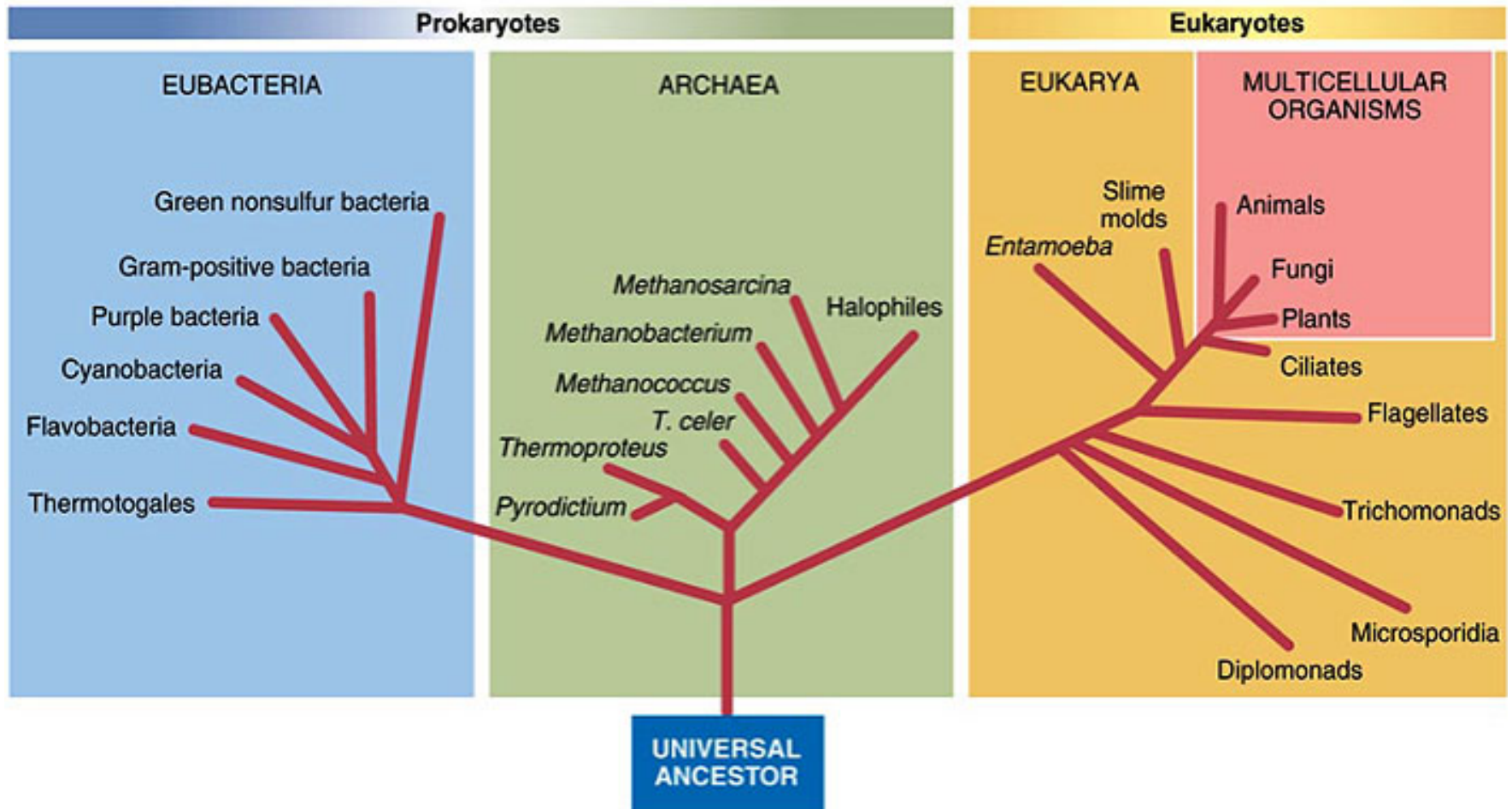


Identificação polifásica de fungos

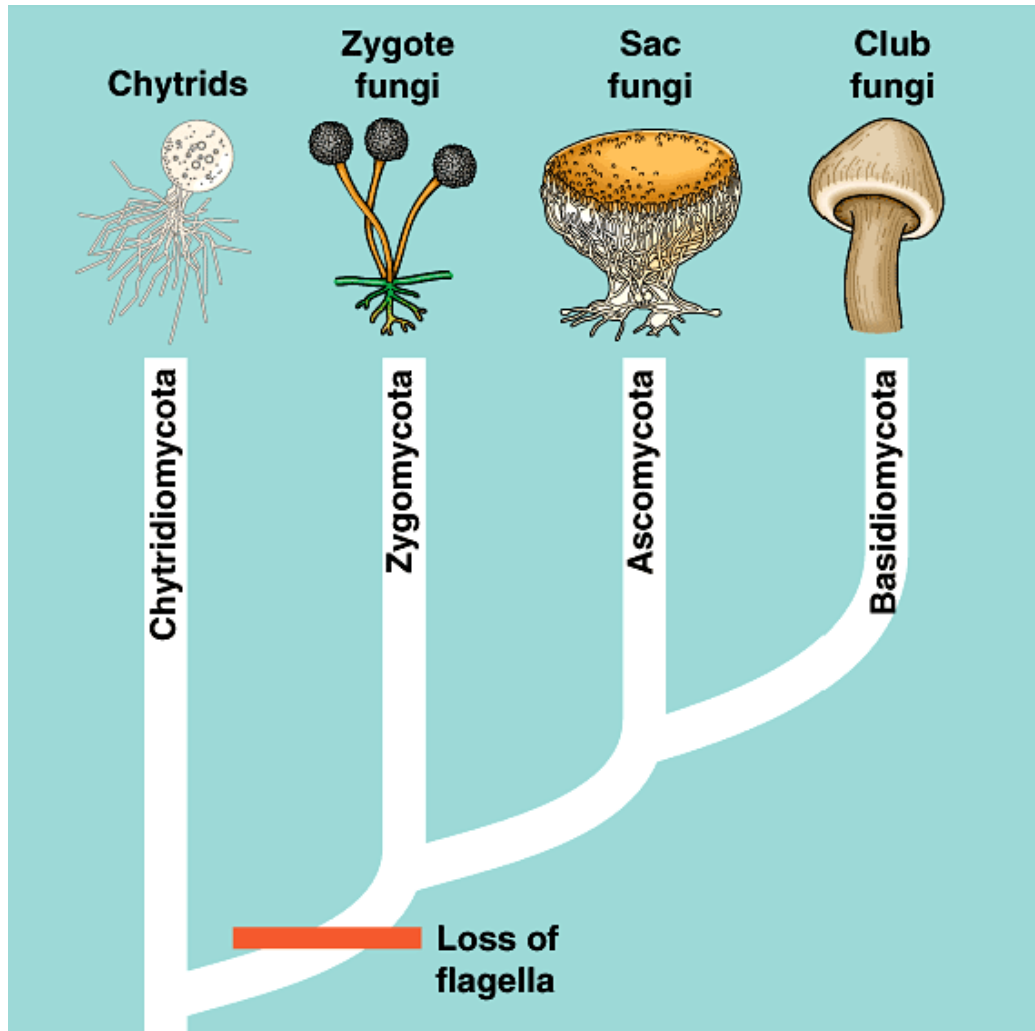
Profa. Kelly Ishida
E-mail: ishidakelly@usp.br

Woese (1977)

Baseada na sequência gênica do DNAr



4 filios:



Originados de um
único ancestral



Grupo
monofilogenético

**“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**

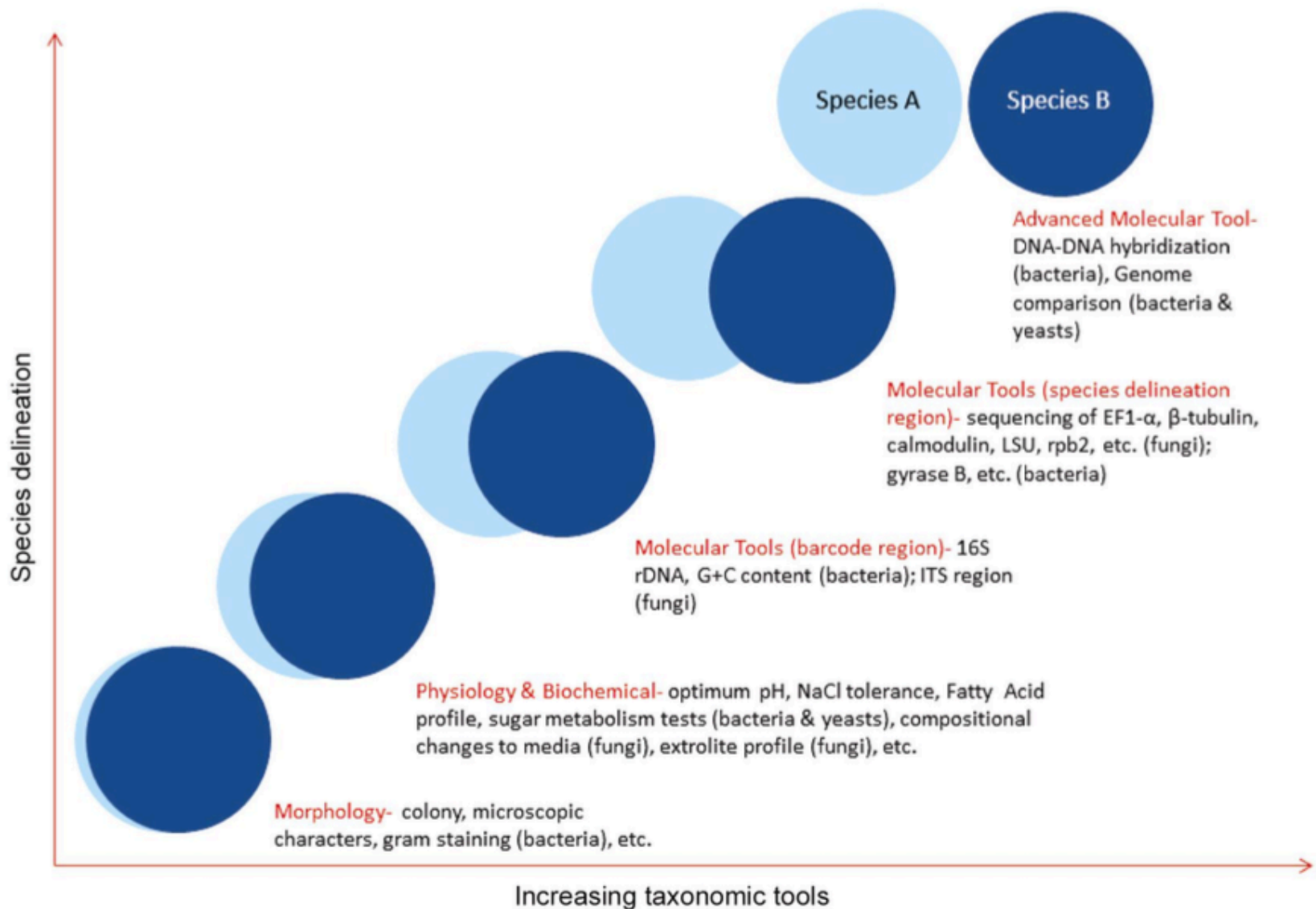
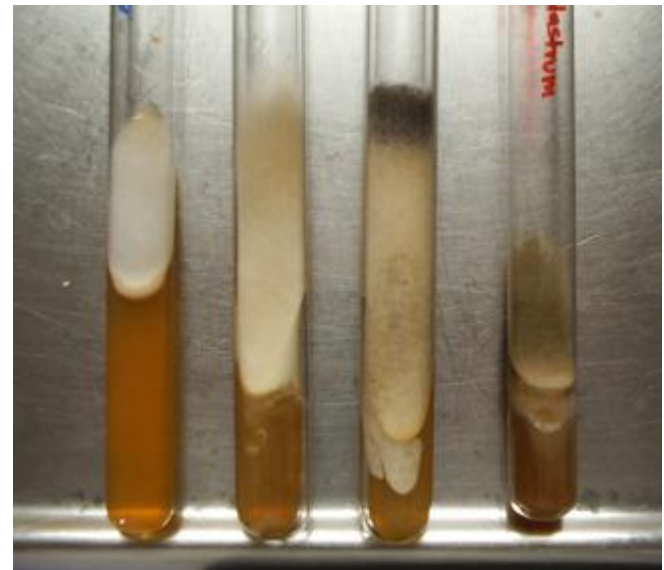


Figure 2. Different criteria used in species delineation of bacteria, archaea and fungi.

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.

