

Segunda-feira, 18 de dezembro de 2006.

Profa Mariceli.

Diagnóstico laboratorial das micoses. Aula prática.

### Métodos diagnósticos

O diagnóstico laboratorial das micoses consiste em:

#### 1. Exame direto

Feito diretamente no material clínico do paciente.

Os materiais coletados são os mais variados possíveis: raspados de pele e de unha, sangue (candidemia), líquido, swab de região de virilha, escarro (infecções pulmonares), etc.

Utiliza-se o KOH 10% (vulgarmente conhecido como potassa): no exame direto trabalham-se com materiais espessos (tecidos queratinizados) e como observar fragmentos de unha ao microscópico, por exemplo? Sem o tratamento com a potassa há uma dificuldade imensa de se observar as hifas no material do hospedeiro. A potassa exerce um papel de "clarificação", ou seja, digere as células do hospedeiro, mas não digere a célula fúngica que possui quitina na parede sendo muito mais resistente. Entretanto, depois de 24 horas, ela também danifica a célula fúngica, e por isso as preparações são observadas no máximo em 24 horas. No período de 2-24 horas, as células do hospedeiro são digeridas, desintegradas enquanto as células fúngicas permanecem íntegras.

Preparações microscópicas: às vezes utiliza-se o gram (mais para mucosas), ou nanquim (só para criptococos – levedura capsulada), Giemsa (só detecta *Histoplasma capsulatum* – fungo dimórfico que no hospedeiro está na forma de levedura. Particularidade: levedura de localização intracelular - macrófagos e monócitos. Nesse caso, mantém-se a célula do hospedeiro íntegra e por isso não se utiliza a potassa e sim o Giemsa. Apesar do nome, o *Histoplasma* não é capsulado).

Observa-se ao microscópio e aí se identifica a partir das estruturas qual o fungo que está infectando.

#### 2. Cultura

Primeiro realiza-se o isolamento do fungo, processo no qual é utilizado o Agar Sabouraud: meio extremamente simples que consta de glicose, peptona e NaCl. A utilização desse meio pobre se deve ao fato de os fungos serem nutricionalmente pouco exigentes. Desse modo, este meio é seletivo, evitando o crescimento de bactérias que podem vir contaminando o material. Ainda assim, existem bactérias que podem vir junto com o material (ex. estafilococos) e para que não ocorra crescimento de bactérias de forma alguma pode-se adicionar um antibiótico (geralmente Cloranfenicol – ATB de amplo espectro – que não afeta o crescimento dos fungos).

Para tornar este meio ainda mais seletivo para fungos patogênicos clássicos (exs. dermatófitos, esporotrix, paracoccidoides) e descartar os fungos contaminantes (aqueles do ar, por exemplo *Aspergillus*, *Actinomyces*), utiliza-se, além do ATB, cicloheximida. Este meio recebe o nome de meio Mycosel®. Entretanto, atualmente muitas vezes é interessante isolar os "fungos contaminantes" e por esse motivo, costuma-se realizar duas culturas, uma do tipo Mycosel e outra não.

Os fungos patogênicos crescem muito mais lentamente.

Às vezes é necessário utilizar Agar Sabouraud + ATB + Óleo, por exemplo para *Malassezia* que é sensível a cicloheximida.

A cultura dura no mínimo 3 e no máximo 30 dias.

Os fungos em sua maioria são de meio ambiente, então são muito mais adaptados à temperatura ambiente. Daí decorre o fato de a temperatura ideal para seu cultivo ser 25 graus Celsius. Entretanto, se estamos suspeitando de um fungo dimórfico, é interessante fazer 2 cultivos simultaneamente: um a 25 graus – para identificar a forma forma filamentosa - e outro a 37 graus – para identificar a forma de levedura.

Ou seja, normalmente a temperatura utilizada é a ambiente, mas no caso de fungos dimórficos realiza-se duas culturas.

### Identificação

➤ **Filamentosos:** por características morfológicas. Deve-se induzir esporulação com agar arroz ou fubá ou batata (muito pobre). Além disso, realiza-se o microcultivo para que não ocorra danificação das estruturas de reprodução (esporos) que vão ser analisadas. A identificação vai se basear na observação: como são os conídios, como são arranjos, etc.

➤ **Leveduras:** praticamente por provas bioquímicas. 2 provas são as mais usadas:

**Assimilação de fonte de carbono:** numa placa utiliza-se um meio que não tem fontes de carbono. Nele existem fontes de nitrogênio e alguns íons, mas não carbono. Espalham-se as células alternadamente na placa e colocam-se aleatoriamente fontes de carbono em pontos diferentes da placa (ex. glicose, sacarose, etc). A leitura do teste é feita verificando se a levedura é capaz de assimilar a fonte de carbono que lhe foi disponibilizada naquela região da placa. Se sim, ela vai crescer no local observando-se um halo opaco.

**Fermentação:** quer-se saber se a levedura fermenta esse açúcar com produção de gás. Assim, a leitura do teste é feita através da produção de gás. Utilizam-se tubos onde a fonte de carbono (ex. glicose, sacarose, maltose, etc) é colocada posteriormente. Dentro desse tubo coloca-se outro tubo chamado de tubo de Durham que é um tubo coletor de gás que permite a observação de bolhas. Um microrganismo pode assimilar determinado açúcar, mas não necessariamente fermentá-lo e produzir gás.

**Obs:** existe fermentação sem produção de gás → com produção de ácido lático, por exemplo.

Pode-se realizar assimilação de nitrogênio: este teste só indica se o m-o assimila ou não nitrogênio inorgânico (nitratos). Tem muita importância para identificação de criptococos, porque algumas espécies assimilam e outras não. Para cândida, este teste não exibe importância. Utiliza-se uma placa com nitrogênio orgânico (peptona – assimilado por todas espécies) e com nitrogênio inorgânico (nem sempre assimilado).