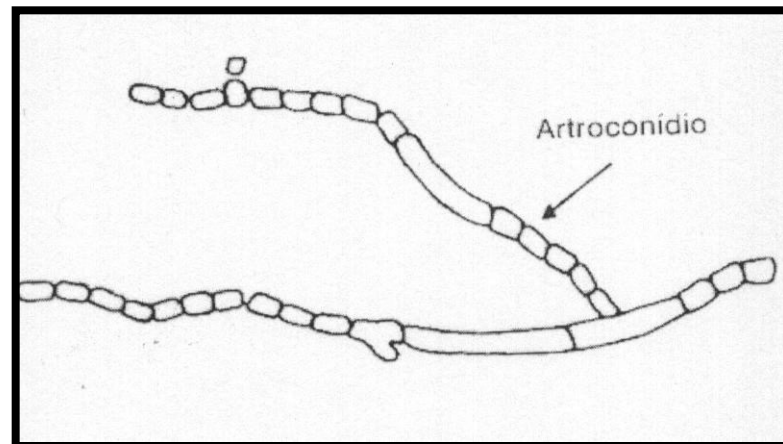
- Formação Blástica (Ascomicetos)



- Formação de Esporângios (Zigomicetos)



- Formação Tática
Arthroconídios



Testes Bioquímicos

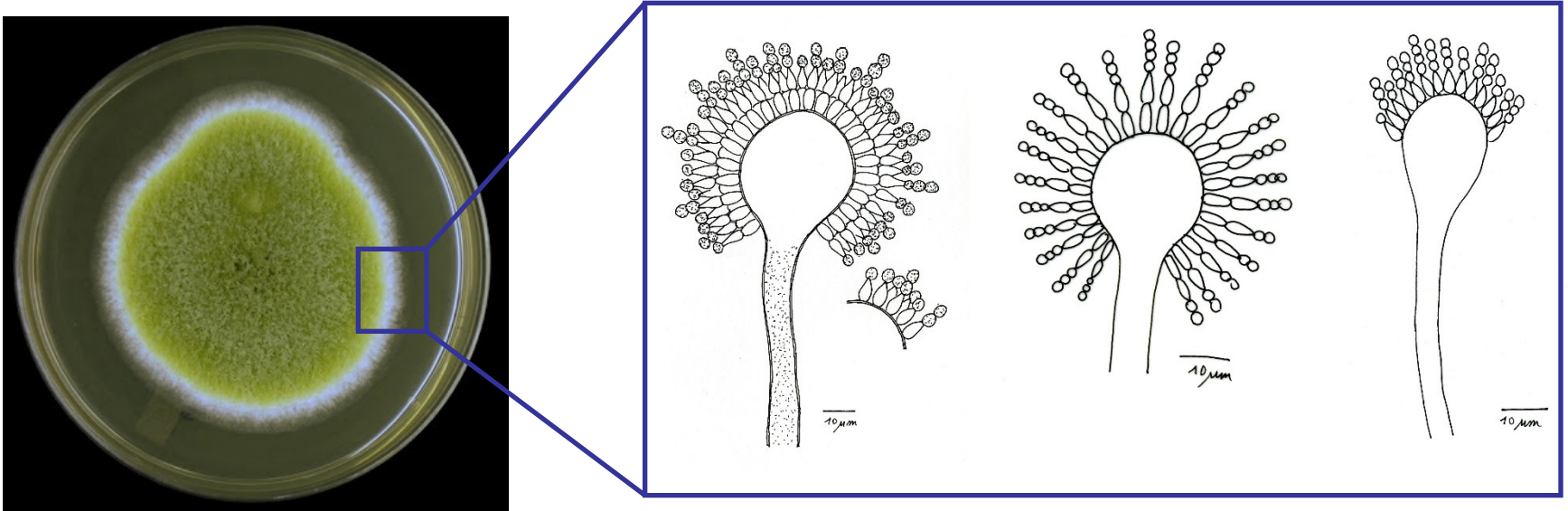
- Urease
- Auxanograma – assimilação de fontes de carbono e nitrogênio
- Zimograma – fermentação de açúcares

Identificação clássica de fungos

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

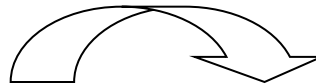
Leveduras – aspectos morfológicos e testes bioquímicos

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

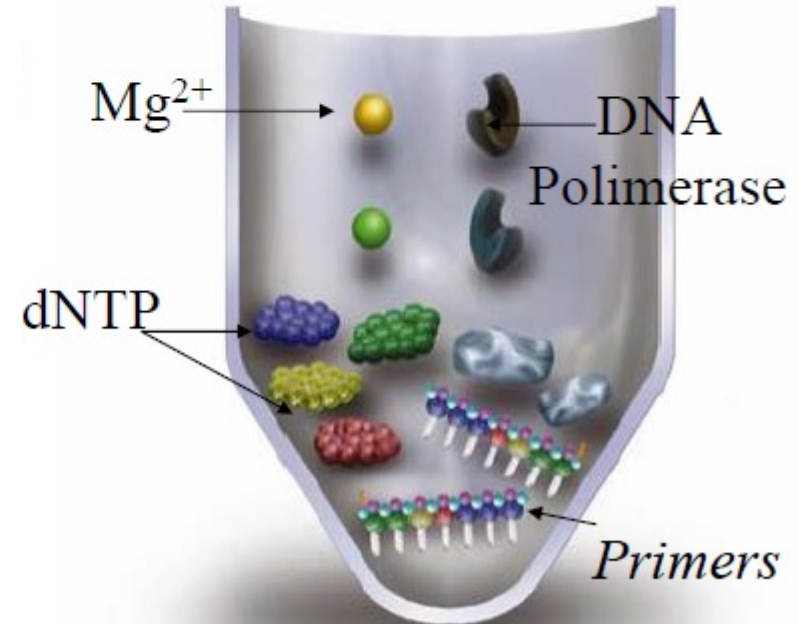
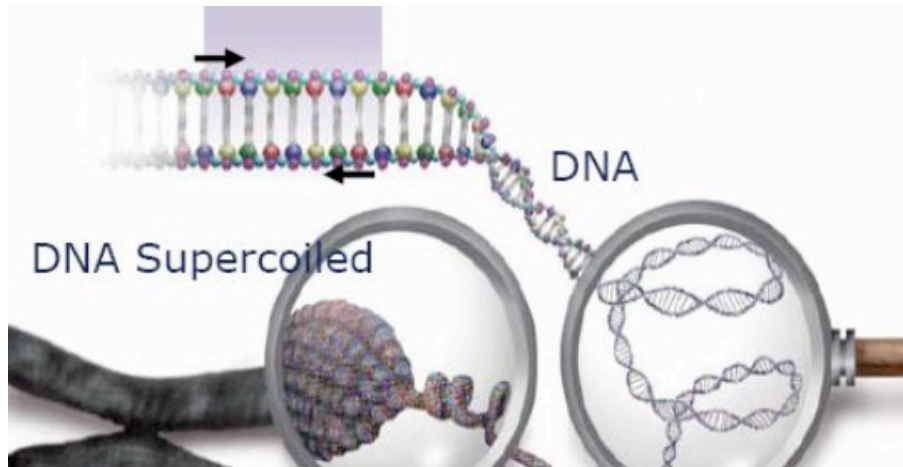
Esses métodos visam a obtenção de Marcadores moleculares do fungo



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

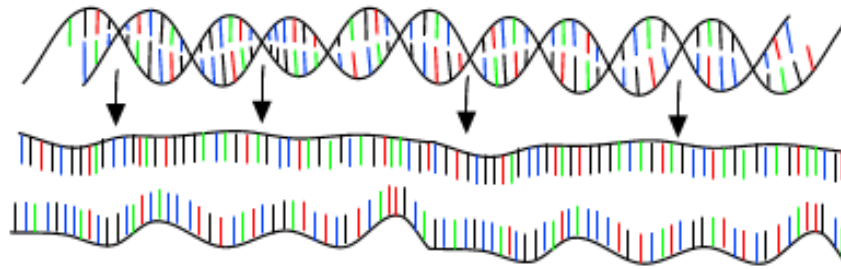
PCR

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



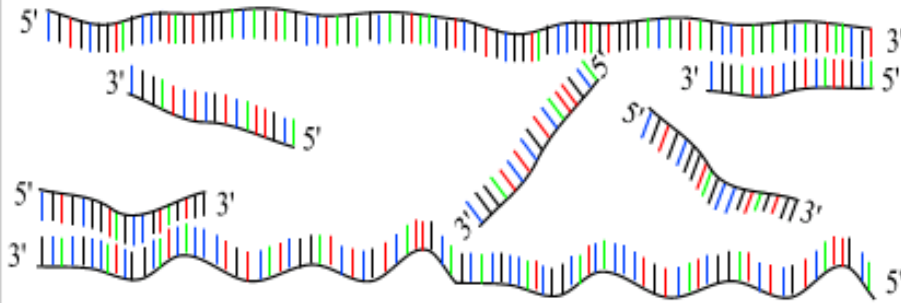
PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :



Step 1 : denaturation

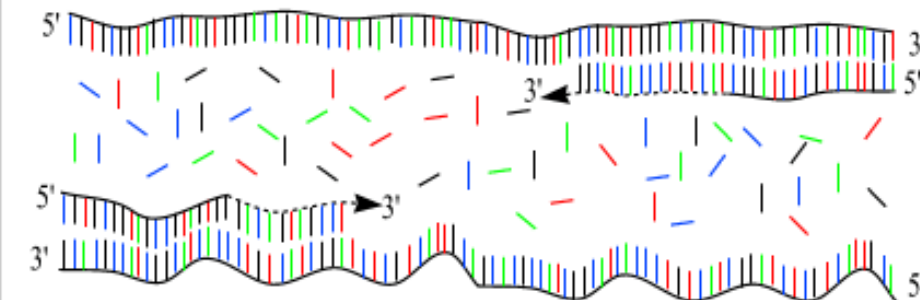
1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

forward and reverse primers !!!



