

# **Apostila de Microbiologia**

## **CBB 1047**

**aulas práticas**  
**VI Período**

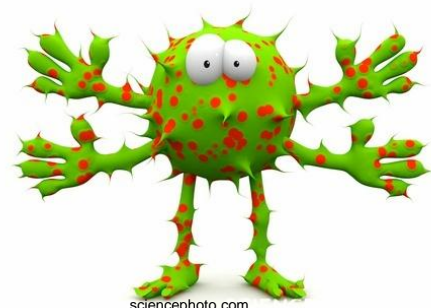


2017-2

Pontifícia Universidade Católica de Goiás / Escola de Ciência Médicas, Farmacêuticas e Biomédicas \*Departamento de Biomedicina

**Profª Drª Renata Carneiro Ferreira Souto**

**Profª Drª Alessandra Marques Cardoso**



# BACTERIOLOGIA

## AULA 1. COLORAÇÃO DE GRAM

### 1. Formas e arranjos das células bacterianas:

COCOS	BACILOS	ESPIRALADAS

### 2. COLORAÇÃO DE GRAM

OBJETIVO: Classificar bactérias com base no tamanho, morfologia celular, agrupamento das células e comportamento diante dos corantes. É um teste adicional e rápido para o diagnóstico de agentes infecciosos, sendo também utilizado para avaliar a qualidade da amostra clínica analisada.

Fatores que influenciam as características bacterianas: Idade da cultura, meio de cultura utilizado, atmosfera da incubação e presença de substâncias inibidoras.

#### PROCEDIMENTOS PARA COLORAÇÃO:

1. Cobrir a área com a solução de cristal-violeta por cerca de um minuto;
2. Decantar o cristal-violeta e lavar suavemente com a solução de iodo ou água de torneira (não lavar excessivamente, pois pode retirar o cristal-violeta das células Gram-positivas);
3. Cobrir a área do esfregaço com a solução de Lugol por um minuto;
4. Descorar a lâmina com a mistura álcool-acetona (1:1), até que o solvente escorra incolor;
5. Alternar com água corrente (jato fraco), por aproximadamente 10 segundos (não lavar excessivamente, pois pode retirar o cristal-violeta das células Gram-positivas; a pouca descoloração pode resultar na pouca retirada do cristal-violeta, ocasionando uma tonalidade azulada nas bactérias Gram-negativas);
6. Cobrir o esfregaço com a solução de safranina ou fucsina básica, por cerca de 30 segundos;
7. Lavar a lâmina em água corrente. Deixar secar ao ar, em temperatura ambiente.

Tipo de bactéria	Cristal-violeta 1 minuto	Lugol 1 minuto	Álcool 10 segundos	Safranina/ Fucsina 30 segundos
Gram (+)	absorve	absorve	não descora	roxo
Gram (-)	absorve	absorve	descora	vermelho

**DIFERENÇAS ESTRUTURAIS ENTRE AS BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS E GRAM NEGATIVA:**

Gram positivas	Gram negativas

ERROS COMUNS DURANTE COLORAÇÃO DE GRAM

1. Precipitação do corante simula cocos Gram-positivos;
2. Uso de lâminas que não tenham sido pré-limpas ou desengorduradas;
3. Espessura do esfregaço pode interferir na coloração (cora irregularmente);
4. Superaquecimento na fixação do esfregaço (destrói morfologia bacteriana);
5. Descorar insuficientemente com álcool-acetona (Retenção do cristal-violeta);
6. Culturas velhas ou com numerosas bactérias mortas ou expostas à ação de antibióticos apresentam irregularidades na coloração (bactérias Gram-positivas perdem a capacidade de reter o cristal-violeta, apresentando-se Gram-negativas e, as bactérias Gram-negativas podem se corar mais fracamente pela safranina/fucsina, podendo simular a ocorrência de infecções mistas: Gram-positivas/Gram-negativas);

7. Discordância de resultados entre o esfregaço corado pelo Gram e a cultura pode estar relacionada com a coleta ou meios de transporte e conservantes inadequados;

8. Resultado positivo de Gram com cultura negativa: contaminação do corante, presença de agentes antimicrobianos na amostra do paciente ou falha no crescimento de microrganismos devido às condições utilizadas (atmosfera, ação seletiva dos meios de cultura, etc).

#### CONTROLE DE QUALIDADE

1. Verificar diariamente a aparência dos reagentes.
2. Solução de cristal-violeta precipitada: refiltre antes de usar.
3. Evaporação pode afetar a eficácia dos reagentes. Recomenda-se que as soluções de trabalho sejam trocadas regularmente, dependendo da demanda.
4. Diariamente ou preparo de novos reagentes: corar lâminas controle. Esfregaços de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) ou *Staphylococcus aureus* (ATCC 25922) são preparados e fixados.

Resultados esperados: bacilos Gram-negativos: coloração rósea; cocos Gram-positivos: coloração violeta.

	Gram Positivos	Gram Negativos
<b>Cocos</b>	<p>Cadeias longas - estreptococos aeróbios e anaeróbios</p> <p>Cachos – estafilococos e peptococos (anaeróbio).</p> <p>Cachos e tétrades – <i>Micrococcus</i>, <i>Stomatococcus</i>, <i>Aerococcus</i> spp</p> <p>Aos pares – <i>Enterococcus</i></p>	<p>Visualizados aos pares</p> <p><i>Neisseria</i>, <i>Moraxella</i>, <i>Branhamella</i>, <i>Acinetobacter</i>, <i>Veillonella</i> (anaeróbio).</p>
<b>Coco-bacilos</b>	<p>Podem formar cadeias curtas</p> <p>Gram variável – <i>Gardnerella</i></p> <p>Em chama de vela – <i>S. pneumoniae</i></p> <p>Retos e curtos – <i>Lactobacillus</i>, <i>Erisipelotrix</i>, <i>Listeria</i>, <i>Rhodococcus</i></p>	<p><i>Haemophilus</i> (pleomórfico, ora coco-bacilo, ora bacilo), <i>Brucella</i>,</p> <p><i>Bordetella</i>, <i>Pasteurella</i> e os anaeróbios <i>Actinobacillus</i>, <i>Bacteroides</i>.</p> <p>Curvos – <i>Campylobacter</i>, <i>Helicobacter</i>, <i>Vibrio</i>, <i>Mobiluncus</i></p> <p>Helicoidais – <i>Arcobacter</i> e <i>Borrelia</i>. <i>Leptospira</i> e <i>Treponema</i> (não visíveis ao Gram)</p> <p>Retos – Enterobactérias, não fermentadores.</p> <p>Extremidades afiladas – <i>Fusobacterium</i> (anaeróbio)</p>
<b>Bacilos</b>	<p>Ramificados – <i>Nocardia</i>, <i>Streptomyces</i>, <i>Actinomyces</i>,</p> <p><i>Propionibacterium</i> (anaeróbio)</p> <p>Difteroides – <i>Corynebacterium</i></p> <p>Esporulados – <i>Bacillus</i>, <i>Clostridium</i></p>	<p>Extremidade bifurcada – <i>Bifidobacterium</i> (anaeróbio)</p>

## **AULA 2. UROCULTURA**

Urinocultura, cultura de urina com contagem de colônias, cultura de jato médio, são denominações para o mesmo procedimento. A coleta da urina deve ser feita pela manhã, preferencialmente a primeira micção do dia, ou após a retenção vesical de duas a três horas.

**PRINCÍPIO DO MÉTODO:** Crescimento bacteriano em meios de cultura seletivos e diferenciais que propiciam o desenvolvimento de patógenos de interesse em infecções urinárias e sua quantificação pela semeadura com alça calibrada. O objetivo é isolar e quantificar bactérias patogênicas do trato urinário, diferenciando infecção de contaminação ou colonização.

### **2.1. PROCEDIMENTOS LARORATORIAIS - Etapas para realização da Urocultura**

#### **2.1.1. BACTERIOSCOPIA DIRETA (Gram de urina não centrifugada):**

A presença de um ou mais micro-organismos por campo de imersão (1.000x) na coloração de Gram de uma gota de urina não centrifugada correlaciona-se com o cultivo de mais de  $10^5$  UFC/mL.

#### **PROCEDIMENTOS:**

1. Homogeneizar a amostra;
2. Com auxílio da alça bacteriológica, colocar uma gota da urina não centrifugada em uma lâmina (limpa, seca e desengordurada);
3. Fixar com calor;
4. Corar a lâmina com Gram e observar ao microscópio.

#### **2.1.2. CULTURA PARA CONTAGEM DE COLÔNIAS (EM ÁGAR CLED) E ISOLAMENTO DE COLÔNIAS (EM AGAR MACCONKEY E MANITOL): Semear a amostra de urina:**

- Ágar CLED: utilizar alça calibrada (1 $\mu$ L, 10 $\mu$ L ou 100 $\mu$ L), realizando a técnica de varredura.
- Ágar MacConkey (MK): utilizar a técnica de esgotamento de alça.
- Ágar Manitol (MN): utilizar a técnica de esgotamento de alça.

1. Identificar as placas inoculadas com o registro e as iniciais do paciente
2. Incubar as placas à 35°C/37°C, por 18 a 24 horas.

#### **☞ Ágar CLED – Cystine Lactose Electrolyte Deficient**

**PRINCÍPIO:** isolamento e quantificação de microrganismos presentes em amostras de urina. A deficiência de eletrólitos inibe o véu de cepas de *Proteus*.

**UTILIDADE:** isolar e quantificar micro-organismos Gram-positivos, Gram-negativos e leveduras.

**INTERPRETAÇÃO:** cor original – azul claro ou verde

Lactose positiva: cor amarela / Lactose negativa: cor azul

**Obs1:** Micro-organismos que fermentam lactose diminuem o pH e mudam a cor do meio de azul claro/verde para amarelo, podendo assim ser verificado se o micro-organismo é lactose negativa ou positiva.

**Obs2:** Espécies de *Shigella* não crescem em meios deficientes em eletrólitos.

LEITURA DA PLACA DE CLED: Verificar crescimento bacteriano e fazer contagem das colônias. O número de colônias encontrado deve ser multiplicado pelo fator (volume da alça) 1.000; 100 ou 10 ( $\mu\text{L}$   $\rightarrow$  mL).

Ex: 168 colônias  $\rightarrow$   $168 \times 1.000 = 168.000$  colônias/mL de urina ou  $1,68 \times 10^5$  colônias/mL de urina

Número de colônias	Significado
zero a 9.000 UFC/mL	Sem significado clínico
10.000 a 90.000 UFC/mL	Suspeita de infecção
$\geq 100.000$ UFC/mL	Indício de infecção

\* Realizar bacterioscopia pós-cultura

\* Colônias com contagem satisfatória no CLED e MK  $\rightarrow$  realizar provas bioquímicas (provas de identificação) e antibiograma (se solicitado).

\* Colônias com contagem de colônia satisfatória no CLED e não crescimento em MK  $\rightarrow$  realizar bacterioscopia pós-cultura. Se Gram-positiva inocular em ágar Manitol. Após crescimento, partir para provas bioquímicas (provas de identificação) e antibiograma.

☞ **Ágar MacConkey:** Meio seletivo para Gram negativo e diferencial para a utilização de lactose. Deve inibir o crescimento de micro-organismos Gram positivo.

Coloração inicial: Rosa

Lactose positiva – colônias rosa pink / Lactose negativa – colônias incolores ou marrom

\*\*\* Como exceção, eventualmente, podem crescer *Enterococcus*, *Candida* e *Bacillus*.

☞ **Ágar Manitol:** Meio seletivo de estafilococos e para a detecção de *Staphylococcus aureus* em amostras clínicas.

Coloração inicial: Vermelho

Lactose positiva – cor amarela / Lactose negativa – cor inicial

**Meios utilizados na rotina**

MEIO	COR INICIAL	CARACTERÍSTICAS PÓS-CULTIVO	PRINCÍPIO DO MEIO UTILIZADO
<b>CLED</b>	Verde/Azul claro	Amarelo: Lactose (+) Sem alteração de cor: Lactose (-)	Não seletivo e diferencial (isolamento, cultivo e CC em urina)
<b>Mac Conkey</b>	Rosa	Colônias rosa (lac +) Colônias transparentes (lac-)	Deteção, isolamento e contagem de coliformes e patógenos (G-)
<b>Manitol</b>	Vermelho rosado	Amarelo (degradação)	Isolamento de S.aureus. degrada manitol e produção de ácido. Alta concentração de NaCl (inibe G-)

**2.1.2. FITA REATIVA:** observar presença ou ausência de nitrito e leucócitos (> 10.000)

**2.1.3. FLUXOGRAMA DE UROCULTURA**

## **AULA 3. PROVAS BIOQUÍMICAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE BACILOS GRAM NEGATIVOS FERMENTADORES**

### **A) BACILOS GRAM NEGATIVOS FERMENTADORES**

- \* Crescem em meios básicos (caldo peptona), meios ricos (ágar sangue, ágar chocolate e CLED), meios seletivos (MacConkey, EMB)
- \* Fermentam glicose, com ou sem a produção de gás
- \* São catalase positivos e oxidase negativa
- \* Reduzem nitrato a nitrito.

#### **A.1 ÁGAR TRÍPLICE AÇÚCA FERRO (TAF)**

PRINCÍPIO: Contém três açúcares: 0,1% glicose, 1,0% lactose e 1,0% sacarose. Além de vermelho de fenol para detecção da fermentação de carboidratos e sulfato de ferro para detecção da produção de sulfato de hidrogênio (indicado pela cor preta na base do tubo).

Fermentação → mudança de cor do indicador de pH de vermelho para amarelo.

Duas camadas de reação: porção inclinada ou bico é aeróbia e porção inferior (profundidade ou fundo) é relativamente anaeróbia.

UTILIDADE: diferenciar bacilos Gram-negativos com base na fermentação de carboidratos, produção de sulfato de hidrogênio e gás.

INOCULAÇÃO: inocular colônia pura de 18 a 24 horas. Semear até o fundo e na superfície do meio (espalhamento). Incubar 24 horas a 35°C, com tampa semi-aberta.

