

Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica

Módulo VII

ÍNDICE

1. Introdução	1
Fungos e infecção hospitalar	1
2. Coleta e transporte de amostras	4
Procedimentos para coleta de amostras	4
3. Processamento de amostras	6
Exame microscópico de amostras	6
Cultura de amostras biológicas para isolamento de fungos	8
4. Identificação de fungos.....	12
Identificação de leveduras	12
Identificação de fungos filamentosos.....	16
Identificação de fungos dimórficos	18
5. Descrição das principais micoses	20
6. Referências bibliográficas	24

GLOSSÁRIO

Artrósporo ou artroconídio = esporo formado pela desarticulação da hifa de fungos filamentosos ou leveduras.

Blastosporo ou blastoconídio = esporos formados por brotamento ou gemulação.

Bolor = fungo filamentoso, multicelular, constituído de hifas.

Brotamento ou gemulação = reprodução com divisão de citoplasma através de estrangulamento.

Cenocítica = hifa desprovida de septos, o mesmo que hifa contínua.

Clamidósporo = estruturas de resistência, constituídas de reserva nutritiva e membrana bastante espessa, permitindo resistir aos fatores externos, semelhante aos esporos.

Conídio = esporo assexuado externo.

Dimórfico = que apresenta duas formas: leveduriforme e filamentosa.

Esporângio = órgão de reprodução assexuada interna, geralmente em forma de vesícula e contém inúmeros esporos denominados de esporangiosporos.

Hialino = que não tem cor, translúcido, assumindo a cor do corante utilizado.

Hifa = reunião de células justapostas, formando estrutura tubular, filamentosa, que compõe o corpo vegetativo dos bolores e de alguns gêneros de leveduras (por ex, *Candida* spp.).

Demácio ou demaciáceo = fungos negros que têm pigmento melanóide (acastanhado), na parede celular.

Levedura = fungo em regra, unicelular que se reproduz geralmente por brotamento.

Tuberculado = com granulações ou nodosidades.

1. INTRODUÇÃO

FUNGOS E INFECÇÃO HOSPITALAR

Fungos são seres dispersos no meio ambiente, em vegetais, ar atmosférico, solo e água e, embora sejam estimados em 250 mil espécies, menos de 150 foram descritos como patógenos aos seres humanos. Leveduras são fungos capazes de colonizar o homem e animais e, frente à perda do equilíbrio parasita-hospedeiro, podem causar diversos quadros infecciosos com formas clínicas localizadas ou disseminadas. De modo contrário, fungos filamentosos, ou bolores, normalmente, não fazem parte da microbiota animal e portanto o homem não é um reservatório importante para esse grupo de fungos. As portas de entrada no hospedeiro são as vias aéreas superiores ou quebra na barreira epidérmica após traumatismos com objetos perfuro-cortantes.

Dentre as centenas de espécies descritas, leveduras do gênero *Candida* são os maiores agentes de infecção hospitalar e representam um desafio para a sobrevivência de pacientes com doenças graves e aqueles em período pós-operatório. Hospitais norte-americanos com sistema de vigilância operante, notificaram *Candida* como 6º patógeno nosocomial e a 4ª causa mais comum de infecções de corrente sanguínea, adquiridas em hospitais.

A manifestação clínica mais comum nas candidíases hospitalares é febre. Candidemia pode ser definida como a ocorrência de 2, ou mais, culturas positivas para a mesma espécie de *Candida*, provenientes de amostras diferentes, coletadas após 72 h da admissão. Infecção invasiva por *Candida* pode ser também considerada quando há isolamento de *Candida* a partir de sítio normalmente, estéril associado a pelo menos, um outro sinal de infecção. A sensibilidade de hemocultura para *Candida* é baixa; aproximadamente, 50% dos pacientes com infecção invasiva por *Candida* podem ter culturas negativas. Além disso, se houver infecção bacteriana concomitante, pode diminuir a chance do isolamento de *Candida*.

Os fatores reconhecidos de risco para infecção invasiva por *Candida* são:

- Permanência > 4 dias em UTI
- Antibioticoterapia de largo espectro
- Cirurgia abdominal
- Cateterização venosa central
- Nutrição parenteral total
- Imunodepressão
- Índice APACHE II > 10
- Ventilação mecânica > 48h
- Neutropenia
- Quimioterapia citotóxica

Frente a estas condições recomenda-se monitoração com exames micológicos sangue de amostras biológicas dos pacientes, tais como, sangue, escarro, pontas de catéteres intravasculares, líquido peritoneal e urina. Culturas positivas para leveduras podem significar apenas colonização mas, podem conduzir à doença invasiva subsequente. Estudo prospectivo, em pacientes cirúrgicos de UTI, mostrou que 38% de 29 pacientes desenvolveram infecção após colonização. A colonização pode ser demonstrada por análise de 3 ou mais amostras, coletadas do mesmo local ou de sítios diferentes, do mesmo paciente, em dias consecutivos.

Diferentes espécies de *Candida* podem causar quadros de fungemia, a saber: *Candida glabrata* (*Torulopsis glabrata*), *Candida tropicalis*; *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida lusitanae*, *Candida lipolytica*, *Candida kefyr*, *Candida inconspicua*, *Candida norvergensis* e *Candida catenulata*. Um grupo europeu realizou na década de 90 um estudo multicêntrico e, por análise univariada, concluíram ser *C. glabrata*, a espécie associada à maior taxa de mortalidade e que óbito estava relacionado com maior idade e severidade da doença de base do paciente.

O gênero *Candida* é, sem dúvida o mais importante mas, existem outras leveduras no ambiente hospitalar, tanto em vegetais, ar atmosférico e água, quanto na pele e no trato gastrointestinal dos pacientes e funcionários, que podem causar quadros infecciosos. Os principais gêneros são *Pichia sp* (*Hansenula sp*), *Rhodotorula sp* e *Trichosporon sp*.

Fungos filamentosos presentes no meio ambiente hospitalar, também podem causar infecção em pacientes suscetíveis. O gênero *Aspergillus sp* (*Aspergillus terreus*, *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. niger*) é o mais citado na literatura como fungo oportunista, especialmente em pacientes transplantados de medula óssea e neutropênicos. A inalação de esporos é a via mais comum de transmissão e os surtos de aspergilose são associados a reformas e construções, dentro e ao redor de hospitais. Doença pulmonar e, mais raramente, sinusite, são as manifestações de aspergilose. Outros gêneros, tais como *Fusarium sp*, *Acremonium sp* e *Penicillium sp* são capazes de causar formas localizadas ou disseminadas de infecção hospitalar. Estes gêneros que são dispersos pelo ar atmosférico, pertencem ao grupo dos hialohifomicetos, pois têm hifas hialinas e septadas. Outros grupos de fungos filamentosos, como zigomicetos (*Rhizopus sp*, *Mucor sp*), caracterizados por hifas não-septadas (cenocíticas) e alguns feo-hifomicetos ("fungos negros" ou demácios) que têm hifas amarronzadas, podem também ser agentes de infecção hospitalar.

GENERALIDADES SOBRE FUNGOS

Os fungos de interesse médico, agentes de micoses, são de dois tipos morfológicos: leveduras, que são unicelulares e bolores ou fungos filamentosos, que são multicelulares (Fig.1). Existe um subgrupo dentro dos filamentosos, chamados fungos dimórficos, que se apresentam sob ambas as formas, dependendo principalmente da temperatura, mas sob influência também do teor de CO₂ e condições nutricionais.

As leveduras têm como estrutura primária, células que se reproduzem por brotamento, único ou múltiplo, em geral, de forma arredondada. Estas células são esporos de origem assexual e se denominam blastocônídios. Alguns gêneros de leveduras menos importantes em micologia médica, reproduzem-se por fissão.

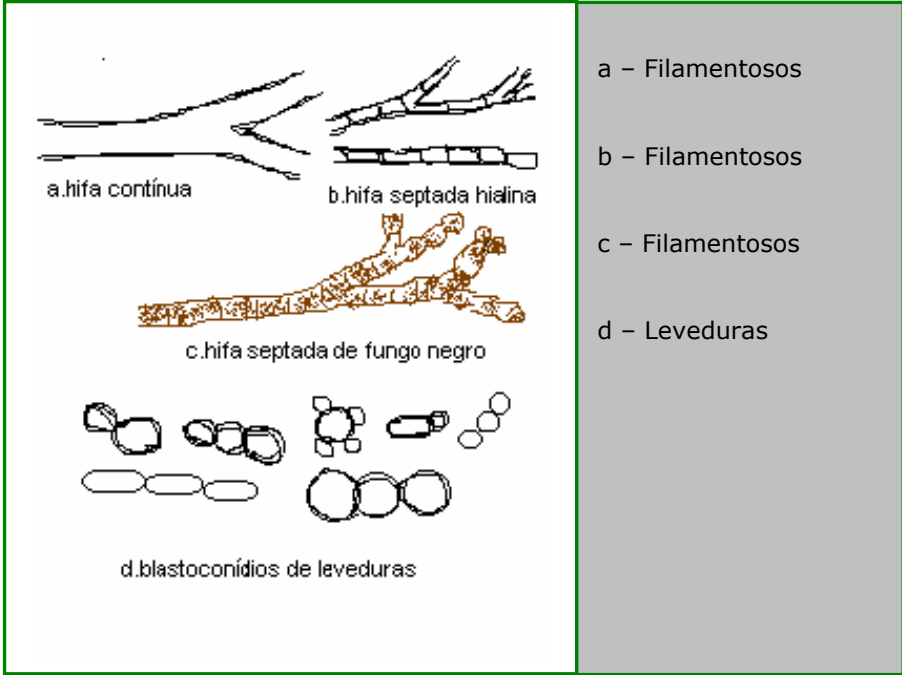
Os fungos filamentosos possuem como elemento constituinte básico a hifa, que pode ser septada ou não septada (cenocítica). A partir da hifa formam-se esporos, para propagação das espécies. Na grande maioria dos fungos, os esporos podem ser chamados de conídios, pois nascem diretamente delas ou sobre estruturas ligas a elas.

Esses conceitos fundamentais representam a base para a identificação de um fungo, pois a classificação de filamentosos é feita, em regra, pelas características morfológicas, tanto macroscópicas (cor, aspecto, textura da colônia, etc.), quanto microscópicas (forma e cor da hifa, presença ou não de septos, tipo e arranjo de esporos, etc.), além da velocidade de crescimento (lenta, moderada ou rápida). A identificação de leveduras, ao contrário, é feita, principalmente, por características fisiológicas, desde que, a morfologia destes fungos não é muito variada e não permite distinção entre espécies e, em regra, entre gêneros.

