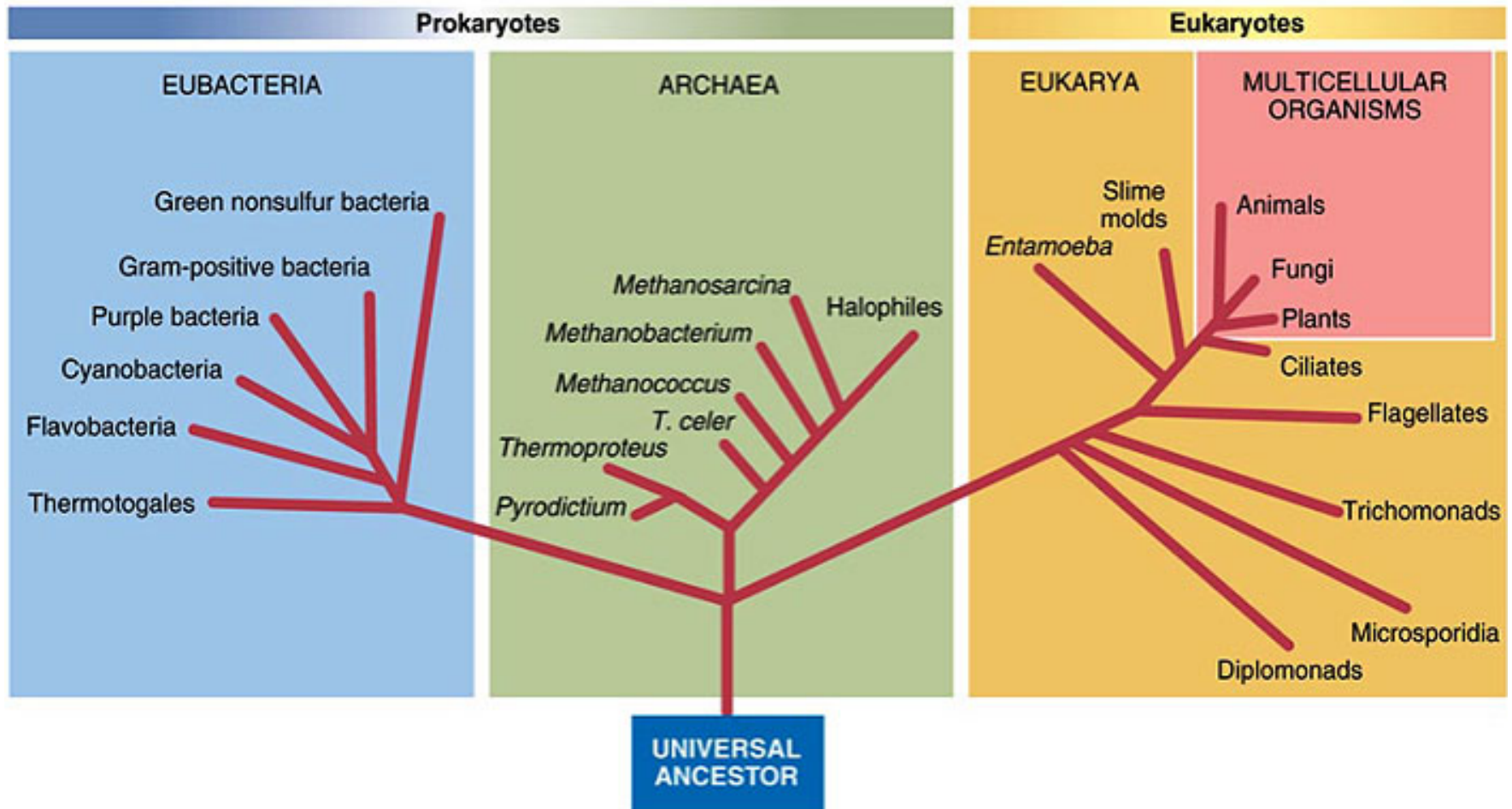


# Identificação polifásica de fungos

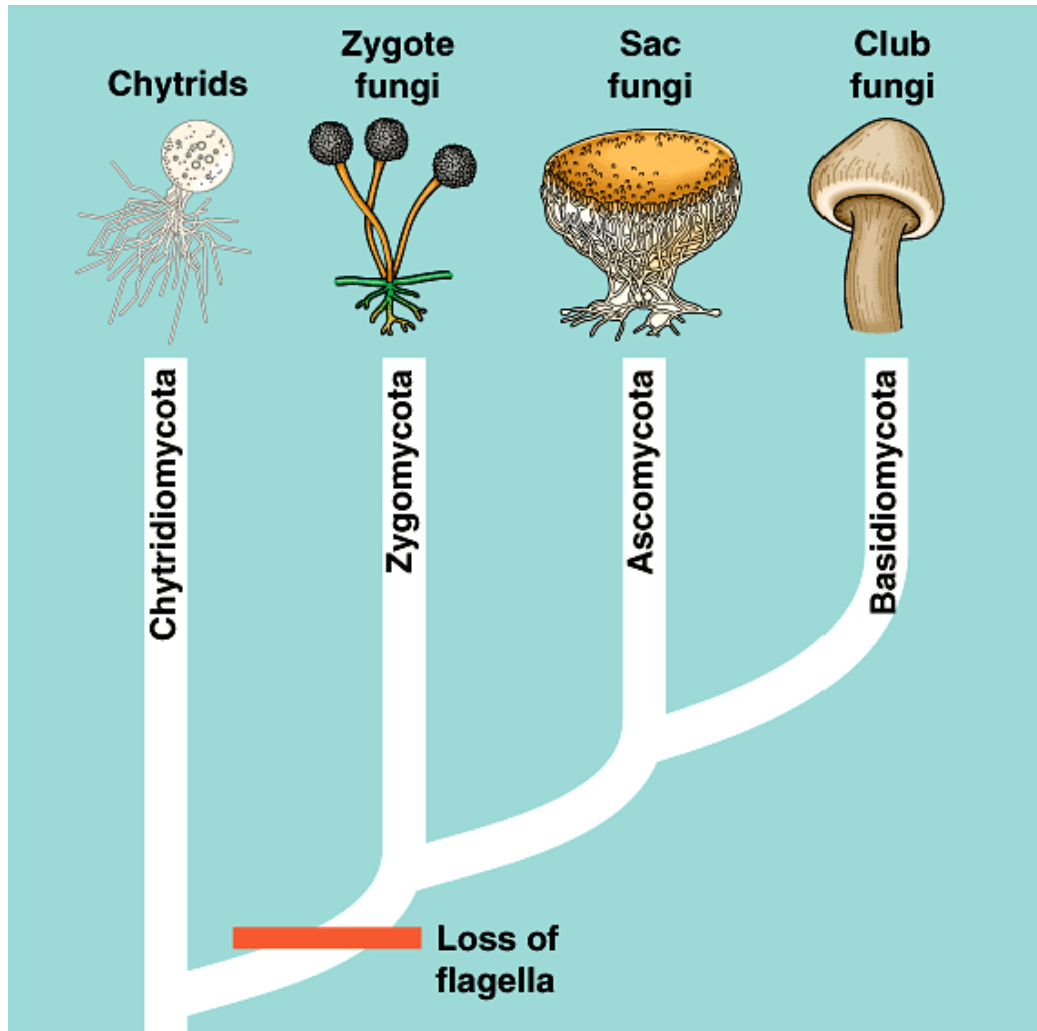
Profa. Kelly Ishida  
E-mail: [ishidakelly@usp.br](mailto:ishidakelly@usp.br)

# Woese (1977)

Baseada na sequência gênica do DNAr



# 4 filios:



Originados de um  
único ancestral



Grupo  
monofilogenético

**“Fungos  
verdadeiros”**

Atualmente...classificação está em fase de transformação!

# Identificação clássica dos fungos

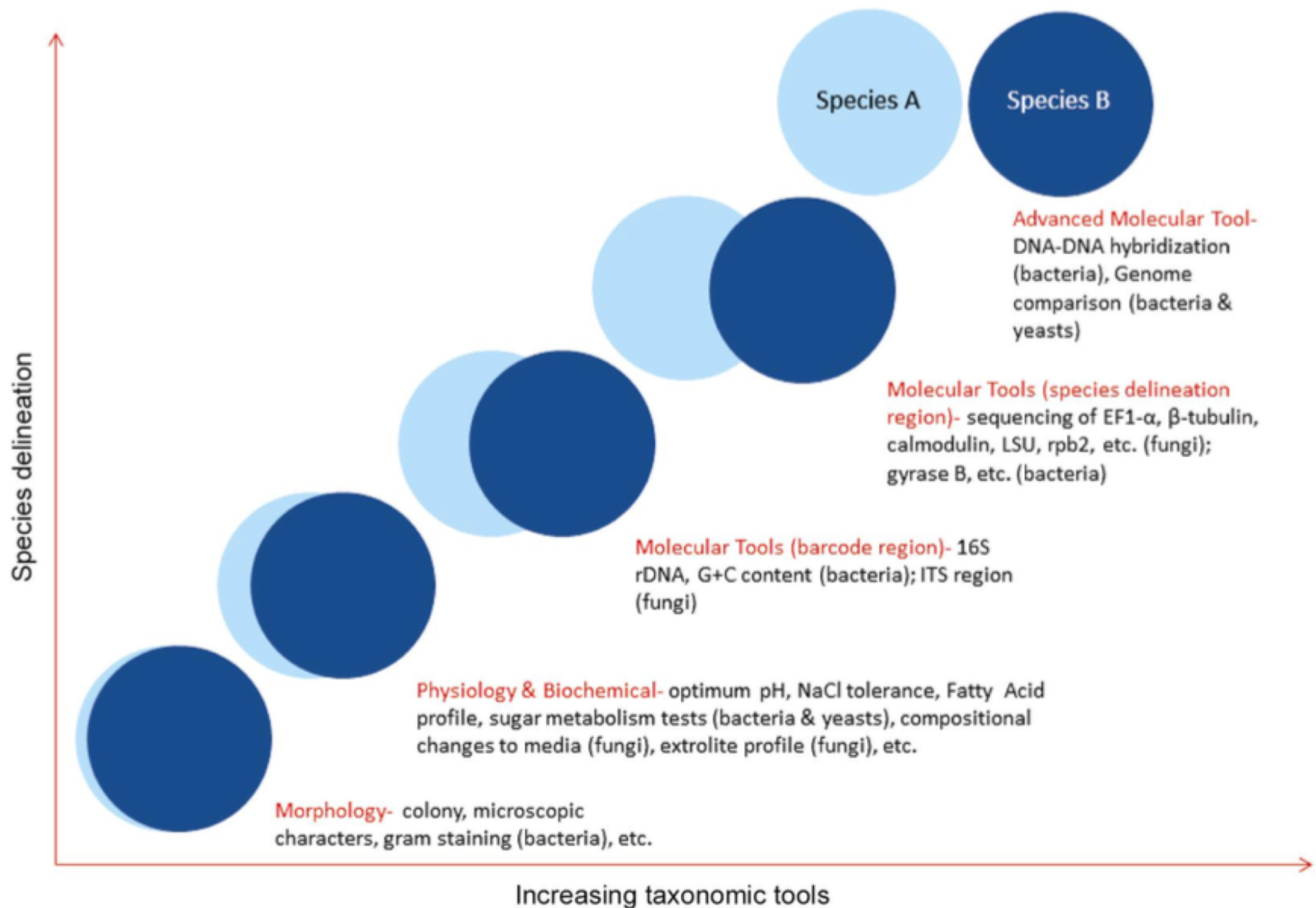
## Métodos Fenotípicos

- **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.**

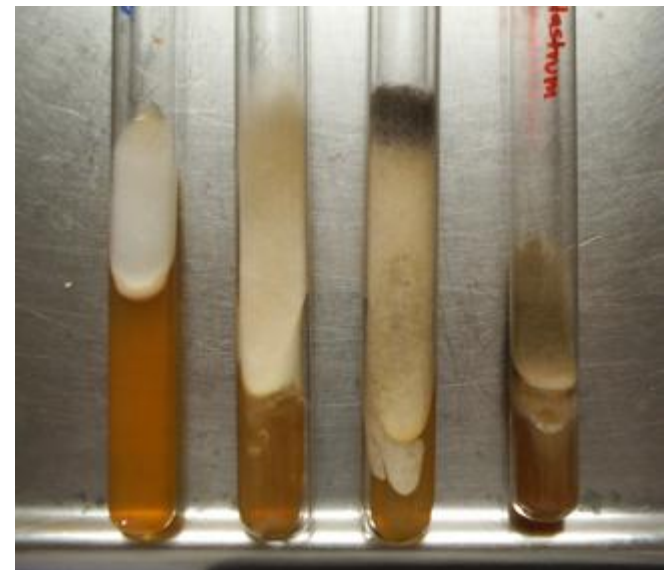


**Figure 2.** Different criteria used in species delineation of bacteria, archaea and fungi.

# 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.

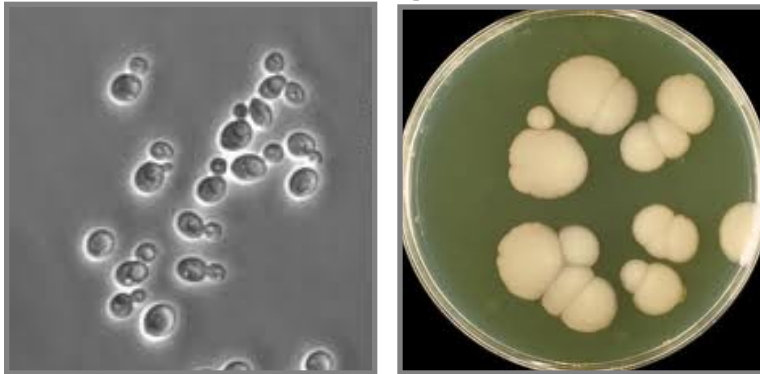
# Coleta e isolamento da amostra fúngica



# Morfologia

## Características macroscópicas da colônia fúngica

- Unicelulares → fungos leveduriformes



Ex. *Saccharomyces cerevisiae*

- Pluricelulares → fungos filamentosos (“bolor”)

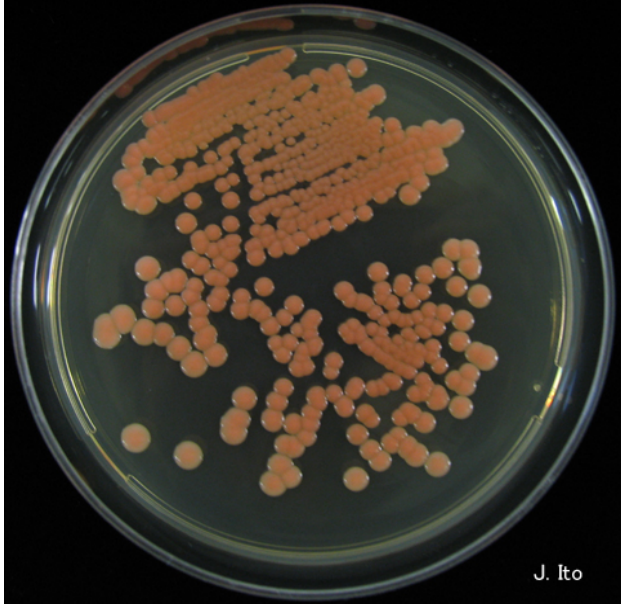
- Hifa – unidade básica do fungo
- Micélio – conjunto de hifas

