

Apostila das Aulas Práticas
Microbiologia Básica para Farmácia

BMM0160 – Noturno

São Paulo, agosto de 2021.

Equipe técnica

Professora Responsável

Kelly Ishida (ishidakelly@usp.br)

Professores Participantes:

Armando M. Ventura (amventur@icb.usp.br)

Carlos P. Taborda (taborda@usp.br)

Cristiane R.G. Carvalho (crisguzzo@gmail.com)

Danilo Yamamoto (dan.yamamoto.thz@gmail.com)

Gabriel Padilla (gpadilla2404@gmail.com)

Kelly Ishida (ishidakelly@usp.br)

Márcio Vinícius Bertacine Dias (mvbd@usp.br)

Robson Souza (robfsouza@gmail.com)

Técnicos

Leandro M. Garrido

Marcela Gonçalves

Márcia Hamuri Fukugaiti

Renata Silveira Paulo

Tatiana A. Reis

Zita Maria de Oliveira Gregório

Monitor

Thayná Lopes Barreto (thaynabarreto1@gmail.com)

Telefones Úteis:

Bombeiros	193
Serviço De Atendimento Móvel De Urgência (SAMU)	192
Hospital Universitário (HU)	3039-9200
Hospital das Clínicas (HC)	3067-6000
Segurança USP	3091-4222
Portaria do ICB-II	3091-7270

Sumário

NOÇÕES ELEMENTARES DE SEGURANÇA PARA OS LABORATÓRIOS DIDÁTICOS DE MICROBIOLOGIA	4
Aulas Práticas - Bacteriologia	9
Prática 1. Coloração de Gram	10
Prática 2. Presença de micro-organismos no ambiente, semeadura e cultura pura	14
Prática 3. Agentes desinfetantes	28
Prática 4. Conjugação e Antibiógrama	20
Prática 5. Antibiógrama	22
Prática 6. Identificação de bactérias através de testes bioquímicos	25
Aulas Práticas: Micologia	33
Prática 7. Características gerais de fungos e Ecologia	34
Prática 8. Antifungograma	48
PRÁTICAS 9-12 - DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS MICOSES	40
Práticas 9 e 10. Diagnóstico Laboratorial das Micoses Superficiais, cutâneas e subcutâneas	41
Prática 11. Diagnóstico Laboratorial das Micoses Sistêmicas Oportunistas	46
Prática 12. Diagnóstico Laboratorial das Micoses sistêmicas endêmicas	49

NOÇÕES ELEMENTARES DE SEGURANÇA PARA OS LABORATÓRIOS DIDÁTICOS DE MICROBIOLOGIA

APRESENTAÇÃO

Este texto foi preparado pela CIPA (Comissão Interna de Prevenção de Acidentes) e alguns docentes dos cursos introdutórios de laboratório do Instituto de Química e adaptado para o Instituto de Ciências Biomédicas. Seu objetivo é prevenir a ocorrência de acidentes durante a realização de experimentos e esse objetivo somente será alcançado com sua colaboração.

Quando estamos no ICB, estamos expostos às mais variadas situações de risco, devido à própria natureza da atividade que se desenvolve aqui: diferentes micro-organismos com diferentes graus de periculosidade à saúde humana, substâncias corrosivas e tóxicas, materiais radioativos. O primeiro passo para se evitar um acidente é saber reconhecer as situações que podem desencadeá-lo. Em seguida, é preciso conhecer e aplicar uma série de regras básicas de proteção individual e coletiva. Nas páginas seguintes você encontrará um grande número dessas recomendações; segui-las não somente contribuirá para seu bem-estar pessoal como, também, para sua formação profissional.

NORMAS DE SEGURANÇA

Segurança é assunto de máxima importância e especial atenção deve ser dada às medidas de segurança pessoal e coletiva em laboratório. Embora não seja possível enumerar aqui todas as normas de segurança em laboratório, existem certos cuidados básicos, decorrentes do uso de bom senso e de conhecimento científico, que devem ser observados. As normas foram divididas em cinco grupos: as que se referem à parte física do laboratório, às atitudes que o laboratorista deve ter, a seu trabalho no laboratório, à limpeza do laboratório e do material e aos procedimentos em caso de acidente.

O laboratório

1. Conheça a localização da saída de emergência, do chuveiro de emergência, do lava-olhos, dos extintores de incêndio, dos registros de gás de cada bancada e das chaves gerais (elétricas). Saiba usar estes dispositivos.
2. Mantenha as janelas abertas para ventilar o laboratório.
3. Verifique se os cilindros de gás sob pressão estão presos com correntes ou cintas.
4. Ao se retirar do laboratório, verifique se não há torneiras (água ou gás) abertas. Desligue todos os aparelhos.

As atitudes

5. É expressamente proibido que os alunos subtraiam qualquer material biológico e químico (especialmente solventes), vidraria ou equipamento (micropipetas, eletrodos, balanças, etc.) dos laboratórios didáticos. Estes materiais podem ser utilizados somente para a

execução de experiências em aulas práticas e os infratores desta norma estarão sujeitos às sanções disciplinares e legais previstas no regimento interno da USP.

6. Use *avental* devidamente fechado e de manga comprida.

7. Não use sandálias ou chinelos, que não protegem de respingos e de queda de objetos. Use somente *sapatos fechados*, de preferência de couro.

8. *Prenda seu cabelo* se for comprido. Pode pegar fogo.

9. Não fume, não coma e não tome nada no laboratório. Isto pode contaminar reagentes, comprometer aparelhos e provocar intoxicação.

10. Não coloque bolsas, malhas, livros, etc. sobre a bancada, mas apenas o caderno de anotações, caneta e calculadora.

11. Não brinque no laboratório. Esteja sempre atento ao experimento que está sendo realizado.

13. Não trabalhe sozinho no laboratório. É preciso haver outra pessoa para ajudar em caso de emergência. O trabalho experimental no laboratório pode ser executado somente na presença do *professor* responsável.

14. Não receba colegas no laboratório. Atenda-os no corredor. Apenas alunos da disciplina podem adentrar ao laboratório.

15. Siga rigorosamente as instruções fornecidas pelo professor.

16. Consulte o professor antes de fazer qualquer modificação no andamento da experiência e na quantidade de reagentes a serem usados.

17. Caso esteja usando um aparelho pela primeira vez, leia sempre o manual antes e consulte o professor.

18. Nunca teste um produto químico ou material biológico pelo sabor (por mais apetitoso que ele possa parecer).

19. Não teste um produto químico ou material biológico pelo odor.

O trabalho

20. Para pipetar, use seringa, pêra de borracha ou pipetador para aspirar o líquido. Nunca aspire líquidos com a boca.

21. Evite contato de qualquer substância com a pele.

22. Encare todos os produtos químicos e microbiológicos como potencialmente nocivos à saúde, enquanto não verificar sua inocuidade, consultando a literatura especializada.

23. Conheça as propriedades físicas, químicas e toxicológicas das substâncias assim como o nível de periculosidade dos micro-organismos com que vai lidar, bem como métodos de descarte dos resíduos gerados. Consulte a bibliografia.
24. Antes de usar qualquer reagente, leia cuidadosamente o rótulo do frasco para ter certeza de que aquele é o reagente desejado.
25. Conserve os rótulos dos frascos, pois contêm informação importante.
26. Não aqueça líquidos inflamáveis em chama direta.
27. Nunca deixe frascos contendo solventes inflamáveis (por exemplo: acetona, álcool, éter) próximo a uma chama.
28. Nunca deixe frascos contendo solventes inflamáveis expostos ao sol.
29. Não armazene substâncias oxidantes próximo a líquidos voláteis e inflamáveis.
30. Abra frascos o mais longe possível do rosto e evite aspirar ar naquele exato momento.
31. Nunca torne a colocar no frasco uma droga retirada em excesso e não usada. Ela pode ter sido contaminada.
32. Nunca aqueça o tubo de ensaio, apontando sua extremidade aberta para um colega ou para si mesmo.
33. Cuidado ao aquecer vidro em chama: o vidro quente tem exatamente a mesma aparência do frio.
34. **Não deixe bicos de Bunsen acesos à toa.**
35. Dedique especial atenção a qualquer operação que necessite aquecimento prolongado ou que libere grande quantidade de energia.
36. Use luva térmica para tirar material quente da estufa.
37. Use luva de pano ou simplesmente um pano para proteger a mão ao inserir um tubo de vidro ou um termômetro numa rolha.

A limpeza

38. Água ou outros produtos derramados e **não** contaminados no chão podem tornar o piso escorregadio. Providencie imediatamente a limpeza.
39. A bancada de trabalho deve ser mantida limpa e seca para evitar que se entre inadvertidamente em contato com uma substância tóxica, corrosiva ou biologicamente perigosa.
40. Não jogue papéis ou outros sólidos nas pias. Provocam entupimentos.

41. Não jogue cultura de micro-organismos, solventes ou reagentes nas pias. Eles contaminam/poluem o ambiente e solventes inflamáveis na tubulação de esgoto podem levar a sérias explosões. Despeje solventes em frascos apropriados. Em caso de dúvida, consulte o professor sobre o método adequado de descarte.

42. Não jogue vidro quebrado ou lixo de qualquer espécie nas caixas de areia.

43. Ao se retirar do laboratório, lave sempre as mãos.

Os acidentes

44. Em caso de acidente, procure imediatamente o professor, mesmo que não haja danos pessoais ou materiais.

45. Todo acidente, por menor que pareça, e qualquer contacto com reagentes químicos ou microbiológicos devem ser comunicado ao professor.

46. Caindo produto químico ou microbiológico nos olhos, na boca ou na pele, lave **abundantemente** com água a parte atingida. A seguir, avise o professor e procure o tratamento específico para cada caso.

47. Vidros quebrados devem ser descartados, depois de **limpos**, em depósitos para lixo de vidro. Nunca jogue vidros quebrados no lixo comum, onde podem causar cortes no pessoal de limpeza.

48. Em caso de derramamento de mercúrio, chame imediatamente o professor ou o técnico. Vapores de mercúrio são muito tóxicos.

DECLARAÇÃO

DECLARO, QUE LI ATENTAMENTE O DOCUMENTO ***“NOÇÕES ELEMENTARES DE SEGURANÇA PARA OS LABORATÓRIOS DIDÁTICOS DE MICROBIOLOGIA DA DISCIPLINA BMM0160 - ICB-USP”***.

COMPROMETO-ME A SEGUIR, INCONDICIONALMENTE, AS RECOMENDAÇÕES DO DOCUMENTO ACIMA E APRESENTAR-ME PARA QUALQUER ATIVIDADE DENTRO DOS RECINTOS LABORATORIAIS DESTE INSTITUTO, OBSERVANDO RIGOROSAMENTE TODOS OS ITENS DO DOCUMENTO ACIMA.

EM CASO DA NÃO OBSERVÂNCIA DOS ITENS **06, 07, 08 e 13** DO REFERIDO DOCUMENTO, ENTENDO QUE NÃO PODEREI PERMANECER NO RECINTO DOS EXPERIMENTOS.

