

**FACULDADE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**APOSTILA DE MICOLOGIA CLÍNICA**

**PROF. DR. SANDRO ROGERIO DE ALMEIDA**

## INTRODUÇÃO

Durante muitos anos a Micologia teve pouca expressão na área médica, possivelmente pela falta de diagnóstico adequado. Ultimamente, o número de pacientes suscetíveis aos mais variados tipos de infecções tem aumentado significativamente. Com esse crescimento, as infecções fúngicas vêm se tornando mais freqüentes.

Com o aparecimento da antibioticoterapia, utilização de métodos imunossupressores, surgimento da AIDS e melhora nos métodos diagnósticos observamos aumento no número de casos de infecções fúngicas.

O diagnóstico de uma infecção fúngica tem por base a combinação de dados clínicos e laboratoriais. O processo laboratorial inclui: demonstração do fungo no material examinado por microscopia e cultura, detecção de anticorpos específicos e detecção de antígenos e metabólitos liberados pelo fungo nos líquidos corpóreos ou tecidos.

Tendo em vista a importância do diagnóstico micológico, a disciplina objetiva desenvolver no aluno a capacidade de identificação de fungos filamentosos e leveduriformes assim como introduzir os principais aspectos da Micologia Médica. Portanto, torna-se imprescindível o bom

conhecimento das principais estruturas fúngicas e das técnicas utilizadas em sua identificação.

As micoses podem ser divididas em:

### **Superficiais:**

- Pitiríase versicolor
- Piedra branca
- Piedra negra

### **Cutâneas:**

- Dermatofitoses
- Candidíase

### **Subcutâneas:**

- Cromomicose,
- Esporotricose
- Micetoma (eumicetoma e actinomicetoma)
- Zigomicose
- Rinosporidiose
- Doença de Jorge Lobo
- Feo-hifomicose
- Hialo-hifomicose

### **Sistêmicas:**

- Paracoccidioidomicose
- Histoplasmose

### **Oportunistas:**

- Criptococose
- Aspergilose

## PARTE I

### MICOSES SUPERFICIAIS

Micoses que desenvolvem alterações apenas na camada mais superficial do estrato córneo e não induz, na maioria das vezes, qualquer resposta inflamatória no hospedeiro.

Principais Doenças e agentes etiológicos:

Pitiríase versicolor – *Malassezia furfur*

Piedra negra – *Piedraia hortae*

Piedra branca – *Trichosporon beiguelae*

#### - Pitiríase versicolor:

Infecção geralmente assintomática, mas, em raras ocasiões, pode ser relatado pelo paciente um discreto prurido. Apresenta-se como manchas hipo ou hiperpigmentada, descamativas geralmente no tórax, pescoço e braços em adultos jovens, sem distinção de sexo. Os principais fatores endógenos para o aparecimento das lesões são: Pele gordurosa, elevada sudorese, fatores hereditários e uso de terapia imunossupressora.

Ag. Etiológico: *Malassezia furfur*

#### Diagnóstico:

Raspado de pele clareado com KOH.

#### Escamas de Pele com *Malassezia Furfur*

**Coradas pelo P.A.S:** Leveduras arredondadas, formando aglomerados em forma de cachos de uva ou mosaico; hifas curtas e grossas, em forma de Y ou L, de cor vermelha.

Isolamento: Para isolamento primário de fungo de material clínico, com suspeita de pitiríase versicolor, devemos utilizar um meio especialmente preparado para o isolamento dessas leveduras, visto que são **lipodependente**.

## - Piedra Negra

Micose que se caracteriza clinicamente pelo aparecimento, nos cabelos e raramente em outros pêlos do corpo humano, de nódulos endurecidos e de coloração escura. Doença benigna, baixo contágio, caráter crônico, frequentemente recidivante que afeta ambos os sexos.

Ag. Etiológico: *Piedraia hortae*

### **Diagnóstico:**

#### *Piedraia hortae*

**Em pêlo:** Produz a piedra negra. Número variável de nódulos duros, escuros (marrons e negros), localizados ao longo do pêlo. Microscopicamente observam-se hifas, formando um pseudo-tecido (ou pseudoparênquima), devido a justaposição das mesmas. O aspecto é de mosaico, com áreas mais claras, onde se localizam os ascos contendo ascosporos, só visíveis após esmagamento e clareamento com KOH.

## - Piedra Branca:

Nódulos fracamente aderidos aos cabelos ou pêlos de cor branca-amarelado. Doença de distribuição geográfica com predileção por climas tropicais e temperados, de caráter assintomático, benigno e de baixo contágio, que acomete indistintamente cabelos e pêlos das regiões axilares, pubianos, perianal, barba e bigode.

Agente etiológico: *Trichosporon beigelli*

### **Diagnóstico:**

#### *Trichosporon beigelli*

**Em pêlo:** Produz a piedra branca, geralmente localizada na extremidade do pelo. A superfície é homogênea, devido à massa de leveduras. A cor varia de branco a amarelo.

## MICOSES CUTÂNEAS

- Dermatofitose
- Candidíase

### Dermatófitos:

Pertencem ao grupo dos fungos denominados de dermatófitos os fungos filamentosos, hialinos, septados, algumas vezes artroconidiados, queratinofílicos, passíveis de colonizar e causar lesões clínicas em pêlos e/ou extrato córneo de homens e animais. São divididos em três gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. Em relação ao seu habitat podem ser divididos em geofílicos- vivem em solos, zoofílicos – vivem em animais e antropofílicos – vivem no homem.

Os aspectos clínicos das lesões dermatofíticas são bastante variados e resultam da combinação de destruição da queratina associada a uma resposta inflamatória, mais ou menos intensa, na dependência do binômio parasito/hospedeiro. Na classificação clínica das dermatofitoses são utilizadas as denominações Tinea seguidas do sítio anatômico das lesões, exemplo: Tinea capitis (couro cabeludo).

Descrição das principais dermatofitoses e seus agentes mais frequentes:

- Tinea pedis (tinha do pé): *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *E.floccosum*
- Tinea ungueum (tinha da unha, onicomicose) : *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*
- Tinea corporis, Tinea circinada (tinha de pele glaba): *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. canis*
- Tinea barbae (tinha da barba): *T. verrucosum*, *M. canis*, *T. violaceum*
- Tinea cruris (tinha da região inguino-crural): *T. rubrum*, *E. floccosum*
- Tinea fávica (tinha alopeciante): *T. schoenleinni*
- Tinea capitis (tinha do couro cabeludo): endotrix: *T. mentagrophytes*, *T. violaceum*, *T. tonsurans* – ectotrix: *M. canis*, *M. gypseum*

Obs.: endotrix: parasitismo no interior dos pêlos – ectotrix: parasitismo fora do pêlo

Descrevemos as principais características diferenciais dos gêneros e espécies mais comuns encontradas parasitando o homem:

**Gênero *Trichophyton*;**

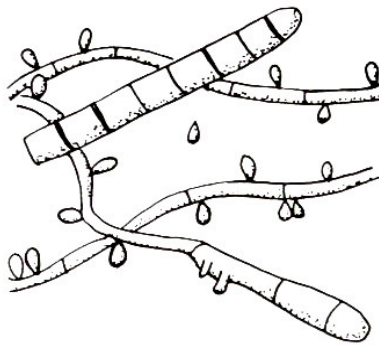
Gênero mais frequentemente isolado de material clínico, acometendo tanto a pele glaba como os cabelos e unhas.

***T. rubrum*;**

Espécie antropofílica cosmopolita. Sua transmissão é exclusivamente inter-humana ou por fômites contaminados.

Crescimento em 12-16 dias em agar Sabouraud. Colônias com textura algodonosa, apresentam tonalidade branca que, com o passar do tempo, pode tornar-se avermelhada e reverso avermelhado. Apresenta grande quantidade de microconídeos, regulares e piriformes. Os macroconídeos, quando presentes, podem apresentar-se como clavias alongadas, quase com um aspecto cilíndrico e com duas a nove septações.

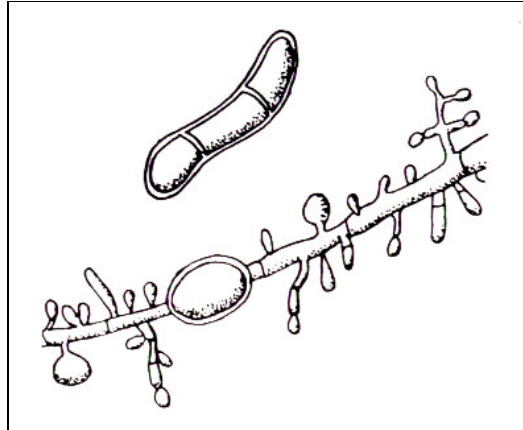
***T. rubrum***



***T. tonsurans*;**

Parasita antropofílico. Apresentam crescimento intermediário, com maturação 12-16 dias após semeadura primária, colônias bastante variáveis que pode variar do algodonoso ao veludoso. Verso com coloração branco e reverso apresenta tons variados de castanho-avermelhado. Apresenta numerosos microconídeos dispostos em acládio e de formas variadas.

*T. tonsurans*

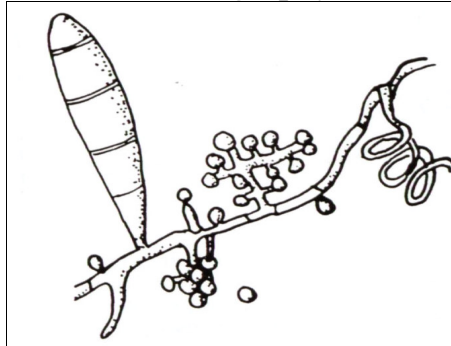


*T. mentagrophytes*:

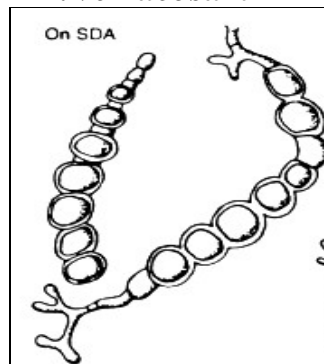
Pode apresentar variedades : *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* espécie zoofílica em agar Sabourad apresenta textura pulverulenta de coloração que pode variar do branco-amarelado ao castanho-avermelhado – reverso avermelhado e *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* espécie antropofílica colônia veludosa ao algodonosa, de coloração branco-amarelado, reverso acastanhado ou avermelhado. A diferenciação das variedades não é evidente.

Microscopicamente, as colônias apresentam grande quantidade de microconídeos arredondados e agrupados, o que lhes confere o aspecto em cacho. Os macroconídeos, quando presentes, mostram um aspecto semelhante a um charuto, som um a seis septos transversais. Com frequência observam-se estruturas de ornamentação, tais com hifas em espiral.