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



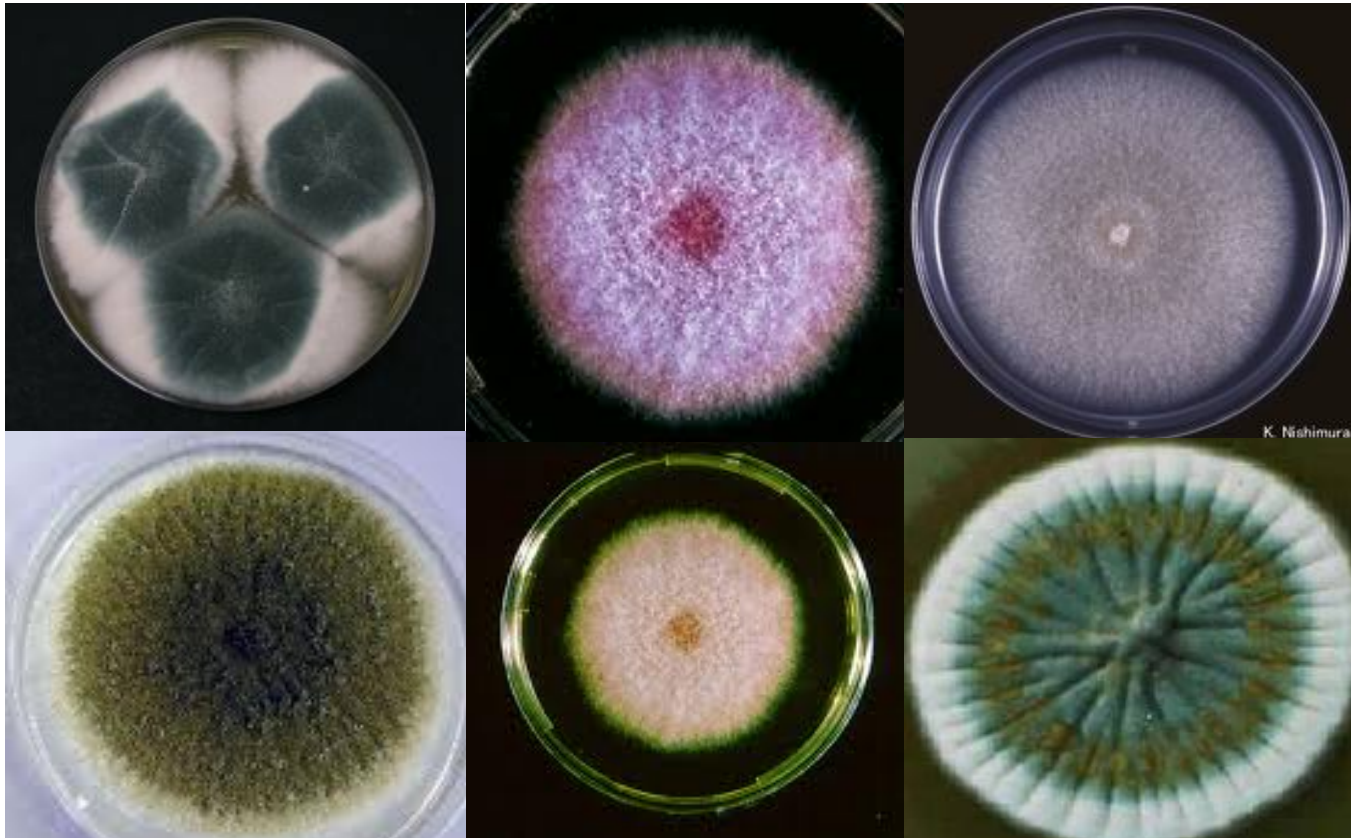
Filamentous



Curled



## FUNGOS FILAMENTOSOS



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

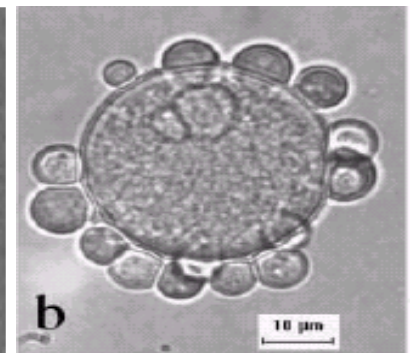
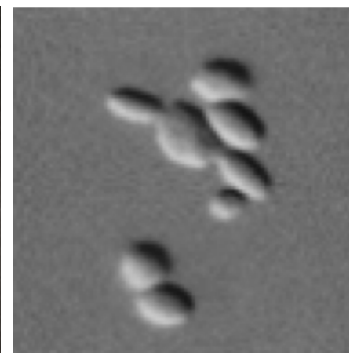
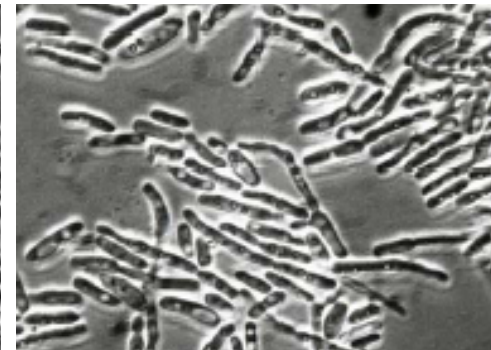
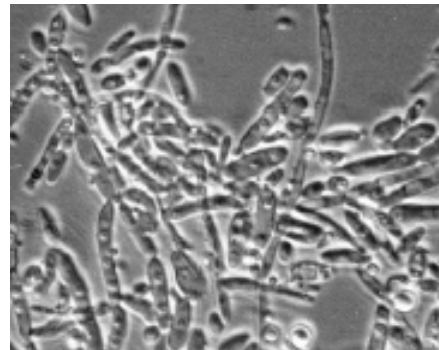
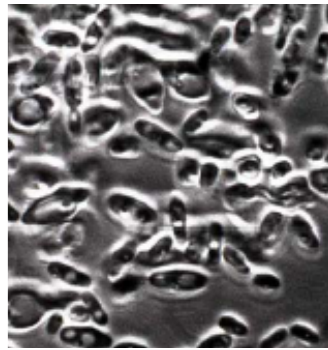
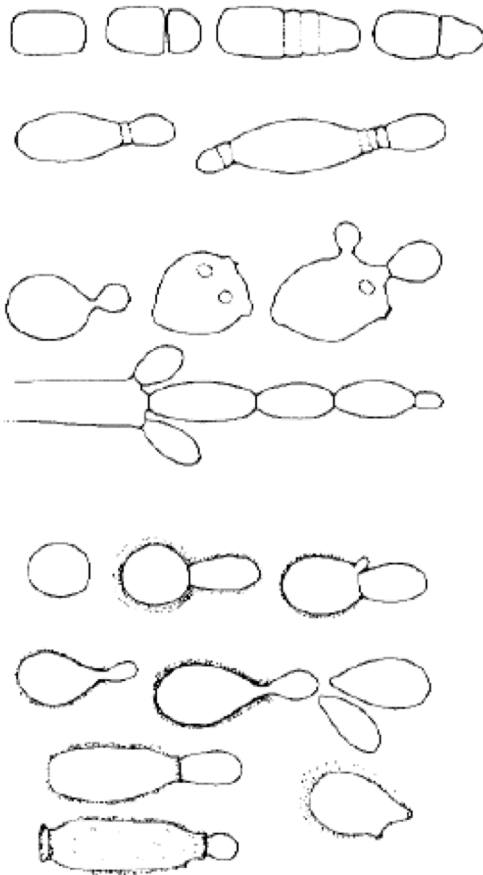
**Técnica da Colônia Gigante – avaliar  
as características macroscópicas das  
colônias**



# Morfologia

## Características microscópicas dos fungos

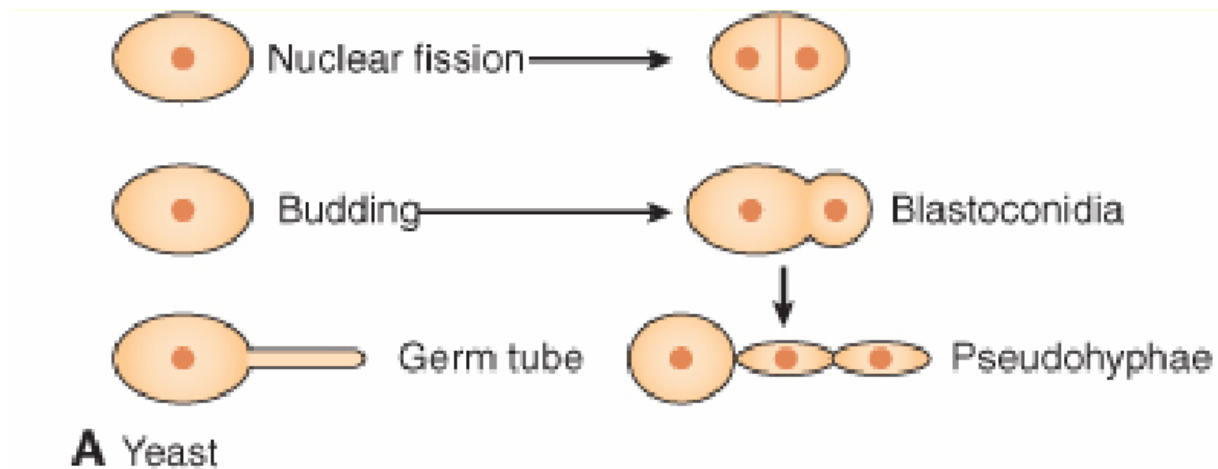
### LEVEDURAS



# LEVEDURAS

## Reprodução assexuada – Formação Blástica

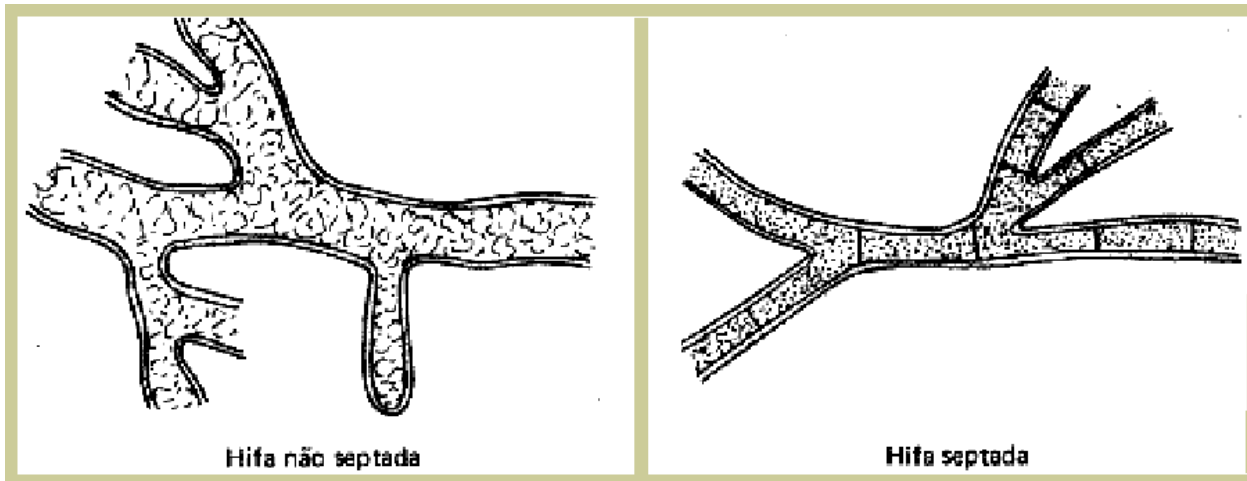
### Brotamento / fissão binária



# FUNGOS FILAMENTOSOS

## Característica microscópica

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

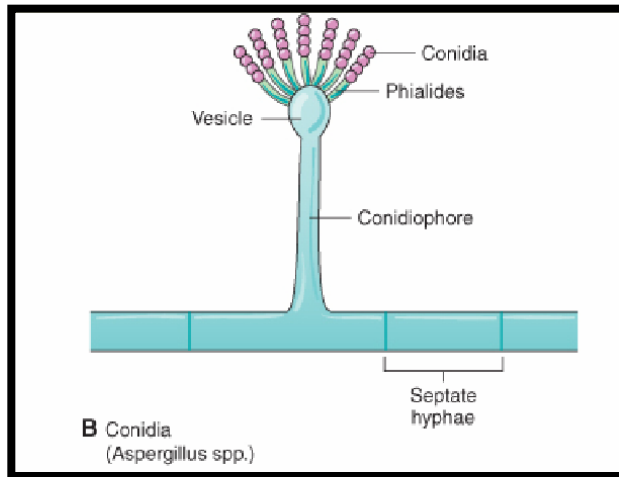


- Septadas x Não-septadas /Contínuas/Cenocíticas
- Hialino X Demáceo
- Espessa X Delgada

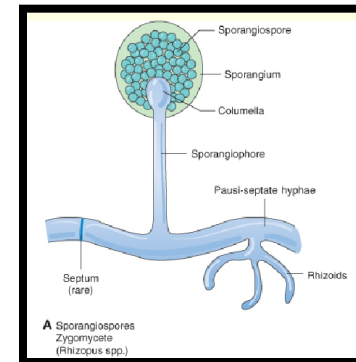
# FUNGOS FILAMENTOSOS

## Reprodução assexuada – Micélio reprodutivo

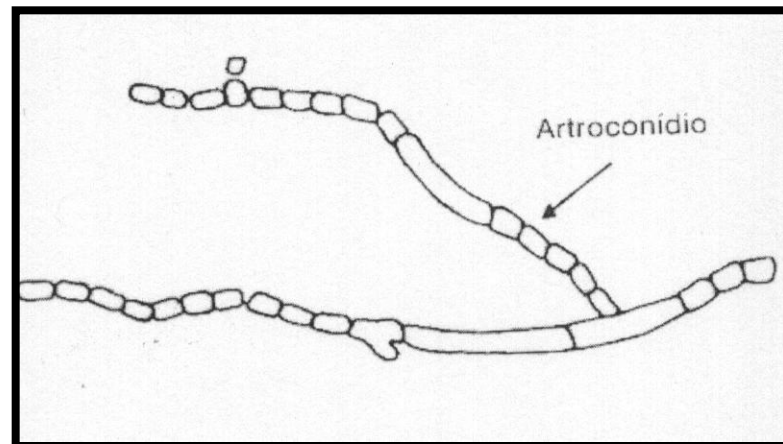
- Formação Blástica (Ascomicetos)



