

ROTEIRO PRÁTICO DE MICOLOGIA

BMM 0585 - Micologia para Biomedicina

Professores:

**PROF. Dr. BENEDITO CORREA
PROF. Dr. CARLOS P. TABORDA
PROFa. Dra. KELLY ISHIDA
PROF. Dr. MÁRIO HENRIQUE DE BARROS**

Apoio técnico:

**EDSON ALVES GOMES
TATIANA ALVES DOS REIS
ZITA MARIA DE OLIVEIRA GREGÓRIO**

**Aluna do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino:
Julia Figueiredo**

2022

PRÁTICA 1 – INTRODUÇÃO À MICOLOGIA MÉDICA - MORFOLOGIA, REPRODUÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DOS FUNGOS

A identificação dos fungos é baseada quase que exclusivamente em sua morfologia tanto macro como microscopicamente. 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. O micélio vegetativo também pode se reproduzir.

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, artrósporadas, 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 as 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) e tanto um com outro, podem 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. *Piedraia hortai*.

MATERIAL

Culturas de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Candida albicans*, *Sporothrix* sp.(fase de levedura e bolor) e *Cryptococcus* sp.

Lâminas prontas e focalizadas de *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Sporothrix* sp.(fase bolor), *Candida albicans* (vida saprofítica) e *Cryptococcus* sp.

DEMONSTRAÇÃO DE CULTURAS FÚNGICAS E LÂMINAS:**-MORFOLOGIA MACROSCÓPICA**

Descreva os principais aspectos macroscópicos característicos de cada fungo: tipo de colônia, verso, reverso, pigmentação, etc. Observe a diferença entre levedura e bolor.

-MORFOLOGIA MICROSCÓPICA

Desenhe e Descreva, através de lâminas prontas e focalizadas, os principais aspectos microscópicos dos fungos em questão.

MORFOLOGIA MACROSCÓPICA Descrição dos aspectos macroscópicos	MORFOLOGIA MICROSCÓPICA Descrição e desenho dos aspectos microscópicos
<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.
<i>Penicillium</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.
<i>Rhizopus</i> sp.	<i>Rhizopus</i> sp.
<i>Sporothrix</i> sp. - Levedura	<i>Sporothrix</i> sp. – Levedura

<i>Sporothrix</i> sp. -Bolor	<i>Sporothrix</i> sp. -Bolor
<i>Candida albicans</i> – vida saprofítica	<i>Candida albicans</i> – vida saprofítica
<i>Cryptococcus</i> sp.	<i>Cryptococcus</i> sp.

Conclusão:

PRÁTICA 2 - ECOLOGIA E FIOLOGIA DE FUNGOS

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 “pourplate”.

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 “pourplate”.

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		

Conclusão:

FISIOLOGIA DE FUNGOS

Os fungos são seres heterotróficos retirando os nutrientes do meio ambiente circundante. Através de digestão enzimática externa transformam as substâncias de maneira que possam ser absorvidas. De maneira geral necessitam de 4 elementos básicos: H, O, C e N, além de outros elementos em menor quantidade: P, S, K, Mg, Fe, Zn, Mn, Cu, Mb, sendo que alguns fungos necessitam ainda de determinados fatores de crescimento, como por exemplo a tiamina. De maneira geral, para seu crescimento, necessitam de uma fonte orgânica de C e de uma orgânica ou inorgânica de N. O meio artificial básico para trabalho com fungos é ágar Sabouraud que tem como fonte de C, a glicose e como fonte de N, a peptona.

Um esporo/conídio de fungo, tendo os nutrientes adequados, germina, filamento, cresce e origina novos esporos/conídios. Nesse processo de crescimento, vários fatores interferem como temperatura, umidade, pH, etc. De maneira geral, o ótimo de temperatura é entre 20 °C e 30 °C, mas os fungos podem se manter em temperaturas baixas ou altas. Há fungos termofílicos, termotolerantes, mesofílicos, psicrófilos. A umidade ótima para seu crescimento é entre 75 e 95 %, mas também suportam uma ampla variação. Da mesma maneira acontece com o pH. As leveduras crescem em variações de pH entre 2,5 e 8,5 e os bolores entre 1,5 e 11. De maneira geral o ótimo é neutro.