NOME LEGÍVEL: _____

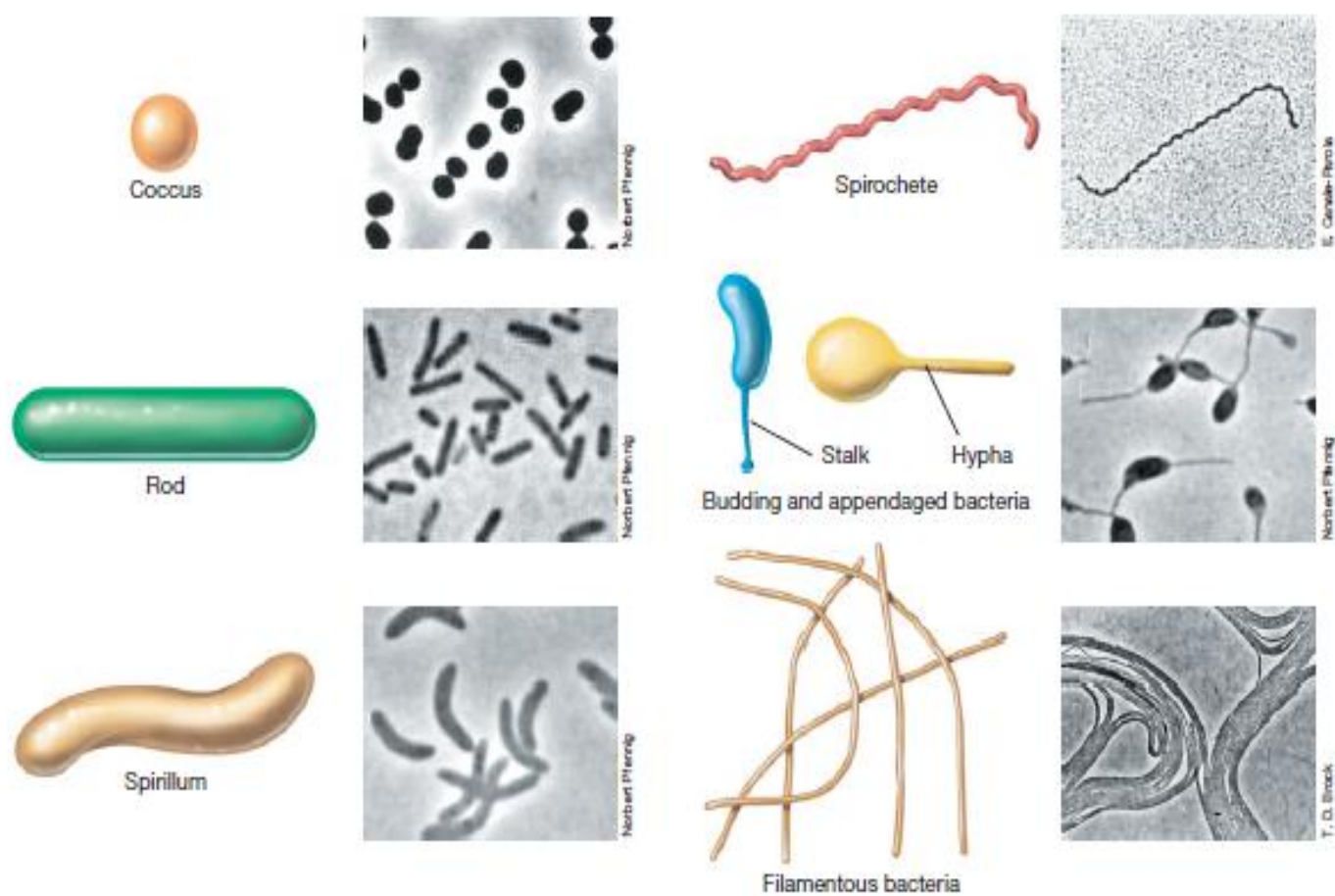
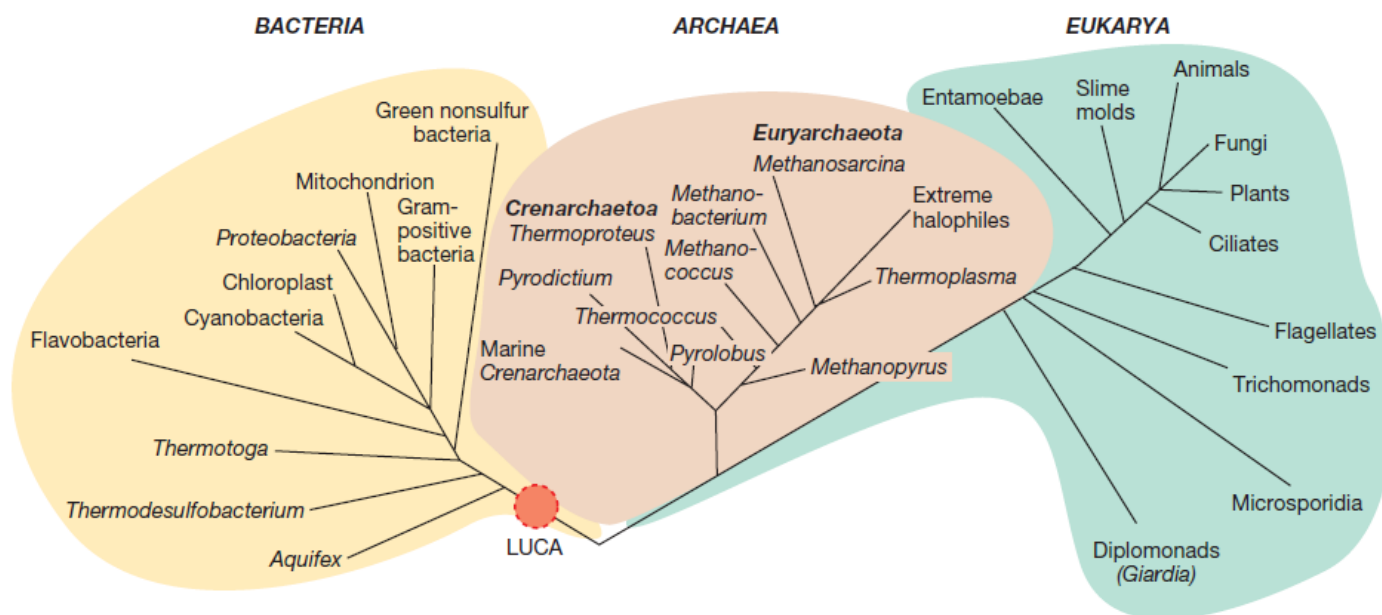
CÓDIGO USP: _____

E-MAIL: _____

São Paulo, ____ de _____ de _____.

ASSINATURA

Aulas Práticas do Módulo II - Microbiologia



Prática 1. Coloração de Gram

1. Princípio

A coloração de Gram foi desenvolvida em 1884, por Hans Christian Gram. É um dos procedimentos de coloração mais utilizados dividindo as bactérias em dois grandes grupos: as bactérias Gram positivas, ou Gram (+), e as bactérias Gram negativas, ou Gram (-). Nesse procedimento, o esfregaço fixado pelo calor é coberto por um corante básico violeta, geralmente, o cristal violeta. O corante confere cor violeta a todas as células e é denominado corante primário. Após um curto período de tempo, o corante violeta é removido e o esfregaço coberto com lugol ($I_2 + KI$), um mordente que fixa o corante aos componentes celulares. Quando o mordente é lavado os dois tipos de bactérias, Gram (+) e Gram (-), aparecem com uma cor violeta escura ou roxa. Em seguida, a lâmina é lavada com etanol ou com solução etanol-acetona. Esta solução, chamada de solução de descoloração, remove a cor violeta de algumas espécies de bactéria, mas não de outras. Após a remoção do excesso do álcool, a lâmina é recoberta com um segundo corante básico (fucsina com cor rósea). O esfregaço é lavado novamente e, depois de retirado o excesso de água com um papel de filtro, observado ao microscópio.

Na primeira coloração, todas as células coram-se em violeta ou roxo. As bactérias que retêm a cor violeta após o tratamento com álcool são classificadas como Gram (+) e as bactérias que perdem a coloração violeta são classificadas como Gram (-). Como essas últimas perdem a coloração violeta com o tratamento com álcool, elas não poderão ser facilmente observadas. Por isso a fucsina (um corante básico) é aplicada ao esfregaço, corando essas bactérias com coloração rósea. Surge daí o nome de contra-corante para o segundo corante (fucsina).

Como as bactérias Gram + retêm a cor violeta, elas não são afetadas pela coloração rósea da fucsina. Diferenças estruturais na parede celular das bactérias Gram (+) e Gram (-) afetam a retenção ou a liberação do complexo cristal Violeta-mordente. Entre essas diferenças destaca-se a espessa camada de peptídeglicanano, parede celular das bactérias Gram (+). Ao contrário, a parede das bactérias Gram (-) mostra-se delgada e inclui a membrana externa rica em lipopolissacarídeos(LPS), não encontrado na parede das bactérias Gram (+).

Soluções:

- Violeta de Genciana: Cristal violeta (1 g), Ácido Fênico (2g), Álcool Absoluto (10 ml) e Água Destilada (100 ml).
- Lugol: Iodo (1 g), Iodeto de Potássio (2 g) e Água destilada (300 ml).
- Álcool-acetona: Álcool etílico (800 ml) e acetona (200 ml)
- Fucsina Diluída: Fucsina (0,25 g em 10 ml álcool etílico) e Água destilada (90 ml).

Cada grupo receberá uma amostra de bactérias (tubo A) que será usada em diferentes experimentos e deverá ser caracterizada por cada grupo. Esta amostra é diferente para cada grupo, desta forma resultados diferentes são esperados entre os diferentes grupos.

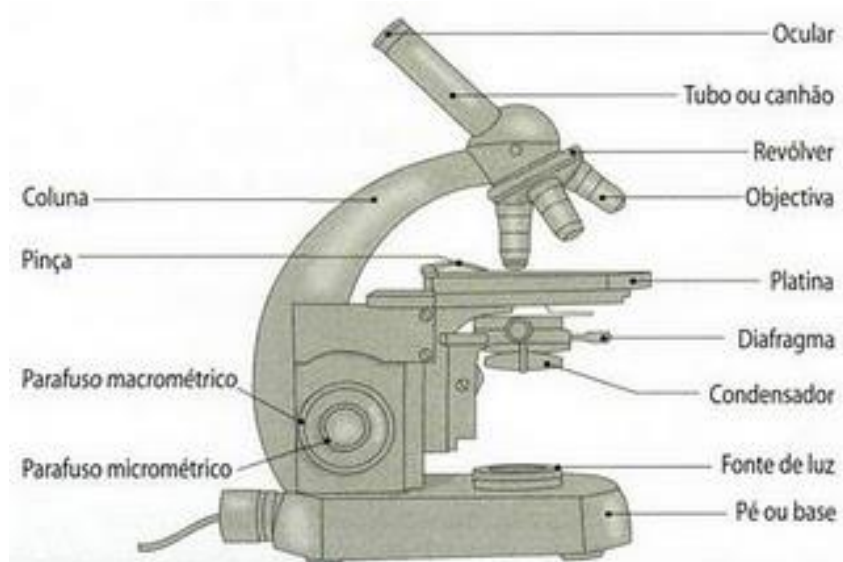
Prática

- a. Esterilizar a alça de platina na parte mais quente da chama do bico de Bunsen (limite da chama azul) até incandescer, formando um ângulo de 45^oC.
- b. **Preparo do esfregaço de culturas de bactérias:** Colocar uma gota (ou colônia) de cada **amostra A** sobre uma lâmina de vidro, misturar gentilmente com o auxílio da alça (um micro-organismo para cada lâmina). Esperar secar o esfregaço. Fixar o esfregaço pelo calor flambando rapidamente a lâmina. Esperar esfriar a lâmina para não ocorrer a cristalização do corante.
- c. **Técnica da coloração de Gram:**
 1. Colocar o corante Violeta de Genciana sobre o esfregaço e deixar em repouso por **1 minuto**.
 2. Escorrer o corante da lâmina. **Não lavar a lâmina com água.** Adicionar a solução de lugol em quantidade suficiente para cobrir todo o esfregaço. Esperar por um minuto.
 3. Escorrer o lugol da lâmina e em seguida lavar com água.
 4. Descorar o esfregaço gota a gota com álcool-acetona por **15 segundos**. **Não** gotejar diretamente sobre o esfregaço.
 5. Corar o esfregaço com fucsina diluída e esperar por **1 minuto**.
 6. Lavar a lâmina com água corrente e secar com papel de filtro. **Não** esfregar a lâmina com o papel.
- d. Visualizar o material utilizando o microscópio ótico (**Ler: “Como utilizar o microscópio ótico”, a seguir**).
- e. Observe e anote a coloração e morfologia das bactérias.
- f. Agora repita o procedimento com as amostras de bactérias conhecidas: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*.

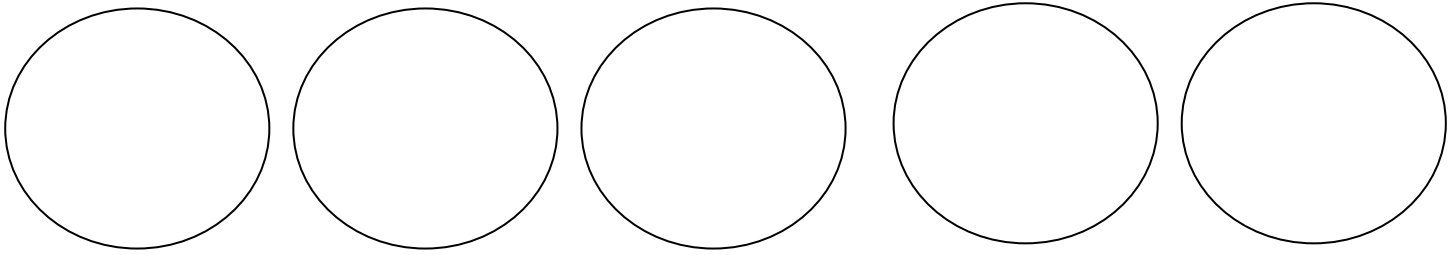
Como utilizar o microscópio ótico

Primeiro conhecer o microscópio (Ver Figura).

- descer a platina e colocar na objetiva de menor aumento, caso não esteja.
- colocar a lâmina sobre a platina. Aproximar a lâmina da lente objetiva de 10X com o auxílio do macrométrico até focalizar a imagem. Tome cuidado para que a objetiva não toque a lâmina.
- Após a focagem na objetiva de menor aumento, **girar o revólver** para a próxima objetiva (40X). Ao mudar de objetiva, ajuste novamente a focagem, utilizando o micrométrico.
- Definido o campo, colocar uma gota de óleo de imersão sobre o esfregaço e observar ao microscópio com a lente objetiva de imersão (100X).
- Usar óleo de imersão **somente** na objetiva de 100X. Após a utilização limpar a objetiva com papel macio.



Observação e anotação dos resultados



Amostra A

E. coli

Bacillus sp

Staphylococcus sp

Streptococcus sp

Descrição dos resultados:

QUESTÕES PARA O RELATÓRIO

1. Descreva a estrutura e composição da parede celular das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.
2. Explique o fundamento da técnica da coloração de Gram. Qual a etapa crucial na execução da coloração de Gram.
3. Desenhe e Descreva cada tipo de bactéria visualizada na aula prática.
4. Durante a aula prática você teve oportunidade de utilizar microscópios óticos convencionais (microscopia de luz) para observar a forma e a reação frente a um procedimento de coloração de diferentes espécies de bactérias. Que outras técnicas de microscopia são empregadas no estudo de bactérias? Cite pelo menos duas técnicas e comente sobre o princípio de ação de cada uma delas.
5. De dois exemplos de bactérias que a coloração de Gram não funciona e diga como é feito para fazer sua coloração.

Prática 2. Presença de micro-organismos no ambiente, semeadura e cultura pura

Esta prática é composta por 3 atividades: 1- Coleta de micro-organismos do ambiente; 2- Método da estria em placa ou esgotamento e; 3- Método do Espalhamento com alça de Drigalsky.

Atividade 1 - Coleta de microrganismos do ambiente

Para a detecção de microrganismos presentes no meio ambiente, será distribuída para cada grupo 1 placa de Petri contendo meio de cultura rico, solidificado pela adição de ágar (TSA), previamente esterilizado, e também 1 placa do mesmo meio adicionado com antibiótico (ampicilina), e 1 placa do mesmo meio adicionado com antifúngico (anfotericina B). **As 3 placas estão divididas em 3 áreas: A (amostra a ser identificada), B e C. As amostras B e C deverão ser semeadas de locais distintos utilizando swab umidificado em solução salina, à escolha do aluno (Ex: maçaneta da porta, sola de sapato, notas de dinheiro, etc).**

A mesma amostra deverá ser semeada no mesmo quadrante nas 3 placas (TSA, TSA+Amp, TSA+Anf). Alguns grupos poderão deixar as placas abertas durante a aula, para que se depositem microrganismos em suspensão no ar. Ao final da aula, as placas serão incubadas a 30°C até a próxima aula, para permitir o crescimento dos possíveis microrganismos, o que irá originar colônias visíveis a olho nú.