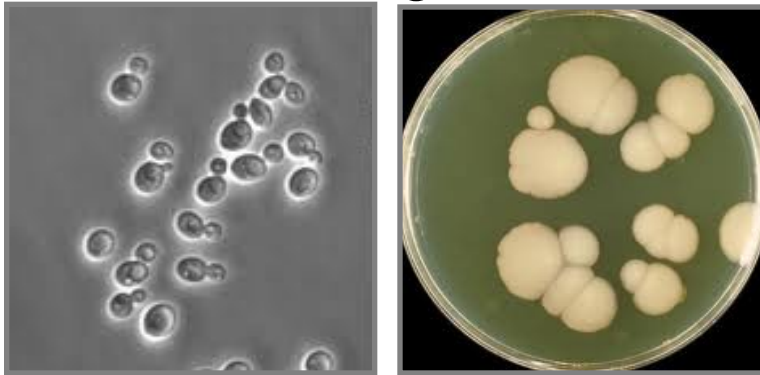
Coleta e isolamento da amostra fúngica



Morfologia

Características macroscópicas da colônia fúngica

- Unicelulares → fungos leveduriformes



Ex. *Saccharomyces cerevisiae*

- Pluricelulares → fungos filamentosos (“bolor”)

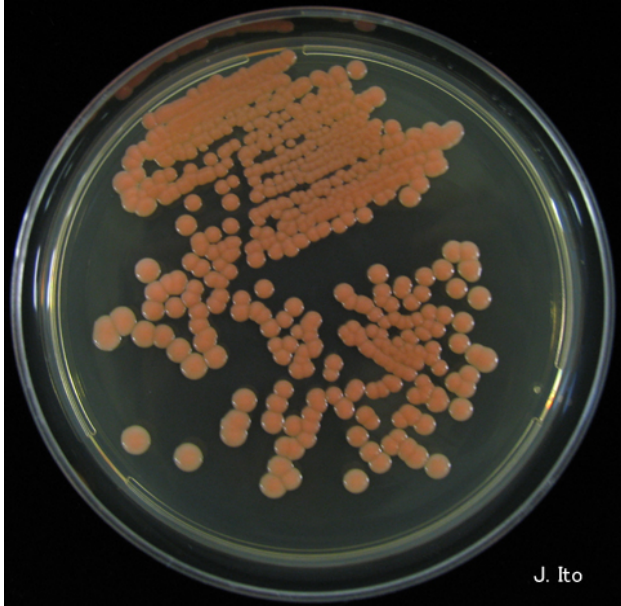
- Hifa – unidade básica do fungo
- Micélio – conjunto de hifas

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

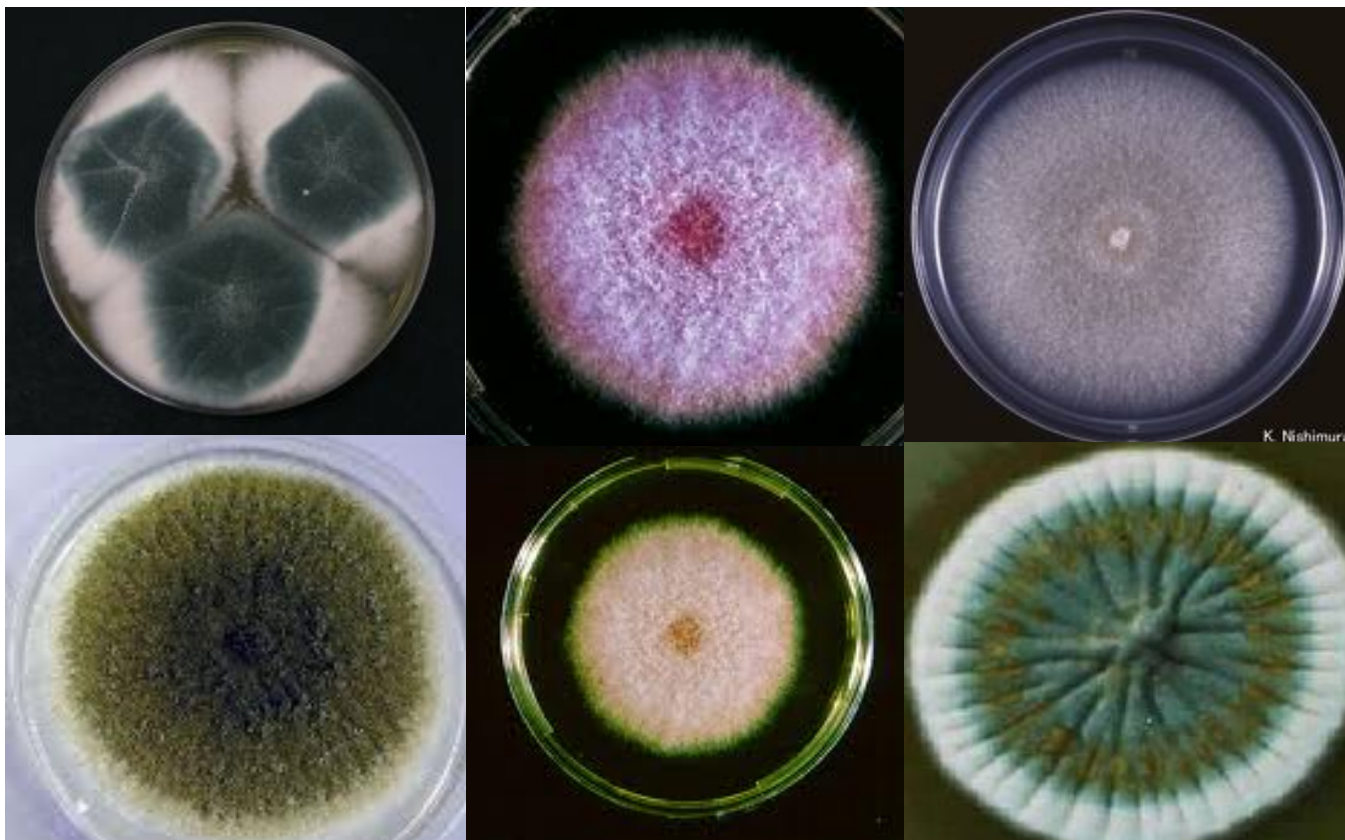


Filamentous



Curled

FUNGOS FILAMENTOSOS



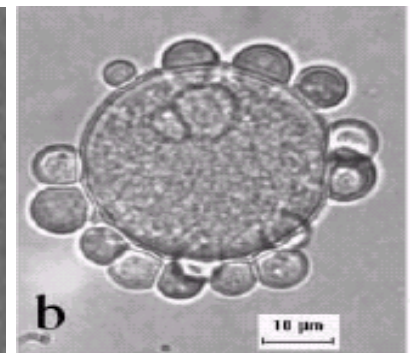
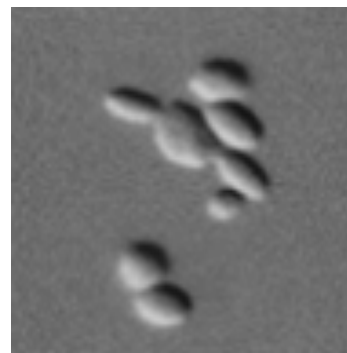
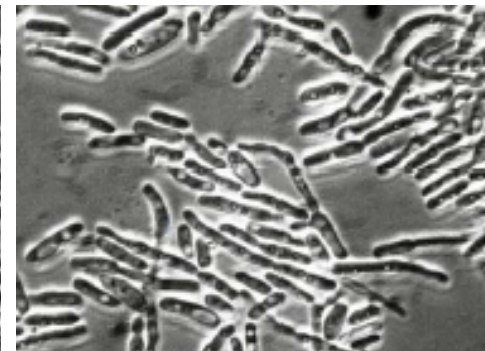
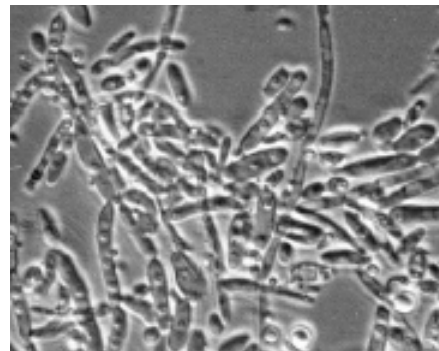
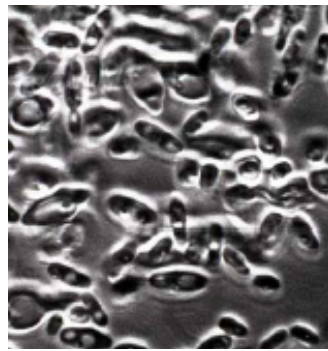
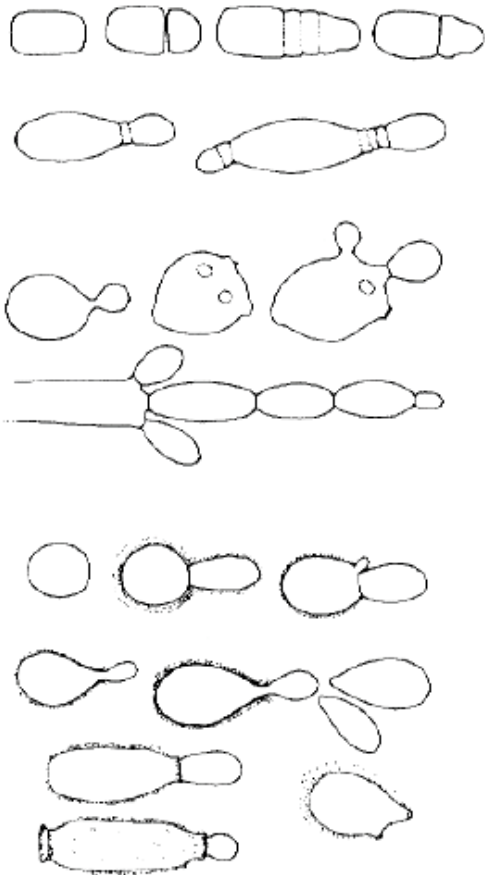
Forma, superfície, margem, coloração verso e reverso, aspecto (seco, úmido), tamanho – dependem do tempo de incubação, meio e temperatura

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

Morfologia

Características microscópicas dos fungos

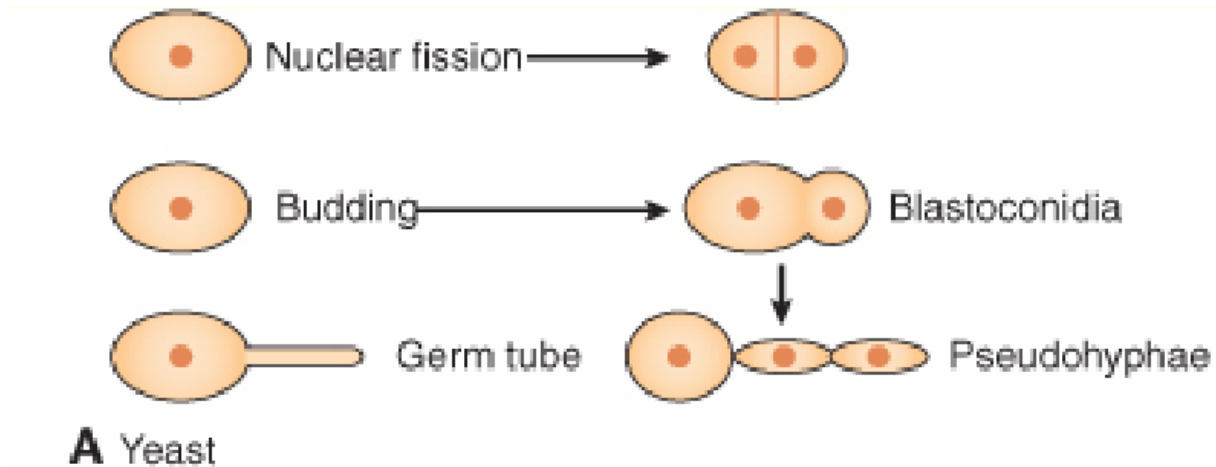
LEVEDURAS



LEVEDURAS

Reprodução assexuada – Formação Blástica

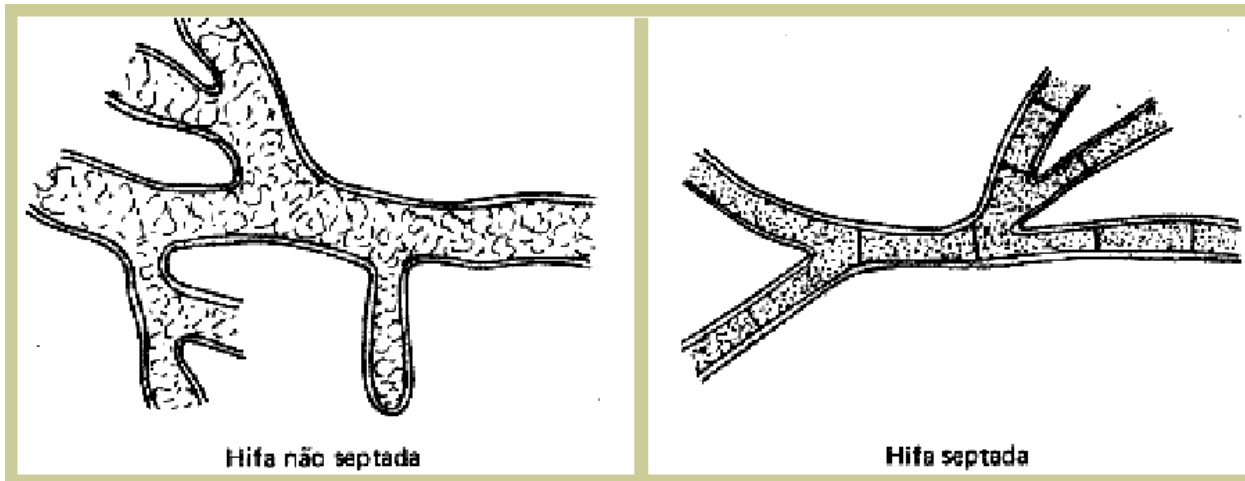
Brotamento / fissão binária



FUNGOS FILAMENTOSOS

Característica microscópica

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

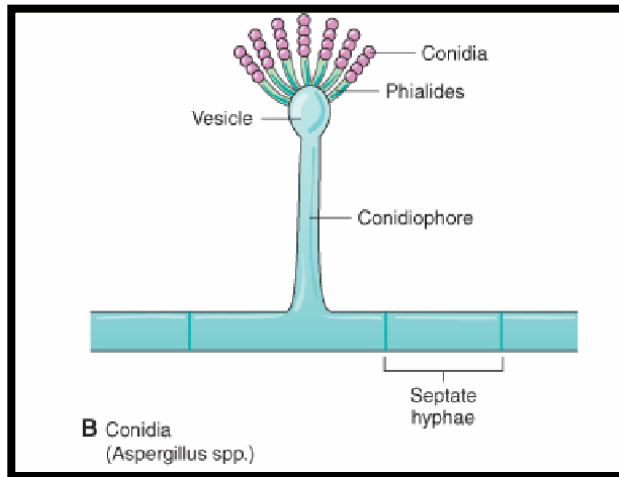


- Septadas x Não-septadas /Contínuas/Cenocíticas
- Hialino X Demáceo
- Espessa X Delgada