- Formação de Esporângios (Zigomicetos)

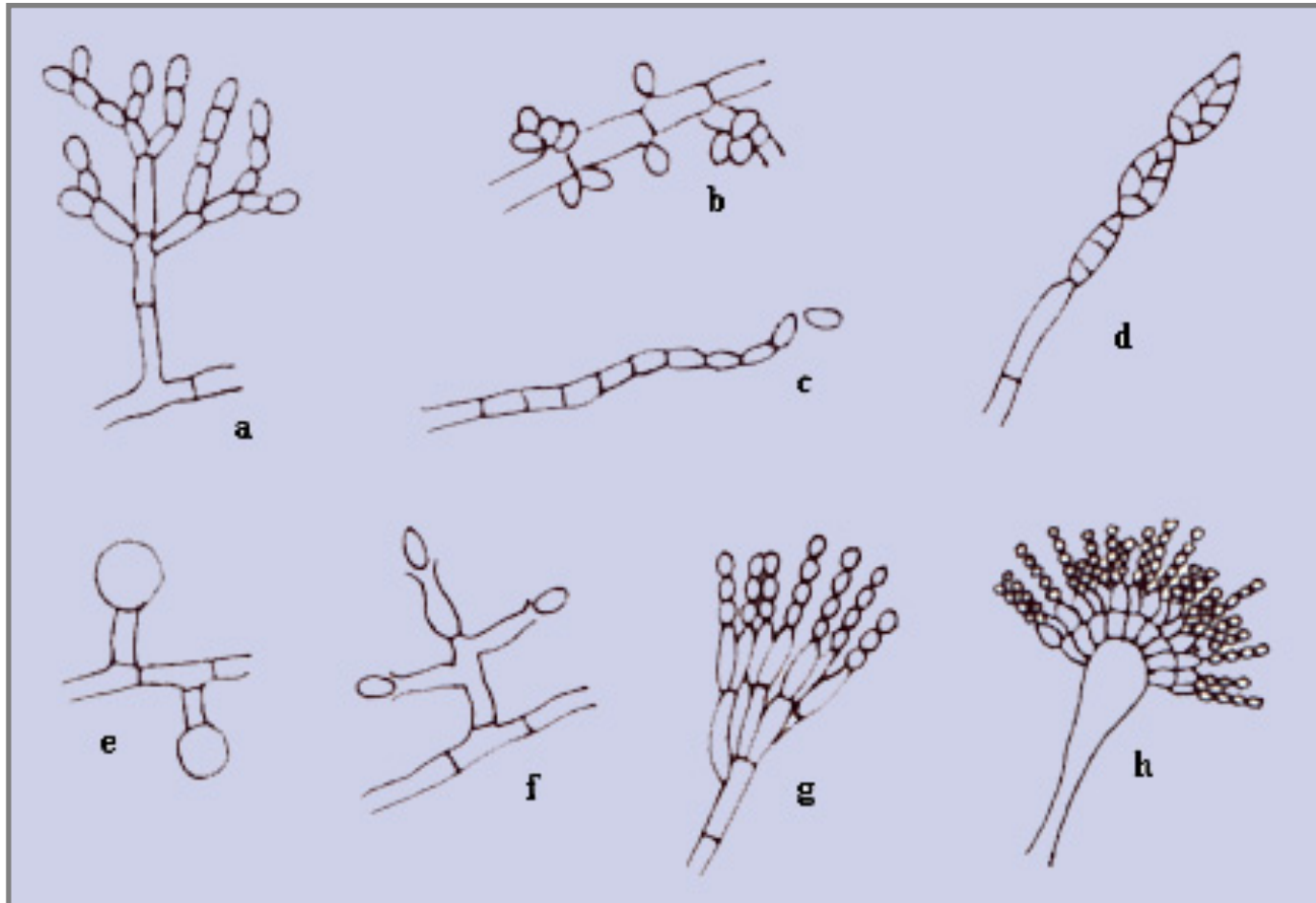


- Formação Tática  
Arthroconídios



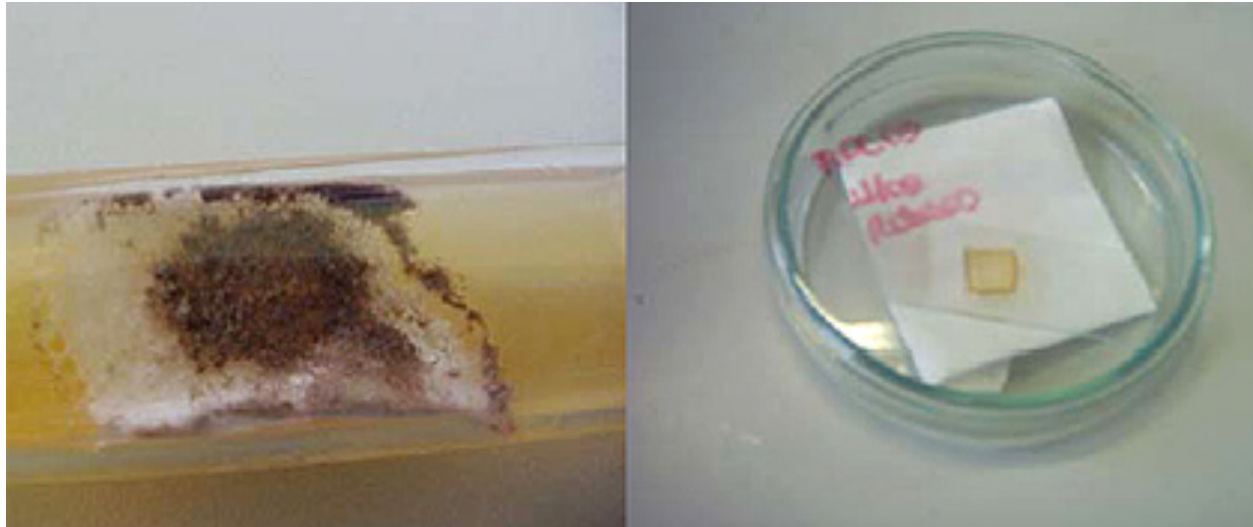
# FUNGOS FILAMENTOSOS

## Estruturas de reprodução assexuada



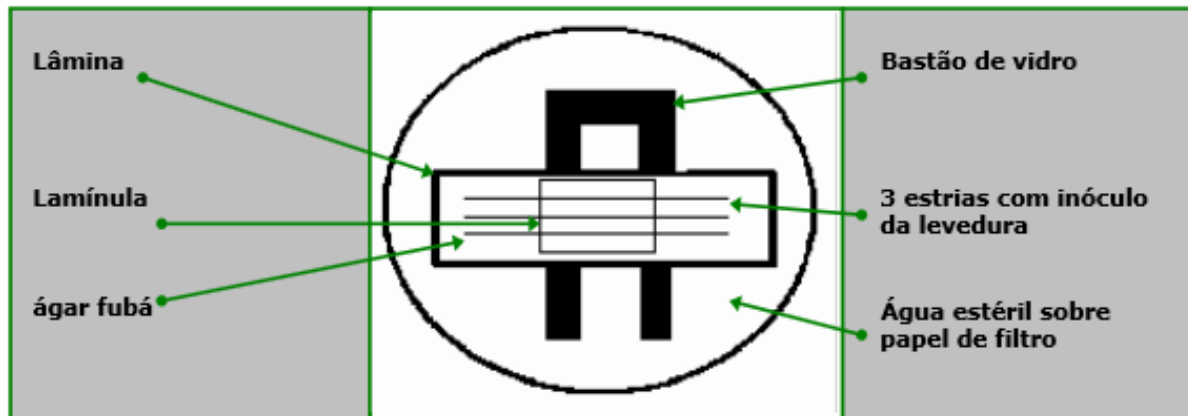
- Técnica de Microcultivo em lâmina

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

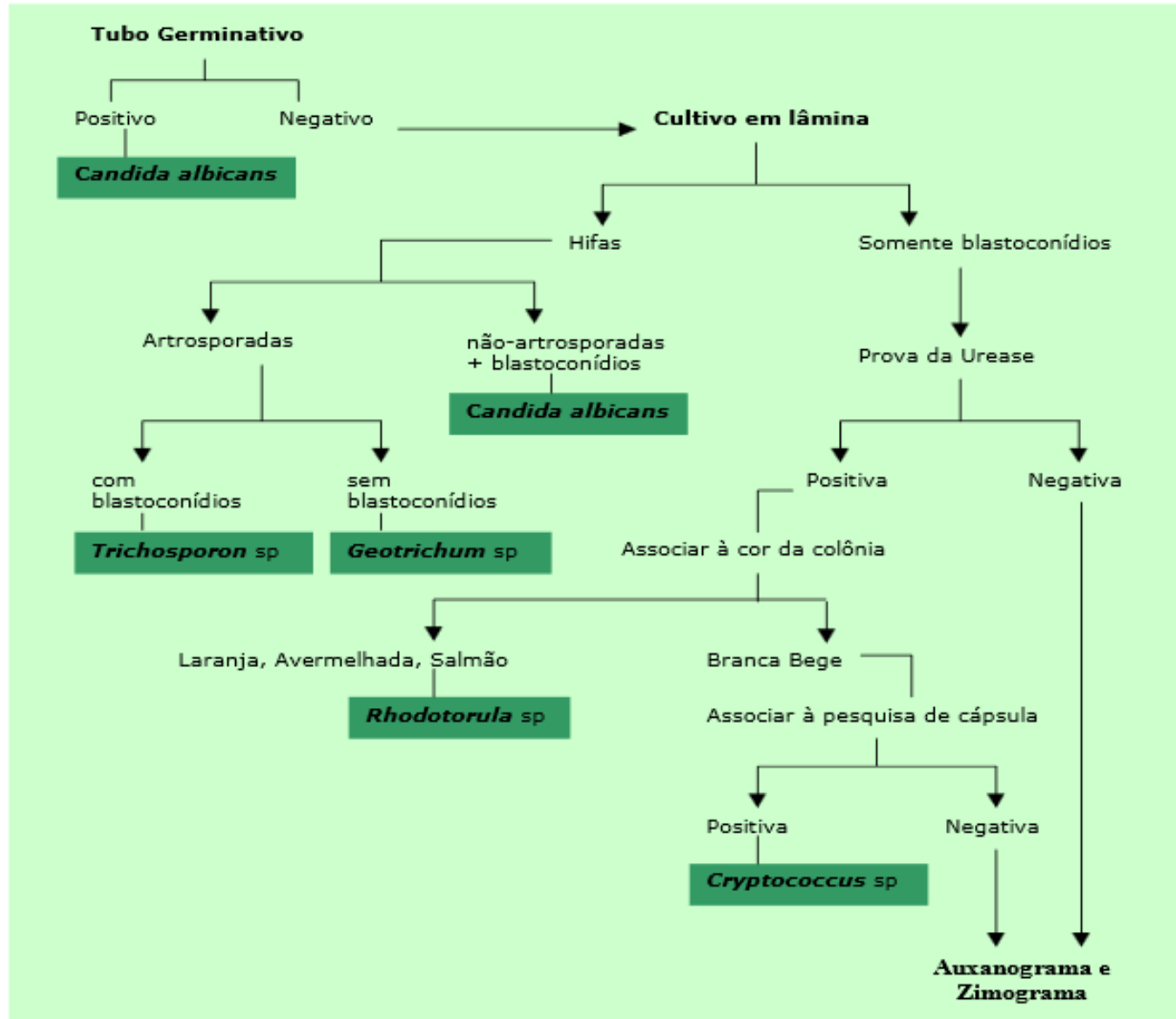
## Identificação clássica de fungos

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

**Leveduras** – aspectos morfológicos e testes bioquímicos

# Por exemplo:

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



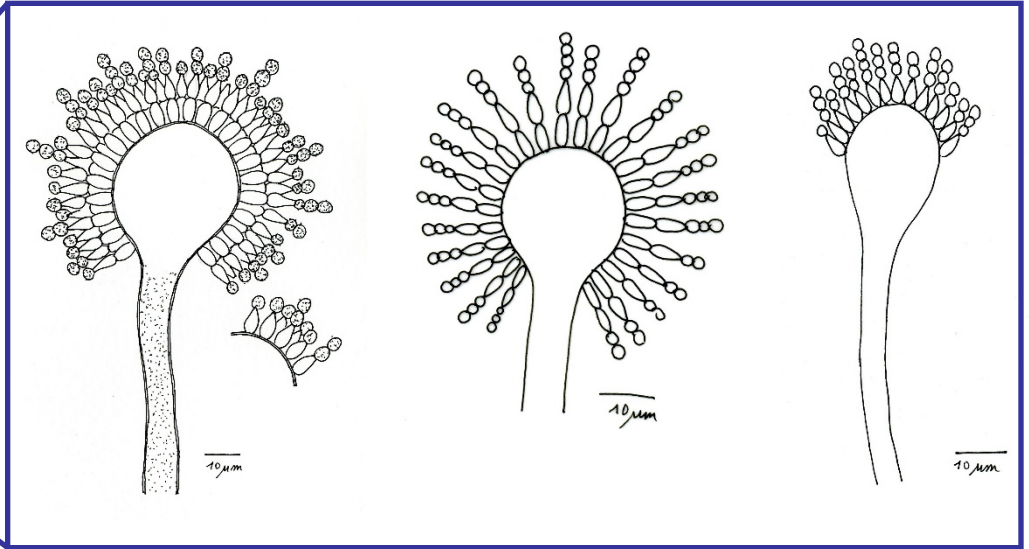
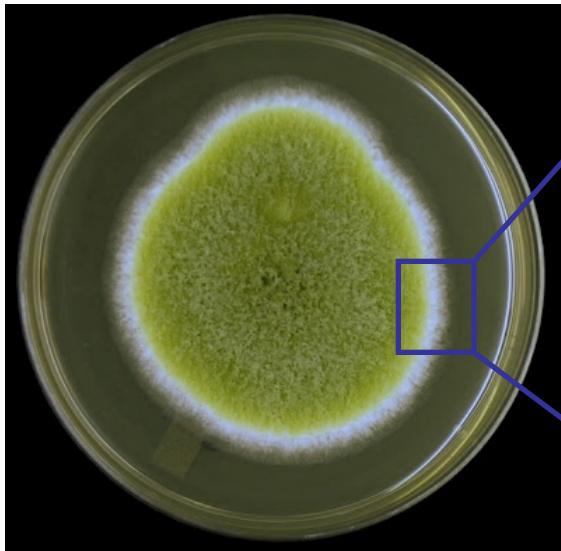


