

Capítulo 4

Micologia

Aurea Maria Lage de Moraes
Rodrigo de Almeida Paes
Verônica Leite de Holanda

1. Introdução à micologia

Os fungos são organismos que convivem conosco todos os dias. Estes organismos são encontrados praticamente em qualquer local do ambiente que nos cerca, inclusive no ar, onde estruturas reprodutivas, na forma de esporos ou conídios, estão prontas para, ao cair em um substrato adequado, desenvolver novas estruturas vegetativas e reprodutivas.

Estes organismos, muitas vezes, nos são úteis, decompondo resíduos orgânicos, causando a decomposição ou a degradação de alimentos, ou mesmo atacando seres vivos, parasitando-os e, eventualmente, causando a sua morte.

Os fungos são importantes, tanto do ponto de vista ecológico quanto econômico. Ecologicamente, são considerados os lixeiros do mundo, pois degradam todo tipo de restos orgânicos, independente da origem, transformando-os em elementos assimiláveis pelas plantas. Já, economicamente, têm implicações em várias áreas: Medicina humana e veterinária, Farmácia, Nutrição, Fitopatologia, Agricultura, Biotecnologia, entre outras.

Os fungos tiveram seu grupo reconhecido como um reino a partir da descrição de cinco reinos por Whittaker em 1969. Esses organismos foram alocados em reinos com base na morfologia e no modo de nutrição dos seres vivos, sendo criado, então, o reino Fungi. Em 1990, Carl Woese propôs o agrupamento dos cinco reinos estabelecidos por Whittaker em três domínios: *Archaea*, *Eubacteria* e *Eukaria*, onde o reino Fungi faz parte do domínio Eukaria, que reúne todos os eucariontes.

A Micologia é, portanto, a área da Biologia destinada ao estudo dos fungos.

1.1. Elementos fundamentais dos fungos e Citologia

Os fungos são organismos eucariontes, unicelulares (leveduriformes) ou multicelulares (filamentosos), haploides (homo ou heterocarióticos), com parede celular contendo quitina e α -glucano. Não apresentam plastos ou pigmentos fotossintéticos.

Todos os fungos conhecidos, com poucas exceções, têm origem nos **esporos** (reprodução sexuada) ou **conídios** (reprodução assexuada), corpúsculos que podem ser comparados às sementes das plantas superiores, embora não sejam morfologicamente semelhantes a estas.

Os esporos ou conídios, para germinarem, necessitam de calor e umidade e o resultado desta germinação é a formação de um ou mais filamentos finos, conhecidos como tubos germinativos. Estes tubos se ramificam em todos os sentidos formando uma massa filamentosa, chamada **micélio**, que constitui o sistema vegetativo, responsável pelo desenvolvimento fúngico e pela absorção dos alimentos. Os filamentos simples ou ramificados que formam o micélio são denominados **hifas**. Na maioria dos casos, o sistema vegetativo encontra-se no interior dos tecidos parasitados, no solo ou na matéria orgânica em decomposição.

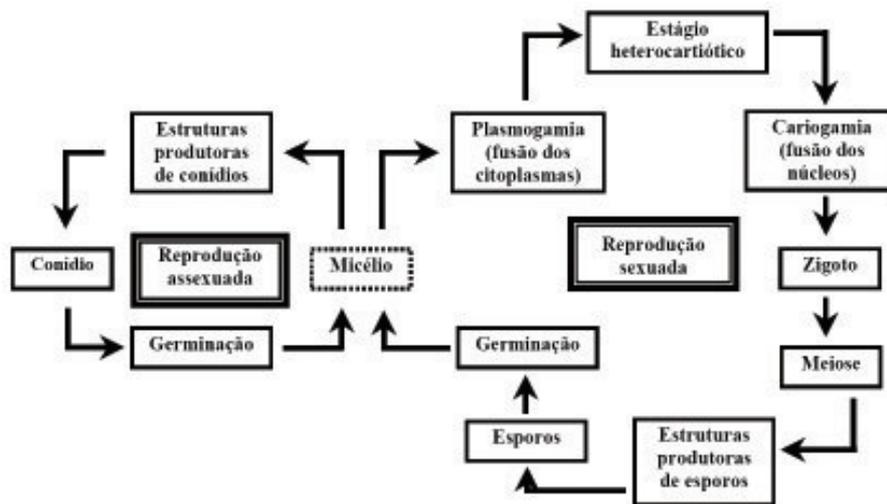
Com a formação dos esporos ou conídios é necessário que estes tenham acesso livre ao ar, para assegurar sua disseminação. Realiza-se, então, uma diferenciação das hifas vegetativas, geralmente levantadas verticalmente sobre o plano do micélio, conhecido como **esporóforo** ou **conidióforo**, e sobre estes se originam os esporos ou conídios. As hifas, por sua vez, podem ser apocíticas (com septo) ou cenocíticas (sem septo).

O ciclo de vida dos fungos compreende duas fases. Uma somática, caracterizada por atividades alimentares, e outra reprodutiva, onde os fungos podem realizar reprodução sexuada ou assexuada. Em ambos os casos, um grande número de estruturas é formado, dependendo da espécie. As estruturas assexuadas, como também as sexuadas, podem ser formadas isoladamente ou em grupos, neste caso, formando corpos de frutificação. Assim, conídios podem ser formados em conidióforos isolados ou agrupados, constituindo então os **conidiomas**. Os esporos podem ser formados em ascas (onde são formados os ascos) ou basidiomas (onde são formados os basídios).

De acordo com tipo de reprodução realizada, os fungos podem ser divididos em três grupos:

- **Holomorfo**: aquele que no ciclo de vida realiza ambas as reproduções, sexuada e assexuada.
- **Anamorfo**: aquele que no ciclo de vida realiza apenas a reprodução assexuada.
- **Teleomorfo**: aquele que no ciclo de vida realiza apenas a reprodução sexuada.

Esquema do ciclo de vida geral do fungo.



1.2. Nutrição, metabolismo e *habitat*

Os fungos são considerados seres heterotróficos, necessitando de materiais orgânicos já formados, que servem como fonte de energia e como constituintes celulares. Por causa da rigidez da parede celular, sua nutrição é por absorção de nutrientes solúveis simples. Realizam respiração celular ou fermentação para obtenção de energia, e sua reserva energética é sob a forma de glicogênio.

Devido à ausência de clorofila nos fungos, torna-se necessário que o substrato forneça as substâncias já elaboradas indispensáveis à alimentação, obrigando os fungos a viverem em estado de saprofitismo, parasitismo, simbiose (líquens, por exemplo) ou mutualismo. Eles podem ser subdivididos em:

- Saprófitas obrigatórios – Fungos que vivem exclusivamente em matéria orgânica morta, não podendo parasitar organismos vivos.
- Parasitas facultativos ou saprófitas facultativos – Fungos capazes de causar doenças ou de viver em restos orgânicos, de acordo com as circunstâncias.

- Parasitas obrigatórios – Fungos que vivem exclusivamente atacando organismos vivos.

Os fungos são considerados seres cosmopolitas, pois estão presentes em qualquer parte do planeta. Sendo amplamente distribuídos pela natureza, são encontrados na água, no ar atmosférico, no solo, sobre os animais e vegetais vivos, na matéria orgânica em decomposição, nos produtos alimentícios e industriais.

A maioria dos fungos têm como necessidades nutricionais, os elementos C, O, H, N, P, K, Mg, S, B, Mn, Cu, Mo, Fe e Zn. Muitas espécies não necessitam de luz para seu desenvolvimento, já outras necessitam para formar suas estruturas de reprodução, podendo ser consideradas fototróficas (que buscam a luz). A temperatura ideal para o crescimento dos fungos fica entre 0 a 35°C, mas o ótimo para a maioria fica entre 20 a 30°C e a umidade ideal fica em torno da saturação.

1.3. Posição sistemática dos fungos

O reino Fungi é dividido em sete filos, (Chytridiomycota, Neocallimastigomycota, Blastocladiomycota, Microsporídia, Glomeromycota, Ascomycota e Basidiomycota), e um grupo, os fungos anamórficos. Este grupo não possui valor taxonômico, sendo seus membros relacionados aos filos Ascomycota e Basidiomycota.

A taxonomia dos fungos é tradicionalmente baseada em caracteres citológicos e morfológicos. Mas, atualmente, com o desenvolvimento de técnicas bioquímicas e moleculares, novos caracteres foram adicionados como auxílio na identificação das espécies fúngicas. Tais como as técnicas baseadas em PCR (RAPD, RFLP, AFLP), sequenciamento de DNA, isoenzimas e cromatografia (TLC, HPLC, CG, espectrometria de massa).

1.3.1. Filo Chytridiomycota

Os representantes do filo Chytridiomycota são considerados cosmopolitas e saprófitos aquáticos. A maioria é de água doce poucos são marinhos. A principal característica do grupo é a formação de zoósporo flagelado, estruturas de propagação no ambiente aquático, onde o flagelo ajuda na sua movimentação.

Ex: *Chytriumyces* sp.

1.3.2. Filo Neocallimastigomycota

São encontrados no sistema digestivo dos grandes mamíferos herbívoros e possivelmente em outros ambientes anaeróbios terrestres e aquáticos. Tratam-se de zoósporos não flagelados.

Ex: *Neocallimastix* sp.

1.3.3. Filo Blastocladiomycota

Seus representantes apresentam reprodução assexuada com zoósporo de um único flagelo, e reprodução sexuada através da fusão de planogametas. São habitantes restritos de água e solo e parasitos de insetos.

Ex: *Allomyces* sp. e *Coelomomyces* sp.

1.3.4. Filo Microsporídia

Organismos eucariontes sem mitocôndria e flagelo desconhecido. São parasitas obrigatórios de animais, e comumente atacam peixes e insetos. Estes organismos foram incluídos no reino Fungi após estudos filogenéticos.

1.3.5. Filo Glomeromycota

O filo Glomeromycota é representado por fungos de micorrizas arbusculares (FMA). Participam de uma associação mutualística com as raízes

de algumas plantas, na qual a planta, através da fotossíntese, fornece energia e carbono para a sobrevivência e multiplicação do fungo, enquanto este absorve nutrientes, minerais e água do solo transferindo-os para as raízes da planta. Também são considerados cosmopolitas. Foi incluído neste grupo os representantes do antigo filo Zygomycota, que tem como principais características, hifas cenocíticas e a formação de zigosporângio, por reprodução sexuada; e esporângio, por reprodução assexuada. Os esporângios são estruturas formadoras de propágulos para dispersão.

Ex: *Mucor* sp. e *Glomus* sp.

1.3.6. Filo Ascomycota

O filo Ascomycota compreende o maior grupo do reino Fungi, constituído de aproximadamente 75% de todos os fungos descritos. Seus representantes são considerados cosmopolitas e são encontrados na natureza como saprófitos, parasitas (especialmente de plantas), ou em associação mutualística (com algas unicelulares) formando os líquens.

A principal característica do grupo é a presença de asco contendo ascosporos, geralmente oito, que representam a estrutura de propagação do grupo. São produzidos por reprodução sexuada.

A reprodução assexuada também pode ser encontrada. O asco é formado em uma estrutura denominada ascocarpo (corpo de frutificação), que pode ser encontrado nas seguintes formas: apotécio (ascocarpo em forma de taça), cleistotécio (ascocarpo totalmente fechado, que se rompe com a maturidade), e peritécio (ascocarpo em forma de balão, com um poro na sua ponta). A ausência da formação de ascocarpo também é observada, sendo este considerado como ascos nus.

Ex: *Eurotium* sp. e *Emericella* sp.

1.3.7. Filo Basidiomycota

Os representantes do filo Basidiomycota são considerados cosmopolitas e saprófitos. São comumente denominados “cogumelos”. Têm como principal característica a presença de basídio contendo basidiosporos, geralmente quatro, produzidos por reprodução sexuada.

A reprodução assexuada também pode ser encontrada. O basídio é formado a partir de um basidiocarpo, sendo este constituído, basicamente, por píleo (o chapéu do cogumelo), lamela (estrutura pregueada abaixo do píleo, onde se encontram os basídios) e estirpe (estrutura que sustenta o píleo).

Ex: *Agaricus* sp. e *Rhodotorula* sp.

1.3.8. Fungos Anamórficos

Os Fungos Anamórficos formam um grupo de fungos onde a reprodução assexuada é predominante, com a formação de conídios como estrutura de propagação.

A reprodução sexuada é ausente, desconhecida ou teve a capacidade perdida. Esse grupo está relacionado a gêneros do filo Ascomycota e Basidiomycota por comparação de sequências gênicas. São considerados como cosmopolitas, saprófitos, e parasitas de animais e plantas.

Os conídios são formados por células conidiogênicas, presentes nos conidióforos, que são prolongamentos de hifas modificadas, com função reprodutiva. Os conídios podem ter diferentes formas, tamanhos e cores, podem possuir ou não a superfície texturizada, ornamento ou septo.

Ex: *Aspergillus* sp e *Penicillium* sp.

2. Por que estudamos os fungos

Os fungos são conhecidos da humanidade há vários séculos, tanto por seus benefícios quanto pelos problemas que causam. Muitas doenças huma-

nas, de animais e plantas (micoses) são causadas por fungos. Em humanos e animais os fungos podem causar alergias respiratórias e cutâneas leves ou intensas, dependendo da suscetibilidade e pré-disposição do indivíduo. Podem causar infecções em mucosas e outros tecidos subcutâneos, assim como infecções crônicas e letais envolvendo órgãos inteiros. Cada tecido ou órgão do corpo humano pode ser afetado, com exceção dos dentes.

Nós dependemos da agricultura para nos fornecer alimentos, principalmente os grãos de cereais (milho, trigo, aveia, amendoim, etc.) que alimentam tanto os humanos quanto os animais. Doenças fúngicas em cereais causam perdas significantes na agricultura, tanto para o consumo interno quanto para a exportação de grãos – atividade tão importante em nossa economia. Além disso, o ataque dos fungos não se restringe ao campo de produção, eles atacam também os grãos estocados causando sua destruição ou produzindo toxinas carcinogênicas potentes (micotoxinas) dentro destes grãos.

Os fungos têm sido utilizados para os mais diferentes propósitos, desde a antiguidade. O uso mais antigo deles tem sido como alimento, propriamente dito, tendo sido utilizado mais tarde também na indústria alimentícia para a produção de pães, queijos, cervejas e vinhos. O sabor e a textura de muitos alimentos, como os queijos e o molho de soja, são dados pelos fungos usados em sua fabricação. Posteriormente, foi descoberto o poder dos fungos na produção de metabólitos que poderiam ser úteis, como a Penicilina.

Estudos em Biotecnologia e Engenharia genética propiciaram a produção destes metabólitos em larga escala. Hoje produtos fúngicos usados comercialmente incluem ácidos orgânicos, etanol, alguns antibióticos (além da Penicilina), pigmentos, vitaminas, enzimas e pesticidas biológicos. Além de se tornarem valiosos objetos de pesquisa, em particular, como modelos eucariontes, uma vez que são facilmente manipulados em laboratório, fornecendo informações importantes sobre a bioquímica, a genética e a biologia molecular dos eucariontes.

3. Micologia Médica

A Micologia médica tem como principal objetivo estabelecer o diagnóstico micológico das infecções por fungos, que por sua vez se baseia em correta coleta e processamento de espécimes clínicos. A observação das normas de preservação, e transporte adequados dos materiais clínicos até os locais de processamento, como laboratório de Microbiologia/Micologia também tem enorme importância para a obtenção de resultados acurados.

3.1. Classificação das micoses

Didaticamente, podemos dividir as micoses em grupos, como demonstrado a seguir:

3.1.1. Micoses superficiais e cutâneas

As MICOSES SUPERFICIAIS são infecções causadas por fungos que invadem as camadas mais superficiais da capa córnea da pele ou a haste livre dos pelos. As lesões se manifestam como mancha pigmentar na pele, nódulo ou pelos. A forma invasiva do fungo é uma hifa, característica de cada micose.

A **pedra negra** é uma micose causada pela *Piedraia hortae*. Esta micose consiste em nódulos duros, de cor escura, localizados na haste dos pelos e bastante aderentes a eles. Em parasitismo, o fungo se apresenta como um emaranhado de hifas intimamente unidas. Essas hifas são de cor castanha e têm parede e septos espessos. Os nódulos constituem, na verdade, um ascostroma, pois em meio ao enovelado de hifas formam-se lóculos ovalados contendo oito ascósporos. Já a **pedra branca** é causada por leveduras do gênero *Trichosporon*. Nesta infecção o fungo cresce sobre a haste dos pelos, formando nódulos de hifas hialinas septadas e ramificadas, facilmente destacáveis dos

pelos, que podem se desarticular, resultando em artroconídios retangulares que se tornam esferóides ou poliédricos.

Leveduras do gênero *Malassezia* são os agentes da **pitíriase versicolor**. Esses fungos vivem normalmente sobre a pele do homem, na forma de levedura. Usualmente podem filantar e invadir as células queratinizadas das camadas superficiais da pele, determinando a micose. A doença se manifesta como manchas descamativas distribuídas pelo tórax, abdome e membros superiores. Ao contrário do que muitos pensam, a micose não é adquirida na praia; o que ocorre é que quando o doente se bronzeia, os locais da pele onde o fungo está em parasitismo não se queimam, permitindo que as lesões possam ser visualizadas com maior facilidade. O diagnóstico definitivo se dá somente pelo exame direto através da observação de hifas curtas e curvas e elementos redondos. A *Malassezia* não cresce nos meios de cultura habituais usados na rotina porque necessita de suplemento lipídico para seu crescimento.

