



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto



Arthur Lima Barbosa

TRIAGEM E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS PATOGÊNICOS

São José do Rio Preto
2024

Arthur Lima Barbosa

TRIAGEM E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS PATOGÊNICOS

Relatório apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, junto ao Conselho de Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, campus de São José do Rio Preto.

Orientadora: Profa. Dra. Margarete Teresa Gottardo de Almeida

Supervisora: Profa. Dra. Patricia Simone Leite Vilamaior

São José do Rio Preto

2024

B238t Barbosa, Arthur Lima
 TRIAGEM E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS PATOGÊNICOS /
 Arthur Lima Barbosa. -- São José do Rio Preto, 2024
 27 f. : il., fotos

 Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências
 Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de
 Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto
 Orientadora: Margarete Teresa Gottardo de Almeida

 1. Diagnóstico de Laboratório. 2. Fungos Patogênicos. 3.
 Micologia. 4. Microbiologia. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço minha orientadora, a Profa. Dra. Margarete Teresa Gottardo de Almeida

Agradeço minha supervisora, a Profa. Dra. Patricia Simone Leite Vilamaior

Agradecimentos especiais para o pessoal do laboratório, Mari, Lu, e Emília, por me ajudarem
em todas as etapas do estágio

Agradeço minha família pelo apoio constante

Agradeço ao IBILCE/UNESP por prover a oportunidade do estágio

Agradeço à FAMERP por aceitar o estágio e prover o local e a estrutura

RESUMO

O estágio da modalidade treinamento oferece ao aluno a oportunidade de ter a experiência de trabalhar na área profissional que almeja, como num laboratório. Este estágio foi realizado no Laboratório de Microbiologia da FAMERP, sob orientação da Prof^a Dr^a Margarete Teresa Gottardo de Almeida e supervisão da Prof^a Dr^a Patricia Simone Leite Vilamaior. Durante o estágio, pude ter contato com profissionais experientes na área e com o conhecimento que possuem a respeito do trabalho que fazem. Com auxílio dos protocolos e da ajuda destes profissionais, aprendi sobre as técnicas básicas de biossegurança e operação de equipamentos; a produção de soluções utilizadas comumente no laboratório; a produção de meios de cultura para o crescimento microbiano; e as técnicas para a triagem e a identificação de fungos patogênicos. De maneira geral, o estágio foi extremamente proveitoso, gerando um enorme crescimento profissional e pessoal.

Palavras-chave: Diagnóstico de Laboratório, Fungos Patogênicos, Micologia, Microbiologia

ABSTRACT

The training internship offers students the opportunity to experience working in their desired professional field, such as in a laboratory. This internship was carried out at FAMERP's Laboratory of Microbiology, under the supervision of Prof. Dr. Margarete Teresa Gottardo de Almeida and Prof. Dr. Patricia Simone Leite Vilamaior. During the internship, I was able to have contact with experienced professionals in the field and the knowledge they have about the work they do. With the help of their protocols and their assistance, I learned about basic biosafety techniques and equipment operation; the production of solutions commonly used in the lab; the production of culture media for microbial growth; and techniques for screening and identifying pathogenic fungi. Overall, the internship was extremely fruitful, generating enormous professional and personal growth.

Key-words: Laboratory Diagnosis, Pathogenic Fungi, Mycology, Microbiology

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Autoclave	12
Figura 2. Esquema da placa grande n. 1	19
Figura 3. Esquema da placa grande n. 2	19
Figura 4. Esquema da placa média	20
Figura 5. Fragmento de fungo hialino	23
Figura 6. Acúmulo de leveduras	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abreviaturas

°C	Graus Célsius
g	Grama
H	Hidrogênio
K	Potássio
L	Litro
mg	Miligrama (10^{-3} g)
ml	Mililitro (10^{-3} L)
µl	Microlitro (10^{-6} L)
mm	Milímetro (10^{-3} m)
N	Nitrogênio
O	Oxigênio