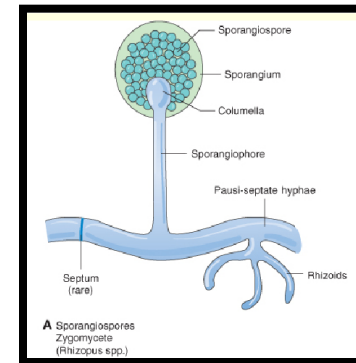
FUNGOS FILAMENTOSOS

Reprodução assexuada – Micélio reprodutivo

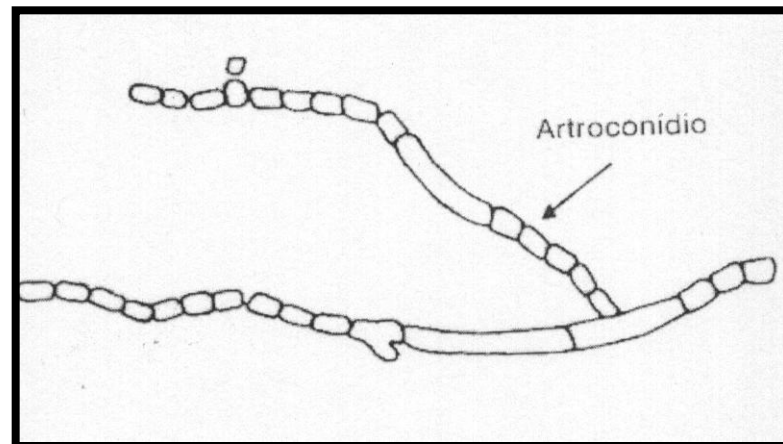
- Formação Blástica (Ascomicetos)



- Formação de Esporângios (Zigomicetos)