Com o advento da terapia com antibióticos de largo espectro e o tratamento de pacientes com doenças metabólicas crônicas, neoplásicos e transplantados, em uso de agentes citotóxicos e imunossupressores, além da AIDS, a diferença entre fungos contaminantes e patogênicos (classicamente os agentes de micoses superficiais, subcutâneas e profundas), tornou-se pouco clara. Agentes como *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus* e espécies de zigomicetos, considerados antigamente, como contaminantes de laboratório e, portanto, de pouca importância clínica, são agora conhecidos como causadores de enfermidades disseminadas, endocardites, infecções pulmonares, ceratites entre outras, em pacientes imunodeprimidos. Portanto, estes fungos devem ser considerados, além dos patógenos clássicos, como por ex., *Paracoccidioides brasiliensis* e *Histoplasma capsulatum*, como possíveis agentes de quadros infecciosos.

Neste módulo, será apresentada uma visão geral das principais infecções fúngicas, de modo que, os microbiologistas possam adquirir certa habilidade para identificar fungos isolados de amostras biológicas. Para um estudo mais completo sobre diagnóstico de infecções fúngicas, recomenda-se as referências citadas ao final do capítulo.

Estruturas microscópicas básicas de fungos: a, b, c - filamentosos, d - leveduras



2. COLETA E TRANSPORTE DE AMOSTRAS

O tipo e a qualidade da amostra biológica, submetida ao laboratório de micologia, são fatores importantes no sucesso do isolamento e identificação do verdadeiro agente etiológico de infecções fúngicas.

A amostra deve ser submetida ao exame microscópico direto e cultura em meios para isolamento e identificação acurada do agente etiológico. Por isso, a assepsia na coleta e o volume da amostra são fatores básicos para o sucesso do diagnóstico da infecção.

RECOMENDAÇÕES GERAIS DE COLETA E TRANSPORTE DE AMOSTRAS

- Coletar a amostra biológica com assepsia e colocá-la em recipiente estéril e vedado, sempre em quantidade suficiente (≥ 2 ml ou $0,5$ cm³) para permitir todos os procedimentos laboratoriais necessários.
- Os "swabs" usados para coleta de material de ouvido, nasofaringe e orofaringe, secreção vaginal e lesões abertas, devem ser colocados em tubos contendo salina estéril para o transporte, de modo a evitar a dessecação da amostra.
- Sempre que possível, coletar amostras antes do início da terapia específica e, particularmente, para lesões cutâneas de pele e unhas, orientar o paciente para evitar uso de medicação tópica por 4 a 5 dias antes da coleta de escamas.
- A amostra deve ser identificada com nome do paciente, número de registro hospitalar (quando for o caso), tipo de amostra e data da coleta.
- A requisição médica que acompanha a amostra, deve conter, sempre que possível, as hipóteses diagnósticas que auxiliarão o micologista na escolha da coloração e do meio de cultura mais adequado para o isolamento do agente etiológico.
- Em pacientes imunodeprimidos ou muito debilitados o estudo de um mesmo tipo de amostra biológica, coletada em 2 ou 3 dias consecutivos, é importante para a interpretação correta de resultados positivos para fungos considerados como saprófitas, ou seja, contaminantes do meio ambiente, ou mesmo, constituinte da microbiota normal do paciente. Nestes pacientes, os fungos saprófitas podem se tornar oportunistas e comportarem-se como patógenos.
- Os materiais ditos contaminados, tais como urina, fezes, pús, secreções de feridas ou trato respiratório, devem ser enviados, sob gelo, ao laboratório, o mais rápido possível (<2 h).
- Líquor e líquidos cavitários devem ser mantidos à temperatura ambiente e encaminhados com urgência ao laboratório para processamento imediato.
- Sangue e material de punção de medula óssea são os únicos materiais biológicos que devem ser semeados diretamente, em frascos contendo meio de cultura líquido ou bifásico (líquido sobre sólido), de modo a evitar coagulação e conseqüente diminuição da sensibilidade do exame.

PROCEDIMENTOS PARA COLETA DE AMOSTRAS

Escarro	Recolher, de preferência, a primeira expectoração da manhã, após gargarejo com água limpa ou fervida, em frasco de boca larga, esterilizado. Não deve conter saliva.
Aspirado gástrico	Aspirar cerca de 5 a 10 ml de suco gástrico, através de sonda nasogástrica, pela manhã, em jejum.
Aspirado traqueal e secreção obtida por broncoscopia	Procedimento realizado por médico treinado. O material colhido deve ser colocado em recipiente estéril.
Sangue e aspirado de medula óssea	Fazer assepsia rigorosa no local da punção e coletar cerca de 5 a 6 ml de sangue venoso, que deverá ser injetado diretamente, em frasco contendo meio de cultura (ver detalhes no próximo ítem). A última gota de material deve ser distendida em uma lâmina de microscopia, para coloração de Giemsa.

Líquor	Fazer assepsia rigorosa no local da punção. Coletar 2 ml ou mais, para exame microscópico e cultura para fungos. Os tubos na rotina hospitalar, devem ser usados na seguinte sequência: 1º exame bioquímico, 2º exame de celularidade, 3º microbiológico, reduzindo assim a possibilidade de isolamento de contaminantes da pele. Entretanto, a coleta da amostra em tubos específicos para cada um desses exames, aumenta a sensibilidade do exame micológico e, por isso, deve ser recomendada.
Tecido obtido por biópsia, necrópsia e peças operatórias	Colher assepticamente, utilizando instrumentos estéreis e colocar o material em recipiente estéril, com salina. Não adicionar nenhum líquido fixador.
Urina	A amostra biológica mais apropriada para o diagnóstico de micose do trato urinário é obtida por sondagem ou citoscopia. Quando não for possível, e para evitar contaminação com microrganismos presentes nas áreas vizinhas, fazer limpeza prévia da região perineal com água e sabão, desprezar o primeiro jato de urina da manhã, e colher 3 a 5 ml de urina em tubo de ensaio estéril. Coleções de 24 horas, não têm valor para diagnóstico micológico.
Fezes	Fazer lavagem prévia da região anal com água e sabão, coletar porções de fezes em recipiente estéril com tampa ou "swab" anal, mergulhar o "swab" em salina estéril e enviar o tubo ao laboratório.
Secreção ou pele de conduto auditivo externo	Colher material por curetagem da lesão ou com "swab" estéril. Mergulhar o "swab" umedecido em salina estéril e enviar o tubo ao laboratório.
Material de micose ocular	O melhor método para recuperação de fungos, requer raspado de córnea, aspiração de líquido intra-ocular ou biópsia. A coleta com auxílio de "swab" não é indicada em local de drenagem.
Lesão de nariz e seios paranasais	Coletar secreção, material necrótico ou tecido obtido por biópsia em recipiente estéril.
Mucosa oral e orofaringe	Coletar com "swab" estéril o material de lesão de mucosa jugal, papilas linguais ou região tonsilar. Mergulhar o "swab" umedecido em salina estéril e enviar o tubo ao laboratório.
Secreção vaginal	Com auxílio de espéculo, coletar material da lesão ou do fundo de saco vaginal com "swab" estéril. Mergulhar o "swab" umedecido em salina estéril e enviar o tubo ao laboratório.
Líquidos corporais (pleural, ascítico, pericárdico, sinovial)	Fazer assepsia rigorosa no local da punção. Coletar cerca de 5 a 10mL de líquido em tubo de ensaio estéril.
Pus e material de abscesso	Devem ser colhidos de preferência, por aspiração de abscessos fechados, com seringa e agulha estéril. Se a lesão for aberta, limpar o local, com gaze esterilizada embebida em salina estéril, para eliminar os exsudatos superficiais que são altamente, contaminados com bactérias. A seguir, colher o material com "swab". Mergulhar o "swab" umedecido em salina estéril e enviar o tubo ao laboratório.
Pele e pelos	Se possível, descontaminar a pele com álcool 70% antes da coleta. Raspar com lâmina de bisturi as escamas cutâneas da borda das lesões. Pode-se utilizar também, uma lâmina de microscopia. Colocar o material entre duas lâminas limpas, de preferência esterilizadas, vedando-se as bordas das lâminas com fita adesiva para evitar perda do material. Os pelos tonsurados, devem ser retirados com pinça estéril e acondicionados entre lâminas ou em potes, de preferência esterilizados.
Unhas	Fazer limpeza prévia das unhas, escovando com água e sabão. Cortar com tesoura e desprezar a parte descolada da unha e, com lâmina de bisturi, raspar as áreas mais profundas e pulverulentas. Colocar este material entre lâminas e vedá-las com fita adesiva.

3. PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS

O sucesso na visualização e isolamento do agente etiológico depende, além da coleta e transporte adequados e volume suficiente da amostra, de seu processamento correto antes do exame micológico. As seguintes recomendações devem ser cuidadosamente, seguidas para boa resolução diagnóstica:

- **Pelos, cabelos, escamas de unha e pele** devem ser alíquotadas para exame microscópico e cultura pois, para exame são clarificadas com solução aquosa de KOH a 20% e, para cultura, não podem sofrer nenhum tratamento prévio, sendo por isso, inoculadas diretamente na superfície do meio de cultura.
- **Líquor, secreções e fluídos corporais** (líquido pleural, ascítico, sinovial, pericárdico, aspirado transtraqueal, lavado gástrico e broncoalveolar [BAL]) devem ser concentrados por centrifugação (1500 a 2000 rpm por 10 minutos). Os materiais coletados com "swabs" devem ser eluídos em solução salina e também devem ser centrifugados. O sedimento obtido é o material adequado para o exame microscópico e semeadura em meios de cultura.
- Para **urina**, é recomendável que uma alíquota (alça calibrada) seja semeada, por esgotamento, sobre o meio de cultura distribuído em placa de Petri, para exame quantitativo, pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). A outra alíquota deve ser centrifugada (1500 a 2000 rpm por 10 minutos) e o sedimento será utilizado para exame microscópico e nova semeadura em tubo (cultura qualitativa).
- **Escarro** pode ser digerido com enzima (v/v) N-acetil-L-cisteína (250 mg de enzima dissolvidas em 1 L de solução-tampão citrato ou solução fisiológica), que fluidifica e facilita a manipulação da amostra e formação de sedimento após centrifugação. Porém, não foi comprovado que esse tratamento melhore a recuperação de fungos da amostra sendo, portanto, opcional. Pode-se utilizar, como alternativa, para digestão da amostra, solução de KOH 20%. A porção purulenta da amostra é preferível e porções líquüefeitas não são adequadas para isolamento do agente. A porção da amostra tratada com KOH, porém, só pode ser usada para exame microscópico, pois a potassa destrói, após algumas horas, as estruturas do fungo, inviabilizando seu isolamento em meio de cultura. Neste caso, outra porção da amostra deve ser centrifugada e o sedimento usado para cultura.
- **Tecidos** obtidos por **biópsia** requerem fragmentação, com o auxílio de um bisturi estéril ou maceração (gânglio) com pistilo em almofariz; pode ser feito dentro de uma placa de Petri estéril. Esse procedimento visa aumentar a área de superfície e expor o microrganismo ligado ao tecido, ao maior contato com o meio de cultura.
- **Sangue e aspirado de medula óssea** não necessitam preparação, sendo que o exame microscópico tem baixa sensibilidade e, portanto a cultura é importante para identificação do agente. Para cultura, as amostras são semeadas imediatamente, após a coleta, em frascos contendo meio de cultura. O meio pode ser bifásico (15 ml de ágar inclinado sob 50 ml de caldo) composto de infusão de cérebro-coração (meio BHI) ou Sabouraud. Meios contendo saponina para lise e posterior centrifugação da amostra são indicados. Na prática, frascos para hemocultura bacteriológica (simples ou automatizada), proporcionam isolamento adequado de fungos, desde que respeitado os períodos necessários ao seu desenvolvimento. Para fungos dimórficos, de crescimento lento (>15 d), muitos autores consideram o método de lise-centrifugação o mais sensível. O sangue e medula óssea não devem ser coletados em seringas contendo EDTA, pois esta substância se combina com elementos da parede dos fungos, diminuindo a sensibilidade do exame. Um dos procedimentos recomendados para é a inoculação de 5 a 6 ml da amostra no frasco com meio bifásico sendo, uma parte para 10 partes do meio líquido, que deve ser então, incubado à temperatura de 30°C.