Atividade 2 e 3 - Semeadura de cultura bacteriana (amostra A e de *E. coli*)

Normas: Toda vez que se fizer uma semeadura os seguintes procedimentos deverão ser observados:

- A. As alças de vidro (Drigalsky) e de platina deverão ser flambadas antes e depois de qualquer operação de semeadura. A alça de Drigalsky deverá ser esterilizada mergulhando a mesma em uma placa de Petri ou Becker com álcool e, em seguida, levada rapidamente à chama do bico de Bunsen por tempo suficiente para iniciar a combustão do álcool. **Cuidado! Não manter a alça sobre o fogo para que não se quebre.**
- B. A alça de platina, por sua vez, deverá permanecer na chama do bico de Bunsen, formando um ângulo de 45°C, até incandescer.
- C. A alça de platina deverá ser esfriada na parede interna do tubo ou, se for o caso, no meio da placa de Petri ainda não inoculada. A alça de Drigalsky deve ser esfriada na face interna da tampa da placa de Petri antes de entrar em contato com a amostra.
- D. Toda a vez que se fizer uma semeadura em tubos de ensaio, deve-se flambar a boca dos mesmos, imediatamente após a retirada das tampas ou do algodão. A tampa deverá ser retirada com o dedo mínimo da mão que estiver segurando a alça de platina ou a pipeta. Após a retirada da amostra com as células, flambar novamente a boca do tubo, antes de recolocar a tampa.
- E. Não esquecer de identificar as culturas com o número do grupo de trabalho, seja no fundo da placa ou nas paredes dos tubos. Não marcar as tampas, pois elas podem ser trocadas acidentalmente, o que dificultará a posterior identificação do material.
- F. As placas de Petri e os tubos de ensaio deverão ser abertos e semeados próximo ao bico de Bunsen, para evitar contaminações com microrganismos presentes no ar. Em seguida, colocar o material na estufa a 37°C com a parte semeada voltada para

baixo (no caso de placas), para evitar que a água que irá se condensar na tampa caia sobre as colônias.

Princípio

Estudos envolvendo a análise de materiais, como alimentos, leite, água e em alguns casos o ar, requerem o conhecimento da quantidade de microrganismos presentes nesses materiais. Diferentes métodos foram desenvolvidos para a quantificação de bactérias, como a contagem direta das bactérias em microscópio ou contadores eletrônicos. Outras abordagens incluem medição da massa celular; medida da turbidimetria da cultura e método da diluição seriada de uma cultura celular, seguida de semeadura em meio sólido (contagem de células viáveis ou unidades formadoras de colônias - U.F.C.).

Técnica de Isolamento de Culturas Puras

Na natureza, as populações microbianas não são homogêneas, porém contêm misturas de várias espécies de bactérias e demais microrganismos. No laboratório, tais culturas mistas podem ser separadas em culturas puras. Estas últimas, contendo um só tipo de bactéria, são indispensáveis para a identificação e o estudo das propriedades morfológicas, genéticas e bioquímicas da espécie estudada. No presente experimento, utilizaremos uma técnica com a finalidade de produzir colônias individuais. Estas colônias, visíveis macroscopicamente, são massas de bactérias, que resultaram da multiplicação de uma única bactéria depositada na superfície do meio sólido no momento da semeadura. Uma vez que as colônias foram individualizadas e identificadas, elas podem ser transferidas assepticamente para outra placa com meio sólido e assim, obtermos uma colônia ou uma cultura pura. Nesta aula, serão empregados dois métodos de isolamento de bactérias.

Atividade 2 - Método da estria em placa ou esgotamento

O método da estria é rápido, porém apenas qualitativo, uma vez que não permite a quantificação do número de bactérias presente na cultura em análise. Trata-se de um método de diluição que envolve o espalhamento por meio de estrias, a partir de um inóculo da cultura numa placa contendo meio de cultura sólido.

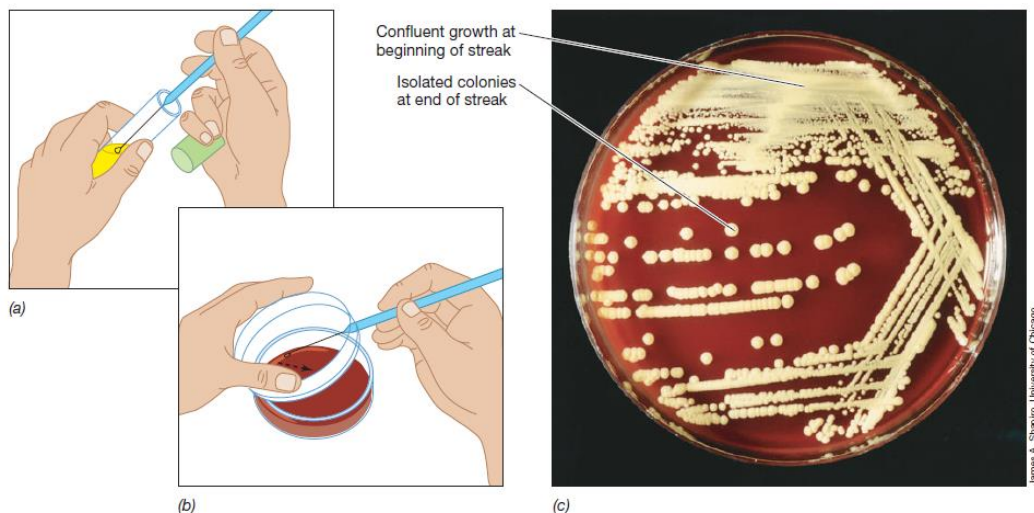
Material:

Placa contendo meio LB ou YT
Cultura de bactéria crescida por uma noite a 37°C
Alça de platina
Bico de Bunsen

Procedimento:

Mergulhar a alça de platina, depois de devidamente flambada e resfriada, no meio de cultura com as bactérias. Note-se que dentro da alça fica uma leve camada de líquido (contendo bactérias). Levar esta alça até a placa de Petri contendo o meio de cultura e fazer uma estria da amostra bem junto à borda da placa. Fazer um pequeno traço na parte superior da placa. **Flambar a alça e esfriá-la**, para iniciar uma nova estria a partir do canto da primeira estria. **Flambar novamente a alça**, esfriá-la e ir fazendo esgotamentos sucessivos até o centro da placa. Incubar as placas a 37°C por 24 h, para poder observar as colônias isoladas.

A seguir tem uma figura que ilustra de forma simplificada o processo de estria em placa para obtenção de colônias isoladas (imagem tirada do livro Microbiologia de Brock).



Atividade 3. Método do Espalhamento com alça de Drigalsky (apenas a amostra de *E. coli*).

Este método requer uma diluição da cultura antes da semeadura na placa, para que se possam obter colônias isoladas. Este método é utilizado quando se deseja determinar o número de **células viáveis** (vivas) em uma suspensão de bactérias. O procedimento envolve duas etapas importantes:

1. A diluição seriada da cultura de bactérias em condições de esterilidade.
2. A semeadura de amostras das suspensões diluídas em placas de Petri contendo meio de cultura sólido.

Material:

Placas de Petri contendo cerca de 20 mL de meio de cultura (LB ou YT) sólido

Tubo falcon de 15mL contendo 10,0 mL de solução salina como diluente

Pipetas

Placas de Petri contendo álcool

Alça de Drigalsky

Suspensão de Bactérias: Cultura líquida de *Escherichia coli* com 12-24 horas de crescimento em estufa a 37°C com agitação.

Procedimento:

Dicas:

- **Homogeneizar** por agitação o tubo de cultura recebido até que se obtenha uma suspensão homogênea das bactérias. Este processo deve ser repetido toda vez que se for retirar uma amostra dos tubos, diluída ou não.
- As amostras deverão ser retiradas dos tubos de ensaio com o auxílio de pipetas estéreis.

Diluição seriada - procedimento:

- Numerar os 6 eppendorfs de 1,5 mL e pipetar 900 µL de solução salina em cada um.
- Retirar, com o auxílio de uma pipeta, uma amostra de 100 µL da cultura bacteriana não diluída e transferi-la para o **eppendorf 1**, contendo 900 µL de solução salina (diluição de 10^{-1}). Homogeneizar bem.
- Retirar uma amostra de 100 µL do eppendorf 1 e transferi-la para o **eppendorf 2**, de modo a obter uma diluição de 10^{-2} . Homogeneizar bem.
- Retirar uma amostra de 100 µL do eppendorf 2 e transferi-la para o **eppendorf 3**, de modo a obter uma diluição de 10^{-3} . Homogeneizar bem.
- Retirar uma amostra de 100 µL do eppendorf 3 e transferi-la para o **eppendorf 4**, de modo a obter uma diluição de 10^{-4} . Homogeneizar bem.
- Retirar uma amostra de 100 µL do eppendorf 4 e transferi-la para o **eppendorf 5**, de modo a obter uma diluição de 10^{-5} . Homogeneizar bem.
- Retirar uma amostra de 100 µL do eppendorf 5 e transferi-la para o **eppendorf 6**, de modo a obter uma diluição de 10^{-6} . Homogeneizar bem.
- **Semear 100 µL das diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} no centro das placas de Petri contendo o meio sólido, previamente marcadas com caneta de retroprojeto.**
- Com o auxílio da alça de Drigalsky, previamente mergulhada em álcool, flambada e resfriada, espalhar a gota uniformemente na superfície da placa.
- Incubar as placas a 37°C por 24 h.
- Na próxima aula, serão contadas as colônias crescidas nas diferentes placas, para quantificar o número de células viáveis presentes na cultura original.
- Consultar métodos de cálculo populacional para determinar o número de células na amostra original.

Perguntas a serem respondidas pelo grupo:

1. Que vantagens os meios de cultura sólidos apresentam para o estudo dos microrganismos?
2. Nesta aula, empregamos apenas meio de cultura rico ou complexo. Existem outros tipos de meios de cultura para crescer bactérias?
3. No 1º experimento da aula, qual foi a finalidade da adição de ampicilina e de anfotericina B às placas contendo o meio de cultura? Poderiam ter sido empregadas outras drogas ao meio de cultura? Estes meios de cultura são classificados de que forma?
4. Qual a diferença entre as técnicas de contagem de células por espectrofotômetro e pelo método de plaquemaneto em placas?
5. Todos os microrganismos coletados do meio ambiente cresceriam no meio de cultura rico? Explique a sua resposta.

Prática 3. Agentes desinfetantes

Esta prática compõe-se por 3 atividades, Atividade antibacteriana de desinfetantes químicos, antissepsia das mãos e atividade bactericida do calor (fervura).

1 - Atividade antibacteriana de desinfetantes químicos.

Material recebido:

Tubo 1 com a amostra A (em caldo);

Tubo 2 com amostra de *E. coli*; e

Tubo 3 com amostra de *B. subtilis*.

Placa de Agar Nutriente dividida em 3 partes;

2 séries de 3 tubos: A e B (com desinfetante) e tubo C (Solução fisiológica/SF – controle).

Procedimento :

-Transferir 0,25 mL de cultura para cada tubo contendo 0,25 mL de um dos desinfetantes testados ou solução fisiológica (tubos A-B-C)

-Homogeneizar os tubos e aguardar 10 minutos.

-Transferir uma alçada de cada tubo para respectiva área da placa de Petri.

-Repetir o procedimento anterior com *Bacillus subtilis* e com *E. coli*.

-Identificar as placas semeadas.

Resultados:

Indicar a presença ou ausência de crescimento

	A	B	C
<i>Escherichia coli</i>			
<i>Bacillus subtilis</i>			
Amostra A			

Desinfetante A e B

C - controle (Solução Fisiológica)

2 - Antissepsia das mãos

Procedimento:

2.1. Dividir o fundo da placa de Petri contendo meio de cultura em 3 partes iguais.

2.2. Com auxílio de um cotonete, previamente esterilizado e umedecido em solução salina esterilizada, esfregar sobre a pele da palma da mão. A seguir, semear 1/3 da placa com o cotonete e identificar “mãos sem lavar”.

2.3. Lavar as mãos álcool em gel que você tenha, com auxílio de outro cotonete, previamente esterilizado e umedecido em solução salina esterilizada, esfregar sobre a pele da palma da mão. Semear 1/3 da placa com o cotonete e identificar “álcool em gel”.

2.4. Outro membro do seu grupo deve lavar as mãos com detergente e depois aplicar álcool iodado a 2%, durante 1 minuto, nas palmas das mãos pré-lavadas. A seguir, com auxílio de outro cotonete, previamente esterilizado e umedecido em solução salina esterilizada, esfregar sobre a pele da palma da mão. Semear 1/3 da placa com o cotonete e identificar “antissepsia”.

2.5. As placas serão incubadas a 37°C por 24 horas, após este período comparar o crescimento de colônias nas 3 partes da placa.

3 - Atividade bactericida do calor (fervura)

Material fornecido:

Tubo - 1: Amostra A

Tubo - 2: caldo com *Escherichia coli*;

Tubo - 3: caldo com *Bacillus subtilis*;

2 placas estéreis com Agar Nutriente divididas em 4 partes.

Procedimento:

-Semear com alça bacteriológica amostra de cada caldo nos respectivos quadrantes de cada placa (**controles - tempo 0**).

-Submeter à fervura os 2 tubos por 30 minutos.

-Retirar amostras dos respectivos caldos com alça durante a fervura aos 5, 10 e 30 minutos.

-Semear com alça cada amostragem dos respectivos tubos, nos respectivos quadrantes restantes, identificar as placas e incubar.

Resultados:

tempo / minutos	0	5	10	30
<i>Escherichia coli</i>				
<i>Bacillus subtilis</i>				

Perguntas a serem respondidas pelo grupo

1 – Como explicar as diferenças de comportamento entre as duas espécies de bactérias testadas?

2 – Diferencie desinfecção e esterilização?

3 – Pesquise sobre as práticas de esterilização e/ou desinfecção empregadas na indústria farmacêutica e em hospitais e faça uma argumentação sobre o tema.

4- Em que condições a sanitização, desinfecção e esterilização são necessárias?