Step 3 : extension

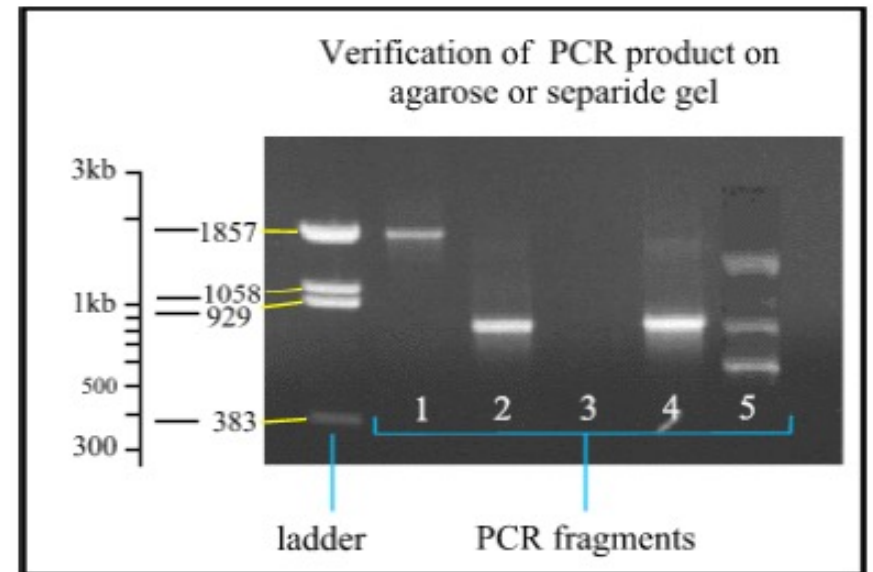
2 minutes 72 °C

only dNTP's



Transiluminador

Fragments da PCR revelados pelo brometo de etídio ou nitrato de prata (exemplos).

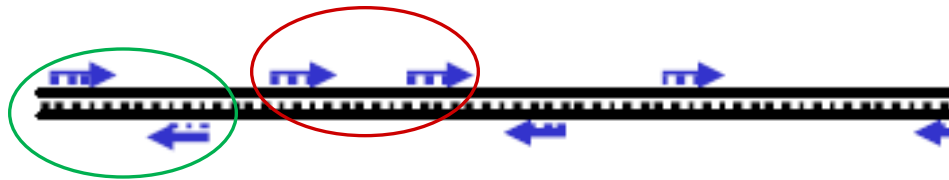


Visualização dos produtos de PCR

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

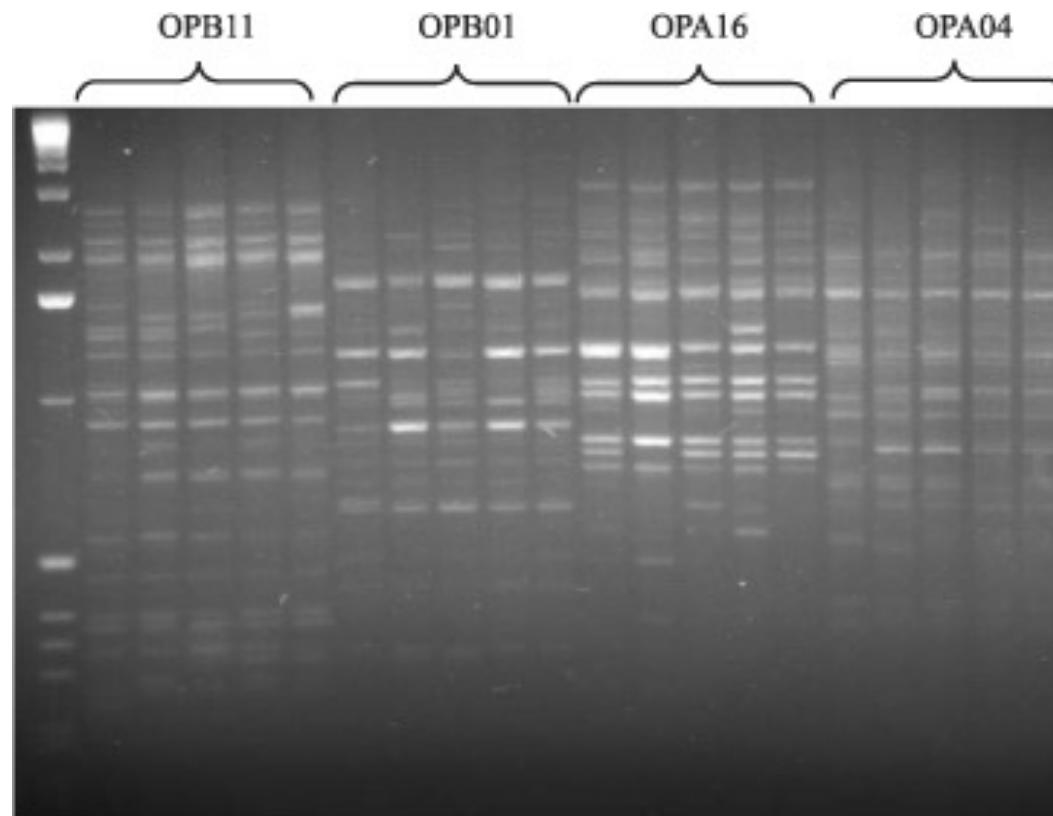


Figura 1. Triagem de oligonucleotídeos iniciadores mostrando diferentes padrões de amplificação.

Como avaliar?