INTERPRETAÇÃO: Cor original do meio: vermelho-laranja, levemente opalescente

Leitura: entre 18 e 24 horas -> Cor púrpura: alcalino / Cor amarelo: ácido

\* Reações ápice/base: por convenção, é feita primeiro a leitura das reações do Ápice, sendo seguida pela do fundo ou base.

#### **DESENHO**



## **A.2 – Meio para verificar Motilidade, Indol e Ornitina (MIO)**

**TESTE PARA MOTILIDADE:** Os flagelos ocorrem em bacilos Gram-negativos e, poucas formas de cocos são móveis. A bactéria pode conter um ou mais flagelos e sua localização varia com a espécie da bactéria e as condições de cultura.

**UTILIDADE:** determinar se o micro-organismo é móvel ou não. Os meios associados a outros testes utilizados para enterobactérias: SIM (Sulfato, Indol, Motilidade); MILI (Motilidade, Indol, Lisina) e MIO (Motilidade, Indol, Ornitina)

**TESTE PARA INDOL:** A presença da enzima tiptofanase atua no triptofano presente no meio de cultura, tendo como produto final a formação de indol. – UTILIZAR REATIVO DE KOVACS PARA LEITURA

**TESTE PARA ORNITINA:** A atividade da enzima ornitina descarboxilase aumenta o pH do meio, devido a transformação da ornitina em uma amina primária: a putrescina, e o meio irá apresentar uma coloração roxa, devido a viragem dos indicadores de pH, Púrpura de Bromocresol e Vermelho de Cresol. Caso contrário, quando a fermentação de glicose abaixa o pH e este fica amarelo.

**INOCULAÇÃO:** inocular uma colônia pura de 18 a 24 horas, na posição vertical, até a base do tubo. Incubar a 35°C por 18 a 24 horas.

**IDENTIFICAÇÃO:** interpretar as reações de motilidade e ornitina antes da adição do reagente de Kovacs para detecção do indol.

### **DESENHO**

## **A.3 – ÁGAR CITRATO DE SIMONS**

**PRINCÍPIO:** verifica a capacidade da bactéria de utilizar o citrato de sódio como única fonte de carbono, juntamente com os sais de amônia, alcalinizando o meio.

**UTILIDADE:** diferenciar as espécies de enterobactérias e não fermentadores

**INOCULAÇÃO:** inocular na superfície do meio (estrias) sem furar a base do meio. Realizar o teste com colônias puras de 18 a 24 horas.

**INTERPRETAÇÃO:** Cor inicial do meio: verde

Positivo: cor azul (verde azulado) – meio alcalino / Negativo: verde – meio neutro

## DESENHO

### A.4 – ÁGAR URÉIA DE CHRISTENSEN

**PRINCÍPIO:** determina a habilidade do micro-organismo de degradar a uréia em duas moléculas de amônia pela ação da enzima uréase, resultando na alcalinização do meio.

**UTILIDADE:** bacilos Gram-negativos fermentadores e não fermentadores, *Staphylococcus* e *Haemophilus*

**INOCULAÇÃO:** inocular colônia pura de 18 a 24 horas. Fazer um inóculo denso, semeando na superfície do meio, não picar a base, pois esta pode servir com controle. Incubar 35°C de 6 a 24 horas, podendo ser necessário até 6 dias.

**INTERPRETAÇÃO:** Cor inicial do meio: amarelo palha.

Positivo: alteração do meio para cor de rosa, pink. / Negativo: sem alteração de cor do meio (amarelo).

Obs: Não deixar o meio em temperatura ambiente, pode ocorrer autohidrólise.

## DESENHO

### A.5 – ÁGAR FENILALANINA

**PRINCÍPIO:** verifica a capacidade da bactéria de produzir ácido fenilpirúvico a partir da fenilalanina por ação enzimática. Uma solução de cloreto férrico a 10% é utilizada para revelar a atividade da enzima fenilalaninadesaminase no ágar.

**UTILIDADE:** diferenciar gêneros e espécies de enterobactérias.

**INOCULAÇÃO:** fazer um inóculo denso e inocular a colônia pura de 18 a 24 horas. Incubar a 35°C por 18 a 24 horas.

**INTERPRETAÇÃO:** Adicionar diretamente o cloreto férrico no tubo inoculado, distribuindo o reagente sobre a superfície do meio.

Cor original do meio: amarelo palha

Positivo: coloração esverdeada na superfície do meio após a adição do reagente / Negativo: meio permanece inalterado (amarelo)

**Obs:** a interpretação deve ser feita em até 5 minutos após a adição do reagente.

#### **DESENHO**

### **A.6 – ÁGAR LISINA**

**PRINCÍPIO:** habilidade enzimática de um micro-organismo em degradar a lisina, formando uma amina e resultando em uma alcalinização do meio de cultura. A lisina pode ser degradada por bactérias que produzam lisina-descarboxilase, que transformam o aminoácido na amina cadaverina. Isto produz uma viragem a violeta do indicador de pH púrpura de bromocresol.

**UTILIDADE:** verificar a capacidade de microrganismos usarem enzimas, auxiliando na identificação. Utilizado principalmente para identificações de enterobactérias, bacilos Gram-negativos não fermentadores e estafilococos.

**INOCULAÇÃO:** inocular uma colônia em estudo no tubo contendo o aminoácido, colocar rapidamente 1,0 mL de óleo mineral estéril em cada tubo e incubar a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  em anaerobiose.

**INTERPRETAÇÃO:** Cor inicial do meio: púrpura

Positivo: púrpura e turvo – indica a formação de aminas a partir da reação de descarboxilação./ Negativo: amarelo

#### **DESENHO**

### **A.7 – CALDO VOGES-PROSKAUER (VP)**

**PRINCÍPIO:** Verifica habilidade de um micro-organismo em produzir acetoína a partir da fermentação da glicose, superando a capacidade de tamponamento do sistema.

**INOCULAÇÃO:** semear o microorganismo em estudo e incubá-lo a 35°C por pelo menos 48 horas (até 5 dias). Após cultivo de 24 horas, adicionar 0,4 mL de NaOH 40% e 0,6 mL de solução de  $\alpha$ -naftol 5% e agitar bem e esperar cerca de 10 minutos. A acetoína em presença de oxigênio desenvolve uma cor vermelha.

**INTERPRETAÇÃO:** Positivo: coloração vermelha / Negativo: coloração amarela

#### **DESENHO**

### **A.8 – CALDO MALONATO**

**PRINCÍPIO:** verifica a capacidade da bactéria de utilizar o malonato como única fonte de carbono, alcalinizando o meio.

**UTILIDADE:** diferenciar as espécies de enterobactérias e não fermentadores

**INOCULAÇÃO:** inocular na parede do tubo, aproximadamente na metade do meio e agitar o tubo cuidadosamente. Realizar o teste com colônias puras de 18 a 24 horas.

**INTERPRETAÇÃO:** Cor inicial do caldo: verde

Positivo: cor azul (verde azulado) – meio alcalino / Negativo: verde – meio neutro

#### **DESENHO**

**B. Leitura:** Fonte de informação mais utilizada: tabela organizada por Farmer (1991) contando com 47 provas, e os respectivos percentuais de positividade

\* Os principais gêneros e espécies de importância clínica podem ser caracterizados com > 95% de acerto com poucas provas.

\* Espécies dos gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Serratia* os testes apresentam baixo poder de discriminação → a identificação feita pelo maior percentual de probabilidade.

\* Padrões não usuais podem ocorrer e o microbiologista deve estar atento para analisar cepas que possam ter importância clínica e epidemiológica ou encaminhá-las a Laboratórios de Referência.

\* Antes, no entanto, deve certificar-se que a análise **NÃO** esta sendo feita com **cultura mista** de bactérias.

### C. Considerações para a identificação de Enterobacterias

\* Valores positivos ou negativos referem-se a 80% ou mais de definição

\* Valores seguidos do sinal positivo (+) ou negativo ( - ) significa o percentual de cepas com resultado do teste positivo ou negativo. Ex: Lisina 75%+ = 75% das cepas são lisina positiva.

#### exemplo

Quadro 2 - Caracterização bioquímica das principais enterobactérias de importância clínica (%)									
Bactérias	Indol	Citr.	H <sub>2</sub> S	Uréia	Fenil.	Lisina	Argin.	Ornit.	Motil.
<i>Citrobacter freundii</i>	33	78	78	44	0	0	67	0	89
<i>Citrobacter diversus (koseri)</i>	99	99	0	75	0	0	80	99	95
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	100	95	5	85	0	0	85	95	95
<i>Edwardsiella tarda</i>	99	1	100	0	0	100	0	100	98
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	95	0	2	0	98	0	98	97
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	100	0	65	0	0	97	96	95
<i>Enterobacter agglomerans</i>	20	50	0	20	20	0	0	0	85
<i>Enterobacter gergoviae</i>	0	99	0	93	0	90	0	100	90
<i>Enterobacter sakazakii</i>	11	99	0	1	50	0	99	91	96
<i>Escherichia coli</i>	98	1	1	1	0	90	17	65	95
<i>Shigella dysenteriae</i>	45	0	0	0	0	0	2	0	0
<i>Shigella flexneri</i>	50	0	0	0	0	0	5	0	0
<i>Shigella boydii</i>	25	0	0	0	0	0	18	2	0
<i>Shigella sonnei</i>	0	0	0	0	0	0	2	98	0
<i>Hafnia alvei</i>	0	10	0	4	0	100	6	98	85
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	98	0	95	0	98	0	0	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	99	95	0	90	1	99	0	0	0
<i>Klebsiella ozaenae</i>	0	30	0	10	0	40	6	3	0
<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Morganella morganii</i>	95	0	20	95	95	v	0	95	v
<i>Proteus mirabilis</i>	2	65	98	98	98	0	0	99	95

#### **AULA 4. TÉCNICAS DE COLETA DE OROFARINGE E CULTURA DOS PRINCIPAIS AGENTES**

Orofaringe: microbiota mista com grande densidade de bactérias Aeróbias, Anaeróbias facultativas e Anaeróbias estritas, incluindo:

*Streptococcus*  $\alpha$ -hemolíticos      *Streptococcus*  $\beta$ -hemolíticos não pertencentes ao grupo A

*Neisserias* não patogênicas      *Haemophilus* spp,

Difteróides      *Staphylococcus* sp      *Micrococcus* spp

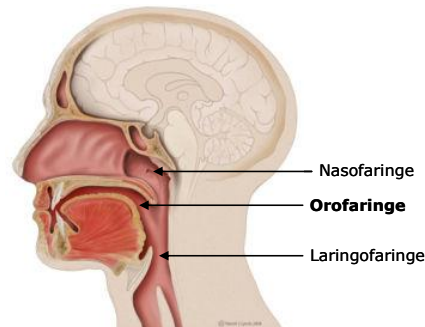
**Anaeróbios** : *Bacterioides* spp, *Fusobacterium* spp, *Veillonella* spp, *Peptostreptococcus* spp, *Actinomyces* spp

Alguns patógenos podem ser componentes transitórios da flora de orofaringe em indivíduos saudáveis, sem desenvolvimento de doença.

*S.pneumoniae*, *S.pyogenes*, *H.influenza*, *N.meningitidis*, Enterobactérias e Leveduras (*C.abicans*)



[www.seom.org](http://www.seom.org)



[pt.wikipedia.org/wiki/Faringe](http://pt.wikipedia.org/wiki/Faringe)

#### **Principais meios de cultura mais utilizados:**

Ágar Chocolate com sangue de cavalo (atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>)

Ágar Sangue (atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>)

Ágar Mac Conkey

#### **5.1. COLETA DE SECREÇÃO DE OROFARINGE**

Culturas de orofaringe: requisitadas para diagnóstico de infecções causadas pelos estreptococos do grupo-A (*S.pyogenes*).

Para coleta: evitar microbiota normal: faringe posterior raspada com um *swab*, “céu” da boca, língua e as laterais da boca devem ser **evitados**.

Culturas de orofaringe: avaliadas também para as seguintes suspeitas de infecção:

- “tosse comprida” - possível coqueluche (*Bordetella pertussis*); Epiglotite (*H.influenzae*) e Gonorréia oral (*N.gonorrhoeae*).

☞ Procedimento para coleta: pela manhã, antes de escovar os dentes

- Solicitar ao paciente que abra bem a boca;
- Usar abaixador de língua e *swab* estéril
- Esfregar *swab* de maneira rotatória sobre as amídalas e faringe posterior; evitando tocar na língua e mucosa bucal;
- Procurar material de áreas com hiperemia, próximas aos pontos de supuração ou remover o pus ou a placa;
- Colher dois *swabs* (o ideal é o uso de *swab* com meio de transporte – Stuart ou Amies).

**Obs 1:** coletar a amostra exatamente na área inflamada, evitando outros sítios da cavidade oral.

**Obs 2:** a contaminação com saliva, que contém uma microbiota bacteriana variada, pode dificultar o isolamento do verdadeiro agente infeccioso.

**Obs 3:** as amostras devem ser cultivadas para recuperação do *S.pyogenes*.

## 5.2. CULTURA DE *Streptococcus pyogenes*

Imediatamente após ser recebido no laboratório: *swab* deve ser esfregado sobre a quarta parte de uma placa de Petri com ágar sangue; A parte restante da placa deve ser semeada com alça estéril;

☞ Procedimentos para Cultura de Orofaringe

- Semear 2 placas de Ágar Sg por amostra.
  - 01 placa: incubar em tensão de CO<sub>2</sub> (microaerofilia) por 18 – 24 hs;
  - Demais placas e tubos semeados: incubar por 18 a 24 hs à 35 – 37°C;

Após incubação:

**Placas:** realizar contagem (raras, algumas, numerosas), analisar as características das colônias no meio de cultura.

- Colônias alfa ou gama hemolíticas → re-incubar por mais 24 horas
- Colônias beta hemolíticas → coloração de Gram e proceder a identificação e antibiograma adequados

**Caldo:**

- Agitar o tubo contendo BHI
- Retirar, com auxílio da alça, o material contido na película superficial do caldo
- Semear por esgotamento de alça
- Incubar a placa a 35 – 37°C por 18 a 24 hs;
  - \* Se não houver crescimento bacteriano na placa e/ou caldo: re-incubar por mais 24 horas;

Decorrido o período de incubação do repique do BHI:

- realizar a contagem (raras, algumas, numerosas)
- analisar características das colônias

- realizar coloração de Gram, identificar e realizar antibiograma adequado.