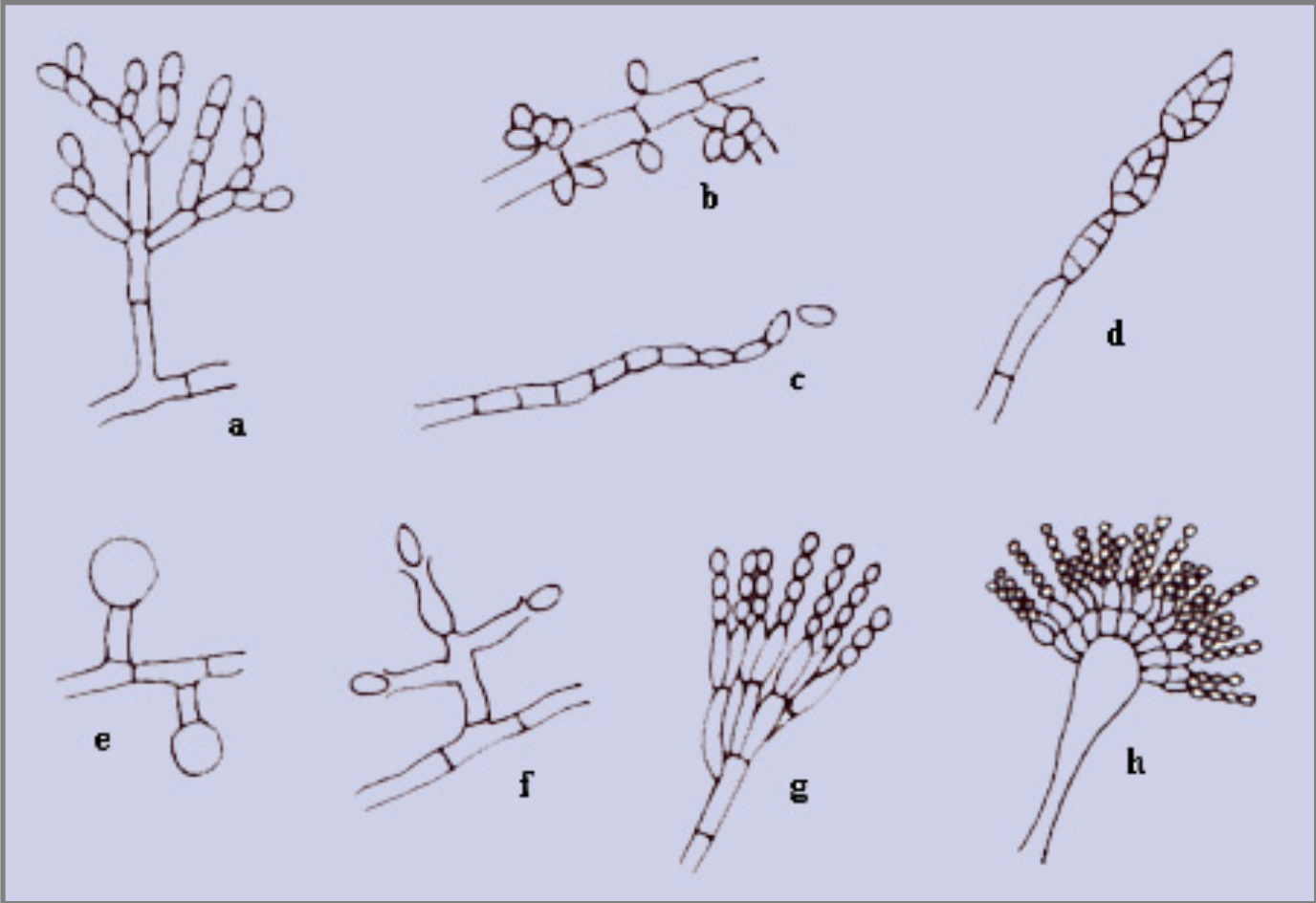


- Formação Tática
Arthroconídios



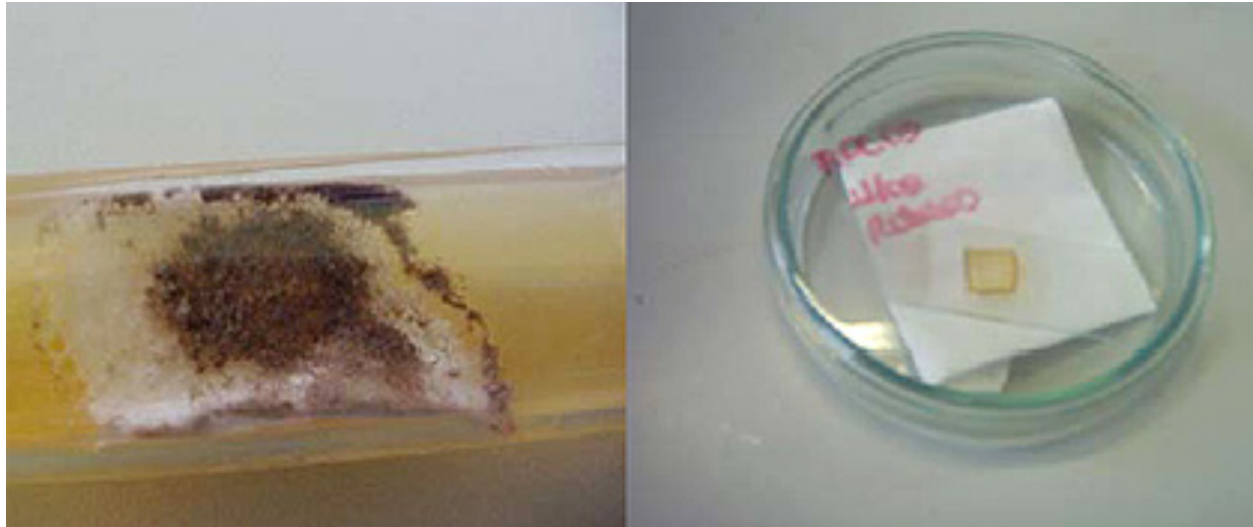
FUNGOS FILAMENTOSOS

Estruturas de reprodução assexuada



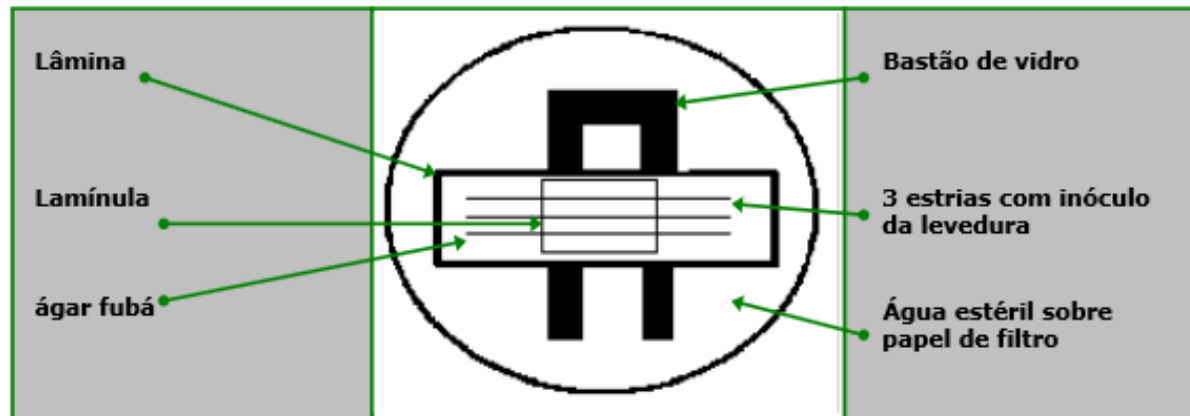
- Técnica de Microcultivo em lâmina

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

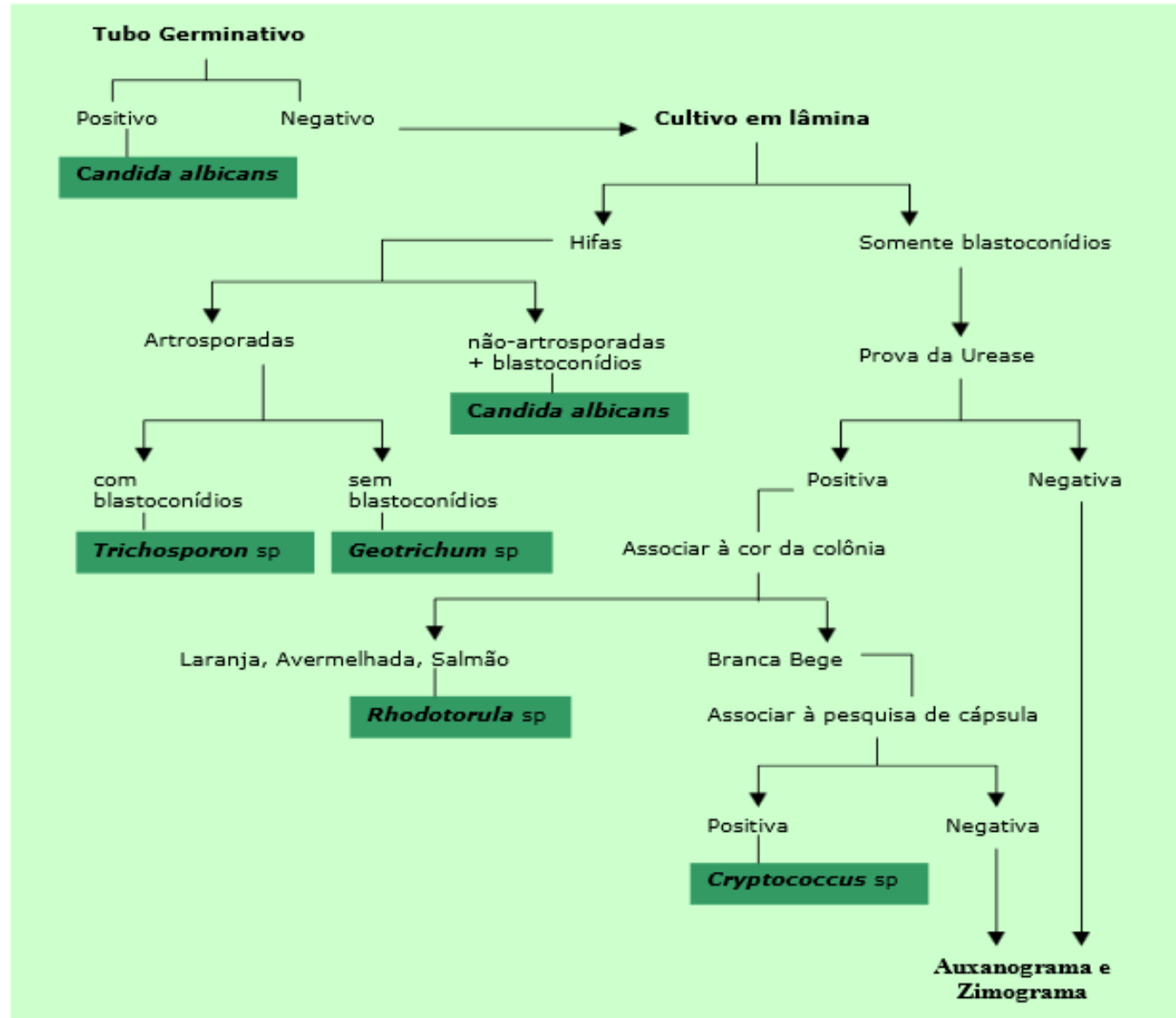
Identificação clássica de fungos

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

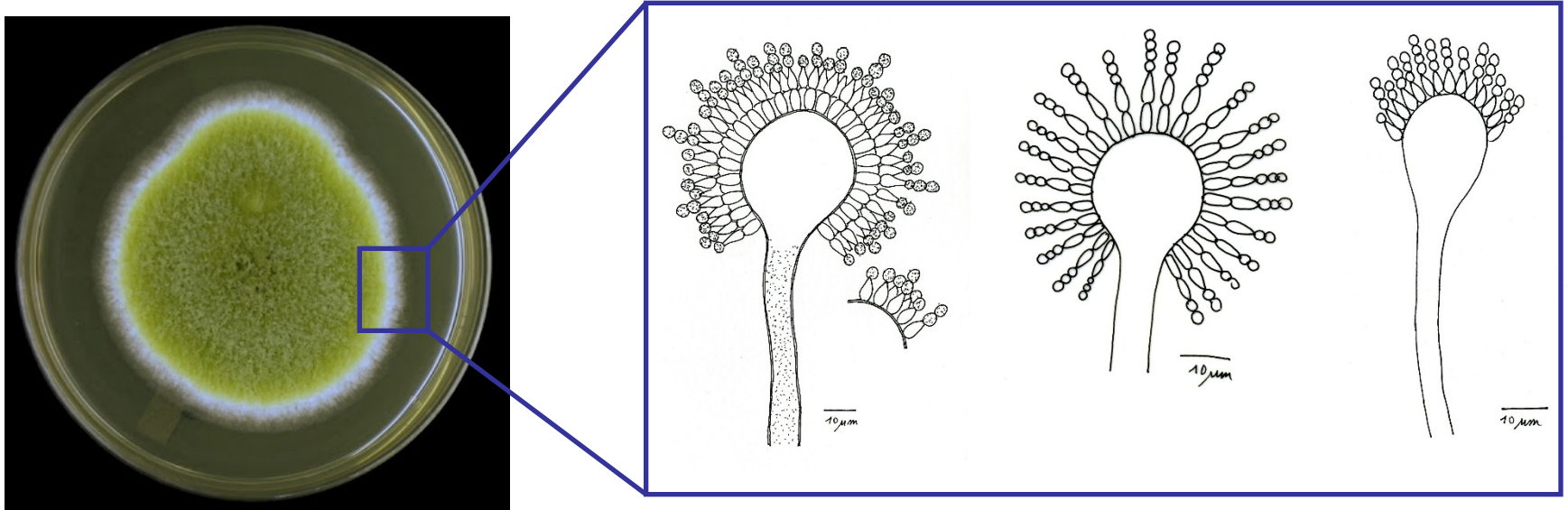


Identificação das principais leveduras de interesse médico

Levedura	Tg	Cultivo em lâmina		Ur	Assimilação									Fermentação					
		Hifa	Ar		Sa	Ma	La	Ce	Tr	Ra	X	I	NO ₃	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

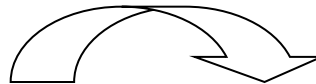
Tg = tubo germinativo, Ar = artrósporo, Ur= urease, Sa = sacarose, Ma=maltose,La = lactose, Ce = celubiose, Tr = trealose, Ra = rafinose, X = xilose, I = inositol,NO₃ = nitrato, Gl = glicose, + = pos, - = neg, V= variável

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

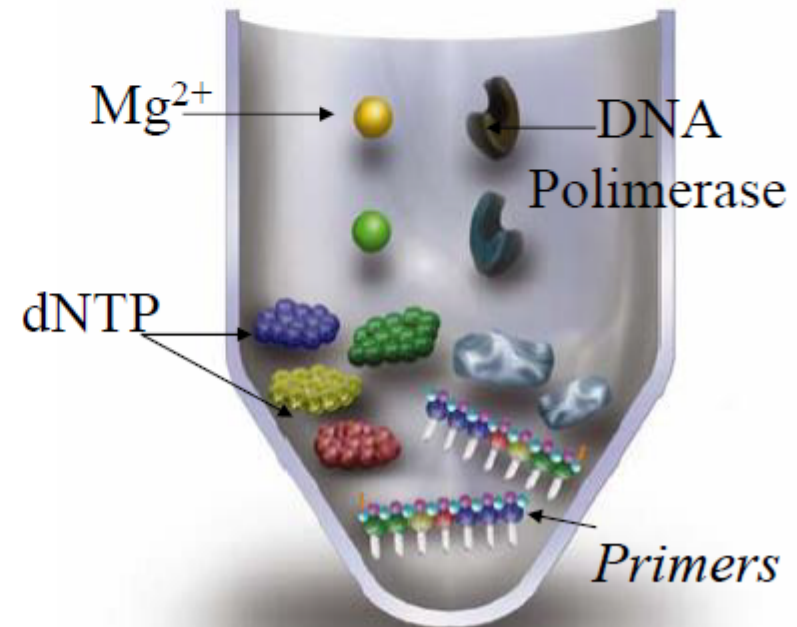
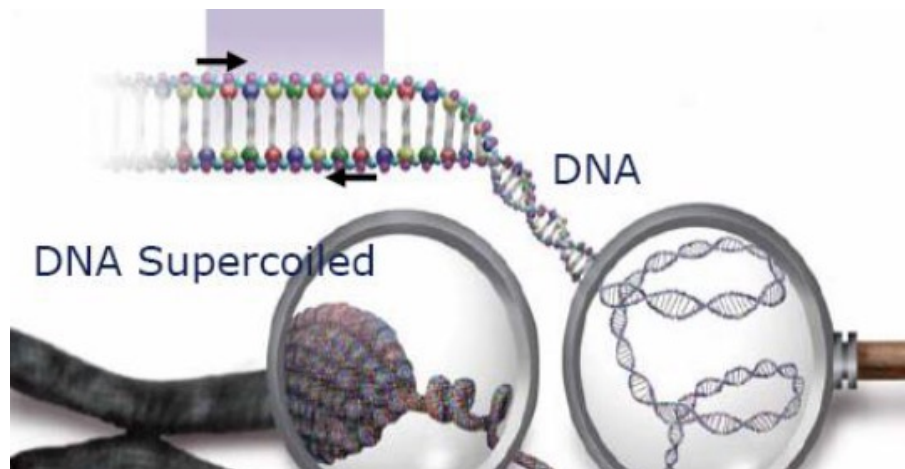
Esses métodos visam a obtenção de Marcadores moleculares do fungo



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

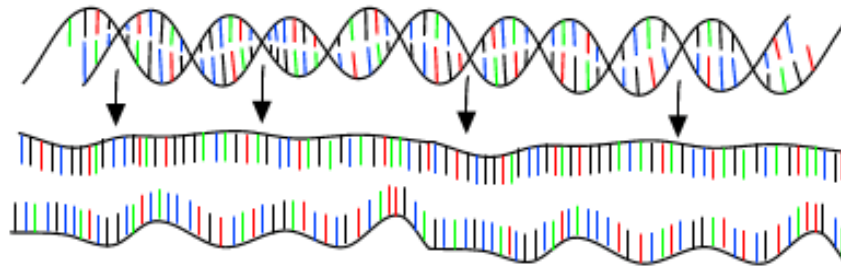
PCR

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



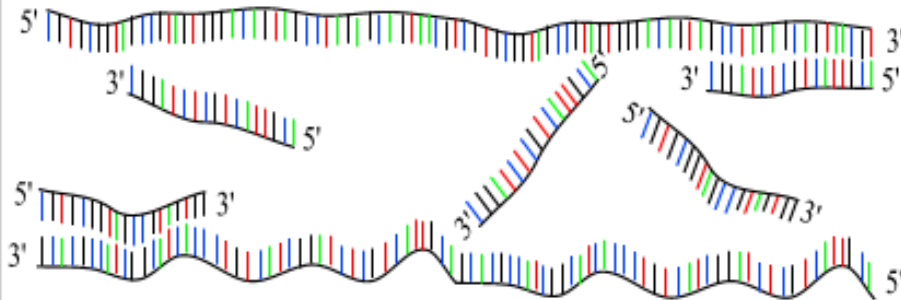
PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :



Step 1 : denaturation

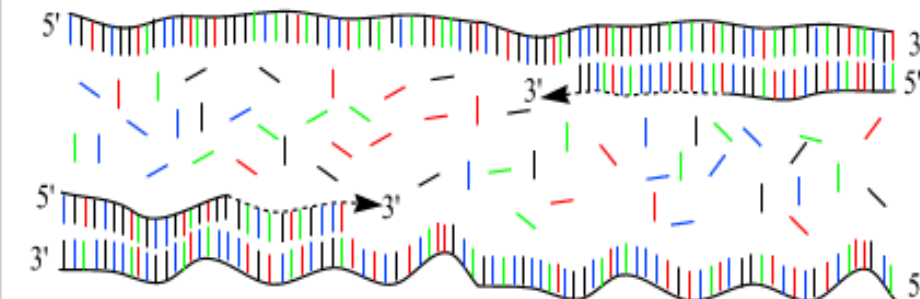
1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

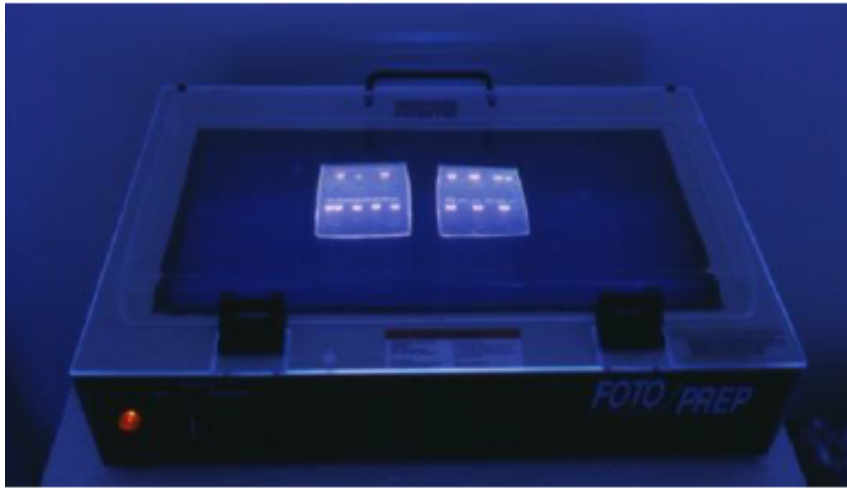
forward and reverse primers !!!