Prática 4. Conjugação

Objetivo: Demonstrar a transferência genética da resistência bacteriana à tetraciclina por meio da conjugação entre uma bactéria doadora (linhagem de *Salmonella typhimurium* MG031 Lac⁻ TET^r) e uma bactéria receptora (linhagem de *Escherichia coli* K12 Lac⁺ NAL^r). O aluno terá a oportunidade de conferir a importância da resistência aos antibióticos e sua disseminação entre bactérias de relevância clínica.

Material Fornecido para cada grupo:

- 1) Três tubos com meio LB com culturas de *E. coli* (tubo A), *S. typhimurium* (tubo B) e cultura conjunta *E. coli* com *S. typhimurium* (tubo C) cultivadas por uma noite a 37 °C;
- 2) Quatro placas de ágar Mac ConKey, divididas em três setores, sendo uma sem adição de antibióticos, uma com tetraciclina, uma com ácido nalidíxico e uma com ambos os antibióticos.
- 3) Alça de platina.

Procedimento:

- 1) Marcar no fundo de uma placa com ágar MacConkey sem antibiótico três setores (A, B e C) e semear pela técnica do esgotamento com alça de platina as culturas de *E. coli* (tubo A) no setor A e *S. typhimurium* (tubo B) no setor B.
- 2) Proceder da mesma forma com uma placa de ágar MacConkey com tetraciclina (TET) na concentração final de 20µg/ml, com ácido nalidíxico (20µg/ml), e com tetraciclina e ácido nalidíxico (ambos na concentração de 20µg/ml).
- 3) O tubo C contém a mistura de conjugação onde foram inoculadas a cultura de *E. coli* e a cultura de *S. typhimurium*. Esta cultura foi incubada a 37°C por 24 horas. Com o auxílio da alça de platina, inocular por esgotamento o setor C de cada uma das placas com ágar MacConkey preparadas.
- 4) Marque as placas com a turma e o grupo responsável, leve as placas semeadas a 37°C e incube por 24 h.

Análise dos resultados:

- 1) Verificar o crescimento de colônias, vermelhas ou brancas, nas placas de agar MacConkey sem antibiótico, com tetraciclina, com ácido nalidíxico ou com ambos os antibióticos.
- 2) Registrar os resultados observados na tabela como indicado:

	Propriedades de crescimento (R/S e Lac ⁺ /Lac ⁻)		
Meio seletivo	Cultura A	Cultura B	Cultura C
MacConkey sem antibiótico			
MacConkey com tetraciclina			
MacConkey com ác. nalidíxico			
MacConkey com tetraciclina e ác. Nalidíxico			

* - crescimento: R -presença de colônias; S - ausência de colônias

** - fermentação da lactose: Lac⁺ - colônia vermelha; Lac⁻ - colônia branca.

Perguntas:

- 1) Por quê as duas bactérias utilizadas precisam expressar algum tipo de resistência para que o experimento possa ser feito?
- 2) Qual é a bactéria doadora neste experimento? Por quê?
- 3) Você descartaria a possibilidade de que uma das linhagens tenha sofrido uma mutação espontânea que a torna-se resistente ao segundo antibiótico? Por quê?

Prática 5. Antibiograma

(Teste de sensibilidade dos microrganismos aos agentes antimicrobianos)

Agentes quimioterápicos são agentes químicos utilizados no tratamento de doenças infecciosas. Seus modos de ação implicam na interferência com o metabolismo microbiano causando poucos danos à célula hospedeira.

Antibióticos - São sintetizados e secretados por certas bactérias, actinomicetes e fungos que matam ou inibem o crescimento de outros microrganismos. Atualmente, alguns antibióticos são sintetizados ou modificados em laboratórios, contudo, originam-se dos organismos vivos.

Exemplos:

Ampicilina- Impede a incorporação do ácido murâmico no componente mucocomplexo da parede da célula, inibindo assim, a síntese da parede celular.

Estreptomicina - Tem afinidade pelos ribossomos bacterianos, causando erros de leitura no códon do mRNA, interferindo assim, na síntese proteica.

Cloranfenicol - Tem afinidade pelos ribossomos bacterianos, impedindo a formação da ligação peptídica entre os aminoácidos durante a síntese proteica.

Tetraciclina - Tem afinidade pelos ribossomos bacterianos, impedindo a ligação de hidrogênio entre o anticódon no complexo aminoácido-tRNA e o códon no mRNA durante a síntese proteica.

Agentes ou drogas sintéticas são agentes quimioterápicos sintetizadas em laboratório.

Exemplos:

Sulfadiazina (sulfanamida) - tem o efeito de inibição competitiva. Isto é, o componente ativo da droga, age como um antimetabólico que compete com um metabólito essencial, o ácido p-aminobenzóico (PABA), durante a síntese do ácido fólico na célula bacteriana. O ácido fólico é uma coenzima celular essencial para a síntese de aminoácidos e purinas.

Antibiograma: Método de Difusão em ÁGAR (Método de Kirby-Bauer)

O antibiograma é um teste que permite a verificação “*in vivo*” da sensibilidade de uma bactéria aos antibióticos. Esta sensibilidade é demonstrada pela zona ou halo de inibição de crescimento que se forma em volta do disco de antibiótico. De acordo com o DIÂMETRO do halo de inibição diz-se que a bactéria é sensível ou resistente ao antimicrobiano testado.

Material:

- Cultura bacteriana crescida por 18 horas (10^5 células por mL);
- Placas com meio de cultura Müller-Hinton;
- Discos de antibióticos;
- Cotonetes e pinças esterilizados.

Procedimento:

1. Agitar bem a cultura bacteriana (*Staphylococcus aureus* e Amostra A);
2. Umedecer o cotonete na suspensão bacteriana, retirando o excesso ao apertar o cotonete contra a parede interna do tubo;

3. Espalhar a suspensão bacteriana em toda a superfície do meio de cultura, de modo homogêneo, inclusive nas bordas;
4. Colocar os discos de antibióticos com auxílio da pinça sobre a superfície do meio e de modo equidistante – usar 5 antibióticos por placa;
5. Incubar as placas a 37°C por 18 horas.
6. Utilizando um “Swab” aplicar por toda a superfície da placa de Petri a cultura bacteriana crescida;
7. Aplicar os discos de antibióticos na superfície da placa utilizando a pinça.

Resultados

Leitura e interpretação: Verificar a presença ou ausência de halo de inibição ao redor dos discos. Medir o DIÂMETRO dos halos, vide figura a seguir, e verificar se o microorganismo é resistente ou sensível. A seguir tem uma tabela que mostra alguns halos de inibição de crescimento para alguns antibióticos testados em aula.

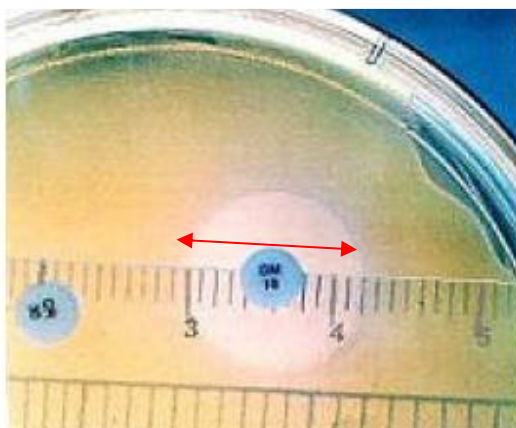


Tabela EuCast para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213
 β -lactamase-producing strain (weak) (NCTC 12973, CIP 103429, DSM 2569, CCUG 15915, CECT 794)

Antibiótico	Conc.	Diâmetro de inibição (mm)	
		Alvo <i>Calculado pelo EUCAST</i>	Faixa <i>Validado pelo EUCAST</i>
Ampicilina	2 ug	18	15 a 21
Cefoxitina	30 ug	27	24 a 30
Cloranfenicol	30 ug	24	20 a 28
Gentomicina	10 ug	22	19 a 25
Tetraciclina	30 ug	27	23 a 31
Tobramicina	10 ug	23	20 a 26

Referência (EUCAST QC Tables v. 8.0, valid from 2018-01-01)

Tabela EuCast para *Staphylococcus* spp.

EUCAST Clinical Breakpoint Tables v. 8.1, valid from 2018-05-15

Antibiótico	Conc.	Diâmetro de inibição (mm)	
		Sensível ≥	Resistente <
Ampicilina	2 ug	18	18
Cefoxitina	30 ug	22	22
Cloranfenicol	30 ug	18	18
Gentomicina	10 ug	22	22
Tetraciclina	30 ug	22	19
Tobramicina	10 ug	22	22

Referência

(http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_8.1_Breakpoint_Tables.pdf)

Perguntas a serem respondidas no relatório

- 1 – Que procedimentos deveriam ser tomados para a determinação da concentração inibitória mínima (MIC) dos antibióticos testados?
- 2 - Que fatores podem interferir no perfil de sensibilidade a antibióticos em uma linhagem bacteriana?
- 3 – A resistência a antibióticos expresso por uma linhagem bacteriana pode ser considerada um fator de virulência? Justifique.
- 4- Quais são os halos para os demais antibióticos (Resistente, Intermediário e Sensível), que não estão descritos na Tabela de Kirbe & Bauer acima.
- 5- Pesquise qual é o painel de antibióticos referenciado pela ANVISA e pela OMS para análise clínica. Compare com o que foi feito.
- 6- Leiam as normas descritas no EuCAST: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/; http://www.eucast.org/guidance_documents/;

Completar de acordo com os resultados obtidos na prática

Bact.	Amp.	Cefatoxina	Cloranfenicol	Gentamicina	Tetraciclina	Tobramicina
Amostra A						
<i>S. aureus</i>						

Prática 6. Identificação de bactérias através de testes bioquímicos

Leitura da Prática dia seguinte ao 18:15 – 18:50 no laboratório A (um participante de cada grupo deve comparecer para tirar a foto do resultado. A leitura e interpretação serão feitos na próxima aula).

Objetivo: Analisar distintas reações bioquímicas e sua utilização como método diagnóstico para enterobactérias

Introdução: Bactérias pertencentes à mesma família, mas gêneros distintos, podem ser eventualmente identificadas baseando-se em características bioquímicas como a capacidade de utilização de diferentes fontes de carbono, expressão de enzimas específicas (urease, deaminases e etc). Testes bioquímicos são uma das bases para a identificação de bactérias patogênicas em laboratórios de análises clínicas, juntamente com outras provas complementares (sorologia, PCR e etc.). Na aula de hoje serão utilizadas provas bioquímicas para a identificação de bactérias da família *Enterobacteriaceae* particularmente para os gêneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Shigella*, *Salmonella* e *Proteus*.

Procedimento

Dia1 - Cada grupo receberá sua amostra A para ser identificada. Em seguida os alunos deverão:

1. Com a alça bacteriológica, tocar em uma colônia e inoculá-la na placa MacConkey (estriar para isolar colônias). Com uma agulha tocar em uma colônia e **perfurar** o meio MILI não encostando no fundo do tubo. Após flambar a alça, repetir o mesmo procedimento para o meio EPM estriando também a amostra na superfície do tubo. Estriar uma colônia na **superfície inclinada** do meio contendo CITRATO.
2. Incubar por 24 h a 37°C

Dia 2- Leitura da série bioquímica dos resultados e identificação dos gêneros bacterianos.

1) Agar MacConkey - Indicador de bactérias fermentadoras de Lactose

Colônias lactose positiva: coloração **vermelha (produz ácido)**

Colônias lactose negativa: incolores (produz amônia)

Princípio: O ágar MacConkey é composto por peptona de caseína, peptona de carne, sais biliares, lactose, cloreto de sódio, vermelho neutro, cristal violeta, ágar bacteriológico e água destilada. Somente bactérias adaptadas à sobrevivência em ambientes com concentrações de sais biliares equivalentes à do ágar MacConkey conseguirão proliferar neste meio de cultura. Para estas, será imposta a condição de lactose como único carboidrato disponível. As bactérias capazes de metabolizar a lactose liberarão ácido no meio de cultura, o que diminuirá o pH e fará com que o indicador vermelho neutro mantenha sua coloração avermelhada, mantendo o meio e as colônias destas bactérias também avermelhadas. No entanto, se as bactérias não forem capazes de utilizar a lactose como fonte primária de energia, os aminoácidos presentes nas peptonas fornecerão energia após serem metabolizados. Neste metabolismo, o produto será amônia, que liberada no meio,

provocará o aumento do pH, fazendo com que o indicador mude a coloração do ágar MacConkey para amarelo e as colônias ficarão incolores.

2) meio EPM

Os testes de produção de CO₂, H₂S e urease são verificados na base. O teste para a enzima L-triptofanodesaminase é observado na superfície do meio

Obs: todas as enterobactérias fermentam glicose

Leitura das Provas

1. **Glicose**

A fermentação da glicose pode ser observada pela presença de bolhas de gás



Prova positiva: base amarela com presença de **bolhas de ar**

Prova negativa: base amarela sem bolhas de ar

2. **H₂S**

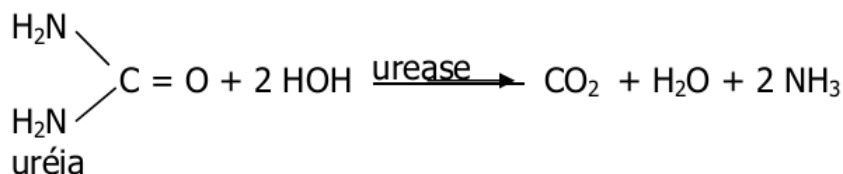
Na₂SO₃ → **H₂S** (reage com Fe dando coloração preta)

Prova positiva: base preta

Prova negativa: base **amarela** ou inalterada

3. **Urease**

Princípio: As bactérias que sintetizam urease convertem a uréia em amônia e gás carbônico.



A amônia alcaliniza o meio, alterando a cor do indicador de pH azul de bromotimol de amarelo para azul.

Prova positiva: base azul

Prova negativa: base **amarela** ou inalterada

4. **Triptofano desaminase**

Princípio: A desaminação oxidativa do L-triptofano catalisada pela L-triptofano desaminase resulta na formação de cetoácido que, em presença de ferro, alcaliniza o meio, alterando a cor do indicador de pH azul de bromotimol na superfície para verde escuro.