## Identificação das principais leveduras de interesse médico

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

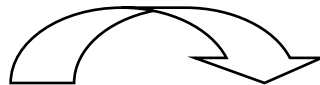
Tg = tubo germinativo, Ar = artrósporo, Ur= urease, Sa = sacarose, Ma=maltose,La = lactose, Ce = celubiose, Tr = trealose, Ra = rafinose, X = xilose, I = inositol,NO<sub>3</sub> = nitrato, Gl = glicose, + = pos, - = neg, V= variável

# Identificação clássica de fungos – uso de chaves de identificação



Diferenças morfológicas extremamente difíceis de serem detectadas

Muitas espécies  
possuem  
morfologia similar



**Identificação  
molecular**

# 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

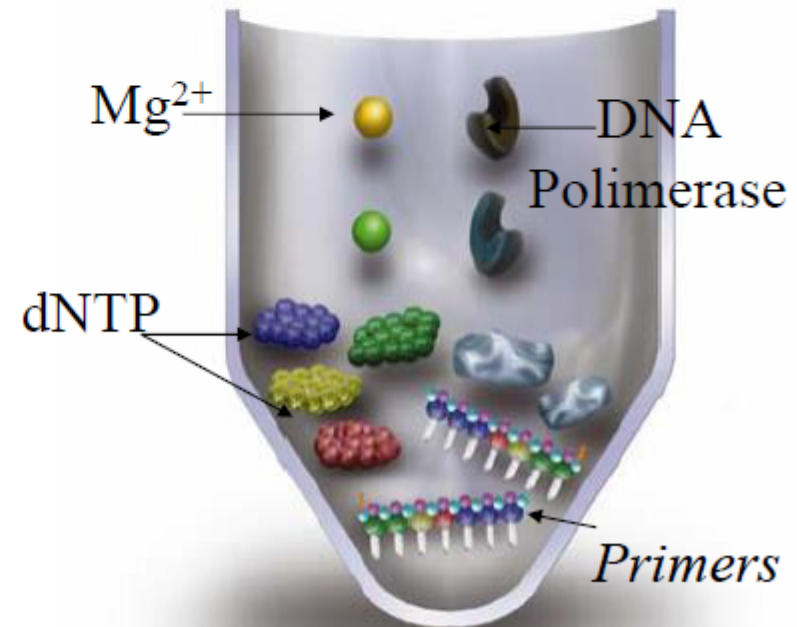
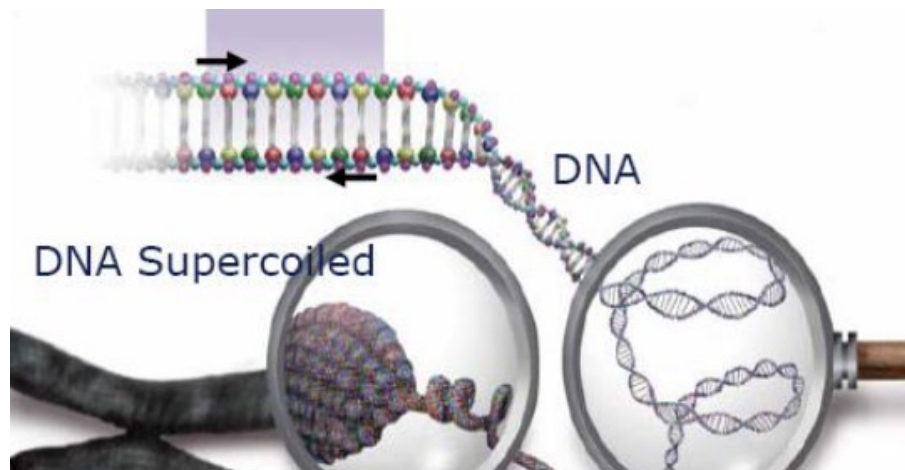
Esses métodos visam a obtenção de Marcadores moleculares do fungo



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

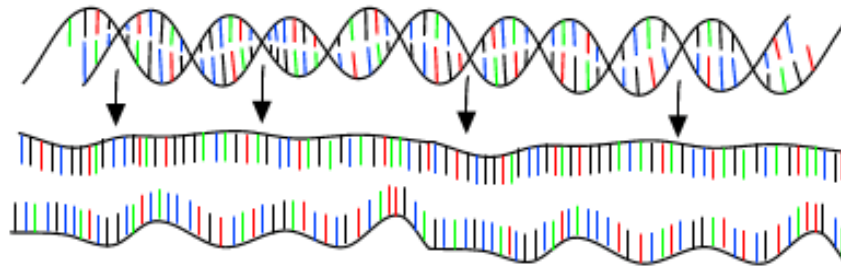
# PCR

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



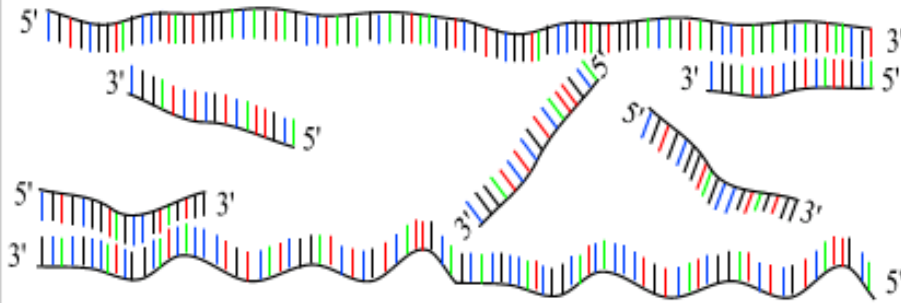
# PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :



Step 1 : denaturation

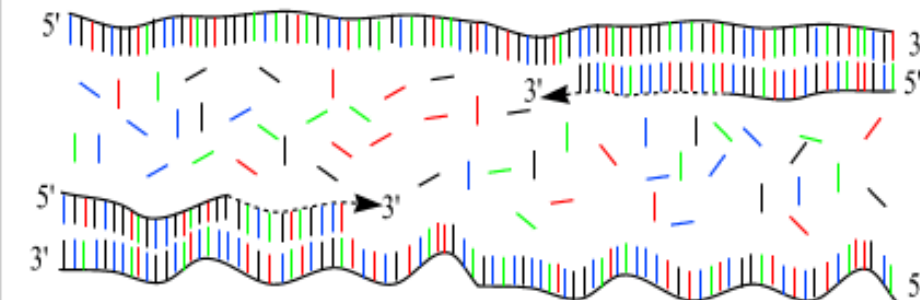
1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

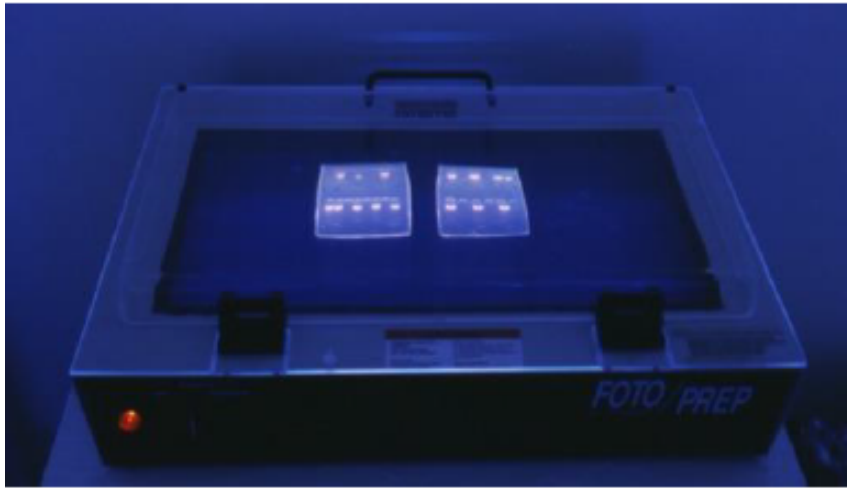
forward and reverse primers !!!



Step 3 : extension

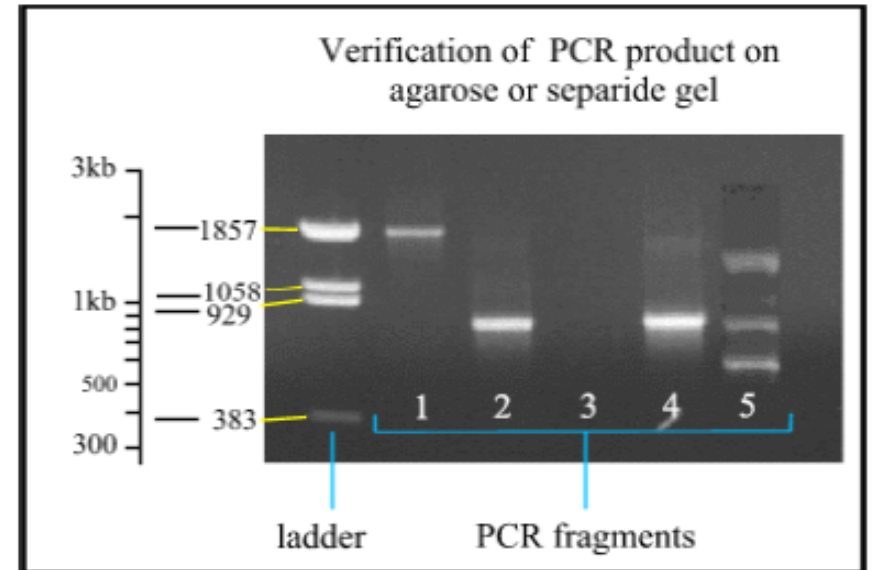
2 minutes 72 °C

only dNTP's



## Transiluminador

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



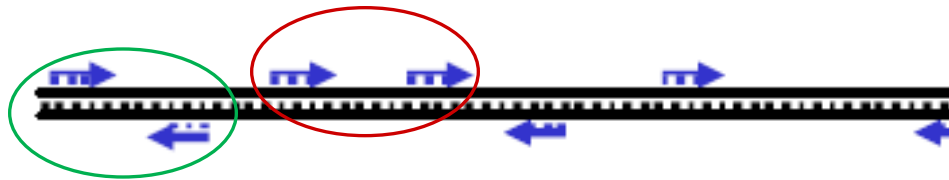
## Visualização dos produtos de PCR



# RAPD

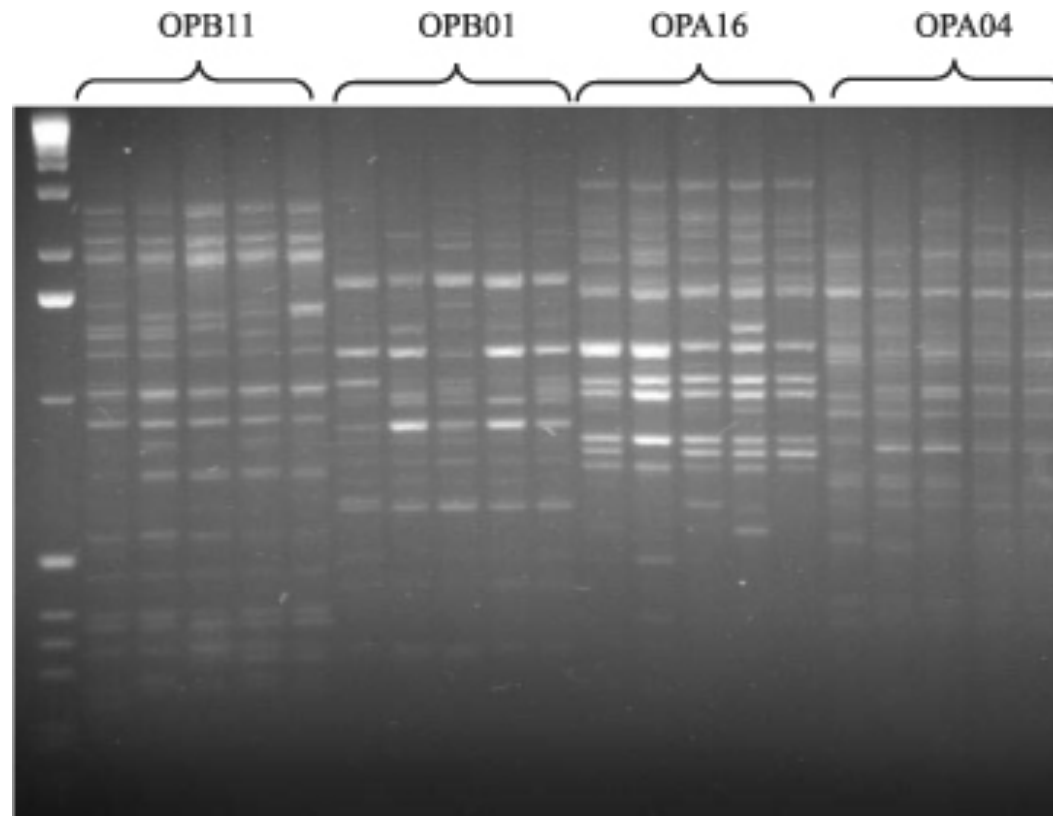
(DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso)