Siglas

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BrCAST	Comitê Brasileiro de Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana
DMSO	Dimetil sulfóxido
EPI	Equipamento de Proteção Individual
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
IBILCE	Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	9
2.	OBJETIVOS	10
2.1.	OBJETIVO GERAL	10
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
3.	METODOLOGIA	11
3.1.	BIOSSEGURANÇA	11
3.1.1.	Boas práticas de laboratório	11
3.1.2.	Procedimentos em caso de acidentes	11
3.2.	AUTOCLAVAGEM	12
3.3.	PREPARO DE SOLUÇÕES	13
3.3.1.	Corante azul de algodão	13
3.3.2.	Solução Hidróxido de Potássio e Dimetil sulfóxido	13
3.3.3.	Solução salina	13
3.4.	CEPAS MICROBIANAS EM LABORATÓRIO	14
3.5.	PREPARO DE MEIOS DE CULTURA	14
3.5.1.	Ágar Base de Carbono	15
3.5.2.	Ágar Base de Nitrogênio	15
3.5.3.	Ágar batata/cenoura	16
3.5.4.	Ágar Casetone	16
3.5.5.	Ágar Kining	17
3.5.6.	Ágar Mueller-Hinton	17
3.5.7.	Ágar Mycosel	18
3.5.8.	Ágar Sabouraud	18
3.6.	DIAGNÓSTICO FÚNGICO	19
3.6.1.	Auxanograma	19
3.6.2.	Antifungigrama	20
3.6.3.	Sorologia	21
3.6.4.	Microcultivo	22
3.7.	MATERIAL DE AMBULATÓRIO	22
3.8.	ANÁLISE DE FUNGOS EM MICROSCÓPIO	23
4.	CONCLUSÃO	25
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

1. INTRODUÇÃO

Um dos propósitos do estágio de treinamento é preparar o aluno para a rotina, os procedimentos metodológicos e as boas práticas de um laboratório real fora da universidade na qual o aluno estuda. O relatório do estágio de treinamento, portanto, é a culminância e o resumo de tudo o que foi aprendido no período do estágio. Este relatório se refere ao estágio modelo treinamento realizado no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), sob orientação da Prof^a Dr^a Margarete Teresa Gottardo de Almeida e supervisão da Prof^a Dr^a Patricia Simone Leite Vilamaior. O estágio foi realizado como parte dos requisitos para a conclusão do curso de bacharelado em Ciências Biológicas na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP).

O Laboratório de Microbiologia da FAMERP é subordinado tanto à FAMERP em si quanto ao Hospital de Base, prestando serviços à ambos. Sua especialidade é na área de micologia – triagem, identificação e estudos de fungos – e os serviços prestados incluem exames laboratoriais para o hospital. Todos os testes e exames seguem um protocolo específico, estabelecido pelo Comitê Brasileiro de Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana (BrCAST), para que os resultados obtidos sejam entendidos, contestados e/ou repetidos por qualquer outro laboratório brasileiro.

A importância da realização desses testes de análise e triagem de fungos é óbvia: são atividades vitais para a saúde pública. O tratamento de uma enfermidade de origem fúngica só é possível mediante conhecimento de qual a espécie, qual sua prévia resistência a drogas, e qual o nível da infecção do fungo que afeta o paciente. Esses procedimentos laboratoriais permitirão dizer ao profissional – um médico, por exemplo – qual o tratamento mais eficaz para o paciente, sendo que esse tratamento não pode ser completamente generalizado por variar de caso a caso. Por meio do estágio, os conhecimentos sobre esses procedimentos laboratoriais foram ensinados e absorvidos. Fungos dos gêneros *Candida*, *Trichophyton*, *Sporothrix* e *Cryptococcus*, além de outros, puderam ser estudados tanto no seu comportamento como na sua morfologia.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do estágio de treinamento foi o aprendizado da rotina, dos procedimentos metodológicos e das boas práticas do Laboratório de Microbiologia da FAMERP para a identificação e triagem de fungos patogênicos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos para este estágio de treinamento foram adquirir:

- a. Aprendizado das noções básicas de biossegurança;
- b. Aprendizado e treinamento no manuseio da autoclave e no procedimento de limpeza de material;
- c. Prática no preparo de soluções comumente utilizadas no laboratório;
- d. Prática no preparo de meios de cultura de microrganismos;
- e. Prática no preparo e análise de auxanogramas;
- f. Prática no preparo e análise de antifungogramas;
- g. Coleta e análise de material de ambulatório; e
- h. Análise e identificação de fungos em microscópio.

3. METODOLOGIA

3.1. BIOSSEGURANÇA

Biossegurança é um conjunto de ações tomadas para minimizar ou prevenir riscos ao se praticar atividades científicas, visando tanto a saúde do pesquisador e do ambiente quanto a segurança dos resultados obtidos em experimentos (Teixeira, Valle, 1996). Assim, é possível ressaltar dois importantes tópicos da biossegurança: as boas práticas de laboratório e qual conduta tomar caso um acidente ocorra.