EXAME MICROSCÓPICO DE AMOSTRAS

A observação de um fungo na amostra biológica tem grande valor diagnóstico pois demonstra a invasão do fungo no tecido e permite uma informação imediata ao médico, a qual pode ser crucial para determinar a terapia apropriada ao paciente. No entanto, se a quantidade da amostra biológica for insuficiente para o exame microscópico e cultura do material, a cultura, na maioria das amostras, tem prioridade sobre o exame microscópico, desde que é método mais específico e em muitos casos, mais sensível. O exame microscópico da amostra é realizado por várias técnicas, dependendo do tipo da amostra e suspeita clínica.

EXAME MICROSCÓPICO DIRETO COM HIDRÓXIDO DE POTÁSSIO (KOH) A 20%

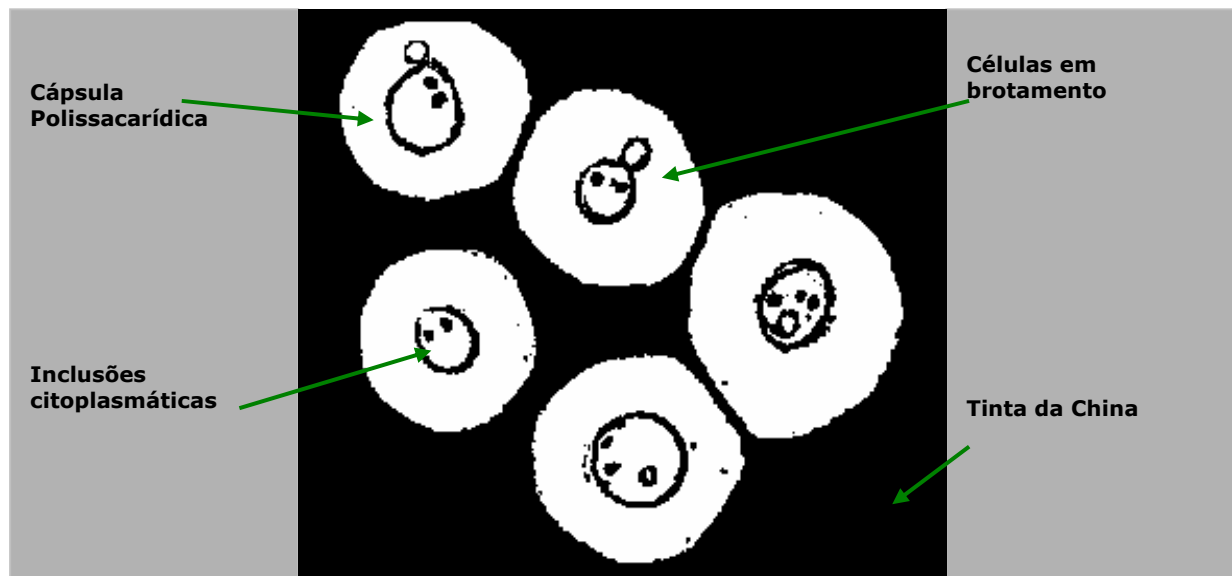
É usado para exame de pelos, pele, unha, tecido obtido por biópsia, exsudatos espessos e outros materiais densos. Colocar uma gota de KOH (aquoso a 20%) em uma lâmina de microscopia e sobre esta, uma porção da amostra a ser examinada. Cobrir a preparação com uma lamínula e, para intensificar a clarificação, aquecer ligeiramente, sobre a chama de um bico de Bunsen, sem deixar ferver a mistura. Examinar a preparação após 20 minutos, em microscópio óptico comum, inicialmente, com objetiva de 10x, seguida de 40x.

EXAME MICROSCÓPICO DIRETO COM TINTA NANQUIM (TINTA DA CHINA)

Utilizada em amostras de líquido, urina, secreções ou exsudatos, para visualização de leveduras capsuladas do gênero **Cryptococcus**, que se tornam mais evidentes contra o fundo negro proporcionado pela tinta.

Colocar uma gota de tinta nanquim e uma gota do sedimento da amostra centrifugada, sobre uma lâmina. Cobrir a preparação com lamínula e observar ao microscópio óptico (objetivas de 10x e 40 x). Nesta técnica, um erro bastante frequente é confundir linfócitos com células de leveduras. A diferenciação é feita pela refringência da parede celular e das inclusões no citoplasma das leveduras, além da presença de brotamentos.

Cryptococcus sp: leveduras em brotamento rodeadas de halo transparente (cápsula polissacarídica), sobre fundo negro formado pela tinta nanquim



EXAME MICROSCÓPICO COM COLORAÇÃO PELO MÉTODO DE GRAM

Todos os fungos são Gram- positivos, assim a utilização da coloração não visa a diferenciação dos microrganismos, mas possibilita discriminar elementos fúngicos de artefatos existentes em urina, secreções e fezes. A amostra é espalhada de modo homogêneo, em movimentos circulares, em uma lâmina de microscopia, fixada com calor e submetida à coloração.

EXAME MICROSCÓPICO COM COLORAÇÃO PANÓTICA (GIEMSA, LEISHMAN OU WRIGHT)

Estas colorações são usadas para pesquisa de *Histoplasma capsulatum* em diversas amostras biológicas: medula óssea, sangue, aspirados e secreção cutânea. Nestes casos, faz-se um esfregaço semelhante ao usado para coloração de Gram. Fixa-se com metanol e cora-se segundo o método escolhido. Podem ser usadas ainda, para corar "imprints" de tecidos obtidos por biópsia.

Abaixo estão esquematizados os principais aspectos morfológicos observados ao exame microscópico e os possíveis agentes etiológicos de acordo com a amostra biológica.

Interpretação de aspectos morfológicos encontrados em exames microscópicos de amostras biológicas

Amostra biológica	Aspecto Morfológico	Interpretação
Pelos	a. Hifas hialinas e/ou artrosporos (1)	a. Dermatófitos
Unhas, escamas de pele	a. Hifas regulares, septadas, ramificadas, hialinas, artrosporadas (1) b. Leveduras e pseudohifas c. Grupo de leveduras e/ou pequenas hifas tortuosas, hialinas (1)	a. Dermatófitos b. <i>Candida spp</i> c. <i>Malassezia sp</i>
Líquor	a. Levedura capsulada (2)	a. <i>CRYPTOCOCCUS SP</i>
Secreções (trato respiratório, vaginal, nasal, oral, naso-faringe)	a. Hifas ramificadas, hialinas, septadas (3) b. Levedura capsulada (2) c. Levedura e pseudohifa (1,3) d. Leveduras globosas ou multiformes, de parede espessa, inclusões citoplasmáticas, com múltiplos brotamentos (1)	a. Fungos filamentosos hialinos (5) b. <i>CRYPTOCOCCUS SP</i> c. <i>Candida spp</i> d. <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
Tecidos, pus e aspirados (subcutâneo, ganglionar, cerebral, pulmonar, mucosa ou outro)	a. Hifas irregulares, largas, cenocíticas (1,3) b. Hifas ramificadas, hialinas, septadas (1,3) c. Hifas septadas de cor castanha ou marrom (1,3) d. Estruturas ovaladas, com ou sem septos, de cor castanha (estruturas muriformes) (1) e. Levedura e pseudohifa (1,2) f. Levedura capsulada (2) g. Levedura globosa ou ovóide, de parede espessa, inclusões citoplasmáticas, com brotamento único ou múltiplos (1) h. Leveduras pequenas, tipo charuto (achado muito raro) (3) i. Leveduras pequenas em macrófagos (4)	a. Zigomicetos b. Fungos filamentosos hialinos(5) c. Feohifomicetos (fungos demácios) d. Cromomicetos (agentes de cromomicrose) e. <i>Candida spp</i> f. <i>CRYPTOCOCCUS SP</i> g. <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> h. <i>Sporothrix schenckii</i> i. <i>Histoplasma capsulatum</i>
Fluídos oculares	a. Fragmentos de hifas, hialinas, septadas (1,3) b. Leveduras e pseudohifas (1,3)	a. Fungos filamentosos hialinos (5) b. <i>Candida spp</i>
Sangue e medula óssea	a. Fragmentos de hifas ramificadas, hialinas, septadas (3,4) b. Levedura capsulada (2) c. Leveduras em brotamento (3,4) d. Leveduras pequenas em macrófagos (4)	a. Fungos filamentosos (5) b. <i>CRYPTOCOCCUS SP</i> c. Leveduras (6) d. <i>Histoplasma capsulatum</i>

(1) Exame microscópico com KOH

(2) Exame microscópico com tinta nanquim

(3) Exame microscópico com coloração de Gram

(4) Exame microscópico com coloração de Giemsa ou panótica

(5) São fungos saprófitas que podem se tornar oportunistas, por ex. ***Aspergillus*, *Fusarium*, *Acremonium***, cuja identificação só é possível pela cultura.

(6) No sangue, leveduras do genero ***Candida*** não formam pseudohifas e a identificação de gênero e espécie é possível somente, após isolamento em meio de cultura.

CULTURA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS PARA ISOLAMENTO DE FUNGOS

A amostra, após o processamento, poderá ser usada para isolamento do agente etiológico. Para tanto, deverá ser semeada em movimentos de estrias (zig-zag) sobre a superfície de meios sólidos de cultura, distribuídos em alíquotas de 12 a 20 ml, dentro de tubos de ensaio tamponados com tampão hidrófilo.

MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura utilizados para o isolamento primário de fungos, a partir de amostras biológicas, podem ser adquiridos no comércio, sob a forma desidratada, não precisando ser formulados no laboratório. Após a hidratação, conforme instruções do fabricante, o meio deve ser distribuído, de preferência, em tubos e esterilizados por autoclavação.