Alguns fungos apresentam-se em determinadas condições, na forma filamentosa e em outras condições, na forma de levedura. Como exemplo desse dimorfismo, temos o *Paracoccidioides brasiliensis*, o *Histoplasma capsulatum* e o *Sporothrix schenckii*, importantes agentes de micoses, que na natureza ou em laboratório à temperatura de 25 °C, apresentam-se em forma de bolor e quando infectando um hospedeiro ou a 37 °C em laboratório, apresentam-se em forma de levedura.

As células fúngicas, para sobreviverem e reproduzirem, se nutrem por meio de absorção de diversos nutrientes, desde estruturas moleculares simples (metano) até as mais complexas (celulose, lignina). Para tais, os fungos disponibilizam de processos metabólitos, muitas vezes específicos do gênero/espécie. Essas reações químicas celulares podem ser utilizadas para a identificação de fungos, assim como as características macro e micromorfológicas (Método clássico de identificação de fungos).

As principais provas bioquímicas são:

Auxanograma: Avalia a capacidade de assimilação de carboidratos (fontes de carbono) pelos fungos (Respiração aeróbica) e assimilação de fontes de nitrogênio (orgânico ou inorgânico)

Zimograma: Avalia a capacidade de fermentação de carboidratos pelos fungos (Respiração anaeróbica), caracterizadas pela formação de gás no tubo de Durham.

Urease: Avalia a capacidade do fungo em converter a uréia em amônia e anidro carbônico. A amônia deixa o meio de cultura com pH básico. Como o indicador de pH é a vermelho de fenol, o meio ficará na coloração róseo-avermelhada.

MATERIAL:

Auxanograma para demonstração

Zimograma para demonstração

Urease para demonstração

PRÁTICA

Faça as observações de cada teste realizado/observado e anote os resultados obtidos.

I) - Culturas de fungos com pigmentos diferentes - Demonstração

Rhodotorula rubra _____

Microsporium canis _____

Fusarium sp. _____

Trichophyton rubrum _____

II) - ZIMOGRAMA – Demonstração

III) - AUXANOGRAMA – Demonstração

IV) – UREASE – *Candida sp.* e *Cryptococcus sp.* crescidos em meio urease - Demonstração

Roteiro para Relatório Prática Ecologia e Fisiologia

1. Introdução
2. Materiais e Métodos
3. Resultados e Discussão

Além de descrever os resultados obtidos nos experimentos e nas demonstrações. Abordar os seguintes aspectos:

- a. Qual a importância do controle de qualidade dos fungos do ar?
- b. Porque é importante conhecer os processos bioquímicos e fisiológicos dos fungos?
- c. Qual a relação da morfologia com o ambiente nutricional?

- 4.Referências

PRÁTICA 3 - IDENTIFICAÇÃO POLIFÁSICA DE FUNGOS

Introdução

A identificação de fungos se baseia, por muitas vezes, nas observações das características macroscópicas e microscópicas. No entanto, há uma grande dificuldade na identificação/classificação de fungos quando, somente, métodos baseados em aspectos morfológicos, os quais são aplicados à chaves de classificação (Arx, 1974; Barnett & Hunter, 1972; Hanlin & Menezes, 1996). Para isso, é preciso que o indivíduo que esteja fazendo a identificação tenha um alto conhecimento sobre taxonomia e sensibilidade para perceber pequenos detalhes morfológicos. Em muitos casos, os taxonomistas têm dificuldades para determinar quais são as características que realmente definem uma espécie ou gênero. Além disso, fases sexuadas (teleomórficas) e assexuadas (anamórficas) de um mesmo genótipo são classificadas com espécies distintas, pois, de fato, apresentam formas bastante distintas.

Além das técnicas morfológicas e bioquímicas, técnicas moleculares de identificação podem contribuir de forma significativa para o entendimento das relações filogenéticas entre as diferentes espécies de fungos, bem como contribuir para uma melhor classificação das novas espécies que poderiam ser catalogadas em projetos de análise da biodiversidade. Além disso, a utilização de métodos moleculares, como o sequenciamento de genes conservados (exemplos: ITS, IGS1, TEF-1 α , β -tubulina, calmodulina), podem ser usados para a identificação de micro-organismos e possibilitar, ainda, o desenvolvimento de métodos de diagnóstico, análises filogenéticas, epidemiologia e genética de populações.

Com avanço dos métodos espectroscópicos na identificação de moléculas, a espectrometria de massas, como por exemplo, pode ser utilizada para detectar e identificar proteínas de um determinado micro-organismo, caracterizando uma digital. Atualmente, o método MALDI-TOF, já é empregado em alguns laboratórios de análises clínicas para diagnóstico laboratorial de infecções microbianas, incluindo as infecções fúngicas. No entanto, ainda se encontra em fase de teste e ampliação do banco de dados.