Prova positiva: superfície verde escuro

Prova negativa: superfície azulada, amarelada ou inalterada

5. Meio de Mili (Motilidade, Indol e Lisina decarboxilase)

O teste de motilidade e lisina decarboxilase são verificados na base e o teste de indol é feito adicionando-se algumas gotas de reativo de Kovac (dimetilaminobenzaldeído) na superfície do meio.

Leitura das provas

I. **Motilidade**

Prova positiva: meio turvo

Prova negativa: meio límpido ou crescimento só no local do inoculo

II. **Indol**

Princípio: Indol é um componente do aminoácido triptofano. Algumas bactérias conseguem utilizar triptofano como nutriente com a ajuda da enzima triptofanase que catalisa a conversão de triptofano em indol. Quando o triptofano é degradado, a presença de indol pode ser detectada através de sua reação com reagente de Kovac, que é amarelo, dando origem a uma coloração avermelhada na superfície do tubo.

Prova positiva: coloração vermelha

Prova negativa: coloração amarela

III. **L-lisina descarboxilase**

Princípio: A descarboxilação da lisina elimina a parte ácida do aminoácido produzindo aminas alcalinas, que elevam o pH do meio e transformam a cor amarela do indicador de pH (bromocresol) em roxa.

6. Agar Citrato de Simmons

Princípio: Este meio de cultura possui citrato como única fonte de carbono. Bactérias que podem utilizar citrato como fonte de carbono crescem em Agar citrato e provocam alcalinização do meio devido à liberação de CO₂ ao final da reação. O indicador de pH (azul de bromotimol) passa de verde a azul (pH>7.5). Observe que quando não ocorre utilização do citrato, não há crescimento bacteriano, pois citrato é a única fonte de carbono do meio.

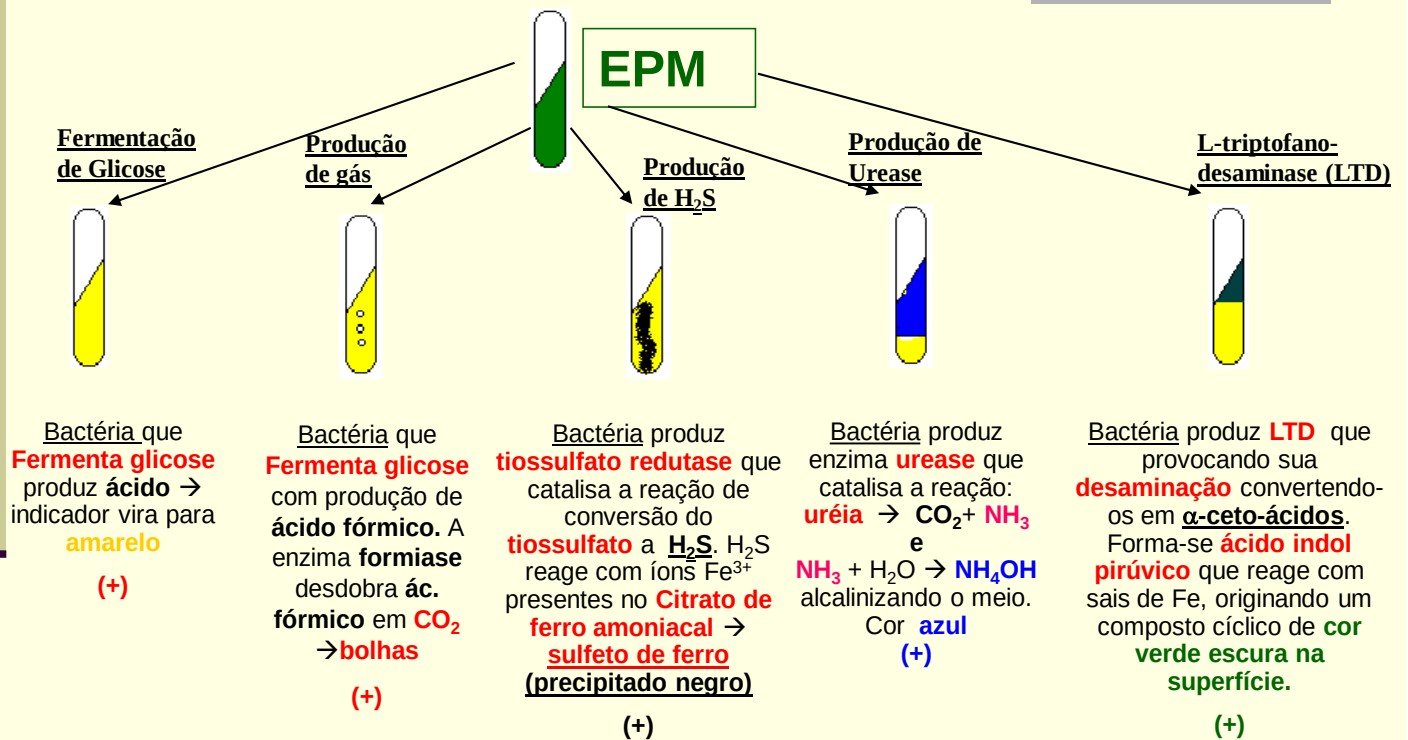
Prova positiva: coloração azul

Prova negativa: coloração do meio inalterada

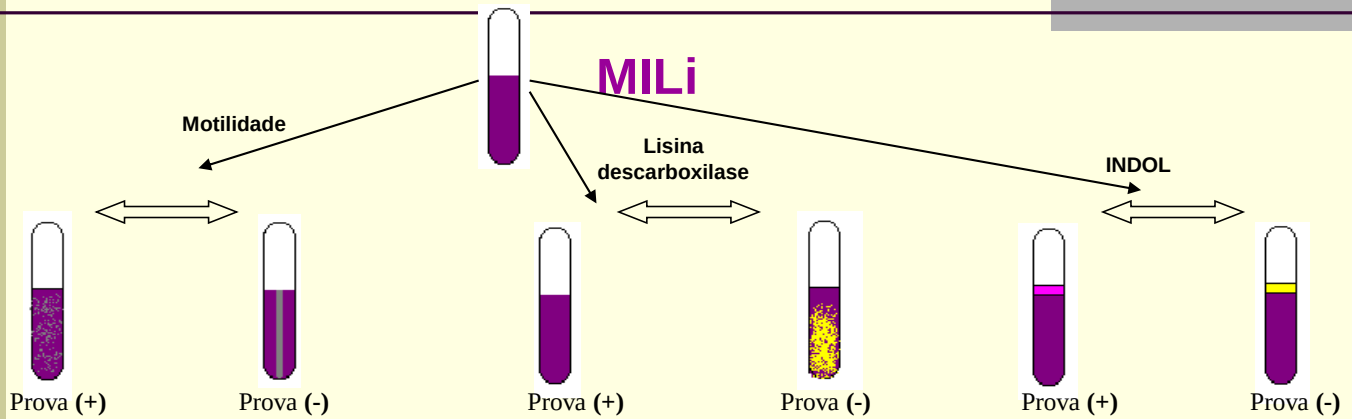
Baseado nas figuras e na tabela a seguir, identifique o gênero da bactéria analisada por seu grupo.

IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA DE ENTEROBACTÉRIAS
Leitura das Provas

Enterobactérias - Provas Bioquímicas EPM



Enterobactérias - Provas Bioquímicas - Mili



Motilidade

Bactérias **móveis** se **difundem** à partir do inóculo inicial **turvando o meio.**

Prova (+)

Bactérias **imóveis** **somente crescem no local** onde foram semeadas.

Prova (-)

Descarboxilases

Bactéria produz a enzima Lisina descarboxilase que promove a **remoção** de **CO₂** dos **a.a.**, produzindo amina que alcaliniza o meio → **cor púrpura.**

Prova (+)

Se bactéria **não** produz esta enzima, a **fermentação da glicose** **provoca** acidificação do meio → **amarelo nos 2/3 inferiores.**

Prova (-)

Produção de INDOL

Bactéria produz a enzima **Triptofanase** que promove a liberação do **anel pirrólico** do a.a. L- triptofano (INDOL).

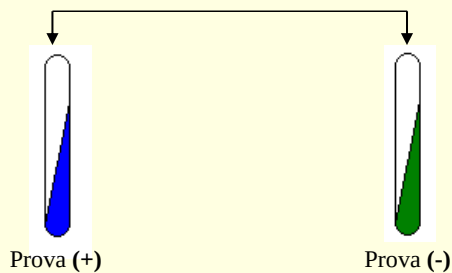
O reativo de Kovacs,

que é adicionado após o cultivo, reage com INDOL → **Anel vermelho.**

Prova (+)

Enterobactérias - Provas Bioquímicas - Citrato de Simmons

Citrato de Simmons



O meio **Citrato de Simmons** contém **Citrato de sódio** como única fonte de Carbono:

Bactéria que são capazes de oxidar **Citrato** produzem CO_2 que se combina com **sódio** e água formando **carbonato de sódio**
→ o meio se torna alcalino → indicador azul de bromotimol vira para
Cor Azul = Prova (+)

Bactérias que não são capazes de utilizar o **Citrato** como única fonte de carbono, não crescem neste meio e o meio permanece **INALTERADO**.
Cor Verde e Ausência de Crescimento = Prova (-)

Tabela: Identificação bioquímica parcial de ENTEROBACTÉRIAS.

Bactérias	EPM					MILI			CITRATO
	Lactose	Glicose produção de gás	H ₂ S	Urease	LTD	Motilidade	Indol	Lisina Descarboxilase	Citrato de Simmons
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	-	-	- / +	+	+	-
<i>Klebsiella</i> spp	+	+	-	+	-	-	-	+	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	-	- / +	-	+	-	- / +	+
<i>Citrobacter freundii</i>	- / +	+	- / +	- / +	-	+	- / +	-	+
<i>Arizona</i>	+	+	+	-	-	+	-	+	+
<i>Shigella</i> SP	-	-	-	-	-	-	- / +	-	-
<i>Edwardsiella tarda</i>	-	+	- / +	-	-	+	+	+	-
<i>Salmonella</i> spp	-	+	+	-	-	+	-	+	+/-
<i>Serratia marcescens</i>	-	+	-	- / +	-	+	-	+	+
<i>Proteus mirabilis</i>	-	+	- / +	+	+	+	- / +	-	- / +
<i>Providencia rettgeri</i>	-	+/-	-	-	+	+	+	-	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	+/-	-	-	+	-	- / +	- / +	-	- / +

Obs.: **LTD**: L-triptofanodesaminase

Pergunta a ser respondida no relatório

1. Os ensaios feitos na aula prática demonstraram alguns princípios empregados na identificação/diagnóstico de bactérias de interesse médico. Pesquise sobre as técnicas empregadas para o diagnóstico de bactérias em laboratórios de análise clínica e as compare com o que foi feito em sala de aula.

Aulas Práticas do Módulo III: Micologia

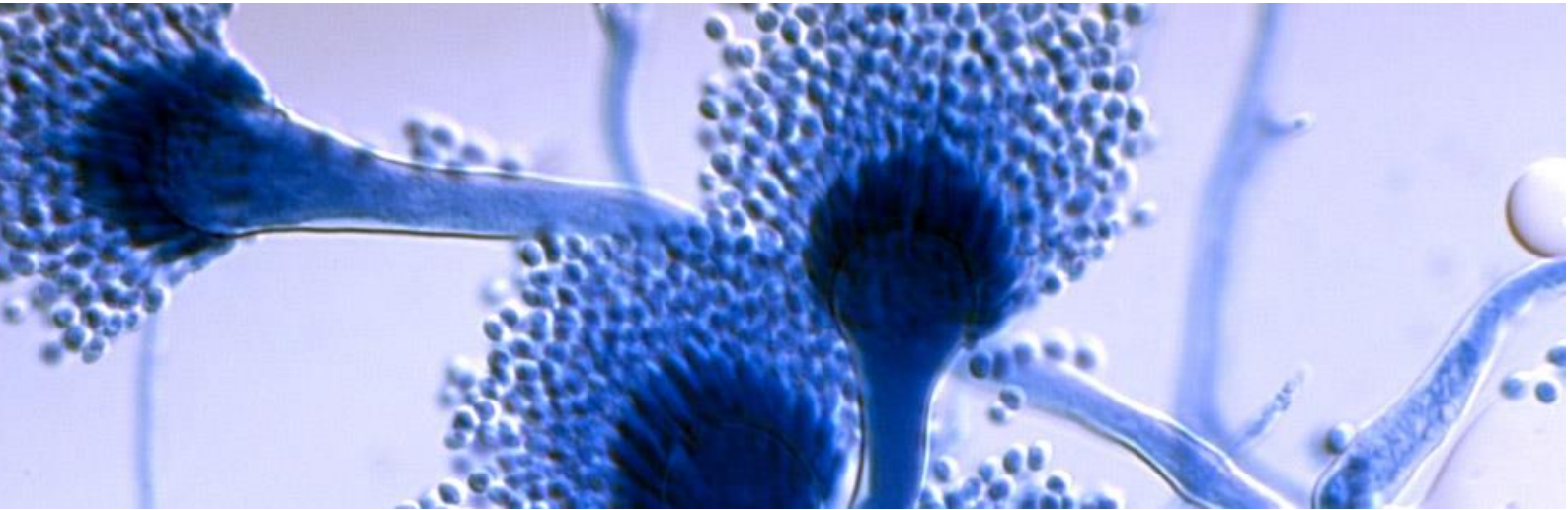


Imagem retirada: <http://www.citylab-bg.com/en/test7.html>

Prática 7. Características gerais de fungos e Ecologia

MORFOLOGIA DE FUNGOS

A identificação dos fungos é baseada quase principalmente em sua morfologia tanto macro- como microscópica. Macroscopicamente os fungos podem apresentar vários tipos morfológicos com colônias filamentosas, cotonosas, pulverulentas e outras (bolors) e cremosas (leveduras) e com os mais diversos tipos de pigmentos.