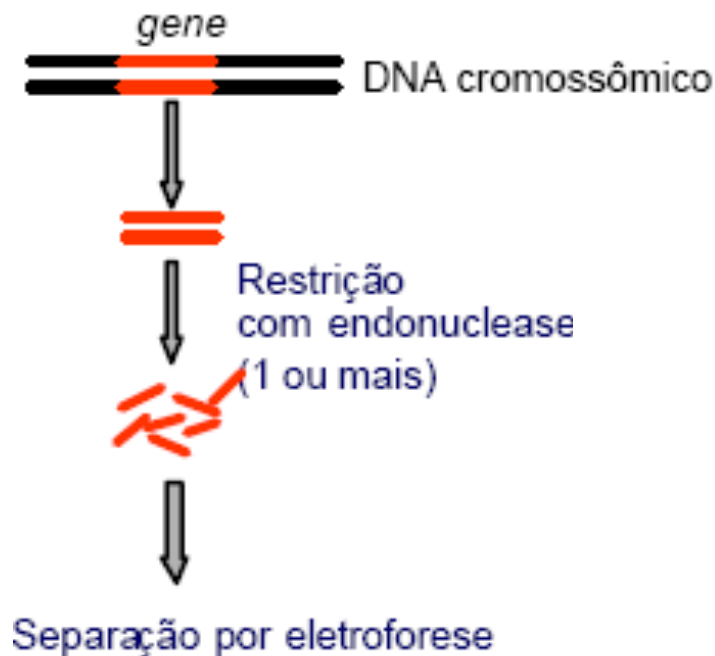
Similaridade das bandas

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

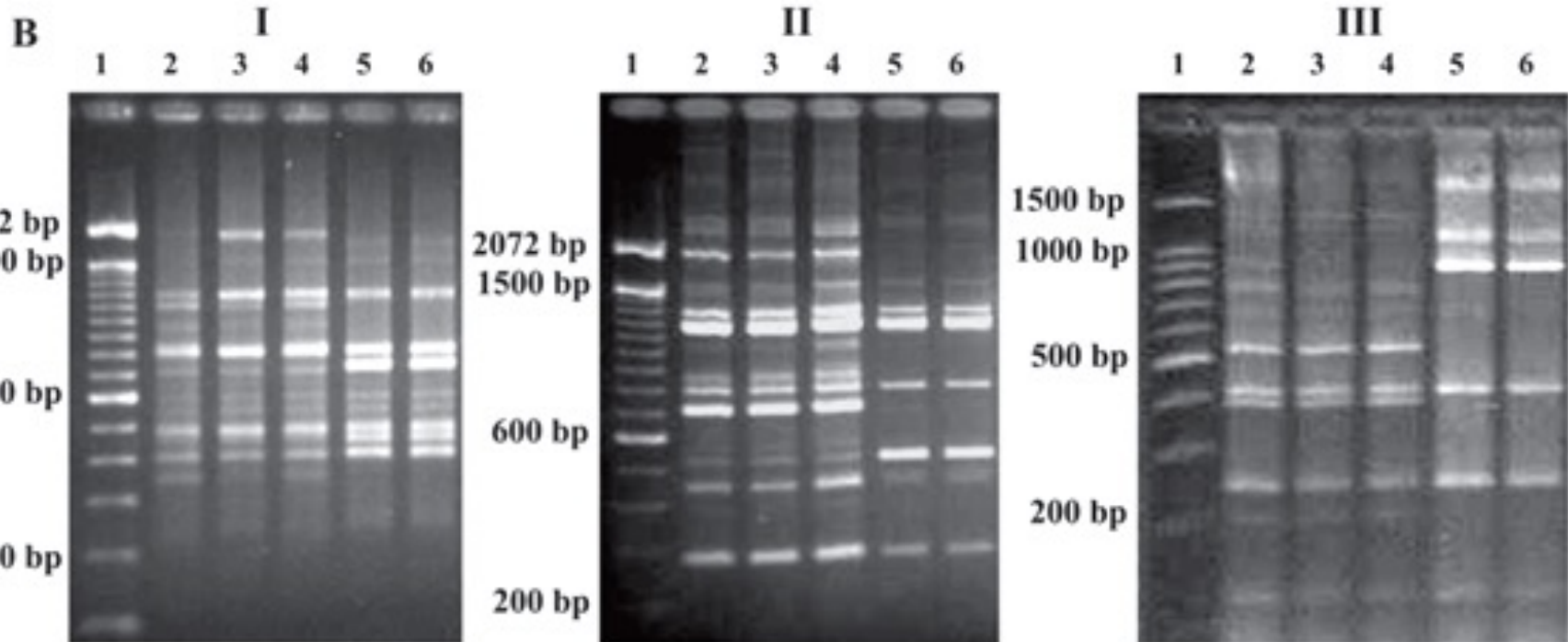


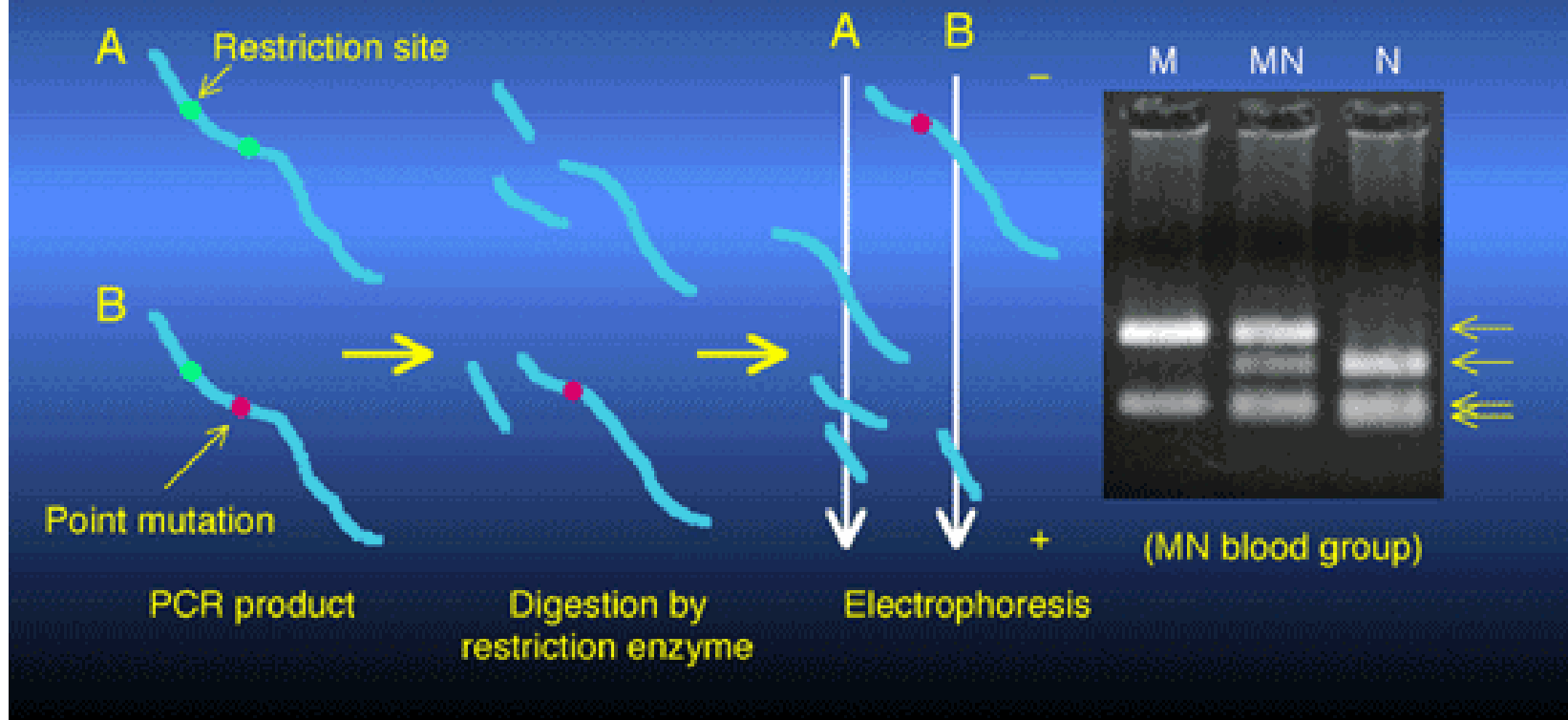
Fig. 2 - A. PCR fingerprinting with primer (GACA)₄ (AI) and PLB1-RFLP with *Ava*I (AII) patterns of *C. neoformans*. Lane 1*, molecular weight marker; 2-5, molecular types VNI, VNII, VNIII, VNIV; 6-9, molecular types VGI, VGII, VGIII, VGIV – **B.** Representative gel of (GACA)₄-PCR fingerprinting (BI),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