As **MICOSES CUTÂNEAS** se caracterizam por serem causadas por fungos que invadem toda a espessura da capa córnea da pele ou a parte queratinizada intrafolicular dos pelos ou a lâmina ungueal. Na pele, as lesões se manifestam como mancha inflamatória, nos pelos como lesão de tonsura e na unha por destruição da lâmina ungueal. O contágio é feito através de animais, homens ou de solo infectado.

As **dermatofitoses** constituem manifestações clínicas muito variadas causadas por um grupo de fungos, denominados dermatófitos, que produzem lesões na pele, pelos ou unhas. Os fungos dermatófitos degradam queratina e pertencem aos gêneros *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*. Há reconhecidamente 27 espécies patogênicas para o homem, dentre as quais 15 ocorrem no Brasil. Destas, as principais são: *Trichophyton rubrum*,

Epidermophyton floccosum, *T. mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *M. gypseum* e *T. tonsurans*.

As dermatofitoses podem ser classificadas nas seguintes modalidades clínicas: dermatofitose ou tinha do couro cabeludo, da pele glabra, da barba e da face, dos pés, das unhas e inguinal, dependendo da localização da lesão no paciente. Já nos cabelos, pela relação com os fungos, podem ser diferenciados dois tipos de parasitismo: endotrix, onde os arthroconídios se localizam somente no interior do pelo, esse causado, por exemplo, por *T. tonsurans*; e ectotrix, onde os arthroconídios se dispõem no interior e ao redor do fio de cabelo. Podemos citar *M. canis* e *T. mentagrophytes* como agentes deste tipo de parasitismo pilar.

Em cultivo, os dermatófitos, em sua maioria, produzem dois tipos de conídios: macroconídios e microconídios que, juntamente com a característica macroscópica da colônia, vão permitir a identificação das diferentes espécies dos dermatófitos. Os macroconídios são característicos dos seguintes gêneros:

- *Microsporum* – São fusiformes, grandes, multisseptados de paredes rugosas.
- *Epidermophyton* – São clavados, robustos bi ou trisseptados com paredes lisas e espessas.
- *Trichophyton* – Quando existentes são delicados, clavados, multisseptados de paredes finas e lisas.

O quadro a seguir mostra as características macro e micromorfológicas que são observadas nas colônias dos principais fungos responsáveis por dermatofitoses.

Fungo dermatófito	Macromorfologia	Micromorfologia
<i>Trichophyton rubrum</i>	Colônia branca, granular ou cotonosa, com pigmento vermelho no verso	Microconídios em gota de lágrima dispostos ao longo da hifa e macroconídios, que quando existem, são comuns do gênero
<i>T. mentagrophytes</i>	Colônia branca, granular ou cotonosa, com pigmento que vai do amarelo ao marron no verso	Macroconídios do gênero, microconídios redondos numerosos
<i>T. tonsurans</i>	Colônia acastanhada com pigmento vermelho-ferruginoso no verso	Microconídios numerosos e polimórficos, usualmente clavados ou alongados
<i>Microsporum canis</i>	Colônia branca, penugenta com pigmento amarelo alaranjado no verso	Macroconídios fusiformes, multisseptados de paredes rugosas e mais espessas que a dos septos, poucos microconídios
<i>M. gypseum</i>	Colônia pulverulenta de cor camurça, com pigmento pardo no verso	Numerosos macroconídios fusiformes, multisseptados, de paredes rugosas e finais poucos microconídios
<i>Epidermophyton floccosum</i>	Colônia membranosa de cor verde-limão	Macroconídios em grupos de três ou mais na extremidade de conidióforos, microconídios inexistentes

A **candidíase** é micose causada por leveduras do gênero *Candida*, em especial pela espécie *C. albicans*. Elas são hóspedes normais do trato gastrointestinal do homem e fazem parte da microbiota de determinadas regiões do tegumento cutâneo. Porém a *Candida* pode invadir a camada córnea da pele ou a lâmina ungueal de hospedeiros normais. As lesões têm localização

peculiar: nas unhas das mãos e nas áreas intertriginosas da pele (região inguinal, espaços interdigitais das mãos, região submamária e axilar). Também é possível ocorrerem lesões nas unhas dos pés.

Há ainda outras micoses de pele e de unha que não são causadas nem por fungos dermatófitos nem por fungos do gênero *Candida*. Dentre esses fungos destacam-se: *Fusarium* sp., *Scybalidium dimidiatum*, e *S. hyalinum* que podem causar lesões principalmente em unhas e em espaços interdigitais dos pés. Em cultivo, *S. dimidiatum* se apresenta como colônia cotonosa, branca no início tornando-se cinza a negra em dez dias. Microscopicamente, se compõe de hifas demáceas e hialinas, com artroconídios septados e não septados. *S. hyalinum* é considerado um mutante de *S. dimidiatum* incapaz de sintetizar melanina e, com isso, as hifas e os conídios são sempre hialinos. As culturas de *Fusarium* sp. podem ser as mais variadas possíveis, quanto à macroscopia. Esta dependerá da espécie que causa a lesão. Porém, microscopicamente, o que caracteriza *Fusarium* sp. é a presença de macroconídios em forma de lua, bi ou trisseptados.

3.1.2 . Micoses subcutâneas

As MICOSES SUBCUTÂNEAS se caracterizam por resultar da inoculação de um fungo patogênico por ocasião de um traumatismo, manifestando-se como tumefação ou lesão supurada da pele ou do tecido subcutâneo, produto da disseminação do fungo por contiguidade ou por via linfática, porém limitada ao território aquém do linfonodo regional.

A **esporotricose** tem como agente *Sporothrix schenckii*. Esse é um fungo dimórfico, logo, muda entre as formas miceliana e leveduriforme, de acordo com a temperatura e as condições do ambiente onde se encontra. Assim sendo, *S. schenckii*, em parasitismo nos tecidos apresenta-se como

elementos leveduriformes bem pequenos, com brotamento geralmente em forma de charuto. Na natureza, em associação a vegetais e madeira, vive na forma filamentosa. A transmissão clássica da esporotricose se dá por traumatismo causado por vegetais onde o fungo se encontra ou pela forma zoofílica, ou seja, através de lesões provocadas por animais infectados por *S. schenckii*, em especial gatos, como vêm ocorrendo no estado do Rio de Janeiro, que é uma área endêmica de esporotricose. A lesão inicial da esporotricose é uma pápula ou nódulo que surge no ponto da inoculação, usualmente localizado nos membros. Desse local o fungo pode propagar-se por contiguidade, determinando uma lesão circunscrita ou por via linfática, ocasionando o aparecimento de nódulos em número variável sobre o trajeto de um linfático superficial. O diagnóstico definitivo se dá com o isolamento em cultivo do fungo em amostras de pus ou biópsia das lesões. Testes de detecção de IgG e IgM em amostras de soro podem auxiliar no diagnóstico e no acompanhamento terapêutico desta infecção.

A **cromoblastomicose** é uma infecção que se caracteriza pelo aspecto parasitário de seus agentes: o corpo muriforme. Esses são elementos globosos, com parede acastanhada espessa e septados em planos distintos. Podem ser visualizados também elementos não septados e outros com apenas um septo, porém o que caracteriza o corpo muriforme é a presença de septos em planos diferentes. As principais espécies que podem causar cromoblastomicose no ser humano são *Fonsecaea pedrosoi*, *F. compacta*, *Cladophialophora carrionii*, *Phialophora verrucosa*, e *Rhinocladiella aquaspersa*. No Brasil, normalmente, os casos dessa micose são causados por *F. pedrosoi*, após traumatismo com matéria orgânica vegetal.

Micetoma é o nome coletivo de micoses produzidas por algumas espécies de fungos ou de actinomicetos aeróbios, os quais, nos tecidos, se organizam em um agregado de hifas ou filamentos bacterianos, denominados grãos. Os agentes de micetoma possuem *habitat* na natureza associado a vegetais,

nutrindo-se de outros vegetais em decomposição ou como fitopatógenos. O micetoma eumicótico se distingue do actinomicótico por ser: causado por um fungo, enquanto o actinomicótico é causado por bactérias filamentosas. Os grãos, de tamanho e forma variados, podem ter coloração branco-amarelado, vermelha ou negra. O que caracteriza a cor de um grão é somente o fungo ou actinomiceto agente da doença. Por isso, a cor do grão obtido das lesões do paciente já fornece um indicativo de qual seja o agente do micetoma. O quadro a seguir o relata alguns desses agentes, com o respectivo tipo e coloração dos grãos:

Fungos causadores de micetoma	
Grão eumicótico negro <i>Madurella mycetomatis</i> <i>M. grisea</i> <i>Pyrenochaeta romeroi</i> <i>Exophiala jeanselmei</i>	Grão eumicótico branco <i>Acremonium sp.</i> <i>Pseudallescheria boydii</i> (<i>Scedosporium apiospermum</i>) <i>Neotestudina rosatii</i> <i>Aspergillus nidulans</i> (<i>Emerciella nidulans</i>)
Actinomicetos causadores de micetoma	
Grão actinomicótico vermelho <i>Actinoadura pelletieri</i>	Grão actinomicótico branco <i>Actinoadura madurae</i> <i>Nocardia brasiliensis</i> <i>N. asteroides</i> , <i>N. caviae</i> <i>Streptomyces somaliensis</i>

Há outras micoses subcutâneas de interesse, como a lobomicose e a entomoftoramicose. No entanto, a esporotricose, cromoblastomicose e micetomas são as mais comuns no Brasil.

3.1.3. Micoses sistêmicas e oportunistas

As MICOSES SISTÊMICAS se caracterizam por serem adquiridas por inalação de propágulos fúngicos, sendo, conseqüentemente a lesão primária pulmonar, com tendência à regressão espontânea. O fungo pode se disseminar pelo corpo através do sangue, originando lesões extrapulmonares nos indivíduos. Os agentes de micoses sistêmicas raramente são implantados traumáticamente; quando isso ocorre, determinam uma lesão granulomatosa circunscrita, com ou sem linfangite regional, que regride espontaneamente.

Ao invadir os tecidos, os fungos desencadeiam resposta imunológica no hospedeiro, que pode ser evidenciada por reação intradérmica, na qual se verifica a resposta celular dada pelo hospedeiro, por reações de hipersensibilidade tardia e por provas de detecção de anticorpos em amostras de soro (imunodifusão dupla e fixação do complemento), onde é avaliada a resposta humoral. Uma reação intradérmica positiva evidencia que o indivíduo já foi previamente sensibilizado pelo fungo e as provas sorológicas indicam que há anticorpos contra o fungo. Porém, as provas sorológicas podem fornecer resultados falso-positivo e falso-negativo, visto que podem ocorrer reações cruzadas com outros anticorpos na prova aplicada. As provas sorológicas auxiliam no diagnóstico de micoses sistêmicas, mas o que realmente diagnostica a doença é o isolamento do fungo em cultivo ou sua observação no exame micológico direto dos materiais adequados para o exame, tendo as provas imunológicas valor diagnóstico presuntivo. As provas imunológicas são úteis para avaliações epidemiológicas, para avaliação prognóstica e para a triagem de pacientes. As reações intradérmicas apresentam valor diagnóstico baixo, uma vez que não discriminam entre infecções passadas ou recentes. Porém são de grande valor nos estudos epidemiológicos.

As micoses sistêmicas são a coccidiodomicose, a blastomicose, a histoplasmose, e a paracoccidiodomicose. As duas primeiras não são comuns no Brasil, embora sejam relatados casos de coccidiodomicose no semi-árido do Nordeste, em especial no Piauí em caçadores de tatus, que revolve-ram o solo para desentocar a caça. Há também a esporotricose sistêmica, que é resultado da inalação de conídios de *S. schenckii* os quais vão causar infecção pulmonar que pode sistematizar-se. Este tipo de apresentação clínica da esporotricose é bastante raro. O aspecto macro e micromorfológico do fungo é o mesmo do agente da esporotricose subcutânea.

A **histoplasmose** é uma infecção sistêmica, causada por *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* ou *H. capsulatum* var. *duboisii*. Enquanto o primeiro agente tem distribuição cosmopolita, o outro tem sua distribuição geográfica restrita ao continente africano. O cultivo de *H. capsulatum* à temperatura ambiente é constituído de colônia branca que, quando muito velha, assume coloração camurça. O crescimento do fungo é bem lento. Microscopicamente se observam hifas finas e delicadas e conídios de dois tipos. Os macroconídios esféricos e tuberculados são estruturas marcantes para a identificação do fungo. Porém, a presença de microconídios esféricos é necessária para a correta identificação do agente, pois há alguns fungos saprófitas, pertencentes ao gênero *Chrysosporium*, que também produzem estruturas de propagação semelhantes. Deve-se, para a correta identificação do agente da histoplasmose, realizar a conversão desse fungo para a fase leveduriforme em meios enriquecidos com incubação a 37°C. Todavia, a conversão de *H. capsulatum* não é facilmente obtida e depende também das características fisiológicas de cada isolado. Quando convertidos à fase leveduriforme observam-se colônias glabras, lisas, branco-amarelada, e na microscopia notam-se leveduras ovais e unibrotantes.

A **paracoccidiodomicose** é uma micose sistêmica causada por *Paracoccidioides brasiliensis*, caracterizada pela forma parasitária do seu agente: célula leveduriforme mutibrotante com parede celular birrefringente. É a micose

sistêmica mais frequente na América Latina. Afeta usualmente agricultores, que mantêm contato direto com a natureza, em principal com o solo. A micose é endêmica no Brasil. As manifestações clínicas da paracoccidiodomicose resultam da inalação de elementos infectantes do fungo ou de uma reativação de lesão primária quiescente, ou seja, de uma lesão adquirida há algum tempo, muitas vezes mais de trinta anos, e que não tinha ainda se desenvolvido. O fungo, além de acometer o pulmão, dissemina-se para outras partes do corpo, atingindo principalmente as mucosas do indivíduo, sua pele e linfonodos. O aspecto macroscópico da cultura de leveduras desse fungo tem coloração creme-clara, consistência cremosa e é conseguido em meios especiais, como o meio de Fava-Neto, com incubação a 37°C. O cultivo a 25°C dá origem a colônias de crescimento muito lento, filamentosas, algodoadas ou aveludadas, compostos de uma trama de hifas sem conídios.

As MICOSES OPORTUNÍSTICAS são causadas por fungos termotolerantes (que crescem a uma temperatura de 37°C), de baixa virulência e que determinam doenças em hospedeiros com graves deficiências do sistema imunodefensivo. Esses fungos têm porta de entrada variável, usualmente provocam reação supurativa necrótica. Podem acometer os mais variados órgãos, produzindo quadros polimórficos que se apresentam como manifestação cutânea, subcutânea ou sistêmica. Os fungos invadem os tecidos como uma hifa.

A **criptococose** é causada por leveduras do gênero *Cryptococcus*, das quais destacam-se duas espécies: *C. neoformans*, que acomete principalmente indivíduos imunodeprimidos e *C. gattii*, que pode acometer indivíduos imunocompetentes. A micose é de frequência elevada nas grandes cidades, onde são diagnosticadas suas formas clínicas mais graves. As formas subclínicas ou as que se manifestam como infecção respiratória inespecífica devem ser

bastante frequentes. A doença é endêmica no Norte e no Nordeste do país, acometendo crianças, jovens e adultos, de ambos os sexos e todas as faixas etárias, com ou sem depressão do sistema imunológico. O fungo apresenta tropismo pelo sistema nervoso central e o líquido do paciente pode simular meningite viral, bacteriana e também tuberculose. As leveduras do gênero *Cryptococcus* possuem uma característica especial, que é a presença de uma cápsula polissacarídica que envolve todo o fungo. Essa cápsula pode ser evidenciada em exames laboratoriais por contraste com tinta nanquim ou com a coloração pelo Mucicarmin de Mayer. *C. neoformans* e *C. gattii* são capazes de produzir a enzima extracelular fenol oxidase, que é extremamente útil para a identificação do agente da criptococose, pois esta enzima faz com que a levedura se torne melanizada quando colocada em cultivo com compostos fenólicos. Esta enzima e a cápsula polissacarídica estão relacionadas com a virulência desse fungo ao organismo.

A **aspergilose** é causada por membros do gênero *Aspergillus* que se apresentam nos tecidos como hifas hialinas septadas e ramificadas dicotomicamente, ou seja, num ângulo de 45°. A micose se manifesta em três formas clínicas: a alérgica, de colonização e a forma invasiva. Poucos grupos de *Aspergillus* causam infecção no homem. Espécies de *Aspergillus* dos grupos *fumigatus*, *niger* e *flavus* são os patógenos mais comuns, porém também podem causar infecção fungos dos grupos *nidulans*, *terreus*, *ustus* e *restrictus*. O aspecto microscópico do conidióforo permite a distinção entre as diferentes espécies.

A **candidíase oportunista** tem incidência mundial e resulta da invasão por espécies de *Candida* dos tecidos de hospedeiros com endocrinopatias, nos que recebem terapêuticas imunodepressivas, nutrição parenteral e administração prolongada de antibióticos ou esteroides, e ainda em pacientes com complicações após grandes cirurgias. Nos tecidos, as espécies de *Candida* se apresentam como hifas de aspecto peculiar, com exceção de *C. glabrata* (nun-

ca filamenta, sempre se apresenta na forma de levedura). O agente mais comum é *C. albicans*, espécie que faz parte da microbiota do tubo digestivo do homem. Vive também em menor número na árvore brônquica e na cavidade vaginal. Os microrganismos responsáveis pela candidíase são classificados em sua forma anamórfica, usando provas fisiológicas de assimilação e fermentação de açúcares. À medida que vêm sendo descobertas as formas teleomórficas das espécies de *Candida*, as características dos esporos demonstram que elas pertencem a vários gêneros distintos.