Diante o exposto, a abordagem polifásica assume um papel fundamental na identificação da espécie fúngica.

PRÁTICA

ESCOLHER DUAS COLÔNIAS DE FUNGOS FILAMENTOSOS DA PLACA DOS FUNGOS ANEMÓFILOS

Os fungos escolhidos serão utilizados em diferentes técnicas na tentativa de identificar o gênero e/ou espécie do fungo.

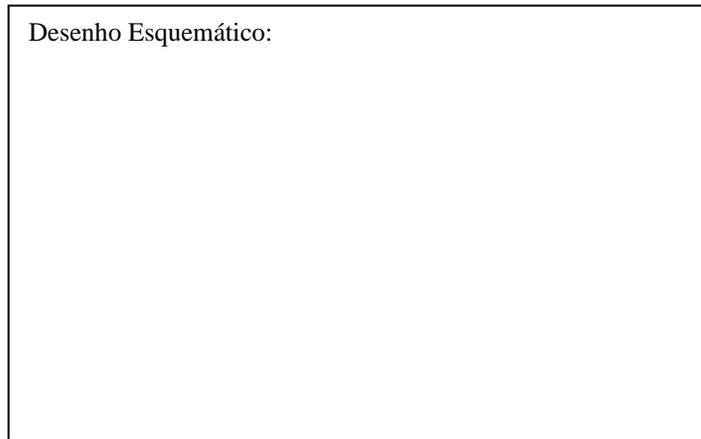
Anotar as características macroscópicas das colônias escolhidas:

EXAME DIRETO DA COLÔNIA

Pingar uma gota de corante Lactofenol azul de algodão e com auxílio de uma alça em L, retirar uma pequena porção da colônia de levedura ou bolor e dispensar na gota de corante. Recobrir a gota com uma lamínula. Visualizar ao microscópio ótico.

Anotar as características microscópicas:

Desenho Esquemático:



COLÔNIA GIGANTE

Com auxílio de uma alça em L, retirar uma porção da colônia e inocular no centro da superfície do ágar Sabouraud dextrose. Incubar a 25-28 °C por 3-10 dias.

Observar as características macroscópicas da colônia:

MICROCULTIVO EM LÂMINA

Fungo na forma filamentosa: 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 em L, retire um pequeno fragmento de uma colônia escolhida (placa de fungo do ambiente) e semeie nos 4 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 de algodão. Examinar ao microscópico e tentar identificar o fungo, quando possível.

Observar e desenhar e descrever as características microscópicas:

Fungo Filamentoso (1)	Fungo Filamentoso (2)

Roteiro para Relatório:

1. Introdução
2. Materiais e Métodos
3. Resultados e Discussão - Descrever os dados obtidos nos experimentos e na discussão aborde os seguintes aspectos:
 - a. Qual a vantagem e desvantagem do método do Exame Direto com relação ao microcultivo em lâmina?
 - b. Descreva as características macroscópicas das colônias e microscópicas dos **fungos** observados na aula prática.
 - c. Quais estratégias laboratoriais poderiam ser utilizadas para identificar a espécie dos fungos trabalhados na aula prática?
4. Referências

PRÁTICA 4 - GENÉTICA

1- Análise de Tétradas de Esporos

Saccharomyces cerevisiae possui um ciclo de vida bem definido com a fase haplóide e diplóide estáveis. Na fase haplóide existem dois tipos sexuais: tipo “a” e tipo “α”. O diplóide pode sofrer meiose em condições de estresse nutricional, como meio pobre em fonte de nitrogênio.

Cada grupo receberá microtubos contendo células de levedura e deverá identificar em quais ocorreu a meiose.

2- Transformação de *Saccharomyces cerevisiae* com DNA exógeno.

Saccharomyces cerevisiae é o organismo eucarionte mais manipulado geneticamente. Possui uma gama de vetores e estratégias de manipulação muito parecidas com *Escherichia coli*.

Embora similar ao procedimento bacteriano, a transformação de leveduras requer tratamentos adicionais com sais de lítio e polietileno glicol. Tais diferenças são decorrentes da presença da parede celular de quitina e β-glucanos típica dos fungos, que forma uma barreira para a entrada de DNA exógeno.

