

## **TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO FÚNGICA: revisão de literatura**

*Carollina Gonçalves Péclat<sup>1</sup>*

*Samuel Henrique Roque Ribeiro<sup>2</sup>*

*Jakeline Ferreira de Araújo Lôbo<sup>3</sup>*

**RESUMO:** Os fungos são organismos com papel vital no ecossistema e também de grande influência para os seres humanos, como a produção de fermentos, medicamentos (penicilina) e outros que se destacam pela sua capacidade infecciosa. Vários métodos de identificação de fungos foram pesquisados e encontrados na literatura, como o MALDI-TOF, microcultivo em lâminas, placas em meio diferencial, em tubos com ágar sabouraud, entre outros. Portanto, esse estudo tem o objetivo de buscar na literatura diversos métodos identificação de fungos. Portanto, foi realizada uma revisão de literatura em dois bancos de dados *Pubmed e Scopus*, coletados um total 1300 artigos e selecionamos 100 artigos, após a aplicação de critérios para a inclusão dos estudos obtivemos um total de sete artigos, sendo 93 artigos excluídos. Neste estudo evidenciou-se que as metodologias PCR, imunofluorescência, cultura de fungo como os mais utilizados em universidades, pois, apresentam um custo baixo em relação às outras metodologias abordadas.

**PALAVRAS CHAVE:** Fungos. Identificação de fungo. Metodologias didáticas.

### **1 INTRODUÇÃO**

Estima-se, que os fungos surgiram a 900 milhões a 1 bilhão de anos atrás, eles se deslocaram dos oceanos para terra firme em simbiose com a vegetação e preservaram sua relação como hospedeiro. Esses fungos pioneiros eram organismos aquáticos, possuíam flagelos, o que facilitou sua mobilidade. Em 1928, Alexander Fleming, bacteriologista, desenvolveu uma pesquisa com estafilococos e descobriu acidentalmente a penicilina (REDMAN *et al.*, 2022).

Por serem decompositores, no ecossistema, os fungos têm um papel fundamental na decomposição de alimentos e vegetais, na produção de alimentos e bebidas, na indústria farmacêutica, na biodegradação e biotransformação. Além de garantirem o equilíbrio ambiental, ao degradar toxinas e auxiliar no crescimento de plantas (ABREU *et al.*, 2015).

---

<sup>1</sup> Aluna do 3º período do curso de Enfermagem no Centro Universitário Alfredo Nasser. E-mail: carollinagoncalves@unifan.edu.br

<sup>2</sup> Aluno do 8º período do curso de Biomedicina no Centro Universitário Alfredo Nasser.

<sup>3</sup> Doutoranda no programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de Goiás;. Professora do Centro Universitário Alfredo Nasser e orientadora da pesquisa.

Os fungos são organismos microscópicos unicelulares ou multicelulares eucariontes, formados a partir de um único tipo de célula, ou por variados tipos de células, formando hifas septadas ou pseudohifas. Dentre milhares de espécies descritas, algumas são patógenos aos seres humanos, como: *Candida spp* , *Aspergillus spp*, *Cryptococcus neoformans*, e representam o grupo das espécies de maior significância clínica (SRIKANTA *et al.*, 2014; DE OLIVEIRA *et al.*, 2015; KÖHLER *et al.*, 2017; TOYOTOME *et al.*, 2019; DU H *et al.*, 2020).

A cultura é o método de semear microrganismos em algum meio. Pode ser por microcultivo em lâminas, microcultivo em placa em meio diferencial, caracterizado pela diferença de coloração do microorganismo, e o microcultivo em tubo com ágar sabouraud, que possui todos os nutrientes necessários para o crescimento dos microrganismos em laboratório (NURFARAHIN *et al.*, 2018; ABOUTALEBIAN *et al.*, 2021).

No cultivo de fungos é possível observar morfologias macroscópicas, que podem servir como triagem de diferenciação dos tipos de fungo cultivados, bem como colônias lisas e cremosas com aspecto leitoso, característico da *Candida spp*. Outro exemplo são as colônias mais hígidas, com aspecto de bolor ou esporos, geralmente, característico de *Aspergillus spp* (DU H *et al.*, 2020).