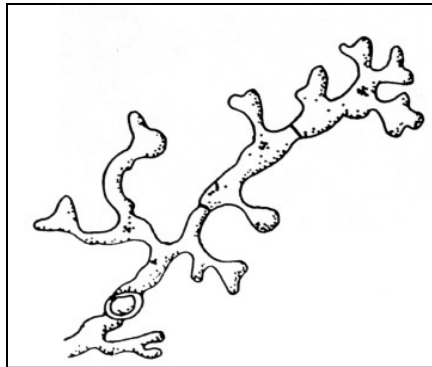
***T. mentagrophytes******T. verrucosum*:**

Trata-se de um fungo cosmopolita que parasita principalmente bovinos, podendo esporadicamente causar lesões em humanos. Clinicamente pode causar lesões bastante inflamatórias do couro cabeludo, pele glaba, barba e bigode. Crescimento lento que varia de 13-25 dias. Macroscopicamente, a colônia caracteriza-se por uma textura veludoso, pigmentação do verso que varia do branco ao amarelo ocre. O reverso apresenta-se em de amarelo com pigmento não difusível pelo meio. A microscopia óptica, de material proveniente de Agar Sabouraud não apresenta microconídeos nem macroconídeos. O que chama a atenção e a quantidade de cadeias formadas por clamidoconídeos grandes.

***T. verrucosum***

***T. schoenleinii*:**

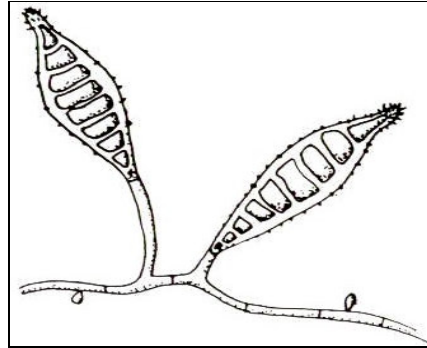
Crescimento lento que varia de 14 a 30 dias. Colônias com textura veludosa e pigmentação que varia do bege ao castanho escuro. O reverso segue o mesmo tom do verso não se observa pigmento difusível no meio. Na microscopia geralmente não são observados macroconídeos nem microconídeos; entretanto, vêem-se numerosas hifas septadas e em bifurcação, associadas a hifas em forma de candelabro e a hifas em forma de cabeça de prego.

***T. schoenleinii*****Gênero *Microsporum*:*****M. canis*:**

É um dermatófito zoofílico transmitido ao homem por diversos animais domésticos principalmente felinos jovens. Clinicamente, é responsável por lesões do couro cabeludo, caracterizada por grandes placas de alopecia, principalmente em crianças. Crescimento rápido de 6-10 dias. Textura algodoadosa de tonalidade branca. O reverso apresenta-se de coloração amarelo-limão. A microscopia direta da colônia mostra na maioria das vezes grande quantidade de macroconídeos fusiformes verrucosos, de paredes grossas e com numerosas septações, que variam

de 5 a 7. Os microconídeos sem em quantidade variadas e sem nenhum valor diagnóstico.

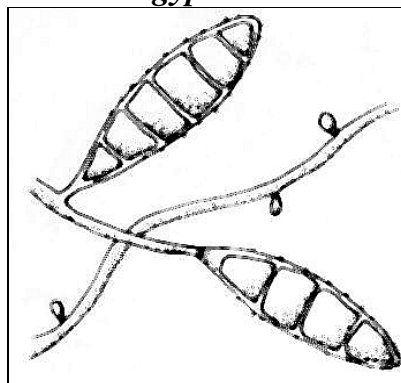
*M. canis*



*M. gypseum*:

Espécie geofílica, que infecta o homem através do contato com o solo contaminado. Colônia de crescimento rápido 3-5 dias. Macroscopicamente a colônia possui textura pulverulenta com pigmentação amarelo-acastanhado. O reverso pode apresentar variações de cores que vão do alaranjado ao marrom. Microscopicamente apresentam macroconídeos simétricos, com 3-7 septos de paredes finas, extremidade arredondada e superfície levemente rugosa.

*M. gypseum*

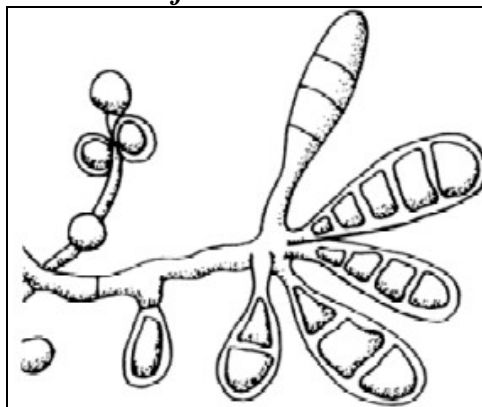


## Gênero *Epidermophyton*;

### *E. floccosum*:

Dermatófito antropofílico. Crescimento rápido 7-10 dias. Macroscopicamente essas colônias apresentam textura algodonosa. A coloração dos bordos e do verso é amarelo-esverdeada. O reverso da colônia tende a acompanhar a coloração do verso. Pigmento difusível no meio. Microscopicamente, caracteriza-se pela presença de macroconídios de parede fina, com 2 a 5 septos e agrupados em cachos.

*E. floccosum*



### -Candidíases:

Nome de conotação genérica para denominar doenças causadas por *Cândida albicans* e outras espécies. O habitat da *Candida* é bastante amplo, no homem essa levedura habita a mucosa digestiva e por contigüidade a mucosa vaginal. A infecção pode atingir mucosas, tecido cutâneo e em alguns casos pode ser sistêmica. As manifestações clínicas apresentam grande diversidade de quadros, podendo ser divididas em três grandes grupos: Candidíase cutâneo-mucosa, Candidíase sistêmica e candidíase alérgica. As principais espécies patogênicas são:

*C. albicans*

*C. tropicalis*

*C. pseudotropicalis*  
*C. guilliermondi*  
*C. parapsilosis*  
*C. krusei*

## MICOSES SUBUTÂNEAS

Micoses subcutâneas são infecções causadas por um grupo diversificados de fungos que ataca o homem e os animais . As lesões aparecem inicialmente a partir de um ponto de inoculação de estruturas fúngicas, através de traumatismos diversos. Podem permanecer localizados ou se espalhar pelos tecidos adjacentes, por via linfática ou hematogênica. As maiores dos fungos envolvidas são sapróbios habituais do solo e vegetais em decomposição.

As principais micoses subcutâneas são; Cromoblastomicose, esporotricose, micetoma (eumicetoma e actinomicetoma), zigomicose, rinosporidiose, doença de Jorge Lobo, feo-hifomicose e hialo-hifomicose.

### **Cromoblastomicose:**

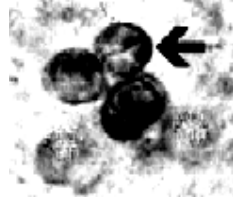
Infecção crônica, granulomatosa, caracterizada por lesões nodulares, verrucosas, papilomatosas, por vezes ulceradas, localizadas, preferencialmente nos membros inferiores, tendo como agente etiológico fungos de coloração escura (demaciáceos), distribuídos por diversas espécies. Os principais são: *Fonsecaea pedrosoi*, *F. compacta*, *Phialophora verrucosa*, *Clodophialophora carrionii* e *Rhinochadiella aquaspersa*.

A principal via de contágio se faz através de solução de continuidade produzida na pele por fragmentos de vegetais ou madeira contaminados.

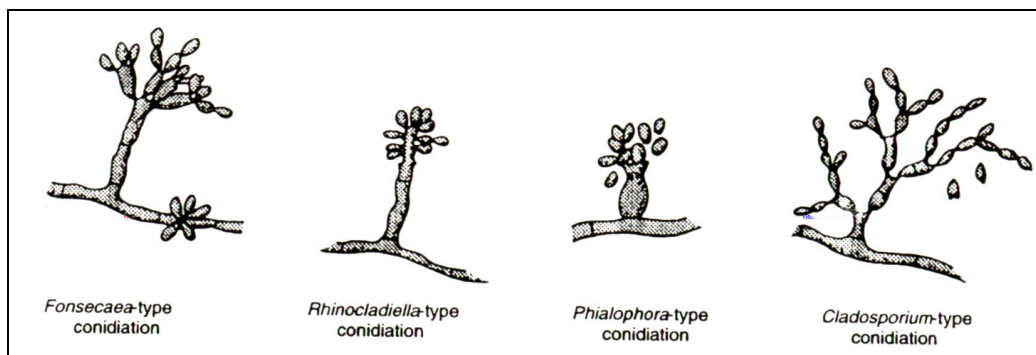
### **Diagnóstico:**

**Exame direto:** Material proveniente das lesões (escamas, crostas ou pus) ou pequeno fragmento de biópsias clarificado com KOH. Observam-se

células arredondadas de contornos bem nítidos, acastanhados, algumas se mostrando em processo de reprodução binária (células escleróticas).



**Cultura:** Em ágar Sabouraud crescimento em torno de 7 a 15 dias de colônias escuras. O aspecto microscópico da cultura não é o mesmo em todos os casos, sofrendo variações na morfologia, fato que leva a identificação das espécies.



### Esporotricose:

A esporotricose é uma infecção de evolução sub-aguda ou crônica, caracterizada por pequenos tumores subcutâneos (gomas), que tendem à supuração e ulceração. O agente etiológico é o *Sporothrix schenckii*, fungo dimórfico, que se introduz nos tecidos orgânicos através de traumatismo ou, raramente, por inalação. Esse fungo é encontrado em vida saprofítica em vegetais, solo, águas contaminadas e animais. A forma clínica mais freqüente da micose é a linfangite nodular ascendente, que se inicia pela inoculação do agente, geralmente nas extremidades (cancro de inoculação), atingindo os glândlios linfáticos.

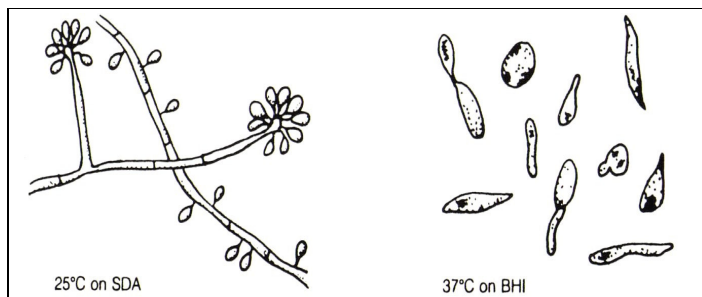
### Diagnóstico:

**Exame direto:** “A fresco” não revela nenhuma forma conclusiva do *S. schenckii*. Esfregaços de pus corados pelo Gram, PAS ou Gomori, raramente permitem a visualização do fungo. As células fúngicas observadas nas lesões são raras, e quando presentes são vistas pequenas leveduras com ou sem brotamento em forma de navete, ou sob a forma de corpo asteróide.