Step 3 : extension

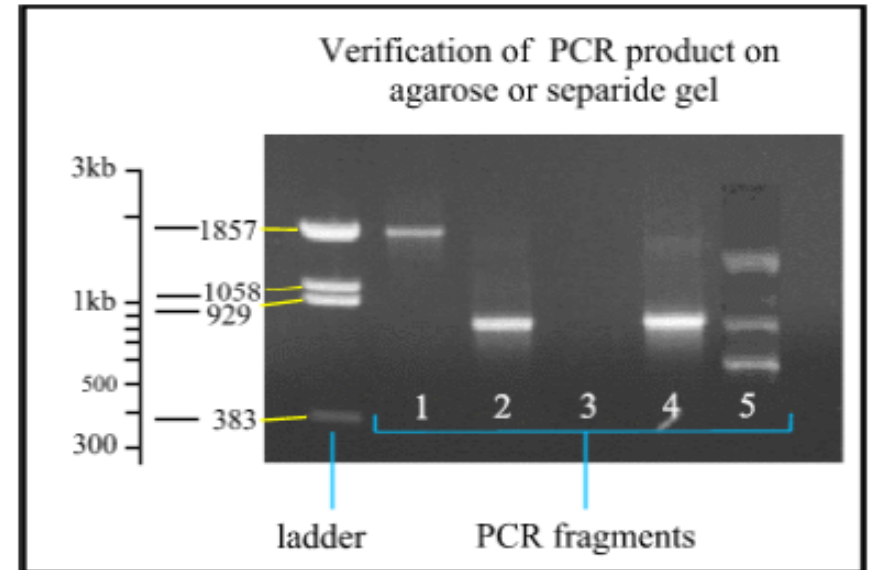
2 minutes 72 °C

only dNTP's



Transiluminador

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

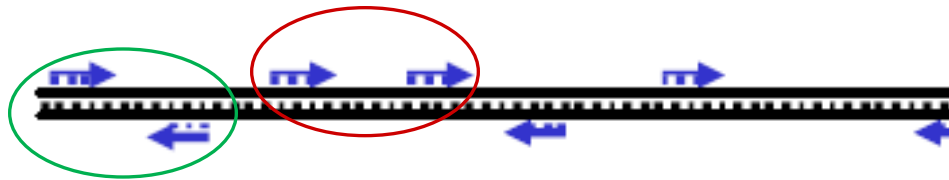


Visualização dos produtos de PCR

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

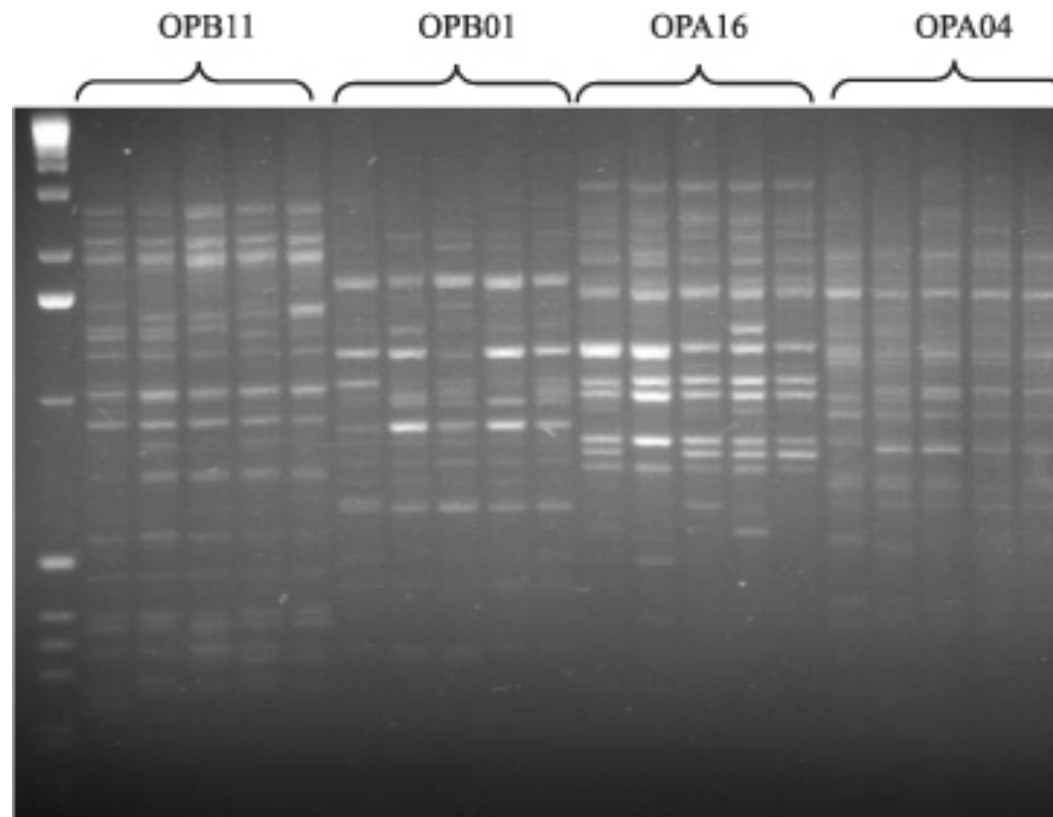


Figura 1. Triagem de oligonucleotídeos iniciadores mostrando diferentes padrões de amplificação.

Como avaliar?

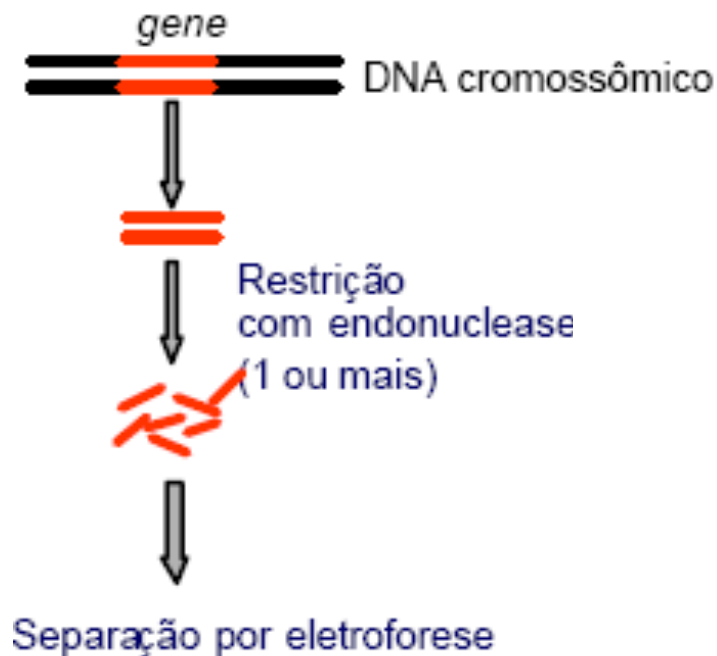
Similaridade das bancas

Construção de um dendograma

Uso de programas de computador

PCR-RFLP - *restriction fragment length polymorphism*

(Polimorfismo de fragmentos de restrição)



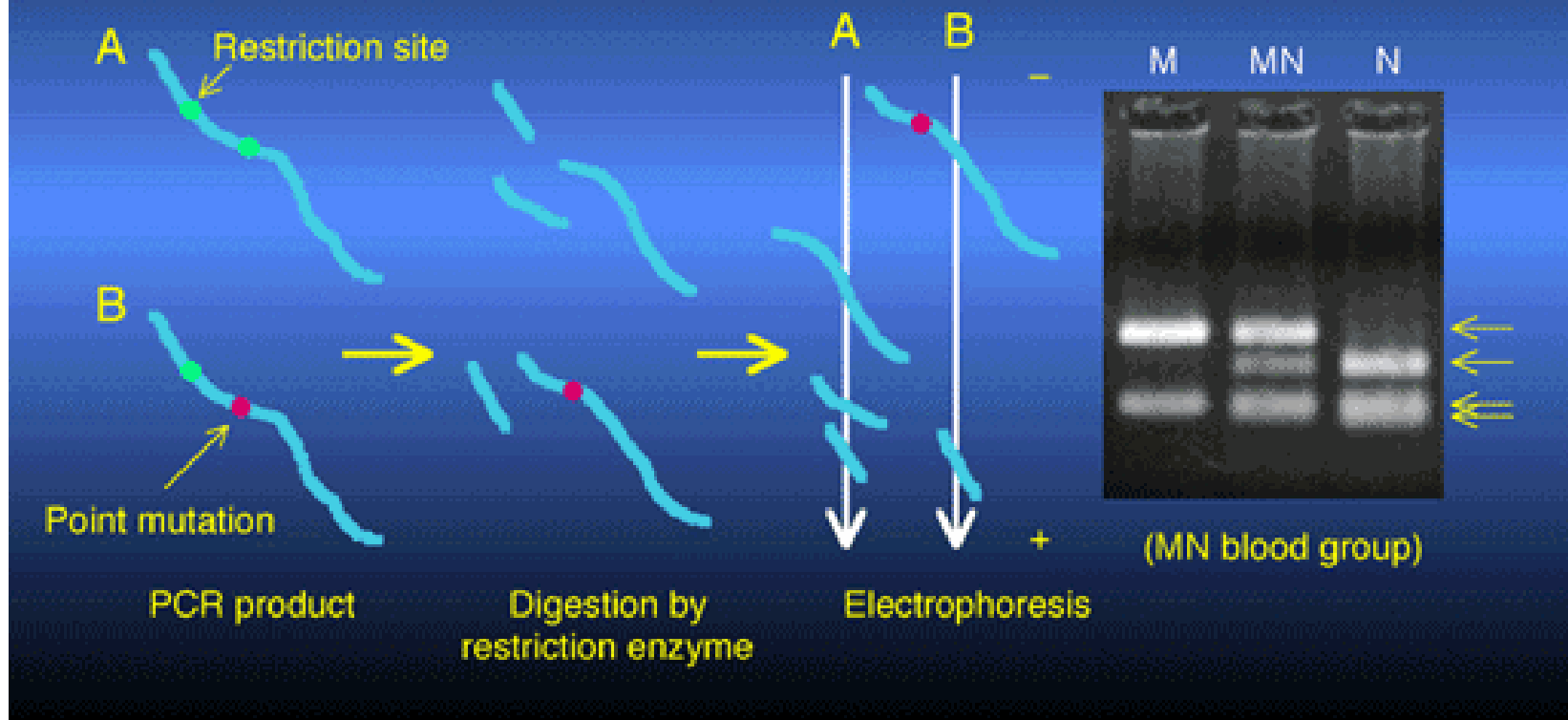
- Consiste
 - amplificação de uma região de um gene pela PCR
 - Seguida de digestão da sequência com enzimas de restrição
 - Objetivo: identificação de polimorfismos de tamanho dos fragmentos.
- Enzima de restrição – cada enzima reconhece um sítio específico
- Fragmentam o DNA em determinadas sequências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

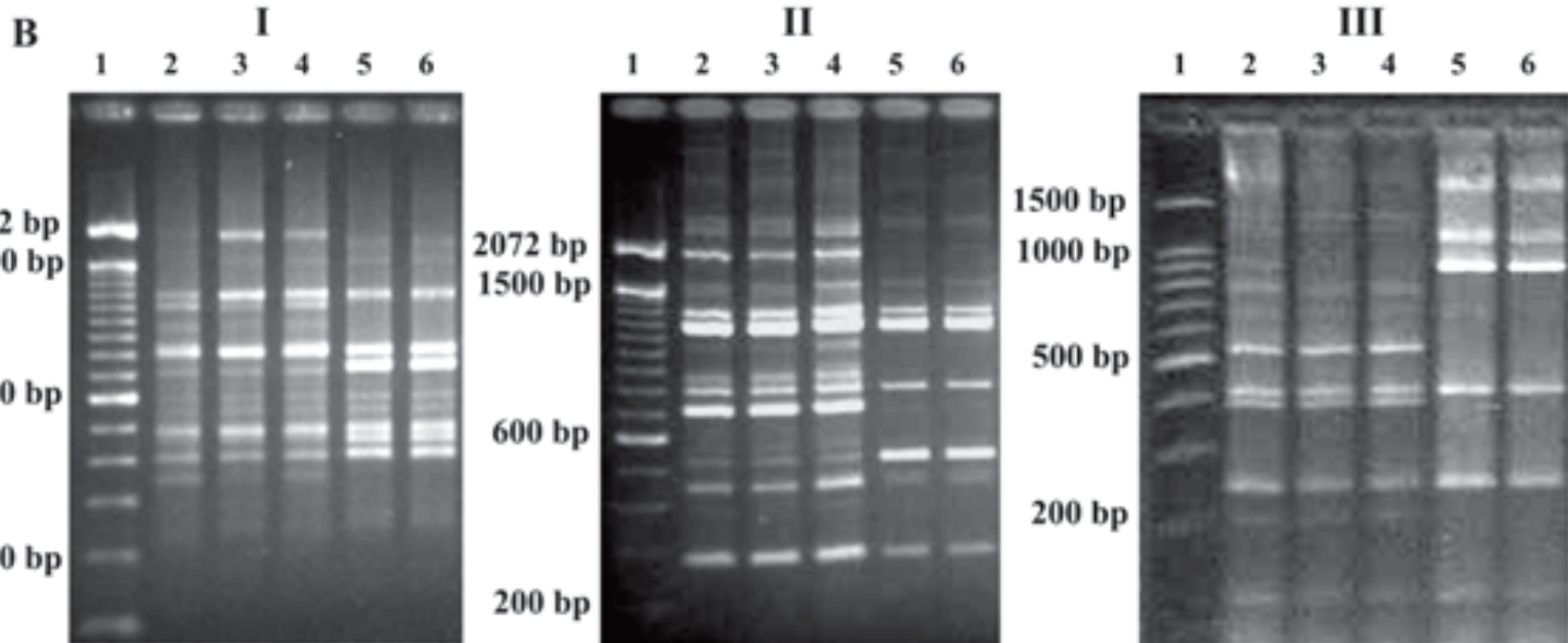


Fig. 2 - A. PCR fingerprinting with primer $(GACA)_4$ (AI) and PLB1-RFLP with *AvaI* (AII) patterns of *C. neoformans*. Lane 1*, molecular weight marker; 2-5, molecular types VNI, VNII, VNIII, VNIV; 6-9, molecular types VGI, VGII, VGIII, VGIV – **B.** Representative gel of $(GACA)_4$ -PCR fingerprinting (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).