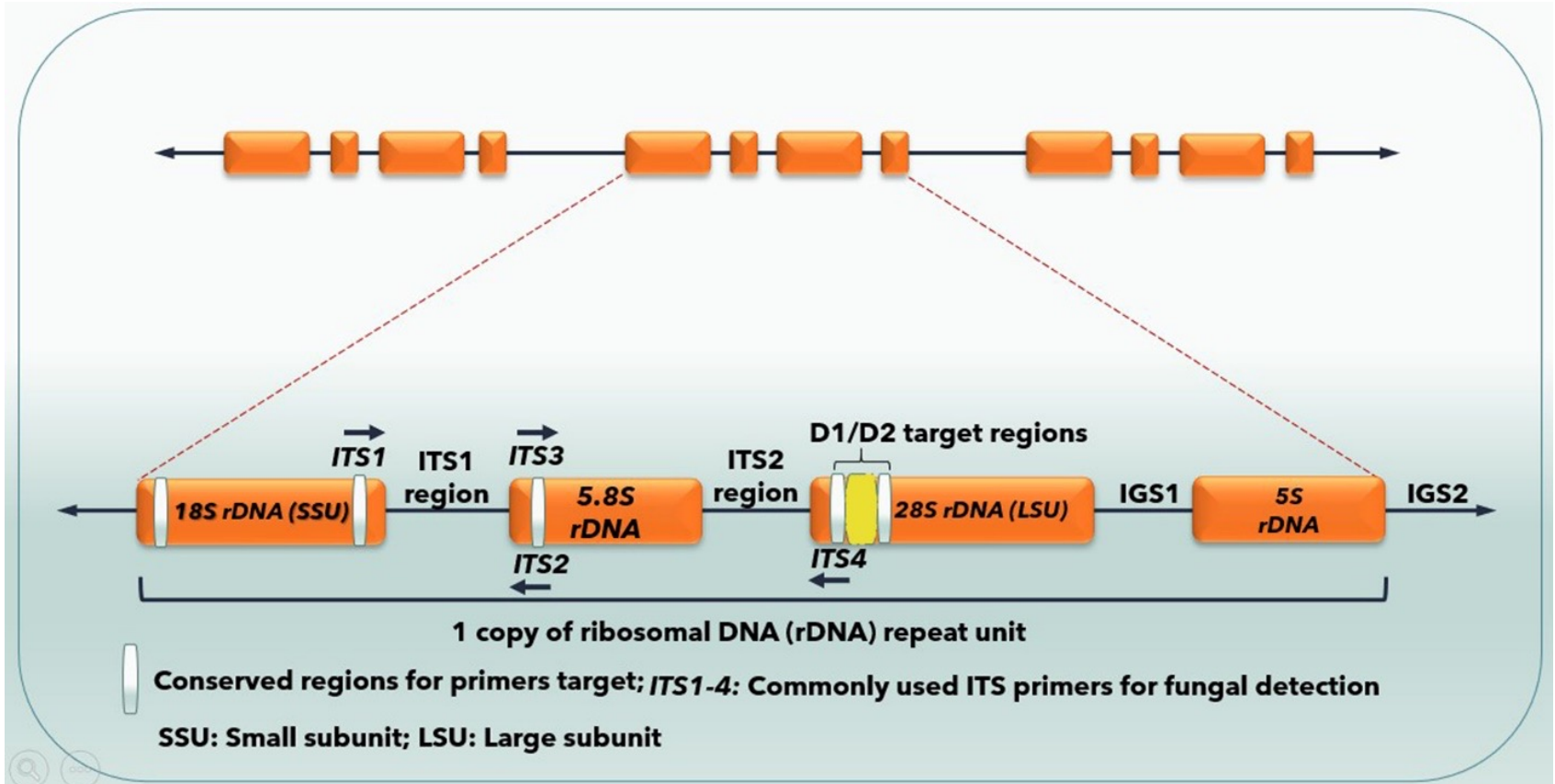
- **PCR específico**

- **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



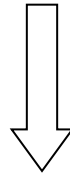
<https://doi.org/10.20935/AcadBiol6074>

Taxonomia de Fungos

Filogenia



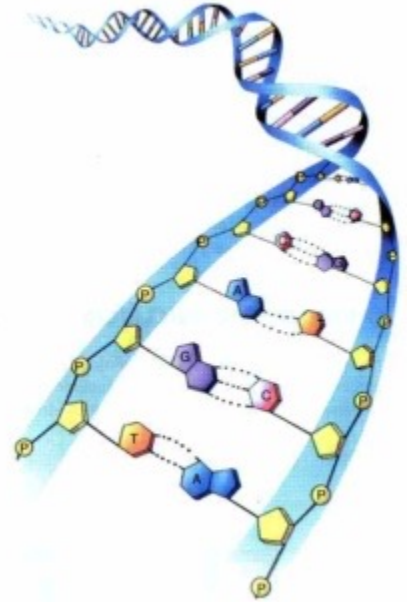
**Sequenciamento do
DNA**



Determinar sequência de nucleotídeos do DNA



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

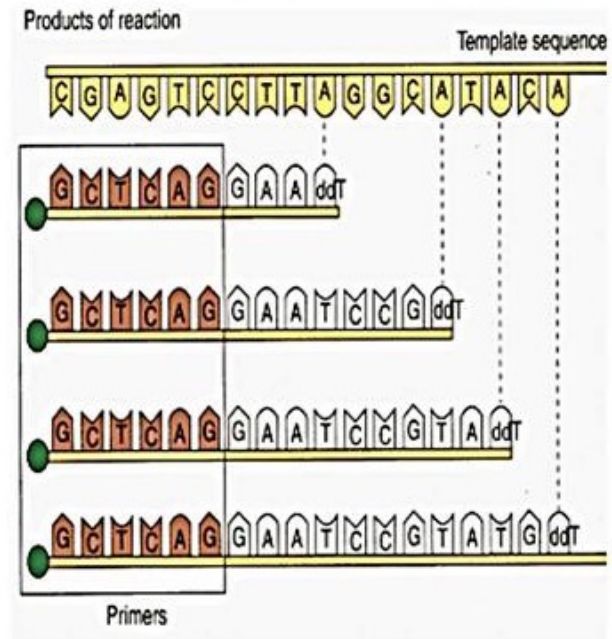
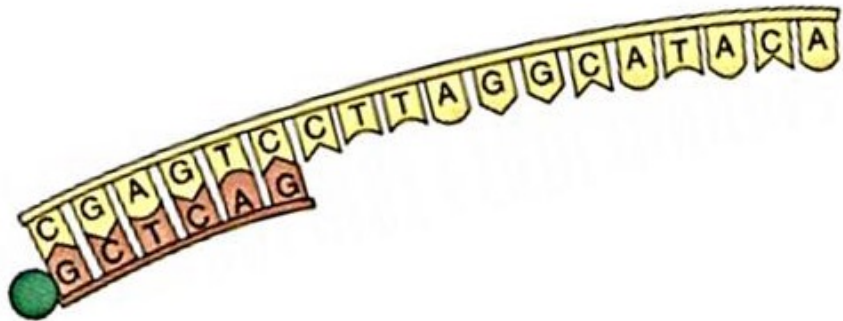


Sequenciamento de DNA

Método de Sanger

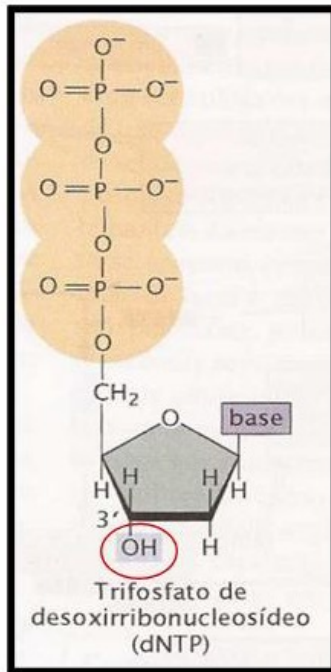
Método de Didesóxinucleotídeos ou Terminação em Cadeia

Descrito por Sanger et al., 1977

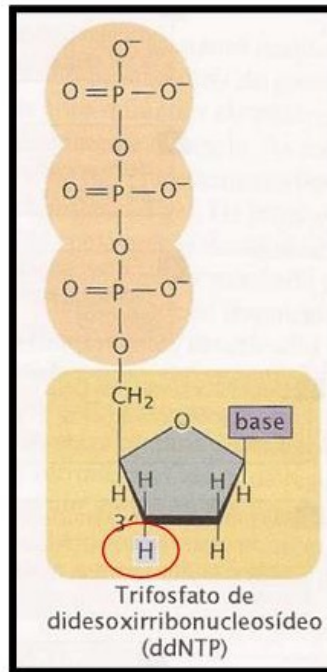


Método de Sanger

- ✓ Substrato especial para síntese de DNA



LIGAÇÃO FOSFODIESTER



Finalizam a síntese de DNA

ddNTP

- ✓ São incorporados na cadeia crescente de DNA

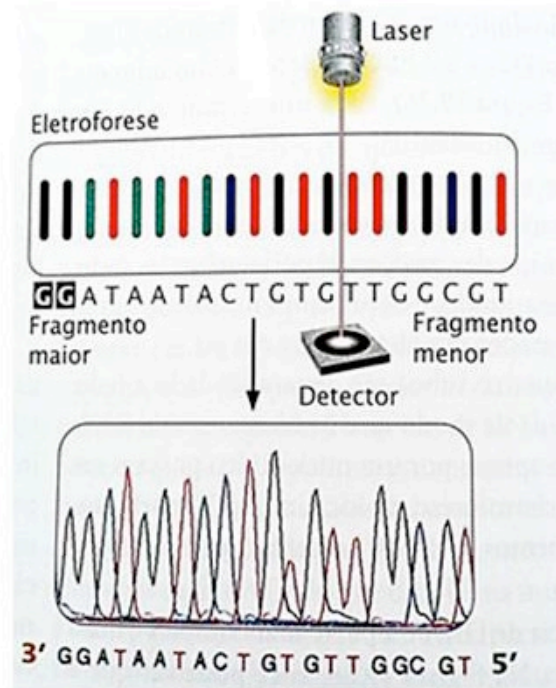
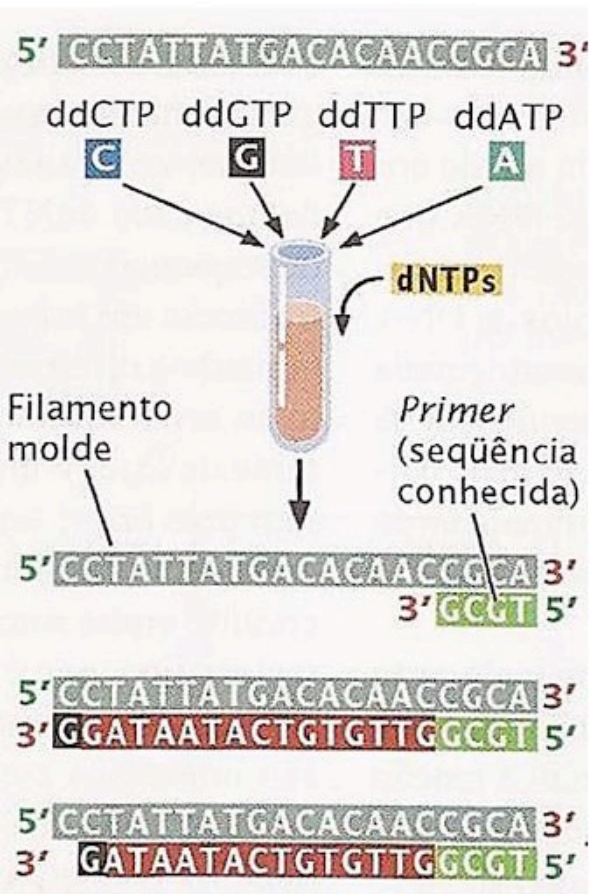