### **Cultura:**

**Macromorfologia:** Culturas de crescimento rápido (4 dias). Apresentam dimorfismo térmico. A 25-30° C, colônias inicialmente lisas e brancas, que se tornam úmidas, enrugadas ou aveludadas, e, com frequência, escurecem apresentando coloração marrom ou preta. Alguns isolados são inicialmente escuros. A 35- 37°C colônias de cor creme ou bronzeada, lisas, macias e leveduriformes.

**Micromorfologia:** 25-30°C - Hifas septadas, delgadas, conidióforo verticilado, sessil ou pedunculado, com conídios alongados, afilados nas duas extremidades, pequenos e unicelulares. Fracamente ligados às hifas, tendo uma disposição com aspecto de “margarida”.



### **Micetomas:**

**Definição:** Micetoma é uma síndrome clínica, de evolução crônica, caracterizada pelo aumento de volume de uma região ou órgão, com a presença ou não de fístulas que drenam um material seroso ou sero-purulento no qual podem ser encontrados “grãos”. A tríade de tumefação, fístulas que drenam e a presença de grãos é usada no sentido restrito para definir o termo micetoma. O Grão é um aglomerado de microrganismos.

O micetoma pode ser provocado tanto por bactérias como por fungo verdadeiro.

Os micetomas são classificados em dois grupos: actinomicóticos ou actinomicose e maduromicóticos ou maduromicose. O primeiro grupo, mais numeroso, estão os micetomas produzidos por bactérias, os actinomicetos. No segundo estão os micetomas provocados por fungos verdadeiros, ou eumicetos.

Ainda os micetomas actinomicóticos (de origem bacteriana) podem ser divididos em dois grupos, segundo a origem endógena ou exógena do agente:

- Actinomicose, de origem endógena, provocada por actinomicetos anaeróbicos, sendo os mais freqüentes o *Actinomyces israeli*, e *Arachnia propionica*.
- Nocardiose, de origem exógena, provocada por actinomicetos aeróbios, sendo os mais freqüentes a *Nocardia asterides*, *N. brasiliensis* e várias espécies do gênero *Streptomyces*, principalmente o *S. somaliensis*.

Os micetomas maduromicóticos, causados pelos eumicetos são provocados principalmente pelo *Madurella grisea*, *M. mycetomatis* e *Pyrenochaeta romeroi*.

### **Diagnóstico:**

O diagnóstico laboratorial dos micetomas é baseado na observação dos grãos, que drenam espontaneamente das lesões, ou que são extraídos através de punção ou biopsia.

#### ***Grão de actinomiceto***

**Em corte de tecido:** O grão aparece no meio de uma área com grande infiltração linfocitária, sem forma regular e sem estrutura interna bem definida. É constituído de massas de finíssimos filamentos. Nas bordas freqüentemente formam-se massas irregulares ou expansões com forma de clava. A cor varia muito devido à diversidade dos agentes causais (desde azul a vermelho claro), variando também conforme a técnica de coloração.

#### ***Grão maduromicótico***

**Em corte de tecido:** Grãos grandes, de forma irregular, contorno bem



nítido, com estrutura interna constituída de hifas cortadas em diversas posições, dando um aspecto do mosaico irregular. Não apresentam clavas e a coloração varia de marrom a preto.

### **Zigomicose:**

Zigomicose são infecções causadas por fungos pertencentes à classe dos Zygomycetes. Em sua maioria, esses organismos são saprofíticos, vivendo no solo, água e nos vegetais em decomposição. São fungos filamentosos constituídos de hifas largas e sem septo. A zigomicose é dividida em duas entidades clínicas distintas: a mucormicose, também conhecida apenas como zigomicose; e a entomofotoromicose, cujos agentes etiológicos pertencem às ordens dos Mucorales e Entomophthorales, respectivamente.

A mucormicose é uma infecção, em geral, de evolução rápida e fulminante. Os agentes etiológicos mais freqüentemente isolados nos quadros de mucormicose são os seguintes: *Mucor sp.*, *Rhizopus sp.*, *Rhizomucor sp.* e *Absidia sp.*. As principais formas clínicas dessa doença são: Zigomicose cutânea (trauma mecânico), zigomicose pulmonar (bola fúngica), zigomicose rinocerebral (forma clínica mais comum- inicia-se nos seios paranasais e evolui para o cérebro) e zigomicose sistêmica (está relacionada com a forma primária pulmonar).

### **Diagnóstico:**

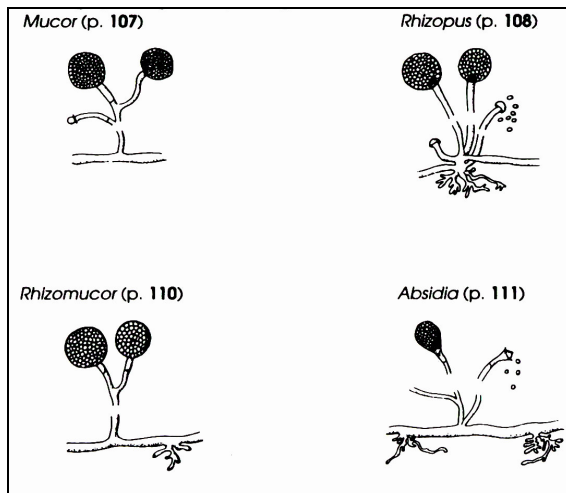
**Exame direto:** KOH, observam-se hifas largas, não septadas, irregulares. Cultura; Meio Sabouraud – Não usar meio com cicloeximida pois impede o crescimento do fungo.

### ***Rhizopus sp***

**Macromorfologia:** Colônia de crescimento rápido, cotonosa, inicialmente branca, passando para acinzentada ou amarronzada, recoberta de pontos negros.

**Micromorfologia:** Hifas vegetativas largas, cenocíticas (septos ausentes), hialinas. Esporangióforos ligados por estolones que conectam as bases das estipes (hastes) nos pontos de fixação sobre a superfície. As estipes podem ser únicas ou fasciculadas (formando feixes), sem ramificação, tendo na

base os rizóides ou rizomorfas que são órgãos com aspecto de raiz e têm por função fixar sobre superfícies e absorver alimentos. A extremidade da estipe alarga-se como “guarda chuva”(columela) de onde sai a membrana formadora do esporângio. Este é globoso, inicialmente incolor, passando a preto com a idade da cultura. No interior do esporângio formam-se os esporangiósporos que , quando maduros, são liberados em grande número após a ruptura da membrana.

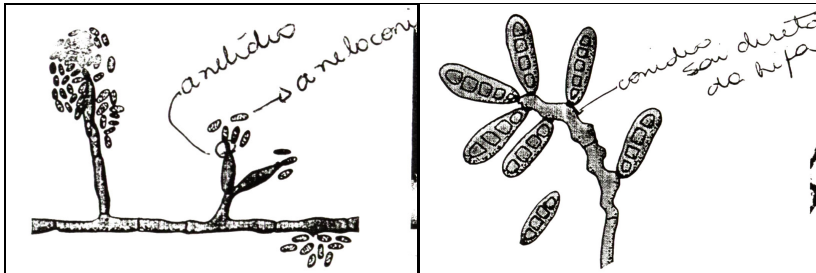


### Entomoftoromicose:

É uma infecção crônica do tecido subcutâneo e mucosa, causada por fungos que vivem saprofiticamente no solo , vegetais em decomposição e fezes de répteis e anfíbios. A infecção ocorre com maior frequência através da inalação ou inoculação de esporos. Os principais agentes etiológicos são; *Delacroixia coronata* e o *Basidiobolus ranarum*.

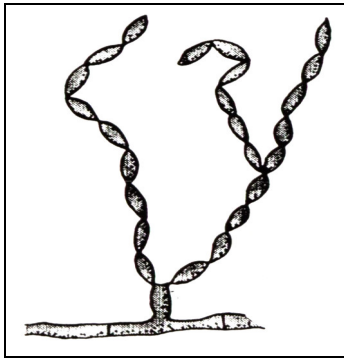
### Feo-hifomicose:

A designação feo-hifomicose foi proposta por Ajello, em 1974, para denominar infecções cutâneas, subcutâneas e profundas, agudas ou crônicas, causadas por uma grande variedade de fungos escuros com exceção dos agentes da cromoblastomicose. Os principais agentes etiológicos são; *Bipolaris oregonensis*, *Cladosporium bantianum* e *Exophiala jeanselmei*.



*Exophiala jeanselmei*.

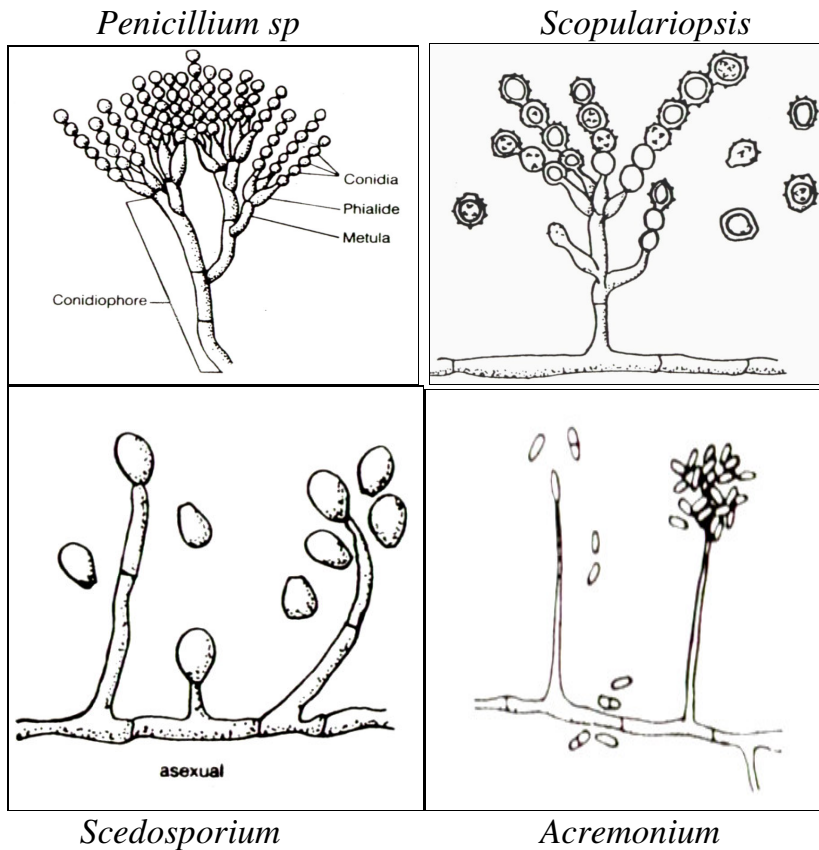
*Bipolaris oregonensis*



*Cladosporium bantianum*

### **Hialo-hifomicose:**

Esse termo foi proposto por Ajello, 1982, para agrupar as infecções ocasionadas por fungos filamentosos hialinos, septados, não formadores de estruturas específicas (como os grãos dos eumicetomas) e que, até então, não eram patógenos clássicos. A maioria dos fungos produtores dessa micose são saprofitas habituais do solo, parasitas de vegetais e degradadores de materiais orgânicos. Grande parte desses fungos é oportunista, com limitado poder patogênico. Os principais são; *Acremonium falciforme*, *Penicillium marneffe*, *Scedosporim apiospermum* e *Scopulariopsis brevicaulis*.