#### DESENHO DO FLUXOGRAMA

#### RESULTADOS

- \* Se houver apenas de bactérias da microbiota natural, liberar o laudo: “ **Flora autóctone**”
- \* Se após 48 horas não houver crescimento bacteriano, liberar o laudo: “**Não revelou crescimento bacteriano após 48 horas de incubação à 37°C**”.
- \* Se houver desenvolvimento de uma das bactérias patogênicas: Realizar coloração de Gram, realizar identificação e realizar antibiograma.

Liberar o laudo com **contagem** (raras, algumas, numerosas) em **UFC** juntamente com o **gênero**, e se possível a **espécie**, do microrganismo isolado e seu respectivo **antibiograma**;



## **AULA 5. IDENTIFICAÇÃO DE COCOS GRAM-POSITIVOS**

A identificação dos estreptococos e estafilococos é baseada na morfologia que apresentam em meios líquidos. Sendo o estreptococo uma cadeia normalmente longa e os estafilococos mostrando-se em forma de cocos aos pares, em cachos de uva ou agrupados.

São necessárias a realização de várias provas para confirmação → Gram-positiva

### **FERMENTAÇÃO DE LACTOSE**

Início: colônias em ágar Manitol

Ágar Manitol: cor inicial vermelho

fermentadora lactose: meio amarelo / não fermentadora de lactose: permanece com a cor inicial

### **TIPOS DE HEMÓLISE**

Ágar sangue: observar o tipo de hemólise

**Alfa hemolíticos:** halo de hemólise parcial (esverdeada ao redor da colônia)

**Beta hemolíticos:** halo de hemólise total (branca ao redor da colônia)

**Não hemolíticos ou gama hemolíticos:** halo de hemólise ausente

### **PROVA DA CATALASE**

Catalase: enzima que decompõe o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em água e oxigênio, sendo utilizada para auxiliar na identificação de *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Listeria*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Bacillus* e *Moraxella catarrhalis*.

Procedimento:

1. Colocar 01 gota de peróxido de hidrogênio (água oxigenada) a 3% sobre uma lâmina;
2. Com fio bacteriológico, agregar a colônia em estudo na gota de peróxido de hidrogênio.

**Leitura:** Presença imediata de bolhas (efervescência) → catalase positivo. Suspeita de *Micrococcus spp* ou *Staphylococcus spp*

Ausência de bolhas ou efervescência → catalase negativo. Suspeita de *Streptococcus spp* ou *Enterococcus spp*

**OBS:** Para este teste não se recomenda a retirada da colônia do meio de ágar sangue, pois pode haver resultado falso positivo.

**Obs:** Pode ser realizado também em tubo de ensaio

### Divisão dos cocos Gram positivos pela prova da catalase

Catalase positivos	Catalase negativos
<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>Enterococcus</i> spp.
<i>Micrococcus</i> spp.	<i>Streptococcus</i> spp.
<i>Planococcus</i> spp.	<i>Aerococcus</i> spp.
<i>Stomatococcus</i> spp.	<i>Gemella</i> spp., <i>Leuconostoc</i> spp.
	<i>Lactococcus</i> spp., <i>Stomatococcus</i> spp.

Fonte: ANVISA

### PROVA DA COAGULASE

As bactérias do gênero *Staphylococcus* têm como característica a capacidade de coagular o plasma. Os estafilococos coagulase (+) (*Staphylococcus aureus*) são os patógenos mais encontrados em infecções humanas. Já estafilococos coagulase (-) representam um extenso grupo de espécies.

- coagulase: proteína com atividade similar à protrombina (converte fibrinogênio em fibrina → formação de um coágulo visível)

- encontrada em duas formas com diferentes propriedades: coagulase conjugada e coagulase livre.

#### ☞ Coagulase conjugada (prova em lâmina)

Coagulase: unida à parede celular bacteriana. Quando as células bacterianas são suspensas em plasma (fibrinogênio), formam-se cordões de fibrina entre elas causando agrupamento sob a forma de grumos visíveis.

≈ Procedimento

1. Traçar dois círculos com lápis de cera em uma lâmina de vidro;
2. Colocar duas gotas de água destilada ou solução fisiológica estéreis dentro de cada círculo;
3. Com auxílio de um fio bacteriológico, agregar a colônia em estudo, homogeneizar delicadamente em cada círculo;
4. Colocar uma gota de plasma para prova de catalase em um dos círculos;
5. No outro círculo, adicionar outra gota de água destilada ou solução fisiológica estéreis (controle);
6. Homogeneizar com palito de madeira, inclinar a lâmina delicadamente, para frente e para trás e observar a presença de aglutinação.

≈ Interpretação

Positiva: formação de precipitado branco e aglutinação dos microrganismos da suspensão após 15 segundos no círculo que contém o plasma.

Negativa: ausência de aglutinação no círculo que contém o plasma.

Controle sem plasma: deverá ser leitoso e uniforme, sem presença de precipitado ou aglutinação.

#### ☞ **Coagulase livre (prova em tubo)**

Substância similar à trombina, presente em filtrados de cultivos. Secretada extracelularmente, reage com uma substância presente no plasma (Fator de Reação com a Coagulase (CRF)), para formar um complexo que reage com fibrinogênio, formando fibrina (coágulos). Quando uma suspensão em plasma do microrganismo produtor de coagulase é preparada em tubo de ensaio, forma-se um coágulo visível após o período de incubação.

≈ Procedimento

1. Usar fio bacteriológico
2. Suspender colônias em estudo em caldo BHI;
3. Colocar em estufa à 37°C até que turve (se necessário), acertar a turbidez até 0,5 de MacFarland;
4. Em um tubo de ensaio estéril, colocar 0,5 mL de plasma reconstituído e 0,5 mL de caldo BHI com crescimento bacteriano recém-turvado; 5. Incubar em estufa a 35°C por 4 horas;
5. Verificar se há presença de coágulo. Se não houver, incubar o tubo em temperatura ambiente e repetir as leituras com 18 e 24 horas de incubação.

≈ Interpretação

Positiva: presença de qualquer grau de coágulo. / Negativa: ausência de coágulo

≈ Recomendações

- durante a leitura inclinar o tubo delicadamente e não agitar (o coágulo pode desmanchar);
- recomenda-se o uso de plasma de coelho com EDTA;
- não utilizar plasma citratado – microrganismos capazes de metabolizar o citrato (ex: *Enterococcus*) podem dar resultados positivos e serem confundidos com estafilococos;
- o plasma humano não é recomendado – contém quantidades variadas de Fator de Reação com a Coagulase e de anticorpos antiestafilococos (resultado falso-negativo)

#### **TESTE DA BACITRACINA – BA e TESTE DA NOVOBIOCINA – NV (DISCO PARA IDENTIFICAÇÃO)**

Bacitracina: *Streptococcus β-hemolítico do grupo A (S. pyogenes)* → sensíveis a concentrações baixas de bacitracina

Novobiocina: Separa cepas de *Staphylococcus saprophyticus* (novobiocina resistente). Demais cepas de *Staphylococcus coagulase-negativa de importância clínica* (novobiocina sensível)

Procedimento :

1. Preparar uma suspensão do microrganismo em estudo com crescimento recente (até 24 horas) em caldo BHI, TSA ou solução estéril, acertando a turvação na escala 0,5 de MacFarland;
2. Com auxílio de um swab semear a superfície de uma placa de ágar Mueller-Hinton;
3. Com auxílio de uma pinça flambada, colocar um disco de bacitracina (0,04 unidades/disco) na superfície do meio e pressionar delicadamente e/ou um disco de novobiocina (5 µg) na superfície do meio;
4. Incubar à 35°C por 18 a 24 horas.

	<b>Bacitracina</b>	<b>Novobiocina</b>
<b>Sensível</b>	halo ≥ 10 mm	halo ≥ 17 mm
<b>Resistente</b>	halo < 10 mm	halo < 17 mm

Recomendações

- não usar cepas velhas (crescimento superior a 24 horas) para a suspensão;
- cepas isoladas de outros materiais biológicos que não urina, fazer identificação complementar com fermentação de açúcares para confirmar espécie.

**OBS: Este teste poderá ser realizado no Antibiograma**

**FLUXOGRAMA PARA IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS GRAM POSITIVAS**

## Outros métodos para identificação de bactérias GRAM POSITIVA

### TESTE DA BILE ESCULINA E DO NaCl 6,5%

1. Semear as provas de Bile Esculina e do caldo de NaCl a 6,5%;
2. Incubar da mesma forma;

Teste da bile esculina positiva apresenta cor marrom escuro e o do caldo de NaCl a 6,5 % deve mostrar turvação para ser considerado positivo.

\* Todos os estreptococos do grupo D de Lancefield apresentam a bile esculina positiva, seja *Enterococcus* sp ou *Streptococcus* do grupo D não enterococo (*Streptococcus bovis*). Quanto ao teste da tolerância ao NaCl a 6,5%, somente os enterococos são positivos.

**Finalidade:** verifica a capacidade da bactéria de hidrolisar a esculina e glicose, na presença de bile. Utilizado para diferenciar *Enterococcus*, spp e *Streptococcus*, spp.

**Procedimento:** inocular em superfície e incubar 24 horas/35-37°C

Cor inicial: palha

Positivo: coloração preta na base e superfície ou apenas na superfície / Negativo: não altera cor inicial

### TESTE DE CAMP

**Finalidade:** identificar cepas de *S.agalactiae* (grupo B). Estas cepas produzem o fator CAMP (*Christie, Atkins e Munch-Petersen*) que atua sinergicamente com a  $\beta$ -hemolisina produzida pelo *Staphylococcus aureus* em ágar sangue.

**Procedimento:**

1. Inocular uma estria única de uma amostra de *Staphylococcus aureus* produtor de beta lisina (ATCC 25923) no centro de uma placa de ágar sangue preparada obrigatoriamente com sangue de carneiro. (Esta linhagem de *S. aureus* deve ser mantida continuamente em estoque)
2. Inocular as amostras a serem testadas em estrias formando um ângulo reto com a linha de inoculação da amostra teste de estafilococo. As estrias não devem se tocar, ficando a 1 mm de distância, e deste modo várias amostras podem ser testadas em uma mesma placa de ágar sangue. A maneira de inocular é fundamental para a observação do efeito esperado.
3. Incubar a 35-37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 48 h.
  - A positividade da prova, *Streptococcus agalactiae* (grupo B), é evidenciada pelo alargamento da zona de lise, que adquire a forma de ponta de flecha característica, na área de intersecção entre as duas estrias.

### TESTE DA DNASE

Detectar degradação do ácido desoxirribonucléico (DNA) contido no meio de cultura por bactérias que possuem uma enzima extracelular (desoxirribonuclease) → degradação produz energia

Inoculação de colônias em meio contendo DNA, (DNase test agar) obtido comercialmente. Adicionar ao meio original azul de ortotoluidina na concentração de 0,1%; o meio adquire uma coloração azul intensa; Incubar a 35°C por 24 horas;

Acrescentar HCl a 1N para revelar a atividade enzimática → formação de zona clara ao redor da colônia positiva

Diferencia:

*Serratia* do gênero *Enterobacter*; *S.aureus* de estafilococos coagulase negativo; *Moraxella catarrhalis* e espécies de *Neisseria*

#### Procedimento:

- Fazer inóculo denso de forma circular
- Incubar 35±2°C por 18 a 24 h (várias cepas podem ser inoculadas)
- Para leitura: cobrir as colônias com HCl 1N e aguardar 30 segundos
- 

AUSÊNCIA DE HALO TRANSPARENTE	PRESEÇA DE HALO TRANSPARENTE
<p><b>DNase negativo:</b></p> <p><i>Staphylococcus epidermidis</i></p> <p><i>Neisseria gonorrhoeae</i></p>	<p><b>DNase positivo:</b></p> <p><i>Serratia marcescens</i></p> <p><i>Staphylococcus aureus</i></p> <p><i>Campylobacter jejuni</i> (some strains)</p> <p><i>M. Catarrhalis</i></p>

**TESTE DO CRESCIMENTO EM ÁGAR MANITOL:** O *S. aureus* apresenta capacidade de fermentar o manitol em meio contendo 7,5 % de NaCl, denominado ágar manitol salgado ou Meio de Chapman. O indicador de pH é o vermelho de fenol, que indica uma reação positiva quando o meio ao redor das colônias se torna amarelo, e negativa quando permanece avermelhado.

#### TESTE DO SULFAMETOXAZOL-TRIMETOPRIM (SXT)

Adicionar na mesma placa de ágar sangue o disco de SXT e incubar por uma noite a 35°C sem CO<sub>2</sub>. A sensibilidade a esta droga significa, em conjunto com as outras leituras, que o estreptococo não pertence ao grupo A, B ou D de Lancefield.

1. Colocar um disco de Bacitracina à direita e um de Sulfametoxazol-trimetoprim à esquerda.
2. Havendo necessidade, pode ser feito o teste de CAMP na mesma placa, conforme desenho abaixo.

## AULA 7. ANTIBIOGRAMA – TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA (TSA)

**Objetivo:** medir a capacidade de um antibiótico, ou outro agente microbiano, de inibir o crescimento bacteriano *in vitro*

### 4.1. Método de Difusão em Ágar (Kirby-Bauer)

**PRINCÍPIO:** preparar uma suspensão de bactérias de cultivo recente. Inocular esta suspensão na superfície de uma placa de ágar Müller-Hinton e, em seguida, adicionar os discos de papel impregnados com antibiótico. Após a incubação em estufa, analisar o padrão de crescimento ou inibição ao redor de cada disco, utilizando tabela apropriada.