3.2. Agentes antifúngicos

O número de fármacos disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas é limitado. Nos últimos anos, a anfotericina B e os azóis – principalmente cetoconazol, fluconazol e itraconazol – têm sido os fármacos de primeira escolha na terapia. Estas duas classes de medicamentos têm como alvo a membrana celular dos fungos. Os polienos ligam-se a uma porção esterol, basicamente ergosterol, presente na membrana de fungos sensíveis, formando poros ou canais. O resultado é um aumento na permeabilidade da membrana que permite o extravasamento de diversas moléculas pequenas, levando à morte celular. A anfotericina B é um antibiótico fungicida de largo espectro e potente, mas seu uso é associado a efeitos adversos significantes, como nefrotoxicidade e febre com calafrios, como reação aguda à infusão intravenosa, já que a farmacocinética deste fármaco não permite a administração oral.

Os azóis são compostos totalmente sintéticos. O mecanismo de ação destes fármacos baseia-se na inibição da esterol-14- α -desmetilase, um sistema enzimático microsomal dependente do citocromo P450, que prejudica a síntese do ergosterol na membrana citoplasmática e leva ao acúmulo de 14- α -metilesteróis. Esses metil-esteróis não possuem a mesma forma e propriedades físicas que o ergosterol e levam à formação da membrana com propriedades alteradas, que não desempenha as funções básicas necessárias ao desenvolvi-

mento do fungo. Os azóis causam menos reações adversas que a anfotericina B, mas são menos potentes que ela. Podem ter ação fungistática ou fungicida. O uso excessivo dos azóis levou ao aparecimento de resistência em espécies suscetíveis.

Um outro agente antifúngico sistêmico utilizado é o pró-fármaco flucitossina. Todos os fungos sensíveis são capazes de desaminar a flucitossina em 5-fluorouracila, um potente antimetabólito; como resultado final, a síntese de ácido desoxirribonucleico dos fungos fica prejudicada. Embora as células dos mamíferos não convertam a flucitossina em fluorouracila, o que é crucial para ação seletiva do composto, alguns microrganismos da flora intestinal o fazem, causando certa toxicidade aos humanos.

A atividade antimicrobiana de um composto pode ser quantificada com base na determinação da concentração mínima capaz de inibir o crescimento de um dado microrganismo, um valor chamado **CIM** (Concentração Inibitória Mínima), ou **MIC** ("Minimum Inhibitory Concentration") em inglês. Este valor pode ser determinado através do **método das diluições sucessivas** ou do **método da difusão em ágar**, ou ainda através do uso de tiras contendo um gradiente de concentração de antibiótico, conhecido como E-teste.

Do ponto de vista microbiológico e clínico, o conceito de sensibilidade e resistência é aplicado para classificar o isolado como sensível ou resistente. No aspecto microbiológico, uma cepa é considerada resistente a um antifúngico quando a **concentração inibitória mínima** é mais elevada que a habitual do antifúngico frente a essa espécie.

Podemos observar três diferentes tipos de resistência aos agentes antifúngicos:

- **Intrínseca:** é dita quando nenhum membro de uma espécie é sensível ao antifúngico, ou seja, todos são insensíveis.

- **Primária:** ocorre quando dentro de uma espécie, normalmente sensível a determinado antifúngico, encontra-se uma cepa com resistência natural a ele, sem necessidade de contato prévio com a droga.
- **Secundária:** ocorre quando uma cepa, previamente sensível, desenvolve resistência à droga após ter sido exposta a ela.

3.3. Diagnóstico imunológico das micoses pulmonares

As provas imunológicas prestam valiosos auxílios no diagnóstico de uma infecção fúngica. Os dados obtidos através de tais provas, devem ser criteriosamente interpretados e correlacionados com os achados micológicos, evidências clínicas e circunstâncias epidemiológicas.

Para segurança e facilidade na interpretação dos resultados, soros controles positivos devem ser incluídos nas provas sorológicas para detecção de anticorpos em soro. Essas provas devem ser realizadas com uma bateria de antígenos. No caso específico das micoses pulmonares, essa bateria deve incluir, no mínimo, antígenos de *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum*, *Aspergillus fumigatus* e *Coccidioides immitis*.

Para melhor avaliação prognóstica, as provas devem ser executadas com amostras seriadas do soro colhido em diferentes períodos, possibilitando assim a elaboração da curva sorológica.

É importante salientar que as provas imunológicas têm valor **presuntivo** no diagnóstico das infecções fúngicas, sendo o exame de cultivo o padrão-ouro para diagnóstico definitivo das micoses.

3.4. Interpretação das provas imunológicas

3.4.1. *Paracoccidiodomicose*

Pacientes portadores de paracoccidiodomicose ativa sem tratamento apresentam positividade nas provas sorológicas acima de 90%. Os títulos da reação de fixação de complemento são mais elevados nas formas graves e agudas da doença, sofrendo quedas à medida que ocorre melhora clínica. A reação não tem muito valor diagnóstico quando tomada como dado isolado. A correlação com os dados clínicos, epidemiológicos e resultados fornecidos por outras técnicas faz com que a importância diagnóstica aumente.

Na imunodifusão dupla de Ouchterlony pode ocorrer a formação de várias bandas de precipitação, sendo mais frequente a demonstração de apenas uma delas. A reação é dotada de alta especificidade. Reações cruzadas são mínimas e podem ocorrer principalmente com soros de pacientes portadores de histoplasmose.

A contraimunoeletroforese é mais sensível que a imunodifusão dupla e permite que os resultados sejam conhecidos em tempo reduzido. Ao lado do alto valor diagnóstico, a reação permite também acompanhar a evolução sorológica do paciente, através da titulação seriada de amostras do soro. O sorodiagnóstico específico da paracoccidiodomicose pode ser obtido por intermédio da imunoeletroforese, através da demonstração do arco de precipitação correspondente ao antígeno E₂ ou **gp43**. O arco de precipitação correspondente forma-se na região catódica da lâmina.

3.4.2. *Histoplasmose*

Anticorpos fixadores do complemento podem ser demonstrados na maioria dos pacientes, já a partir da quarta semana após a infecção. Preconiza-se a utilização dos antígenos obtidos da fase leveduriforme do *Histoplasma*

capsulatum bem como do antígeno obtido da sua fase filamentosa para aplicação no teste, uma vez que o antígeno leveduriforme apresenta uma maior especificidade e o antígeno filamentoso maior sensibilidade. Os resultados inespecíficos estão geralmente relacionados aos títulos de 1:8 e 1:32. Consequentemente títulos inferiores a 1:8 são considerados normais, e entre 1:8 e 1:32 são considerados de valor presuntivo. Títulos de 1:32 ou mais elevados são altamente sugestivos de histoplasmose em atividade. Após a cura clínica, os títulos caem rapidamente e normalmente desaparecem após nove meses. Reações cruzadas podem ocorrer com soros de portadores de paracoccidioomicose.

Na imunodifusão dupla podem ser verificadas duas faixas de precipitação de importância diagnóstica, denominadas **bandas H e M**. A faixa M forma-se próxima do orifício que recebe o antígeno e pode ser demonstrada com soros de pacientes com formas agudas ou crônicas de histoplasmose, ou em indivíduos sensíveis a histoplasmina e que se submeteram a recente teste intradérmico com o antígeno. A precipitina H é demonstrada no soro de pacientes com a doença ativa ou até dois anos após recuperação clínica, raramente ocorre na ausência de M.

A contraímunoeletroforese tem praticamente o mesmo valor da imunodifusão dupla, permitindo ainda a titulação dos anticorpos anti- *H. capsulatum*.

A detecção de antígeno de *H. capsulatum* em espécimes de urina, sangue e fluido cefalorraquidiano oferece um método rápido para o diagnóstico, para o monitoramento de terapia, assim como para a identificação de recaídas na histoplasmose disseminada. Resultados falso-positivos têm sido observados somente em pacientes com blastomicose, paracoccidioomicose e infecção por *Penicillium marneffe*, e menos frequentemente em pacientes com coccidioomicose.

3.4.3. *Aspergilose*

Nos aspergilomas, os títulos de anticorpos específicos demonstrados pela reação de fixação de complemento estão geralmente elevados. As bandas de precipitação reveladas pela imunodifusão dupla e contraímunoeletroforese são geralmente múltiplas, podendo ser acima de dez. Após a remoção cirúrgica do aspergiloma ou tratamento adequado, estes anticorpos deixam de ser detectados em pouco tempo.

Na aspergilose brônquica alérgica os títulos de anticorpos específicos são baixos, e na asma aspergilar raramente são demonstrados. Através de provas cutâneas com aspergilina, pode-se demonstrar reações de hipersensibilidade do tipo I e III na aspergilose brônquica alérgica, e do tipo I na asma aspergilar.

Nas formas invasivas da doença raramente se demonstram anticorpos através das provas usuais, necessitando-se o emprego de provas mais sensíveis tais como radioimunoensaios e imunoenzimáticas.

Na imunodifusão dupla e contraímunoeletroforese, podem ocorrer reações inespecíficas devido à proteína C-reativa do soro do paciente. A eliminação de tal reação inespecífica se faz através da lavagem da lâmina, em solução de citrato de sódio a 5% durante trinta minutos.

3.4.4. *Criptococose*

O imunodiagnóstico da criptococose se baseia principalmente na demonstração de antígeno solúvel de *C. neoformans*, (GLUCORONOXILOMANANA) através da reação de soro ou líquido com partículas de látex sensibilizadas com gamaglobulina de coelho antipolissacáride capsular. Interferências, tais como fator reumatoide e efeito prozona podem ser encontradas neste teste, e são facilmente eliminadas com tratamento das amostras com pronase.

Os reagentes para demonstração de antígeno solúvel são encontrados no comércio, de procedência norte-americana, na forma de *KIT*.

Anticorpos podem ser demonstrados na fase inicial e final da criptococose. As provas mais utilizadas para tal propósito, são as reações de imunofluorescência indireta e aglutinação de suspensão de células de *C. neoformans*, porém apresentam baixo rendimento.

4. Meios de cultura e corantes

4.1. Meios de cultura

Os meios de cultura são preparações que contêm as fontes nutricionais necessárias para o crescimento e multiplicação dos organismos.

O cultivo de microrganismos pode ter diferentes propósitos, mas em todos eles o meio de cultura deve suprir as necessidades mínimas para que *in vitro* se consiga um ambiente semelhante ao que se encontrava o organismo na natureza.

Levando em consideração que os nutrientes são unidades estruturais e fontes de energia para a construção e manutenção da estrutura e organização dos microrganismos, o meio de cultura deve contê-los para que viabilize o seu crescimento.

São esses os principais constituintes do meio de cultura:

- **Água:** sempre deve ser usada água destilada para o preparo de meios de cultura. A água da torneira é de constituição desconhecida, variando especialmente em íons e em pH.
- **Fonte de carbono:** é necessária para a síntese de numerosos compostos orgânicos que fazem parte do protoplasma. A glicose é a principal fonte de carbono utilizada pelos microrganismos.

- **Fonte de nitrogênio:** muitos componentes da célula, principalmente as proteínas, contêm nitrogênio.
- **Minerais:** enxofre e fósforo.
- **Elementos de traço:** são os minerais que são exigidos em quantidades mínimas. Exemplos: potássio, magnésio, etc.
- **Fatores de crescimento:** um fator de crescimento é um componente orgânico que a célula deve conter para crescer, mas é incapaz de sintetizar. Exemplos: aminoácidos, purinas, etc.

Observação: Para o preparo do meio de cultura, as drogas usadas devem ser de maior pureza. O pH, a temperatura e a aeração devem ser cuidadosamente controlados. Sempre se deve observar o prazo de validade do produto.

Os meios de cultura podem ser classificados da seguinte forma:

Quanto ao estado físico

- *Sólido:* contém ágar (agente solidificante) na concentração de 1,5g a 3,0g por litro.
- *Semissólido:* 0,1g a 1,1g de ágar.
- *Líquidos (caldos):* ausência de ágar.

Agentes solidificantes:

- *Gelatina:* pode ser hidrolizada. É mais utilizada hoje em provas bioquímicas.
- *Ágar:* é uma substância hidrocarbonada extraída de várias espécies de algas vermelhas, e é imune ao desdobramento pela maioria dos microrganismos.
- *Sílica gel:* usada quando se deseja cultivar microrganismos autotróficos.

Quanto à composição química

- *Naturais ou Complexos*: formados por substâncias de composição química não definida.
- *Sintéticos*: quando a composição química é conhecida e seus componentes servem para suprir as fontes necessárias de carbono, nitrogênio, vitaminas, etc.

Quanto ao emprego

- *Meios de enriquecimento*: são meios enriquecidos com determinados nutrientes que favorecerão o desenvolvimento de determinado microrganismo, entre vários outros.
- *Meio de manutenção*: garante a viabilidade do microrganismo, por longos períodos, de modo a torná-los disponíveis em qualquer experimentação.
- *Meio diferencial*: permite ao microrganismo produzir estruturas ou reações que podem ser usadas na sua diferenciação entre gêneros ou espécies.
- *Meio seletivo*: permite o crescimento de um determinado grupo ou gênero de microrganismo, em detrimento de outros.

Os meios de cultura devem ser preparados e esterilizados cuidadosamente, de acordo com o protocolo a seguir:

a) Pesagem dos ingredientes

- Se o meio é preparado a partir de seus ingredientes básicos, suas massas corretas para o volume desejado devem ser pesadas isoladamente.

- Para meios desidratados, pesar a massa correspondente ao volume desejado.

b) Dissolução dos ingredientes

- Nunca usar recipientes de cobre ou zinco para dissolução dos ingredientes do meio de cultura, usar preferencialmente o balão de vidro, quimicamente limpo.
- Adicionar ao recipiente contendo os ingredientes uma quantidade de água destilada, aproximadamente a metade do volume desejado, agitando constantemente com bastão de vidro, e evitando a formação de bolhas; aquecer brandamente.
- Usar água destilada à temperatura ambiente, no preparo de meios líquidos.
- Completar o volume do meio com a água após a formação de suspensão homogênea. Isso é essencial, principalmente em meios contendo agentes solidificantes.
- O aquecimento para uma efetiva dissolução dos ingredientes e esterilização do meio deve ser feito no menor tempo possível. Os meios que contêm ágar devem ser aquecidos até o seu ponto de ebulição para uma completa dissolução.
- Resfriar os meios contendo ágar à temperatura aproximada de 50 °C, reajustar o volume de água destilada aquecida de 45 a 50 °C, se houver perda significativa de água durante o aquecimento.

c) Determinação e ajuste de pH

- Determinar o pH de meios formulados antes de adicionar o ágar.
- Quando se tratar de meios formulados, se deve aferir 0,2 unidades de pH acima do desejado, haja visto que o pH abaixa aproxima-

damente este valor após a autoclavação. Nos meios desidratados, não é necessário o ajuste do pH, pois os meios já vêm tamponados.

- Determinar o pH através de um potenciômetro ou por papel indicador de pH.
- Ajustar o pH com solução de ácido clorídrico (HCl) 0,1N ou solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1N.

d) Distribuição dos meios

- Distribuir os meios em recipientes, quimicamente limpos e no caso de meios que não suportem nova autoclavação, usar recipientes estéreis.
- Ao distribuir em frascos de Erlenmeyers ou balões de fundo chato, evitar ultrapassar 50% do volume total do frasco.
- A distribuição em placas deve ser de aproximadamente 15mL; 6ml em tubos para meio inclinado, 5ml para camada alta e 6ml para caldos em geral.
- A distribuição nos tubos deve ser feita com pipetas;
- Codificar os meios conforme padrão ou convenção do laboratório;

e) Esterilização dos meios

- Com algumas exceções, esterilizar os meios em autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

f) Preparo de ágar inclinado em tubos

- Ao retirar os tubos contendo meio sólido da autoclave, incliná-los apoiando-os num suporte de madeira, permanecendo os mesmos com aproximadamente 1cm de meio na base. Deixar solidificar à temperatura ambiente.

g) Plaqueamento de meio de cultivo

- Fundir o meio sólido em banho-maria, resfriá-lo em banho d'água, de modo a evitar ou diminuir a umidade que se condensa na tampa da placa de Petri, quando o ágar se solidifica.
- Flambar a boca do recipiente que contém o meio, antes de distribuí-lo na placa.
- Próximo à chama do bico de Bunsen, verter o meio, levantando parte da tampa da placa de Petri estéril, o suficiente para permitir a introdução da boca do tubo ou outro recipiente que contém o meio, sem tocar as bordas da placa. Pode-se usar uma pipeta para a distribuição.
- Fechar a placa, movimentá-la levemente sobre a bancada para permitir uma distribuição uniforme, e deixar solidificar à temperatura ambiente.

h) Armazenamento e conservação dos meios de cultura:

- Para períodos de tempo prolongados, recomenda-se guardar os tubos e frascos de Erlenmeyers contendo meio em temperatura de 12 a 15 °C. Os meios contendo ágar não devem ser guardados abaixo de 0 °C para não alterar seu gel.
- Geralmente é possível sua conservação durante um ou dois meses à temperatura ambiente em locais secos, limpos e abrigados da luz;
- Identificar todos os tubos, placas ou frascos que contenham meios de cultura.
- Para que não haja perda de água do meio para o ambiente, os recipientes devem ser bem vedados. No caso de placas de Petri, seus bordos poderão ser lacrados com parafilme.

Lista de meios de cultura mais utilizados em laboratório de Micologia

Ágar extrato de arroz (*Rice extract agar*)

- | | |
|--------------------|--------|
| • Meio desidratado | 15g |
| • Ágar | 30g |
| • Água destilada | 1000mL |

Suspender o pó na água e deixar embeber o ágar durante trinta minutos, fundir, distribuir e esterilizar em autoclave por quinze minutos a 121 °C.