A seleção das células transformadas pode ser feita pelo simples critério de crescimento e formação de colônia em meio mínimo seletivo, pois somente as transformadas terão adquiridos alguma capacidade nutricional nova

Procedimento prático:

Cada grupo receberá um microtubo, tipo eppendorff, contendo 0.1ml de células W303-1B (*MAT α ade2-1, trp1-1, his3-115, leu2-3,112 ura3-1* de *S. cerevisiae* estando suspensas em 100mM acetato de lítio, 10mM Tris-Cl pH 7.5 e 0.1mM EDTA. A esse será adicionado o DNA exógeno a ser incorporado pelas células (no caso o plasmídeo recombinante (pMRX9-GPD) e DNA carrier obtido de salmão.

- 1 -Adicionar 10μl da mistura de DNA às células.
- 2-Adicionar 0,7ml de polietileno glicol a 40% (PEG-40%) em 100mM Acetato de Lítio (misturar por inversão, duas vezes)
- 3- Deixar na bancada sem mexer por 20min.
- 4-Transferir os tubos para 42°C por 10min.
- 5-Adicionar 0,5ml de H₂O em cada tubo;
- 6- Centrifugar a 13500rpm por 30 segundos.
- 7- Descartar o sobrenadante;
- 8- Adicionar 1ml de H₂O, fechar, inverter, descartar o TE e ressuspender com o que sobrar
- 9- Semear em meio mínimo seletivo apropriado.

3- Perguntas para o relatório?

- 1- Como se apresentam as células de *S. cerevisiae* após a meiose?
- 1- Quais as auxotrofias da linhagem utilizada no experimento de transformação? Qual a marca de seleção do plasmídeo transformante?
- 2- Como o meio mínimo deve ser suplementado a fim de garantir o crescimento somente das células que receberam o plasmídeo transformante?.
- 3- Qual o papel dos reagentes (acetato de lítio, carrier DNA, PEG 40%) e do choque térmico a 42°C utilizados no processo de transformação?

PRÁTICAS 5, 6, 7 e 8 - DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS MICOSES

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

Micoses superficiais

Pitiríasis versicolor - *Malassezia furfur*

Piedra preta - *Piedraia hortae*

Piedra branca - *Trichosporon beigeli*

Micoses Cutâneas

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

Candidíase - *Candida*

Micoses Subcutâneas

Esporotricose – *Sporothrix*

Cromomicose - *Phialophora*, *Cladophialophora* e *Fonsecaea*

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

Doença de Jorge Lobo - *Paracoccidioides lobo*

Micoses Sistêmicas endêmicas

Paracoccidioidomicose - *Paracoccidioides*

Histoplasmose - *Histoplasma capsulatum*

Outras Micoses Sistêmicas

Candidíase – *Candida*

Criptococose- *Cryptococcus*

Aspergilose – *Aspergillus*

Além das micoses, os fungos podem ainda produzir alergias, micotoxicoses e micetismos.

Diagnóstico laboratorial

Métodos diretos

1- Exame direto

a 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 para fontes de C e N.

Zimograma

Urease etc.

5- Provas imunológicas para identificação do agente

Métodos Indiretos

1- Imunológicos

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

PRÁTICA 5 – MICOSES SUSPERFICIAIS E CUTÂNEAS

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 abdômen. Atinge indistintamente todas as raças e mais freqüentemente adultos jovens.

Agente etiológico: *Malassezia* spp.

Características clínicas: Lesões superficiais, atingindo principalmente o tronco e abdômen, mas podendo acometer pescoço, face, braços, e raramente mão e região inguino crural. 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 pelos 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 pelos.

PIEDRA NEGRA

Agente etiológico: *Piedraia hortae*

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 pelos da barba e do bigode, mais raramente os pelos axilares. Recentemente observou-se ser comum em pelos escrotais. Os nódulos são menos consistentes e aderentes ao pêlo. São frequentemente 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 ascas.

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 arthroconídios.

FUNGOS PRODUTORES DE MICOSES CUTÂNEAS

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 nos seguintes gêneros:

Microsporum spp.

Trichophyton spp.

Epidermophyton spp.

Quanto ao habitat os dermatófitos podem ser:

geofílicos - quando têm seu habitat no solo.

zoofílicos - quando têm seu habitat 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 pelos e a presença de hifas septadas, ramificadas, com arthroconídios 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 = *tineacruris*; no corpo = *tineacorporis*; na barba = *tineabarbae*; na mãos = *tineamanum*; nos pés = *tineapedis*, na unha = *tineaunguium*; no couro cabeludo = *tineacapitis*.