Para ágar, recomenda-se a solidificação com tubo inclinado, deixando espaço de 3 cm do final do meio até o tampão, para evitar contaminação via meio externo. Todos estes meios de cultura são distribuídos e esterilizados, de preferência em tubos de ensaio pois, desta forma, há maior resistência à desidratação e contaminação, além de oferecer menor bio-risco na manipulação da cultura.

O armazenamento dos tubos, contendo meios de cultura, deve ser em saco plástico fechado, dentro de armários, à temperatura ambiente. Desse modo, se houver uma contaminação durante o tempo de armazenamento, as colônias de fungos contaminantes serão facilmente observadas, ao contrário do que ocorre, quando se armazena sob refrigeração. O controle de esterilidade deve ser feito por 7 dias, à temperatura ambiente, antes do uso de qualquer meio de cultura.

Para isolamento de fungos a partir de qualquer tipo de amostra, devem ser utilizados **meios não seletivos**, que permitam crescimento de fungos patogênicos e bolores de crescimento rápido (\leq de 7 dias). Estes fungos, apesar de serem contaminantes de meio ambiente, podem ser agentes de micoses em pacientes suscetíveis, ou seja, são potencialmente, oportunistas. O isolamento desses fungos, em meio de cultura está sendo, cada vez mais, importante para diagnóstico laboratorial das infecções ditas oportunistas.

O meio básico em laboratório de micologia é o ágar Sabouraud dextrose (ASD), chamado simplesmente, ágar Sabouraud. Em regra, usa-se um antibiótico para impedir o crescimento de bactérias que poderiam prejudicar o isolamento de fungos. O cloranfenicol é o mais indicado, pois resiste à autoclavação. Pode ser colocado tanto no ASD como em outros meios de cultura para fungos.

Meios ditos seletivos para fungos patogênicos, contém cicloheximida que inibe parcialmente, ou totalmente, fungos anemófilos. Estes meios são indicados para cultivo de materiais coletados de lesões com suspeita de dermatofitose, para aumentar a sensibilidade no isolamento de dermatófitos. Mas, deve-se ressaltar que esta substância poderá inibir o isolamento de fungos oportunistas, como ***Aspergillus sp***, além de ***Histoplasma capsulatum*** na fase leveduriforme e certas leveduras patogênicas dos gêneros ***Candida*** e ***Cryptococcus***.

Existem meios presuntivos que indicam presença de certos grupos de fungos ou determinados gêneros, como por ex., ágar contendo compostos fenólicos para ***Cryptococcus sp*** (ágar contendo sementes de niger ou *Guizzotia absinica*), ou ágar especial para dermatófitos (*Dermatophyte Test Medium*). Existem ainda, meios presuntivos, por reação enzimática e colorimétrica, de espécies de *Candida spp* (*Candida Medium*, *ChromAgar*, *Biggy Agar*, etc). São meios mais caros que ASD e além disso, sua maior aplicação é no isolamento primário de leveduras, a partir de amostras biológicas muito contaminadas, tais como: secreção vaginal, fezes e urina. A identificação, no entanto, é feita somente, após análise morfológica e fisiológica.

Para isolamento ou subcultivo de dermatófitos recomenda-se o ágar batata, encontrado no comércio, sob forma desidratada, para aumentar a esporulação e facilitar a identificação do gênero e espécie do fungo. Para fungos dimórficos, de crescimento lento (\geq 15 dias), recomenda-se o uso de meios enriquecidos como o ágar infusão de cérebro-coração (BHI) para obtenção, em menor tempo, de culturas melhor desenvolvidas. Pode ser acrescido de 5 a 10% de sangue de carneiro e de antibióticos (de preferência, cloranfenicol ou penicilina e estreptomicina).

O meio de cultura pode ser selecionado segundo: tipo de amostra e agente etiológico, conforme a suspeita clínica. De acordo com os aspectos observados ao exame microscópico da amostra, pode-se ainda, redirecionar o procedimento para isolamento do agente. Recomenda-se sempre 2 tubos de meio para sementeira da amostra biológica, os quais deverão ser incubados à temperatura de 30°C, usada atualmente, para todos os tipos de amostras.

ÁGAR SABOURAUD-DEXTROSE (ASD)

Dextrose	40 g
Peptona	10 g
Ágar	15 g
água destilada	1000 ml

- Dissolver os componentes na água destilada.
- Acertar o pH em 5,6 .
- Aquecer até a completa dissolução.
- Distribuir cerca de 10 ml por tubo.
- Esterilizar em autoclave a 120°C por 15 minutos.

ÁGAR SABOURAUD-DEXTROSE COM CLORANFENICOL

- Dissolver 100 mg de cloranfenicol em 10 ml de álcool 95°C.
- Adicionar em 1 litro de ASD antes da esterilização.

ÁGAR-SABOURAUD-DEXTROSE COM CLORANFENICOL E CICLOHEXIMIDA (MEIOS COMERCIAIS MYCOSEL, MICBIOTIC AGAR OU MEIO SELETIVO PARA FUNGOS)

- Diluir separadamente 400 mg de cicloheximida (Actidione) em 10 ml de acetona.
- Diluir 50 mg de cloranfenicol em 10 ml de álcool 95°C.
- Misturar as soluções e adicionar em 1 litro de ASD antes da esterilização.
- pH= 7,0

BRAIN HEART INFUSION AGAR COM CLORANFENICOL (BHI)

- Dissolver 50 mg de cloranfenicol em 10 ml de álcool 95°C.
- Adicionar em 1 litro de BHI desidratado antes da esterilização.

PROCEDIMENTOS PARA CULTURA

Os materiais devidamente, processados devem ser semeados na superfície dos meios de cultura, com alça de níquel-cromo ou pipeta Pasteur, com movimentos em estrias em *zig-zag*, para permitir separação de eventuais contaminantes da amostra. O material não deve ser colocado em profundidade no ágar, mas apenas aderido à superfície do meio. O ASD é o meio mais utilizado, por ser relativamente barato e permitir o crescimento de todos os fungos, com raríssimas exceções.

A temperatura de incubação recomendada, para todas as amostras é 30°C, devido a possibilidade de o agente etiológico ser oportunista, e desse modo, crescer melhor a 30°C do que a 37°C, no *primo* isolamento. Além disso, pensando em Brasil, em que, as temperaturas são muito altas na região norte e nordeste, dificilmente alcançam 25°C, a menos que se utiliza estufa BOD ("*body oxygen demand*"). A temperatura de 30°C é verificada, mais facilmente, durante muitas horas do dia.

- Hemoculturas fazem parte da rotina diagnóstica para casos de infecção hospitalar e merecem algumas recomendações à parte, para isolamento de fungos. Os frascos contendo meio bifásico e sangue ou aspirado de medula óssea, devem ser submetidas à agitação manual periódica, para maior homogeneização do oxigênio na fase líquida do frasco. Exames macroscópicos diários da superfície da fase sólida são indicados para verificar aparecimento de colônias de: leveduras dos gêneros *Candida sp*, *Cryptococcus sp* e outros (24 h-7 dias), fungos filamentosos e *Sporothrix schenckii* (2 a 15 d) e fungos dimórficos, como: *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum* (15 a 30d). Qualquer colônia de fungo deve ser repicada em ASD, para posterior identificação.
- O crescimento de fungos, ao contrário de bactérias, não resulta em turvação imediata do meio líquido, de modo que, a análise microscópica de uma gota do meio, abrevia o prazo de resultados positivos. Recomenda-se a pesquisa microscópica do crescimento de fungos corando por Gram, duas gotas do meio líquido, periodicamente, em cada um dos períodos acima citados. Além do exame microscópico da fase líquida, um procedimento que resulta em maior sensibilidade da cultura, é a realização de repiques de 1 ml da fase líquida, para tubos contendo ASD ou BHI, em dias alternados: 2^o, 10^o e 30^o dia.
- Visto que a maioria dos laboratórios brasileiros não trabalha com o meio bifásico, pode-se inocular a amostra, na mesma proporção de 10%, em frascos de hemocultura bacteriológica e fazer a leitura como anteriormente, descrito. Entretanto, sistemas automatizados para hemoculturas, que acusam o crescimento de qualquer microrganismo em até 7 dias, não permitem identificar a presença de fungos de crescimento mais lento. Nesses casos, a incubação por período de até 30 dias, com repiques do caldo em ASD. O procedimento para sangue e aspirado de medula óssea, denominado lise-centrifugação, não é muito difundido no Brasil, pelo custo de importação do sistema. O material biológico é inoculado diretamente no frasco do sistema, que contém

saponina, que lisa as células liberando assim os microrganismos intracelulares. A seguir, deve-se realizar centrifugação que direcionará os elementos fúngicos para o fundo do tubo que já contém o meio de cultura. O sobrenadante é desprezado e, desta forma, a cultura foi realizada, evitando-se subcultivos, que são necessários quando se inocula o material em meios bifásicos ou líquidos. A incubação é feita a 37°C por período de até 30 dias.

Abaixo estão os procedimentos recomendados para exame direto e cultura, visando obter melhor rendimento no isolamento primário de fungos, de acordo com tipo de amostra biológica.

Procedimentos laboratoriais para exame direto e isolamento de fungos, segundo amostra biológica

AMOSTRA BIOLÓGICA	PROCESSAMENTO	EXAME MICROSCÓPICO	MEIO DE CULTURA*
Secreção respiratória	- Fluidificação (recomendada) - Centrifugação - Uso do sedimento	- "a fresco" - KOH a 20% - Giemsa - Tinta nanquim	- ASD - BHI
Líquor	- Centrifugação - Uso de sedimento	- Tinta nanquim - Gram	- ASD
Urina**	- Centrifugação - Uso de sedimento	- "a fresco" - Gram	- ASD
Flúidos corporais (pleural, ascítico, sinovial, pericárdico, gástrico, brônquico)	- Centrifugação - Uso de sedimento	- KOH a 20% - Giemsa	- ASD - BHI
Pus e secreções de abscessos	- Nenhum	- KOH a 20% - Giemsa	- ASD - BHI
"swab" embebido em salina (mucosa oral, nasal, vaginal, anal, olhos, conduto auditivo)	- Centrifugação - Uso de sedimento	- Gram	- ASD
Pele, pelos e escamas	- Nenhum	- KOH a 20%	- ASD
Tecidos e peças	- Fragmentação ou maceração - "Imprint" em lâmina	- KOH a 20% - Giemsa - Tinta naquim	- ASD e BHI
Sangue e medula óssea	- Semeadura em meio de cultura - Esfregaço ou distensão em lâmina	- Giemsa	- BHI bifásico ou líquido - ASD bifásico ou líquido

* Todos os meios sólidos, para isolamento de fungos devem conter cloranfenicol.

** Para contagem de colônias (UFC/ml), semear 0,1 ml de urina em ASD distribuído em placa de Petri, antes de centrifugar.

4. IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS

O profissional de laboratório deve tentar identificar todas as culturas positivas e emitir o resultado mais acurado possível. Muitas vezes, o exame microscópico da amostra é suficiente para medidas de controle da infecção, outras vezes somente o isolamento e identificação do fungo pode orientar a conduta clínica. A identificação dos fungos, de modo ideal, deve contemplar o gênero e a espécie; porém, muitas vezes, isso não é possível, pelo grau de dificuldade e complexidade do exame. Nestes casos a identificação do grupo de fungos, suficiente para o diagnóstico de micose, por ex., zigomicetos, feo-hifomicetos, dermatófitos, leveduras, etc.

O isolamento de um fungo em meio de cultura não significa, necessariamente, que ele é o agente etiológico da infecção. A presença de fungos na microbiota (flora) de pacientes, por ex. *Candida sp* e no meio ambiente, por ex. *Aspergillus sp*, pode resultar em cultura positiva. Isto explica o grande número de culturas positivas para fungos, a partir de uma amostra biológica. A relação entre o fungo isolado em meio de cultura e sinais e sintomas, é critério clínico-epidemiológico. No entanto, deve-se sempre valorizar o isolamento de um fungo procedente de:

- Qualquer amostra biológica que mostrou resultado positivo ao exame microscópico
- Micose cutânea
- Fluídos corporais normalmente estéreis
- Tecidos obtidos por biópsias ou peças operatórias
- Urina, obtida por sondagem ou cistoscopia, independente da contagem de colônias
- Raspado de córnea
- Paciente imunodeprimido (transplantado ou com Aids)
- Paciente em uso de antibióticos por longo tempo, internado em unidade de terapia intensiva ou submetido a ventilação, cateterismo ou outras manipulação
- Paciente de hemodiálise ou debilitado que apresente algum sintoma ou sinal de doença infecciosa independente do tipo de amostra clínica

Além desses casos, têm importância as culturas de fungos:

- Dimórficos
- Isolados mais de uma vez, do mesmo tipo de amostra biológica, coletada em diferentes dias e procedentes do mesmo paciente
- Isolados de ponta de cateter (alimentação parenteral, infusões venosas, etc.)

IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS (Morfológica e Bioquímica)

A morfologia das leveduras, ao contrário do que ocorre com os bolores, não apresenta muita diversidade e, portanto, nem sempre é um parâmetro suficiente para sua identificação. Em determinadas situações, no entanto, a identificação rápida, simples e presuntiva pode ser feita, contribuindo para o diagnóstico do quadro infeccioso. Desse modo, se a levedura apresenta hifas hialinas e ramificadas, é sugestivo do gênero *Candida sps* e se, além disso, desenvolver clamidósporos -células de reserva- ou tubos germinativos, em determinadas condições "in vitro", é identificada como *Candida albicans*. Outros gêneros, tais como, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Geotrichum* e *Trichosporon*, também podem, na grande maioria das vezes, ser identificados apenas, por sua morfologia característica. O restante dos gêneros e espécies, porém, necessita de provas bioquímicas para sua identificação. No entanto, do ponto de vista clínico, nem sempre é importante a identificação acurada da levedura. Por outro lado, a identificação, pode ter interesse epidemiológico. Para leveduras relacionadas a episódios de infecção hospitalar, por ex., há grande preocupação no estudo das espécies dos agentes, como marcador epidemiológico temporal e espacial de infecções, como no caso de espécies de *Candida* que têm menor sensibilidade a antifúngicos azólicos.

Colônias de levedura obtidas de amostra biológica, só devem ser identificadas, quando estiverem puras, ou seja, sem contaminação bacteriana ou em mistura de espécies. Para tanto, deve ser realizado o plaqueamento de cada colônia morfologicamente distinta e confirmada sua pureza, por microscopia. De cada colônia deve ser feito um repique em ASD para sua identificação.

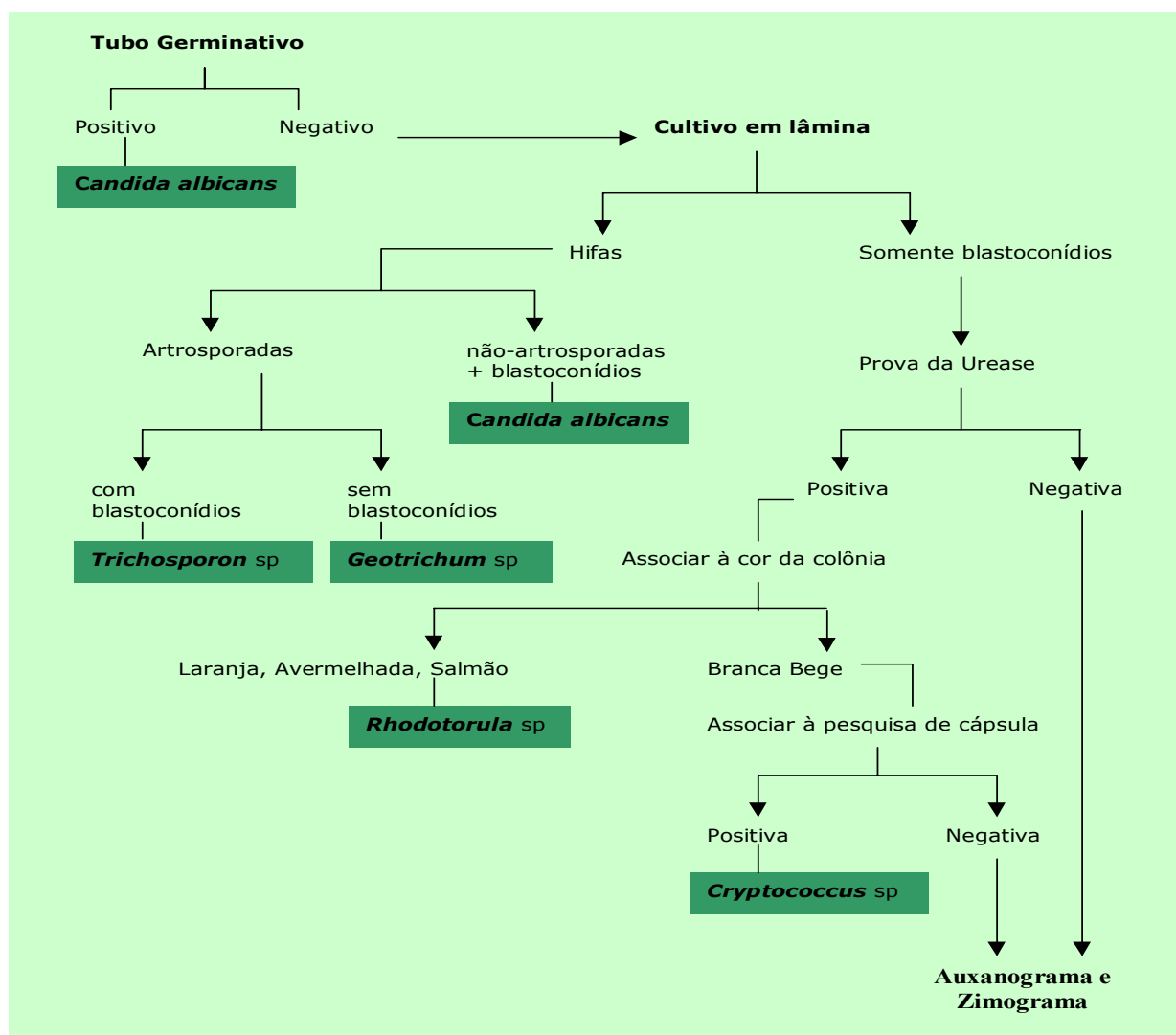
As provas fisiológicas mais comuns e mais simples para identificação de *Candida albicans* e *Candida sp* são: tubo germinativo e filamentação em cultivo em lâmina. No cultivo em lâmina, avalia-se a capacidade de produção de hifas hialinas ramificadas que podem se fragmentar em esporos, denominados artroconídios. Estas hifas ocorrem nos gêneros *Geotrichum* e *Trichosporon*. Caso a levedura forme hifas hialinas ramificadas sem fragmentação, provavelmente pertence ao gênero *Candida* e se houver formação de clamidósporos característicos, é *Candida albicans*.

A pesquisa de cápsula, característica marcante do gênero *Cryptococcus* é feita com uma gota de tinta nanquim e uma alçada da cultura. A cápsula, constituída de material polissacarídico, aparece como um halo claro ao redor dos blastoconídios de *Cryptococcus* e contrastam com o fundo negro da lâmina.

A prova de urease, disponível em todo laboratório de microbiologia é muito utilizada em micologia. A reação positiva para urease, junto com análise morfológica permite identificação presuntiva de *Cryptococcus sp*. Leveduras do gênero *Rhodotorula* são também urease positiva mas, como em regra, apresentam colônias com pigmento avermelhado ou salmão, são facilmente distinguidas de *Cryptococcus sp*. Outros gêneros incluindo *Candida sp*, produzem urease, mas tem outras características para sua identificação.

O esquema abaixo propõe um fluxo para identificação das principais leveduras de interesse médico. Se as provas não conduzirem à identificação presuntiva do gênero, provas de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio (**auxanograma**) e fermentação de carboidratos (**zimograma**) devem ser realizadas e interpretadas segundo tabelas existentes na bibliografia recomendada ao final deste capítulo. Um exemplo simplificado é a **Tabela 1**.

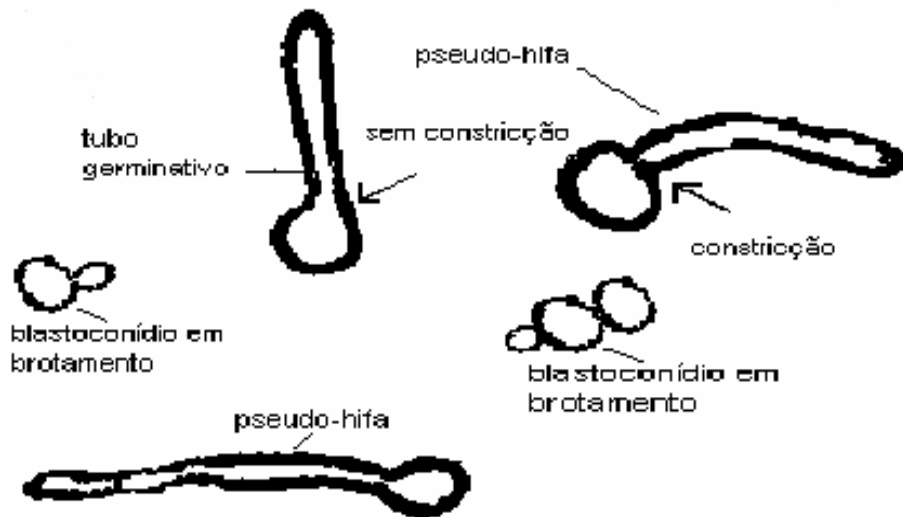
Esquema simplificado para identificação de alguns gêneros de leveduras



PROVA DO TUBO GERMINATIVO

A partir de uma alçada da colônia isolada, fazer uma suspensão em tubo de ensaio contendo 0,5 ml de soro humano (pode-se usar também soro estéril de bovino, cavalo ou coelho). Incubar a 37°C durante período **máximo de 3 horas**. Este prazo é importante porque, após esse período, outras espécies de *Candida* e de outros gêneros, formam também tubo germinativo. Depositar então, uma gota da suspensão sobre lâmina, cobrir com lamínula e examinar ao microscópio óptico. A presença de tubo germinativo, na forma de pequeno filamento que brota do blastoconídio, sem formar constrictão com a célula-mãe, permite a identificação presuntiva de ***Candida albicans***.