Ágar Sabouraud glicosado (*Sabouraud glyucose agar*)

- | | |
|------------------|--------|
| • Dextrose | 30g |
| • Peptona | 10g |
| • Ágar | 30g |
| • Água destilada | 1000mL |

Misturar todos os elementos em balão, deixar embeber o ágar por trinta minutos, levar à autoclave e aquecer lentamente à 120 °C. Agitar e ajustar o pH para 6,5. Esterilizar por quinze minutos a 121 °C.

Batata dextrose ágar (*Potato dextrose agar – BDA*)

- | | |
|--------------------|--------|
| • Meio desidratado | 39g |
| • Ágar | 5g |
| • Água destilada | 1000mL |

Suspender em água e deixar embeber o ágar por quinze minutos. Aquecer até a dissolução completa. Esterilizar em autoclave por quinze minutos a 121 °C.

Mycosel (Mycobiotic) agar

• Farinha de soja digerida	10 g
• Dextrose	10 g
• Cicloheximida	0,4 g
• Cloranfenicol	0,05 g
• Agar	15 g
• Água destilada	1000 mL

Misturar os reagentes. Esquentar agitando frequentemente até dissolver todos os ingredientes. Autoclavar a 118°C por quinze minutos. Não aquecer de forma excessiva. Para o meio desidratado seguir o mesmo procedimento sem adição do ágar.

Czapeck dox ágar (CZ)

• Sacarose	30 g
• Nitrato de sódio	3 g
• Fosfato di-potássico	1 g
• Sulfato de magnésio	0,5 g
• Cloreto de potássio	0,5 g
• Sulfato ferroso	0,01g
• Ágar	30 g
• Água destilada	1000mL

Misturar e dissolver os reagentes. Juntar o ágar e deixar embeber durante trinta minutos. Ajustar o pH para 7,3 antes de esterilizar. Fundir o ágar e esterilizar em autoclave por quinze minutos a 121 °C. Para o meio desidratado, seguir o mesmo procedimento sem adição do ágar.

Ágar infusão de cérebro e coração (*Brain Heart Infusion agar – BHI*)

• Infusão de 200g de cérebro de bezerro	7,7 g
• Infusão de 250g de coração de vaca	9,8 g
• Proteose Peptona	10 g

• Dextrose	2 g
• Cloreto de sódio	5 g
• Fosfato dissódico	2,5 g
• Ágar	20 g

Misturar e dissolver os reagentes. Juntar o ágar e deixar embeber durante trinta minutos. Ajustar o pH para 7,4 antes de esterilizar. Fundir o ágar e esterilizar em autoclave por quinze minutos a 121 °C. Para o meio desidratado seguir o mesmo procedimento sem adição do ágar.

Ágar dextrose farinha de milho (*Corn meal agar* – CMA)

• Farinha de milho	40 g
• Dextrose	20 g
• Ágar	20 g
• Água destilada	1000 mL

Colocar a farinha em Becker com água e aquecer em banho-maria a 60 °C por uma hora. Em seguida, filtrar em gaze dobrada duas vezes. Restabelecer o volume inicial com água destilada. Transferir para balão que já contenha o ágar e a dextrose pesados. Esterilizar em autoclave a 121 °C por vinte minutos. Para o meio desidratado usar o mesmo procedimento usado no BDA, porém esterilizar a 121 °C por vinte minutos.

OBS: Quando este meio é utilizado para *Mucoracea*, trocar a dextrose por glicose.

Extrato de malte ágar (*Malt extract agar* – MEA)

• Extrato de malte	30 g
• Ágar	30 g
• Água destilada	1000 mL

Usar o mesmo procedimento do meio BDA, e ajustar o pH para 7,0.

Sabouraud

• Glicose	30 g
• Peptona	10 g
• Ágar	20 g
• Água destilada	1000 mL

Usar o mesmo procedimento do meio Sabouraud glicosado.

Meio seletivo para fungos entomopatogênicos

• Farinha de aveia	10 g
• Ágar	10 g
• Sulfato de estreptomicina	0,50 g
• Dodine	0,45 g
• Penicilina G	0,20 g
• Cristal violeta	2,5 mg
• Água destilada	500 mL

* *Solução estoque de cristal violeta*: 0,1 g de cristal violeta em 200 ml de água destilada.

* *Solução estoque de antibióticos*: 4g de penicilina G e 10 g de sulfato de estreptomicina em 40 mL de água destilada.

Mistura-se aveia e ágar em 490 mL de água destilada; agita-se vigorosamente aquecendo até a fervura, adiciona-se Dodine e 5 mL da solução estoque de cristal violeta enquanto estiver quente, e autoclava-se por vinte minutos. Quando estiver na temperatura de 50 a 55 °C, adicionam-se 2 mL de solução estoque de antibióticos; agita-se bem e distribui-se imediatamente o meio em placas de Petri.

Farinha de aveia ágar (*Oatmeal ágar* – OM)

- | | |
|--------------------|---------|
| • Farinha de aveia | 60 g |
| • Ágar | 12,5 g |
| • Água destilada | 1000 mL |

Bater a farinha no liquidificador com um pouco da água por um minuto. Depois adicionar o ágar e a água e homogeneizar. Esterilizar em autoclave a 121°C por vinte minutos.

OBS: Não utilizar o frasco de Erlenmeyer na medida exata do meio, pois durante a autoclavagem, o meio ferve e pode molhar a rolha ou transbordar.

Extrato de levedura-peptona-glicose-ágar (*Yeast extract-peptone-glucose-agar* – PYGA)

- | | |
|-----------------------|---------|
| • Peptona | 5 g |
| • Extrato de levedura | 5 g |
| • Glicose | 20 g |
| • Ágar | 13 g |
| • Água destilada | 1000 mL |

Seguir os mesmos procedimentos usados para Sabouraud glicosado.

MP-5 (meio seletivo para fungos aquáticos)

- | | |
|------------------|---------|
| • Peptona | 1 g |
| • Maltose | 4 g |
| • Ágar | 20 g |
| • Água destilada | 1000 mL |

Seguir os mesmos procedimentos usados para o Sabouraud glicosado

Observação: Todos os meios utilizados no laboratório de Micologia podem ser acrescidos com antibióticos (cloranfenicol, estreptomina, etc.) para evitar o crescimento de outros microrganismos.

Meio de cultura – Fava Netto (para antígeno de *P. brasiliensis*)

• Proteose peptona nº 3 (Difco)	3 g
• Peptona	10 g
• Extrato de carne	5 g
• Cloreto de sódio	5 g
• Extrato de levedura	5 g
• Dextrose	40 g
• Ágar	18 g
• Água destilada qsp	1000 mL

Fundir o meio em banho maria fervente. Ajustar o pH entre 7,2 e 7,4. Autoclavar a 120°C durante vinte minutos.

Meio de cultura - Smith-Asparagina (para histoplasmina)

• L-Asparagina	7 g
• Cloreto de amônio	7 g
• Fosfato monoácido de potássio	1,31 g
• Citrato de sódio	0,9 g
• Sulfato de magnésio heptahidratado	1,5 g
• Citrato férrico	0,3 g
• Glicose	10 g
• Glicerina	25 g
• Água destilada qsp	1000 mL

Dissolver a asparagina em cerca de 300 mL de água destilada aquecida a 50°C. Dissolver os sais separadamente em 25 mL de água destilada, sendo que o citrato férrico deverá ser dissolvido em água quente. Misturar as soluções dos sais com a solução de asparagina. Homogeneizar. Acrescentar a glicose e a glicerina. Completar o volume com água destilada. Homogeneizar. Distribuir o meio, porções de 200 mL, em balões de 500 mL. Autoclavar a 120°C durante vinte minutos

Meio de Cultura – Negróni (Filtrado de cultura de *P. brasiliensis*)

- Dissolver 60 g de neopeptona em 120 mL de água destilada aquecida a 45°C.
- Colocar a solução de neopeptona em tubos para diálise (membranas de celofane) e dialisar contra água destilada (cerca de 2 litros) durante cinco horas a 70°C, e por uma noite em geladeira a 4°C.
- Retirar o conteúdo do tubo de diálise e completar o volume com água destilada para 1.800 mL. Adicionar 36g de glicose, 0,18 g de tiamina e 0,36 g de asparagina.
- Homogeneizar e acertar o pH, que deve ser entre 6.8 e 7.0;
- Distribuir o meio, porções de 150 mL em frascos Erlenmeyer ou balões de 300 mL de capacidade.
- Autoclavar a 120°C durante 15 minutos.

Observação: Todos os meios utilizados no laboratório de Micologia podem ser acrescidos com antibióticos (cloranfenicol, estreptomina, etc), para evitar o crescimento de outros microrganismos.

4.2. Corantes

A coloração é um meio utilizado em laboratórios de Micologia com o objetivo de visualizar estruturas vegetativas e reprodutivas dos fungos, as formas de leveduras, e realizar testes de viabilidade. As soluções utilizadas são:

a) Solução de hidróxido de potássio – KOH (solução clarificante)**• Concentrações:**

40% - unhas (fâneros).

30% - pelos e pele.

10% - pele tenra de criança.

6% - para exame de escarro.

5% - para estudo de Basidiomycotina e outros fungos.

• **Fórmula (para solução 30%):**

KOH em lentilhas	30 g
Água destilada	70 mL

• **Preparo:**

Dissolver os dois ingredientes em movimentos giratórios, até a total dissolução dos componentes.

A solução deve ficar transparente.

Armazenar em vidro escuro.

b) Lactofenol de Amann com azul de algodão

Usado para tornar mais distintas as estruturas hialinas dos fungos (corante citoplasmático)

• **Fórmula:**

Ácido fênico	20 g
Ácido láctico	20 g
Glicerina	40 g
Água destilada	20 mL
Azul de Poirrierblau	0,05 g

• **Preparo:**

Misturar todos os componentes e dissolver pelo calor.

Depois adicionar 0,05g de azul de Poirrierblau.

Esperar 24 horas e filtrar.

Observação: Para estudar as estruturas de fungos demáceos (negros) pode-se utilizar Lactofenol de Amann sem adição de azul de algodão.

c) Acridine Orange

Corante vital usado para teste de viabilidade que distingue células vivas e mortas, onde as células vivas adquirem coloração laranja, e as células mortas, coloração verde.

• Fórmula:

Acridine orange	0,02 g
PBS pH 7,7	100 mL

• Preparo:

Dissolver os dois ingredientes e agitar.

d) Verde janus B

Usado na diferenciação de células vivas e mortas. As células vivas permanecem incolor, enquanto as células mortas adquirem coloração azul.

• Fórmula:

Verde-janus B	0,05 g
Água destilada	100 mL

• Preparo:

Dissolver os dois ingredientes e agitar.

e) Reagente de Melzer

Usado para detecção de reação amiloide ou dextrinoide de esporos, ascas e tecidos himeniais de Ascomycotina e Basidiomycotina, na qual uma coloração azulada determina uma reação amiloide e uma marrom determina uma reação dextrinoide.

• **Fórmula:**

Iodo	0,5 g
Potássio iodado	1,5 g
Hidrato de cloro	20 g
Água destilada	20 mL

• **Preparo:**

Dissolver os ingredientes e agitar.

f) Floxina B

Usada para o estudo do citoplasma de Basiodiomycotina.

• **Fórmula:**

Floxina B	10 g
Glicerina	75 mL
Água destilada	175 mL

• **Preparo:**

Misturar todos os componentes e dissolver pelo calor.

g) Glicerina 10%

Preserva a coloração original do fungo estudado.

• **Fórmula:**

Glicerina	10 mL
Água	90 mL

• **Preparo:**

Misturar os ingredientes com leve agitação.

5. Técnicas micológicas

5.1. Diluição seriada

A diluição seriada é uma técnica simples que pode ser usada para vários propósitos, como: separação de duas cepas fúngicas que estejam misturadas em um tubo ou placa (contaminação no tubo ou na placa), contagem de colônias em amostras, isolamento de fungos de substratos líquidos (análise de água, leite, etc) e de solo, além da determinação da quantidade e qualidade de um inóculo para processos fermentativos ou inóculos líquidos.

a) Preparo da amostra

Separação de duas cepas de fungos

- Fazer uma raspagem com a alça em L na placa ou no tubo onde se encontram as duas cepas a serem separadas – no caso de separação de duas cepas de fungos.
- Este raspado deve ser colocado em um tubo com 10mL de solução salina a 0,85% e homogeneizar.

Isolamento de fungos de substratos líquidos

- Colocar 2 mL da amostra líquida (água, leite, etc) em um tubo com 10 mL de solução salina a 0,85% e homogeneizar.

Isolamento de fungos de solo

- Colocar 1g do solo a ser analisado em um tubo com 10 mL de solução salina a 0,85% e homogeneizar.

b) Diluição da amostra

- Utilizando uma série de dez tubos com 9 mL de salina, colocar no primeiro tubo 1 ml da suspensão homogeneizada do primeiro tubo (deve-se usar uma pipeta para cada transferência); homogeneizar e transferir

1 mL para o segundo tubo; homogeneizar novamente e transferir 1 mL para o terceiro tubo. Repetir este procedimento até o último tubo

c) Semeadura nos meios de cultura

- Preparar uma placa de Petri com o meio de cultura escolhido para cada tubo de diluição.
- Todas as placas devem ser marcadas com as respectivas diluições.
- Retirar 0,1 mL ou 1 mL (à escolha) de cada uma das diluições e transferir para a placa de Petri com a pipeta (**deve-se usar uma pipeta para cada diluição**) e espalhar na placa com o auxílio da alça de Drigalski.
- Incubar as placas por, no mínimo, sete dias na estufa a 25°C.
- Após o período de incubação, observar as placas e fazer a contagem das colônias ou no caso de separação das cepas fúngicas, observar as placas e retirar a colônia desejada com a alça em L.

d) Observação dos resultados – Contagem

A contagem de colônias é feita a partir da observação das placas e contagem manual das colônias crescidas e quantificação da diluição original, ou seja, quantos conídios ou esporos haviam na sua suspensão original. O número de conídios presentes na suspensão original será igual ao número de colônias multiplicado pelo fator de diluição.

Ex: Se na diluição 10^{-4} obtivemos cinquenta colônias com inóculo de 1 mL, a concentração original será de $50 \times 10^4 = 5 \times 10^5$ conídios/mL.

Se na diluição 10^{-6} obtivemos 135 colônias com um inóculo de 0,1 ml, a concentração original será de $135 \times 10^6 \times 10 = 135 \times 10^7 = 1,35 \times 10^9$ conídios/mL.

Observação: Para a contagem de conídios ou esporos em uma solução também podemos usar a Câmara de Neubauer

5.2. Técnicas de semeadura e microscopia

5.2.1. Semeadura de fungos

Inoculação em placas

As técnicas usadas para inocular fungos em placas são fundamentalmente efetuadas para obter culturas axênicas (culturas puras) e são bem desenvolvidas, já que a identificação de fungos filamentosos baseia-se principalmente nas características morfológicas.

Procedimento:

- Flambar a alça ao rubro e esfriar.
- No caso de a amostra estar em tubo:
 - remover a tampa de rosca ou tampão de algodão do tubo que contém a cepa, com o dedo mínimo da mão direita, segurando o tubo com a mão esquerda;
 - flambar a boca do tubo, imediatamente antes e depois da inoculação;
- No caso de a amostra também estar em placa:
 - tomar a placa com a mão esquerda, de modo que a base da placa fique segura e a tampa possa ser manipulada num movimento de abrir e fechar, com os dedos polegar e indicador;
 - proceder a uma rápida flambagem na placa toda vez que esta tenha que ser aberta;
 - manipular a placa na altura da chama do bico de Bunsen;

- introduzir a alça ou agulha no tubo ou placa de Petri com amostra, e retirar uma quantidade suficiente do inóculo;
- tomar uma placa, abrir conforme exposto anteriormente e inocular no centro da placa ou conforme especificações em três pontos eqüidistantes.
- Incubação das placas:
 - incubar as placas, invertidas em estufa ou à temperatura ambiente, para evitar que, durante a incubação, a água de condensação da superfície do ágar, provoque crescimento confluyente do organismo, impedindo a formação de colônias isoladas.
 - obedecer aos requisitos fisiológicos de crescimento do microrganismo, tais como temperatura ideal de incubação, iluminação, tempo de incubação, etc.

Inoculação em tubos ou frascos de Erlenmeyers

A inoculação em tubos ou frascos de Erlenmeyers pode ser feita em meios sólidos e líquidos. Apresentam inúmeras finalidades de uso. Em todos os casos, tomam-se medidas assépticas durante a inoculação.

a) Meio líquido para meio líquido

Quando a cultura estiver em meio líquido e se pretende repicá-la para um tubo contendo meio líquido, deve-se usar uma alça de platina ou níquel-cromo em forma de gota, observando-se as condições de assepsia.

b) Meio líquido para meio sólido

- Tomar com uma alça em forma de gota um inóculo da amostra em meio líquido.
- Introduzir a alça sobre a superfície do ágar inclinado, até a base do mesmo.
- Fazer estrias ou um esfregão em direção à boca do tubo, sobre a superfície inclinada até $\frac{3}{4}$ da sua extensão. A superfície inclinada do ágar deve ficar voltada para cima, com a mão do operador por baixo do tubo, de modo que a superfície inclinada possa ser vista sem obstáculo.

c) Meio sólido para meio líquido

- Introduzir a agulha ou alça em forma de L estéril no tubo que contém a cultura em ágar inclinado e tomar uma pequena quantidade do inóculo. Evite carrear pedaços ou fragmentos do meio com o inóculo.
- Imergir o inóculo no meio líquido, agitar a agulha suavemente contra a parede do tubo para ressuspender o inóculo.
- Homogeneizar o meio sob leve agitação.

d) Meio sólido para meio sólido

- Tomar com uma agulha ou alça em forma de L o inóculo no meio sólido.
- Introduzir a agulha sobre a superfície do ágar inclinado, até a sua base.
- Fazer estrias ou um esfregão em direção à boca do tubo, sobre a superfície inclinada, até aproximadamente $\frac{3}{4}$ da sua extensão. O procedimento é o mesmo da inoculação de meio líquido para o meio sólido.