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 oníquiassub-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).

PRÁTICA – micoses superficiais e cutâneas

I - Lâminas focalizadas/Pranchas e Culturas – Desenhar e fazer anotações a respeito das características macroscópicas e microscópicas.

Microsporia	Tricofícia
<i>Microsporum canis</i>	<i>Tricophyton rubrum</i>
<i>Microsporum gypseum</i>	<i>Tricophyton mentagrophytes</i>
Ptíriase versicolor	<i>Malassezia furfur</i>
Exame direto da PELE	

II – Técnica da Isca

Em uma placa de Petri estéril, dispensar a terra para análise, e em seguida, colocar os fios de cabelo estéreis sobre a terra. Molhar com água destilada estéril e incubar a 25-28° C e observar se há crescimento fúngico por até 21 dias.

Resultado:

II - Carpetes estéreis

Os alunos levarão para casa para coleta de material do animal de estimação. Com a mão friccionar o tapete na pelagem do animal. Levar o tapete no dia seguinte para processamento no laboratório de Micologia (ICBII - sala 247).

Resultado:

I – Urease – Demonstração

Roteiro para o Relatório: Experimento técnica da Isca e Tapete

1. Introdução
2. Materiais e Métodos
3. Resultados e Discussão
4. Referências

PRÁTICA 6 – MICOSES SUBCUTÂNEAS

MICOSES SUBCUTÂNEAS

ESPOROTRICOSE

Definição

Espécies do gênero *Sporothrix* 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 causadoras 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

Definição

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 marrom, 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 marrom-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 marrom.

PRÁTICA

Observe as lâminas focalizadas. Desenhe e descreva as características macroscópicas e microscópicas:

PRÁTICA 7 – MICOSES SISTÊMICAS I - Candidíase e Criptococose

CANDIDÍASE

Definição

Candidíase é uma infecção primária ou secundária envolvendo as espécies do gênero *Candida*. Pode-se considerar cerca de 7 espécies mais frequentes em material clínico humano: *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. Entretanto, espécies resistentes aos antifúngicos são emergindo como *C. auris* e *C. lusitaniae*. 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. Espécies de *Candida* são leveduras que fazem parte da microbiota, isto é, encontradas normalmente no homem e sua manifestação representa um processo oportunístico.

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

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:

- a 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*

1. Produção de clamidoconídios: em meio de fubá (“cornmeal ágar”+ tween 80), a *C. albicans* produz clamidoconídios terminais ou intercalares, redondos ou ovais, após 24-48 h.
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 as leveduras de *Cryptococcus* spp. são visualizadas como células redondas, circundadas por uma cápsula mucopolissacarídica 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 colora 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 DEMONSTRATIVA

- Lâmina de *Cryptococcus* sp. em tinta nanquim
- Lâmina de *Candida albicans* – levedura
- Lâmina de *Candida albicans* – tubo germinativo
- Lâmina de *Candida albicans* – clamidoconídeo
- Demonstração Auxanograma e Zimograma
- Demonstração Ensaio da urease

<i>Cryptococcus</i> sp.	<i>Candida albicans</i> – levedura
<i>Candida albicans</i> – tubo germinativo	<i>Candida albicans</i> – clamidoconídeo

PRÁTICA 8 - MICOSES SISTÊMICAS II - Paracoccidioidomicose e Histoplasmose

PARACOCCIDIOIDOMICOSE (PCM)

Definição

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 Gomori-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

HISTOPLASMOSE

Definição

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.

PRÁTICA DEMONSTRATIVA

- Lâmina a fresco de *Paracoccidioides* sp.
- Histologia de PCM
- Microcultivo de *Histoplasma capsulatum*
- Histologia de histoplasmose

<i>Paracoccidioides</i> sp.	Histologia de PCM
Histoplasma capsulatum - microcultivo	Histologia de histoplamose

PRÁTICA 9 - 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, análogos de pirimidinas (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 baixa seletividade, alta toxicidade e aumento de fungos resistentes aos antifúngicos.