Portanto, esse estudo tem como objetivo buscar na literatura diversos métodos de identificação de fungos.

## 2 METODOLOGIA

Para acessar a literatura foi adotado o critério de pesquisa utilizando as palavras chaves: *Identification OR Cultivation And "Fungus"*. Para a seleção dos artigos foi realizada uma busca em janeiro/2022 na base de dados com periódicos indexados *SCOPUS*, *NCBI* (*National Center for Biotechnology Information*).

Assim, foram selecionados todos os artigos publicados de 2014 a 2022. A partir dos artigos obtidos, foi realizada uma varredura para verificar se todos os trabalhos estavam relacionados com as palavras chaves da busca, os que não estavam relacionados com pelo menos uma associação das palavras chaves abordadas, foram descartados desse estudo. Após a filtragem, todas as publicações levantadas foram listadas com o título, ano da publicação, metodologia e a categoria de contribuição científica de cada documento.

### **3 DISCUSSÕES, RESULTADOS E/OU ANÁLISE DE DADOS**

Durante a etapa de busca pelos artigos nos bancos de dados *Pubmed* foram encontrados um total de 800 artigos, na e *Scopus* 500 artigos. Desses artigos 100, foram selecionados, de acordo com o título e resumo que atenderam o tema da pesquisa. E foram excluídos 80 artigos, porque não preencheram os critérios de inclusão. Dos 20 artigos, apenas os mais expressivos e com as melhores metodologias de identificação, resultou um total sete artigos (CEOXATTO *et al.*, 2012; ABOUTALEBIA *et al.*, 2021; JILLWIN *et al.*, 2021). No Quadro 1, reuniu-se as principais técnicas de identificação fúngica e descreveu suas vantagens e desvantagens.

Quadro 1 - Descrição de diferentes metodologias para identificação de fungos

AUTOR/ANO	METODOLOGIA	VANTAGENS	DESVANTAGENS
Croxatto, 2012	Espectrometria de massa de tempo de voo com ionização por dessorção assistida por matriz (MALDI-TOF MS)	É adequado para identificação microbiana rápida e de alto rendimento a baixo custo e é uma alternativa para sistemas convencionais de identificação bioquímica e molecular de laboratório.	Equipamento caro, demanda mão de obra especializada, é utilizado para altas demandas de testes/dia.
Jillwin, 2021	identificação molecular de fungos fixados em formalina e incluídos em parafina (FFPE)	Baixo custo equipamento, baixo tempo de resposta e rápida fluidez do teste.	Baixa sensibilidade, amostras sensíveis com necessidade de extração de DNA.
Aboutalebian, 2021	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	Proporciona a melhor possibilidade de detecção de pequenos números de genomas microbianos em amostras frescas, particularmente para tecidos com cultura negativa ou patógenos de crescimento lento, sensibilidade alta pouca amostra relativa e alta confiabilidade.	Kits de alto custo, A execução em série de um ensaio de PCR separado como uso rotineiro para a detecção de patógenos individuais é trabalhoso, demorado e caro, principalmente se vários painéis de agentes causadores potenciais devem ser testados.
Chotiprasitsakul, 2020	Imunofluorescência	Alta especificidade e é relativamente acessível.	Baixa sensibilidade, tempo analítico lento e apresenta riscos de falso positivo/negativo.
Burnham-Marushich, 2018	Imuno detecção de antígenos fúngicos	É um teste rápido, sensível e específico tanto na pesquisa do antígeno como no seu subproduto tóxico.	É um teste de alto custo, demanda tempo com risco de falso negativo para determinados gêneros de fungos.
Abdallah, 2020	Cultura	Específico e sensível para a identificação fúngica, e ideal para identificação morfológica macroscópica e de baixo custo.	Tempo analítico demorado em relação aos demais testes, inespecífico em relação à espécie (microscopia), sendo necessários outros testes para confirmação.
Zatti, 2020	Técnicas de amplificação isotérmica de ácidos nucleicos	Acessível, sensível, específico, fácil de usar, rápido, robusto, livre de equipamentos e entregue ao usuário final, cumprindo todos os requisitos.	Demanda tempo e é necessário mão de obra especializada.