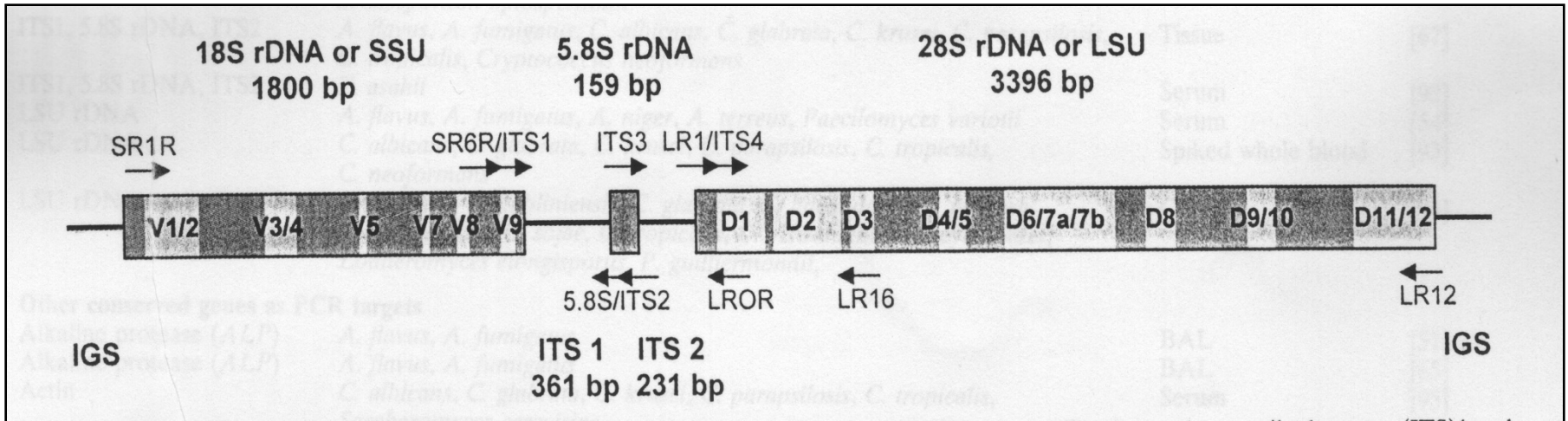
- **PCR específico**

- **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



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'-ATTGCTTGCGGGCGGTAACGTCC-3'
<i>C. glabrata</i>	5'-TAGGTTTTACCAAC TCGGTGTT-3'
<i>C. parapsilosis</i>	5'-TCTTTTCCTCCGCTTAT 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.

Table 1: Identification of yeasts isolated from vaginal fluid by standard mycological methods and seminested Polymerase Chain Reaction (snPCR), and % agreement between the yeast identification methods.

Yeasts	N° isolates (%) identified by:		% agreement
	snPCR	Standard mycological	
<i>Candida</i> sp.	4 (3.9)*	1 (1.0)**	0
<i>Candida albicans</i>	94 (93.1)	86 (85.2)	89.6
<i>Candida parapsilosis</i>	1 (1.0)	2 (2.0)	50.0
<i>Candida tropicalis</i>	1 (1.0)	2 (2.0)	0
<i>Candida krusei</i>	0 (0)	1 (1.0)	0
<i>Candida glabrata</i>	0 (0)	6 (5.8)	0
<i>Candida lusitanae</i>	0 (0)	1 (1.0)	0
<i>Candida stellatoidea</i>	0 (0)	2 (2.0)	0
non- <i>Candida</i> genus	1 (1.0)	0 (0)	0

**Candida* sp. (non-*albicans*, non-*parapsilosis*, non-*tropicalis* and non-*glabrata* species);

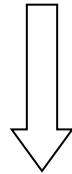
***Candida* sp. (non-*albicans*).

Taxonomia de Fungos

Filogenia



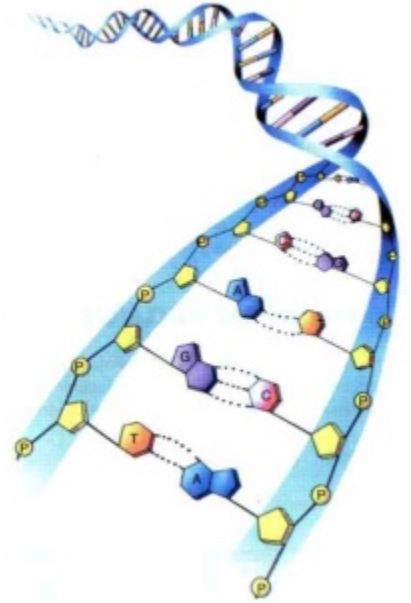
**Sequenciamento do
DNA**



Determinar sequência de nucleotídeos do DNA



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

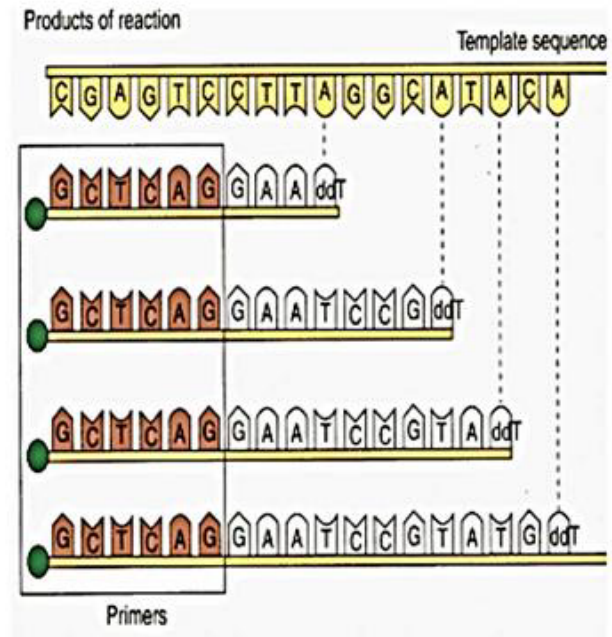
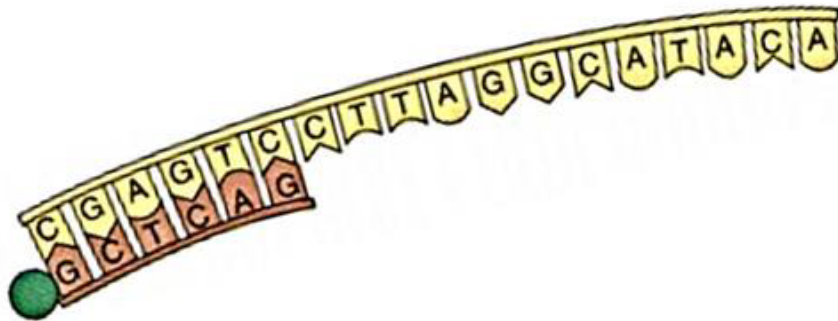


Sequenciamento de DNA

Método de Sanger

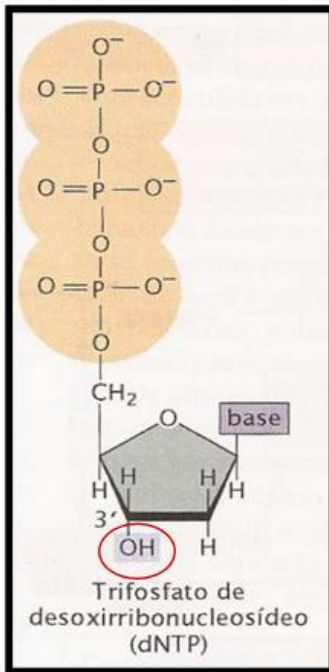
Método de Didesóxinucleotídeos ou Terminação em Cadeia

Descrito por Sanger et al., 1977

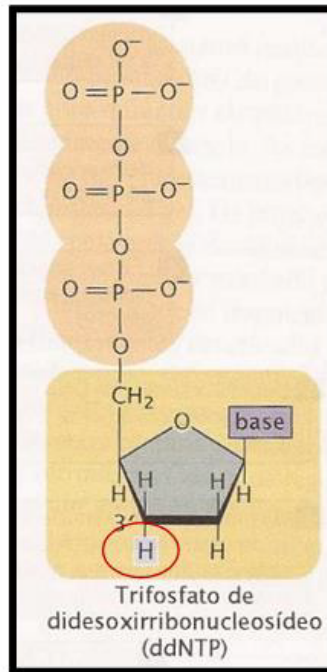


Método de Sanger

- ✓ Substrato especial para síntese de DNA



LIGAÇÃO FOSFODIESTER



Finalizam a síntese de DNA

ddNTP

- ✓ São incorporados na cadeia crescente de DNA

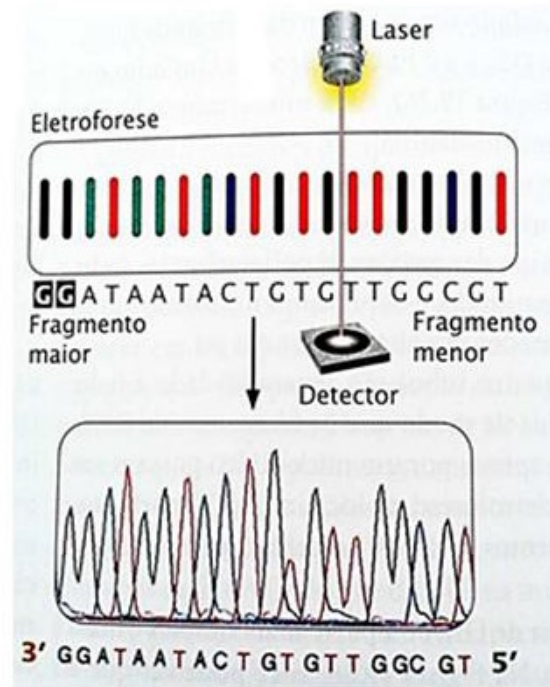
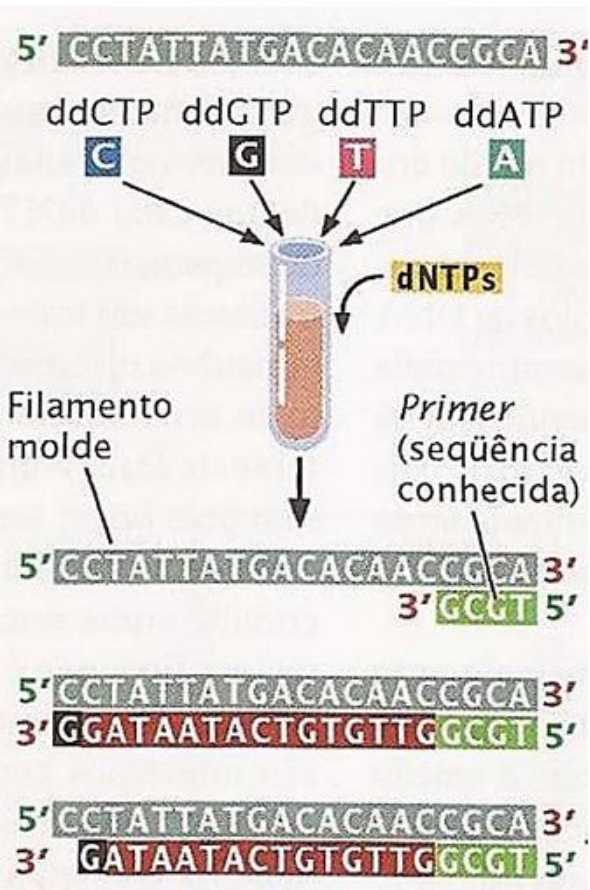