Prova do tubo germinativo com blastoconídios, tubo germinativo e pseudo-hifas de *Candida albicans*



CULTIVO EM LÂMINA PARA PROVA DE FILAMENTAÇÃO E CLAMIDÓSPORO

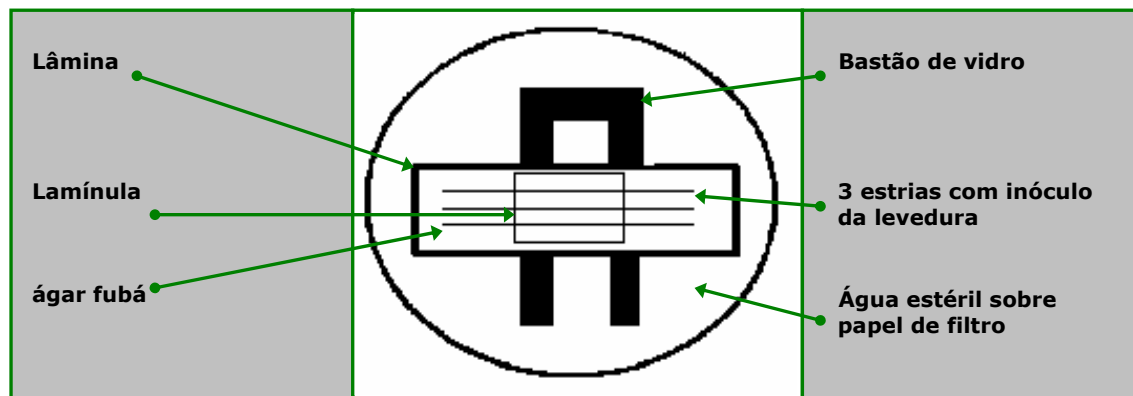
Depositar 3 ml de ágar-fubá fundido, sobre uma lâmina contida sobre um suporte dentro de uma placa de Petri. O suporte para a lâmina pode ser um bastão de vidro, outra lâmina ou apenas dois palitos de madeira. Após solidificação do meio, semear a levedura, com auxílio de uma agulha em "L", fazendo 2 estrias paralelas. Recobrir as estrias com lamínula esterilizada. Fazer uma câmara úmida, acrescentando 2 ml de água destilada estéril na placa, ou embebendo um algodão estéril, para evitar dessecação do meio, durante o período de incubação da prova. Tampar a placa e após 24h, 48h e 72h, examinar a preparação em microscópio ótico. A presença de hifas hialinas, septadas e ramificadas, característica do gênero *Candida* e se houver formação de clamidósporos indica *Candida albicans*. Formação exclusiva de artrósporos permite identificação de *Geotrichum*, mas quando são formados também blastoconídios trata-se de *Trichosporon*. O meio de ágar fubá ou farinha de milho pode ser adquirido no comércio (CornMeal agar) mas sua formulação é simples, ressaltando-se que de todas as maneiras, deve-se acrescentar a substância tensoativa **tween 80**, para que a prova dê resultados confiáveis. O meio tem a seguinte composição e preparo:

Meio ágar Fubá

Fubá	20 g
Ágar	10 g
Tween 80	5 ml

Adicionar o fubá em 250 ml de água e ferver até borbulhar. Filtrar o fubá em gaze dobrada em quatro. Dissolver o ágar em 250 ml de água. Restaurar o volume da infusão de fubá para 250 ml, com água quente, juntar as suspensões, ajustar o pH para 6,6 – 6,8 e adicionar o Tween 80. Distribuir volumes de 5 ml em tubos e esterilizar em autoclave a 120°C por 15 minutos.

Cultivo em lâmina para prova de filamentação e clamidósporo



PROVA DA UREASE

- Semear uma alçada da levedura na superfície do meio de urease (ágar uréia de Christensen).
- Incubar à temperatura de 37°C.

A mudança da cor do meio para rosa bispo em 24 h, indica reação positiva.

PROVA DE ASSIMILAÇÃO DE FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO OU AUXANOGRAMA

Nessa prova são usados 2 meios, que podem ser adquiridos no comércio, na forma desidratada (*Yeast Nitrogen Base* e *Yeast Carbon Base*) ou formulados. A levedura é semeada "pour plate", homogeneizando-se 2 ml de uma suspensão das colônias, a cada meio fundido ou semeada na superfície de cada um dos meios, previamente, distribuídos em 2 placas de Petri. São então adicionadas pequenas alíquotas de diferentes carboidratos que servem de fonte de carbono, sobre a superfície do meio isento de carbono. Várias substâncias, incluindo álcoois, proteínas e aminoácidos servem de fontes de nitrogênio e são colocadas sobre a superfície do meio isento de nitrogênio. Após incubação à temperatura ambiente ou 25°C, por período de uma semana, a levedura irá assimilar e crescer em volta de determinadas fontes, de acordo com o metabolismo característico de sua espécie. A leitura é feita pelo halo de turvação resultante do crescimento e indica prova de assimilação positiva para a respectiva fonte. Os resultados são comparados a tabelas existentes na bibliografia recomendada e um exemplo simplificado consta na tabela abaixo.

Identificação das principais leveduras de interesse médico

Levedura	Tg	Cultivo em lâmina		Ur	Assimilação									Fermentação					
		Hifa	Ar		Sa	Ma	La	Ce	Tr	Ra	X	I	NO ₃	Gl	Sa	Ma	La	Ra	Tr
<i>C. albicans</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	V
<i>C. tropicalis</i>	-	+	-	-	+	+	-	V	+	+	+	-	-	+	V	+	-	-	+
<i>C. parapsilosis</i>	-	+	-	-	+	+	-	V	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	V
<i>C. krusei</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>C. guilliermondii</i>	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	V
<i>C. glabrata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
<i>C. neoformans</i>	-	-	-	+	+	+	-	V	+	V	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Geotrichum</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	V	-	-	-	-	-
<i>Trichosporon</i>	-	+	+	V	+	+	+	+	V	V	+	V	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhodotorula sp</i>	-	-	-	+	+	V	-	V	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Saccharomyces</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	V	+	-	-	-	+	+	+	-	+	V

Tg = tubo germinativo, Ar = artrósporo, Ur= urease, Sa = sacarose, Ma=maltose,La = lactose, Ce = celubiose, Tr = trealose, Ra = rafinose, X = xilose, I = inositol,NO₃ = nitrato, Gl = glicose, + = pos, - = neg, V= variável

FERMENTAÇÃO DE ACÚCARES OU ZIMOGRAMA

A capacidade de fermentar carboidratos, ao lado do auxanograma, irá completar o perfil bioquímico da levedura permitindo, em regra, a identificação acurada de gênero e espécie (**QUADRO 3**). As características morfológicas são fundamentais para concluir a identificação, desde que **diversas espécies têm perfis bioquímicos idênticos, mas morfologias distintas**. Para o zimograma, diversas fontes de carboidratos são colocadas em tubos respectivos, contendo meio básico líquido. A levedura é semeada em cada tubo e após período de até 15 dias a 25°C, a fermentação é revelada por formação de bolhas de gás, observadas dentro de tubos de Durhan, colocados previamente, durante a preparação do meio básico.

IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS

A identificação de fungos filamentosos tem, como fundamento, a observação da morfologia da colônia e aspectos microscópicos. A análise da colônia visa observar: cor, textura, superfície, pigmento difusível no meio de cultura, entre outros, e pode ser feita no tubo de ensaio contendo a cultura primária do fungo. Porém, o mais adequado é a análise a partir da "colônia gigante", ou seja, uma cultura feita no ponto central de uma camada de ágar distribuído em placa de Petri. A velocidade de crescimento, que pode ser rápida (≤ 7 dias), intermediária (8 a 14 dias) ou lenta (≥ 15 dias) é fundamental para identificação presuntiva do fungo.

A observação das estruturas microscópicas, tais como: hifa hialina ou demácia, septada ou cenocítica, forma, disposição e formação dos esporos, são suficientes, em geral, para a identificação de fungos filamentosos. Em alguns grupos porém, como os fungos demácios, pode ser necessário também uso de provas bioquímicas. A morfologia microscópica é melhor visualizada com a técnica de microcultivo que preserva a disposição original dos esporos sobre as hifas e mantém íntegras certas estruturas formadoras de esporos, por ex. esporângios que são órgãos de reprodução de zigomicetos.

Os fungos filamentosos, patogênicos ou contaminantes ambientais, potencialmente oportunistas, formam um grupo muito extenso, impossível de ser tratado neste Manual. Para identificação das diversas espécies ou grupos existe bibliografia especializada de textos, manuais e atlas, indicados no final deste capítulo. Dentro do objetivo deste Manual serão ilustrados aspectos microscópicos de alguns fungos de interesse em medicina (vide Figuras adiante).

TÉCNICA DE MICROCULTIVO PARA FUNGOS FILAMENTOSOS

Colocar sobre uma lâmina esterilizada, contida em uma placa de Petri estéril, um cubo de ágar: ASD ou ágar batata. A lâmina deve estar sobre um suporte, que pode ser formado por outra lâmina, ou um pequeno bastão de vidro recurvado, ou ainda, dois palitos de fósforo. Semear o fungo, a partir de repique recente, nos 4 lados do cubo de ágar. Recobrir com uma lamínula esterilizada. Fazer uma câmara úmida, adicionando 1 a 2 ml de água destilada estéril no fundo da placa ou embeber um pequeno chumaço de algodão estéril, para evitar a dessecação do meio de cultura, durante o crescimento do fungo. Tampar a placa e deixar à temperatura ambiente por 7 a 10 dias, até que se observe desenvolvimento de hifas com ou sem pigmentação.

Após esse período, inativar a esporulação, adicionando 1 ml de formol ao algodão e vedando a placa com fita adesiva durante 24h-48h. O vapor de formol, além de inativar o fungo, irá auxiliar na fixação das estruturas microscópicas. Retirar a lamínula com auxílio de uma pinça, cuidadosamente, uma vez que nela deverão estar aderidas as hifas e esporos do fungo. Pingar uma gota de corante azul de lactofenol-algodão ("Cotton Blue") e montar sobre uma lâmina. Desprezar o cubo de ágar e, em seu lugar, pingar outra gota de corante azul e recobrir com lamínula, para visualizar esporos e hifas também aderidos à lâmina. Observar em microscópio ótico com objetiva de 40 X, o tipo e cor da hifa, forma disposição e formação de esporos.