- Incubação dos tubos:
 - preferencialmente todos os tubos com meio sólido devem ficar em posição vertical em estantes ou outros tipos de suporte.

6.2.2. Microscopia

Exame direto de um pedaço da colônia

Com a alça de platina em forma de L ou agulha esterilizada, cortar um pedaço da colônia e colocá-lo sobre uma lâmina. Não se deve raspar a superfície da colônia, porque apenas os conídios serão retirados. Desta forma, em muitos casos é possível identificar o fungo.

Colocar uma gota do corante lactofenol de Amann com azul de algodão ou outro corante desejado sobre o pedaço da colônia. Se o fungo for muito escuro, substituir o corante por uma solução clarificante ou uma gota de água.

Cobrir a preparação com uma lamínula, comprimindo-a com o cabo do bisturi ou do estilete. Examinar ao microscópio, com objetivas de 10X, 40X e 100X.

Técnica de cultivo em lâmina

Na maioria das vezes, é necessário obter preparações onde as estruturas do fungo são observadas por inteiro. Isto porque há muitos gêneros cujos esporos ou conídios por si só não são característicos. Neste caso, as estruturas responsáveis pela formação e sustentação dos conídios ou esporos necessitam ser observadas por completo. Isto nem sempre é possível com a técnica de exame direto, havendo necessidade de se fazer o cultivo na própria lâmina. Com isto, obtêm-se os fungos com suas estruturas intactas.

Procedimento:

- Vazar em placa de Petri uma camada fina do meio de cultura adequado para cada gênero ou espécie de fungos a ser examinado.
- Após a solidificação do meio, com o auxílio de um bisturi, cortar fragmentos de 0,5 cm².
- Montar uma placa de 15 cm de diâmetro e cobrir o fundo com papel de filtro e colocar sobre este um bastão em forma de “U”, duas lâminas e duas lamínulas.
- Após a esterilização, colocar o quadrado de meio sobre cada lâmina;
- Inocular nos quatro lados do quadrado do meio de cultura, fragmentos miceliais e/ou esporos.
- Colocar sobre o meio de cultura a lamínula.
- Molhar o papel de filtro com água destilada estéril formando uma câmara úmida.
- Deixar em temperatura ambiente, por aproximadamente uma semana ou mais dependendo do fungo estudado.
- Observar crescimento e esporulação.
- Fixar pelo formol por 24 horas.
- Montar lâminas e lamínulas com corante e observar em microscópio ótico com objetivas de 10x, 40x e 100x.

Técnica da fita adesiva

Esta técnica dá excelentes resultados quando o fungo está sendo cultivado em placa de Petri. Na maioria das vezes, suas estruturas aparecerão inteiras, como no cultivo em lâmina.

Procedimento:

- Cortar um pedaço de fita adesiva um pouco menor do que a lâmina e colocá-lo sobre a colônia, com a cola para baixo.
- Comprimir com a alça de platina em forma de L para que o fungo cole na fita.
- Colar a fita sobre o corante na lâmina.
- Observar ao microscópio óptico com objetivas de 10X, 40X e 100X.

Cultivo sob lamínula

O objetivo desta técnica é a observação das microestruturas vegetativas e reprodutivas do fungo mais intactas.

Procedimento:

- Inocular em uma placa de Petri, contendo 20 mL de meio de cultura específico para o gênero a ser identificado, fragmentos do fungo em três pontos equidistantes entre si, e sobre cada um destes colocar uma lamínula de 24x32mm, previamente flambadas em bico de Bunsen.
- Após sete dias de crescimento, as lamínulas sobre os pontos de inóculo devem ser retiradas do interior da placa, com auxílio de uma pinça, previamente flambada. As lamínulas devem ser colocadas invertidas sobre lâminas contendo uma gota de Lactofenol de Amann com azul de algodão.
- Observar ao microscópio óptico com objetivas de 10X, 40X e 100X.

Técnicas para estudo de Ascomycotina

Procedimento:

- O uso de um microscópio estereoscópico (lupa) é indispensável para o exame do material.
- Secções verticais no corpo frutífero do fungo estudado poderão ser feitas com auxílio de uma gilete ou bisturi.
- A maioria das lâminas para posterior observação ao microscópio óptico é montada normalmente em água para medição dos ascosporos e observação de sua coloração, o reagente de Melzer's também devendo ser usado para o estudo dos anéis apicais das ascas.
- O estudo destes fungos em meio de cultura também deve ser feito para que se conheça o seu anamorfo. Isto poderá ser feito através da técnica de isolamento de ascosporos (*single ascospore isolation*).

Técnica para estudo de Basidiomycotina

- O material é montado em KOH a 5%.
- O reagente de Melzers também é usado para os esporos de fungos Agaricáceos.

Impressão de esporos:

Uma das mais importantes características que permite o agrupamento dos gêneros em seções é a coloração dos basidiósporos em massa, ou seja, a impressão de esporos.

Procedimento:

- Selecionar um corpo frutífero fresco e maduro e cortar sua haste junto ao píleo.

- Colocar o píleo sobre uma folha de papel de duas cores (preta e branca) com as lâminas ou poros para baixo.
- Cobrir o píleo e o papel com papel encerado, cristalizador ou com uma campânula. Se o corpo frutífero do fungo estiver em boas condições, a impressão de seus esporos poderá ser obtida em uma hora.

5.3. Coleta e isolamento de fungos ambientais

Observações quanto ao complexo fungo-substrato são de grande valia por ocasião de qualquer coleta. Deve-se notar que as estruturas mais visíveis de um fungo não representam, necessariamente, o seu todo. Além disso, grande parte de seus ciclos ou remanescentes estruturais poderão estar perdidos no interior do substrato. Desta forma, conclui-se que a amostra que se coleta de um fungo, na verdade não passa de um momento do seu ciclo biológico.

As partes mais evidentes, nos fungos, representam em geral, aquelas que mais resistem ao manuseio e ao tratamento para secagem. As condições ideais para o estudo dos fungos residem no isolamento dos organismos a partir de diferentes substratos, e nos diversos ambientes em que os fungos ocorrem: solo, ar, água ou mesmo na vegetação.

Independente do espécime a ser coletado, alguns materiais gerais devem ser providenciados para as coletas:

- | | |
|-------------------------|-------------------------|
| * altímetro | * fósforo ou isqueiro |
| * jornal | * caderneta de campo |
| * lupa de mão | * lápis |
| * mochila ou cesta | * máquina fotográfica |
| * canivete ou espátula | * papel indicador de pH |
| * faca afiada | * saco plástico |
| * fita crepe | * saco de papel |
| * fita métrica ou trena | |

A. Solo

Considera-se o solo um mosaico de micro-habitats devido a sua grande complexidade, longe de ser um simples amontoado de matéria inorgânica sem vida. Ao contrário, o solo costuma ser rico em microbiota e mesofauna, o que força o pesquisador a usar técnica ou substâncias especiais quando pretende isolar um grupo definido.

O método de diluição é o mais usado para se estudar a incidência de fungos em solos. O material, ao ser coletado, deve ser colocado em latas esterilizadas ou em sacos plásticos. As amostras destinadas à análise devem ser manipuladas com o auxílio de uma espátula ou colher, parcialmente esterilizadas com algodão embebidos em álcool ou com auxílio de uma lamparina. De preferência, o período entre a coleta de material e as diluições, não deve ultrapassar quatro horas.

Procedimento:

- Tomam-se 10g de cada amostra de solo e coloca-se em frascos de Erlenmeyer contendo 90 mL de solução salina esterilizada. Agitar vigorosamente (solução 1:10 - mesmo princípio da diluição seriada porém em maiores proporções).
- Desta suspensão, pipeta-se 1 mL e adiciona-se a tubo contendo 9 mL de solução salina esterilizada, após agitação (solução 1:100).
- Retira-se então outro 1 mL desta última solução e coloca-se em um novo tubo contendo também 9 mL de solução salina esterilizada, sempre após agitação (solução 1:1000).
- Por fim, se necessário, a mesma operação anterior pode ser repetida, e uma alíquota de 1 ou 0,1 mL plaqueada em um meio de cultura apropriado. Em geral, usa-se ágar Sabouraud acrescido de antibiótico (cloranfenicol, estreptomina ou penicilina).

- Após sete dias, faz-se o isolamento dos fungos, repicando-se as colônias para tubos de ensaio contendo meio sólido.
- Após o desenvolvimento das colônias, procede-se à identificação genérica-específica dos fungos.

A coleta de substratos orgânicos, como folhas, frutos, raízes e troncos em diferentes estádios de decomposição também é interessante. Estercos de herbívoros devem ser coletados frescos, com uma espátula grande e acondicionados em sacos plásticos.

Importante lembrar que as regras de assepsia parcial e etiquetagem (local de coleta, data, condições ambientais e substrato) são idênticas para qualquer coleta, e devem receber atenção especial.

O método da placa de solo consiste em se colocar, com uma espátula, quantidades pequenas de solo em uma placa esterilizada, evitando os torrões de terra. Verter então o meio de cultura com antibiótico (sugere-se a utilização do meio de MARTIN, com rosa-bengala e sulfato de streptomicina) e deixar solidificar.

Para o isolamento de fungos de substratos orgânicos pode-se utilizar o método de pressão de folhas. Este consiste em se pressionar com uma pinça uma folha sobre a superfície do meio de cultura com antibiótico, retirando-a em seguida. A placa, então, é deixada à temperatura ambiente, observando-se diariamente o crescimento das colônias.

Outra opção seria plaquear amostras de substratos (folhas, galhos, insetos, etc), cortadas com bisturi em pequenos pedaços. Deposita-se de uma a três amostras equidistantes sobre o ágar, umedecendo-as levemente com água esterilizada. Se a amostra for de insetos muito pequenos, colocá-los intactos.

B. Fungos macroscópicos

Existe uma variação muito grande de fungos macroscópicos, de consistência diferente. Alguns se decompõem logo após serem coletados, outros são mais resistentes. De qualquer modo, cuidado e bom senso tornam-se necessários para o sucesso de uma coleta. Os materiais comumente usados são:

- Cristalizador.
- Folha de papel dupla face (branca/preta), para coleta de esporos.
- Frascos de vidro escuros com fixador álcool a 5%.
- Papel de filtro ou algodão.

No caso de o substrato ser esterco de herbívoros, preparar um cristalizador contendo papel de filtro embebido em água e glicerina (para não ressecar rapidamente), antes de introduzi-lo no recipiente. Tampar, então, deixando o conjunto à temperatura ambiente e ao abrigo do sol, porém com iluminação. Impedir o ataque de inseto ou outros artrópodes e observar o crescimento macroscópico dos fungos.

Nas coletas, deve-se retirar o material por inteiro com o auxílio de uma faca ou espátula, cuidadosamente, para evitar quebra ou esfarelamento. Se possível, trazer parte do substrato junto. Aconselha-se não misturar materiais diferentes em um mesmo saco a fim de evitar a mistura de esporos. Ao transportá-los para outro lugar, acomodá-los na mochila ou cesta, protegendo-as com folhas de jornal. Amostras delicadas podem ser coladas no fundo de uma caixa de fósforos. Durante as coletas, anotações sobre cor, textura e tamanho do material coletado devem ser feitas, pois na maioria dos casos os fungos têm suas características alteradas depois de secos.

C. Ar atmosférico

O ar representa um repositório natural, sob a forma de esporos, dos mais diversos tipos e grupos de fungos. O isolamento depende do local, do tempo de exposição e do substrato empregado. A coleta de ar pode ser realizada de duas formas:

1. Com um amostrador de ar por impactação - Nestes amostradores há um compartimento onde é colocada uma placa de Petri com o meio de cultura escolhido e quando o amostrador é ligado, a placa recebe todo o ar puxado em um volume determinado por dez minutos. Ao término, essas placas são incubadas a 25°C por sete dias. As colônias são contadas e repicadas para tubo de ensaio e deve-se então proceder à identificação dos fungos isolados.
2. Expondo as placas de Petri com meio de cultura escolhido, por cinco, dez ou quinze minutos ao ar atmosférico no ambiente selecionado, incubando em seguida a 25°C por sete dias. Repicar as colônias para tubo de ensaio e proceder à identificação dos fungos isolados.

D. Água

Fungos aquáticos

Em ambientes aquáticos, encontramos tanto fungos zoospóricos como tetraradiados (não zoospóricos). Os primeiros são realmente adaptados ao ambiente aquático, pois possuem esporos flagelados móveis. O segundo grupo, sem flagelos, apresenta esporos de forma radiada, com três ou quatro braços partindo de um mesmo ponto, ou ainda sigmóides ou ovalados. Esta morfologia concede maior facilidade de flutuação, dispersão e aderência ao substrato.

Os fungos aquáticos podem também ser encontrados no solo, graças à formação de estruturas de resistência que lhes permitem sobreviver até que condições de umidade favoráveis se estabeleçam. Para observação destes fungos, torna-se necessária a coleta de amostras de água e solo, às quais adicionam-se iscas especiais. Assim, o material para a iscagem é:

- Ácido clorídrico a 1%.
- Frasco de 100ml, de boca larga e tampa.
- Hidróxido de potássio a 2%.
- Hipoclorito de sódio a 10%.
- Iscas como: asa de insetos, celofane, ecdise de cobra, exoesqueleto de camarão, folha de gramínea descorada ou fervida, frutos (maçã, jaboticaba, etc), grão de pólen do *Pinus*, gravetos e sementes (cânhamo, *Crotalaria* sp.).
- Papel alumínio.
- Papel encerado.
- Saco de tela de náilon ou lata.

A iscagem pode ser realizada no campo ou no laboratório. É importante salientar que a transparência do material irá determinar sua eficiência como isca. De preferência, os frascos devem ser esterilizados. Para fins taxionômicos, este requisito passa a ser obrigatório.

No momento da coleta da água, juntar ao pote gravetos ou folhas que estiverem nas proximidades. Uma vez no laboratório, transferir uma parte do coletado para placas de Petri esterilizadas, adicionar as iscas e deixar à temperatura ambiente. Com o desenvolvimento das colônias, entre 48 e 72 horas, procede-se ao isolamento da cultura pura, utilizando o meio MP-5.

Após o crescimento em meio sólido, retirar um pequeno quadrado de 1x1 cm da parte mais periférica da colônia, colocando-o em uma placa esterili-

zada com água destilada estéril e duas a três metades de sementes de cânhamo. Decorridas 48 horas, o material deve estar pronto para ser observado diretamente ou montado em lâmina.

Todos os substratos que portarem crescimento micelial devem ser separados, lavados em água destilada e recolocados em placas contendo novas amostras do mesmo substrato com água destilada esterilizada renovada. Em lâmina, pode-se observar os flagelos colocando-se uma a duas gotas de Karo na montagem, a fim de diminuir a mobilidade dos zoósporos.

Para as espécies que dificilmente ocorrem neste tipo de iscagem, recomenda-se a submersão de frutos, gravetos ou folhas dentro de latas perfuradas ou bolsas de náilon. Estas devem ser amarradas com fio plástico e, de preferência, protegidas da observação pública. Após duas ou três semanas, este material deve ser retirado e lavado em água corrente por cerca de trinta minutos, para a remoção de detritos, bactérias, protozoários e pequenos invertebrados. Se os fungos estiverem presentes, pústulas esbranquiçadas aparecerão na epiderme do fruto, as quais deverão ser observadas.

5.4. Preservação de fungos

Culturas microbianas são extremamente vulneráveis e podem se contaminar, mutar ou morrer. Muitas vezes, culturas são insubstituíveis, e sua perda pode ser muito grave. Outras vezes ela pode ser reisolada ou adquirida de uma coleção de culturas. Em qualquer um dos casos, tempo, informação e dinheiro são desperdiçados, mas isto pode ser evitado ou minimizado com um sistema eficiente de preservação de linhagens. Esta é uma das funções mais importantes de uma coleção de culturas. A preocupação central é a preservação de linhagens com suas características originais durante um longo período de tempo. Novas espécies, mutantes, organismos portadores de plasmídeos e linhagens produzidas por engenharia genética devem ser preservadas, de forma

a manter as suas propriedades. Assim, é essencial que coleções de culturas executem pesquisas no intuito de definir técnicas de preservação apropriadas. É importante frisar que não existe nenhum método universal para uma preservação adequada a todos os microrganismos. Grupos taxonômicos de microrganismos, e até linhagens dentro da mesma espécie, variam quanto a sua resposta aos diferentes métodos de preservação.

Métodos de preservação

Estes métodos têm como objetivo manter as culturas num estado viável sem mudança morfológica, fisiológica ou genética. Para se obter um bom resultado na aplicação de um método de preservação, a cultura deve estar em ótimas condições, deve-se respeitar as condições ótimas de crescimento, temperatura, umidade, aeração, iluminação e meio de cultivo.

A. Repique

• Ágar

O método mais tradicional de preservação de culturas é através da transferência periódica da cultura (repique) para um novo meio de cultivo sólido ou líquido. O intervalo entre cada transferência varia com o microrganismo, o meio de cultivo empregado e as condições ambientais.

A maioria dos fungos pode crescer em BDA ou EM, contudo, alguns têm requerimentos especiais de crescimento. O período de tempo entre as transferências varia de fungo para fungo. Para alguns, a cada duas ou quatro semanas, a maioria a cada dois a quatro meses, enquanto outros podem sobreviver 12 meses sem transferência. Três condições devem ser determinadas quando se usa este método para preservação de microrganismos:

- Meio adequado para manter as culturas.
- Temperatura ideal de estocagem.
- Frequência entre as transferências.