- ✓ Nenhum outro dNTP é adicionado



~~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

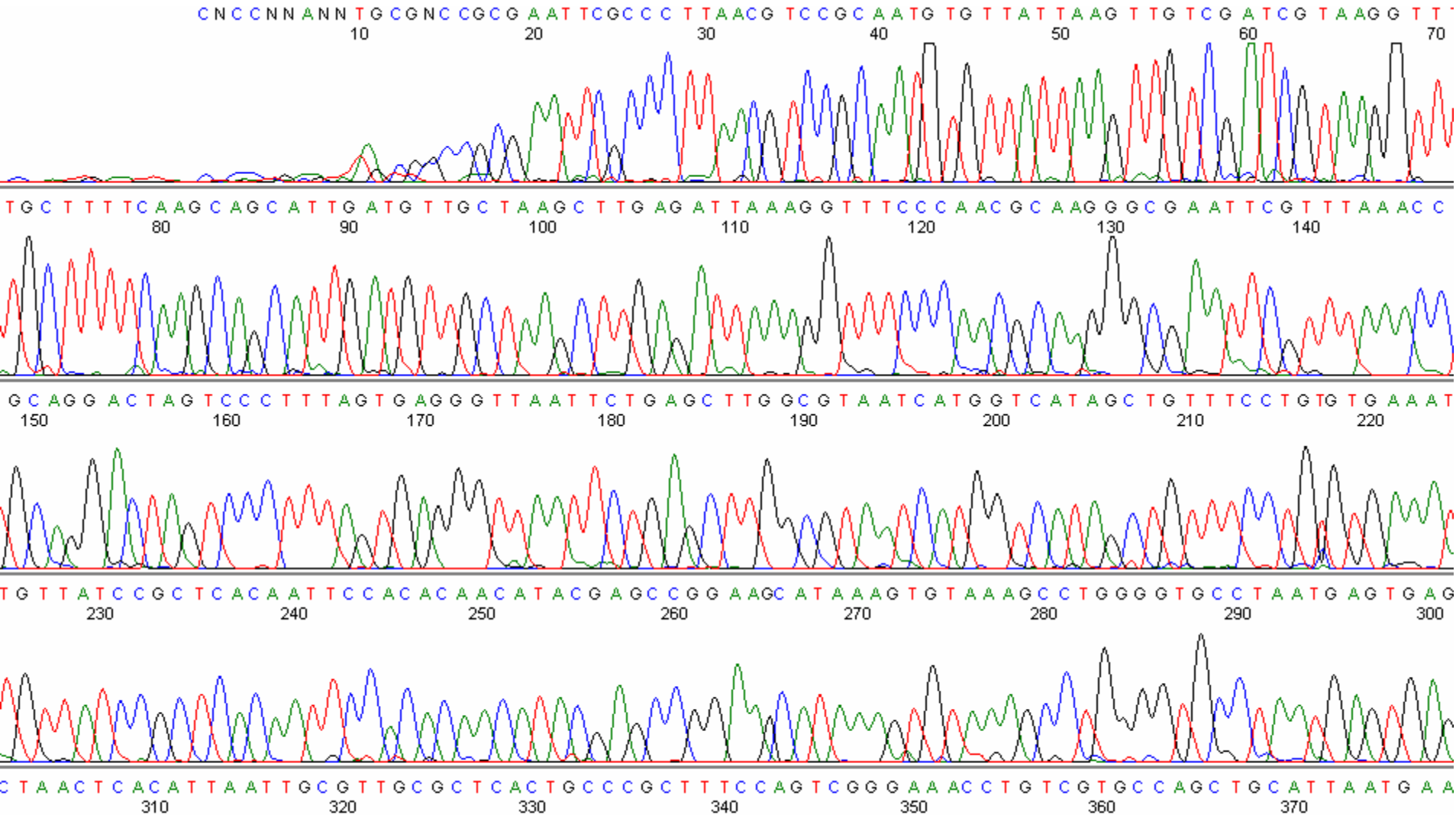


Cada fragmento aparece como um pico, sendo que a cor do pico indica a base representada

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)
- Construção de árvore filogenética (MEGA 4.0, PHILIP, ou PAUP, ARB)

Calmodulina

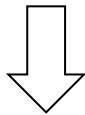
EF1- α

Até 2007:

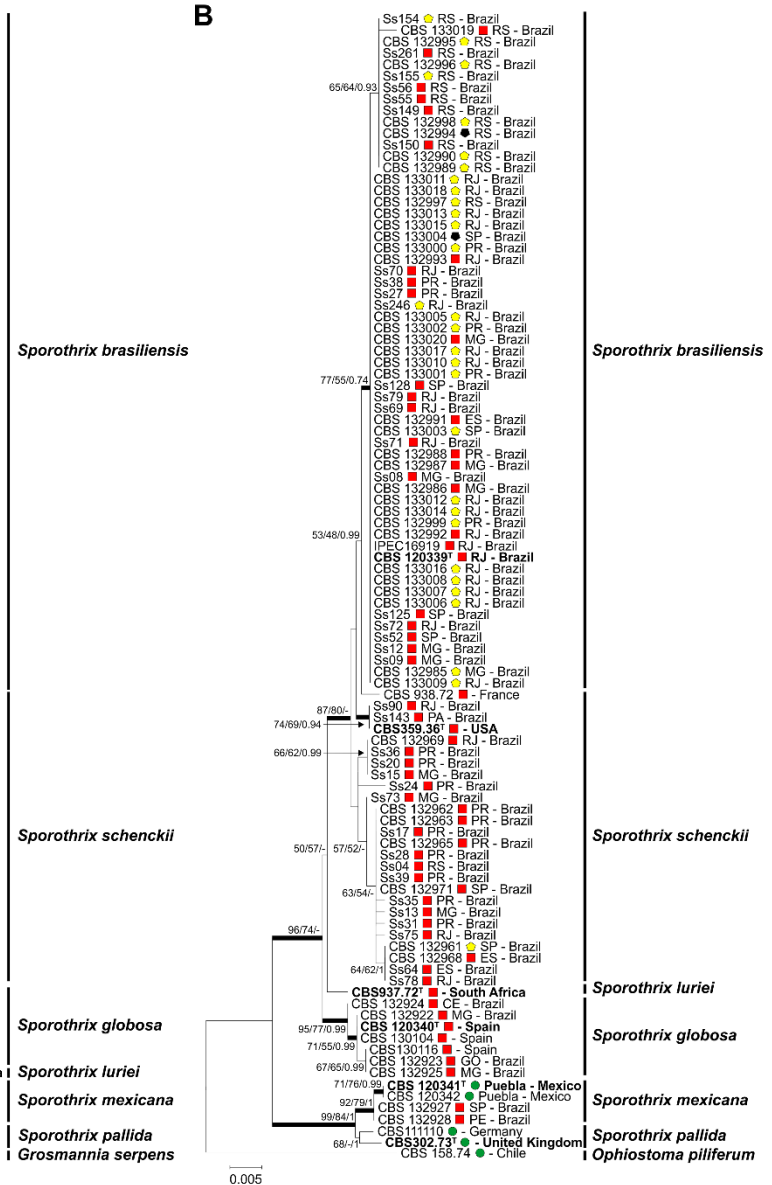
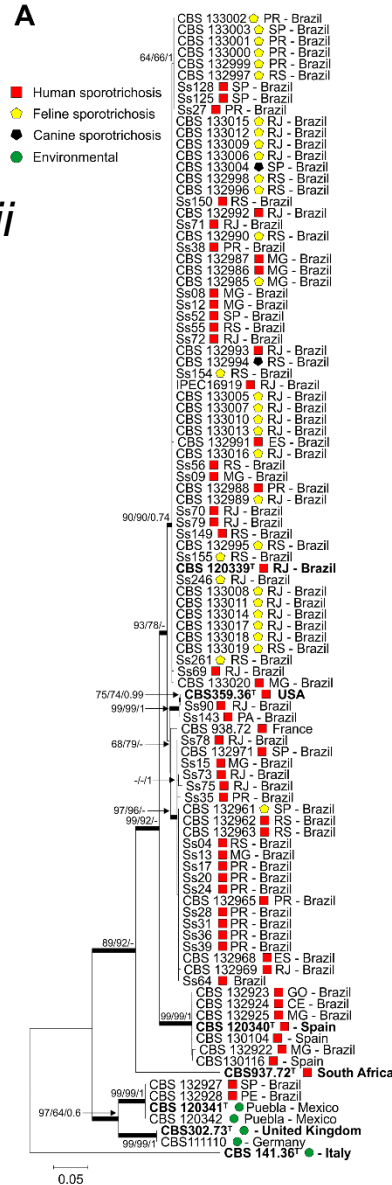
Todos isolados eram classificados como *S. schenckii*

Diferenças morfológicas sutis (colônia, micélio reprodutivo e leveduras)

Análise molecular!



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



Recentemente ...

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

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

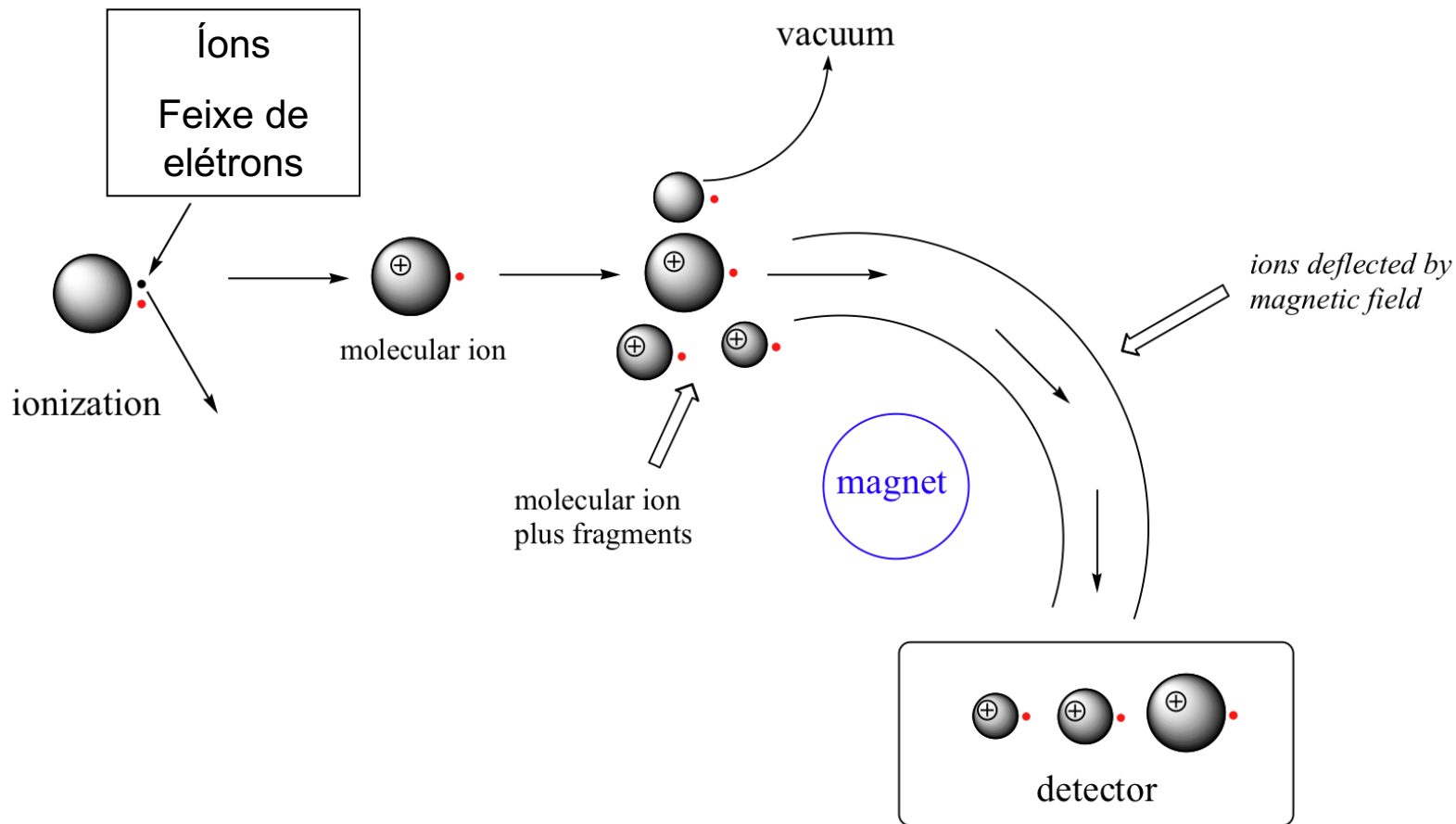
“Balança molecular”



Daltons (Da) = u =
unidade de massa
atômica

O que é espectrometria de massas?