### Rinosporidiose:

É uma infecção micótica submucosa, crônica, de evolução lenta e granulomatosa, causada pelo *Rinosporidium seeberii*. Essa infecção é caracterizada pela formação de pólipos vegetantes localizados, principalmente nas mucosas nasal e conjuntival. O fungo é um provável habitante de águas estagnadas, poços e açudes, sendo uma das possíveis vias de aquisição da infecção.

### Diagnóstico:

**Exame direto:** KOH do material biológico (pólipos) observa-se células arredondadas (esporângio) de parede espessura variando de 10 a 100 m

de diâmetro. Nos cortes histológicos corado por HE PAS e Gomori observa-se grande quantidade de esporângio com numerosos ndosporos em seu interior.

### **-Doença de Jorge Lobo**

É uma doença crônica, localizada, caracterizada pela presença de lesões semelhantes a um queloide, lesões verrucosas ou vegetantes, nodulares ou tumorais. O agente etiológico da micose é o fungo denominado de *Loboa lobo*. A contaminação acredita-se que seja através da inoculação acidental do parasita por traumatismo.

#### **Diagnóstico:**

É realizado basicamente pelo exame direto e histopatológico.

No exame direto com KOH observa-se célula globosa leveduriforme de tamanho uniforme com inclusões lipídicas em seu citoplasma e com parede espessa. No exame histopatológico observa-se células arredondadas, de parede espessa, isoladas em cadeias com intensa reação inflamatória.

Não é possível cultivar o fungo.

## **MICOSES PROFUNDAS**

### **Paracoccidioidomicose (PCM):**

Trata-se de infecção granulomatosa de evolução crônica, com grande polimorfismo clínico, onde as formas pulmonares e cutâneo-mucosas predominam, seguindo-se outros órgãos, como gânglios linfáticos, suprarrenal, baço fígado, intestinos, ossos, etc. Na grande maioria dos casos, os pulmões estão comprometidos e, em geral, tal localização é acompanhada

de lesões em outros locais. A paracoccidiodomicose é de distribuição geográfica restrita aos países latino-americanos. Atinge frequentemente indivíduos do sexo masculino entre 30-40 anos. Quanto ao modo de contágio da doença, admite-se, atualmente, que é adquirida pela inalação de esporos que vivem na natureza, no solo, vegetais ou na água, determinando lesões primárias pulmonares.

A classificação clínica na paracoccidiodomicose pode ser:

PCM-infecção: estágios assintomáticos e subclínicos. Contatos com o fungo sem desenvolver sintomas. Testes intradérmico positivos.

PCM-doença; Doença clínica sintomática

Aguda ou juvenil: Evolução rápida, dissemina-se para órgãos e sistemas

Crônica: Origina-se da PCM-infecção, leva muitos anos para se manifestar.

Pode disseminar para outros órgãos.

Agente etiológico: *Paracoccidioides brasiliensis*. Fungo dimórfico térmico – a 25°C – forma micelial – 37 °C forma de levedura.

### **Diagnóstico laboratorial;**

É realizado pela pesquisa direta do agente em escarro, biópsia de lesão, pus de linfonodos ou pesquisa de anticorpos no soro.

**Exame direto:** Material da lesão ou escarro com KOH. São encontradas formas características de leveduras com parede dupla e múltiplos brotamentos (em roda de leme).

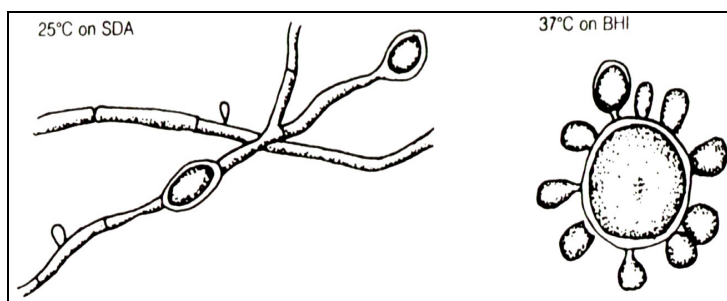
**Em pus:** Células arredondadas (na sua maioria), ovaladas, com parede grossa bem refringente. Tamanho variável. Formação de brotos únicos, duplos ou múltiplos (em roda de leme). Disposição catenulada ou aglomerada. Pequenos vacúolos aparecem no citoplasma.

**Em material corado pela hematoxilina-eosina:** Apresenta-se como formas arredondadas, de 1 a 20 µm, com parede grossa e refringente, isoladas ou agrupadas, com brotamento único ou múltiplo (em roda de leme). A coloração do citoplasma varia de levemente azulada e levemente avermelhada, podendo ser incolor. Com frequência, aparecem fagocitadas por células gigantes (Langhans).

**Em material corado pela prata:** O aspecto é o mesmo da preparação

anterior, mas a coloração das células fúngicas varia de amarelo claro passando pelo marrom, até preto. Observa-se com maior nitidez as formas com brotamentos múltiplos.

**Cultura:** Cultivo em agar Sabouraud e agar Mycosel a 25°C. Após 20-30 dias, crescimento de colônias brancas que à análise micromorfológica apresentam clamidósporos intercalados ou terminais nas hifas. O diagnóstico pode ser feito se observado a conversão da forma micelial para leveduriforme cultivando-se a 37°C.



### **Histoplasmose:**

É uma doença granulomatosa, tendo como agente etiológico o fungo *Histoplasma capsulatum*, que apresenta especial afinidade pelo sistema retículo endotelial, produzindo diversas manifestações clínicas.

Classificação das formas clínicas;

**Assintomática:** Indivíduos que entram em contato com o fungo mais não desenvolvem sintomas. Algumas vezes podem aparecer sintomas que se assemelham desde uma tuberculose a um resfriado. Os glânglios mediastinais podem estar envolvidos. Quando não ocorre a cura espontânea, evolui para a forma generalizada.

**Generalizada:** Ocorre por disseminação pulmonar apresentando sintomas de acordo com o órgão afetado principalmente os que fazem parte do sistema retículo endotelial como fígado, baço e linfonodos.

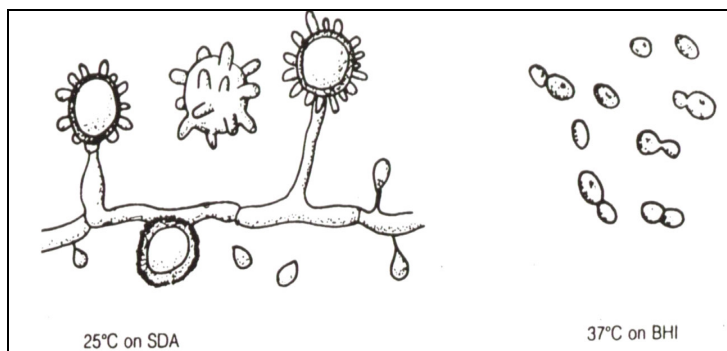
O contágio é através da inalação de esporos do fungo.

O *Histoplasma capsulatum* também é um fungo dimórfico térmico.

### Diagnóstico;

**Exame direto:** Material biológico com KOH – as formas de leveduras dificilmente são encontradas por este método.

**Em corte de tecido corado pela H.E.:** Células parasitárias arredondadas, aparecendo como elementos intracelulares, de parede grossa e citoplasma retraído. Observa-se uma zona clara entre a parede e o citoplasma, o que simula uma cápsula.



## MICOSES OPORTUNISTAS

### Criptococose:

Infecção subaguda ou crônica, de comprometimento pulmonar, sistêmico e do sistema nervoso central, causado pelo *Cryptococcus neoformans*. A infecção primária no homem é sempre pulmonar, devido a inalação do fungo da natureza. A infecção pulmonar é quase sempre subclínica e transitória; entretanto, pode emergir ao lado de outras doenças que debilitem o indivíduo, tornar-se rapidamente sistêmica e fatal. Portanto é conhecida como infecção oportunista. O fungo possui forte



neurotropismo.

**Diagnóstico:**

Materiais biológicos: líquor, escarro, pus ganglionar, exudatos de lesões cutâneas e mucosas, urina e sangue.

**Exame direto:** A fresco com tinta nanquim. O fungo é visualizado como uma célula arredondada.

**Macromorfologia:** Culturas de crescimento rápido (3 dias). Colônia plana ou levemente elevada, brilhante, úmida, com frequência mucóide. Cor inicialmente creme tornando-se bronzeada.

**Micromorfologia:** Células arredondadas ou ovalada, isoladas ou com brotamento único; parede grossa, bem refringente e vacúolos no citoplasma. Cápsula bem nítida em preparações com tinta nanquim.

**Aspergilose:**

A aspergilose no seu sentido amplo é definida como um grupo de doenças na qual fungos do gênero *Aspergillus* estão envolvidos. Esses fungos são cosmopolitas e extremamente presentes na natureza, sendo encontrados em restos orgânicos, no solo, no ar e sobre a superfície de seres vivos, etc. Por essas razões, representa no laboratório de micologia, uma fonte freqüente de contaminação dos meios de cultura e de espécimes clínicos a serem analisados. No homem a doença depende do estado fisiológico geral ou local do hospedeiro.

As principais manifestações clínicas são:

Aspergilose pulmonar: Aspergiloma (bola fúngica), Aspergilose invasiva, Aspergilose alérgica, Aspergilose bronco-pulmonar

Aspergilose disseminada

Otomicose

Onicomucose

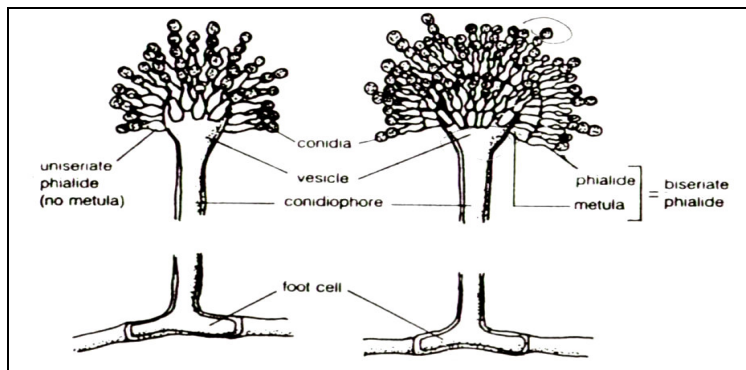
**Diagnóstico:**

**Exame direto:** Em KOH hifas hialinas

**Cultura:**

**Macromorfologia:** Colônia de crescimento rápido, inicialmente branca, passando a azul, verde, amarela ou preta. Reverso incolor, amarelo ou preto. Pulvurulenta ou granulosa, com borda franjada e contorno circular ou lobado, mas limitado.