- 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?**

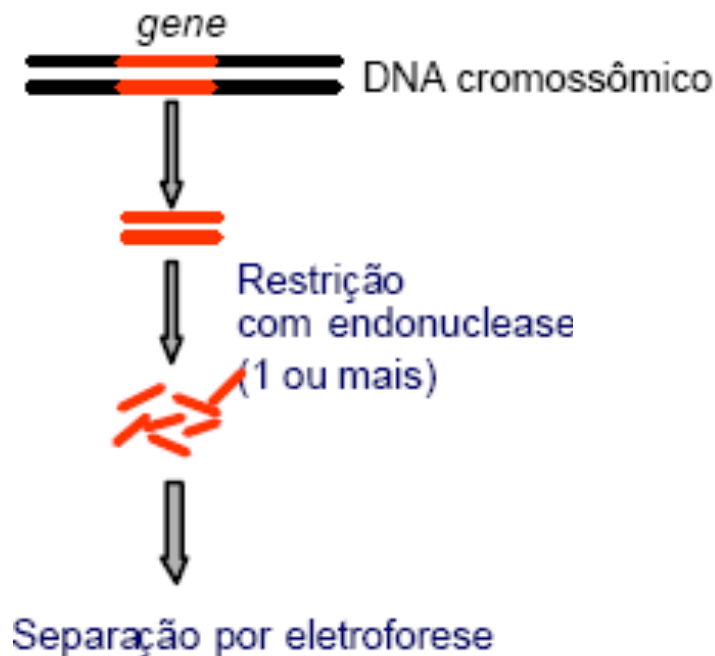
Similaridade das bandas

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*

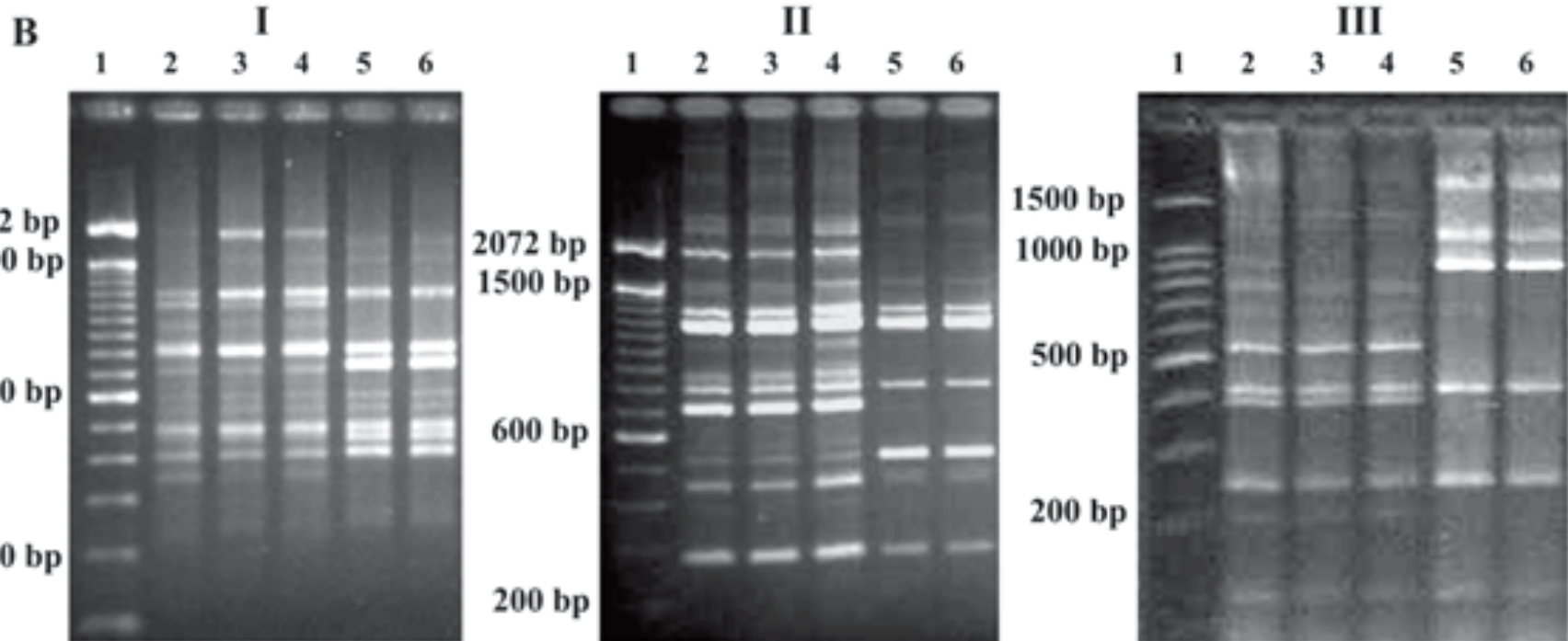
2,3 e 4 – VNI

5 e 6 - VNII

PCR: Primer GACA

Primer 6-RAPD

PLB1-RFLP



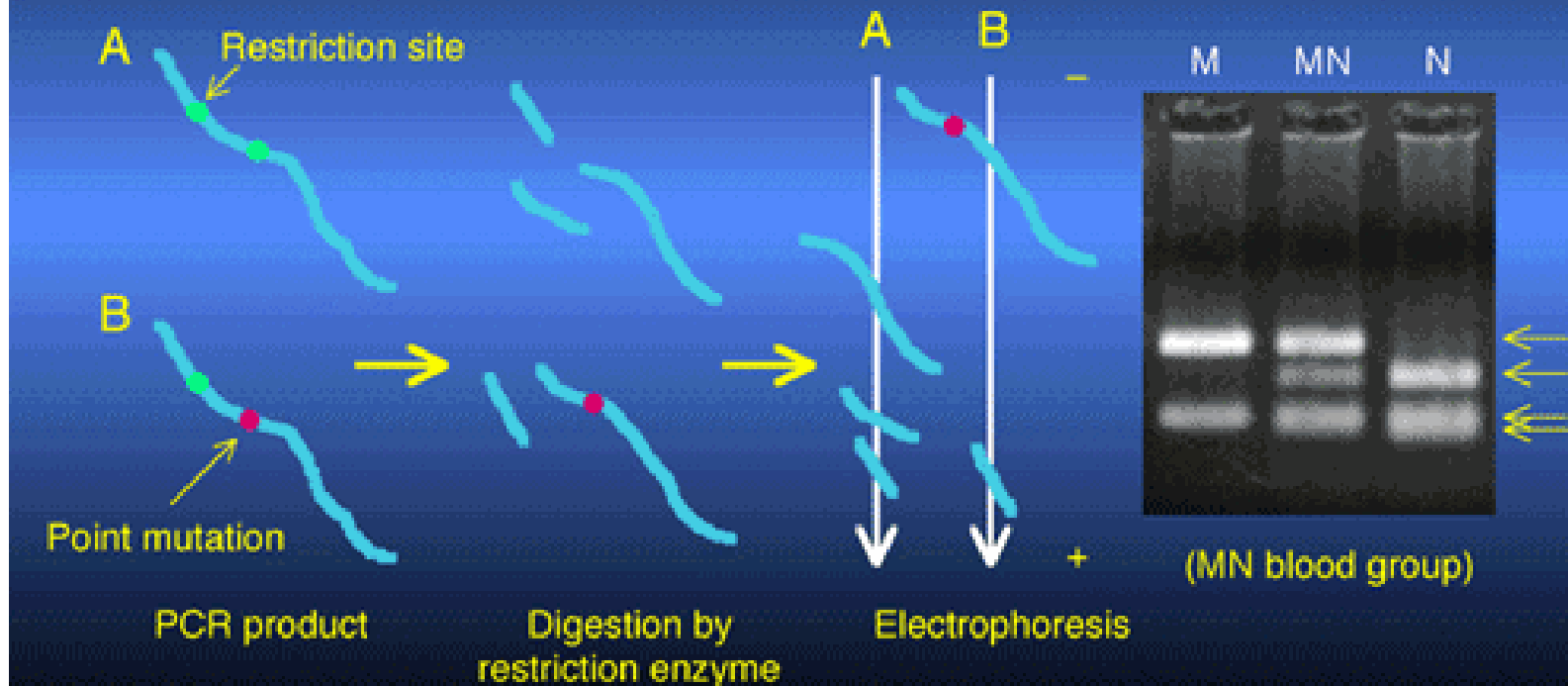
**Fig. 2 - A.** PCR fingerprinting with primer (GACA)<sub>4</sub> (AI) and PLB1-RFLP with *Ava*I (AII) patterns of *C. neoformans*. Lane 1\*, molecular weight marker; 2-5, molecular types VNI, VNII, VNIII, VNIV; 6-9, molecular types VGI, VGII, VGIII, VGIV – **B.** Representative gel of (GACA)<sub>4</sub>-PCR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

# Detecção de mutação no gene de interesse

## Analysis of DNA polymorphism (6)

### PCR (4)

### Restriction fragment length polymorphism (RFLP)



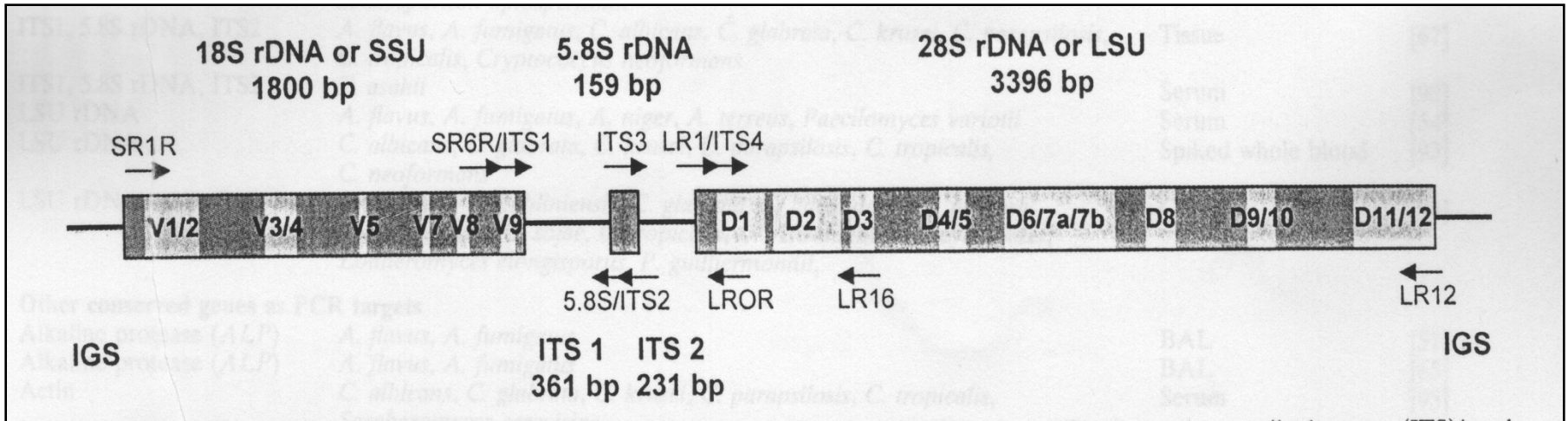
- **PCR específico**

- **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



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

### Iniciadores Universais – gênero *Candida*

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.

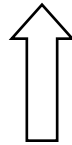
Yeasts	N° isolates (%) identified by:		% agreement
	snPCR	Standard mycological	
<i>Candida</i> sp.	4 (3.9)*	1 (1.0)**	0
<i>Candida albicans</i>	94 (93.1)	86 (85.2)	89.6
<i>Candida parapsilosis</i>	1 (1.0)	2 (2.0)	50.0
<i>Candida tropicalis</i>	1 (1.0)	2 (2.0)	0
<i>Candida krusei</i>	0 (0)	1 (1.0)	0
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

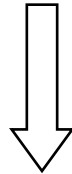
\*\**Candida* sp. (non-*albicans*).

# Taxonomia de Fungos

## Filogenia



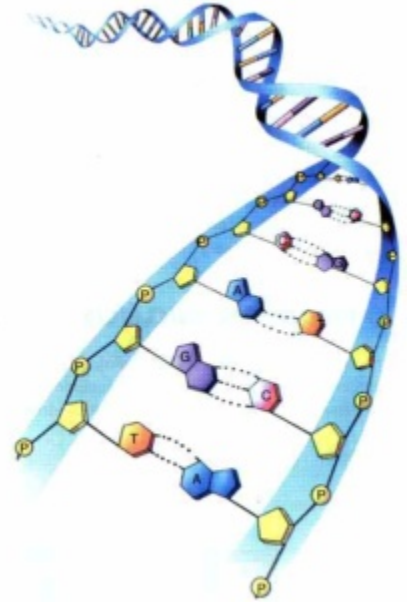
**Sequenciamento do  
DNA**



**Determinar sequência de nucleotídeos do DNA**



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

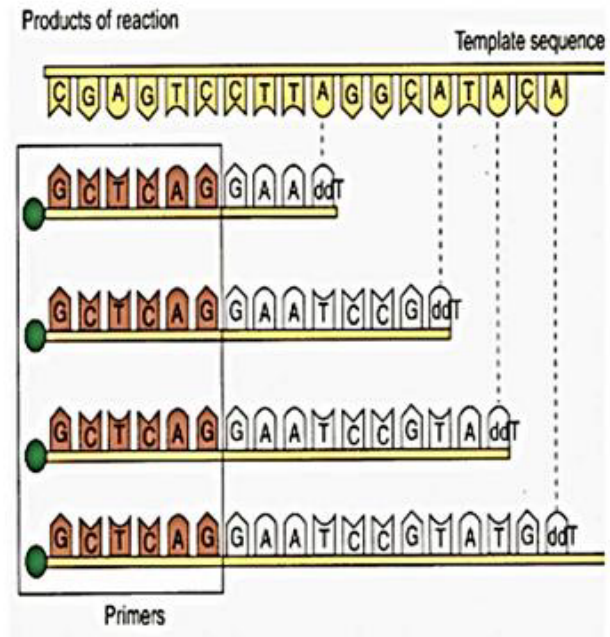


# Sequenciamento de DNA

## Método de Sanger

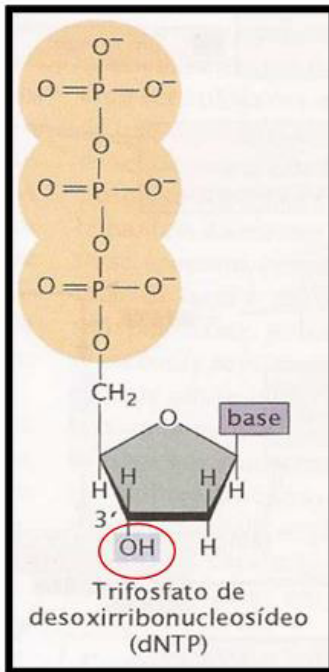
### *Método de Didesóxinucleotídeos ou Terminação em Cadeia*