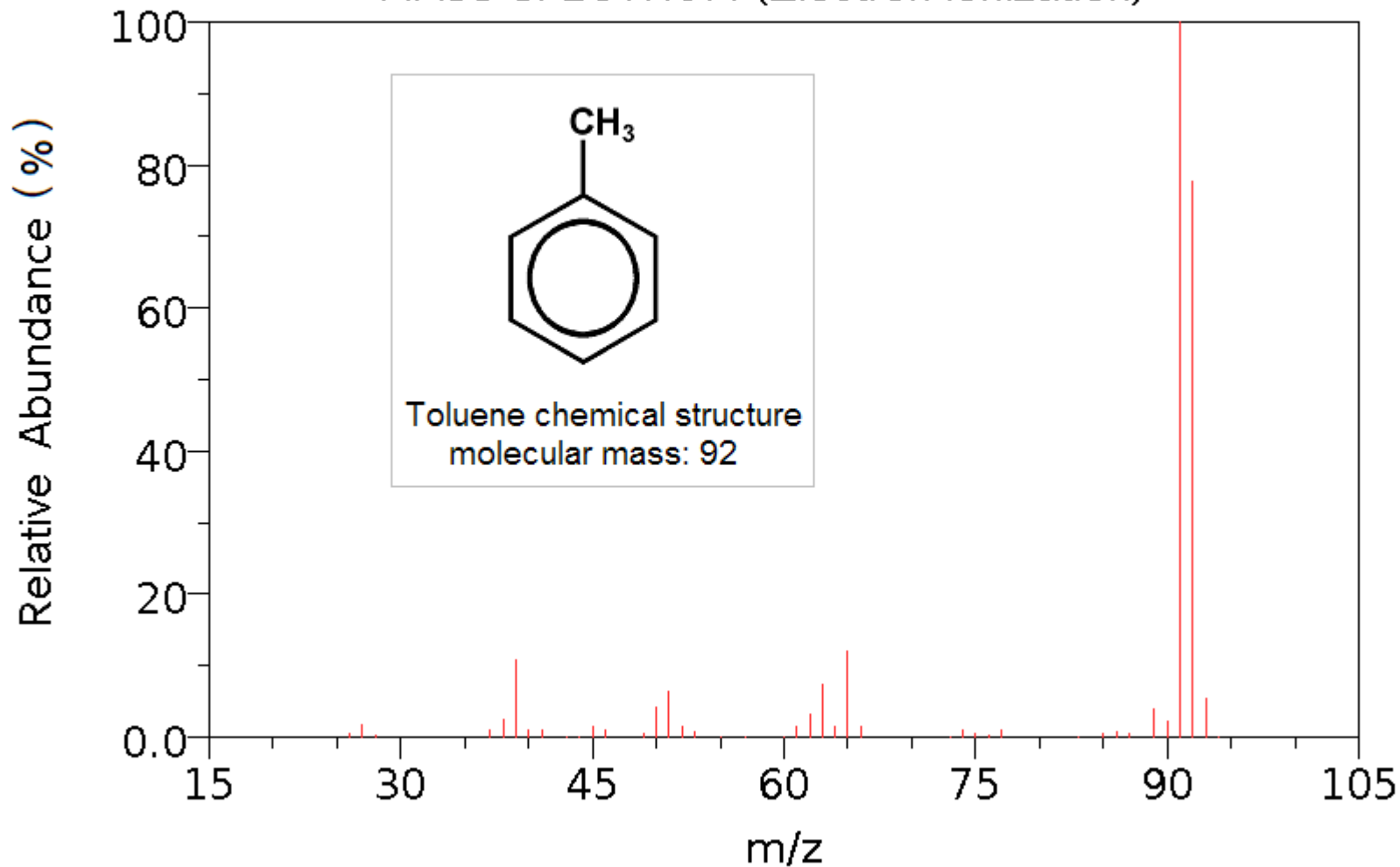
- Técnica analítica em que todos os átomos ou moléculas de uma amostra são ionizados (Feixe de íons ou elétrons) – gera fragmentos - separados de acordo com suas massas (m/z) - detectados e quantificados.
- É uma ferramenta analítica utilizada para medir a massa molecular de uma amostra. Cada molécula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



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

Toluene C₇H₈

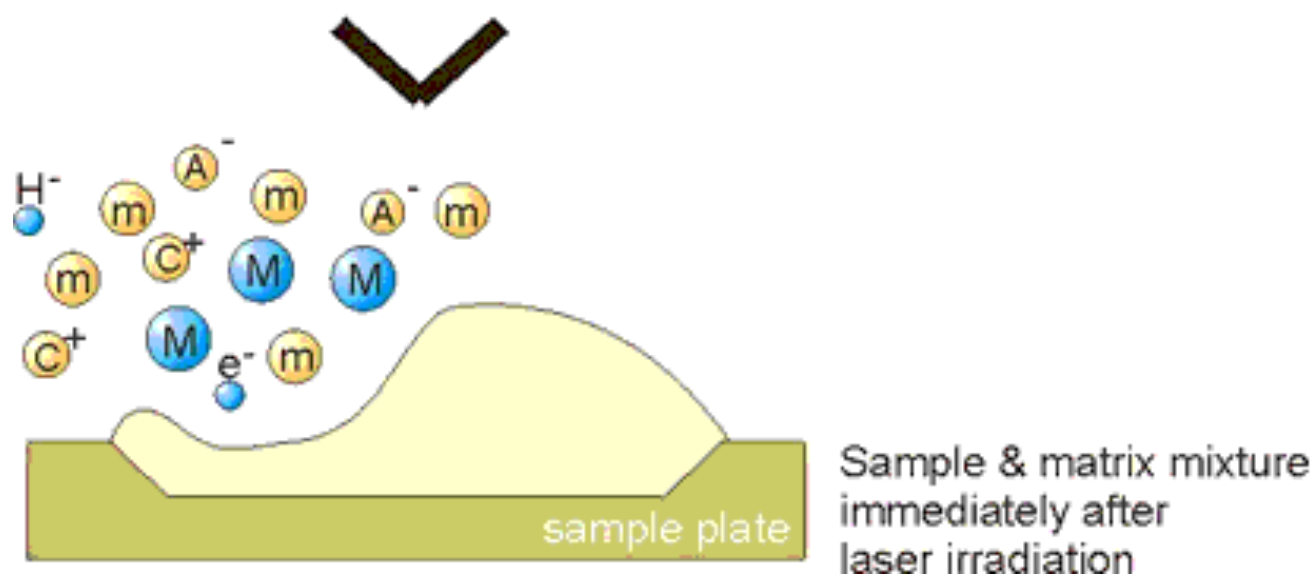
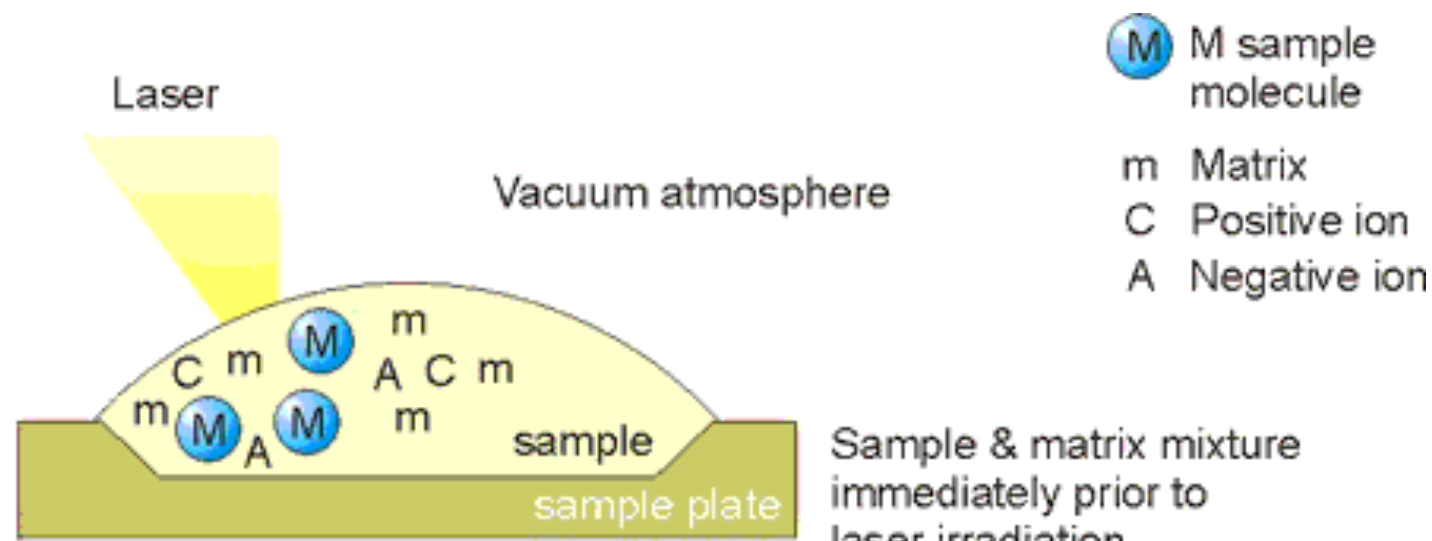
MASS SPECTRUM (Electron Ionization)



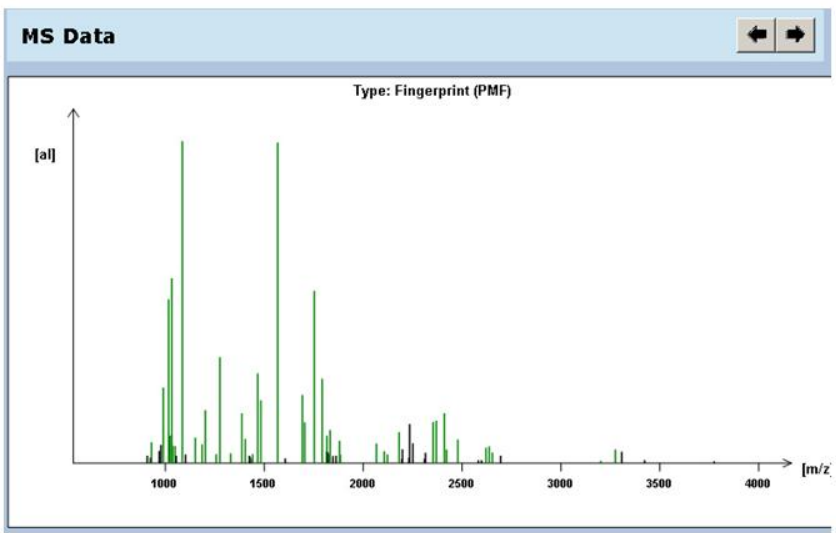
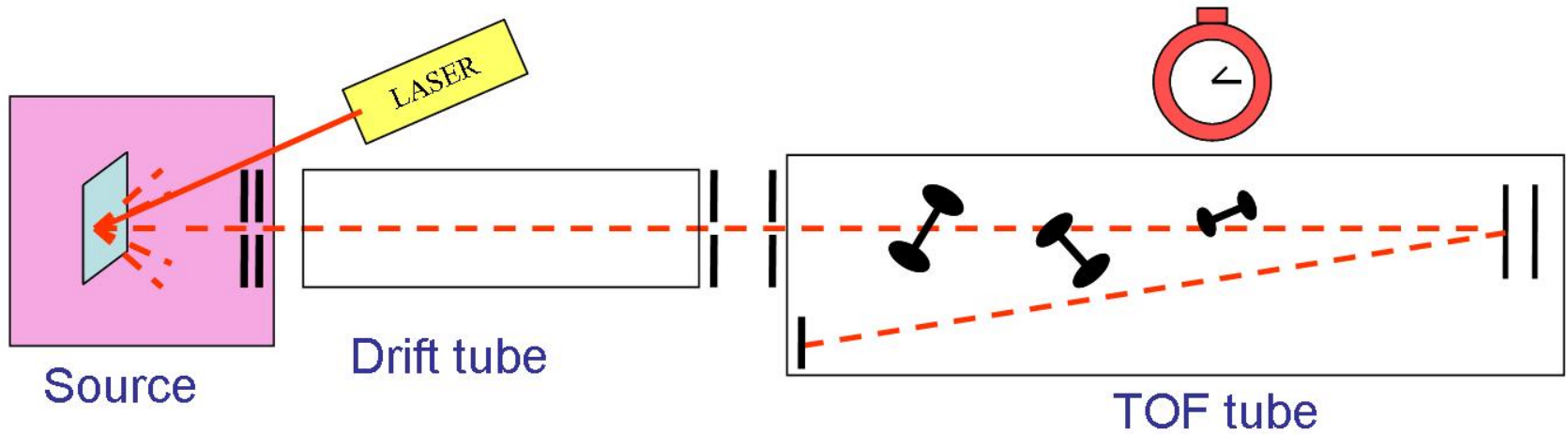
NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

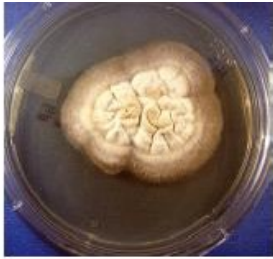
MALDI

- ***“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





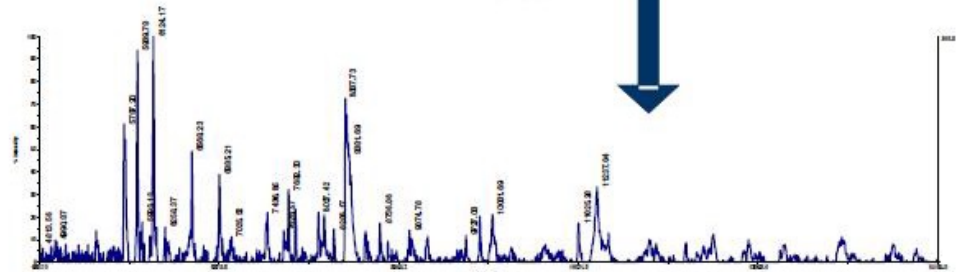
Microbial sample (1)



MALDI-TOF sample plate (2)



MALDI-TOF sample plate (3)



Commercial MALDI TOF Systems for Microbial Identification



Company	Comments
Bruker Daltonics (Hardware, software - MALDI Biotyper, and database)	Cell lysis on target plate or preparatory extraction, as appropriate Concentrates on 100 peaks max (exceeding defined signal/noise ratio)
Shimadzu Axima Assurance and Launchpad software Anagnostec GmbH (SARAMIS database) Acquired by bioMérieux "VITEK MS"	Cell lysis on target plate (intact cells, including yeasts) "SuperSpectra" analyzes spectra recognizing species, genus, and family specific peaks; designed to account for media effect, age of culture, etc; designed to recognize mixed cultures
Andromas	Cell lysis on target plate Conserved species-specific peaks, minimum relative intensity (ie, above predefined threshold)

Disclaimer – Possible omissions/updates - field rapidly evolving