Petr Hamal *et al.* (2022) abordam que a identificação dos fungos filamentosos, baseia-se em características morfológicas, disponíveis nos laboratórios e é a abordagem mais usada nos laboratórios de micologia clínica.

Segundo Jacyr Pasternak *et al.* (2012), o método MALD-TOF é uma aplicação de espectromia de massa a microbiologia, é um material que é colocado em uma placa com matriz e bombardeia e o evapora com um laser.

Joseph Jillwin *et al.* (2021) ressaltam que o exame histopatológico (HPE) do tecido age diretamente na ajuda do diagnóstico de infecções fúngicas invasivas (IFI's), mas tem resultados negativos para identificação de fungos do nível de gênero e espécie.

Gap Statement. D LIU *et al.* (2020) em sua obra, afirma que os procedimentos laboratoriais, convencionais que identificam dermatófitos, são lentos e tem carência de especificidade, e passa ser necessário métodos melhores de diagnóstico. Com isso, a aplicação da tecnologia de amplificação de ácidos nucleicos possibilita uma identificação mais precisa e rápida de dermatófitos.

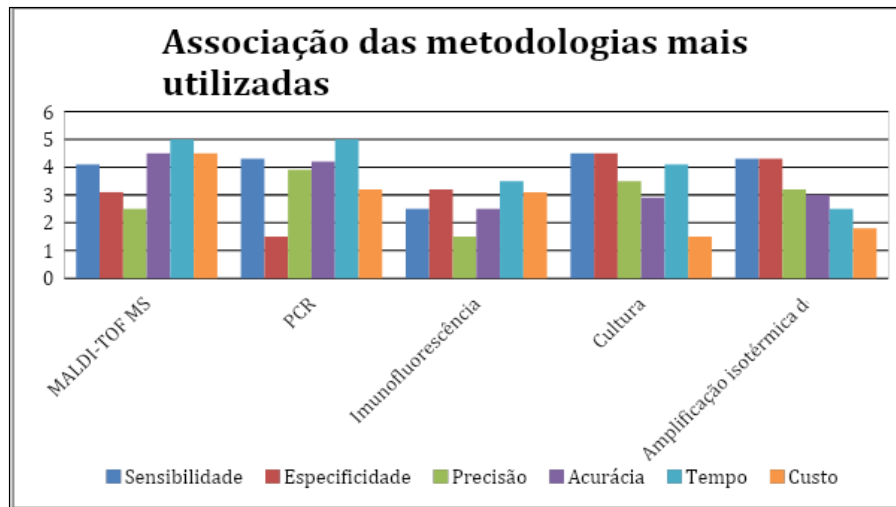
Fungos filamentosos foi uma importante descoberta da indústria, para a saúde humana. Estes fungos em seus ambientes naturais de formação são muito variáveis, o que reflete os vários métodos desenvolvidos para seu cultivo e isolamento. Geralmente, a cultura dos fungos nos laboratórios é feita em placas de ágar. No entanto, várias técnicas de isolamento de célula única, incluindo diluição, micromanipulação, citometria de fluxo, microfluídica e compartimentalização, foram desenvolvidas. Essas técnicas podem ser usadas para cultivar microrganismos e avaliar e monitorar a fisiologia, e a função celular, com isso rastrear novos produtos microbiológicos (NEVALAINEN *et al.*, 2014).

Várias outras técnicas, como coloração viável, hibridização *in situ* e aquelas que usam proteínas de autofluorescência, são frequentemente combinadas com essas técnicas de isolamento de célula única, dependendo do objetivo do estudo (NEVALAINEN *et al.*, 2014).