O teste de susceptibilidade “in vitro” tem o objetivo de avaliar se o fungo filamentosos ou levedura é sensível ou resistente a um antifúngico. Embora este não seja um teste rotineiramente empregado na clínica médica, o ideal é a realização deste teste para melhor direcionar a escolha do tratamento antifúngico. Alguns casos refratários ao tratamento justificam teste de susceptibilidade aos antifúngicos. As cepas isoladas são testadas utilizando técnicas padronizadas contra os antifúngicos utilizados na clínica, principalmente no ambiente hospitalar (anfotericina B, fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, isavuconazol, 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). No Brasil, o Comitê Brasileiro para Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (BrCAST) tem padronizado os ensaios de acordo com a realidade brasileira. Para os testes de sensibilidade aos antifúngicos é preconizado o uso dos protocolos BrCAST - EUCAST que estão disponíveis em português no site: www.brcast.org.br. Esses protocolos bem como os critérios de interpretação tem sido atualizados de tempos em tempos. 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 das novas moléculas com os antifúngicos padrão. Para uma boa execução do ensaio, é necessário realizar o controle de qualidade do teste, 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 concentração inibitória mínima (CIM) para a tal cepa. 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

PRÁTICA

I - TÉCNICA DE MACRODILUIÇÃO EM CALDO – Testes de Susceptibilidade de fungos aos antifúngicos padrão

Materiais

Suspensão de leveduras de *Candida* sp. (5×10^6 leveduras/mL).

Solução estoque de Anfotericina B (160 $\mu\text{g/mL}$)

Solução estoque de Fluconazol (160 $\mu\text{g/mL}$)

Tubos com 0,9 mL de caldo Sabouraud

Tubos com 0,5 mL de caldo Sabouraud

Concentrações a serem testadas:

Anfotericina B: 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 e 0,25 $\mu\text{g/mL}$

Fluconazol: 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 e 0,25 $\mu\text{g/mL}$

Controle positivo: crescimento de fungo

Controle negativo: ausência de crescimento de fungo

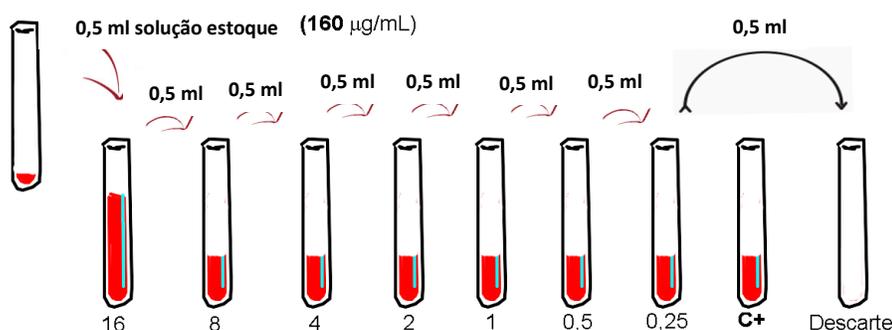
Procedimento:

Em série de 8 tubos de meio de cultura (1º tubo: 0,9 mL e os demais 0,5 mL)

Proceder da seguinte maneira:

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

0



5. O penúltimo tubo conterá somente o meio de cultura para o controle positivo de crescimento fúngico (C+), e o último tubo conterá somente o meio de cultura (C-)
6. Após a diluição do antifúngico, transferir **10 μL** da suspensão de fungo em **todos** os tubos, EXCETO no C-.
7. Incubar a série de tubos a 35°C por 24 h para *Candida* spp.
8. Determinar o valor de CIM para cada antifúngico por meio de Leitura Visual

RESULTADOS - Macrodiluição em caldo

Para a interpretação dos resultados usar a Tabela 1.

Tabela 1. Diretrizes de interpretação dos testes de susceptibilidade “in vitro” de *Candida* spp. aos antifúngicos (Adaptado do BrCAST, 2022).

Antifúngicos	Ponto de Corte para CIM (mg/L)									
	<i>C. albicans</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. tropicalis</i>	
	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >
Anfotericina B	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fluconazol	2	4	0,002	32	-	-	2	4	2	4
Micafungina	0,016	0,016	0,032	0,032	IE ⁴	IE ⁴	0,002	2	IE ⁴	IE ⁴
Voriconazol⁶	0,064 ⁵	0,25 ⁵	IE	IE	IE	IE	0,125 ⁵	0,25 ⁵	0,125 ⁵	0,25 ⁵

C. krusei tem resistência intrínseca ao fluconazol.

Experimento 1:

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 = _____ µg/mL

Interpretação: _____

Experimento 2:

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 = _____ µg/mL

Interpretação: _____

Roteiro para o Relatório:

1. Introdução
2. Materiais e Métodos
3. Resultados e Discussão
4. Referências