Descrito por Sanger et al., 1977

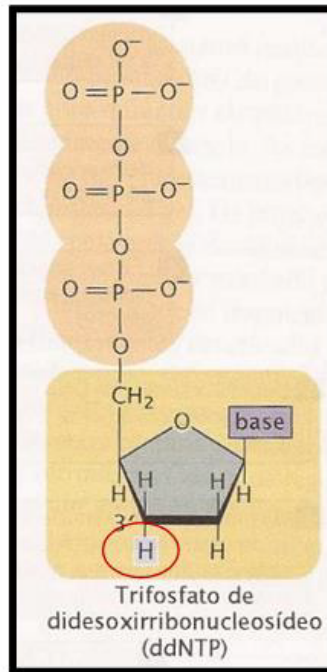


# Método de Sanger

- ✓ Substrato especial para síntese de DNA



LIGAÇÃO FOSFODIESTER



Finalizam a síntese de DNA

ddNTP

- ✓ São incorporados na cadeia crescente de DNA



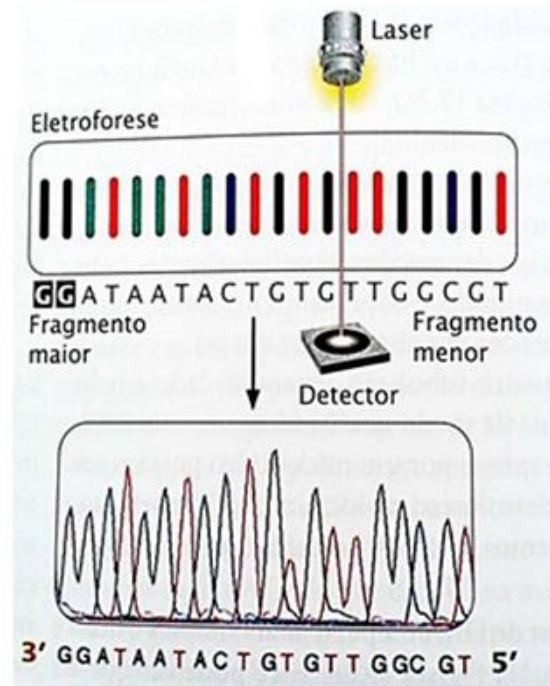
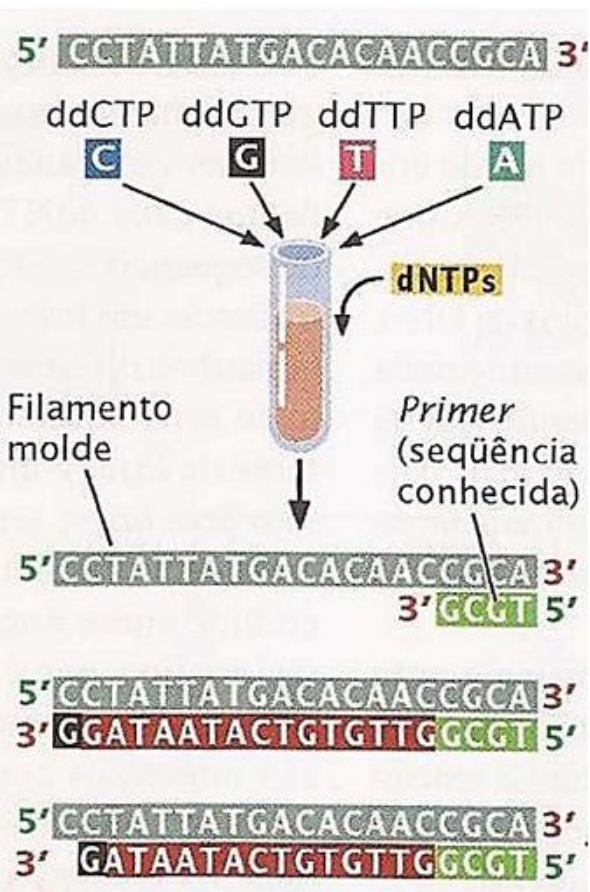
- ✓ Nenhum outro dNTP é adicionado



~~LIGAÇÃO FOSFODIESTER~~



## Reação de sequenciamento baseada no Método de Sanger



## Eletroforese

*fragmentos migram de acordo com seu tamanho*



*O corante fluorescente no DNA é detectado*

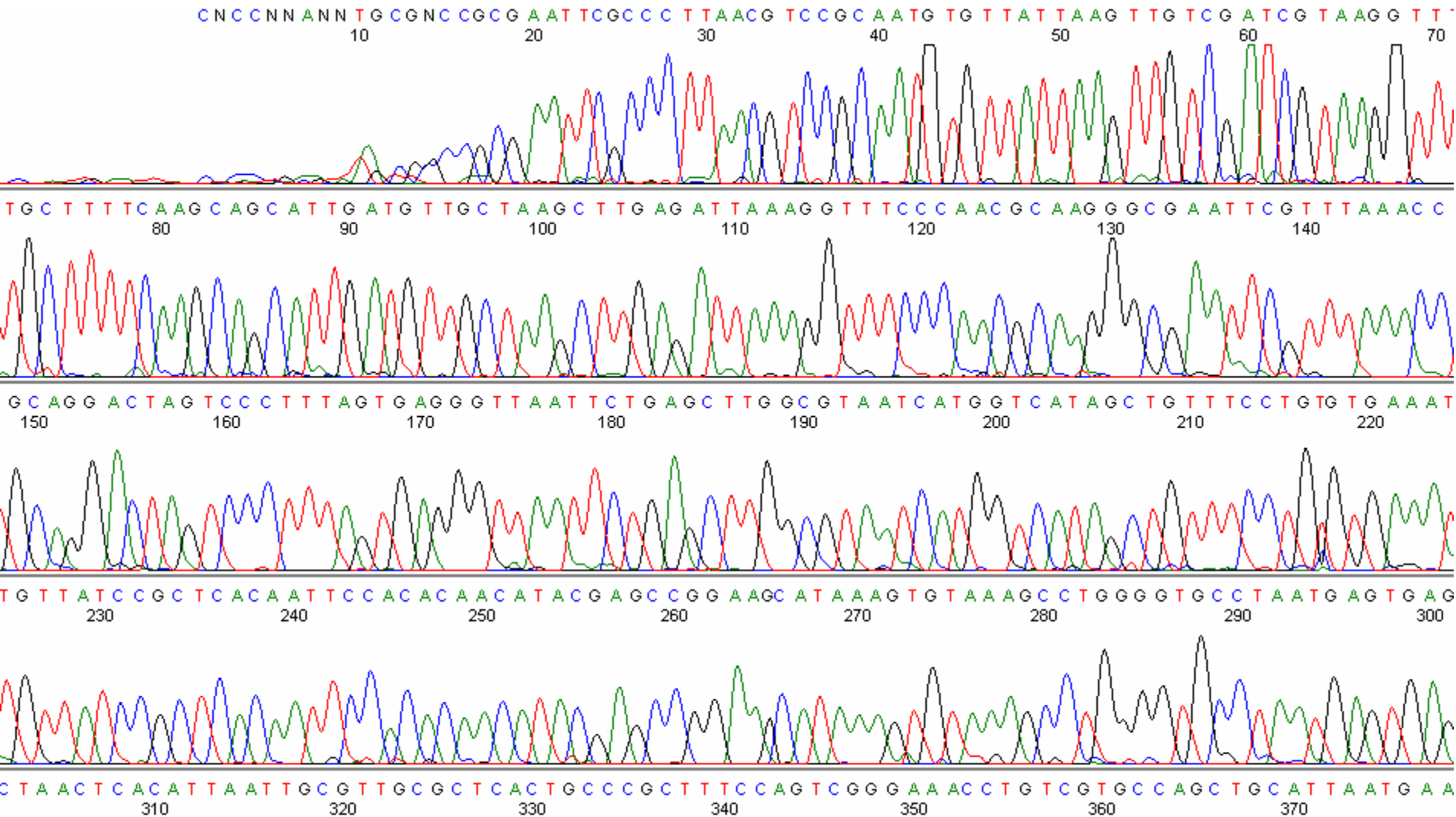


*Cada fragmento aparece como um pico, sendo que a cor do pico indica a base representada*

*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,  $\beta$ -tubulina, actina, TEF-1 $\alpha$ ) 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

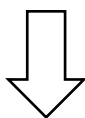
## EF1- $\alpha$

Até 2007:

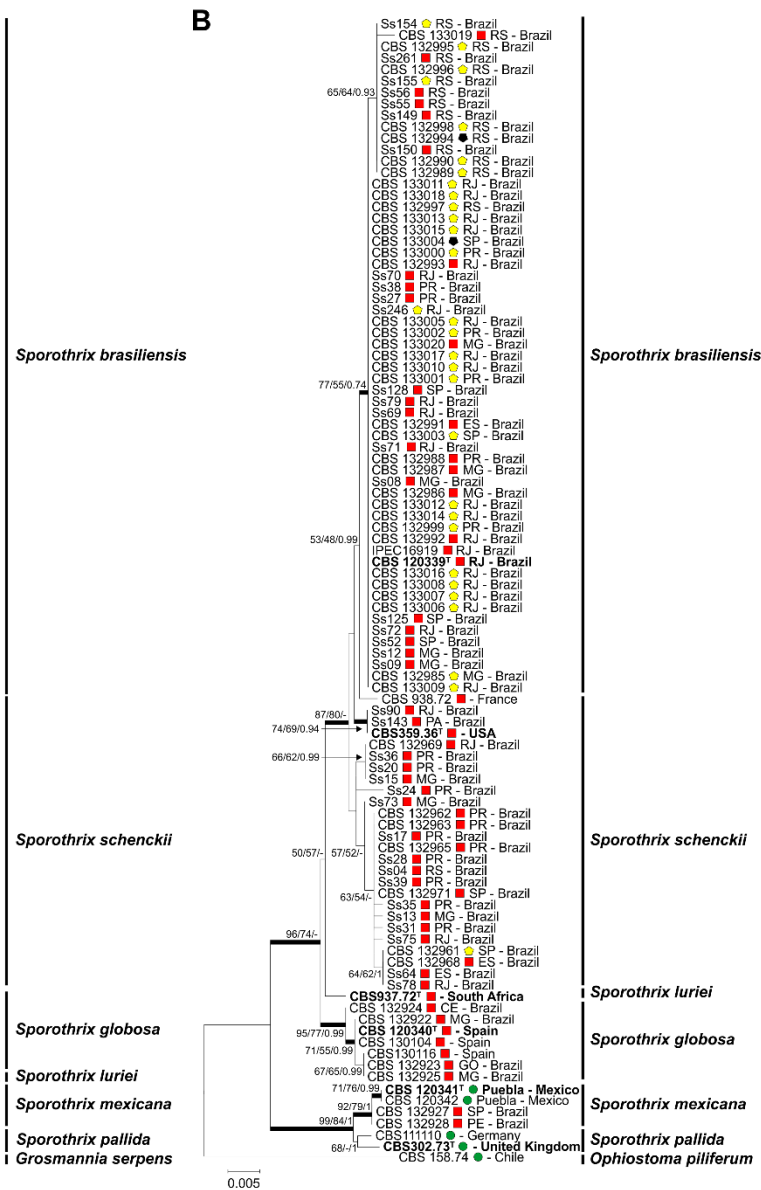
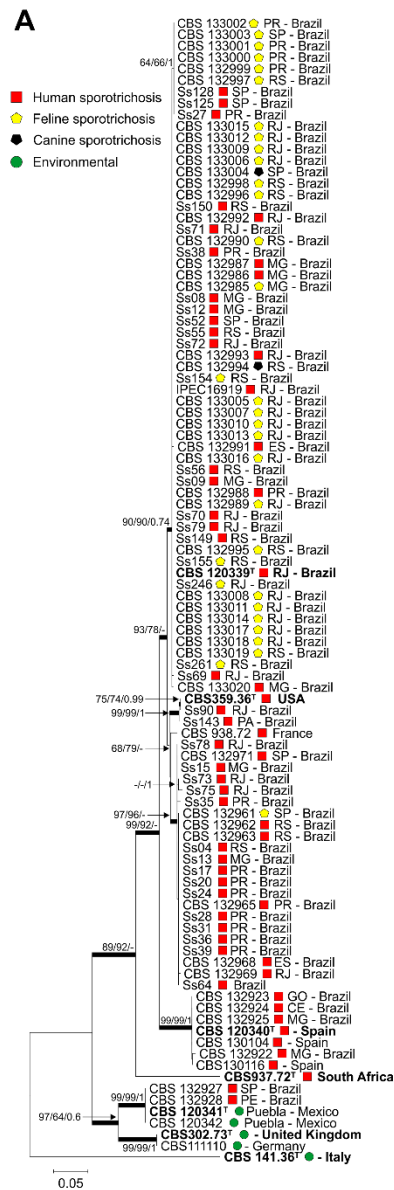
Todos isolados eram classificados como *S. schenckii*

Diferenças morfológicas sutis (colônia, micélio reprodutivo e leveduras)

**Análise molecular!**



Espécies *S. schenckii*





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

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

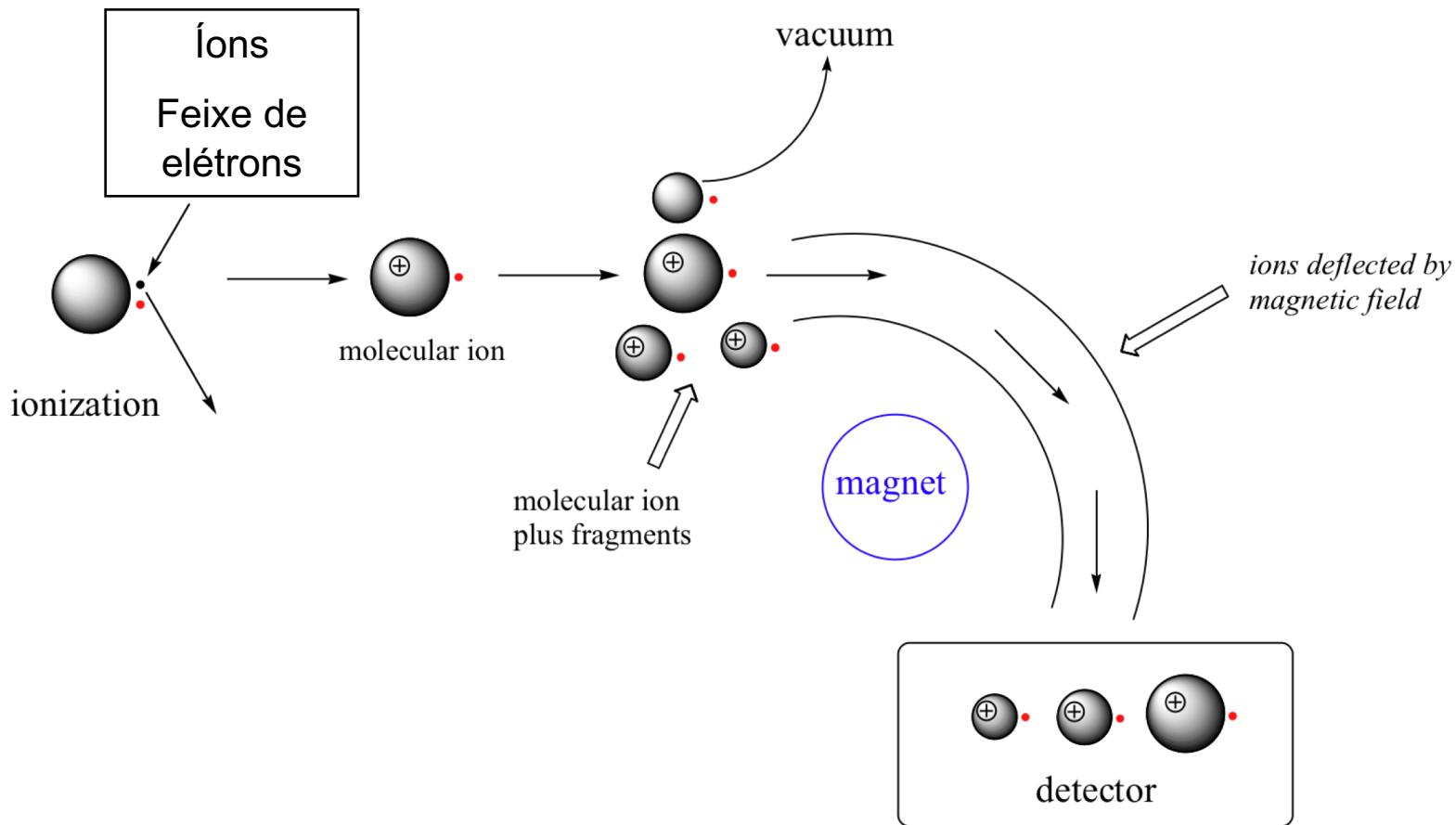
“Balança molecular”