- ✓ Nenhum outro dNTP é adicionado



~~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

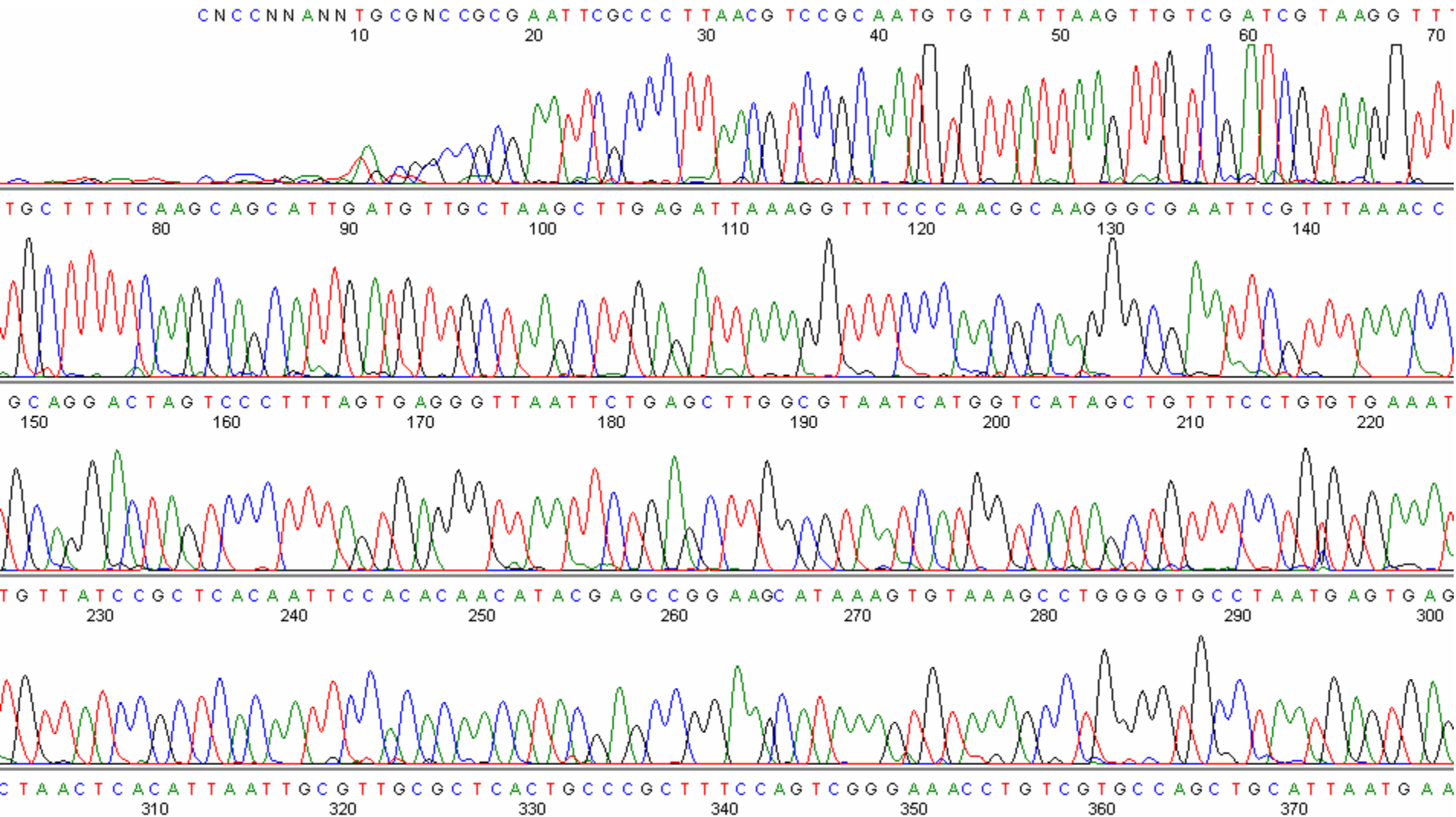


Cada fragmento aparece como um pico, sendo que a cor do pico indica a base representada

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

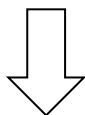
EF1- α

Até 2007:

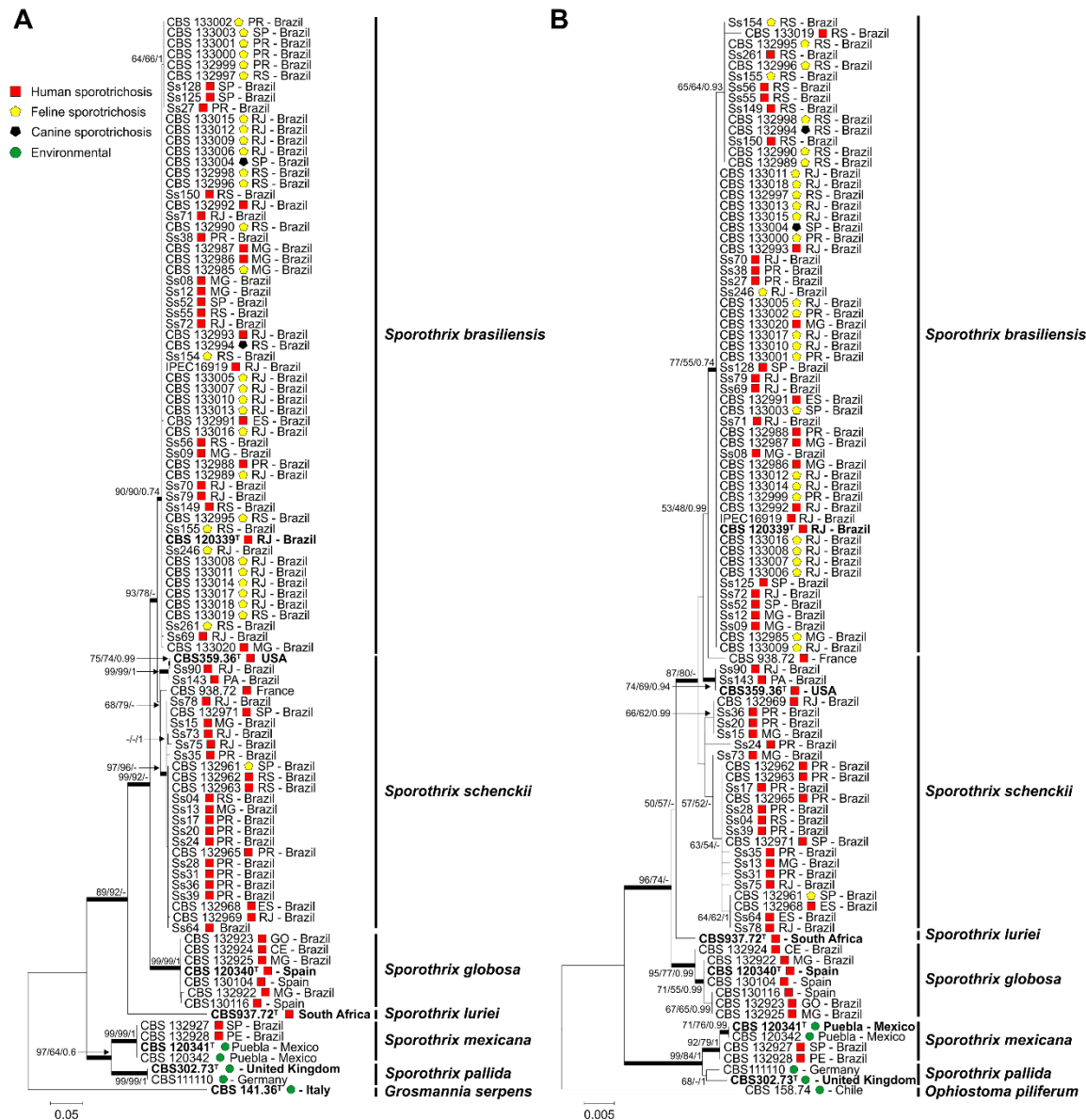
Todos isolados eram classificados como *S. schenckii*

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?