**INSUMOS:** ágar Müller-Hinton; discos de antibióticos; padrão de turbidez (MacFarland: BaCl<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e *swabs*

### PREPARAÇÃO DO ÁGAR MÜLLER-HINTON:

1. Conforme fabricante, autoclavar, resfriar em banho maria (45 a 50°C)
2. Utilizar placas de Petri → 4 mm de profundidade (100 mm diâmetro: 25 a 30 mL / 50 mm diâmetro: 60 a 70 mL)
3. Esfriar a TA e armazenado entre 2 e 8°C

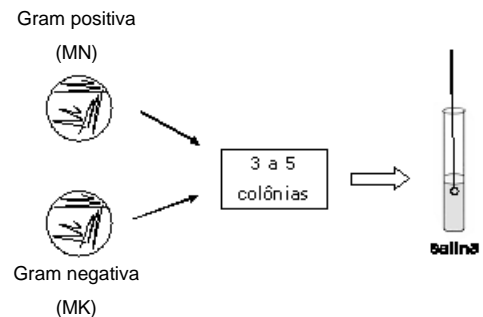
\* Validade: 7 dias (> depende das precauções)

\* Confirmar esterilidade (30 a 35°C/24 hrs ou mais)

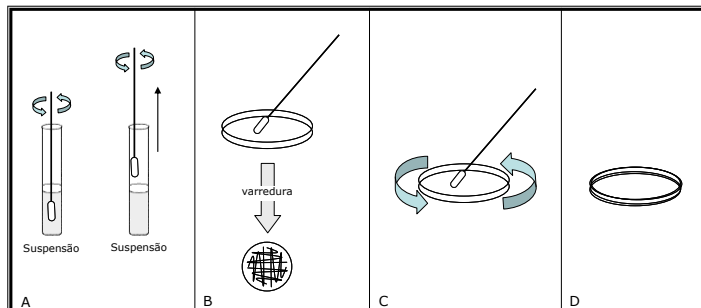
\* pH = 7,2 a 7,4

### PREPARAÇÃO DO INÓCULO:

Suspensão equivalente 0,5 de MacFarland:  $\geq 10^5$  col/mL



### INOCULAÇÃO DAS PLACAS:

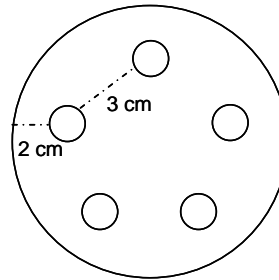


APLICAÇÃO DOS DISCOS:

1. Escolher as drogas (discos antimicrobianos) – TA
2. Utilizar pinça estéril (flambada)
3. Pressionar o disco no ágar (assegura contato com a superfície)
4. Evitar reaplicação – novo disco, novo local (difusão rápida)

100 mm → 5 a 6 discos

150 mm → 12 discos



5. Incubar 35°C por 24 horas (tampa para baixo)

LEITURA: halos medidos em mm na placa invertida (halômetro ou régua) – laudo em mm

Comparar halo de crescimento → sensibilidade ou resistência

FATORES TÉCNICOS QUE INFLUENCIAM NO TAMANHO DO HALO

1- Densidade do inóculo

Muito [ ]: > quantidd de bactéria no inoculo → > halo de resistência – falsa resistência

Pouco [ ]: < quantdd de bactérias no inoculo → < halo de sensibilidade – falsa sensibilidade

2- Temperatura de inoculação

↑: diminui viscosidade, > difusão, > halo

↓: diminui crescimento bacteriano: > halo

3- Tempo de incubação

Antes (tempo <): não há crescimento

Após (tempo >): contaminação e cepas mutantes

4- Tamanho da placa, profundidade do meio e distância entre discos

Tamanho: halos podem se encontrar ou entrar um dentro do outro (impede leitura)

Altura: 4mm → difusão igual / > 4mm: difusão para o fundo / < 4mm: difusão para os lados

Distância: mínima de 2cm

5- pH 7,2 a 7,4: interfere na atividade dos antibióticos - Ácido: ↓ atividade do antibiótico (< halo)



#### 4.1.1. EXPRESSÃO DE RESULTADOS - CATEGORIA DE INTERPRETAÇÃO DO TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA

Seguindo os critérios de interpretação dos diâmetros dos halos e utilizando as tabelas do CLSI vigentes e disponíveis na bancada de trabalho do setor, liberar os resultados como S(sensível), R(resistente) ou I(intermediário)

**Sensível ( S ):** a infecção causada por este isolado pode ser tratada apropriadamente com a dose do agente antimicrobiano recomendado para aquele tipo de infecção e patógeno, a menos que haja contra-indicação.

**Intermediária ( I ):** uma infecção causada por este isolado pode ser tratada apropriadamente em locais do corpo, onde as drogas se concentrem fisiologicamente ou quando for possível a prescrição de uma dosagem mais alta da droga que a habitual.

**Resistente ( R ):** os organismos não são inibidos pelas concentrações do agente antimicrobiano normalmente prescritas em tratamentos habituais (frequência e dosagem) e/ou caem na faixa em que a ocorrência de mecanismos de resistência antimicrobiana específicos são mais prováveis (ex: beta-lactamases) e a eficácia clínica não tem sido confiável em estudos clínicos.

- Observar o tipo de amostra e procedência do paciente (hospitalar ou ambatório) para liberar somente os antimicrobianos próprios.

#### 4.1.2. INTERFERENTES

A execução desta técnica está sujeita a diferentes interferentes, por isso deve ser rigorosamente controlada. Das interferências mais comuns:

- Análise de mais de uma cepa concomitantemente;
- Inoculo muito denso ou muito fraco;
- Altura do ágar fora das especificações recomendadas;
- Quantidade de discos excessivos;
- Disposição dos discos muito próximos;
- Discos e meios fora do padrão de qualidade.

#### Exemplos de antibacterianos e padrão interpretativo dos mesmos.

Antibacterianos		Padrão interpretativo		
		Zona de inibição em mm		
		Resistente	Intermediária	Sensível
Amicacina	30 µg (AMI)	≤ 14	15 – 16	≥ 17
Enterobactérias				
<i>P.aeruginosa</i>				
<i>Acinetobacter</i> sp				
<i>Staphylococcus</i> sp				
Amoxicilina	30 µg (AMO)			

Enterobactérias		≤ 13	14 – 16	≥ 17
<i>Vibrio cholerae</i>		≤ 13	14 – 16	≥ 17
<i>Staphylococcus</i> sp		≤ 28	-	≥ 29
<i>Enterococcus</i> sp		≤ 16	-	≥ 17
<i>Haemophilus</i> sp		≤ 18	19 – 21	≥ 22
<i>Streptococcus</i> sp exceto <i>S.pneumoniae</i>		-	-	≥ 24
Gentamicina				
Enterobactérias	10 µg (GEN)	≤ 12	13 – 14	≥ 15
<i>Acinetobacter</i> sp		≤ 12	13 – 14	≥ 15
<i>Staphylococcus</i> sp		≤ 12	13 – 14	≥ 15
<i>P.aeruginosa</i>		≤ 12	13 – 14	≥ 15

## **AULA 8. MICOBACTÉRIAS – MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO E CULTIVO**

Escarro: espécime clínico de escolha para diagnóstico de tuberculose pulmonar. Deve ser colhido sempre que possível antes do início da antibioticoterapia.

### Boa amostra de escarro:

- Provém da árvore brônquica, obtida após o esforço de tosse
- Colhida, preferencialmente, pela manhã
- Pacientes com dificuldade de expectoração: induzir escarro com inalação com solução salina hipertônica - 5 a 15 min.

Para Concentrar (V/V) = hipoclorito a 5% + escarro (usar tubo de centrifuga de 50mL)

- Agitar em vórtex, deixar em TA por 15 minutos
- Completar o volume de 50mL com água destilada ou deionizada
- Centrifugar a 3.000 rpm por 15 minutos
- Desprezar sobrenadante e ressuspender sedimento com gotas de água destilada e estéril
- Preparar o esfregaço

### Cuidados:

\* Volume das amostras: aproximadamente 2 a 5 mL e acondicionar em frascos plásticos transparentes com tampa de rosca.

OBS: Crianças e pacientes que não conseguem expectorar ou que engolem o escarro: realizar coleta com swab laríngeo (utilizado para pesquisa microscópica de BAAR (bacilo álcool-ácido resistente) e isolamento em cultura.

### Coleta dos espécimes

Escarro: pela manhã (antes de refeição e após higiene oral), lavado bronquioalveolar ou lavado gástrico (< sensibilidade)

Urina: 1ª micção (mínimo 3 e máximo 6 amostras em dias consecutivos .

Líquido cefalorraquidiano, pleural, ascítico e outros: colhidos em tubo estéril (liquor: > 5 mL)

Fragmentos de tecidos e fluidos de punção: biópsia (H<sub>2</sub>O destilada ou salina estéril). Punção – transferir para frasco ou tubo estéril (purulentas ou viscosas → diluir em H<sub>2</sub>O ou salina fisiológica)

### **B) Digestão com agentes mucolíticos seguida por centrifugação**

A técnica aumenta o risco de formação de aerossóis (torna a amostra mais liquefeita). Os procedimentos só podem ser realizados em CSB e a centrífuga deve ter rotores e adaptadores de tubos (caçapas) com tampas de proteção contra a dispersão de aerossóis

MATERIAIS E REAGENTES	PROCEDIMENTO	CUIDADOS
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tubos de centrifuga de poli-propileno, com tampa e fundo cônico.</li> <li>• Recipiente para descarte contendo hipoclorito a 2%.</li> <li>• Lâminas novas, com bordas foscas, sem riscos, e desengorçadas.</li> <li>• Solução de NaOH 4% estéril.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transferir a amostra para o tubo de centrifuga, adicionar igual volume de NaOH a 4%, fechar bem o tubo e agitar em "vortex".</li> <li>• Deixar em temperatura ambiente por 15 min (fluidificação da amostra).</li> <li>• Adicionar água estéril e purificada por sistema de filtração, até completar 10 mL e agitar novamente.</li> <li>• Centrifugar a 3.000 x g por 15 min.</li> <li>• Desprezar o sobrenadante em recipiente à prova de respingos e agitar em "vortex" para suspender o sedimento.</li> <li>• Colocar 2 gotas do sedimento no centro da lâmina, preparar um esfregaço com a ponta da pipeta, com a forma de uma retângulo, com dimensões de 1x2 cm.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Utilizar água ultrapura esterilizada, pois a água destilada ou deionizada pode conter BAAR e levar a um resultado falso-positivo.</li> </ul>

Fonte: OPAS/OMS – Anvisa/MS

### Características das Micobactérias (gênero *Mycobacterium*).

Bacilos curvos ou retos com 0,2 a 0,7 µm de comprimento

Álcool-ácido resistência (grande quantidade de lipídios na parede celular)

Aeróbias, não esporuladas.

### **BACILOSCOPIA**

- Método rápido e fácil
- Permite detectar a presença de BAAR - menos sensível que cultura para micobactérias.
- Importante nos programas de controle da tuberculose, monitorar eficácia do tratamento e/ou confirmar a presença de BAAR pós-cultura.

Amostras não estéreis: descontaminação (escolher um dos métodos disponíveis). Em seguida realizar concentração da amostra por centrifugação.

Amostras estéreis (líquor, líquido pleural, sangue): realizar a concentração da amostra.

**Preparo do esfregaço para baciloscopia do escarro:** O esfregaço pode ser preparado por meio de distensão do escarro diretamente sobre a lâmina (exame direto) ou por digestão com agentes mucolíticos seguida por centrifugação.

### Distensão do escarro diretamente sobre a lâmina

MATERIAIS E REAGENTES	PROCEDIMENTO	CUIDADOS
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Papel toalha ou outro capaz de absorver respingos para forrar a bancada (delimitar a área contaminada).</li> <li>• Lâminas novas, com bordas foscas, sem riscos e desgonduradas. As lâminas devem ser lavadas com água e detergente neutro. Após vários enxágues, colocá-las em álcool e secá-las antes do uso.</li> <li>• Bandeja de inox forrada com papel absorvente (será a área de trabalho para preparar cada esfregaço).</li> <li>• Palitos de madeira.</li> <li>• Recipiente com tampa para descarte dos palitos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Organizar as amostras em ordem crescente e as respectivas lâminas em frente de cada pote.</li> <li>• Colocar a amostra a ser processada na bandeja de inox.</li> <li>• Quebrar no meio o palito e com as pontas farpadas retirar a partícula purulenta do escarro e distender na lâmina até obter um esfregaço homogêneo, ocupando 2/3 da lâmina, sem deixar espaços vazios.</li> <li>• Deixar a lâmina secar em temperatura ambiente, em superfície forrada com papel (área contaminada).</li> <li>• Descartar o material usado de acordo com as normas de biossegurança.</li> <li>• Guardar as amostras em geladeira até a liberação dos resultados (caso seja necessário repetir a baciloscopia ou realizar a cultura).</li> <li>• Fixar os esfregaços, passando três vezes pela chama do bico de Bunsen.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Processar um número máximo de 12 amostras de cada vez.</li> <li>• Trabalhar em CSB, ou com bico de Bunsen, mantendo a chama acesa até o final do trabalho.</li> <li>• Esfregaços muito finos ou muito grossos dificultam a leitura e podem levar a resultados falso-negativos.</li> <li>• Não aquecer a lâmina durante a preparação do esfregaço, para evitar a formação de aerossóis.</li> <li>• Não usar alça metálica.</li> <li>• Mesmo após a fixação podem existir bacilos viáveis no esfregaço.</li> </ul>

Fonte: OPAS/OMS – Anvisa/MS

- Escolher pequena porção purulenta ou com sangue
- Esfregaço: diretamente da amostra (sens.50%) ou após centrifugação (sens.70%)

### MÉTODOS DE COLORAÇÃO

#### Ziehl-Neelsen

CORANTES	PROCEDIMENTO	RESULTADO
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Fucsina 0,3%:</b> Dissolver (por agitação) 3g de fucsina básica em 100 mL de etanol 95%. Dissolver 50 g de fenol cristalizado em 1.000 mL de água destilada (aquecer suavemente até que o fenol dissolva). Misturar os 100 mL da solução de fucsina com 900 mL da solução de fenol aquoso. Deixar repousar 24 h, filtrar e manter em frasco escuro.</li> <li>• <b>Álcool-ácido 3%:</b> Adicionar 30 mL de HCl concentrado em 970 mL de etanol 95%.</li> <li>• <b>Azul de Metileno 0,3%:</b> Dissolver 3 g de azul de metileno em 100 mL de água destilada e completar o volume para 1.000 mL com água destilada. Deixar repousar 24 h, filtrar e manter em frasco escuro.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cobrir todo esfregaço com a Fucsina. Aquecer, sem deixar ferver, 3 vezes em um período de 5 min.</li> <li>• Lavar com água (jato fraco).</li> <li>• Cobrir a lâmina com álcool-ácido.</li> <li>• Deixar por no máximo 2 min</li> <li>• Lavar com água (jato fraco).</li> <li>• Cobrir o esfregaço com azul de metileno (1 min). Lavar com água (jato fraco).</li> <li>• Deixar a lâmina secar ao ar (se for usado papel de filtro para secar a lâmina, desprezar em lixo apropriado e usar um papel para cada lâmina).</li> <li>• Ler em microscópio óptico comum em objetiva de imersão de 100x.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Positivo: bacilos corados em vermelho (BAAR), outras bactérias e células se coram em azul.</li> <li>• Negativo: ausência de BAAR em 100 campos observados.</li> <li>• Leitura da baciloscopia de escarro deve obedecer à escala semi-quantitativa, conforme item 2.3.</li> <li>• Leitura de baciloscopia de outras amostras deve ser informada apenas como positiva ou negativa.</li> </ul>

Fonte: OPAS/OMS – Anvisa/MS

## Auramina

É indicado para ser utilizado como método de triagem, uma vez que a leitura é feita com objetiva de 40X. As lâminas positivas devem ser recoradas pelo método de Ziehl-Neelsen para confirmação do resultado e emissão do resultado em cruces.