Daltons (Da) = u =  
unidade de massa  
atômica

# O que é espectrometria de massas?

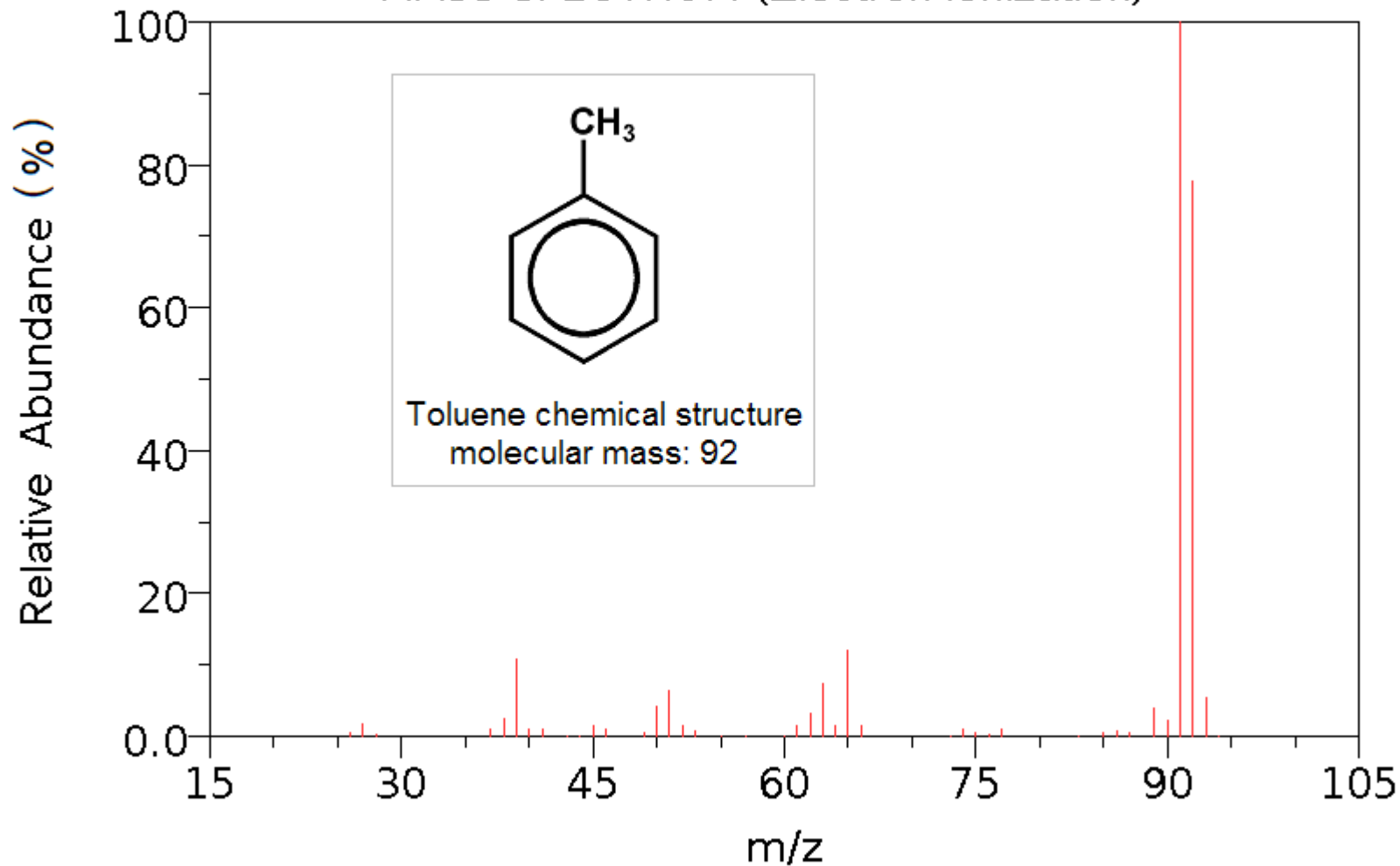
- Técnica analítica em que todos os átomos ou moléculas de uma amostra são ionizados (Feixe de íons ou elétrons) – gera fragmentos - separados de acordo com suas massas ( $m/z$ ) - detectados e quantificados.
- É uma ferramenta analítica utilizada para medir a massa molecular de uma amostra. Cada molécula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

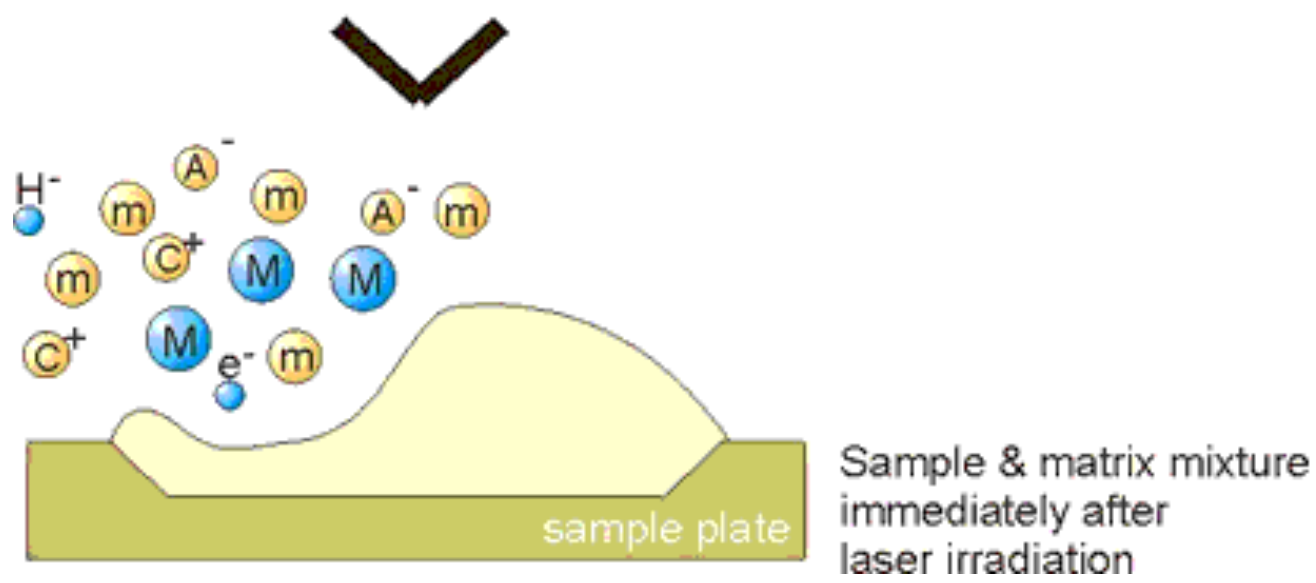
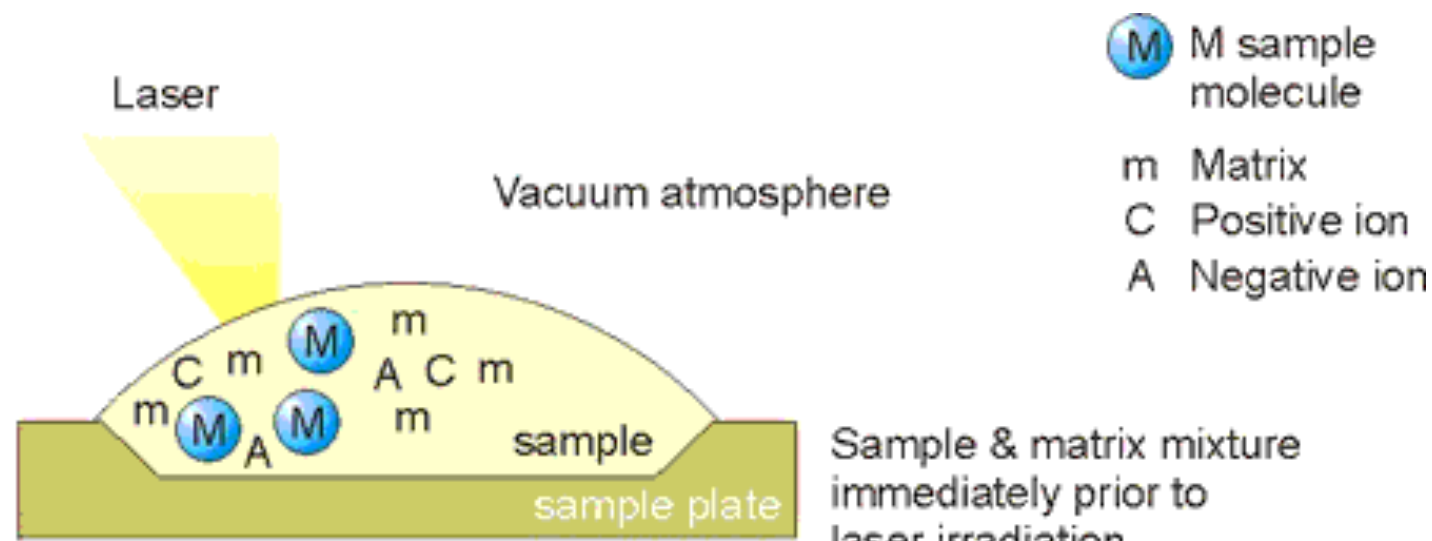
MASS SPECTRUM (Electron Ionization)



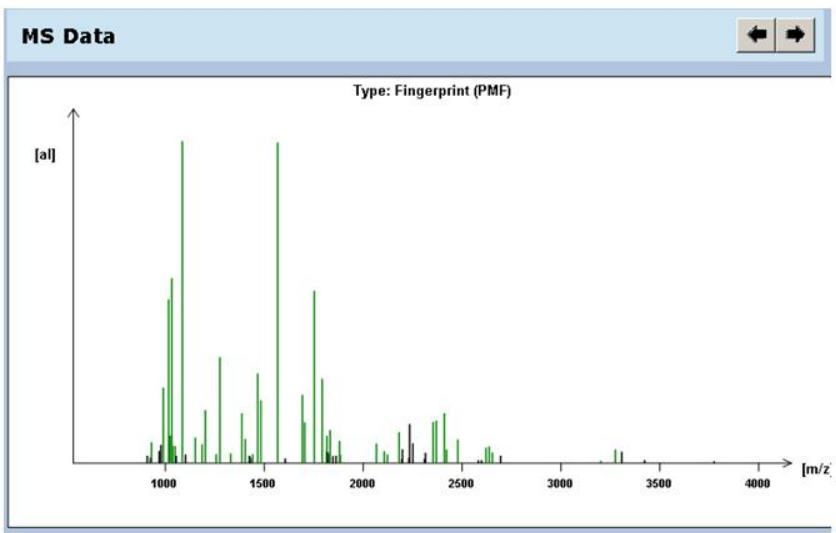
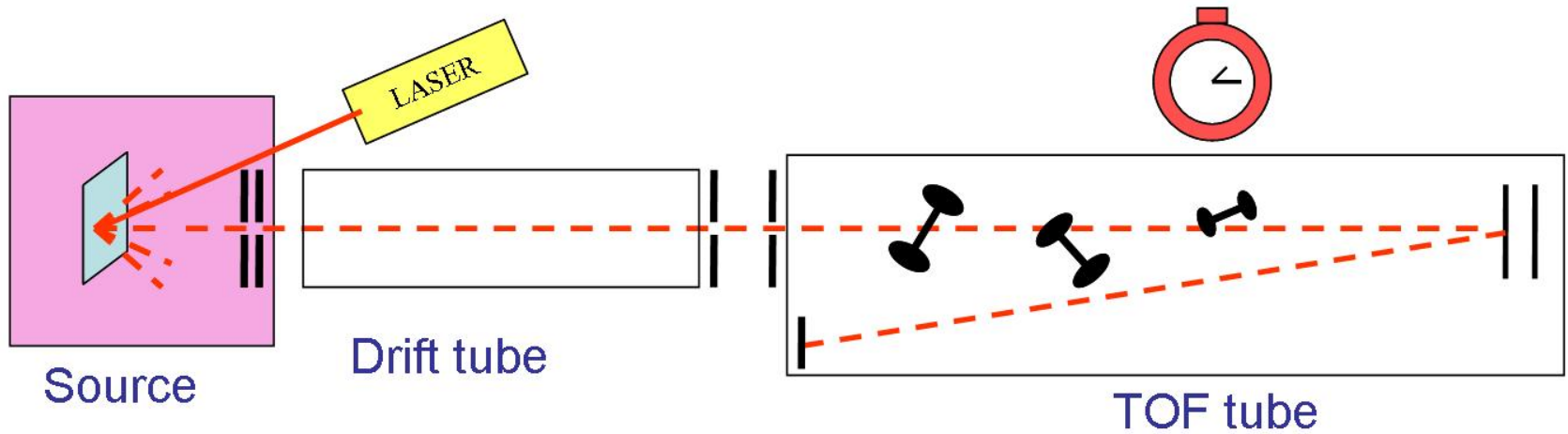
NIST Chemistry WebBook (<http://webbook.nist.gov/chemistry>)

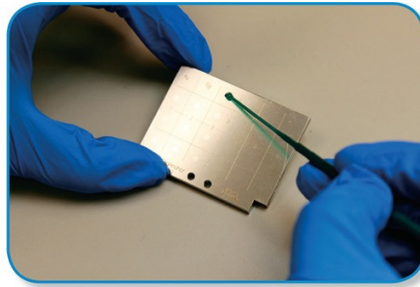
# MALDI

- ***“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





**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	Eschechia coli	2.375
POS CONT	A2	Candida krusei	2.308
NEG CONT	A3	no peaks found	
590209523	A4	Candida parapsilosis	2.218

Score	Detected Species	Comment	Link
2.218	Candida parapsilosis ATCC 22019 IMA...		
1.859	Candida parapsilosis MY924_08 ERL		5480
1.795	Candida parapsilosis 26 PSB		5480
1.774	Candida parapsilosis DSM 4237 DSM		5480
1.711	Candida parapsilosis DSM 57941 DSM		5480
1.686	Candida parapsilosis DSM 70126 DSM		5480
1.502	Candida parapsilosis ATCC 22019 THL		5480
1.351	Cupriavidus necator B479 UFL		48736
1.310	Cupriavidus necator B480 UFL		48736
1.200	Candida parapsilosis DSM 70126 DSM		5480



**Mayo Clinic  
Laboratory Services Report**

**MICROBIOLOGY**

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

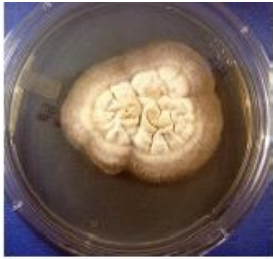
**CANDIDA PARAPSILOSIS Many**  
*Identified by mass spectrometry.*