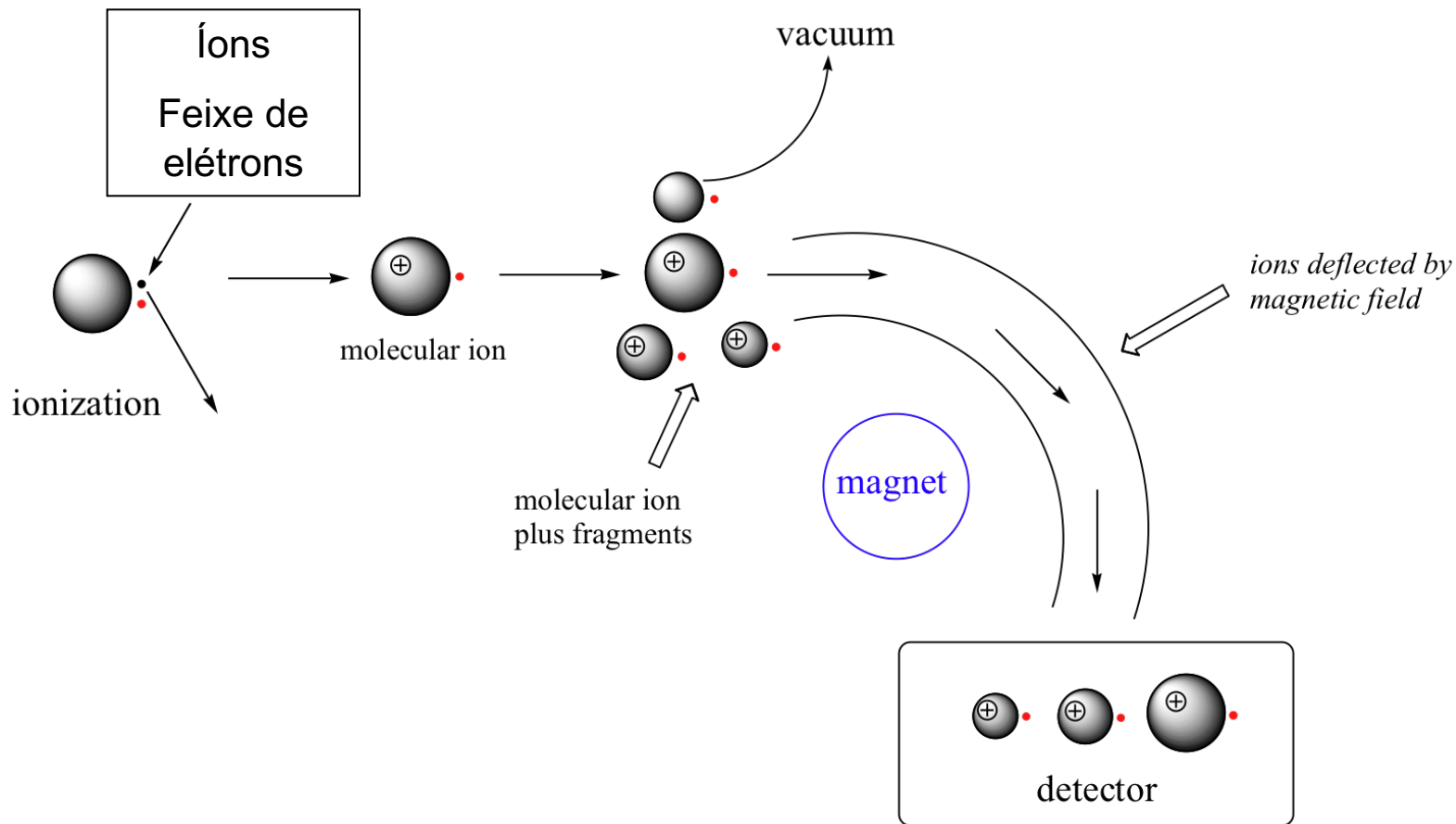
“Balança molecular”



Daltons (Da) = u =
unidade de massa
atômica

O que é espectrometria de massas?

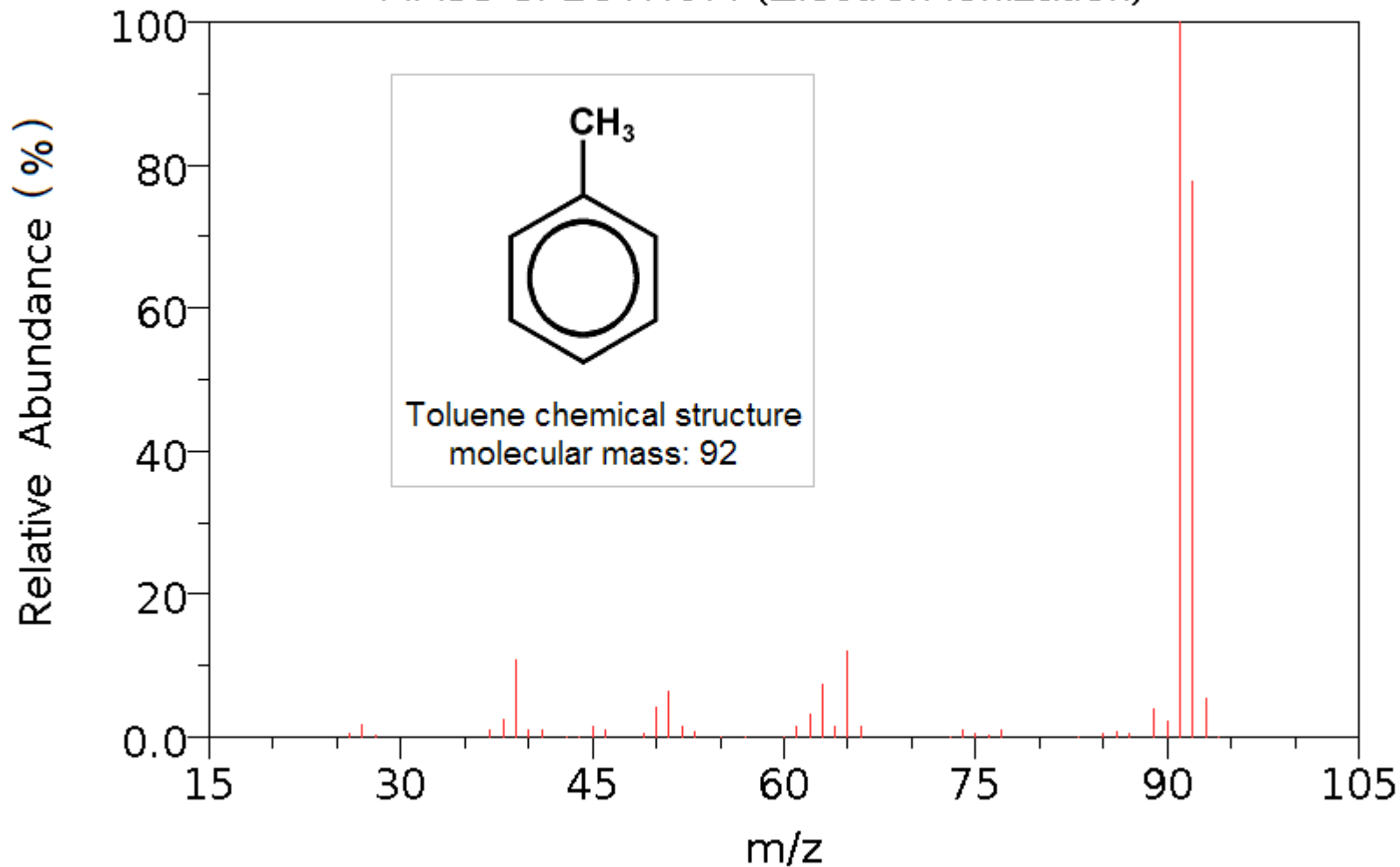
- Técnica analítica em que todos os átomos ou moléculas de uma amostra são ionizados (Feixe de íons ou elétrons) – gera fragmentos - separados de acordo com suas massas (m/z) - detectados e quantificados.
- É uma ferramenta analítica utilizada para medir a massa molecular de uma amostra. Cada molécula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