\*Um resultado negativo no exame direto do material clínico não exclui a possibilidade de infecção por *M. tuberculosis*. Em casos de forte suspeita de TB realizar a cultura.

### Exame microscópico – Baciloscopia

Escarro: método simples, rápido e econômico;

- Sensibilidade varia de acordo com o nº de bacilos na amostra;
  - Estimar carga bacilar e avaliar tratamento (paucibacilar e multibacilar);]
  - Há 3 limitações:
- Negativa em amostras com < 5.000 bact/mL (extrapulmonar ou estágio inicial da TB pulmonar).
  - Não permite identificação da espécie;
  - Não permite ≠ bacilos viáveis e mortos

### LEITURA DAS LÂMINAS

Escala semi-quantitativa para informe do número de BAAR observados em esfregaços de escarro corados pelo método de Ziehl-Neelsen

Número de Bacilos (Objetiva 100x)	Resultado
• Não foram encontrados BAAR em 100 campos observados	Negativo
• Presença de 1 a 9 BAAR em 100 campos observados (relatar o número)	1 a 9 bacilos
• Presença de menos de 1 BAAR por campo em 100 campos examinados	+
• Presença de 1 a 10 BAAR por campo em 50 campos examinados	++
• Presença de mais de 10 BAAR por campo em 20 campos examinados	+++

Fonte: OPAS/OMS – Anvisa/MS

### CONTROLE E AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DA BACILOSCOPIA

A) Aspectos preventivos: desde a recepção das amostras até a emissão do laudo final

1. Organizar local de trabalho, para facilitar o trabalho, locomoção das pessoas e limpeza diária.
2. Deve ser realizado treinamento periódico dos profissionais – eliminar erros decorrentes da falta de informações.
3. Uso protocolos que descrevem de forma clara e completa cada procedimento usado no laboratório (POP), as ações devem ser padronizadas – executar tarefas da mesma maneira.
4. Observar etapas como identificação, conservação e transporte das amostras.

5. Cuidados com inspeção, identificação, preparo e armazenamento de reagentes e corantes.

6. Controle de estoque periódico e monitoração do prazo de validade dos reagentes e corantes.

B) Aspectos operacionais: incluir amostras controle na rotina (controle de qualidade interno) e supervisão por laboratório de referência (controle de qualidade externo).

Para o controle de qualidade interno, selecionar amostras positivas e negativas para BAAR, preparar os esfregaços e fixar. Conservar as lâminas em caixas apropriadas, em lugar fresco. Identificar as caixas com data de preparo (validade de 3 meses) e símbolo de risco biológico. Incluir uma lâmina positiva e uma negativa na rotina de trabalho uma vez por semana.

## **CULTURA**

Único método para: Analisar perfil de sensibilidade, polimorfismo do DNA das diferentes cepas (subtipos genéticos) e patogenicidade.

- Mais sensível e específica que baciloscopia.
- Detecta de 10 a 100 bacilos/mL de amostra.
- Para o isolamento: \* escolha do meio de cultura; \* escolha dos vários métodos de descontaminação; \* diferentes condições de incubação

### **8.2. MÉTODOS PARA TRATAMENTO DAS AMOSTRAS PARA CULTURA**

As amostras que apresentam flora microbiana associada devem ser tratadas para eliminar os microrganismos contaminantes, que se desenvolvem mais rápido que as micobactérias e impedem seu crescimento. O tratamento é feito com agentes químicos aos quais as micobactérias são conhecidamente mais resistentes e que também reduzem a viscosidade do material.

Espécimes provenientes de cavidades fechadas, tais como os líquidos orgânicos não necessitam ser descontaminados, desde que tenham sido colhidos assepticamente e colocados em recipiente estéril.

#### **8.2.1. N-acetil-L-cisteína/NaOH 2% (NALC-NaOH)**

O NALC é um potente agente mucolítico e favorece a utilização de concentrações baixas do descontaminante sem prejudicar a recuperação de micobactérias. A desvantagem é que a solução deve ser preparada diariamente porque ela perde a atividade após 24 horas.

#### **8.2.2. NaOH 4% (Petroff)**

Esta solução tem atividade descontaminante e para ter atividade mucolítica deve ser usada em concentrações altas (4%). Nessa concentração o NaOH é tóxico para algumas micobactérias, o que torna o tempo de exposição do material a esta substância crucial para se obter um bom resultado.

#### **8.2.3. NaOH 4% (Swab)**

Este método fornece resultados similares aos obtidos no método de Petroff. Sua aplicação é indicada principalmente para amostras de escarro. É uma técnica rápida e simples, e não requer o uso de centrifuga. Também permite que um laboratório local, sem recursos de equipamentos, faça a semeadura no meio de Ogawa-Kudoh e envie ao laboratório de referência para incubação e leitura.

### 8.3. MEIOS SÓLIDOS

#### 8.3.1. Lowenstein-Jensen (LJ)

##### **Incubação:**

1. Em estufa 37°C: O material de pele deve ser incubado a 30 e a 37°C. Manter os tubos na posição horizontal com as tampas um pouco desrosqueadas até que o inóculo esteja seco. Depois colocar na vertical e apertar as tampas.

##### **Leituras:**

1. Examinar as culturas duas vezes nas duas primeiras semanas e uma vez nas semanas seguintes até completar 8 semanas. Anotar o número e a pigmentação das colônias. Observar a presença de contaminantes (fungos e outras bactérias) e presença de mais de um tipo de colônias de micobactérias.

2. Se houver crescimento, fazer um esfregaço em lâmina de uma colônia, utilizando uma gota de água estéril. Deixar secar, fixar e corar como descrito no item baciloscopia.

3. Observar e anotar: presença de BAAR, a formação de corda e a presença de contaminantes.

##### **Resultado:**

Cultura negativa: ausência de crescimento de colônias.

Cultura positiva para BAAR: quando for confirmado BAAR no esfregaço em lâmina.

Cultura contaminada: crescimento de outras bactérias que não micobactérias.

Formação de corda: As espécies do Complexo *M. tuberculosis* apresentam a formação de corda, ou grumos aglomerados lineares. Geralmente os bacilos apresentam-se em paliçada adquirindo um

aspecto de corda. Outras vezes apresentam-se como grumos compactos assemelhando-se a um borrão de corantes. A formação de corda é mais

evidente na cultura em meio líquido.

#### 8.3.2. Ogawa-Kudoh

**Inoculação:** Espalhar o material com o *swab* sobre a superfície do meio.

**Incubação:** 37°C em estufa por até oito semanas.

##### **Leituras:**

1. Examinar as culturas duas vezes nas duas primeiras semanas e uma vez nas semanas seguintes até completar 8 semanas. Anotar o número e a pigmentação das colônias. Observar a presença de contaminantes (fungos e outras bactérias) e presença de mais de um tipo de colônias de micobactérias. Se houver crescimento, fazer um esfregaço em lâmina de uma colônia, utilizando uma gota de água estéril. Deixar secar, fixar e corar como descrito no item baciloscopia. Observar e anotar: presença de BAAR, a formação de corda e a presença de contaminantes.



**Resultado:**

Cultura negativa: ausência de crescimento. Cultura

Positiva para BAAR: quando for confirmado BAAR no esfregaço em lâmina. Cultura contaminada: crescimento de outros microrganismos que não micobactérias. Formação de corda: As espécies do Complexo *M. tuberculosis* apresentam a formação de corda, ou grumos aglomerados lineares. Geralmente os bacilos apresentam-se em paliçada adquirindo um aspecto de corda. Outras vezes apresentam-se como grumos compactos assemelhando-se a um borrão de corantes. A formação de corda é mais evidente na cultura em meio líquido.

Amostra	Inoculação direta	Tratamento da amostra	Meio para isolamento				
			LJ	Ogawa-Kudoh	Outros	25 a 30°C	37°C
Sangue	x		x		Bactec Myco/F		x
Medula óssea	x		x		Lytic, MB/BacT		x
					LJ, $\gamma$ H <sub>9</sub> .		x
Líquidos assépticos	x		x		Lytic, MB/BacT, LJ, $\gamma$ H <sub>9</sub> .		x
Líquor	x		x		MGIT, MB/BacT, LJ, $\gamma$ H <sub>9</sub> .		x
Amostras respiratórias		x	x	x	MGIT, MB/BacT, LJ, Ogawa.		x
Lavado gástrico		x	x		Kudoh, MGIT, MB/BacT, LJ.		x
Secreções e biópsias		x	x		MGIT, MB/BacT, LJ		x
Secreções e biópsias cutâneas		x	x		MGIT, MB/BacT, LJ.	x	x
Urina		x	x		MGIT, MB/BacT, LJ suplementado com hemina, LJ.		x
Linfonodo		x	x		MGIT, MB/BacT, LJ.		x

Fonte: OPAS/OMS – Anvisa/MS

**8.4. MEIOS LÍQUIDOS****8.4.1. Middlebrook 7H9 (adquirido comercialmente)**

**Inoculação:** Semear 0,5 a 1,0 mL do sedimento tratado.

**Incubação:** Incubar em estufa a 37°C. Se forem inoculados fragmentos de pele no meio incubar um tubo a 37°C e outro a 30°C.

**Leituras:**

- Examinar os tubos duas vezes durante as duas primeiras semanas e uma vez nas semanas seguintes ate completar oito semanas. Observar a turvação no meio. Se houver crescimento, fazer um esfregaço em lamina, utilizando uma gota da cultura. Deixar secar em cabine de segurança, fixar e corar como descrito no item baciloscopia.
- Observar e anotar: presença de BAAR, a formação de corda e a presença de contaminantes.

**Resultado:**

- **Cultura negativa:** ausência de crescimento.
- **Cultura positiva para BAAR:** quando for confirmado BAAR no esfregaço em lamina.
- **Cultura contaminada:** crescimento de outros microrganismos que não micobactérias. Formação de corda: As espécies do Complexo *M. tuberculosis* apresentam a formação de corda, ou grumos aglomerados lineares. Geralmente os bacilos apresentam-se em paliçada adquirindo um aspecto de corda. Outras vezes apresentam-se como grumos compactos assemelhando-se a um borrão de corantes. A formação de corda é mais evidente na cultura em meio líquido.

**8.5. Sugestão de meios de cultura, temperatura de incubação e método de processamento de diferentes amostras para isolamento de micobactérias**

Amostra	Inoculação direta	Tratamento da amostra	Meio para isolamento				
			LJ	Ogawa-Kudoh	Outros	25 a 30°C	37°C
Sangue	x		x		Bactec Myco/F		x
Medula óssea	x		x		Lytic, MB/BacT		x
					LJ, $\gamma$ H <sub>9</sub>		x
Líquidos assépticos	x		x		Lytic, MB/BacT, LJ, $\gamma$ H <sub>9</sub>		x
Líquor	x		x		MGIT, MB/BacT, LJ, $\gamma$ H <sub>9</sub>		x
Amostras respiratórias		x	x	x	MGIT, MB/BacT, LJ, Ogawa.		x
Lavado gástrico		x	x		Kudoh, MGIT, MB/BacT, LJ.		x
Secreções e biópsias		x	x		MGIT, MB/BacT, LJ		x
Secreções e biópsias cutâneas		x	x		MGIT, MB/BacT, LJ.	x	x
Urina		x	x		MGIT, MB/BacT, LJ suplementado com hemina, LJ.		x
Linfonodo		x	x		MGIT, MB/BacT, LJ.		x

Fonte: OPAS/OMS – Anvisa/MS

**HANSENÍASE****DIAGNÓSTICO LABORATORIAL**

Auxilia no diagnóstico diferencial com outras doenças dermatoneurológicas;

Auxilia na detecção de casos suspeitos de recidiva

Auxilia na classificação para tratamento

Sítios de Coleta do Raspado Intradérmico

**Pacientes com lesões cutâneas visíveis ou áreas com alteração de sensibilidade;**

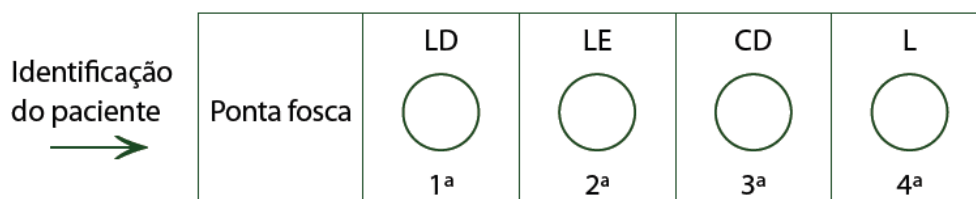


Figura 1 – Disposição dos esfregaços em lâmina de vidro.