O corante azul de lactofenol-azul algodão, utilizado na microscopia de culturas de fungos filamentosos, é formulado e preparado da seguinte forma:

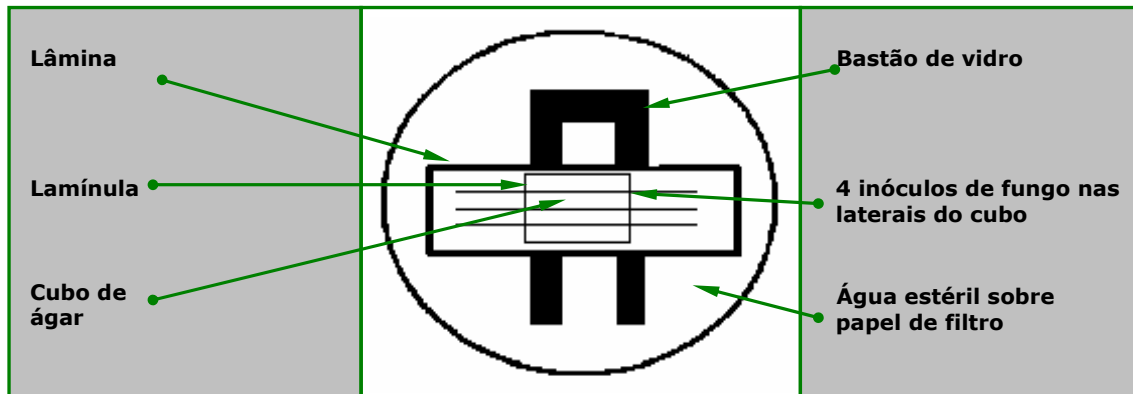
Azul de lactofenol-algodão

Ácido láctico	20g
Cristais de fenol	20g
Glicerina	20g
Azul algodão	0,05g
Água destilada	20g

- Fundir os cristais de fenol em banho-maria e juntar
- Esperar 24 h e filtrar

O azul algodão pode ser substituído pelo azul de metileno.

Técnica de microcultivo para análise microscópica de fungos filamentosos



Fungos anemófilos de hifas hialinas e septadas (hialohifomicetos)

Aspergillus



Penicillium

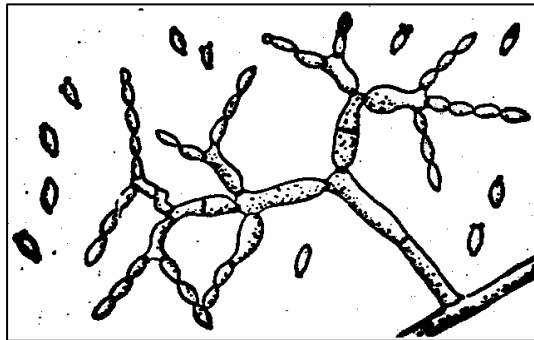


Fusarium



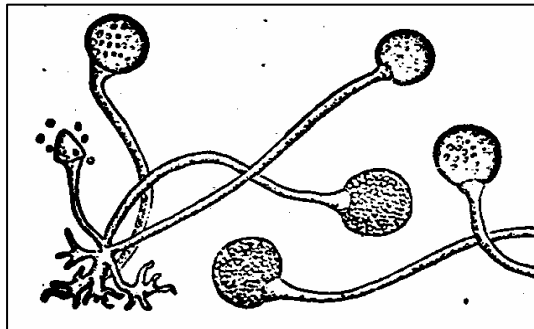
Acremonium





FUNGO ANEMÓFILO DE HIFAS SEPTADAS E MARRONS (DEMÁCIO)

Cladosporium



FUNGO ANEMÓFILO DE HIFAS HIALINAS E CENOCÍTICAS (ZIGOMICETO)

Rhizopus

Dermatófitos agentes de micoses cutâneas



Trichophyton rubrum

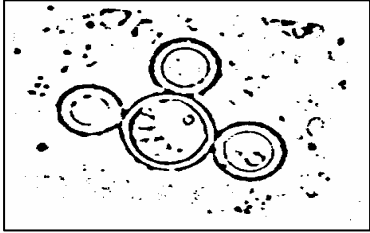


Microsporum canis

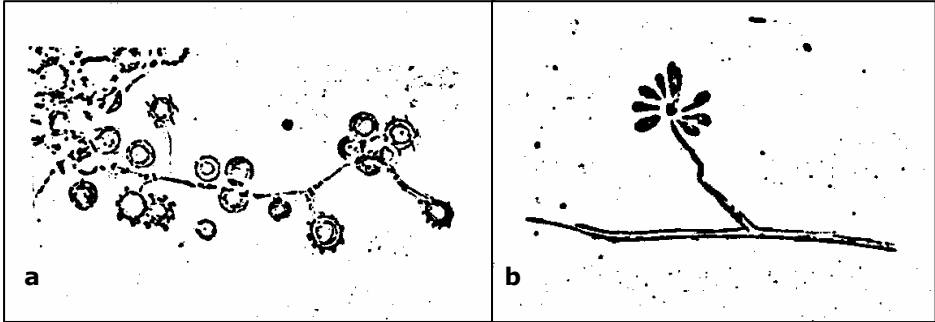
IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS DIMÓRFICOS

Dimórficos são fungos filamentosos que podem, sob determinadas condições, assumir forma de levedura, diminuindo a capacidade de filamentação e dividindo-se por brotamento, conferindo às colônias aspecto cremoso. Esta fase leveduriforme ocorre sob temperatura acima de 30°C, de preferência a 37°C. São fungos de crescimento lento (≥ 15 dias) no *primo*-isolamento (*Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides brasiliensis* ou moderado (8 a 14 dias), como *Sporothrix schenckii*. A identificação é feita pela comprovação do dimorfismo e pelo aspecto microscópico característico de cada fase.

***Paracoccidioides brasiliensis* in vivo e in vitro (37°C).**



***Histoplasma capsulatum* (a) e *Sporothrix schenckii* (b) in vitro (25°C).**



5. DESCRIÇÃO DAS PRINCIPAIS MICOSES

As localizações topográficas mais frequentes, relacionadas aos agentes fúngicos, serão apresentadas de forma resumida.

Agentes etiológicos e localizações topográficas

	Derma- tófitos	H. capsulatum	P. brasiliensis	S. schenckii	Aspergillus sp	Candida sp	C. neoforman	Zigo- micetos
Trato respiratório		X	X		X	X	X	X
Sangue		X	X		X	X	X	X
Osso			X	X	X	X	X	
Medula óssea		X						
Pele e Unha	X					X		
Pelo	X							
Cérebro		X	X		X	X	X	X
Líquor		X				X	X	
Ouvidos					X			
Olhos					X	X		
Fígado e Baço		X	X					
Naso-faringe			X		X	X		X
Mucosas		X	X			X		
Tecido sub- cutâneo e gânglios		X	X	X	X			X
Trato urinário			X			X	X	
Trato gastrointestinal			X			X		

DERMATOFIToses (TINEAS)

São infecções fúngicas limitadas às camadas superficiais queratinizadas da pele, pelos e unhas, popularmente, conhecida como "epíngue" ou "frieira", dependendo da localização das lesões que são extremamente pruriginosas. Em imunodeprimidos podem acometer tecidos subcutâneos.

Agentes etiológicos: *Microsporum spp*, *Trichophyton spp* e *Epidermophyton floccosum*

Ocorrência: universal, acometendo indivíduos de qualquer idade, sexo ou raça.

Fontes de infecção: contágio direto com animais, solo ou indivíduo infectado.

Procedimento laboratorial:

- Amostra: escamas de pele, unha e cabelos
- Exame da amostra com KOH a 20%, revela hifas regulares, hialinas, septadas, refrigentes, frequentemente artrosporadas.
- Cultura: material deve ser semeado em ASD, com auxílio de uma alça em "L", de forma a ficar em perfeito contato com o meio de cultura. As colônias de dermatófitos geralmente, crescem a partir do 10º dia de incubação à temperatura ambiente e os fungos são identificados pela sua morfologia macroscópica e microscópica. No Brasil, os dermatófitos mais frequentes são *T. rubrum* e *M. canis*.

PARACOCCIDIOIDOMICOSE

Doença granulomatosa, crônica que pode acometer pele, mucosas, linfonodos, sistema respiratório, trato gastrointestinal, adrenais, fígado, baço e SNC. Apresenta grande variabilidade de manifestações clínicas, desde formas localizadas até formas disseminadas de mau prognóstico, na dependência da resposta imune do hospedeiro. Existe também a paracoccidiodomicose-infecção, em que o indivíduo não apresenta sinais e sintomas mas, demonstra por testes intradérmicos positivos, que entrou anteriormente, em contato com o fungo. Apresenta muitas semelhanças com a tuberculose.

Agente etiológico: *Paracoccidioides brasiliensis*

Ocorrência: países da América Latina, principalmente Brasil.

Procedimento laboratorial:

- Amostra: raspado de lesão e mucosa, secreção do trato respiratório, aspirado de linfonodos, tecido obtido por biópsia.
- Exame direto com KOH a 20% revela a presença da forma leveduriforme constituída de células grandes (10µm a 60 µm), globosas, com parede celular dupla e refringente e com múltiplos brotamentos, à semelhança de "roda de leme", orelhas de "Mickey Mouse" ou argolas entrelaçadas.
- Cultura: fungo dimórfico de crescimento lento (≥ 15 dias). Culturas desenvolvidas a $\leq 30^{\circ}\text{C}$ são filamentosas, de cor branca, cotonosa, com sulcos centrais, composta de hifas hialinas finas, septadas e fragmentadas em esporos multiformes. As colônias incubadas entre 30°C a 35°C são de cor creme, pregueadas e enrugadas, cuja microscopia revela as formas características leveduriformes que permitem a identificação do agente.

HISTOPLASMOSE

Doença que acomete primariamente o sistema retículoendotelial. A infecção pode ser localizada ou generalizada. A histoplasmosse primária afeta o sistema respiratório e a histoplasmosse progressiva atinge fígado, baço, linfonodos, mucosas, medula óssea, etc. Em indivíduos hígidos, a infecção tem bom prognóstico porém atualmente, é importante infecção oportunista associada à Aids, nos quais ocorre a forma grave e disseminada.

Agente etiológico: *Histoplasma capsulatum*

Ocorrência: distribuição universal, principalmente em países de clima temperado.

Fontes de infecção: inalação de esporos presentes em aerossóis formados por solos contaminados com excretas de galinhas e morcêgos.