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

Toluene C₇H₈

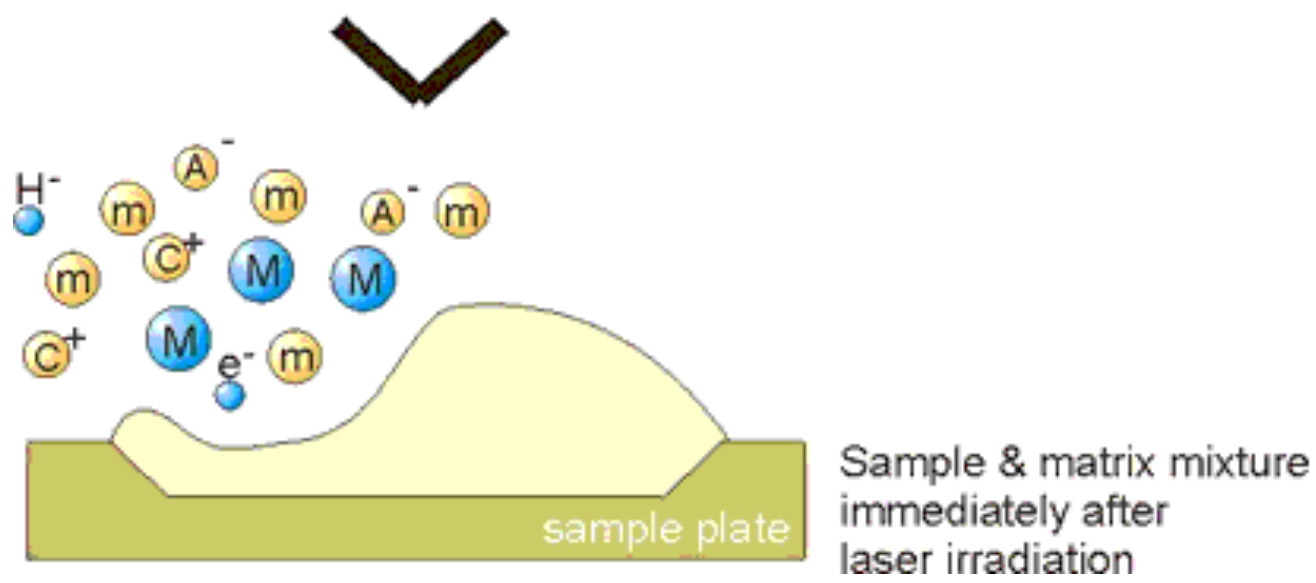
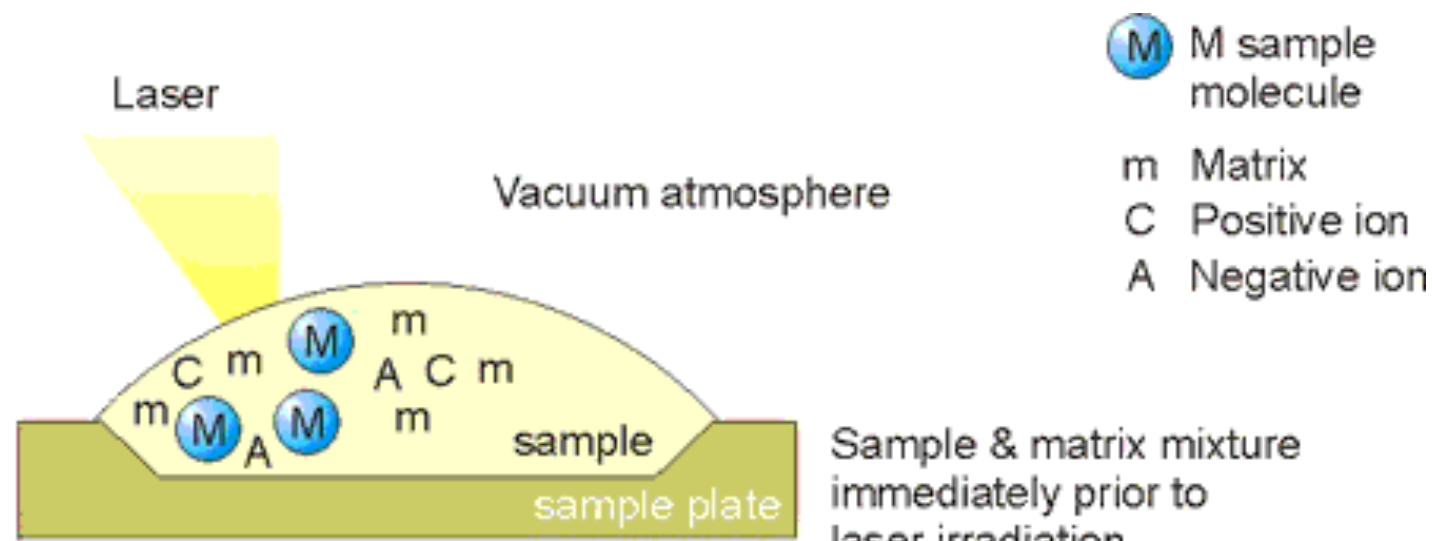
MASS SPECTRUM (Electron Ionization)



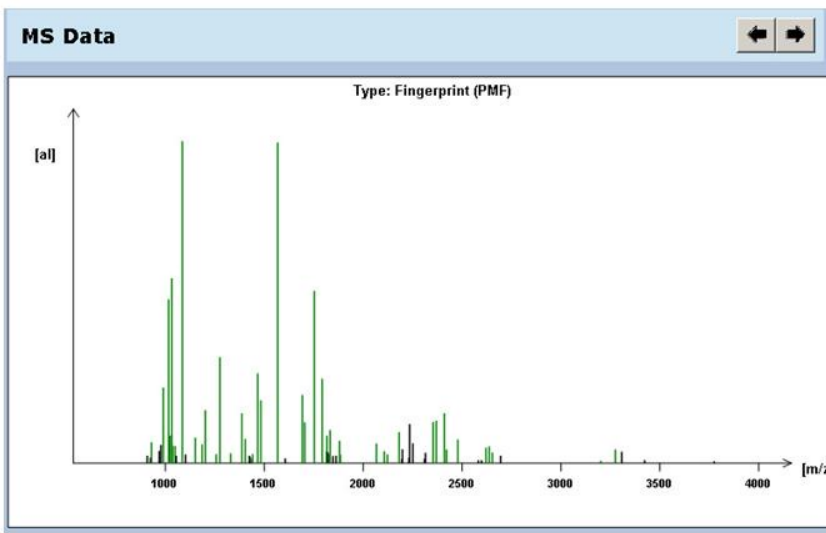
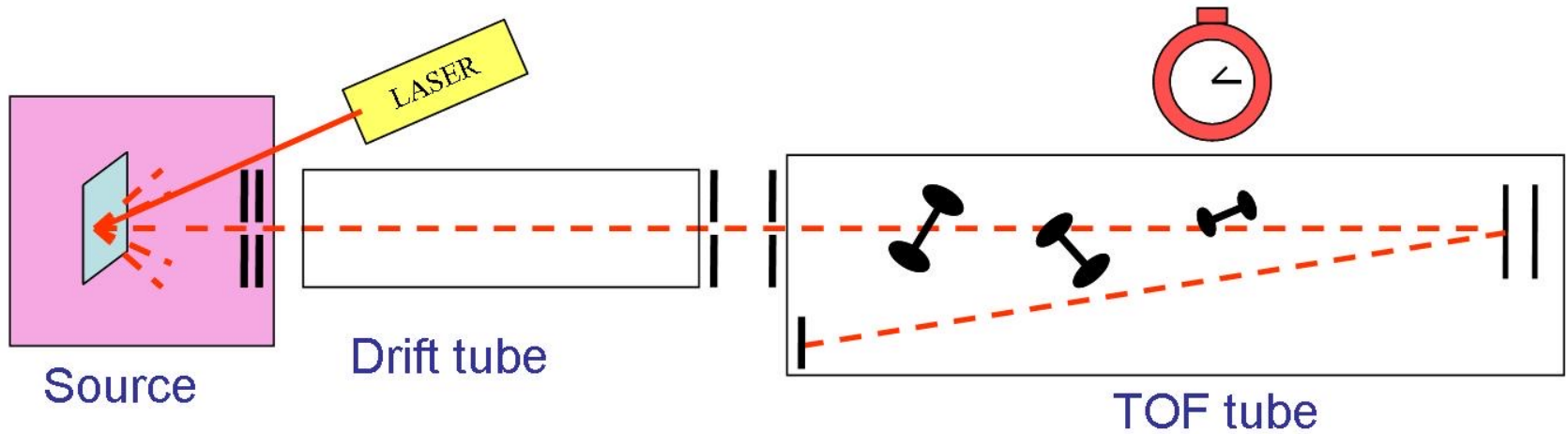
NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

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





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

- Complejo de especies *Candida haemulonii*
 - *C. haemulonii*
 - *C. pseudohaemulonii*
 - *C. duobushaemulonii*
- *C. auris*

Sequenciamento da região D1/D2 (ITS)