**Micromorfologia:** Hifas vegetativas, ramificadas, septadas, incolores e refringentes. Conidióforo, com haste simples, saindo de uma célula base, e extremidade globosa (vesícula). Da superfície da vesícula saem fiáldes ou esterigmas, em forma de garrafas e disposição radiada no seu conjunto. Na extremidade de cada fiálide forma-se uma cadeia de esporos basipetos (conídio ou fialosporo), globosos, de cor variável.



## **PARTE II**

### **Técnicas para identificação de fungos**

#### ***Técnicas para identificação de fungos filamentosos***

##### **1- Técnica de esgarçamento:**

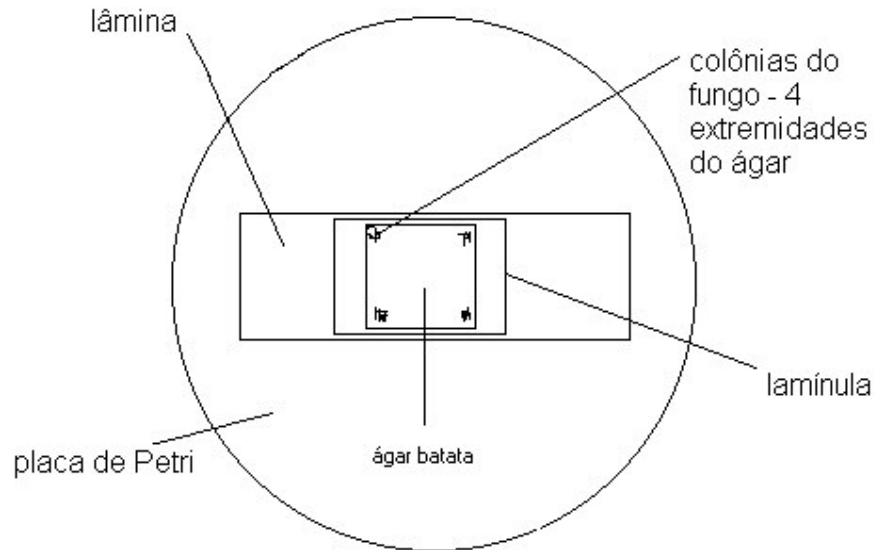
Utilizada como primeira tentativa (mais rápida) para identificação de colônias filamentosas. As estruturas fúngicas são quebradas, tornando-se mais difícil a identificação.

- Com alça de platina em “L”, retirar um pedaço da colônia de bolor crescida no ágar.
- Colocar 1 a 2 gotas de Lactofenol azul-algodão. Cobrir com lamínula, comprimindo levemente. Observar em microscópio com aumento de 400X.

##### **2- Microcultivo em lâmina:**

No microcultivo em lâmina, as estruturas permanecem íntegras além de ser utilizado um meio de cultura (ágar batata), que estimula a produção de macro e microconídeos, que na maioria das vezes identificam o fungo. Estimula, também, a formação de pigmento.

- Esterilizar placas de Petri com 3 lâminas no interior (duas servem para suporte e a outra para realizar o microcultivo).
- Preparar ágar batata em placa
- Cortar em quadradinhos
- Colocar um pedaço de ágar batata no centro da lâmina do microcultivo
- Com a alça em “L”, cortar pedaços bem pequenos da colônia do bolor, crescidos no ágar e colocar nos quatro lados do pedaço de ágar batata
- Cobrir com lamínula estéril, pressionando levemente
- Colocar um pouco de água destilada estéril e deixar a 25°C, repondo a água estéril, sempre que necessário. Deixar por 10-15 dias, dependendo da velocidade do crescimento do fungo.
- Para montar, retirar a lamínula com pinça estéril. Fixar o fungo na lamínula colocando 1 a 2 gotas de álcool e esperar secar. Montar essa lamínula em lâmina limpa, com 1 gota de Lactofenol azul- algodão.
- A lamínula pode ser vedada com esmalte de unha ou Entellan para conservar por mais tempo.



### Reagentes e meios de cultura:

#### Lactofenol azul-algodão:

Fenol cristalizado	20g
Ácido láctico	20ml
Glicerina	40ml
Água destilada	20ml
Azul-algodão	0,05g

Fundir o fenol separadamente. Misturar o ácido láctico, glicerina e água com o fenol. Colocar o corante e filtrar em papel.

#### Ágar Batata:

Batata	10g
<b>Glicose</b>	<b>5g</b>
Ágar	10g

Água 500ml

Ferver bem a batata cortada em pedacinhos e descascadas. Amassar bem e completar o volume para 500ml. Adicionar a glicose e o ágar e deixar em Banho-Maria até dissolver completamente.

Colocar em frascos com aproximadamente 20ml.

Autoclavar a 121°C por 15 minutos.

## IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS

### 1- PROVA DO TUBO GERMINATIVO:

A prova do tubo germinativo é um teste que caracteriza rápida e presuntivamente a levedura da espécie *Candida albicans*.

A técnica é muito simples e baseia-se, fundamentalmente, na semeadura de um pequeno inóculo dessa levedura em soro, que pode ser de várias espécies animais. Os soros recomendados são o humano, o fetal bovino ou de cavalo, podendo-se, ainda, utilizar albumina de ovo.

#### **Técnica:**

- a. Com a ponta de uma pipeta Pasteur estéril, ou ainda, com uma alça de platina calibrada (0,001ml), retirar uma pequena porção de uma colônia de levedura e emulsioná-la de forma asséptica em 0,5 ml de soro. Evitar, se possível, o uso de soro humano, que pode ter anticorpos ou ainda antifúngicos.

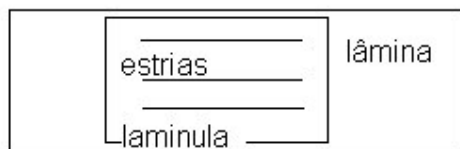
- b. Incubar a 37°C por um período de 1,5-2 horas, em banho-maria, ou até 3 horas em estufa bacteriológica.
- c. Findo este período, deve-se remover uma gota da suspensão e montar uma preparação do tipo lâmina-lamínula, para observação microscópica. O tubo germinativo, quando o teste for positivo, aparecerá como filamento fino e cilíndrico, originado do blastoconídio da levedura, no qual não se observa nenhuma zona de constricção, quer na base ou ao longo de sua extensão.

## **2- MICROCULTIVO DE LEVEDURAS**

Esta técnica baseia-se no princípio de que leveduras, quando incubadas num meio com Tween-80 apresentam a capacidade de filamentar, formando pseudo-hifas e/ou hifas verdadeiras. Assim, pelas características morfológicas diferenciadas das estruturas filamentosas, pode-se sugerir a espécie de levedura implicada na identificação.

### **Técnica:**

Preparar ágar Fubá e colocar 3 ml de meio, ainda líquido, sobre a lâmina do microcultivo, com pipeta estéril. Esperar solidificar. Com alça de platina, pegar um pouco da colônia de levedura crescida no ágar e semear em estria no ágar Fubá. Cobrir com lamínula estéril. Deixar 2 a 3 dias à 25°C e observar a preparação, da forma como está, em microscópio com aumento de 400x.

**Material:**

Ágar Fubá:

Farinha de milho amarela	6,25g
Água	150 ml
Ágar	1,9 g
Tween 80	1,5 ml

Aquecer em banho-maria 60°C por 1 hora a farinha de milho e a água. Filtrar. Completar o volume, com água, para 150 ml. Acrescentar o ágar e o Tween e deixar em banho-maria fervendo até dissolver.

Colocar em frascos com aproximadamente 3-5 ml.

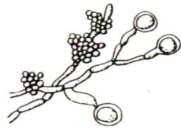
Autoclavar 121°C por 15 minutos.



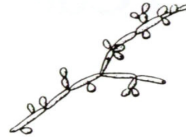
### Filamentação de *Candida sp* em ágar fubá com Tween-80:

#### *Pseudohyphae with blastoconidia*

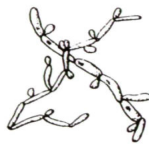
*Candida albicans* (p. 63)



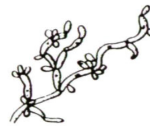
*Candida tropicalis* (p. 65)



*Candida parapsilosis* (p. 68)



*Candida lusitanae* (p. 69)



*Candida krusei* (p. 70)



*Candida kefyr (pseudotropicalis)*  
(p. 71)



*Candida guilliermondii* (p. 72)



*Candida lipolytica* (p. 73)



### 3- Auxanograma (Assimilação de Carboidratos e Nitrogênio)

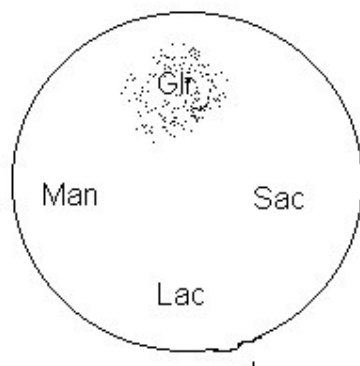
#### Assimilação de Carboidratos:

Esta técnica baseia-se na capacidade que as leveduras apresentam de utilizar determinado carboidrato como única fonte de carbono, para sua viabilidade celular. Desta forma utiliza-se, nesta técnica, um meio basal destituído de qualquer fonte de carbono (sem o qual a célula fúngica não pode crescer), onde será semeada a levedura que se deseja identificar.

Após a semeadura, adiciona-se ao cultivo um carboidrato e observa-se a capacidade de utilização deste como fonte de carbono. Quando o carboidrato é assimilado pela levedura, observa-se crescimento desta ao redor da fonte de carbono.

### **Técnica:**

- Preparar o meio Yeast Nitrogen Base de acordo com as normas preconizadas pelo fabricante.
- Simultaneamente, preparar uma suspensão de leveduras com turvação equivalente ao tubo número 5 da escala de MacFarland
- Toma-se uma alíquota de 1 ml da suspensão de leveduras e adiciona-se a 20 ml de meio basal fundido e resfriado. Transfere-se esta suspensão para uma placa de Petri homogeneizando suavemente.
- Aguarda-se a solidificação do meio e adiciona-se pequenas quantidades de açúcares em posições previamente demarcadas.