Procedimento laboratorial:

- Amostra: secreção do trato respiratório, sangue, punção de medula óssea, tecido obtido por biópsia de mucosas e outros.
- Exame microscópico direto, sem coloração, requer muita habilidade do técnico. Recomenda-se coloração por Giemsa, para melhor visualização do agente em de cortes histológicos, onde se evidencia sob imersão, pequenas leveduras (2-5 µm), intracelulares, dentro de células mononucleares.
- Cultura: fungo dimórfico de crescimento lento (15 a 30 dias) sendo que no *primo*-isolamento é mais fácil obter a forma filamentosa de cor branca, aspecto cotonoso e sulcado, à temperatura $\leq 30^{\circ}\text{C}$. A confirmação do dimorfismo é feita através de repique em meio rico (BHI) e incubação entre 30°C e 35°C . A transformação da forma filamentosa ou miceliana à fase leveduriforme, é vista com a formação de pequenas (2-5 µm) leveduras em brotamento. A identificação porém, é feita pela micromorfologia da forma **filamentosa**, com a observação de esporos grande-macroconídios- arredondados e com inúmeras espículas ou granulações na parede celular, chamados hipnósporos ou esporos tuberculados.

ESPOROTRICOSE

Infecção crônica cuja forma clínica mais freqüente em nosso meio é a forma linfangítica nodular ascendente. Atinge em geral, uma das extremidades sob forma de lesão ulcerada no ponto de inoculação e acomete a drenagem linfática regional com formação de gomas no trajeto. As formas disseminadas são raras, em paciente imunocompetentes, mas frequentes em pacientes com Aids.

Agente etiológico: *Sporothrix schenckii*

Ocorrência: doença de distribuição universal que acomete principalmente, trabalhadores rurais e floristas.

Procedimento laboratorial:

- Amostra: aspirado das lesões gomosas ou tecido subcutâneo.
- Exame microscópico da amostra apresenta baixa sensibilidade mas, exame de cortes de tecido corados, pode revelar leveduras em forma de "charuto" ou apenas formas ovaladas com divisão em brotamento (blastoconídios).
- Cultura: fungo dimórfico que se desenvolve bem em ASD, entre 7 a 12 dias e cuja forma filamentosa ($\leq 30^{\circ}\text{C}$) apresenta hifas hialinas finas e septadas com esporos disposto em arranjo semelhante à flor "margarida". A forma leveduriforme ($> 30^{\circ}\text{C}$), não é característica do gênero e requer meios ricos acrescidos de sangue, cisteína e submetidos a tensão de CO_2 . O interesse na obtenção da fase leveduriforme é para a diferenciar o agente da esporotricose, do gênero *Sporothricum*, fungo filamentoso não-dimórfico e anemófilo de meio ambiente. A forma **filamentosa** apresenta na microscopia a forma adequada para identificação do agente.

ASPERGILOSE

A aspergilose pode se apresentar em indivíduos imunocompetentes, como lesões localizadas em unhas, pés, canal auditivo, olhos e forma bronco-pulmonar alérgica. Em pacientes imunocomprometidos, tende à forma disseminada ou cerebral, de alta letalidade, geralmente, associada a neutropenia ou à doenças debilitantes.

Agente etiológico: *Aspergillus fumigatus* (o mais comumente isolado)

Ocorrência: tem distribuição universal. É crescente o número de relatos desta doença como infecção secundária em pacientes em tratamento prolongado com antibiótico e corticosteróides, doenças debilitantes como carcinoma, tuberculose, pacientes neutropênicos, e em lesões de tecidos subcutâneos, da pele ou da córnea.

Procedimento laboratorial:

- Amostra: secreção do trato respiratório, material de biópsia e lavado brônquico.
- O exame microscópico revela hifas septadas e hialinas, com 4 a 6 μm de diâmetro e que se ramificam em ângulo de até 45° .
- Cultura: colônias de *Aspergillus fumigatus*, a espécie mais associada à doença em humanos, podem ser facilmente, isoladas em ASD, em até 7 dias (crescimento rápido) com desenvolvimento, na superfície do meio, de filamentos brancos-hifas - que se tornam verde a verde-acinzentado, com a formação de esporos.

CRÍPTOCOCOSE

A criptococose é uma infecção subaguda ou crônica que envolve primariamente, os pulmões, com tropismo pelo sistema nervoso central -meninges-, podendo atingir pele e outros tecidos.

Agente etiológico: *Cryptococcus neoformans*

Ocorrência: no homem, a distribuição da doença é universal.

Procedimento laboratorial:

- Amostra: líquido, secreção do trato respiratório ou de lesão de pele, aspirado de formação tumoral subcutânea e tecidos obtidos por biópsia. O exame laboratorial deverá incluir urina, de preferência após massagem prostática, para monitorar a presença do agente na próstata que constitui seu órgão de reserva.
- Exame obrigatoriamente, com tinta nanquim para observação de células capsuladas, com diâmetro variável, entre 5 μm a 20 μm , que sugerem *Cryptococcus sp.*
- Cultura: secreção do trato respiratório, líquido e tecidos podem ser cultivados em ASD ou qualquer outro meio, desde que não contenham cicloheximida que inibe *Cryptococcus*. O agente cresce rápido (≤ 7 dias) entre 25°C e 37°C , sob forma de colônias mucóides de coloração creme à parda. A identificação de gênero e espécie é feita através de provas bioquímicas, como: teste da urease e auxanograma.

CANDIDIÁSE

Candidíase é uma doença com manifestações clínicas variadas. As infecções aguda e crônica mostram lesões na boca, faringe, pele, unhas, sistema broncopulmonar, intestinal e perianal. Ocasionalmente, endocardite, meningite, fungemia ou infecções em outras localizações podem ser observadas.

Agentes etiológicos: *Candida albicans* e outras espécies, que estão frequentemente, envolvidas em casos de micoses oportunistas em pacientes debilitados. São os principais agentes etiológicos de Infecções hospitalares. As espécies de *Candida* podem ser isoladas de vários locais do corpo humano, como microbiota normal de cavidade oral, mucosa vagina, região perianal e trato gastrointestinal.

Ocorrência: - universal, incluindo as formas graves que ocorrem sob fatores predisponentes para desenvolvimento da doença, tais como: desnutrição, obesidade, diabetes, gravidez, antibioticoterapia, quimioterapia e uso de corticosteróides, manipulação endovenosa inadequada, neoplasias e outras doenças debilitantes.

Procedimento laboratorial:

- Amostra: (dependerá da sintomatologia clínica) fragmentos de pele e unhas; raspados da mucosa oral, vaginal ou anal; secreção do trato respiratório, sangue, liquor, urina e fezes.
- Exame de fragmentos de pele e unhas devem ser feitos com solução de KOH 20%. Secreção do trato respiratório ou material de mucosa podem ser examinados pela coloração de Gram. A levedura aparece como células arredondadas, com brotamentos com ou sem hifas. Pequenas células podem ter diâmetro de 2-6µm, mas formas maiores são também observadas.
- Cultura: o crescimento é rápido (24-72h) entre 25°C e 37°C. O aparecimento ocorre em torno de 3 a 4 dias, com formação de colônias com coloração branca à bege. A habilidade de formar tubo germinativo e/ou clamidósporos na prova de cultivo em lâmina, permite a identificação de *C. albicans*. Para a identificação das outras espécies do gênero *Candida* deve-se, além do cultivo em lâmina, proceder-se à assimilação de fontes de carbono e nitrogênio (auxanograma) e fermentação de fontes de carbono (zimograma) .

ZIGOMICOSE

Infecção geralmente, subaguda de evolução rápida que acomete indivíduos debilitados, transplantados, diabéticos descompensados ou ainda com Aids. Pode acometer seios paranasais, tecido subcutâneo, pulmão e vasos sanguíneos, causando embolia no SNC e trombose. A micose, em indivíduos imunodeficientes é, em geral, fatal se o diagnóstico não for rápido e o tratamento específico não for prontamente, estabelecido.

Agentes etiológicos: fungos da classe dos Zigomicetos, compreendendo os gêneros *Mucor*, *Rhizopus* e *Absidia*, entre outros.

Ocorrência: distribuição universal.

Procedimento laboratorial:

- Amostra: secreção de sinus nasal ou tecidos obtidos por biópsia de seios paranasais ou lesões subcutâneas.
- Exame com KOH a 20%, revela hifas hialinas e largas (6-50µm), cuja característica principal é a ausência de septos, que caracterizam as hifas cenocíticas, desse grupo de fungos.
- Cultura: fungos de crescimento rápido (< 72 h) a 25°C em ASD, com hifas aéreas abundantes. A identificação é feita pela microscopia da colônia que evidencia hifas cenocíticas e esporos contidos dentro de estruturas fechadas denominadas esporângios.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hoog, G.S, Guarro, J., Figueras, M.J. and Gene, J. **Atlas of Clinical Fungi**, 2ª Ed., CBS, Utrecht, Holanda, 2000.
2. Kane, J., Summerbell, R., Sigler, L., Krajden, S. and Land, G. **Laboratory handbook of Dermatophytes: a Clinical Guide and Laboratory Manual of Dermatophytes and Other Filamentous Fungi from kin, Hair and Nails**, Star Publishing Co., Belmont, Ca, 1997.
3. Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. (coord.) **The Yeasts – A taxonomic study**, Elsevier Science B.V., Amsterdam, Holanda, 1998.
4. Kwon-Chung, K.J. and Bennett, J. E. **Medical Mycology** , 1992.
5. Lacaz C.S., Porto, E., Martins, J.E.C., Heins-Vaccari, E.M. and Melo, N.T. **Tratado de Micologia Médica**, 9ª ed., Sarvier, São Paulo, 2002.
6. Lacaz, C. da S., Porto, E., Heins-Vaccari, E.M. and Melo, N.T. **Guia Para Identificação de Fungos Actinomicetos e Algas de interesse médico**, 8º ed., ed. Sarvier, São Paulo, 1998.
7. Larone, D.H. **Medically Important Fungi: A guide to Identification**, 3º ed., Washington, DC., 2000.
8. Maza, Pezzlo and Baron **Atlas de Diagnóstico em Microbiologia**, ed. Artmed, Porto Alegre, 1999.
9. Mendes-Giannini, M.J. and Melhem, M.S.C. *Fungos In: Ferreira, A.W. and Ávila, S.L.M. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes*, 2ªed., Guanabara-Koogan , Rio de Janeiro, 2001.
10. Midley, G., Clayton, Y.M. and Hay, R.J. **Diagnóstico em cores. Micologia Médica**, Ed. Manole Ltda., São Paulo, 1998.
11. Minami, P.S. **Micologia: Métodos Laboratoriais de Diagnóstico das Micoses**, Ed. Manole Ltda, São Paulo, 2003.
12. Rippon, J.W. **Medical Mycology: The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes**, 2ª ed., W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1982.
13. Sidrim, J.J.C. and Moreira, J.L.B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica**. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 1999.
14. Von Nowakonsky, A., Silva, C.R.N. and Melhem, M.S.C. **Fungos e Aids: diagnóstico de infecções oportunistas**, ed. Ministério da Saúde, Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids, Série Telelab nº22, 2001.
15. Zaitz, C., Campbell, I., Marques, S.A., Ruiz, L.R.B. and Souza, V.M. **Compêndio de Micologia Médica**, ed. Medsi, Rio de Janeiro, 1998.