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

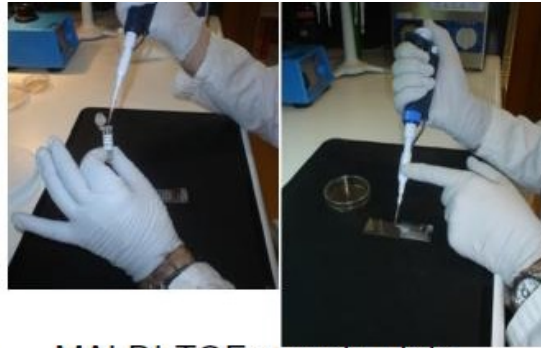


**Espectro de massas  
Digital do fungo**





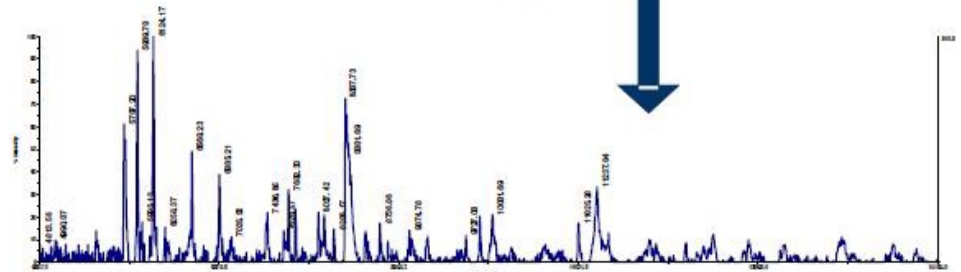
Microbial sample (1)



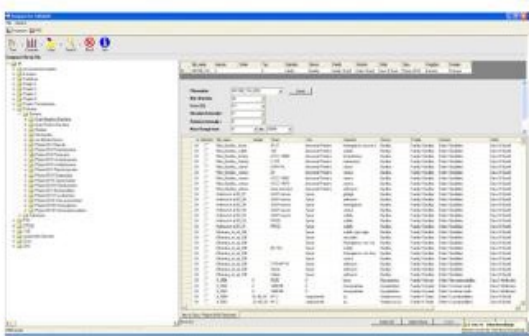
MALDI-TOF sample plate (2)



MALDI-TOF sample plate (3)



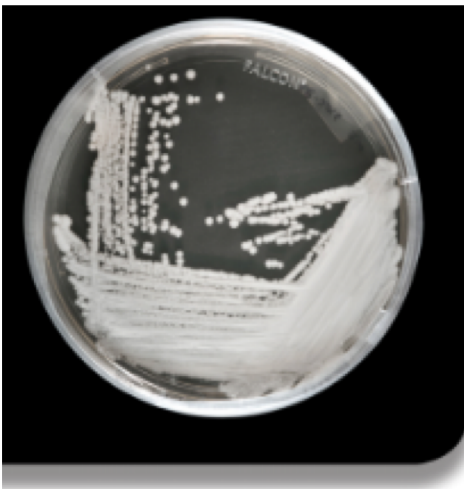
MALDI-TOF ICMS spectrum (4)



Microorganism identification on SARAMIS database (4)



Espectro de massas = digital do fungo



# *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/>

# *Candida auris*

- 1º. Caso no Japão 2009 – 50% mortalidade
- USA: 7 casos (4 mortes) – candidemia
- Alguns isolados apresentam reduzida susceptibilidade às 3 classes de antifúngicos
- Pacientes susceptíveis: diabetes mellitus, cirurgias, antibióticos, cateter venoso central, internação por várias semanas
- Transmissão: dentro do ambiente hospitalar
- Não é identificado pelos métodos clássicos

- 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,<sup>a</sup> A. Kolecka,<sup>b</sup> A. Alastruey-Izquierdo,<sup>a</sup> B. Theelen,<sup>b</sup> M. Groenewald,<sup>b</sup> M. Kostrzewa,<sup>c</sup> M. Cuenca-Estrella,<sup>a</sup> A. Gómez-López,<sup>a</sup> and T. Boekhout<sup>b,d</sup>

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

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

# Sequenciamento da região D1/D2 (ITS)

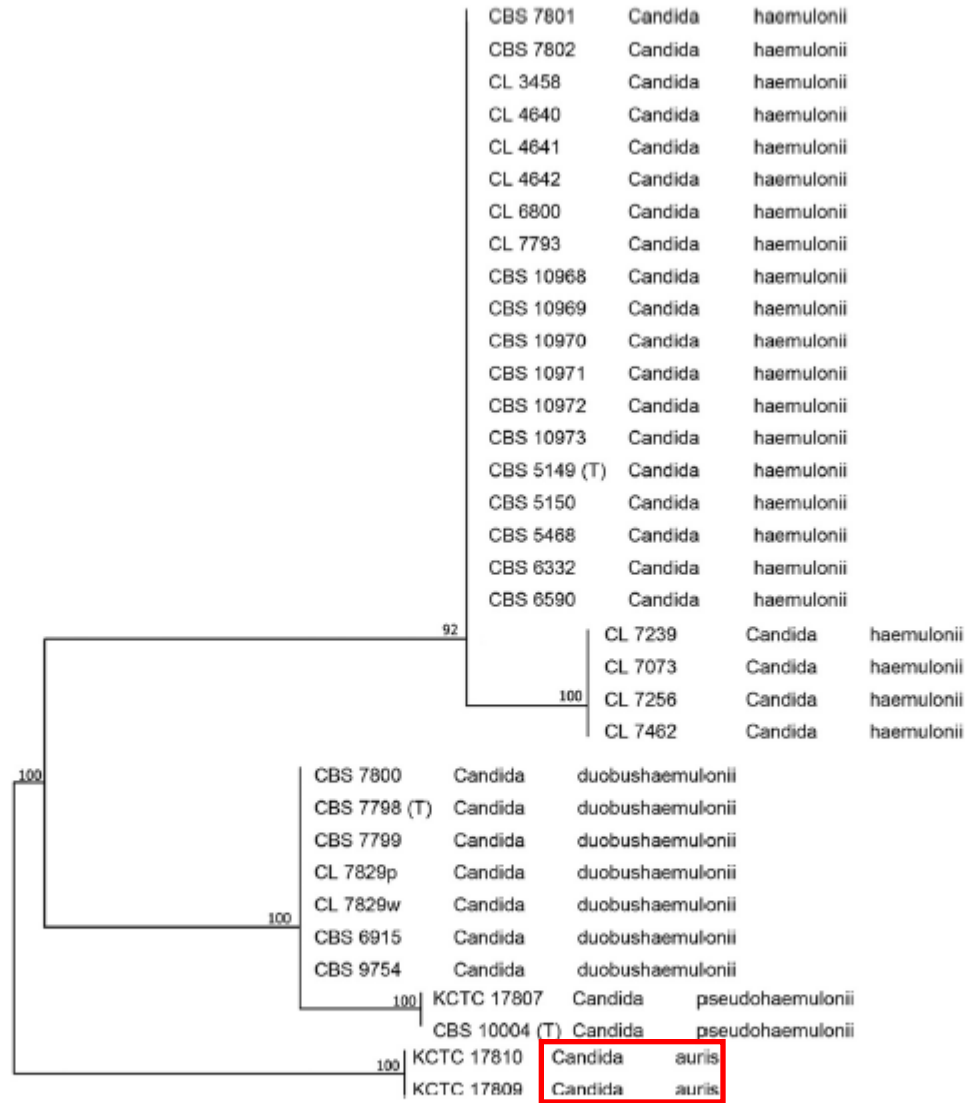
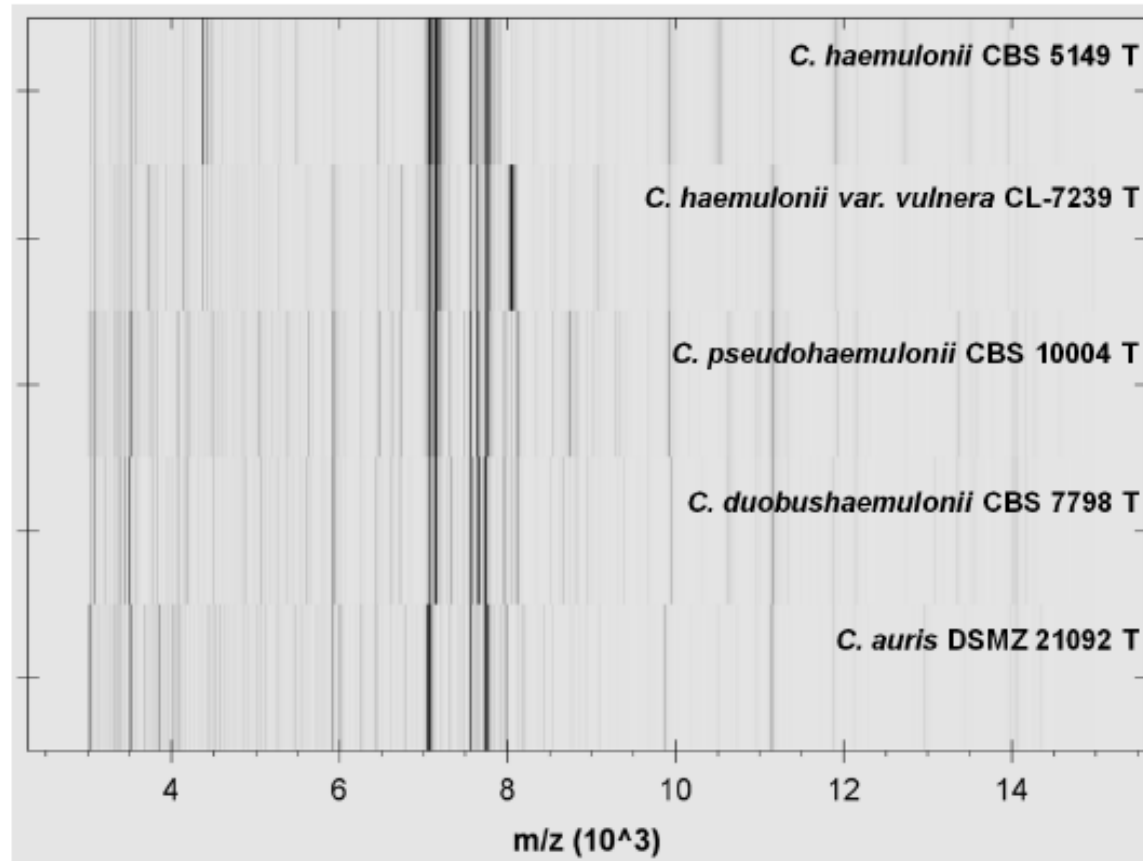


FIG 1 Phylogenetic tree of isolates of the *C. haemulonii* complex obtained by using maximum-likelihood phylogenetic analyses and 2,000 bootstrap simulations based on ITS sequences.

# 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

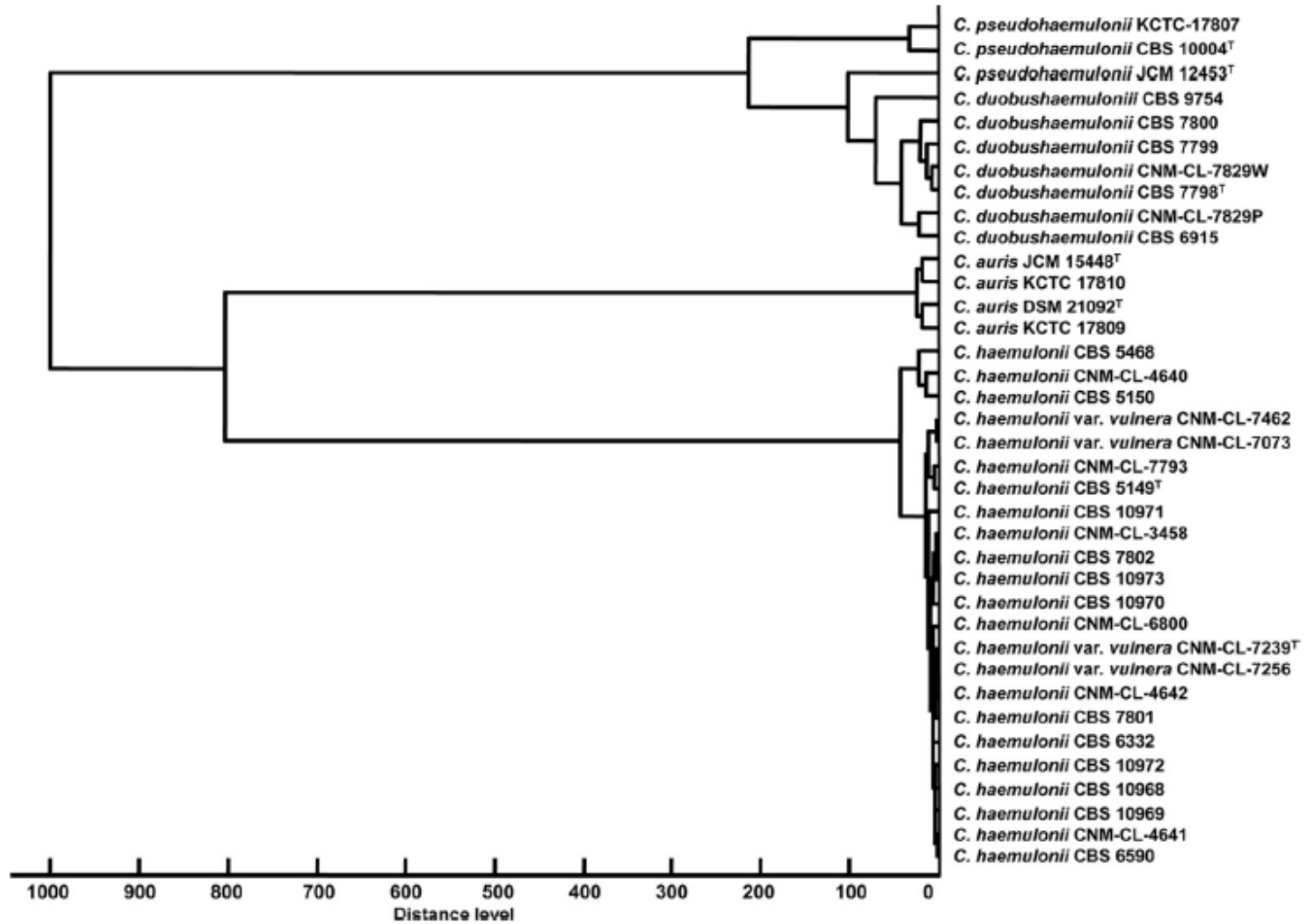


FIG 2 Dendrogram clustering the MALDI-TOF MSP obtained from at least 20 mass spectra of strains belonging to the *C. haemulonii* complex species and related species. *C. auris* JCM 15448<sup>T</sup> and DSM 21092<sup>T</sup> and *C. pseudohaemulonii* JCM 12453<sup>T</sup> were added to make the sampling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