Fonte: D. Leiker e A.C. McDougall – Guia Técnico Baciloscopia da Hanseníase – 1987.

Lesões planas: coletar no limite interno

Nódulos, tubérculos e placas eritematosas com microtubérculos: coletar no centro.

**Pacientes sem lesões visíveis**

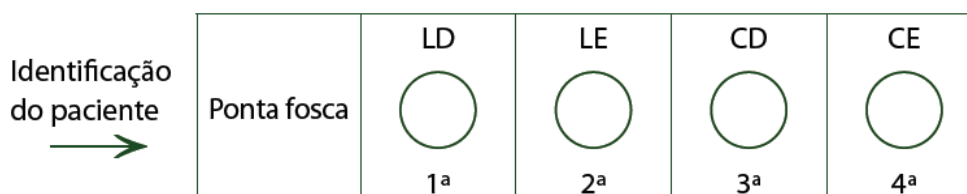


Figura 2 – Disposição dos esfregaços em lâmina de vidro.

Fonte: D. Leiker e A.C. McDougall – Guia Técnico Baciloscopia da Hanseníase – 1987.

**Índice Baciloscópico (IB)** – Leitura da baciloscopia para Hanseníase - Proposto por Ridley em 1962, método de avaliação quantitativo

Resultado	Nº de bacilos e campos observados	Nº campos
0	Ausência de bacilos em 100 campos examinados	100
1+	Presença de 1 a 10 bacilos, em 100 campos examinados	100
2+	Presença de 1 a 10 bacilos, em cada 10 campos examinados	100
3+	Presença de 1 a 10 bacilos, em média, em cada campo examinado	100
4+	Presença de 10 a 100 bacilos, em média, em cada campo examinado	25
5+	Presença de 100 a 1.000 bacilos, em média, em cada campo examinado	25
6+	Presença de mais de 1.000 bacilos, em média, em cada campo examinado	25

Bacilos observados em cada campo microscópico devem ser registrados na folha de contagem do IB.

Bacilos aglomerados e contidos em globias não podem ser contados, porém, o seu número deve ser estimado, de acordo com o esquema abaixo:

Globia Pequena - Apresenta em média 30 bacilos em seu corpo.

Globia Média - Apresenta em média 60 bacilos em seu corpo.

Globia Grande - Apresenta em média 100 bacilos em seu corpo.

IB do paciente: calculado por média aritmética dos IBs de cada sítio analisado:

LOD = 4 +	$IB = \frac{17}{4} = 4,25$
LOE = 3 +	
CE = 4 +	
LESÃO = 6 +	

Nenhum bacilo em 100 campos, liberar:  
Ausência de bacilos em 100 campos  
examinados por sítio (IB=0).

Fonte: D. Leiker e A.C. McDougall – Guia Técnico Baciloscopia da Hanseníase – 1987.

Descrever aspecto morfológico *M. leprae nos* esfregaços. (corados irregularmente)

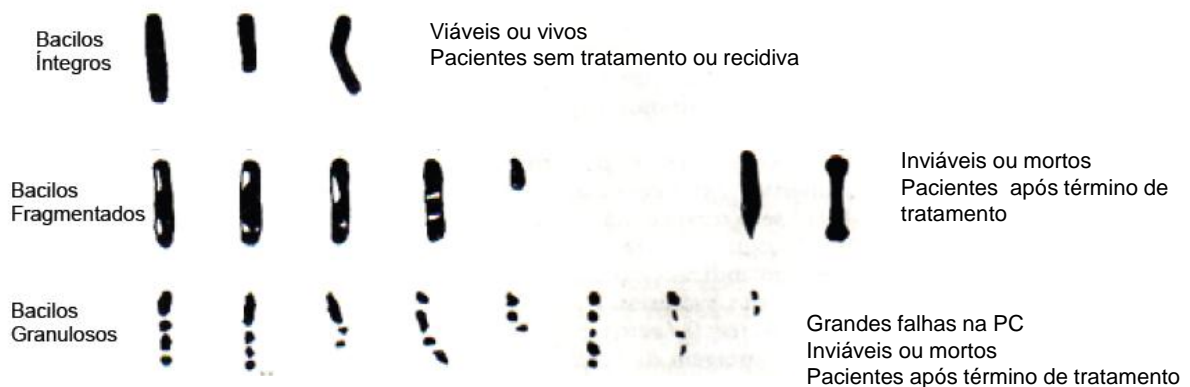
Podem ser observados: isoladamente, formando aglomerados ou globias (formadas por substância incolor)

Leitura do IM requer habilidade e prática - caráter subjetivo (centros de referência)

### Índice Morfológico (IM)

Descrição morfológica: importância nos casos de suspeita de recidiva e resistência medicamentosa.

Morfologia: bacilo íntegro (forma viável), fragmentado ou granuloso



Fonte: D. Leiker e A.C. McDougall – Guia Técnico Baciloscopia da Hanseníase – 1987.

## MICOLOGIA

### AULA 9. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS MICOSES: COLETA, TRANSPORTE E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS CLÍNICAS

#### 9.1. Introdução:

- Micologia médica é a ciência especializada em estudar os fungos e as enfermidades causadas por estes.
- Infecções fúngicas ou Micoses são infecções provocadas por ação direta de fungos microscópicos em hospedeiros suscetíveis.
- O diagnóstico laboratorial das micoses é realizado pela demonstração de estruturas fúngicas em amostras biológicas e sua posterior identificação pelo estudo de suas características diferenciais.
- O diagnóstico depende da qualidade da coleta das amostras. Antes de realizar a coleta, recomenda-se limpar a área com álcool 70%. O material deve ser coletado em recipiente esterilizado.
- As amostras devem ser encaminhadas ao laboratório de micologia, acompanhadas de uma ficha padrão, contendo dados clínicos e epidemiológicos do paciente.
- Essa ficha deve conter: identificação, origem, residência, tempo de evolução da doença, localização e aspectos clínicos da lesão, possível contato com animais, uso de medicação antifúngica nos últimos 30 dias, utilização de piscinas, etc.

#### 9.2. Coleta das amostras:

**ESCAMAS DE PELE:** Realizar a coleta na periferia das lesões cutâneas secas com auxílio de uma lâmina de bisturi sem o fio de corte ou com uma lâmina. As escamas devem ser acondicionadas em placa de Petri esterilizada ou entre lâminas ou dentro de envelopes de papel preto. Coleta com swab é indicada em casos de lesões cutâneas exsudativas. Sendo suspeita de Pityriase versicolor, pressionar o lado adesivo de uma fita durex sobre a lesão e pregá-lo em uma lâmina (procedimento da fita durex).

**PÊLOS E CABELOS:** Com auxílio de uma pinça, coletar os pêlos ou cabelos infectados. Coletar com a raiz e colocar dentro de uma placa de Petri ou entre lâminas.

**UNHAS:** Raspar a superfície que se encontra em contato direto com o dedo, na área de transição entre o tecido saudável e o tecido doente. Coletar com swab em casos de secreção purulenta. Se existir ataque periungueal, coletar material do suco periungueal.

**MUCOSAS, ORIFÍCIOS NATURAIS E SECREÇÕES DIVERSAS:** Avaliar a região afetada, observar as lesões eritematosas, ulcerosas ou esbranquiçadas e coletar com swab.

**ESCARRO:** Pela manhã, antes de escovar e se alimentar, realizar limpeza bucal e obter a amostra por tosse profunda, de preferência três amostras em dias consecutivos.

**URINA:** Jato médio da primeira urina do dia em frasco de boca larga esterilizado.

**PUS:** Punção de abscessos com anti-sepsia prévia.

**LCR:** Punção lombar – procedimento médico.

**SANGUE PERIFÉRICO E MEDULA ÓSSEA:** Sangue – idem hemocultura; Medula óssea – punção da crista ilíaca.

**BIÓPSIA DE TECIDOS OU ÓRGÃOS:** As peças devem ser divididas em fragmentos e colocadas em gaze umedecida em solução fisiológica esterilizada.

**LÍQUIDOS ORGÂNICOS:** Coletar em recipiente esterilizado.

### 9.3. Transporte e Armazenamento:

- Transporte: mais rápido possível para a recuperação do agente causal da micose, pois bactérias e fungos contaminantes presentes na amostra podem interferir na sobrevivência dos fungos patogênicos.
- Pêlos, cabelos, escamas de pele e unhas podem permanecer a temperatura ambiente por várias semanas sem que seja perdida a viabilidade fúngica.
- Escarro, líquidos orgânicos, urina, fezes, exsudatos e secreções devem ser refrigerados por no máximo 24h, embora o processamento dentro de 2h após a coleta seja o mais recomendado.
- LCR e medula óssea: não se recomenda nenhum tipo de estocagem, devendo a amostra ser encaminhada o mais urgentemente para o processamento.

### 9.4. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS MICOSES: EXAME DIRETO E CULTURA

**A. EXAME DIRETO:** Exame direto: é capaz de estabelecer o diagnóstico de grande parte das micoses, pois o aspecto microscópico da vida parasitária da maioria dos fungos é muito característico.

**1. Exame direto a fresco:** amostra entre lâmina e lamínula, se necessário, diluir com solução fisiológica esterilizada. Analisar em objetiva de 40x. Ex: urina, secreção vaginal.

**2. Exame direto com KOH 20%:** adicionar uma gota de KOH ao material exposto em lâmina e promover leve aquecimento. Aguardar no mínimo 15 min. e analisar em objetiva de 40x. O KOH digere a queratina permitindo melhor visualização dos fungos. OBS: ao usar KOH com dimetil sulfoxido (DMSO) é dispensada a etapa de aquecimento. Ex: pele, pêlo e unha.

**3. Exame direto de grão parasitário:** esmagar o grão entre lâmina e lamínula, acrescentar uma gota de KOH e analisar em objetiva de 40x.

**4. Exame direto com tinta da China:** misturar uma gota de tinta da China com sedimento de LCR (centrifugar 15 min. a 1500 rpm). Analisar em objetiva de 40x. Procurar *Cryptococcus* (leveduras capsuladas com ou sem brotamento).

**5. Exame direto com tinta Parker:** a tinta facilita a diferenciação das estruturas fúngicas por corá-las. Não indicada para fungos demácios. Amostra + KOH + tinta Parker.

**6. Coloração por Gram:** observar o esfregaço corado por Gram em objetiva de imersão. As estruturas fúngicas são Gram (+). Ex.: pesquisa de *Candida* sp.

**B. CULTURA:** Capacidade que o fungo tem de crescer em meios nutritivos artificiais. Esse crescimento é evidenciado, macroscopicamente pela formação de uma unidade estrutural, denominada colônia. Através dos aspectos macro-estruturais de uma colônia é possível sugerir a espécie presente na cultura.

\*Meios de cultura para isolamento primário:

- ágar Sabouraud: favorece crescimento fúngico.
- ágar Sabouraud com antibióticos: inibição de bactérias e fungos contaminantes. Cicloheximida pode inibir: *Cryptococcus neoformans*, *Pseudoallescheria boydii*, *Aspergillus*, *Fusarium*, e *Candida*.
- ágar Mycosel (cloranfenicol e cicloheximida): meio comercial – idem anterior.
- ágar BHI: meio enriquecido para isolamento de *Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides brasiliensis*.
- caldo BHI: amostras de válvula cardíaca, cateter, etc.

\*Meios de cultura para caracterização morfológica:

- ágar batata: pobre em nutrientes capaz de induzir a formação de conídios.
- ágar fubá com tween 80: estimula a formação de pseudohifa e blastoconídios de *Candida* sp e clamidoconídio terminal em *Candidaalbicans*.

\*Meios de cultura para testes bioquímicos:

- ágar uréia: detecta a produção de urease (uréia\_ amônia);
- ágar niger: detecta a atividade da fenoloxidase em *C. neoformans*.

**Inoculação da amostra:**

1. A amostra é inoculada com alça de platina em “L” em meios de cultura sólidos inclinados, fazendo leve pressão na superfície do meio (para garantir o contato).
2. Recomenda-se centrifugação prévia (10 min./1500-2000 rpm) de líquidos corporais.

**Incubação:** Os cultivos são incubados à temperatura de 25-30°C e 37°C para fungos dimórficos (conversão para a forma leveduriforme). As culturas devem ser examinadas diariamente durante o período de incubação. Os resultados negativos não deverão ser liberados antes de 30 dias.

## **AULA 10: DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS MICOSES - IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS E FUNGOS FILAMENTOSOS**

**ASPECTOS MACROSCÓPICOS:** Análise de uma colônia é um conjunto de características subjetivas, de expressão fenotípica, encontradas em determinada espécie. Não raro, as características clássicas deixam de se manifestar e apontam em direção a uma outra espécie fúngica, não correlacionada aos achados. Na observação das características culturais, devem ser observados os aspectos:

**a) tamanho da colônia:** em meios distribuídos em tubos, as colônias atingem no máximo a espessura do tubo utilizado.

**b) características das bordas das colônias:** na periferia das colônias, podem ser observados muitos desenhos, que vão desde morfologias bem delimitadas até achados de projeções irregulares, que lembram franjas. *Sporothrix schenckii* \_ as bordas tornam-se escuras com o envelhecimento da cultura.

**c) textura das colônias:**

- algodonosas (aspecto de algodão);
- furfuráceas (lembram substância farinácea espalhada);
- penugentas (lembram penugem de aves);
- arenosas (assemelham-se a areia de praia);
- veludas/velutíneas (aspecto de tecido aveludado);
- granulosas/pulverulentas (esfarelam-se facilmente);
- glabras/céreas (aspecto de cera ou manteiga);

**d) relevo/topografia das colônias:**

- cerebriformes (cheias de altos e baixos, fazendo circunvoluções lembrando cérebro);
- rugosas (variação da cerebriforme, com pregas topográficas menos evidentes);
- apiculadas ou umbilicadas (apresentam uma saliência na parte central);
- crateriformes (aprofundam no meio semelhante a uma cratera);
- planas (sem sulcos ou rugosidades);

**e) pigmentação das colônias:**

- A cor do anverso e reverso são considerados na identificação.
- Existe grande variação de cores de pigmentos, que passam por matizes que vão do verde, passando pelo amarelo, vermelho e castanho, até o preto.
- A pigmentação não é uma característica constante numa espécie fúngica, podendo variar conforme o meio de cultura.