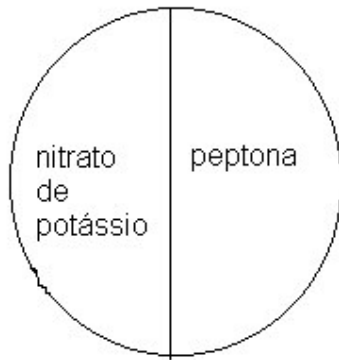
- Incubar as placas a 30°C por 24-48 horas.
- Observar regiões opacas ao redor dos açúcares adicionados

**Assimilação de Nitrogênio:**

A assimilação de nitrogênio demonstra a capacidade que algumas leveduras apresentam de assimilar nitrato de potássio (nitrogênio inorgânico), como única fonte de nitrogênio utilizado na sua viabilidade biológica.

**Técnica:**

- Prepara-se o meio Yeast Carbon Base, de acordo com as indicações do fabricante.
- Após a preparação e autoclavação, o meio deve ser estocado em geladeira, até o momento do uso.
- No momento do uso, fundem-se 20 ml do meio, e após resfriar a uma temperatura de 45-50 °C acrescenta-se a este 1 ml da suspensão de levedura previamente preparada (com uma turvação correspondente ao tubo 5 da escala de MacFarland)
- Após movimentos não muito bruscos de agitação para homogeneizar o inóculo, despeja-se o meio numa placa de Petri
- Após solidificação do meio, distribuir pequenas quantidades de compostos nitrogenados (nitrato de potássio e peptona)
- A peptona é aqui empregada como controle da viabilidade do inóculo, visto que todas as leveduras a utilizam como fonte nitrogenada.



#### **4- FERMENTAÇÃO DE CARBOIDRATOS:**

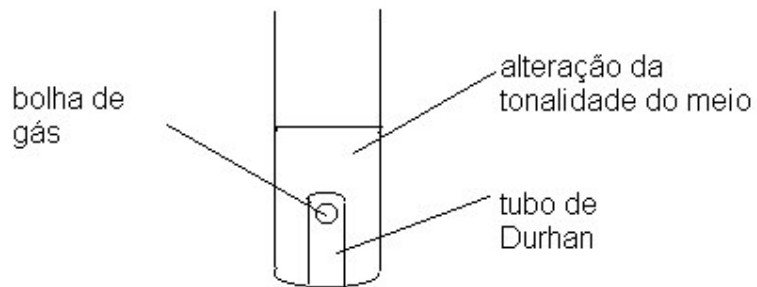
A capacidade de uma levedura fermentar determinado carboidrato está diretamente ligada à habilidade desta de possuir sistemas enzimáticos eficientes, capazes de permitir, em baixas tensões de oxigênio, degradar açúcares para produção de energia, formando, entre outros metabólitos, etanol e gás carbônico.

Assim, utiliza-se também na identificação das leveduras essa característica fenotípica, onde se investiga a habilidade que uma determinada levedura possui de fermentar um açúcar, através da demonstração da produção de CO<sub>2</sub>.

##### **Técnica:**

- Prepara-se o meio basal para fermentação e distribuídos em tubos de ensaio, contendo um tubo de Durham invertido em seu interior, em alíquotas de 3 ml.

- Os tubos são autoclavados e estocados na geladeira por até um mês.
- No momento da execução do teste, adiciona-se ao meio basal, 1,5 ml da solução de açúcares (6% em água destilada), mantendo sempre a relação de  $\frac{1}{2}$  da solução de açúcares para meio basal.
- Adiciona-se 0,2 ml da suspensão de levedura (escala 5 – MacFarland), no meio basal e incubam-se os tubos a 37°C por 10-14 dias.



### Material:

#### Meio de cultura

Azul de bromotimol	0,03 g
Extrato de levedura	2,7 g
Peptona	4,5 g
Água destilada	600 ml
Etanol a 95%	1,8 ml

Dissolver o extrato de levedura e a peptona em água destilada.

Separadamente dissolver completamente o azul de bromotimol em etanol. Adicionar o azul de bromotimol dissolvido à mistura inicial e homogeneizar. Distribuir 3 ml do meio em tubos de ensaio com tampa roscável contendo um tubo de Durhan na posição invertida. Autoclavar a 121°C, por 15 minutos. Deixar resfriar. Adicionar a cada tudo, 1,5 ml de uma das soluções de açúcares. Estocar a 4°C.

**IMPORTANTE: Observar na Parte IV desta apostila o “Protocolo para identificação de leveduras”.**

## **ISOLAMENTO DE FUNGOS DO AR**

**A. Finalidade:** O isolamento de fungos anemófilos é importante na determinação da flora do ar de uma área, nos estudos sobre alergia a fungos, na determinação do grau de contaminação de ambientes, para obtenção de amostras de interesse industrial, etc.

**B. Fundamento:** Usando-se a técnica de exposição de placas com meio de cultura durante tempos pré-fixados, os esporos em flutuação no ar sedimentam sobre o meio e aí germinam.

### **C. Material:**

- a. Placa com ágar Sabouraud ou ágar batata dextrose.
- b. Lactofenol azul algodão
- c. Lâminas, lamínulas, alças, etc.
- d. Tubos com ágar-Sabouraud ou ágar batata inclinado.

### **D. Execução da técnica:**

1. Abrir a placa e expor durante 20 minutos
2. Fechar, identificar e incubar à temperatura ambiente

3. Acompanhar o desenvolvimento das culturas
4. Examinar ao microscópio
5. Repicar em tubos

## **E. Resultado**

### **PESQUISA MICROSCÓPICA DE DERMATÓFITOS EM PÊLO**

**A. Finalidade:** Diagnóstico das tinhas do couro cabeludo.

**B. Fundamento:** O diagnóstico laboratorial das tinhas do couro cabeludo baseia-se no exame microscópico de pêlos e cultura dos mesmos em ágar Sabouraud. Os pêlos com microsporia apresentam esporos ectotrix na base e os pêlos com tricofícia apresentam parasitismo endotrix e/ou ectotrix em formas artrosporadas.

#### **C. Material:**

1. Lâmina, pinça, microscópio, etc.
2. Solução de KOH a 20%

#### **D. Execução:**

1. Colher, com uma pinça de ponta chata (pinça de depilação), pêlos danificados das bordas da lesão.
2. Colocar os pêlos entre 2 lâminas de vidro bem limpas (ou em placa esterilizada em caso de transporte).
3. Pingar uma gota de solução de KOH sobre os pêlos em uma lâmina e cobrir com lamínula.
4. Aquecer levemente, passando a lâmina várias vezes sobre a chama, evitando-se rigorosamente a fervura do líquido.
5. Examinar ao microscópio.
  - a. Os pêlos parasitados por *Microsporum* apresentam bainha externa de esporos pequenos ao redor do mesmo na região do folículo.
  - b. Os pêlos parasitados por *Trichophyton* apresentam formas filamentosas e artrosporadas externa e internamente.

## **E. Resultado**

A. Exame direto

B. Cultura

## **PESQUISA MICROSCÓPICA DE DERMATÓFITOS EM PELE E UNHA**

**A. Finalidade:** Diagnóstico de dermatofitoses de pele e unha: tinea corporis, tinea cruris, tinea manum, tinea ungueum e tinea imbricata.

**B. Fundamento:** O exame microscópico baseia-se no encontro de filamentos septados e ramificados, muitas vezes artrosporados, em escamas de pele e unha clareados com KOH.

### **C. Material:**

1. Escamas de pele
2. Lâminas, lamínulas, alça, etc.
3. Solução de KOH a 20%
4. Bisturi ou lâmina de barbear
5. Ágar Sabouraud-cloranfenicol

### **D. Execução:**

1. Raspar a pele ou a unha com bisturi ou lâmina.
2. Misturar uma parte das escamas com KOH sobre uma lâmina de microscópio e cobrir com lamínula.
3. Aquecer levemente evitando a fervura.
4. Comprimir levemente a lamínula.
5. Retirar o excesso de KOH.
6. Examinar ao microscópio.

### **F. Resultado:**



## **DEMONSTRAÇÃO DO DIMORFISMO DOS FUNGOS (Transformação M - Y)**

**A. Finalidade:** É característica de alguns fungos patogênicos, servindo para sua identificação e para estudos morfológicos ou de atividade antigênica, bioquímica etc.

**B. Fundamento:** A transformação M - Y ocorre com a mudança na composição do meio e na temperatura (ou apenas na temperatura).

### **C. Material:**

1. Ágar Sabouraud e ágar BHI
2. Cultura de *Sporothrix schenckii* ou *Paracoccidioides brasiliensis*
3. Alça de platina, lâmina e lamínula etc.

### **D. Execução:**

1. Repicar a cultura filamentosa no meio ágar BHI
2. Incubar a 37°C, durante período suficiente para crescimento, mantendo úmido o meio com pequeno volume de caldo Sabouraud (ou colocar vasilha com água na estufa).
3. Examinar ao microscópio.
4. Repicar, em ágar Sabouraud, a cultura da fase levedufiorme
5. Incubar à temperatura ambiente por período suficiente para crescimento
6. Examinar macro e microscopicamente.

## **PESQUISA DE LEVEDURAS EM PELE E UNHA**

**A. Finalidade:** Diagnóstico das leveduroses de pele e unha.

**B. Fundamento:** O exame microscópico é realizado pesquisando-se em escamas de pele e unha, clareadas com KOH, as formas arredondadas ou ovaladas, formando, às vezes, aglomerados e filamentos. Isola-se o agente em ágar Sabouraud.

**C. Material:**

1. Escamas de pele e unha
2. Solução de KOH a 20 ou 30%
3. Lâminas, lamínulas, etc.
4. Ágar Sabouraud-cloranfenicol

**D. Execução:**

1. Raspar a pele ou a unha para obter escamas
2. Colocar uma gota de KOH sobre a lâmina
3. Misturar uma parte das escamas com KOH
4. Cobrir com lamínula
5. Aquecer levemente
6. Examinar ao microscópio
7. Cultivar a outra parte do material em ágar Sabouraud-cloranfenicol.
8. Fazer as provas de tubo germinativo, clamidosporo (clamidoconídio) e bioquímicas.

**E. Resultado**

- a. Exame direto
- b. Cultura

**E. Resultado:** anotar, conforme tabela:

## **PESQUISA DE *Malassezia furfur***

**A. Finalidade:** Diagnóstico da pitiríase versicolor

**B. Fundamento:** O diagnóstico da pitiríase versicolor é realizado pela pesquisa microscópica de aglomerados de esporos, em forma de cacho de uva, ao lado de filamentos grossos, septados, curtos, com ramificações tendo aspecto de Y ou L.

**C. Material necessário:**

1. Fita adesiva transparente
2. Solução de KOH a 20%
3. Lâminas, lamínulas, microscópio, etc.

**D. Execução:**

**1. Pesquisa com fita adesiva:**

- a. Colocar a face colante da fita sobre a pele em descamação
- b. Retirar e colar a face colante da fita sobre a lâmina
- c. Examinar ao microscópio, procurando retirar e colar principalmente os esporos arredondados formando aglomerados em mosaico ou cacho de uvas.