A unidade estrutural dos fungos filamentosos é representada pela hifa e o conjunto desses elementos é denominado micélio. O micélio pode ser diferenciado em vegetativo - quando exerce as funções de assimilação de alimentos e fixação em substratos, e em reprodutivo - que serve à reprodução dos fungos.

De acordo com a morfologia, os fungos podem apresentar 3 tipos:

Unicelular: Células arredondadas, ovóides ou alongadas, podendo se reproduzir por brotamento, cissiparidade ou por outro processo. Caracteriza as leveduras.

Filamentoso: Pode se apresentar com ou sem septos. As hifas podem se diferenciar em estruturas variadas, recebendo denominações diversas: rizóides, artrósporos anastomoses, etc. Caracteriza os bolors.

Pseudofilamentoso: Algumas leveduras em determinadas condições formam, por brotamentos sucessivos, uma estrutura filamentosa conhecida com o nome de pseudomicélio. Caracteriza algumas leveduras do gênero *Candida*.

O micélio vegetativo (em fungos filamentosos) se diferencia em estruturas de reprodução caracterizadas pela formação de conídios/espores que cumprem as funções de disseminação da espécie. Os conídios/espores podem ser hialinos, pigmentados, simples, septados, apresentando várias formas que muitas vezes definem gêneros ou espécies de fungos. São estruturas extremamente importantes na identificação dos fungos.

As estruturas reprodutivas, de acordo com sua origem, podem ser assexuados (conídios) ou sexuados (espores), podendo estar ou não dentro de determinadas estruturas.

Conídios (Reprodução assexuada):

Ectósporos: formam-se na extremidade de hifas especiais denominadas conidióforos. Ex. *Aspergillus*, *Penicillium*.

Endósporos: conídios produzidos no interior de esporângios. Os conídios, nesse caso são chamados de esporângiosporos e caracterizam a subdivisão Zygomycotina. Ex. *Rhizopus*, *Mucor*, *Absidia*.

Esporos (Reprodução sexuada):

Ectósporos: esporos formados na extremidade de basídios e são denominados basidiósporos. Caracterizam a subdivisão Basidiomycotina. Ex. cogumelos.

Endósporos: esporos formados no interior de células denominadas ascos. Os esporos são chamados de ascósporos e caracterizam a subdivisão Ascomycotina. Ex. *Aspergillus fumigatus*.

MATERIAL

Culturas de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Candida*

Lâminas prontas e focalizadas de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Candida*.

Placas de ágar Sabouraud

Placas para microcultivo em lâmina.

Lâminas, lamínulas, corante lactofenol azul-algodão, alças em L

Tubos com solução fisiológica.

PRÁTICA:

Técnica da colônia gigante: Com alça de platina em L, retire um pequeno fragmento da colônia de fungo do tubo e coloque no centro de uma placa de Petri com ágar Sabouraud dextrose. Incubar à 28 °C. Quando o desenvolvimento estiver satisfatório observar os aspectos morfológicos característicos.

Técnica do microcultivo de fungos: Utilizar placas de Petri contendo lâminas dispostas sobre um bastão de vidro. Com todo cuidado de assepsia, coloque um pequeno quadrado

(1 cm) de ágar Sabouraud, sobre a lâmina. Com alça de platina, retire um pequeno fragmento de uma colônia escolhida (placa de fungo do ambiente) e semeie os lados do ágar. Coloque uma lamínula estéril sobre o ágar e água destilada estéril na placa para evitar dessecação do meio. Feche a placa e deixe à temperatura ambiente. Quando houver desenvolvimento satisfatório, retire a lamínula e o fragmento do meio de cultura e coloque numa lâmina contendo uma gota de lactofenol azul algodão. Examinar ao microscópico e tentar identificar o fungo, quando possível.

DEMONSTRAÇÃO

Morfologia macro- e microscópica

Desenhe e Descreva, através de lâminas prontas e focalizadas, os principais aspectos macroscópicos (tipo de colônia, verso, reverso, pigmentação, etc. Observe a diferença entre levedura e bolor) e microscópicos dos fungos (micélio septado x não septado, hialino x demácia, delgado x espesso, formação de ectosporos x endósporos e outras características).

<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Rhizopus</i>	<i>Candida</i>

ECOLOGIA DOS FUNGOS

Os fungos tem como habitat, os mais diferentes substratos. A grande maioria dos fungos vive no solo fazendo parte da reciclagem dos materiais na natureza. São encontrados também nos vegetais, água, nos animais, etc. Os fungos formam diversas estruturas de dispersão, sendo a principal, os conídios/espores, e através de dispositivos especiais, essas estruturas entram em contato com várias vias de dispersão.

A principal via de dispersão é o ar atmosférico, através dos ventos. Os fungos que se dispersam pelo ar atmosférico são denominados de fungos anemófilos e tem importância em alergias no homem e como agentes deteriorantes de diversos materiais. Os fungos podem se dispersar também pela água,

sementes, insetos, homem, animais, etc. Pelas vias de dispersão, os fungos são espalhados na natureza. Quando encontram um substrato com nutrientes adequados, crescem e colonizam. Dessa maneira, podem deteriorar vários materiais e ocasionar em vários hospedeiros, as micoses.

Através de métodos específicos, os fungos podem ser isolados de seu habitat, das vias de dispersão, dos vários materiais contaminados e de diversos hospedeiros com micoses.

MATERIAL

Placas de Petri com ágar Sabouraud para isolamento de fungos anemófilos;
Tubos com 1 g de milho moído e tubos com 9 mL de água destilada estéril;
Tubos com 1 g de solo e tubos com 9 mL de água destilada estéril;
Tubos com água do lago;
Tubos estéreis para coleta de água do abastecimento público;
Pipetas de 1 ml estéreis;
Alças de Drygalsky estéreis.

PRÁTICA

ISOLAMENTO DE FUNGOS ANEMÓFILOS

Expor placas de Petri, contendo ágar Sabouraud dextrose durante 15 minutos em diferentes locais. Cultivar à 25 °C. Após 7 dias realizar a contagem de colônias crescidas – diferenciar em fungos filamentosos e leveduras

ISOLAMENTO DE FUNGOS DE SUBSTRATOS (alimentos e solo).

Fazer uma suspensão do substrato (1 g) em 9 mL água destilada estéril. Semear **0,1 ml** do líquido na superfície do ágar Sabouraud dextrose. Espalhar com alça de Drygalsky e cultivar à 25 °C. Após 7 dias realizar a contagem de colônias crescidas e iniciar a identificação das mesmas. Em alguns casos é necessário proceder à diluição da água e semear pela técnica de “pour plate”.

ISOLAMENTO DE FUNGOS DE SUPERFÍCIE Com auxílio de “swab”, umedecer o algodão em água destilada estéril e retirar o excesso na parede do tubo. Passar o “swab” na área de interesse e semear na superfície do ágar Sabouraud dextrose. Após 7 dias realizar a contagem de colônias crescidas – diferenciar em fungos filamentosos e leveduras.

ISOLAMENTO DE FUNGOS DE LÍQUIDOS (água do lago e de abastecimento público).

Para o isolamento de fungos que utilizam a água como via de dispersão, utiliza-se técnicas de diluição comuns e semeadura na superfície em ágar Sabouraud. Coletar água do bebedouro, da torneira ou de outro local. Semear 0,1 ml do líquido na superfície do ágar Sabouraud dextrose. Espalhar com alça de Drygalsky e cultivar à 25 °C. Após 7 dias realizar a contagem de colônias crescidas e iniciar a identificação das mesmas. Em alguns casos é necessário proceder à diluição da água e semear pela técnica de “pour plate”.

LEITURA

Após a incubação por 7 dias, dos meios de cultura, observar e distinguir o tipo de crescimento fúngico (levedura ou bolor) e contar o número de colônia para cada tipo fúngico.

Inserir os resultados de contagem de colônias e os aspectos macroscópicos (após 7 dias).

	Leveduras	Bolor
Fungos Anemófilos		
Solo		
Alimento (milho)		
Água do Lago		
Água do Abastecimento Público		
Superfície de Material		

Prática 8. Antifungigrama

Infecções causadas por fungos têm se tornado um grande problema de saúde pública e vêm crescendo em número e gravidade nas últimas três décadas. Esse aumento progressivo está relacionado com a evolução dos procedimentos médico-hospitalares invasivos, aumentando o risco de infecção fúngica, principalmente, em pacientes internados em unidades de oncologia, hematologia e de terapia intensiva (UTIs). Atualmente, a terapia antifúngica está restrita aos agentes poliênicos, aos azóis, as alilaminas, aos derivados morfolínicos, a 5-fluorocitosina, a griseofulvina e, mais recentemente, as equinocandinas. No entanto, para o tratamento das micoses invasivas, este arsenal terapêutico é limitado por problemas de seletividade, toxicidade e perfil de resistência dos fungos.

O teste de susceptibilidade “in vitro” tem o objetivo de avaliar se o fungo filamentoso ou levedura é sensível ou resistente a um antifúngico. Embora este não seja um teste rotineiramente empregado na clínica médica, alguns casos refratários ao tratamento podem justificar teste de susceptibilidade aos antifúngicos, a partir da cepa de fungo isolada. As cepas isoladas de *Candida* spp. são testadas utilizando técnicas padronizadas contra os antifúngicos mais utilizados no mercado (anfotericina B, cetoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, caspofungina, micafungina e anidulafungina).

A padronização destes testes de susceptibilidade aos antimicrobianos é realizada por órgãos internacionais como o CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, USA) e o EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Europa). As técnicas mais frequentemente empregadas são: técnica de diluição em caldo [protocolos M27-A3 (2008) para leveduras e M38-A2 (2008) para fungo filamentoso] e disco difusão [protocolo M44-A(2004)] do CLSI. Esta padronização é necessária para que estudos epidemiológicos possam ser realizados em diferentes partes do mundo e os resultados comparados. Além disso, para a pesquisa de novos agentes antifúngicos, um dos quesitos é comparar a eficácia da nova droga com os antifúngicos padrão. Para uma boa execução do ensaio, é necessário realizar o controle de qualidade do teste de susceptibilidade, pois é essencial para assegurar os resultados obtidos. Para isso é recomendado que se use uma cepa padrão (geneticamente estável) para determinar valores aceitáveis de CIM. Em geral, os resultados obtidos com variação de CIM $\pm$ uma diluição podem ser aceitos.

Definições

CIM – Concentração inibitória mínima: é a menor concentração do antifúngico capaz de inibir o crescimento do fungo

CFM – Concentração fungicida mínima: é a menor concentração do antifúngico capaz de matar o fungo

Fungistático: é a capacidade do antifúngico em inibir o crescimento do fungo.

Fungicida: é a capacidade do antifúngico em matar o fungo

PRÁTICA: TÉCNICA DE MACRODILUIÇÃO EM CALDO

Materiais

Suspensão de conídios de *Aspergillus* sp. ($1-5 \times 10^6$ conídios/mL)

Suspensão de leveduras de *Candida* sp. ($1-5 \times 10^5$ leveduras/mL).

Solução estoque de Anfotericina B (160 µg/mL)

Solução estoque de Fluconazol (160 µg/mL)

Tubos com 9 mL de caldo Sabouraud + extrato de levedura 0,2%

Tubos com 5 mL de caldo Sabouraud + extrato de levedura 0,2%

Preparação das soluções de antifúngicos:

1. Anfotericina B ou fluconazol- concentração 1.600 µg/mL

Pesar 1,6 mg de anfotericina B ou Cetoconazol e diluir em 1 mL de DMSO (dimetilsulfóxido) e água estéril, respectivamente.

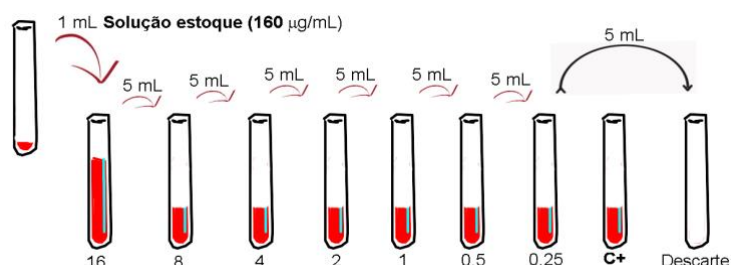
Diluir 1:10 em meio caldo Sabouraud + extrato de levedura 0,2% para obter a concentração de **160 µg/mL** (que será utilizado para o Antifungigrama).

Procedimento:

Em série de 8 tubos de meio de cultura (1º tubo: 9 mL e os demais 5 mL)

Proceder da seguinte maneira:

1. colocar 1mL de antifúngico (solução estoque de 160 µg/mL) no primeiro tubo (**Tubo 16**) com meio de cultura (diluição 1:10) e homogenizar.
2. Proceder a diluição seriada de 1:2, transferindo 5mL do **tubo 16 para o tubo 8** e homogenizá-lo.
3. Realizar o procedimento 2 até o **tubo 0,25**
4. Após homogeneização do tubo 0,25, descartar os 5mL no **Tubo Descarte**



5. O último tubo conterá somente o meio de cultura para o controle positivo de crescimento fúngico (**C+**)
6. Após a diluição da droga, transferir 0,1 mL da suspensão de fungo em **todos** os 8 tubos.
7. Incubar a série de tubos a 35°C por 72 h para *Aspergillus* spp. e 48 h para *Candida* spp.
8. Determinar o valor de CIM para cada antifúngico por meio de Leitura Visual.

RESULTADOS - Macrodiluição em caldo

1. Grupo _____

Fungo:	Antifúngico:							
Concentração do antifúngico (µg/mL)	16	8	4	2	1	0,5	0,25	C+
Crescimento do fungo (+: crescimento; -: inibição de crescimento)								

Valor de CIM = _____

Interpretação dos resultados

Tabela 1. Diretrizes de interpretação dos testes de susceptibilidade “in vitro” de *Candida albicans*. Documento E.Def 7.3.2 (BrCAST/Eucast, 2020)

Antifúngicos	S (sensível)	I (Sensível, dose aumentada)	R (resistente)
Anfotericina B	≤ 1 µg/mL	--	≥ 2 µg/mL
Fluconazol	≤ 2 µg/mL	4	≥ 8 µg/mL

PRÁTICAS 9 a 12 - DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS MICOSES

As doenças provocadas por fungos são classificadas de acordo com a localização no hospedeiro:

a. Micoses superficiais

Pitíriasis versicolor-*Malassezia furfur*

Piedra preta- *Piedraia hortae*

Piedra branca- *Trichosporon beigelii*

b. Micoses Cutâneas

Dermatofitoses- *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*

Candidíase-*Candida* spp.

c. Micoses Subcutâneas

Esporotricose- *Sporothrix* spp.