**ASPECTOS MICROSCÓPICOS:** O estudo micromorfológico é feito a partir do isolamento primário, utilizando-se uma pequena alíquota da colônia retirada da cultura e montada entre lâmina e lamínula com uma gota de lactofenol azul de algodão (técnica do esgarçamento). Nessas montagens (microscopia óptica em objetiva de 40x) podem ser observadas:

- Hifas septadas ou cenocíticas;
- Estruturas de reprodução (microconídeos e macroconídeos);
- Estruturas de ornamentação (hifas em espiral, candelabro fávico, etc);
- Coloração das hifas e esporos (hialinos ou demáceos).

\* Fungos leveduriformes: células brotantes redondas ou ovais (blastocónídeos), sendo algumas alongadas, formando pseudohifas.

Outro método utilizado com a finalidade de evidenciar, com o mínimo de deterioração, o arranjo das estruturas de frutificação é denominado:

#### **MICROCULTIVO EM LÂMINA PARA FUNGOS FILAMENTOSOS:**

1. Preparar placas de Petri contendo uma lâmina apoiada sobre um suporte. Essa lâmina deve ficar ajustada à placa de modo que o suporte não deslize com movimentos. Esse aparato, juntamente com outro recipiente contendo lamínulas, deve ser acondicionado e esterilizado de forma adequada.
2. Com o aparato montado e esterilizado, selecionar uma placa de ágar batata (espessura de 4-5 mm) e com auxílio de um bisturi estéril, retirar dessa placa blocos retangulares de meio (1cm<sup>2</sup>).
3. Esses blocos devem ser dispostos de forma asséptica sobre a lâmina que se encontra acondicionada na placa de Petri. Tomar uma colônia em estudo e fazer 4 repiques nas 4 faces do retângulo de ágar batata, que será posteriormente coberto com lamínula estéril.
4. Montada a cultura, colocar 1mL de água destilada estéril dentro da placa, tendo cuidado para não molhar a lâmina que contém o bloco de meio de cultura.
5. O sistema é incubado à TA até o aparecimento visual evidente do crescimento fúngico sob a lamínula.
6. Para observação final, retirar a lamínula com uma pinça estéril colocando-a sobre uma lâmina com uma gota de lactofenol azul de algodão; a outra lâmina é preparada retirando o bloco de ágar, colocando uma gota do corante e lamínula. Vedar as lâminas com esmalte.

\*OBS: tempo de cultivo: dermatófitos = 6-10 dias, esporotricose = 3-5 dias, micoses profundas = 4 semanas.

#### **MICROCULTIVO EM LÂMINA PARA FUNGOS LEVEDURIFORMES:**

1. Preparar material como para microcultivo de fungos filamentosos.
2. Prepara ágar fubá com tween 80 e colocá-lo ainda líquido sobre a lâmina do microcultivo, com pipeta estéril e esperar solidificar.

3. Com alça de platina, recolher colônia leveduriforme e semear em estrias no ágar.
4. Cobrir com lamínula estéril.
5. Deixar 2 a 3 dias à TA e observar a preparação em aumento de 40x.

\*OBS: observar presença ou ausência de hifas, pseudohifas, blastoconídios, artroconídios e produção de clamidoconídios.

#### OUTRAS PROVAS

1. **Perfuração do pêlo in vitro:** utilizada para diferenciar *Trichophyton mentagrophytes*, que perfura pêlo radialmente, do *T. rubrum*, que não é capaz de perfurar. Metodologia: cabelos estéreis em placa de Petri contendo caldo Sabouraud e inóculo de *T. mentagrophytes*.

2. **Pigmentação em ágar batata:** utilizada para diferenciar *T. rubrum* que produz pigmento vermelho. Metodologia: repique em ágar batata.

3. **Prova da Urease:** utilizada para diferenciar *T. rubrum* (negativo) de *T. mentagrophytes* (positivo); *C. neoformans* (positivo). Metodologia: repique em ágar uréia.

4. **Prova do Tubo germinativo:** utilizada para diferenciar *Candida albicans* de outras espécies. O tubo germinativo é uma projeção alongada que emerge da levedura, quando em contato com soro à temperatura de 37°C, durante 2 a 3 horas.

\**C. albicans*: blastoconídio emergindo tubo germinativo sem constrição na região de emergência da levedura; Obs: *C. dubliniensis* – diferenciada por métodos moleculares.

\**C. tropicalis*: blastoconídio emergindo pseudohifa e na base desta, presença de constrição.

5. **Assimilação de carboidratos:** É a habilidade que uma levedura tem de crescer aerobiamente na presença de determinado carboidrato (dextrose, maltose, sacarose, galactose, lactose, trealose, melibiose, L-arabinose, celobiose, xilose, rafinose, dulcitol, ramnose, inulina, manitol, inositol) fornecido como fonte única de energia.

**Metodologia:** emprega ágar destituído de qualquer fonte de carbono, adicionado da suspensão da levedura e distribuído em placa. Após solidificação, são alíquotados os carboidratos sobre o ágar. Pode-se também utilizar discos de papel de filtro impregnados com diferentes carboidratos.

Positividade = halo de crescimento da levedura em presença do carboidrato fornecido.

6. **Fermentação de carboidratos:** É a habilidade que uma levedura tem de crescer anaerobiamente na presença de determinado açúcar (dextrose, maltose, sacarose, galactose, lactose, trealose) fornecido como fonte de energia, observada através da produção de gás carbônico e alteração de pH.

**Metodologia clássica:** inocula-se suspensão da levedura em tubo de ensaio contendo meio de cultura, solução do açúcar desejado a 2% e um tubo de Durham invertido.

Positividade = produção de gás no interior do tubo de Durham e mudança da coloração do meio.

**7. Outros:**

Inoculação em animais, Lâmpada de Wood, Intradermoreação, Sorologia, CHROMagar Candida (meio cromogênico), Sistemas Manuais (API 20C–BioMérieux, ID32C–BioMérieux, Auxacolor-Sanofi-Pasteur) e Automatizados para a identificação das leveduras (Microscan Rapid Yeast Ident–Baxter, AutoMicrobic–BioMérieux-Vitek), Métodos de biologia molecular (PCR, PFGE).

## AULA 11: MICOSES SUPERFICIAIS – DERMATÓFITOS

- Dermatófitos: fungos filamentosos, hialinos, septados, artroconidiados, queratinofílicos, capazes de colonizar pele, pêlo e unha.
- Dermatofitoses/Tineas: infecções causadas por dermatófitos.
- Gêneros: *Microsporum* (pele, pêlo), *Trichophyton* (pele, pêlo e unha) e *Epidermophyton* (pele, unha).

### DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

#### 1. Exame direto com KOH 20%:

**pêlos:** descrever o tipo de parasitismo (ectotrix = conídios na superfície do pêlo; endotrix = conídios e/ou filamentos no interior do pêlo).

**escamas de pele e unha:** descrever as características das hifas quanto à coloração (hialinas), septação e presença de artroconídios.

**2. Cultura:** o material deve ser semeado em 3 tubos (ágar Sabouraud, Sabouraud com antibióticos e Sabouraud com antibióticos e cicloeximida). Incubação: 25°C durante 15 dias.

#### 3. Identificação:

*Microsporum*: \*Predomínio de macroconídios.

##### ***M. canis*:**

Aspecto macroscópico: colônias algodonosas, anverso branco e reverso amarelo.

Aspecto microscópico: macroconídios fusiformes de paredes grossas, com numerosos septos (5-7, às vezes até 15), com extremidade distal curva. Poucos microconídios.

##### ***M. gypseum*:**

\_aspecto macroscópico: colônias pulverulentas ou algodonosas (pleomorfismo), anverso amarelo-acastanhado (canela) e reverso alaranjado ao marrom.

\_aspecto microscópico: macroconídios simétricos (3-7 septos) de paredes finas, com extremidade menos pontiaguda. Microconídios piriformes.

*Trichophyton*: \*Predomínio de microconídios.

##### ***T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*:**

\_aspecto macroscópico: colônias pulverulentas, anverso branco-amarelado e reverso castanho-vinho.

##### ***T. mentagrophytes* var. *interdigitale*:**

\_aspecto macroscópico: colônias algodonosas ou veludas, anverso brancoamarelado e reverso castanho-avermelhado.

\_aspecto microscópico: hifas hialinas septadas, algumas em espiral, microconídios arredondados e agrupados (aspecto de cachos). Raros macroconídios em forma de charuto (1-6 septos).

***T. rubrum:***

\_aspecto macroscópico: colônias algodonosas, anverso branco e reverso rubro.

\_aspecto microscópico: hifas hialinas septadas, numerosos microconídios delicados, regulares e piriformes, raros macroconídios em forma de clavias alongadas, aspecto cilíndrico (2-9 septos).

***T. tonsurans:***

\_aspecto macroscópico: colônias algodonosas ou veludas, umbilicadas ou pregueadas, anverso branco-bege e reverso castanho-avermelhado.

\_aspecto microscópico: hifas hialinas septadas, microconídios de aspecto grosseiro (sem homogeneidade de dimensão e forma: pequenas ou grandes estruturas claviformes ou microconídios dilatados em forma de balão).

Raros macroconídios de aspecto irregular. Clamidoconídios intercalares, hifas em raquete e artroconídios em culturas velhas.

***T. schoenleinii:***

\_aspecto macroscópico: colônias glabras secas a veludas baixas, de crescimento lento (14-30 dias), anverso e reverso bege a castanho escuro. As colônias apresentam uma grande massa de hifas submergindo no meio.

\_aspecto microscópico: ausência de macroconídios e microconídios. As hifas terminam em candelabros fávicos.

***Epidermophyton floccosum***

\*Presença de macroconídios e ausência de microconídios.

\_aspecto macroscópico: colônias algodonosas ou granulosas, anverso verdeamarelado e reverso amarelo-acastanhado.

\_aspecto microscópico: hifas hialinas septadas, macroconídios claviformes, arredondados na extremidade distal e agrupados em um único ponto de inserção na hifa, aspecto de “penca de bananas”. Não apresenta microconídios.

**AULA 12: MICOSES SUPERFICIAIS – NÃO DERMATOFÍTICAS**

**1. Ptiíase versicolor (*Malassezia furfur*):**

- Caracterizada por manchas hipo ou hiperpigmentadas, escamosas e de bordas bem delimitadas. Regiões mais afetadas: pescoço, ombros e tórax.

- Exame direto com KOH 20% ou Método da fita durex: hifas flexuosas, curtas e grossas, esporos (leveduras) arredondados ou ovalados agrupados em cachos.
- Cultura: ágar Sabouraud com azeite de oliva (0,5 a 1%), 35-37°C, 7 dias.

\_Aspecto macroscópico: colônias brancas cremosas e úmidas, brilhantes, elevadas, tornando-se secas e bege-amarronzadas ao longo do tempo.

\_Aspecto microscópico: leveduras com membrana de duplo contorno, formato globoso, oval ou elipsóide (garrafa de boliche), sendo algumas com brotamento único.

## **2. Tinea nigra ou Keratomycosis nigricans palmaris (*Hortaea werneckii*; anteriormente, *Phaeoannellomyces werneckii*; *Cladosporium werneckii*, *Exophiala werneckii*):**

- Caracterizada por manchas negras ou marrom escuro na pele (palmas das mãos\*, braços e regiões plantares), sendo normalmente lesões únicas, de formato irregular, bordas bem delimitadas, pouco descamativas e não pruriginosas.
- Exame direto com KOH 20%: hifas demáceas, septadas, lisas e irregulares; células leveduriformes e clamidoconídios.
- Cultura: ágar Sabouraud com ou sem antibióticos, 25°C, até 30 dias.

\_Aspecto macroscópico: colônias úmidas e brilhantes de aspecto leveduriforme, coloração negro-olivácea. Posteriormente adquirem aspecto filamentososo, veludoso e coloração cinza-escuro.

\_Aspecto microscópico: células leveduriformes, gemulantes, de cor marrom-escuro, apresentando septo central.

## **3. Piedra branca (*Trichosporon beigelli*):**

- Caracterizada por nodulações de consistência mucilaginosa, coloração branco-amarelada, aderidas firmemente aos pêlos e cabelos (regiões axilares, pubiana, perianais, barba e bigode).
- Exame direto com KOH 20%: nódulos claros, moles, formados por aglomerados de hifas ramificadas hialinas, que se fragmentam em artroconídios.
- Cultura: ágar Sabouraud sem cicloeximida, 25°C, 2-5 dias.

\_Aspecto macroscópico: colônias leveduriformes glabras, coloração branca-bege, com sulcos radiais e pregas irregulares (cerebriforme).

\_Aspecto microscópico: pseudohifas, hifas septadas hialinas, artroconídios ovais, redondos ou retangulares e blastoconídios pleomórficos.

## **4. Piedra preta (*Piedraia hortae*):**

- Caracterizada por nodulações duras de cor marrom escuro a preto, aderidas firmemente aos pêlos (couro cabeludo), embora não haja invasão dos mesmos.
- Exame direto com KOH 20%: nódulos firmes, escuros, contendo ascos ovalados com 2-8 ascosporos.

- Cultura: ágar Sabouraud, 25-30°C, 2-3 semanas.

\_Aspecto macroscópico: colônias filamentosas de coloração castanhoescura, verde oliva ou preta, textura glabrosa ou veludosa, o centro tende a se tornar cerebriforme.

\_Aspecto microscópico: hifas septadas com células de parede grossa e clamidósporos intercalares.

### **AULA 13: MICOSES SUBCUTÂNEAS**

**1. Esporotricose:** Doença subaguda ou crônica causada pelo fungo dimórfico *Sporothrix schenckii*, normalmente limitada à pele e tecido subcutâneo, embora em raras situações pode disseminar-se para ossos e órgãos internos. Forma clássica: lesões ulcerativas e gomosas com linfadenite nodular ascendente.