**2. Pesquisa após clareamento com KOH:**

- a. Raspar a pele em área com descamação, usando bisturi ou lâmina de vidro.
- b. Misturar parte das escamas com KOH e cobrir com lamínula.
- c. Aquecer levemente a lâmina, evitando fervura.
- d. Examinar ao microscópio, procurando os esporos aglomerados em forma de mosaico e os filamentos.

**E. Resultado:**

## PRODUÇÃO DE UREASE

**A. Finalidade:** Identificação de **C. neoformans**.

**B. Fundamento:** Produzindo urease, **C. neoformans** decompõe a uréia com formação de amônia que alcaliniza o meio, provocando a viragem do indicador.

**C. Material:**

1. Meio de Christensen
2. Amostra de levedura

**D. Preparo do material:**

Meio de Christensen:

Uréia ágar base (Difco)..... 29 g  
Água destilada..... 100 ml

Esterilizar por filtração

Ágar..... 15 g  
Água destilada..... 900 ml

Autoclavar 115°C - 15 minutos.

Esfriar até 50 - 55°C, misturar a base e distribuir esterilmente em tubos.  
Solidificar inclinado.

**E. Execução da técnica:**

1. Semear na superfície
2. Incubar a 37°C
3. Observar a viragem do indicador (hidrólise da uréia= viragem para vermelho)

**F. Resultado:**

## **DIFERENCIAÇÃO DE *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes* PELO TESTE DA UREASE E PERFURAÇÃO EM PELO**

Meio de cultura utilizado:

Peptona 1g  
NaCl 5g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2g  
Glicose 5g  
Agar 15g  
Água destilada 1000ml

Procedimento: Adicionar 6ml de solução de vermelho de fenol (0,2% em etanol-50%). Autoclavar a 115°C por 15 minutos. Esfriar a 50°C e adicionar 100ml de solução aquosa a 20% de uréia esterilizada por filtração e inclinar.

Resultado:

*Trichophyton rubrum*: Urease fraca ou ausente (não há mudança antes de 14 dias)

*Trichophyton mentagrophytes*: Pulverulento – fortemente positivo (antes de 7 dias)

### **TESTE DE PERFURAÇÃO:**

- Usar cabelo pré-púbere e colocar em placas de Petri
- Esterilizar o cabelo por autoclaveagem a 120°C por 10 minutos
- Colocar 25 ml de água destilada estéril
- Adicionar 2 a 3 gotas de estrato de levedura
- Fazer leitura em 4 semanas

Resultado:

O *T. mentagrophytes* penetra perpendicularmente dentro do pelo, formando orifícios em forma de cunha. O *T. rubrum* não perfura o pelo.

## MEIOS DE CULTURA E CORANTE MAIS COMUNS EM MICOLOGIA

### Ágar Sabouraud (AS)

Peptona.....	10 g
Dextrose.....	20 g
Ágar.....	15 g
Água destilada.....	1000 ml

Dissolver o ágar em água fervente e acrescentar os outros componentes .  
Distribuir e autoclavar a 115°C por 15 minutos.

### Ágar Sabouraud + Antibióticos

Gentamicina.....	25 mg
Cloranfenicol.....	140 mg
Álcool.....	10 ml
AS ou ASD fundido.....	1000 ml

Dissolver o cloranfenicol no álcool e depois misturar com AS ou ASD ágar fundido. Distribuir e autoclavar a 115°C por 15 minutos.

### Corante

Lactofenol azul algodão (Lactofenol de Aman)	
Fenol.....	20 g
Ácido láctico.....	20 ml
Glicerina.....	40 ml
Água destilada.....	20 ml
Cotton blue (azul algodão).....	0,05 g

- Misturar: ácido láctico, glicerina e água.
- Acrescentar fenol e dissolver com calor uniforme.
- Acrescentar azul algodão.
- Filtrar em papel.

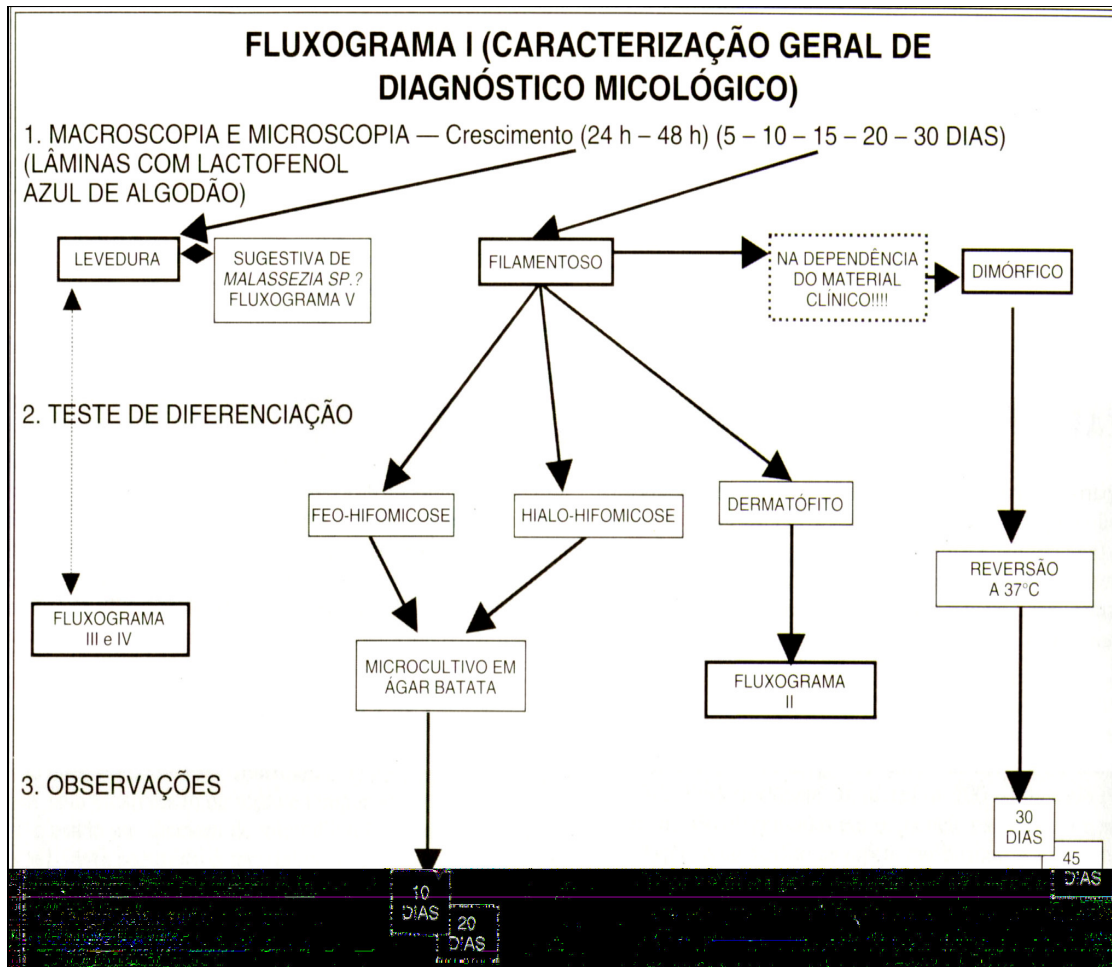
### KOH

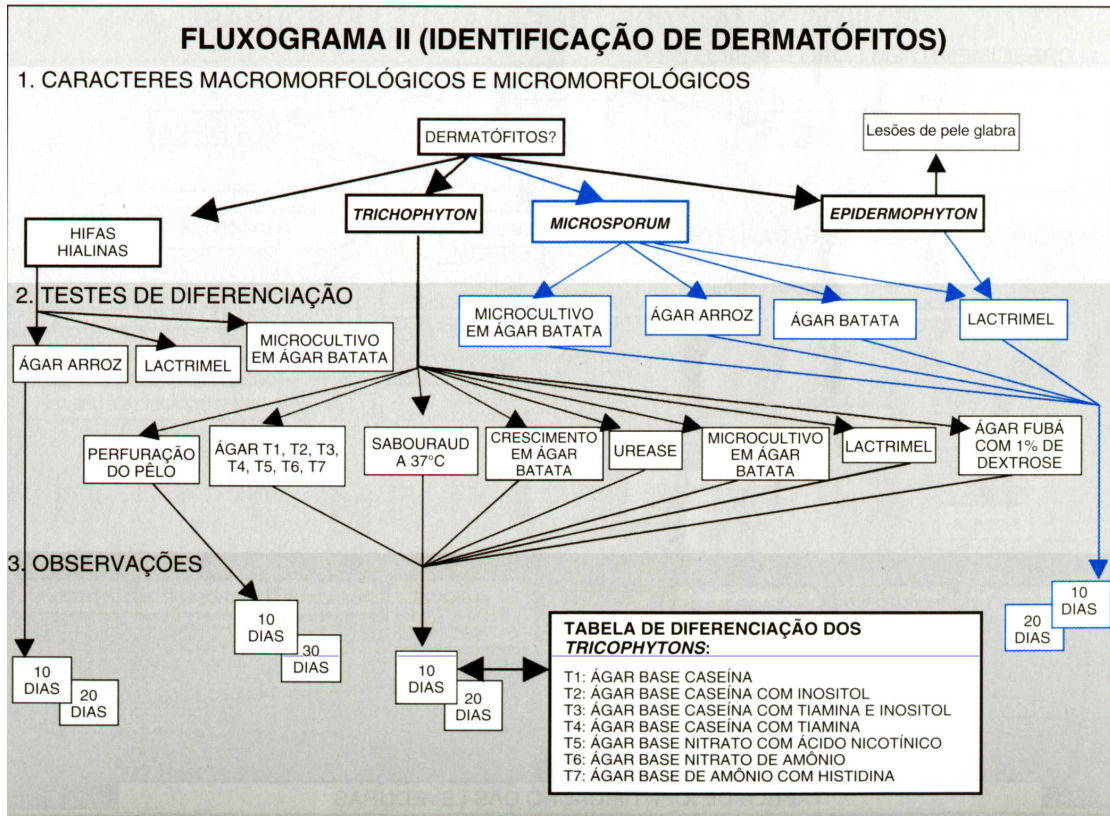
Hidróxido de Potássio diluído a 10 ou 20% em água destilada