• **Preservação sob óleo mineral**

Muitas espécies de fungos podem ser preservadas por meses ou anos através de um método relativamente fácil e simples, que é o de imersão em óleo mineral. O óleo deve ser esterilizado por aquecimento em um forno Pasteur a 170°C por uma ou duas horas ou autoclavagem dupla por quinze minutos a 121°C.

Deixar crescer a cultura em meio apropriado. O repique pode ser feito em ágar inclinado ou não.

Após um crescimento adequado, colocar assepticamente o óleo mineral estéril sobre a superfície da cultura a uma altura aproximada de 1 a 2cm (quando a cultura estiver em ágar inclinado, cobre-se completamente a superfície). Isto impede a desidratação e reduz a atividade metabólica, assim como a velocidade de crescimento do microrganismo, devido à redução da tensão do oxigênio.

Guardar as culturas com óleo mineral na posição vertical. Fazer testes de viabilidade periodicamente para determinar se a cultura está deteriorando.

• **Blocos de ágar em água**

O método consiste em cultivar o microrganismo em uma placa de Petri contendo um meio de ágar apropriado. Após o crescimento vigoroso o ágar é cortado com uma lâmina estéril em blocos de aproximadamente 4 a 6 mm. No caso de fungos, a partir do final do crescimento das colônias, um número apropriado de cubos é transferido assepticamente para tubos ou frascos con-

tendo 10 a 15 mL de água destilada estéril. Para reativação, basta retirar assepticamente um dos cubos e depositá-los sobre um meio adequado, a sua aplicação fica restrita a microrganismos que tenham grande aderência ao ágar, como no caso de fungos filamentosos e algumas leveduras.

B. Secagem

• Secagem em areia, solo e sílica-gel

Também é considerada como um bom método de conservação de microrganismos. Pode ser uma simples secagem de esporos ou secagem sob várias condições, como, por exemplo, em secador com ou sem vácuo.

Para tanto, emprega-se a seguinte linha de trabalho: Preparar o tubo para estocagem (pode ser de tampa rosquiável ou frascos de penicilina), enchendo-o até $\frac{3}{4}$ com gel (sílica-gel purificada, sem indicador, 6-22 mesh), depois esterilizar no mínimo durante três horas a 180°C (calor seco), e colocar em atmosfera seca para seguir em banho de gelo *overnight*. Fazer uma suspensão de esporos em leite frio desnatado (5%). Derramar a suspensão fria sobre a sílica gelada e depois levar para um banho de gelo, pelo menos durante quinze minutos.

Deixar os géis à temperatura ambiente (25 a 30°C) dentro de dessecadores até que, com a agitação, os cristais sejam separados (cerca de uma a duas semanas ou dois a três dias para fungos de crescimento rápido). Armazenar os tubos em dessecadores em sala fria ou recipientes com sílica em geladeira (4°C), embora bons resultados possam ser obtidos à temperatura ambiente.

- **Armazenamento em solo estéril**

A preservação de fungos em solo estéril, pode ser feita de duas maneiras:

- pela inoculação de uma suspensão de esporos;
- pela inoculação de esporos secos em solo seco ou em substrato similar, com subsequente estocagem do material seco.

O método de estocagem em solo empregado consiste em inocular 5g de solo (20% de umidade e esterilizado pelo menos duas vezes a 121°C por quinze minutos) com 1mL de suspensão de esporos em água, com subsequente crescimento durante cerca de dez dias à temperatura ambiente. O armazenamento deverá ser feito de preferência em refrigerador a 5°C.

C. Liofilização (*freeze-drying*)

A liofilização, ou *freeze-drying* é um dos métodos mais econômicos e eficientes de preservação a longo prazo. O método permite a produção de grande número de liofilizado porque o uso de ampolas pequenas facilitam a estocagem. Enquanto o procedimento da liofilização é relativamente simples, o aspecto teórico é bastante complexo, pois a liofilização envolve a remoção de água de uma suspensão de microrganismos congelados por sublimação sob pressão reduzida, isto é, a água é evaporada sem passar pela fase líquida (passagem do estado sólido para o estado gasoso).

As células secas podem ser estocadas por longo período, se mantidas longe de oxigênio, umidade e luz. Elas podem a qualquer hora ser facilmente re-hidratadas e ativadas.

A liofilização pode ser realizada de várias maneiras, pois vários tipos de aparelhos foram desenvolvidos para este fim.

No caso dos fungos, é importante lembrar que o sucesso da liofilização varia entre linhagens de mesma espécie; em geral, aqueles que crescem e

esporulam bem em cultura sobrevivem ao processo, enquanto que isolados em estado deteriorado ou debilitado não resistem à liofilização.

Requisitos básicos para liofilização

- Meio de suspensão externo para congelamento (álcool metílico ou etílico + gelo seco).
- Gerador e mantenedor de vácuo (bomba).
- Absorvente do vapor de água (dissecante - condensador - líquido refrigerante).

Parâmetros de liofilização

Tipo de célula; crescimento e idade da cultura; concentração celular; meio de suspensão (crioprotetores); velocidade de resfriamento; método de secagem; condição de estocagem; método de constituição e métodos de análise (medidas de viabilidade, injúria, morte e outros parâmetros).

Crioprotetores

Materiais proteicos, carboidratos; aminoácidos; leite desnatado e outros.

Meios de suspensão:

- Leite desnatado 10%; leite desnatado 10% + inositol 5%.
- Sacarose 7% + peptona 7%; inositol 5% em soro de sangue de cavalo e outros.

Método de liofilização:

- Pré-congelamento + vácuo (umidade residual 1% a 2%);
- Centrifugação + vácuo
 - Secagem primária: umidade residual 5% a 10%.
 - Secagem secundária: umidade residual 1% a 2%.

Congelamento:

A preservação das características de microrganismos armazenados em um freezer com faixa de temperatura de 0 a -20°C produz resultados diversos, sendo que seu sucesso depende da espécie de fungo.

Parâmetro de congelamento:

Escolha do tipo de refrigerador, escolha de ampolas e frascos, agentes crioprotetores, culturas e preparação de suspensão, velocidade de resfriamento, estocagem e velocidade de descongelamento.

Pré-resfriamento para congelamento:

- Freezer (velocidade de resfriamento, $v_r = 1^{\circ}\text{C}/\text{min.}$).
- Gelo seco ($v_r = 7^{\circ}\text{C}/\text{min.}$).
- Fase vapor de nitrogênio ($v_r = 18^{\circ}\text{C}/\text{min.}$).

Congelamento direto:

Fase líquida de nitrogênio ($v_r = 200^{\circ}\text{C}$).

D. Armazenamento em nitrogênio líquido

Utiliza-se o nitrogênio líquido para se conseguir temperaturas “ultrabaixas”. Isso tem sido satisfatório para grande número de células vivas.

O método apresenta certas desvantagens: a aparelhagem requerida é mais cara que a usada para secagem ou congelamento; há necessidade de condições bem controladas de congelamento e degelo, e ainda há o risco de explosão de ampolas. Também é um método menos interessante que a secagem, quando se usa o armazenamento para distribuição de culturas.

A estocagem a temperaturas “ultrabaixas” reduz as trocas físicas e químicas e é um bom método para ser usado quando as culturas são de difícil liofilização.

Nos fungos, faz-se uma suspensão de esporos em glicerol 10% e alíquotas de 0,5mL são distribuídas em ampolas de vidro-borosilicato ou criotubos de 1mL e marcadas com o número da cultura usando tinta permanente. As ampolas são seladas com maçarico (quando criotubos, as tampas são bem fechadas) e colocadas num banho com corante em refrigerador de 4 a 8°C por trinta minutos para pré-resfriamento. Este procedimento permite que o glicerol penetre e envolva o organismo. O corante indica qualquer falha no selamento das ampolas ou criotubos, caso o conteúdo fique colorido.

Tal procedimento é seguido pelo congelamento das ampolas a -35°C por quarenta a sessenta minutos, e as ampolas são então colocadas no nitrogênio líquido e congeladas rapidamente a -196°C. A reativação é feita colocando-se as ampolas rapidamente em banho de água a 37°C até os cristais de gelo derreterem. As ampolas então são abertas e o conteúdo é dispensado em meio de cultura adequado ao crescimento.

Para se fazer o controle da viabilidade e pureza das culturas congeladas, a reativação deve ser feita após três a quatro dias de estocagem no nitrogênio líquido.

E. Método do papel de filtro (preservação de fungos entomopatogênicos)

Procedimento:

- Tiras de papel de filtro previamente esterilizadas (estufa 105°C por 24h), são distribuídas sobre o meio BDA (batata dextrose ágar), em placas de Petri, pouco antes de endurecer.
- Culturas fúngicas são transferidas para estas placas e incubadas por oito dias (dependendo do isolado) a 28°C.
- As tiras de papel apresentando estruturas fúngicas são retiradas das placas e transferidas para placas de Petri, para então serem mantidas em dessecador contendo sílica gel, onde deverão permanecer por 48 horas à temperatura ambiente.

- Após este período de incubação, as tiras são acondicionadas em saquinhos de papel-manteiga, previamente esterilizados, e armazenadas em dessecador à temperatura ambiente.

F. Método da sílica gel

Procedimento:

- Preparar recipientes (vidrinhos com tampa ou tubos *Eppendorfs*) parcialmente cheios com sílica gel (6 a 22 meshes) sem indicador, seca e esterilizada com calor seco (180°C/90 min).
- Cultivar os isolados em meio de cultura até a fase de esporulação.
- Preparar suspensão de esporos em leite em pó desnatado (10%), esterilizado e esfriado a 4°C.
- Adicionar a suspensão de esporos à sílica, resfriada a 4°C, sendo 0,5 mL da suspensão para 4 g de sílica.
- Incubar a 4°C por trinta minutos.
- Armazenar à temperatura ambiente por duas semanas e depois vedar as tampas.
- Transferir para geladeira (4 °C) para longo período de armazenamento.

6. Técnicas utilizadas em Micologia médica

O diagnóstico laboratorial das infecções fúngicas requer a **coleta** de amostras apropriadas e **procedimentos laboratoriais** adequados, segundo indicação clínica do paciente. A qualidade da amostra disponível para análise laboratorial é de fundamental importância. Coleta, estocagem e processamento de espécimes inadequados **podem levar a um diagnóstico errôneo**.

Dependendo da micose do paciente, uma série de materiais podem ser enviados ao laboratório para exame, como relacionado no quadro a seguir.

Tipos de micose	Tipos de material usualmente enviado ao laboratório para exame
Superficiais e cutâneas	Pele, pelos, unhas, exsudatos
Subcutâneas	Pus, tecidos (biópsias), exsudatos
Sistêmicas e oportunistas	Escarro, pus, tecidos (biópsias), exsudatos líquor, materiais brônquicos, medula óssea, sangue, urina

6.1. Coleta e processamento de espécimes clínicos

6.1.1. Pele

A. Coleta

- Limpar com álcool etílico ou éter (Em alguns casos nenhuma antissepsia pode ser feita). Se a lesão for úmida, limpar com água destilada ou solução salina estéril. Lâmpada de Wood pode ser usada para orientar a coleta e o diagnóstico.
- Raspar com lâmina de bisturi estéril ou cureta dermatológica a borda das lesões, evitar colher o material do centro da lesão.
- Colocar o material em placa de Petri entre duas lâminas ou em envelope (estéreis).

B. Processamento

- Exame microscópico direto - KOH 10% ou NaOH 4%.
- Cultivo.

Meios	Sabouraud-ágar com cloranfenicol Mycosel Ágar (contém cicloheximida e cloranfenicol)*
Semeadura	Semear três a cinco escamas de pele em cada tubo
Incubação	Incubar à temperatura ambiente
Observação	Observar o crescimento de fungos por até três semanas
Identificação	Identificar os fungos isolados em geral pela morfologia

6.1.2. Pelos

A. Coleta

- Com pinça estéril coletar o máximo de pelos afetados. A lâmpada de Wood pode ajudar na seleção.
- Colocar em placa de Petri, entre duas lâminas ou em envelope (estéreis).
- Procurar sempre colher, por raspagem, amostra de pele onde se implantam os pelos afetados, mesmo se tiverem aparência sadia.

B. Processamento

É realizado da mesma maneira que para amostras de pele.

6.1.3. Unhas

A. Coleta

- Limpar com álcool etílico ou éter.
- Raspar com lâmina de bisturi estéril ou com tesoura cirúrgica de ponta reta grande quantidade da parte lesada da unha. Desprezar as primeiras raspagens. Excelente para exame e cultivo é a parte da unha aparentemente são na borda da lesão ungueal.
- Raspar o material sob a unha, em caso de lesão na parte proximal e periungueal.

- Colocar o material em placa de Petri, entre duas lâminas ou envelope (estéreis).

B. Processamento

É realizado da mesma maneira que para amostras de pele.

6.1.4. Escarro

A. Coleta

- Quantidade: 5 a 10 mL são suficientes.
- Coletar, de preferência em jejum, o primeiro da manhã, após escovar os dentes e bochechar com solução antisséptica.
- Colher em recipiente estéril.
- Processar até duas horas após a coleta.

B. Processamento

- Fluidificação e concentração de escarro:
 - Adicionar ao escarro 10 mL de solução de citrato de sódio 0,10 mol/L e 0,10g de N-acetil L-cisteína.
 - Agitar bastante, centrifugar e desprezar o sobrenadante.
- Exame microscópico direto: KOH 10% ou NaOH 4%.
- Cultivo:

Meios	Sabouraud-ágar com cloranfenicol e Mycosel Ágar
Semeadura	Espalhar o material em pelo menos dois tubos de cada meio
Incubação	Incubar à temperatura ambiente e a 37°C
Observação	Observar o crescimento de fungos até quatro a seis semanas
Identificação	Identificar os fungos isolados*

* Em geral é realizada através de observação ao microscópio das colônias isoladas, em preparações com lactofenol-azul de algodão, cultivo em lâminas, demonstração de termotolerância e demonstração do dimorfismo entre outras técnicas.

7.1.5. Pus

A. Coleta

- Colher assepticamente, de preferência através de punção (nesse caso o procedimento é realizado por um médico).
- Colocar em recipiente estéril ou processar imediatamente.
- Processar o mais rápido possível, caso o processamento não tenha sido realizado no momento da coleta.

B. Processamento

- Exame microscópico direto: KOH 10% ou NaOH 4%.
- Cultivo:

Meios	Sabouraud-ágar com cloranfenicol e Mycosel Ágar
Semeadura	Pelo menos dois tubos de cada, se houver material suficiente. Caso contrário, semear em quantos tubos forem possíveis
Incubação	Incubar à temperatura ambiente e a 37°C
Observação	Observar o crescimento de fungos até quatro semanas
Identificação	Identificar os fungos isolados

Observação: Caso se observe grãos no pus, deve-se limpar a lesão com salina estéril, cobri-la com gaze estéril e, comprimir a região ao redor da lesão, a fim de que os grãos fiquem retidos na gaze. Se houver dificuldade de se obter material, deixar a gaze sobre a lesão do paciente até o dia seguinte. Observamos este material ao microscópio estereoscópico “pescando” os grãos, com auxílio de uma agulha “alça de platina” e, colocando-os em uma placa com salina estéril para lavá-los.

Após a lavagem, processar:

1. Exame direto: NaOH 4% ou KOH 10%.
2. Cultivo:

Grãos actinomicóticos – Semear em Caldo Tioglicolato e Sabouraud sem antibiótico.

Grãos eumicóticos – Semear em Sabouraud com cloranfenicol, observar de três a quatro semanas e identificar os isolados.

6.1.6. Aspirado de medula óssea

A. Coleta

- O médico deve coletar por punção.
- Colocar em frasco estéril com heparina. Evitar heparina de reuso, pois esta deve ser rigorosamente estéril. Nunca colher em frascos com EDTA, pois esta substância se combina com elementos da parede do fungo, diminuindo a sensibilidade do exame.
- Processar até duas horas após a coleta.

B. Processamento

- Exame direto geralmente não é realizado. Mas se necessário, corar lâminas com Giemsa ou Gram.
- Cultivo:

Meios	Sabouraud-ágar com cloranfenicol Mycosel Ágar BHI Ágar (se possível com sangue de carneiro 5%)
Incubação	Incubar à temperatura ambiente e a 37°C
Observação	Observar o crescimento de fungos até seis semanas
Identificação	Identificar os fungos isolados

6.1.7. Tecidos (biópsia)

A. Coleta

- O procedimento de coleta é realizado pelo médico
- Colocar, preferencialmente em tubo estéril, contendo 2 a 3 mL de soro fisiológico também estéril. Na ausência de frascos estéreis com salina, colocar entre duas gazes estéreis umedecidas com soro fisiológico, acondicionando em recipiente estéril para transporte.
- Processar rapidamente, no máximo em duas a quatro horas.

B. Processamento

- Pinçando firmemente o tecido, cortar pequenos fragmentos e em seguida macerar (em gral, homogeneizador ou com tesoura cirúrgica estéril).
- Exame microscópico direto: KOH 10% ou NaOH 4%.
- Cultivo:

Meios	Sabouraud-ágar com cloranfenicol e Mycosel Ágar
Incubação	Incubar à temperatura ambiente e a 37°C
Observação	Observar o crescimento de fungos até quatro semanas
Identificação	Identificar os fungos isolados

* Para isolar Zigomicetos (*Mucor*, *Rhizopus*, *Absidia* etc) usar o meio:

Pão umedecido esterilizado em tubo ou placa. Acrescentar cloranfenicol na concentração de 300mg/l no processamento. Fragmento de tecido deve ser cortado com bisturi em pequenos pedaços com cuidado, evitando a maceração.