- Material: pus de lesões cutâneas, material de biópsia ou punção.
- Exame direto com KOH 20%: é raro encontrar o fungo (leveduras ovais ou redondas, em forma de charuto). Em tecidos apresenta-se sob a forma de corpos asteróides (corpúsculos de Esplendore) – PAS, HE.
- Cultura: ágar Sabouraud com ou sem antibiótico, 3-5 dias, 25°C (forma miceliana) e 37°C (forma leveduriforme).

\_Aspecto macroscópico:

25°C: colônia filamentosa de crescimento rápido, superfície enrugada e dobrada, logo se tornando acastanhada e enegrecida nas bordas devido à síntese de melanina.

37°C: colônia leveduriforme, úmida e cremosa de coloração pardacentoamarelada.

\_Aspecto microscópico:

25°C: hifas hialinas septadas, ramificadas e muito delicadas; conídios piriformes em cachos terminais, semelhantes a margaridas, na extremidade do conidióforo.

37°C: leveduras com ou sem gemulação única, redondas ou ovais, em forma de charuto

**2. Cromomicose:** Micose crônica, de evolução lenta que acomete a pele e o tecido subcutâneo. Lesões localizadas normalmente nos membros inferiores (pés e pernas), sendo o aspecto clínico polimorfo (nódulos, lesões papulosas, eritemato-descamativas e forma clássica: verrucosa, ulcerada ou não).

- Etiologia: família *Dematiaceae* \_ *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea compacta*, *Phialophora verrucosa*, *Cladosporium carrionii* e *Rhinocladiella aquaspersa*.
- Material: escamas, pus de lesões cutâneas, material de biópsia.
- Exame direto com KOH 20%: Corpos fumagóides (células fúngicas globosas, ovaladas, de parede espessa, coloração castanha, apresentando ou não septação interna).

- Cultura: ágar Sabouraud ou Mycosel, 2-4 semanas, 25-30°C.

\_Aspecto macroscópico: colônia filamentosa, veludosa, de coloração escura (marrom-escuro, verde oliva, cinza ou negro).

\_Aspecto microscópico: três principais tipos de conídios:

**1. Phialophora:** estruturas em forma de jarro (fiálides), formadas ao longo das hifas e que originam conídios – “vaso de flores”. Ex.: *Phialophora verrucosa*.

**2. Rhinocladiella:** estruturas alongadas (conidióforos), geradas ao longo das hifas, formando conídios ovais, que se localizam na extremidade superior (acroteca) e nos lados desses conidióforos – “cachos de bananas”. Ex.: *Rhinocladiella aquaspersa*.

**3. Cladosporium:** estruturas fúngicas (conidióforos) que formam cadeias de conídios (curtas e longas) que se ramificam através de brotamento apical. Ex.: *Fonsecaea pedrosoi*, *Fonsecaea compacta*, *Cladosporium carrionii*.

#### AULA 14: MICOSES PROFUNDAS

**1. Paracoccidioidomicose (*Paracoccidioides brasiliensis*):** Micose sistêmica de caráter crônico. A infecção primária ocorre nos pulmões, podendo ocorrer disseminação para a mucosa bucal, conjuntival, genital, gânglios linfáticos, pele e órgãos internos.

- Material: escarro, exsudato de úlcera, pus de gânglios, biópsia de tecido.
- Exame direto com KOH 20%: leveduras redondas ou ovais, de parede espessa e duplo contorno. Podem formar pequenos agregados de células. Podem mostrar um único ou múltiplos brotamentos (“Mickey Mouse”). Os brotamentos são blastoconídeos que se dispõem em torno da leveduramãe.
- Cultura: ágar Sabouraud, 25°C (15 a 60 dias) e 37°C (10 a 20 dias).

\_Aspecto macroscópico:

25°C: parte inferior amarronzada e parte superior de cor branca, formada de filamentos.

37°C: colônias leveduriformes, cerebriformes, cor creme. São friáveis e facilmente destacáveis.

\_Aspecto microscópico:

25°C: hifas finas e septadas, com clamidoconídios terminais ou intercalados

37°C: leveduras arredondadas semelhantes às encontradas na forma parasitária.



## 2. Histoplasmose (*Histoplasma capsulatum*):

- Micose sistêmica, principalmente pulmonar. Sério problema em imunocomprometidos, sobretudo nos portadores de HIV com AIDS, os quais podem apresentar manifestações graves, rapidamente progressivas e fatais.
- Material: escarro, biópsia de tecido, sangue, punção de medula óssea.
- Exame direto com KOH 20%: leveduras pequenas e unibrotantes de parede fina (difícil visualização). Histopatológico (Giemsa, Wright, HE): leveduras no interior de macrófagos.
- Cultura: ágar Sabouraud ou Mycosel (25°C, 6 a 12 semanas) e ágar BHI ou sangue (37°C).

\_Aspecto macroscópico:

25°C: colônias glabras que com o tempo tornam-se filamentosas, aéreas, algodinosas, de cor branca.

\*Confirmar obtendo a fase leveduriforme (ágar sangue ou BHI - 37°C).

37°C: colônias glabras, lisas, branco-amareladas.

\_Aspecto microscópico:

25°C: delicadas hifas hialinas septadas, microconídeos e macroconídeos globosos tuberculados.

37°C: leveduras ovais, unibrotantes, de morfologia uniforme.

## 3. Coccidioidomicose (*Coccidioidis immitis*):

- Micose sistêmica e crônica. Normalmente causa anorexia progressiva e comprometimento pulmonar, podendo ocorrer disseminação para outros sítios. Simula quadro de tuberculose.
- Material: escarro, biópsia de tecido, líquido, punção de nódulos.
- Exame direto com KOH 20%: esférulas (10 a 80 µm) contendo em seu interior numerosos endósporos (2 a 5 µm), limitados por uma parede dupla.
- Cultura: é evitada devido ao elevado risco de contaminação. Ágar Sabouraud, 25°C, 5 a 10 dias.

\_Aspecto macroscópico:

25°C: colônias brancas e algodinosas que desenvolvem posteriormente cor amarelo-acinzentada. As colônias maduras típicas são membranosas, quase glabras, com discreto micélio aéreo.

\_Aspecto microscópico:

25°C: hifas hialinas septadas, artroconídeos de parede espessa intercalados por células disjuntoras.

OBS: forma parasitária é difícil de ser obtida in vitro. Pode ser feita a reversão in vivo (camundongos).

#### **4. Blastomicose (*Blastomyces dermatitidis*):**

- Quatro formas: 1.forma pulmonar aguda e crônica; 2.forma cutânea de evolução crônica; 3.forma cutânea de inoculação primária; 4.forma disseminada.
- Material: escarro, biópsia de tecido, pus de lesões cutâneas, lavado brônquico, líquor.
- Exame direto com KOH 20%: estruturas esféricas de paredes espessas (duplo contorno) e grande dimensão (8 a 15 µm), isoladas ou com brotamento único de base larga.
- Cultura: Ágar Sabouraud e Mycosel (25°C, 14-21 dias ou 30-50 dias) e ágar BHI ou sangue (37°C, 10-14 dias).

\_Aspecto macroscópico:

25°C: colônias brancas, algodinosas e pregueadas ou colônias creme, glabrasas, geralmente estéreis.

37°C: colônias leveduriformes planas, pastosas e amarelas.

\_Aspecto microscópico:

25°C: hifas hialinas, finas, ramificadas, septadas e conídeos lisos, redondos ou ovalados.

37°C: estruturas semelhantes àquelas de vida parasitária.

### **AULA 15: MICOSES OPORTUNISTAS E FUNGOS CONTAMINANTES**

#### **1. Criptococose (*Cryptococcus neoformans*)**

a)Exame direto (Tinta da China): leveduras capsuladas com ou sem brotamento.

b)Cultura: colônias viscosas e brilhantes de cor branca a creme; Microscopia: leveduras capsuladas com ou sem brotamento.

#### **2. Candidíase (*Candida albicans* e outras espécies)**

a)Exame direto (KOH 20%, Gram): leveduras com ou sem brotamento, pseudohifas.

b)Cultura: colônias cremosas, úmidas, redondas, com bordas bem definidas de cor branca a creme; Microscopia: leveduras com ou sem brotamento; em ágar batata ou fubá: clamidoconídeos.

#### **3. Aspergilose (*Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus*)**

a)Exame direto (KOH 20%): filamentos largos, ramificados e septados, cabeça aspergilar e conídeos.

b)Cultura:

- **A. fumigatus**: colônia granulosa de cor esverdeada; Microscopia: conidióforo liso que termina em vesícula em forma de cúpula com 2/3 da superfície coberta por uma fileira de fiálides das quais saem longas cadeias de conídeos globosos.

- **A. niger**: colônia com aspecto de pimenta do reino; Microscopia: conidióforo largo e liso com vesícula esférica coberta por uma camada de fiálides de onde saem fileiras de conídeos negros.

- **A. flavus**: colônia algodonosa de cor amarela amarronzada ou verde amarelada; Microscopia: hifas hialinas septadas, conidióforo longo, rugoso, com vesícula esférica e volumosa, esporulação em toda a superfície.

#### 4. Hialohifomicoses (*Penicillium* sp, *Fusarium* sp)

##### - *Penicillium* sp:

Cultura: colônias pulverulentas, pregueadas, de cores verde, amarela ou marrom; Microscopia: conidióforo e ramificações divergentes; fiálides dilatadas nas bases e afiladas no ápice com conídeos pequenos e hialinos.

##### - *Fusarium* sp:

Cultura: colônias algodonosas de cor púrpura/roxa; Microscopia: microconídeos e macroconídeos septados, fusiformes, encurvados, com as extremidades afiladas e encurvadas.

#### 5. Zigomicose (*Rhizopus* sp, *Mucor* sp, *Absidia* sp)

##### - *Rhizopus* sp:

Cultura: colônia algodonosa de cor marrom-amarelada; Microscopia: esporangióforo com esporângios esféricos de parede escura que saem diretamente dos rizóides.

##### - *Mucor* sp:

Cultura: colônia de rápido crescimento, inicialmente branca depois amarela ou cinza; Microscopia: ausência de rizóides, com esporangióforos terminando em esporângios esféricos contendo esporangiósporos.

##### - *Absidia* sp:

Cultura: colônia algodonosa de cor cinza; Microscopia: esporangióforos que saem entre os rizóides, nos estólons, com esporângios piriformes.

#### 6. Feohifomicose (*Curvularia* sp, *Alternaria* sp)

##### *Curvularia* sp:

\*Cultura: colônia com micélio aéreo baixo, flocoso de cor marrom; Microscopia: filamentos escuros septados, conidióforo simples e conídeos multicelulares com uma célula central dilatada e mais escura.

#### 14. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. NCCLS. Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão: norma aprovada – Oitava edição (Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA), 2003. (*disponível em: [www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/clsi/clsi\\_OPASM2-A8.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf)*)
2. NCCLS. Normas de desempenho para testes de sensibilidade antimicrobiana – 15º Suplemento Informativo. (Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth International Supplement. CLSI/NCCLS document M100-S15 [ISBN 1-56238-556-9]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA), 2005. (*disponível em: [www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/clsi/clsi\\_OPASM2-A8.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf)*)
3. SILVA, CHPM; NEUFELD, PM. Bacteriologia e Micologia para laboratório clínico. Editora Revinter, 2006.
4. ANVISA. Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços de saúde. Editora Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 1ª ed. 2004. (*disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)*)
5. BURTON, G.R.W.; ENGELKIRK, P.G. Microbiologia para ciências da saúde. 7ª edição. Editora Guanabara Koogan, 2005.
6. VERMELHO, A.B.; PEREIRA, A.F. COELHO, R.R.R.; SOUTO-PADRÓN, T. Práticas de Microbiologia. Editora Guanabara Koogan, 2006.
7. [http://www.google.com.br/imgres?imgurl=http://pages.usherbrooke.ca/biomedias/images/gallerieapi2.png&imgrefurl=http://pages.usherbrooke.ca/biomedias/techniques\\_microbio.htm&h=817&w=1034&sz=469&bnid=Rp5WHLQWltdHM:&tbnh=92&tbnw=116&prev=/search%3Fq%3DApi%2B20E%26tm%3Disch%26tbo%3Du&zoom=1&q=Api+20E&usq=\\_gGpgOhDfNpLvHwP8smPIIbvzRto=&docid=CXQ4GN4tmrInM&sa=X&ei=TL8KUom0GrLk4AONiYHACQ&ved=0CC4Q9QEwAA&dur=142](http://www.google.com.br/imgres?imgurl=http://pages.usherbrooke.ca/biomedias/images/gallerieapi2.png&imgrefurl=http://pages.usherbrooke.ca/biomedias/techniques_microbio.htm&h=817&w=1034&sz=469&bnid=Rp5WHLQWltdHM:&tbnh=92&tbnw=116&prev=/search%3Fq%3DApi%2B20E%26tm%3Disch%26tbo%3Du&zoom=1&q=Api+20E&usq=_gGpgOhDfNpLvHwP8smPIIbvzRto=&docid=CXQ4GN4tmrInM&sa=X&ei=TL8KUom0GrLk4AONiYHACQ&ved=0CC4Q9QEwAA&dur=142)
8. [http://www.medcorp.com.br/medcorp/upload/downloads/microemdestaque1\\_2006714174315.pdf](http://www.medcorp.com.br/medcorp/upload/downloads/microemdestaque1_2006714174315.pdf)
9. ANVISA. Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica. [http://www.anvisa.gov.br/servicosade/microbiologia/mod\\_5\\_2004.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosade/microbiologia/mod_5_2004.pdf) (acesso em 13/08/13)
10. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 6 : Detecção e identificação de bactérias de importância médica /Agência Nacional de Vigilância Sanitária.– Brasília: Anvisa, 2013.
11. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo7: Detecção e Identificação de Micobactérias de Importância Médica/Agência Nacional de Vigilância Sanitária.– Brasília: Anvisa, 2013. 47p..: il.9 volumes