Cromomicose-*Phialophora*, *Cladosporium* e *Fonsecaea*

Micetomas-*Pseudoallescheria*, *Madurella*, *Acremonium*

Doença de Jorge Lobo-*Paracoccidioides loboii*

d. Micoses Sistêmicas endêmicas

Paracoccidioidomicose- *Paracoccidioides brasiliensis*

Histoplasmose- *Histoplasma capsulatum*

e. Outras Micoses Sistêmicas

Candidíase – *Candida* spp.

Criptococose- *Cryptococcus* spp.

Aspergilose – *Aspergillus* spp.

Diagnóstico laboratorial

Métodos diretos

1- Exame direto

à fresco - clareamento com KOH

após colorações : Gram, Giemsa

2- Histopatológico - HE, Gomory, PAS

3- Cultura: Sabouraud

Sabouraud + antibióticos

Meios específicos: seletivos e indicadores

Exame macroscópico e microscópico

4- Provas bioquímicas p/ identificação

Auxanograma: teste de assimilação de fontes de Carbono e Nitrogênio.

Zimograma: teste de fermentação de carboidratos

Urease e entre outras.

5- Provas imunológicas para identificação do agente

Métodos Indiretos

1- Imunológicos

Reação de Fixação do complemento, aglutinação, Precipitação, imunodifusão, contraímunoeletroforese, imunofluorescência, intradermoreação, etc

Práticas 9 e 10. Diagnóstico Laboratorial das Micoses Superficiais, cutâneas e subcutâneas

MICOSES SUPERFICIAIS: Constituem um grupo de fungos que estão praticamente no limiar do saprofitismo e do parasitismo, causando no hospedeiro apenas distúrbios estéticos.

PITÍRIASIS VERSICOLOR

Definição: dermatose superficial crônica, cosmopolita, muito freqüente em clima tropical, caracterizada pelo aparecimento de pequenas manchas bem delimitadas, de coloração variável, localizadas principalmente no tronco e no abdômem. Atinge indistintamente todas as raças e mais freqüentemente adultos jovens.

Agente etiológico: *Malassezia* spp.

Características clínicas: Lesões superficiais, atingindo principalmente o tronco e abdômem, mas podendo acometer pescoço, face, braços, e raramente mão e região inguinocrural. As lesões se apresentam sob a forma de manchas hipocrômicas descamativas irregulares, de cor variável, dependendo da cor do indivíduo, e condição do clima. Apresenta fluorescência à luz de Wood.

Diagnóstico micológico: as escamas devem ser clarificadas em hidróxido de potássio a 20% ou 30%. Ao exame microscópico observam-se células birrefringentes arredondadas, isoladas ou agrupadas com um cacho de uvas ao lado de hifas curtas, septadas, ramificadas.

A cultura das escamas deve ser feita em meio da Sabouraud dextrose + cloranfenicol + cicloheximida, adicionado de óleo de oliva e bile de boi, pois esta levedura é lipofílica, e incubada à 37°C.

PIEDRAS

PIEDRA BRANCA E PIEDRA NEGRA

Definição: infecção micótica dos pêlos caracterizada pela presença de nódulos mais ou menos duros, esbranquiçados (pedra branca) ou negros (pedra negra).

As pedras são infecções benignas, mas muito contagiosas e de fácil propagação. Ambas são distintas, não só pelos seus agentes etiológicos, mas também por sua distribuição geográfica e epidemiológica. Clinicamente, estas micoses podem ser confundidas com a tricomiose axilar e com a pediculose (lêndias). Atacam a região folicular dos pêlos.

PIEDRA NEGRA

Agente etiológico: *Piedraia hortai*

Epidemiologia: é observada em regiões tropicais e subtropicais da América do Sul, endêmica na Amazônia, na Indochina e em Java. Ocorre, principalmente nas regiões onde há abundante queda pluviométrica. Ataca somente os pelos do couro cabeludo, apresentando nódulos visíveis ou não a olho nu. As nodosidades da pedra preta são muito consistentes.

Exame micológico: o cabelo deve ser cortado e examinado após clarificação com potassa a 20%. Observa-se um nódulo constituído de um micélio largo de 2 a 4 µm, de paredes

escuras, presença de ascos ovais contendo ascóporos fusiformes.

Cultura em ágar-Sabouraud as colônias são verde-escuras, enegrecidas, acuminadas listas ou plissadas, de crescimento lento.

Aspecto microscópico: filamentos escuros, curtos de paredes espessas, numerosos clamidoconídios.

PIEDRA BRANCA

Agente etiológico: *Trichosporon beigelli*

Epidemiologia: é de distribuição geográfica cosmopolita. Ataca os pêlos da barba e do bigode, mais raramente os pêlos axilares. Recentemente observou-se ser comum em pêlos escrotais. Os nódulos são menos consistentes e aderentes ao pêlo. São freqüentemente encontrados na extremidade do pelo e pouco visíveis a olho nu.

Exame micológico: Após clarificação de pêlo com potassa a 20%, observa-se micélio fragmentado em elementos mais ou menos retangulares ou arredondados. Não apresentam ascos.

Cultura. Em ágar Sabouraud dextrose, as colônias são de cor creme, moles, membranosas, tornando-se com o tempo levemente penugentas e aderindo fortemente ao meio de cultura. Crescimento rápido.

Aspecto microscópico: Filamentos e artroconídios.

MICOSES CUTÂNEAS: São micoses frequentemente causadas por fungos dermatófitos. Para esses casos a doença pode ser denominada de dermatofitoses.

Definição: É uma infecção cutânea, com uma variedade de aspectos clínicos, cujos agentes etiológicos atacam com predileção a queratina da pele, pelos e unhas. A infecção é geralmente restrita às camadas não vivas da superfície corpórea. A maioria destas infecções são causadas por um grupo homogêneo de fungos queratinofílicos chamados dermatófitos.

Os dermatófitos são divididos em gêneros, segundo:

forma assexuada de reprodução

- ***Microsporum spp.***
- ***Trichophyton spp.***
- ***Epidermophyton spp.***

forma sexuada da reprodução

- ***Arthroderma sp.***

Quanto ao habitat os dermatófitos podem ser:

- **geofílicos** - quando têm seu habitat no solo.
- **zoofílicos** - quando têm seu habitats nos animais.
- **antropofílicos** - quando têm seu habitat no homem.

Modo de infecção: A infecção é feita pela forma miceliana. Na pele, os filamentos micelianos crescem excentricamente na camada córnea da pele e se ramificam. Após espaço de uma semana há uma reação cutânea e formação de vesículas ao redor da lesão. O pêlo é penetrado secundariamente; o dermatófito vai utilizando a queratina do pêlo e

penetrando em direção ao bulbo. Os cabelos parasitados se tornam descoloridos, frágeis, e caem aparecendo uma zona de tonsura (tinhas tonsurantes)

O aspecto dos elementos fúngicos dentro e no redor dos pêlos e a presença de hifas septadas, ramificadas, com artroconídios nas escamas de pele e unhas, indicam seguramente uma infecção por dermatófitos.

Aspectos clínicos das dermatofitoses:

Dependendo do local onde o dermatófito se instale, podemos denominar a dermatofitose, por exemplo, na região inguino-crural=*tinea cruris*; no corpo= *tinea corporis*; na barba= *tinea barbae*; na mãos= *tinea manum*; nos pés= *tinea pedis*, na unha= *tinea unguium*; no couro cabeludo= *tinea capitis*.

Estudo biológico dos dermatófitos:

Podemos utilizar a lâmpada de Wood, não só para o auxílio diagnóstico, como para controle de cura. As lesões de tinhas submetidas às radiações ultravioletas, filtradas, apresentam fluorescência verde, principalmente nas lesões de tinha do couro cabeludo provocadas pelo *M. canis*.

Para a coleta do material biológico devemos utilizar: Placa de Petri; tesoura; bisturi; pinça e lâminas de microscopia.

Das lesões do couro cabeludo devemos coletar, com pinça os fios de cabelo que já estão tonsurados na periferia da lesão.

Nas lesões circinadas devemos raspar, com bisturi ou com a própria lâmina, na bordas das lesões, pois é o local onde o fungo está em atividade.

Nas oníquias sub-ungueais deve-se raspar por debaixo da unha, em contato com o tecido são. A unha pode ser cortada.

Todo material deve ser coletado em placa de Petri ou entre duas lâminas. Não se devem misturar materiais de locais diferentes.

Diagnóstico Laboratorial

Material Biológico: escamas de pele, raspado de unha e pelos

Exame direto: Submeter o material ao amolecimento e a clarificação com potassa (KOH) diluição a 10, 20 ou 30% a quente.

O que procurar nas preparações:

No exame direto de escamas de pele ou unha observam-se filamentos micelianos longos, ramificados, septados, algumas vezes com artroconídios

Exame direto de cabelo ou pêlo: bainha de esporos redondos ao redor do pêlo (parasitismo ectothrix) ou filamentos com artroconídeos no interior do pêlo (parasitismo endothrix). Pode ocorrer parasitismo endo e ectothrix ao mesmo tempo.

Cultura: todos os dermatófitos crescem facilmente no meio de ágar Sabouraud dextrose ou no meio "Mycosel" (meio de Sabouraud acrescido de cloranfenicol, inibidor bacteriano, e de cicloheximida, que inibe fungos filamentosos contaminantes).

MICOSES SUBCUTÂNEAS:

Esporotricose: Espécies do complexo *Sporothrix schenckii* são fungos dimórficos e agentes da esporotricose, micose subcutânea sub-aguda ou crônica, podendo ter 3 principais formas clínicas: cutânea, linfocutânea e disseminada, sendo a linfocutânea a mais freqüente. A infecção é adquirida através da inoculação traumática do fungo no tecido epitelial atingindo a camada subcutânea. Indivíduos que trabalham na lavoura, jardinagem e outros podem se contaminar com o fungo presente no ambiente por meio de farpas de

madeiras e espinhos de plantas. Atualmente, a transmissão zoonótica da esporotricose está vinculadas a arranhaduras e mordidas de felinos infectadas por *Sporothrix* e está intimamente ligada a epidemia de esporotricose no estado do Rio de Janeiro desde 1998. As principais espécies causadores da esporotricose são: *S. schenckii*, *S. brasiliensis*, *S. mexicana*, *S. globosa*, *S. palida*.

O exame direto à fresco não apresenta muito valor no diagnóstico desta micose, pois as estruturas fúngicas não revela características diferenciais em vida parasitária. Em material de biópsia observam-se leveduras em forma de “naveta”.

O cultivo deve ser realizado à 25°C e à 37°C. À 25°C a cultura encontra-se em fase M (bolor) e observa-se o desenvolvimento de colônia cotonosa, a princípio branca, tornando-se com o tempo enegrecida e úmida. Ao exame microscópico observam-se hifas delgadas, septadas e conídios piriformes dispostos em forma de “margarida”, na extremidade dos pedúnculos (conidióforos) ou inseridos diretamente nas hifas. Culturas envelhecidas revelam conídios arredondados e dispostos paralelamente às hifas. À 37°C, a cultura está em fase Y (levedura) e observa-se o desenvolvimento de uma colônia branca e cremosa. Ao exame microscópico observam-se leveduras globosa a elípticas ou em forma de naveta.

Diagnóstico laboratorial

Material Clínico: pele, punção dos linfonodos, pus, sangue, biópsias de tecidos etc.

Exame direto: à fresco não revela nenhuma forma conclusiva de *Sporothrix*. Esfregaços de pus corados pelo Gram, PAS ou Gomori, raramente permitem visualização do fungo. Pela técnica de imunofluorescência direta, a visualização do agente em pequeno número é mais fácil.

As células fúngicas observadas nas lesões são raras e quando presentes, são vistas como leveduras com ou sem brotamento, Gram +, PAS +, tamanho de 2-3µ x 3µ, sob forma de corpo asteróide, células esféricas de parede espessa.

Cortes histopatológicos corados pelo Gram, PAS ou Gomori & Grocott mostram o fungo sob a forma de naveta ou charuto ou ainda formas asteróides, resultantes de uma relação hospedeiro-parasita.

Cultura: excelente crescimento em ágar Sabouraud dextrose ou Mycosel. Cultura cresce em 3 a 5 dias, é um processo seguro e de rápido diagnóstico.

Características macroscópicas da cultura: em meio de ágar Sabouraud-dextrose, à temperatura ambiente, as colônias de *S. schenckii* são de formas e cores variadas, de esbranquiçadas a negras, superfície plissada, levemente aveludada e de consistência elástica. À temperatura de 37°C a cultura é leveduriforme, de consistência cremosa e de cor amarelo creme.

Características microscópicas da cultura: a forma miceliana é obtida em microcultivo em lâmina, verifica-se a presença de finos filamentos septados, com conídios redondos ou piriformes, dispostos ao longo das hifas ou na forma característica em “margarida”. À 37°C apresenta-se sob a forma de levedura com brotamento.

Cromomicose: É uma infecção crônica de evolução lenta, que acomete a pele e o tecido celular subcutâneo do homem e dos animais. A maioria das lesões é causada por fungos da família Dematiaceae, que vivem no solo e vegetais em decomposição. O aspecto clínico das lesões é polimorfo, caracterizando principalmente pela formação de nódulos, lesões papulosas, eritemato-descamativas e pela forma clássica, verrucosa, que pode apresentar-se ulcerada ou não. Normalmente, as lesões localizam-se nos membros inferiores, principalmente nos pés e pernas.

A infecção ocorre geralmente pela inoculação traumática das partículas fúngicas na pele do hospedeiro. E os principais agentes etiológicos da cromomicose são: *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea compacta*, *Phialophora verrucosa*, *Cladosporium carrionii* e *Rinocladiella aquaspersa*.