6.1.8. Líquor

A. Coleta (sempre realizada por um médico).

- Quantidade ideal: 1,0 mL em tubo estéril (às vezes vêm menos material).

- Processar rapidamente;
- Se for preciso conservar: guardar sob refrigeração (4°C).

Observação: *Cryptococcus* tolera bem a refrigeração.

B. Processamento

- Centrifugar o líquido;
- Exame microscópico direto do sedimento com tinta nanquim (OBRIGATÓRIO) e esfregaços corados com Gram e Giemsa (caso necessário).
- Cultivo:

Meios	Sabouraud-ágar com cloranfenicol e BHI - NUNCA Mycosel
Semeadura	Semear o sedimento em pelo menos dois tubos de cada meio
Incubação	Incubar à temperatura ambiente e a 37°C
Observação	Observar o crescimento de fungos até quatro a seis semanas
Identificação	Identificar todos os fungos isolados

6.1.9. Exsudatos (Pleura, pericárdio, peritônio, articulações, etc)

A. Coleta

- Colher em tubo estéril com heparina estéril. O ideal é já ter heparina na seringa.
- Processar rapidamente.

B. Processamento

- Centrifugar e desprezar o sobrenadante.
- Exame microscópico direto do sedimento com KOH 10% ou NaOH 4% e tinta nanquim.
- Cultivo: é realizado da mesma forma que escarro (item 6.1.4 deste capítulo)

6.1.10. Material brônquico (aspirado, escovado, lavado e outros)

A – Colheita (sempre realizada pelo médico do paciente)

- Colher em frasco estéril.

B. Processamento

É Centrifugar e desprezar o sobrenadante. Realizar exame microscópico do sedimento com KOH 10% e tinta nanquim. Cultivo do sedimento da mesma forma que para amostra de escarro.

6.1.11. Urina

A. Coleta

- Quantidade – 25 a 50 mL em frasco estéril;
- Recomendar:
 - Primeira urina da manhã.
 - Cuidados de higiene local.
 - Desprezar o primeiro jato.
- Processar no máximo em duas a quatro horas.
- Conservar sob refrigeração (4°C), excepcionalmente.

B. Processamento

- Exame microscópico direto do sedimento com KOH 10% ou NaOH 4% e tinta nanquim.
- Cultivo:

Meios	Sabouraud-ágar com cloranfenicol e Mycosel Ágar
Semeadura	Semear o sedimento em pelo menos dois tubos de cada meio de cultura
Incubação	Incubar à temperatura ambiente e a 37°C
Observação	Observar o crescimento de fungos até seis semanas
Identificação	Identificar os fungos isolados*

Nota: Para investigação da etiologia fúngica, recomenda-se coleta de uma amostra matinal diária, por três dias consecutivos. * A ANVISA também recomenda que seja realizada cultura quantitativa da urina para contagem de unidades formadoras de colônia, através da semeadura da urina não centrifugada em uma placa de Sabouraud ágar com alça calibrada.

6.1.12 Sangue (para hemocultura)

A. Coleta

- Fazer assepsia local com álcool iodado.
- Quantidade: 4 a 5 mL de sangue (utilizando escalpe e seringa descartável).
- Colocar diretamente em frasco de hemocultura contendo meio de BHI líquido ou lioquid.
- Manter o frasco (já inoculado) em temperatura ambiente, invertido em estantes apropriadas.
- Processar em 48 horas após a colheita; dez dias após a primeira semeadura e dez dias após a segunda semeadura.
- Se forem utilizados frascos de sistemas automatizados, seguir instruções do fabricante.

B. Processamento

- Exame direto em geral não é realizado, se necessário, corar lâminas pelo Gram ou Giemsa.
- Cultivo:

Meios	BHI ágar com cloranfenicol
Semeadura	Retirar o hemocultivo (com seringa descartável) e inocular cerca de 1 mL em cada tubo de cultura, espalhando o sangue por toda superfície do meio
Observação	Observar as subculturas (tubos) por até seis semanas
Incubação	Incubar à temperatura ambiente e observar de quatro a seis semanas
Identificação	Identificar todos os fungos isolados

6.2. Coleta de sangue: separação, conservação e estocagem do soro

Cerca de 10 mL de sangue deverão ser colhidos através de punção venosa, em tubo de ensaio estéril sem adição de anticoagulantes. O soro é separado após retração do coágulo, segundo os preceitos técnicos, a fim de evitar hemólise. Adicionar ao soro, mertiolato na concentração final de 1:10.000, a partir de solução estoque 1:100.

Distribuir em alíquotas de 1 mL em pequenos tubos e ensaio ou frascos, identificá-los corretamente e armazenar em congelador até o momento do uso ou envio ao laboratório de referência.

6.3. Preparo e padronização dos antígenos utilizados nas provas sorológicas e reações intradérmicas

6.3.1. Polissacáride de *Paracoccidioides brasiliensis*

O antígeno obtido a partir de células de *Paracoccidioides brasiliensis* em sua fase leveduriforme, segundo técnica de FAVA NETTO, é de natureza química quase que exclusivamente polissacarídica. O antígeno é utilizado nas reações de fixação de complemento, precipitação em meio líquido e nas provas intradérmicas de leitura tardia.

- a) Preparar o meio de cultura - Fava Netto;
- b) No preparo do antígeno, utilizar no mínimo três amostras diferentes de *P. brasiliensis*, que são mantidas em sua forma leveduriforme em estufa a 35°C, no meio acima descrito e, com repiques a cada vinte dias.
- c) Preparar suspensão em solução fisiológica estéril das células leveduriformes do fungo.

- d) Com auxílio de pipeta estéril, espalhar a suspensão sobre a superfície do meio de cultura contido em garrafas de Roux.
- e) Incubar a 35°C durante vinte dias.
- f) Decorrido o prazo estipulado, colher as células do fungo, com auxílio de espátula e fazer suspensão em solução tampão Veronal, contida em frascos apropriados para centrifugação.
- g) Homogeneizar a suspensão com auxílio de bastão de vidro e centrifugar a 2.000 rpm durante dez minutos.
- h) Desprezar o sobrenadante (É conveniente, antes, autoclavar o sobrenadante, pois ele pode conter células viáveis, ou adicionar formalina).
- i) Fazer suspensão do sedimento em aproximadamente cinco volumes de acetona. Homogeneizar a suspensão com auxílio de bastão de vidro (estéril).
- j) Centrifugar a 2.000 rpm durante dez minutos. Desprezar o sobrenadante.
- k) Repetir as operações “i” e “j” por mais duas vezes.
- l) Repetir as operações “i”, “j” e “k”, com éter sulfúrico.
- m) Anotar o volume do sedimento e deixá-lo em frasco aberto em geladeira até o dia seguinte, quando as células estarão secas.
- n) Fazer suspensão a 15% em solução tampão veronal, levando em consideração o volume das células anotado no item “m”.
- o) Autoclavar a suspensão a 115°C durante quinze minutos.

- p) Centrifugar a 2.000 rpm, durante trinta minutos, tendo o cuidado em manter condições de esterilidade.
- q) Deixar o frasco em geladeira até o dia seguinte.
- r) Repetir a operação "p".
- s) Separar cuidadosamente o sobrenadante e adicionar mertiolato na concentração final de 1:10.000.
- t) Distribuir o antígeno em alíquotas de 1 a 5ml, em frascos ou tubos estéreis. Identificar e datar.
- u) Realizar controle de esterilidade.
- v) A estabilidade do antígeno é superior a dois anos, quando estocado a 4°C.

A padronização do antígeno polissacarídico para emprego na reação de fixação de complemento se faz através da titulação desse antígeno ante o soro de paciente portador de paracoccidiodomicose e, que reconhecidamente seja positivo em tal reação diante do antígeno padrão.

Nas reações intradérmicas, o antígeno deve ser padronizado em pacientes portadores de paracoccidiodomicose, ou em animais experimentalmente infectados. Através da utilização de antígeno padrão, chega-se à diluição ótima que deverá ser utilizada para o novo antígeno. Fava Netto, através de sua experiência pessoal, verificou que a diluição do antígeno a ser utilizado nas provas intradérmicas corresponde a 1/10 daquela que representa a dose ótima de antígeno para fixar unidades de complemento 50% de hemólise, na prova de fixação de complemento. Geralmente a diluição ótima do antígeno para utilização nas reações intradérmicas está em torno de 1:10.

6.3.2. Filtrado de cultura de *Paracoccidioides brasiliensis*

O antígeno obtido por essa técnica, constitui-se em excelente reagente para ser utilizado nas reações de fixação do complemento e precipitação em gel. Sua natureza química é glicoproteica.

- Preparar o meio de cultura - Negróni (item 4.1 deste capítulo)
- Inocular os frascos com pelo menos três amostras diferentes de *P. brasiliensis*, a partir de cultivos mantidos a 35°C.
- Incubar a 35°C durante quatro semanas sob agitação constante.

Observação: Se não houver disponibilidade de manter os cultivos sob agitação constante, os mesmos poderão ser mantidos estáticos a 35°C durante 12 semanas.

- Decorrido o tempo de cultivo, adicionar mertiolato na concentração final de 1:10.000, agitar e incubar a 35°C durante uma semana.
- Realizar controle de esterilidade.
- Filtrar as culturas em papel de filtro.
- Colocar o filtrado em placas de Petri limpas e deixar em estufa a 37°C, até que o volume seja reduzido a 1/20 do volume original, ou utilizar polietilenoglicol (concentrando vinte vezes).
- Centrifugar a 2.500 rpm por trinta minutos.
- Distribuir o filtrado, que constitui o antígeno em alíquotas de 1 a 5 mL em frascos tipo penicilina, identificar, datar e estocar a 4°C.

6.3.3. Filtrado de cultura de *Histoplasma capsulatum* (HISTOPLASMINA)

- Preparar o meio de cultura - Smith-Asparagina (item 4.1 deste capítulo).
- Semear de três a cinco amostras diferentes de *Histoplasma capsulatum* nos balões contendo o meio de cultura.

- Deixar as culturas à temperatura ambiente e no escuro, durante quatro a seis semanas, sob agitação.
- Decorrido o prazo estabelecido, adicionar mertiolato na concentração final de 1:10.000. Agitar para submergir os filamentos e deixar à temperatura ambiente durante uma semana.
- Realizar controle de esterilidade.
- Filtrar em papel de filtro.
- Dependendo do emprego da histoplasmina, temos dois caminhos a seguir:
 - **Utilização em reações sorológicas** (Reações de fixação de complemento e precipitação em gel de ágar)
 - Colocar o antígeno em placas de Petri limpas, deixar a 37°C até que o volume seja reduzido para 1/20 do volume original.
 - Centrifugar a 2.500 rpm durante trinta minutos.
 - Distribuir o antígeno em frascos tipo penicilina.
 - Identificar, datar e conservar a 4°C.
 - Para padronização nas provas sorológicas, consultar o item 6.5 deste capítulo.
 - **Utilização em provas intradérmicas**
 - Após filtrar em papel de filtro a histoplasmina é filtrada em membrana esterilizante (poro de 0,22 µm).
 - Distribuir em frascos tipo penicilina e estocar a 4°C.
 - Realizar controle de esterilidade.

- A histoplasmina a ser utilizada nas reações intradérmicas é geralmente diluída a 1:1000, em solução fisiológica estéril. Deverão ser realizadas provas em indivíduos sensíveis ao antígeno, ou animais previamente sensibilizados, diante de *H. capsulatum*, utilizando-se histoplasmina padrão para fins de comparação.

6.3.4. Filtrado de cultura de *Aspergillus fumigatus*

- Cultivar *A. fumigatus* (mínimo de três amostras diferentes) em caldo Sabouraud por quatro semanas à temperatura ambiente.
- Decorrido o prazo estipulado, adicionar mertiolato na concentração final de 1:5.000. Agitar para submergir os filamentos.
- Deixar as culturas à temperatura ambiente durante uma semana.
- Realizar controle de esterilidade.
- Filtrar em papel de filtro.
- Colocar o filtrado em placas de Petri limpas e deixar em estufa a 37°C, até que o volume seja reduzido para 1/20 do volume original, ou utilizar polietilenoglicol para concentrar.
- Centrifugar a 2.500 rpm durante trinta minutos.
- Distribuir o antígeno em alíquotas de 1-5 mL, em frascos tipo penicilina., Identificar, datar e conservar a 4°C.

O filtrado de cultura de *A. fumigatus* é utilizado nas reações de fixação de complemento e precipitação em gel de ágar. É conveniente preparar pela mesma técnica, filtrados de culturas de *A. flavus*, *A. terreus* e *A. niger*. Para a padronização do antígeno, consultar o item 6.5 deste capítulo.

6.5. Técnicas de padronização dos antígenos utilizados nas provas sorológicas

a) Reação de fixação de complemento

Os antígenos utilizados nas reações de fixação de complemento são padronizados através da titulação cruzada perante soro positivo para o antígeno em estudo. Utiliza-se, para tal propósito, antígeno padronizado com finalidades de controle da reação. A diluição ótima do antígeno não deverá demonstrar atividade anticomplementar.

b) Imunodifusão dupla de Ouchterlony

São feitas diluições do antígeno (1:2, 1:4, 1:8 etc), as quais são colocadas para difundir no gel, contra soro reconhecidamente positivo para o antígeno em questão.

Decorrido o tempo necessário para formação dos precipitados, procede-se à leitura da reação.

O título do antígeno será aquele correspondente à sua mais alta diluição que se dê positividade nítida com o soro e o mesmo número de bandas de precipitação, quando comparado ao antígeno padrão.

6.6. Técnica de imunodifusão radial dupla em gel de ágar (Ouchterlony)

REAGENTES

Reagente 1

Ágar noble0,5 g

Água destilada.....100 mL (Estocar em erlenmeyer a 4° C)

Reagente 2

Ágar noble1,0 g

Azida sódica0,1 g

PBS 7.2100 mL

* Aquecer em banho-maria até o ágar dissolver

* Colocar 3,5 mL em tubo de ensaio e estocar a 4° C

Reagente 3

PBS (Tampão fosfato 0,01 mol/L , NaCl 0,15 mol/L) pH 7.2-7.4

Solução **A**: NaH_2PO_4 ———0,2 M (Fosfato de sódio monobásico)

Solução **B**: Na_2HPO_4 ———0,2 M (Fosfato de sódio dibásico)

***Tampão fosfato 0,01 mol/L**

Adicionar 280 mL da solução **A** a 720 mL da solução **B**

PBS: 50 mL do tampão fosfato + 50 mL de NaCl 3 mol/L.
Completar para 1000 mL com água destilada.

Reagente 4

Citrato de sódio 5 g100 mL de água destilada

Reagente 5

SOLUÇÃO CORANTE

Coomassie brilliant blue	0,5 g
Ácido acético	10 mL
Etanol	45 mL
Água destilada	45 mL

Reagente 6

SOLUÇÃO DESCORANTE

Metanol	400 mL
Ácido acético	100 mL
Água destilada	500 mL

1ª Etapa (filmagem das lâminas):

- Mergulhar as lâminas de microscopia, devidamente limpas, no **reagente 1**; com auxílio de uma pinça, retirá-las em seguida, deixando o tempo suficiente para umedecê-las.
- Secá-las em estufa de aproximadamente 60°C.
- Após a secagem, estocá-las em caixas para posterior utilização.

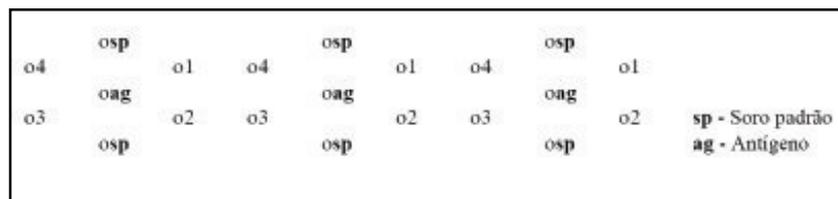
2ª Etapa:

- Utilizando uma mesa nivelada, colocar a lâmina previamente “filmada” com o **reagente 1**.

- Colocar em banho-maria os tubos com 3,5 mL de ágar (**reagente 2**) estocados, esperar liquifazer.
- Verter sobre a lâmina o **reagente 2** liquefeito, deixando solidificar por cinco minutos.
- Colocá-las em câmara úmida na geladeira.

Observação: Pode permanecer em geladeira na câmara úmida até sete dias (margem de segurança).

- Após dez minutos em geladeira, a lâmina já pode ser perfurada segundo esquema a seguir.



3ª Etapa

- Colocar o soro - 10 µL em cada orifício - respeitando o esquema acima. Nas extremidades superiores e inferiores adicionar soro padrão. Nos poços 1, 2, 3 e 4, adicionar os soros a serem testados.
- Após a colocação dos soros, aguardar uma hora para adicionar os antígenos nos orifícios centrais.

4ª Etapa

- Difusão em estufa a 37°C ou à temperatura ambiente, por 48 horas.

5ª Etapa

- Iniciar os banhos – Colocar as lâminas (após 48 horas) em uma cuba e verter sobre elas citrato de sódio 5 % (**reagente 4**) por duas horas, com objetivo de retirar precipitados inespecíficos.
- Após o banho de citrato – Adicionar solução salina 0,9 % por 48 horas, trocando várias vezes.

6ª Etapa

- Usando o papel de filtro (umedecê-lo previamente em água destilada), embrulhar as lâminas e colocá-las em estufa de secagem a 60° C, até atingir completa secagem.
- Mergulhar as lâminas em água destilada, e retirar o papel cuidadosamente. Lavar em água corrente para retirar resíduos de papel de filtro e secá-las em estufa.