Na área diagnóstica, o PCR é atualmente o mais confiável e sensível, embora seja de alto custo, porém o mais utilizado para diferenciar ou detectar a presença de fungos, como ensaios moleculares. A identificação molecular de fungos fixados em formalina e incluídos em parafina (FFPE), a espectrometria de massa de tempo de voo com ionização por dessorção assistida por matriz (MALDI-TOF MS) são menos utilizadas na área da docência, porque a técnica de cultivo de fungos em meio à cultura tem uma melhor relação custo/benefício (ABOUTALEBIA *et al.*, 2021; JILLWIN *et al.*, 2021; CEOXATTO *et al.*, 2020) (Gráfico 1).

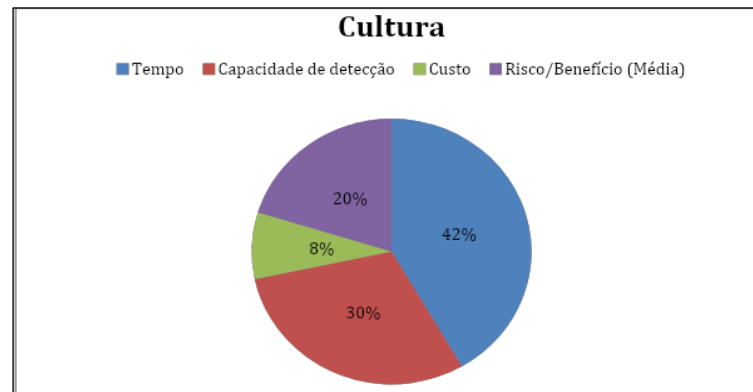
No entanto, para muitos clínicos, quando se faz uma associação de custo/benefício para um paciente que necessita de um tratamento eficaz e rápido (NEVALAINEN *et al.*, 2014). É levada em consideração a capacidade de um teste realizar a detecção necessária, tempo e custo onde tais características estão associadas aos testes Cultura, PCR e Imunofluorescência (Gráficos 2, 3 e 4).

Gráfico 1 - Relação gráfica em associação das metodologias mais utilizadas em pesquisa e em diagnóstico



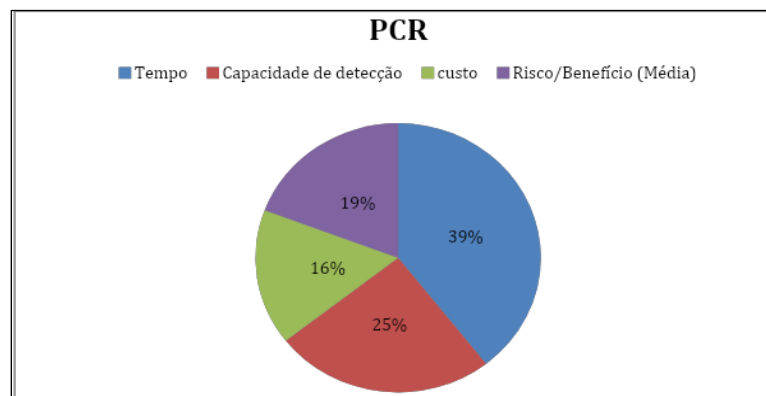
Fonte: autoria própria.

Gráfico 2 - Relação Risco/Benefício (valores a nível de associação, não são analítico)



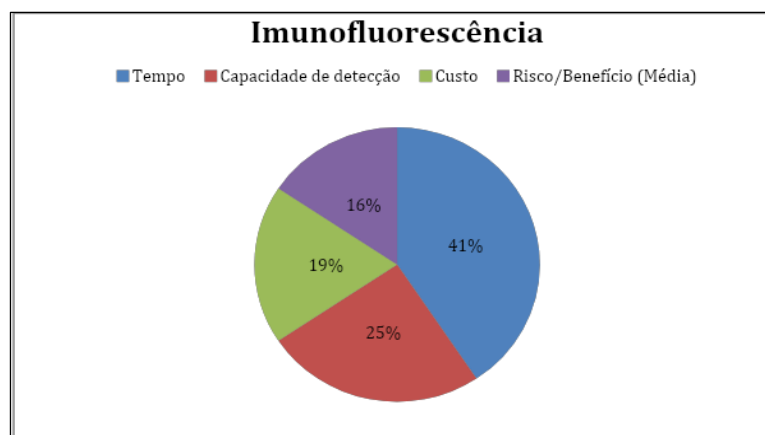
Fonte: autoria própria.