### KOH + tinta

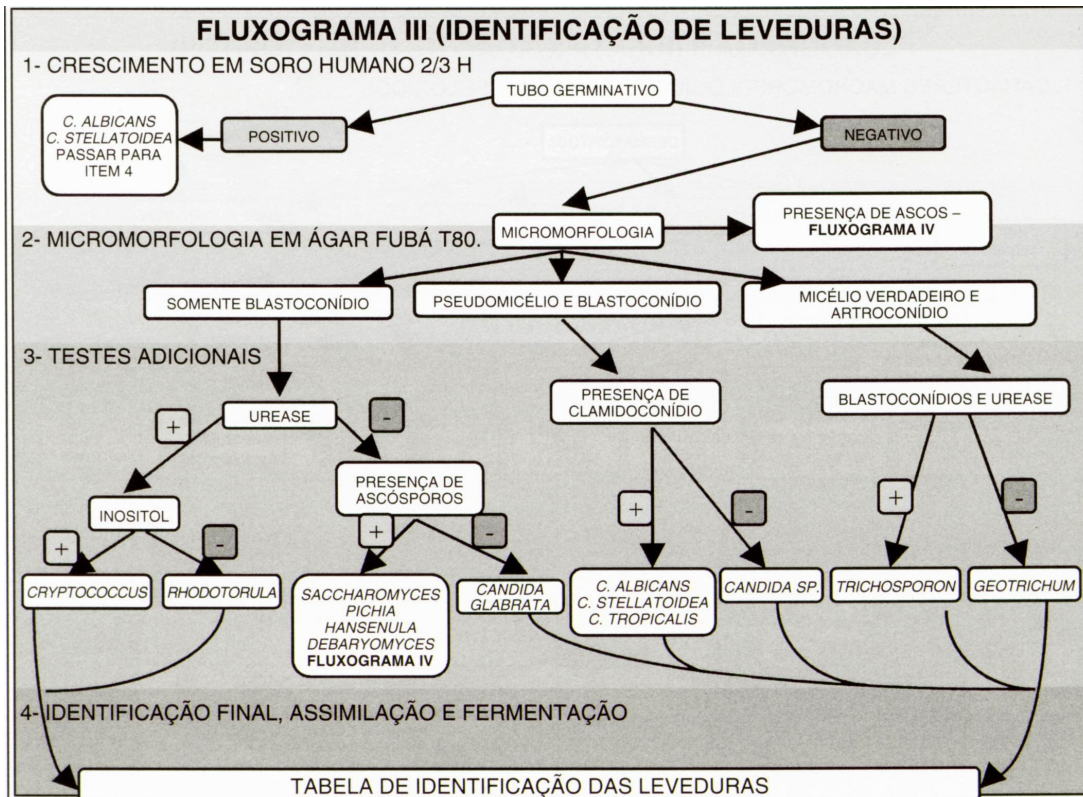
Hidróxido de Potássio 10 ou 20%, adicionado de Tinta Parker Permanente, na proporção de 2:1.

## PARTE III FLUXOGRAMAS









## PARTE IV

### UNIVERSIDADE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS LABORATORIO DE MICOLOGIA CLÍNICA

#### PROTOCOLO PARA IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS

No. de entrada da cepa: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

Iniciais do paciente: \_\_\_\_\_

Material biológico: \_\_\_\_\_

Exame direto: \_\_\_\_\_

Cultura: \_\_\_\_\_

#### 1 – MORFOLOGIA

##### a) Macroscópia:

ASD: Cor: \_\_\_\_\_ Textura: \_\_\_\_\_

##### b) Microscópia:

Agar Fubá: Data: \_\_\_\_\_

Pseudomicélio ( ) Micélio verdadeiro ( ) Clamidósporo ( )

Arranjo dos Blastocomídios ( ) Artroconídios ( )

Tubo germinativo: \_\_\_\_\_

Outras características: \_\_\_\_\_

## 2 – PROVAS BIOQUÍMICAS

a) Auxonograma: Data: \_\_\_\_\_

1 – G Glicose ( )	16 – RIB Ribitol ( )
2 – GA Galactose ( )	17 – GAL Galactiol ou Ducitol ( )
3 – SOR L – Sorbose ( )	18 – MAN D Manitol ( )
4 – SU Sacarose ( )	19 – GLU D – Glucitol ou Sorbitol ( )
5 – MA Maltose ( )	20 – LAC Ácido Láctico ( )
6 – CE Celobiose ( )	21 – CIT Ácido Cítrico ( )
7 – TR Trealose ( )	22 – SUC Ácido Succínico ( )
8 – LA Lactose ( )	23 – I Inositol ( )
9 – ME Melibiose ( )	24 – MZ Melezitose ( )
10 – RA Rafinose ( )	25 – X L – Arabinose ( )
11 – ST Amido solúvel ( )	26 – DAR D – Arabinose ( )
12 – LAR L – Arabinose ( )	27 – RH Raminose ( )
13 – RI D – Ribose ( )	28 – AS Salicina ( )
14 – GL Glicerol ( )	29 – Peptona ( )
15 – ER Eritritol ( )	30 – NO <sub>3</sub> Nitrato ( )

b) Zimograma: Data: \_\_\_\_\_

Controle ( )	Sacarose ( )
Glicose ( )	Maltose ( )
Lactose ( )	Trealose ( )
Rafinose ( )	Celobiose ( )
Galactose ( )	Melibiose ( )

c) **Provas complementares:** Data: \_\_\_\_\_

Presença de cápsula: \_\_\_\_\_

Crescimento a 37° C \_\_\_\_\_

Alta produção de ácido: \_\_\_\_\_

Urease: \_\_\_\_\_

Resistência á cicloheximida: \_\_\_\_\_

Ascósporos ( Forma e Número): \_\_\_\_\_

### 3 - Interpretação das provas do Zimograma e Auxonograma

<b>Resultados</b>	<b>Aspecto tubo de durhan</b>	<b>Formação do halo</b>
+ Forte	Repleto de gás	Rápida e halo forte
+ W Fraco	Gás pela metade do tubo	Halo fraco
+ VW Muito fraco	Somente uma bolha gás	Lento ou latente
+ S Lento	Formação de gás após 3 dias	Negativo
- Negativo	Sem gás	Muitas cepas (+)
V Variável	Algumas cepas (+) e outras (-)	Poucas (-)
+/- -----		

**4 – A identificação deve ser feita de acordo com Kreger Van Rij, 1984.**

**BIBLIOGRAFIA**

- AINSWORTH, C.G.; SPARROW, F.K.; SUSSMAN, A.S. (eds.): **The fungi: an advanced treatise**. New York, Academic Press, 1973.
- BALOWS, A.; HAUSLER JR., W.J.; HERRMANN, K.L.; ISENBERG, H.D.; SHADOMY, H.J. - **Manual of clinical microbiology**. 5ed. Washington, D.C., Am. Soc. Microbiol., 1991.
- BENNETT, J.W. & CIEGLER, A. (eds) - **Secondary metabolism and differentiation in fungi**. New York, Marcel Dekker, 1983.
- BRAUDE, A.I. (ed.) - **Medical microbiology and Infections diseases**. Philadelphia, Saunders, 1981.
- BAUMGARTNER, C. et al. – Direct identification and recognition of yeast species from clinical material by using Albicans ID and CROMagar candida plates. *J.Clin. Microbiol.* 34: 454-456, 1996.
- CHANDLER, F.W.; KAPLAN, W.; AJELLO, L. - **A colour atlas and textbook of the histopathology of mycotic diseases**. London, Wolfe, 1980.
- DEL NEGRO, G.; LACAZ, C. DA S.; FIORILLO, A.M. (eds) - **Paracoccidioidomycose**. Blastomycose sul-americana. São Paulo, EDUSP, 1982.
- FENN, J.P. et al – Comparison of updated vitek yeast biochemical card and API20C yeast identification system. **J. Clin. Microbiol.** 32: 1184-1187, 1994
- FREY, D.; OLDFIELD, R.J.; BRIDGER, R.C. - **A colour atlas of pathogenic fungi**. London, Wolfe, 1979.
- HOWARD, D.H. - **Fungi pathogenic for humans and animals**. New York, Marcel Dekker, 1983.
- KIRSCH, D.R.; KELLY, R.; KURTZ, M.B. - **The genetics of Candida**.

- Boca Raton, CRC, 1990.
- KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; DOWELL Jr., V.R.; SAMMERS, H.M.  
- Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 2 ed.  
Philadelphia, Lippincott, 1983.
- KONEMAM, E.W.; ROBERTS, G.D. - **Micologia. Practica de laboratorio.** 3 ed. Buenos Aires, Panamericana, 1992.
- KWOW-CHUNG, K.J.; BENNETT, J.E. - **Medical mycology.**  
Philadelphia: Lea e Febiger, 1992.
- KURSTAK, E. (ed.) - **Immunology of fungal diseases.** New York,  
Marcel Dekker, 1989.
- LACAZ, C. DA S. (ed.) - **Infecções por agentes oportunistas.** São Paulo,  
EDUSP, 1977.
- LACAZ, C. DA S. (ed.) - **Candidiases.** São Paulo, EPU/EDUSP, 1980.
- LACAZ, C. DA S.; PORTO, A.; MARTINS, E.C.M. (eds.) - **Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico.** São Paulo, Sarvier, 1991.
- LARONE, D.H. - **Medically important fungi. A guide to identification.**  
2 ed. Maryland, Harper, 1987.
- McGINNIS, M.R. - **Laboratory handbook of medical mycology.** New York, Academic Press, 1980.
- McAGINNIS, M.R. et al. Evaluation of the biolog microstation system for yeast identification. **J. Med. Vet. Mycol.** **34**: 349-352, 1996.
- MOORE, G.S.; JACIOW, D.M. - **Micology for the clinical laboratory.**  
Reston, Reston, 1979.
- MOORE-LANDECKER, E. - **Fundamentals of the fungi.** 3 ed.  
Englewood Cliffs, Prentice Hall, 1990.
- ODDS, F.C. - **Candida and candidosis.** 2 ed., London, Baillière -

- Tindall, 1988.
- ODDS, F.C. & BERNARDS, R. CHROMagar Candida a new differential Isolation medium for presuntive identification of clinically important Candida species. *J.Clin. Microbiol.*, 32:: 1923-1929, 1994.
- PAFLER, M. A et al . Application of CHROMagar candida for rapid screening of clinical specimens for Candida albicans, Candida tropicalis, Candida krusei
- RICHARDSON, M.D.; WARNOCK, D.W. - **Fungal infection: diagnosis and management.** Oxford: Blackwell, 1993.
- SIDRIM, J.J.C. & MOREIRA, J.L.B. Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica – Guanabara Koogan, 1999.
- RIPPON, J.W. (ed.) - **Medical mycology. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes.** 3 ed. Philadelphia, Saunders, 1988.
- TURNER, W.B. - **Fungal metabolites.** New York, Academic Press, 1971.
- TURNER, W.B.; ALDRIDGE, P.C. - **Fungal metabolites II** - New York, Academic Press, 1983.
- van-RIJ, K. -**The yeasts. A taxonomic study.** Amsterdam, Elsevier, 1983.
- ZAITZ.; MARQUES, S.A; RUIZ, L.R.B.; SOUZA, V.M. – Compêndio de Micologia Médica. Rio de Janeiro, MEDSI, 1998. 434 p.