É importante ressaltar que no tecido do hospedeiro, as partículas fúngicas inoculadas se convertem em células globosas, com presença de fissão entre as células e com coloração natural marron, chamadas de corpos fumagóides, células muriformes ou células

escleróticas. Essas células são consideradas leveduras e se dividem por meio de fissão binária. A observação dessas estruturas é sugestiva de cromomicose, eliminando outras doenças como leishmaniose e esporotricose. Tanto as células escleróticas e o micélio dos fungos causadores da cromomicose (fungos demáceos) possuem coloração natural marron-castanho.

Diagnóstico laboratorial

Material Biológico: secreções, escamas de pele, biópsias de tecido

Exame Direto: Clarificação com KOH 10%. Observação de células globosas, ovaladas, de parede espessa, de coloração castanha, apresentando geralmente septação interna chamadas de corpos fumagóides, células muriformes ou células escleróticas. A presença dessas células é sugestivo de cromomicose.

Cultura: Cultivar em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol ou Mycosel (ágar peptonado e glicosado com cicloheximida e cloranfenicol) a 25-30°C. Um fato peculiar é que os fungos causadores da cromomicose não crescem na presença de cicloheximida.

Histopatologia: Os cortes histológicos podem ser corados com HE. Observação as células escleróticas de coloração natural marron.

PRÁTICA

Lâminas focalizadas/Pranchas e Culturas – Desenhe e faça anotações das estruturas observadas.

Microsporia	Tricofícia
<i>Microsporum canis</i>	<i>Microsporum gypseum</i>
<i>Tricophyton rubrum</i>	<i>Tricophyton mentagrophytes</i>
Ptiríase versicolor	<i>Malassezia furfur</i>
<i>Sporothrix</i> sp – fase miceliana	

Prática 11. Diagnóstico Laboratorial das Micoses Sistêmicas Oportunistas

CANDIDÍASE

Definição: Candidíase é uma infecção primária ou secundária envolvendo as espécies do gênero *Candida*. Pode-se considerar cerca de 7 espécies patogênicas para o homem: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. stellatoidea*, sendo a espécie de *C. albicans* a mais freqüente. As manifestações clínicas das doenças são as mais variadas, podendo ser subaguda, aguda ou crônica. O envolvimento pode ser localizado na boca, garganta, couro cabeludo, vagina, dedos, unhas, brônquios, pulmões, trato gastrointestinal ou generalizado, como na septicemia, endocardite e meningite. No caso de infecções sistêmicas, a mortalidade pode chegar até 70% dos casos de candidemia.

Os processos patológicos também são variados indo desde irritação e inflamação até uma resposta granulomatosa e supurativa. Desde que espécies de *Candida* são leveduras que fazer parte da microbiota, isto é, encontrada normalmente no homem, sua manifestação representa um processo oportunístico.

Para que *C. albicans* seja considerada patogênica é necessário que a mesma seja isolada de modo constante, em grande quantidade das lesões e, de modo geral, visualizada ao exame direto na forma filamentosa.

Freqüentemente, o paciente apresenta debilitação em seus mecanismos de defesa ou tem uma doença de base. Nos pacientes idosos debilitados, recém-nascidos prematuros e nos desnutridos, a ocorrência de candidíase é alta, em suas variadas formas clínicas. Durante a gravidez, principalmente nos 3 últimos meses, com o aumento de glicogênio nas células da mucosa vaginal, e uso de anticoncepcionais de alta dosagem ocorre aumento de candidíase vaginal. Tratamentos prolongados com antibióticos, principalmente os chamados de largo espectro de ação, corticóides, drogas imunossupressoras favorecem a instalação de candidíases, principalmente as formas invasivas.

Diagnóstico Laboratorial

Materiais biológicos: raspados das lesões cutâneas e das mucosas, expectoração, raspados das unhas, urina, sangue e biópsias, entre outros.

Exame direto:

- à fresco com KOH a 20%
- esfregaços corados pelo Gram ou Giemsa (além de poder visualizar os elementos fúngicos, permite avaliar a quantidade de microrganismos)
- cortes histológicos: PAS ou Gomori & Grocott (elementos leveduriformes com brotamentos e filamentos abundantes).
-

Cultura: em meio ágar Sabouraud dextrose + cloranfenicol; após 24-48 horas colônias cremosas, esbranquiçadas, brilhantes. Ao exame microscópico visualizam-se apenas os elementos leveduriformes comuns a todas as espécies de *Candida*.

Identificação da espécie de *Candida albicans* e *Candida não-albicans*

1. Produção de clamidoconídios: em meio de fubá ("corn meal ágar" + tween 80), a *C. albicans* produz clamidoconídios terminais ou intercalares, redondos ou ovais, após 24-48 hs.
2. Produção de tubo germinativo: a espécie de *C. albicans* produz o tubo germinativo em presença de soro (humano, fetal bovino) após 1-3 horas à 37°C.
3. Auxanograma: Assimilação de fontes de carbono e nitrogênio.
4. Zimograma: Fermentação de açúcares.

CRIPTOCOCOSE

Definição: É uma infecção subaguda ou crônica de comprometimento pulmonar, sistêmico e, principalmente, do sistema nervoso central (SNC), causada pelo ***Cryptococcus neoformans*** e ***Cryptococcus gattii***. A infecção primária no homem é quase sempre pulmonar, devido à inalação do fungo da natureza. A infecção pulmonar é quase sempre subclínica e transitória, podendo imergir ao lado de outras doenças que debilitam o indivíduo, tornando-se rapidamente sistêmica e fatal. Portanto, é conhecida como infecção oportunista. Este fungo tem tropismo pelo SNC, ocasionado meningite criptocócica. A espécie de *C. gattii*, também, pode causar criptococose em pacientes imunocompetentes. *C. neoformans* é de distribuição cosmopolita e está associado com habitat de aves. O pombo parece ser o principal vetor para a distribuição e manutenção do fungo. Não parece que o pombo tenha a infecção, uma vez que ele tem uma temperatura corporal em torno de 42°C. O fungo vive nas fezes e pode permanecer viável por 2 anos se houver umidade suficiente. Já *C. gattii* é frequentemente isolado de troncos de eucaliptos e está relacionado com a presença de madeira em decomposição

Diagnóstico Laboratorial

Materiais biológicos: liquor, escarro, pus ganglionar, exsudatos de lesões cutâneas e mucosas, urina e sangue.

Exame direto: à fresco com tinta nanquim (leveduras de *Cryptococcus* spp. são visualizadas como uma células redondas, circundadas por uma cápsula mucopolissacrídica não corada)

Histopatologia: Coloração com H&E, Gomori-Grocott – presença de leveduras; Coloração de mucicarmim evidencia a presença de cápsula polissacarídica envolvendo a levedura – se colra em rosa.

Cultura: o material deve ser semeado em ágar Sabouraud dextrose e dará crescimento a uma colônia viscosa, lisa, brilhante. Com o tempo, a colônia escorre para a base do tubo.

PRÁTICA

Material:

Cultivos de *C. albicans*
tubos com 1 ml de solução fisiológica estéril
tubos com 20 ml de meio C ou N
placas estéreis
conjuntos de açúcares para auxanograma
espátulas estéreis
recipientes para água fervente
Demonstração: zimograma, uréia e lâminas

Auxanograma: Preparar uma suspensão de *C. albicans*. Assinalar no fundo da placa os açúcares a serem empregados. Fundir em banho maria, o meio de cultivo (meio C e meio N). Esfriar até 40-45° c. Semear a suspensão da levedura pela técnica “pour plate”. Após solidificação, colocar os açúcares (pequenas alíquotas) com uma espátula de madeira estéril. Incubar a 25° C e realizar a leitura após 48 horas.

Zimograma (Demonstração): Semear 2 ou 3 alçadas da suspensão da cultura em tubos de fermentação contendo solução de açúcares a 2%. Agitar levemente os tubos, incubar a 25° C durante 5 a 14 dias. Observar a presença ou não de gás retido nos tubos de Durhan.

Urease (Demonstração): Para diferenciação de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* ou diferenciação das principais leveduras patogênicas, *Candida* spp. e *Cryptococcus* spp. Semear os fungos no meio de uréia com indicador de pH (vermelho de fenol). Incubar em estufa a 37 °C. Verificar a mudança do pH até 20 dias. Urease+ (rosa-vermelho) urease - (amarelo).

Observe as lâminas focalizadas, desenho e anote as características microscópicas:

Material clínico (mucosa oral) – Exame direto	Lâmina direta da cultura
Microcultivo – Observação de clamidoconídio	Tubo germinativo
Histopatológico (Candidíase)	

Histopatológico (Criptococose)	<i>Cryptococcus neoformans</i> – coloração com tinta nanquim
--------------------------------	--

Prática 11. Diagnóstico Laboratorial das Micoses sistêmicas endêmicas

PARACOCCIDIOIDOMICOSE (PCM)

P. brasiliensis e *P. lutzii* são fungos dimórficos e agentes etiológicos da PCM, doença de localização sistêmica, grave e que se manifesta por diversas formas clínicas.

O exame direto a fresco é de grande valor no diagnóstico dessa micose, pois o fungo apresenta-se sob a forma de levedura com dupla membrana, sendo a interna enrugada e a externa lisa. Dependendo do material, apresenta-se com brotamentos múltiplos. Em material de biópsia, com coloração de Gomory, pode-se observar facilmente o aspecto característico de “roda de leme”.

O cultivo pode ser feito em ágar Sabouraud dextrose a 25°C e em ágar BHI com sangue ou meio de Fava Netto a 37°C e incubar de 20 a 30 dias. A 25°C, a cultura está em fase M (mould-bolor) e observa-se o desenvolvimento de uma colônia cotonosa, branca, elevada e de crescimento lento, cujo exame microscópico revelará apenas micélio septado e alguns clamidósporos. A 37°C, a cultura está em fase Y (yeast=levedura) e observa-se o desenvolvimento da colônia leveduriforme. Ao exame microscópico, observam-se células isoladas com gemulação simples e múltipla.

De grande valor no diagnóstico e prognóstico dessa micose são as reações imunológicas, como por exemplo, a reação de fixação do complemento, de precipitação e intradermoreação.

Diagnóstico Laboratorial

Material Biológico: escarro, secreções, pus de linfonodos, material de lesões cutâneas, mucosas, sangue

Exame Direto: Clarificação com KOH 10%. Observação de formas de leveduras com múltiplos brotamentos com forma de roda de Leme. A presença desta estrutura fúngica é sugestiva de *Paracoccidioides* spp.

Cultura: Cultivar em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol ou Mycosel (ágar peptonado e glicosado com cicloheximida e cloranfenicol) em temperaturas inferiores a 29 °C para obtenção da forma filamentosa. A conversão para a forma levedura, faz-se o cultivo em meio ágar cérebro-fígado-coração (BHI) a 37 °C. A confirmação do dimorfismo fúngico é necessária para fechar o diagnóstico.

Histopatologia: Os cortes histológicos podem ser corados com H&E ou Gromori-Grocott. A última coloração evidencia a presença de fungo no tecido apresentando leveduras multibrotantes. O fungo aparece com coloração marron-negro no fundo claro.

Teste Sorológico: Consiste na pesquisa de anticorpos anti-*Paracoccidioides* (Anticorpo anti-gp43). Pode-se utilizar diversas técnicas: Imunodifusão em gel duplo, Fixação do complemento, Western blot, Aglutinação em látex

Observe as lâminas focalizadas, desenhe e anote as características microscópicas:

Histopatológico (Paracoccidioidomicose)	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> - levedura

HISTOPLASMOSE: É uma doença fúngica granulomatosa, cujo agente etiológico é o *Histoplasma capsulatum*. Este fungo apresenta especial afinidade pelo sistema reticuloendotelial (SER), produzindo diversas manifestações clínicas, sendo a forma pulmonar a mais freqüente. *H. capsulatum* cresce em solos com alto teor de nitrogênio, geralmente associado com excretas de aves e morcegos. Solos de galinheiros, viveiros de aves, cavernas de morcegos são altamente propícios. As aves fornecem o substrato ideal para o crescimento do fungo no solo, podendo transportá-lo para outros locais em suas penas. Os morcegos são infectados, excretando o fungo em suas fezes, podendo disseminar a doença em suas migrações. O principal agente vetor é o vento, que pode disseminar os conídios a longas distâncias. A inalação de uma quantidade suficiente de partículas infectantes do fungo, gera a infecção primária no pulmão, com o crescimento de leveduras nos alvéolos pulmonares e interstício. A intensidade da exposição inalatória, além de outros fatores, determinará se a infecção resultante corresponderá a sintomas clínicos. Se a exposição for leve, a infecção será provavelmente assintomática, e se for maciça, o resultado será sintomática aguda.

Diagnóstico laboratorial

Material Biológico: Escarro, material de biópsia, sangue

Exame direto: o exame à fresco não representa muito valor no diagnóstico dessa micose, pela dificuldade de visualização das leveduras no interior das células do SER. Em material de biópsia corado pelo método da hematoxilina-eosina (HE) ou pelo Giemsa, observam-se células leveduriformes pequenas, redondas, intra-citoplasmáticas e que apresentam halo claro ao redor, imitando cápsula.

Cultura: o cultivo deve ser feito em ágar Sabouraud dextrose a 25°C e em ágar BHI com sangue ou em meio Fava Netto a 37°C. A 25°C, a cultura está em fase M (mould-bolor) e observa-se o desenvolvimento de colônia esbranquiçada, cotonosa, que revela ao exame microscópico, micélio septado com conídios ornamentados denominados **estalagmósporos**. A 37°C a cultura está na fase y (yeast=levedura), observa-se colônia cremosa e microscopicamente, apenas células leveduriformes ovaladas e pequenas.

Testes sorológicos: provas sorológicas como reação de fixação do complemento, imunodifusão e imunofluorescência podem ser úteis no diagnóstico dessa doença.

Observe as lâminas focalizadas, desenhe e anote as características microscópicas:

Histopatológico (Histoplasmose)	<i>Histoplasma capsulatum</i> - Micélio
	