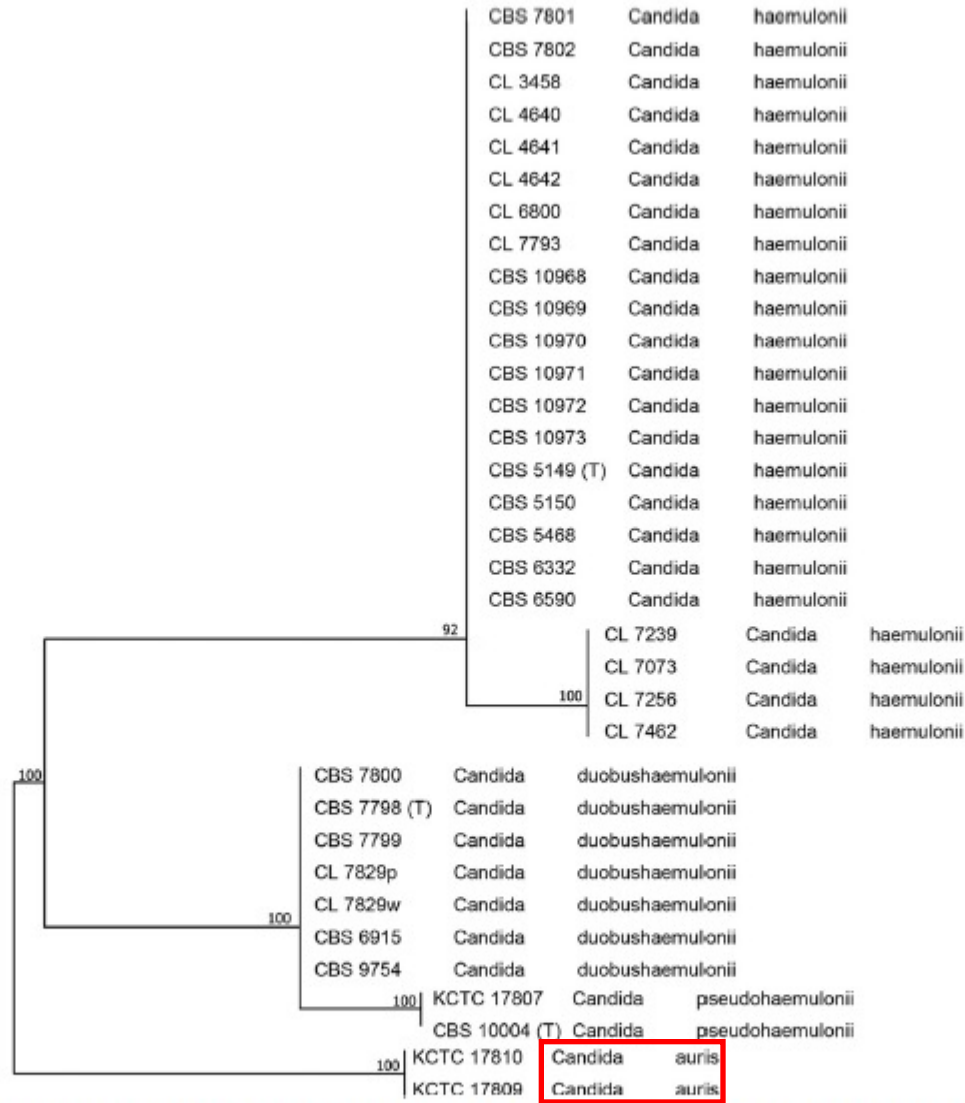
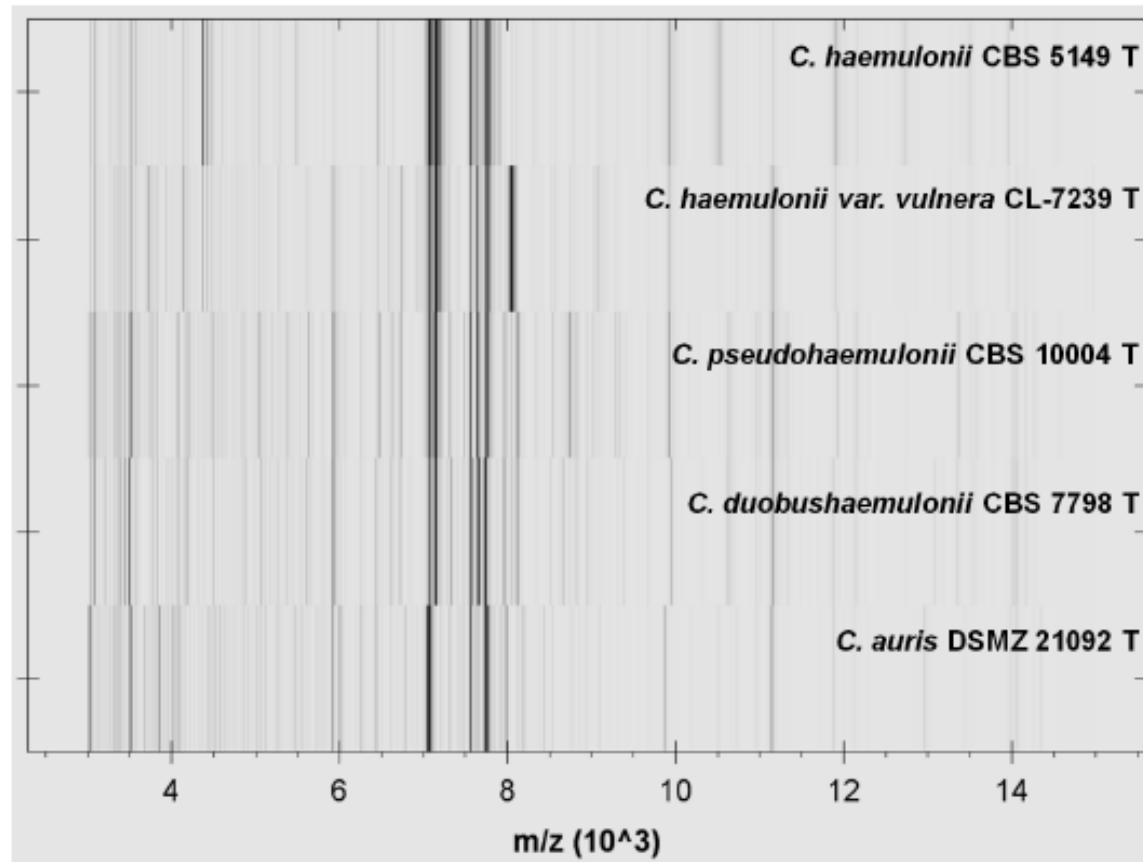


FIG 1 Phylogenetic tree of isolates of the *C. haemulonii* complex obtained by using maximum-likelihood phylogenetic analyses and 2,000 bootstrap simulations based on ITS sequences.

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

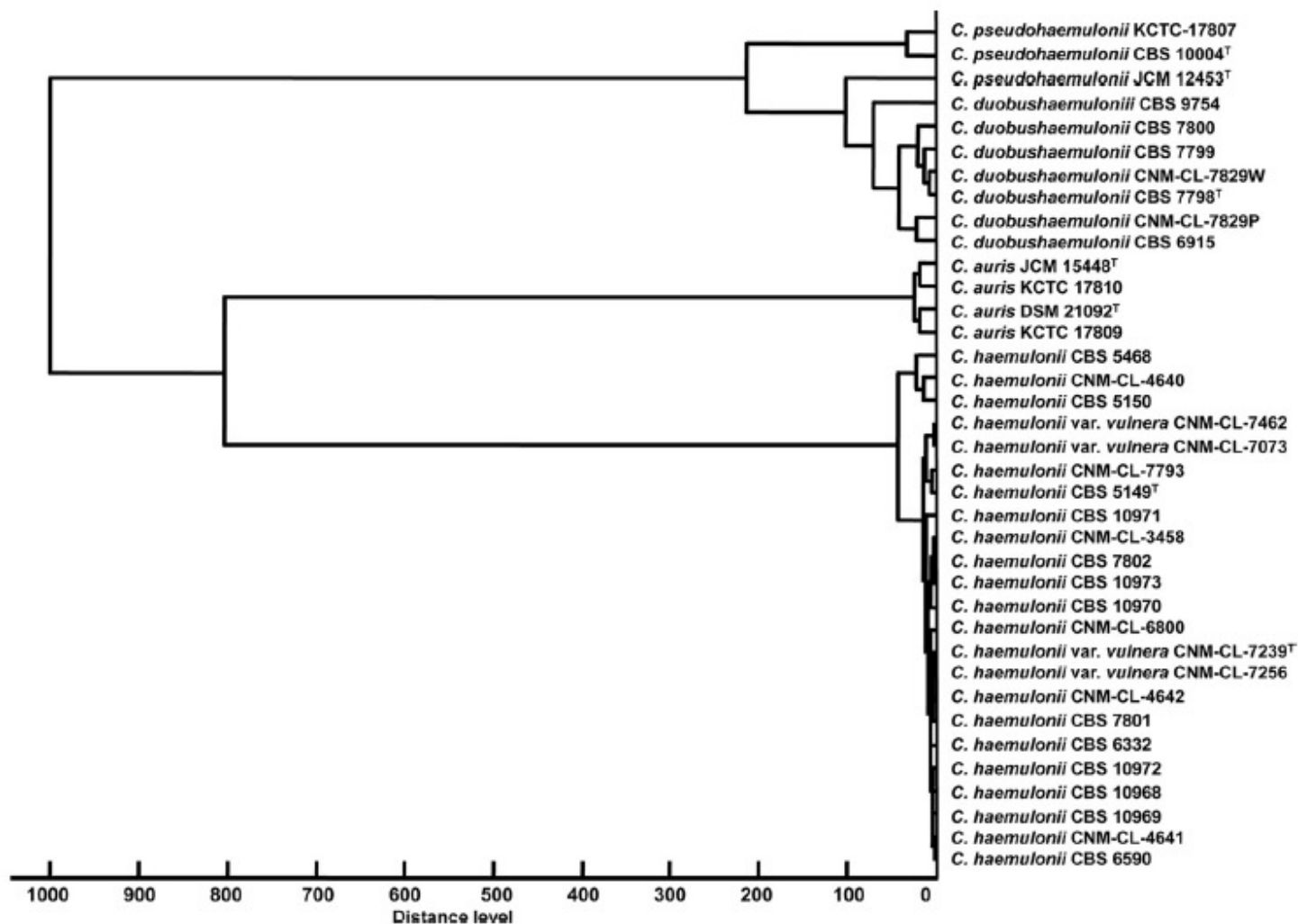


FIG 2 Dendrogram clustering the MALDI-TOF MSP obtained from at least 20 mass spectra of strains belonging to the *C. haemulonii* complex species and related species. *C. auris* JCM 15448^T and DSM 21092^T and *C. pseudohaemulonii* JCM 12453^T were added to make the sampling in MALDI-TOF MS more robust.