7ª etapa

- Corar por dez minutos utilizando o **reagente 5**.
- Colocar em cuba de coloração várias lâminas e verter o corante. Após dez minutos, retirar as lâminas e estocar novamente o corante (é possível reaproveitá-lo). Periodicamente deve-se filtrá-lo novamente.

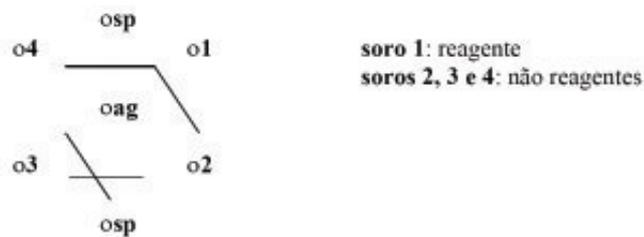
8ª Etapa

- Após o processo de coloração, retirar o excesso de corante com solução descorante (**reagente 6**) até que as linhas de precipitação fiquem bem nítidas.

Observação: Se descorar muito ou totalmente pode corar novamente.

9ª Etapa

- Leitura: considera-se reação positiva (soro reagente) quando houver a presença de linhas de precipitação apresentando identidade total com o soro padrão. Exemplo:



6.7. Identificação de leveduras de importância clínica

As leveduras são um grupo de fungos heterogêneos que superficialmente aparentam ser homogêneas. A identificação desses fungos é baseada nas características morfofisiológicas e bioquímicas. A morfologia é primariamente usada para estabelecer o gênero, entretanto, as provas bioquímicas (Teste de redução do nitrato e hidrólise da ureia), e de assimilação e fermentação de açúcares são usadas para diferenciar várias espécies.

6.7.1. Provas morfológicas

Dentre as provas morfológicas disponíveis para identificar espécies do gênero *Candida* temos a técnica de Dalmau e o tubo germinativo.

A técnica de Dalmau é baseada no fato de que *C. albicans*, quando cultivada em meio de cultura pobre em nutrientes, como o ágar arroz ou ágar fubá, produz uma estrutura de resistência denominada clamidoconídio. Dentre todas as espécies do gênero *Candida*, somente *C. albicans* e *C. dubliniensis* são capazes de formar clamidoconídios, sendo que esta última forma clamidoconídios em cachos, apresentando três ou mais clamidoconídios por hifa. Além disso, esta é uma espécie rara e altamente relacionada a *C. albicans*.

O teste do tubo germinativo baseia-se no fato de que *C. albicans*, quando incubada a 37°C por duas a três horas, em soro bovino ou de coelho, forma, a partir de suas leveduras, uma estrutura denominada tubo germinativo que dará origem às hifas e pseudo-hifas características desta espécie.

Teste do tubo germinativo

- Rotular os tubos testes com o número da amostra.
- Usando uma pipeta, dispensar 0,5 mL de soro bovino ou de coelho em cada tubo.
- Com uma alça flambada, tocar levemente a colônia de levedura e colocá-la no soro dentro do tubo.
- Agitar para homogeneizar as células leveduriformes no soro. Incubar os tubos a 37°C por duas a três horas.
- Após a incubação, colocar uma gota da suspensão numa lâmina de microscopia lisa e cortada e cobrir a preparação com uma lamínula.
- Examinar ao microscópio para detectar a presença ou ausência de tubo germinativo nas células da levedura estudada.

Teste de Dalmau

- Usar uma placa de Petri com *corn meal* ágar adicionado de 1% Tween 80.
- Com um bisturi estéril, fazer um sulco no meio de cultura, aproximadamente 1 cm à esquerda do meio da placa.
- Com auxílio de uma alça de platina esterilizada, retirar uma pequena quantidade da cultura leveduriforme em estudo e semear no sul-

co. Fazer três furos no meio de cultivo com a mesma alça à direita do sulco, formando um pequeno triângulo.

- Colocar uma lamínula (24 mm x 24 mm) estéril sobre o meio de cultura, cobrindo o sulco e sobre os furos.
- Incubar a temperatura ambiente por 72 horas.
- Observar no microscópio óptico, em objetiva de 10X, a presença ou ausência de clamidoconídios, diariamente até completar cinco dias.

6.7.2. Provas de assimilação

Para estudo de assimilação de fontes de carbono por leveduras podem ser utilizados meios cromogênicos, bem como *kits* comerciais de identificação.

Meio CHROMagar Candida

O meio cromogênico CHROMagar Cândida para diferenciação de *Candida albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis* e outras espécies permite a identificação do microrganismo de acordo com a coloração que este apresenta no meio semeado.

A interpretação dos resultados é feita com base na cor e no aspecto típico das colônias, conforme apresenta a tabela a seguir:

Cor e aspecto típico da colônia	Microrganismo pré-identificado
Verde	<i>Candida albicans</i>
Azul-metálico	<i>Candida tropicalis</i>
Rosa, rugosa	<i>Candida krusei</i>
Branco à violeta	Outras espécies

Galeria API 20C Aux

A galeria API 20 C AUX engloba vinte cúpulas que contêm substratos desidratados para efetuar 19 testes de assimilação. As cúpulas são inoculadas com um meio mínimo semigelosado e as leveduras crescem apenas se forem capazes de utilizar o substrato correspondente. A leitura dessas reações faz-se por comparação com os controles de crescimento (presença ou ausência de turvação) e a identificação é possível consultando o catálogo analítico ou um sistema de identificação disponível na internet (Api Web).

Método Vitek YBC (Cartão de Bioquímica para levedura)

O cartão YBC contém 30 poços. Destes 30, 26 contêm caldos bioquímicos e quatro contêm caldos de controle negativo. O cartão necessita de 24 horas, e em alguns casos de 48 horas, de incubação a 30°C em uma estufa e, em seguida, de uma única leitura depois de decorridas 24 horas, e em alguns casos de uma segunda leitura depois de 48 horas, no leitor/incubadora VITEK para uma análise dos dados. O cartão baseia-se nos métodos bioquímicos estabelecidos de Wickerham e Burton. Estes testes incluem a assimilação de hidratos de carbono, hidrólise da ureia, resistência a ciclo-heximida e redução de nitrato, que foram adaptados para serem utilizados no sistema VITEK.

6.8. Testes de sensibilidade aos antifúngicos

Entre os testes preconizados para detectar resistência a antifúngicos, apenas alguns deles foram até agora suficientemente avaliados em estudos amplos e bem conduzidos, a fim de comprovar boa reprodutibilidade intra e interlaboratorial, além de correlação com a evolução clínica dos pacientes. Os mais conhecidos e difundidos são os do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), denominado, desde 2005, *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), publicado a partir de 1985, sob a forma de

documento. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) adquiriu os direitos autorais para a língua portuguesa dos documentos CLSI/NCCLS M27-A3 e M38-A e tornou-os disponíveis através do site: <http://www.anvisa.gov.br>

M27-A3. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade de Leveduras; à Terapia Antifúngica Norma Aprovada - Terceira edição do NCCLS: Descreve a metodologia de um teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos das leveduras que causam infecções fúngicas invasivas, incluindo as espécies de *Candida* e *Cryptococcus neoformans*. O M27-A3 é o método mais bem estudado e o documento pertinente contém técnicas de diluição em meio líquido, macrodiluição em tubos de ensaios e microdiluição em placas de micro titulação, para determinar a CIM. As leveduras são testadas ante as drogas (anfotericina B, 5-fluorocitosina e azólicos, incluindo cetoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol, além de posaconazol e ravuconazol). O meio usado é o RPMI-1640 líquido, inóculo inicial de 1 a 5×10^6 cel/mL, ajustando em espectrofotômetro a 530 nm, incubação a 35° C. Utilizam-se cepas-controle ATCC em todos os testes realizados.

M38-A. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade à Terapia Antifúngica de Fungos Filamentosos; Norma Aprovada do NCCLS.

Descreve um método para testar a sensibilidade dos fungos filamentosos que causam infecções invasivas, incluindo espécies de *Aspergillus*, espécies de *Fusarium*, *Rhizopus arrhizus*, *Pseudallescheria boydii* (*Scedosporium apiospermum*) e *Sporothrix schenckii*, assim como outros fungos patogênicos oportunistas, aos agentes antifúngicos. O

meio de cultura recomendado é mesmo indicado no documento M27-A2 e o inóculo deve ser ajustado, com auxílio de espectrofotômetro, para conter $0,4 \times 10^4$ a 5×10^4 UFC/mL. Entretanto, a densidade óptica (DO) a 530 nm, requerida no ensaio, depende do tamanho do conídio ou esporangiosporos do fungo em estudo. Há necessidade de adição de Tween 20, como agente surfactante, para preparar inóculo de *Aspergillus* spp.

M44-A. esse método descreve uma prova sensível e prática, validada para teste de sensibilidade em *Candida* spp.; utilizando discos impregnados com fluconazol ou com voriconazol. Este método ainda não foi validado para provas com outros gêneros de leveduras e recentemente foi proposto um novo método para uso com fungos filamentosos. O documento inclui critério de interpretação para os diâmetros de halos obtidos com discos de fluconazol e valores esperados para cepas padrão.

EUCAST. ensaio recomendado para avaliação da atividade antifúngica de substâncias puras pela técnica da microdiluição em caldo, pela organização europeia *Antifungal Susceptibility Testing Subcommittee of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing* (AFST-EUCAST), é baseado nos procedimentos da referência CLSI M27-A2, mas com algumas modificações, a fim de se obter maior exatidão na determinação dos valores de CIM. Estudos têm confirmado que a modificação do documento CLSI M27-A2, com a suplementação do meio RPMI 1640 e com 2% de glicose no meio de cultura, tornou a metodologia mais vantajosa. Isso se deu devido a redução do tempo de incubação necessário (24 horas) para se obter um crescimento suficiente para a determinação dos valores de CIM.

Sistemas comerciais: Existem vários sistemas comerciais para realizar testes de sensibilidade aos antifúngicos, incluindo, entre outros, Asty, Atb Fungus 3, Candifast, E-Test, Fungitest, Integral Systems Yest, Mycototal E Sensitrite Yeast One. Apenas o E-Test, o Atb Fungus 3 e o Candifast têm distribuidores no Brasil.

Resumo do capítulo

Os fungos são organismos que convivem conosco todos os dias. São importantes, tanto do ponto de vista ecológico, quanto econômico. A Micologia é a área da Biologia destinada ao estudo dos fungos, que teve o seu grupo reconhecido como um reino a partir da descrição de cinco reinos por Whittaker, em 1969. Os organismos foram alocados em reinos com base na morfologia e no modo de nutrição dos seres vivos, sendo criado, então, o reino Fungi. Todos os fungos conhecidos, com poucas exceções, têm origem dos **esporos** (reprodução sexuada) ou **conídios** (reprodução assexuada), corpúsculos que podem ser comparados às sementes das plantas superiores, embora não sejam morfológicamente semelhantes a estas. Na maioria dos casos, o sistema vegetativo encontra-se no interior dos tecidos parasitados, no solo ou na matéria orgânica em decomposição. Com a formação dos esporos ou conídios, é necessário que estes tenham acesso livre ao ar, para assegurar sua disseminação. O ciclo de vida dos fungos compreende duas fases. Uma somática, caracterizada por atividades alimentares, e outra reprodutiva, onde os fungos podem realizar reprodução sexuada ou assexuada. Por causa da rigidez da parede celular, sua nutrição é por absorção de nutrientes solúveis simples. Os fungos são considerados seres cosmopolitas, pois estão presentes em qualquer parte do planeta. A temperatura ideal para o crescimento dos fungos fica entre 0 a 35°C, mas o ótimo para a maioria fica entre 20 a 30°C, e a umidade ideal fica em torno da saturação.

Os fungos são usados como alimento propriamente dito; na indústria alimentícia, na produção de pães, queijos, cervejas e vinhos; na indústria farmacêutica e biotecnológica, para a fabricação de antibióticos, ácidos, pigmentos, enzimas, pesticidas biológicos, entre outros usos.

- Os fungos podem parasitar o homem e outros animais, causando um grupo de doenças conhecidas como micoses.

- As micoses podem ser classificadas em cinco grupos, de acordo com suas manifestações clínicas.
- As micoses superficiais são infecções causadas por fungos que invadem as camadas mais superficiais da capa córnea da pele ou a haste livre dos pelos.
- As micoses cutâneas se caracterizam por serem causadas por fungos que invadem toda a espessura da capa córnea da pele, a parte queratinizada intrafolicular dos pelos ou a lâmina ungueal.
- As micoses subcutâneas se caracterizam por resultar da inoculação de um fungo patogênico por ocasião de um traumatismo, em geral cortes por plantas ou pela manipulação do solo, manifestando-se como tumefação ou lesão supurada da pele ou do tecido subcutâneo, produto da disseminação do fungo por contiguidade ou por via linfática.
- As micoses sistêmicas são caracterizadas por serem adquiridas através de inalação de propágulos fúngicos, causando, conseqüentemente a lesão primária pulmonar. Desta forma, o fungo pode se disseminar pelo corpo através da corrente sanguínea, originando lesões extrapulmonares nos pacientes.
- As micoses oportunistas são causadas por fungos termotolerantes de baixa virulência que determinam doenças em hospedeiros com graves deficiências do sistema imunológico.
- O diagnóstico das micoses é realizado através da visualização do fungo nos espécimes clínicos (exame microscópico direto) e do seu cultivo em meios adequados. Provas imunológicas podem auxiliar no diagnóstico, fornecendo resultado presuntivo das infecções.

Questões

- 1) Cite as técnicas mais importantes para o isolamento de fungos de solo e de ar.
- 2) Em que situações podemos usar a técnica de diluição seriada?
- 3) Paciente portador do HIV fazendo uso de corticosteroides e que teve tuberculose pulmonar há três anos apresenta imagens radiológicas de tórax sugestivas de bola fúngica. Foi colhida uma amostra de escarro, a qual foi processada adequadamente. O exame microscópico direto apresentou hifas septadas e hialinas, ramificadas dicotomicamente. No cultivo, houve crescimento de uma colônia esverdeada, a qual, quando corada pelo lactofenol azul de algodão, apresentou conidióforo com vesícula alongada e fiálides distribuídas a partir da metade da vesícula, dando origem a longas cadeias de conídios globosos e equinulados. Com base nisso, responda:
 - a) Explique como deve ser realizado o processamento do espécime clínico em questão, antes que sejam realizados o exame direto e o cultivo do material.
 - b) Qual o agente etiológico desta micose?
 - c) Que testes imunológicos poderiam ser aplicados à doença que o paciente possui?
 - d) Uma pessoa saudável, sem uso de medicamentos, poderia adquirir esta infecção? Comente.

Referências Bibliográficas

- ALEXOPOULOS, C. J. ; MIMS, C. W. ; BLACKWELL, M. *Introductory Mycology*. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1996.
- ALMEIDA-PAES, R. *et al.* Immunoglobulins G, M, and A against *Sporothrix schenckii* exoantigens in patients with sporotrichosis before and during treatment with itraconazole. *Clinical and Vaccine Immunology*. v. 14, n. 9, p. 1149-1157, 2007.
- ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: Alves, S.B. *Controle Microbiano de insetos*. Piracicaba: FEALQ, 1998.
- ATTLI, S. D. *Importância e sistemática de fungos filamentosos*. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisa Tecnologia "André Tosello", 1990.
- CRESPO-ERCHIGA, V. ; GÓMEZ-MOYANO, E. ; CRESPO, M. *La pitiriasis versicolor y las levaduras del género Malassezia*. *Actas Dermo-Sifilográficas*. v. 99, n. 10, p. 764-771, 2008.
- CRUZ, L. C. H. *Micología Veterinária*. Itaguaí: Imprensa Universitária, 1985.
- HAMILTON, A. J. *Serodiagnosis of histoplasmosis, paracoccidioidomycosis and penicilliosis marneffeii: current status and future trends*. *Medical Mycology*. v. 36, n. 6, p. 351-364, 1998.
- HIBBETT, D. S. *et al.* A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*. Londres, v.111, 2007.
- KIRK, P. M. *et al.* (eds). *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. 9. ed. Wallingford: CABI Publishing, 2001.
- LATGÉ, J. P. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*. v. 12, n. 2, p. 310-350, 1999.
- LAZÉRA, M. S. *et al.* Criptococose. In: Coura, J.R. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
- LOPES-BEZERRA, L. M. ; SCHUBACH, A. O. ; COSTA, R. O. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. v. 78, n. 2, p. 293-308, 2006.
- MOORE-LANDECKER, E. *Fundamentals of the Fungi*. 4. ed., New Jersey: Prentice-Hall, Inc., 1996.
- PUTZKE, J. ; PUTZKE, M. T. L. Os Reinos dos Fungos. Vol. I. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 1998.
- RIPPON, J. *Medical Mycology: The pathogenic fungus and the pathogenic actinomycetes*. Philadelphia: WB Saunders, 1988.

SILVEIRA, V. D. *Micologia*. 5. ed., Rio de Janeiro: Âmbito Cultural Edições Ltda., 1995.

VALLE, A. C. F. *et al.* Micoses superficiais e cutâneas. In: COURA, J. R. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

WANKE, B. *et al.* Investigation of an outbreak of endemic coccidioidomycosis in Brazil's Northeastern State of Piauí with a review of the occurrence and distribution of *Coccidioides immitis* in three other Brazilian states. *Mycopathologia*. v. 148, n. 2, p. 57-67, 1999.

WEITZMAN, I; SUMMERBELL, R. C. The dermatophytes. *Clinical Microbiology Reviews*. v. 8, n. 2, p. 240-259, 1995.

ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. ; MUNIZ, M. M. ; WANKE, B. Histoplasrose. In: Coura, J.R. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.