Gráfico 3 - Relação Risco/Benefício (valores a nível de associação, não são analítico)



Fonte: autoria própria.

Gráfico 4 - Relação Risco/Benefício (valores a nível de associação, não são analítico)



Fonte: autoria própria.

#### 4 CONCLUSÕES

Por conseguinte, os dados observados e relatos de artigos encontrados na literatura, relacionam as metodologias MALDI-TOF MS, PCR, imunofluorescência, cultura, amplificação isotérmica de ácidos nucleicos como os mais utilizados na identificação de fungos em pesquisa e diagnóstico, pois são testes precisos e específicos, fazendo com que o diagnóstico se torne mais fidedigno. No entanto evidenciou-se que as metodologias PCR, imunofluorescência, cultura de fungos como os principais e mais utilizados em centro universitários para fins didáticos, uma vez que apresentam um custo baixo em relação a outras metodologias abordadas.

#### REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, N. A. *et al.* Correlation between the dermoscopic patterns and fungal culture. *J Cosmet Dermatol., Egypt., Issue 5*, v. 19, p. 1196-1204, 2020.
- ABOUTALEBIAN, S. *et al.* Direct Detection and Identification of the Most Common Bacteria and Fungi Causing Otitis Externa by a Stepwise Multiplex PCR. *Front Cell Infect Microbiol., Iran*, v. 11, 2021.
- CROXATTO, A.; PROD'HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev., Suisse, Issue 2*, v. 36, p. 380-408, 2012.

DU, H. *et al.* *Candida auris: Epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence.* ***PLoS Pathog.***, China, Issue 10, v. 16, 2020.

JIAO, W. *et al.* *Organic acid, a virulence factor for pathogenic fungi, causing postharvest decay in fruits.* ***Mol Plant Pathol.***, China, Issue 2, v. 23, p. 304-312, 2022.

JILLWIN, J. *et al.* *Molecular identification of pathogenic fungi in formalin-fixed and paraffin-embedded tissues.* ***J Med Microbiol.***, India, Issue 2, v. 70, 2021.

KÖHLER, J. R. *et al.* *Fungi that Infect Humans.* ***Microbiol Spectr.***, Boston, Issue 3, v. 5, 2017.

LOMAS, J. G. *et al.* *A simple and rapid method for microculture and identification of fungi.* ***Mycopathologia***, France, Issue 2, v. 76, p. 119-124, 1981.

NEVALAINEN, H.; KAUTTO, L.; TE'O, J. *Methods for isolation and cultivation of filamentous fungi.* ***Methods Mol Biol.***, Australia, v. 1096, p. 3-16, 2014.

NURFARAHIN, A. H.; MOHAMED, M. S.; PHANG, L. Y. *Culture Medium Development for Microbial-Derived Surfactants Production-An Overview.* ***Molecules***, Malaysia, Issue 5, v. 23, 2018.

OLIVEIRA, H. C. *et al.* *Importance of adhesins in virulence of Paracoccidioides spp.* ***Front Microbiol.***, Brazil, v. 6, p. 303, 2015.

PÉREZ-MARTÍN, J. *et al.* *Virulence-specific cell cycle and morphogenesis connections in pathogenic fungi.* ***Semin Cell Dev Biol.***, Spain, v. 57, p. 93-99, 2016.

SRIKANTA, D.; SANTIAGO-TIRADO, F. H; DOERING, L. *Cryptococcus neoformans: historical curiosity to modern pathogen.* ***Yeast.***, USA, Issue 2, v. 31, p. 47-60, 2014.

TOYOTOME, T. *Resistance in the Environmental Pathogenic Fungus Aspergillus fumigatus.* ***Med Mycol J.***, China, Issue 3, v. 60, p. 61-63, 2019.