3.1.1. Boas práticas de laboratório

O básico das boas práticas de laboratório começa na assepsia e organização do local de trabalho. A assepsia deve ser feita usando álcool e luz ultravioleta, tanto antes quanto depois do procedimento experimental. A organização do local de trabalho deve garantir que as mãos e saídas/entradas de ar estejam desobstruídas. A vestimenta adequada e o uso de equipamentos de proteção individual (EPIs) contribuem para a diminuição dos acidentes, seja por evita-los ou por minimizar os riscos caso ocorram. A vestimenta deve consistir de calças, sapatos fechados e jaleco. Os EPIs podem ser luvas, máscara, avental e óculos de proteção. A prática com o procedimento experimental a ser realizado também é importante para evitar acidentes. Deve-se conhecer o procedimento e os riscos envolvidos no experimento, e esse procedimento deve ser feito com calma e cautela. Pressa e estresse, além da falta de organização e vestimenta adequada, agravam a probabilidade de acidentes (Souza Reis, Galindo, 2022).

3.1.2. Procedimentos em caso de acidentes

Em casos de acidentes que envolvam diretamente pessoas, é recomendado manter a calma e comunicar os responsáveis pelo laboratório. Caso necessário, usar o chuveiro de emergência e os lava-olhos, especialmente no caso de queimaduras com fogo ou químicas (pode ser usado também caso agentes contaminantes entrem em contato com áreas da pele críticas, como mucosas). Caso o acidente seja mais grave, o serviço de emergência deve ser acionado. Qualquer tipo de ferimento deve ser lavado e tratado imediatamente, com o objetivo de evitar complicações (Souza Reis, Galindo, 2022).

Em caso de acidentes que envolvam equipamentos de laboratório e que não causem problemas diretos às pessoas, é primeiro necessário a assepsia do local e equipamento contaminado, preferencialmente com álcool. Caso o equipamento seja cortante, como vidro ou lâminas, também é necessário colocá-lo em um recipiente de descarte específico. Caso o

equipamento use líquidos, tais líquidos devem ser retirados do local e, após a limpeza, o local deve também passar por um procedimento de assepsia. De qualquer maneira, os responsáveis pelo laboratório também devem estar à par dos acontecidos.

3.2. AUTOCLAVAGEM

A autoclave (Figura 1) é um equipamento que utiliza temperatura e pressão para esterilização de material. A temperatura-alvo é de 121 °C, com uma pressão de cerca de 2 atmosferas. Após a temperatura e pressão ideais serem atingidas, a esterilização ocorre num período de 20 minutos, porém a esterilização de meios de cultura requer que o tempo seja de apenas 15 minutos.

A autoclave é utilizada em dois momentos: antes e depois do uso do material. A esterilização anterior ao uso garante que não haverá contaminação do material a ser utilizado em experimentos e dos meios de cultura a serem distribuídos. A esterilização posterior ao uso, em contrapartida, garante que o ambiente (tanto dentro e fora do laboratório) não sejam contaminados com os microrganismos estudados nos experimentos realizados. Em conjunto com as técnicas de biossegurança, os microrganismos de estudo no laboratório ficam isolados do ambiente externo e de contaminação.

Figura 1. Autoclave



Fonte: Autor

3.3. PREPARO DE SOLUÇÕES

3.3.1. Corante azul de algodão

Azul de algodão é uma solução utilizada para corar e contrastar microrganismos em exames de identificação de células em microscópio. Para a preparação do corante, os ácidos e a glicerina são adicionados à água destilada – é importante aquecer o ácido fênico até que se torne líquido antes de adicioná-lo. O azul de anilina é adicionado e a solução é deixada em repouso por até dois dias. Após esse período, a solução é filtrada e colocada num frasco cor âmbar, sendo armazenado em local sem incidência de luz direta.

Material necessário

Ácido fênico cristalizado	20 mg
Ácido láctico	20 ml
Glicerina	40 ml
Azul de anilina	50 mg
Água destilada	20 ml

3.3.3. Solução de Hidróxido de Potássio e Dimetil sulfóxido

A solução de K^+OH^- , como é chamada, é utilizada para a melhor observação de fungos coletados de pacientes, visto que é uma solução que elimina impurezas da lâmina de vidro e destrói células da pele enquanto preserva células fúngicas.

Material necessário

Hidróxido de Potássio	10 g
Dimetil Sulfóxido (DMSO)	43 ml
Água destilada	100 ml

3.3.3. Solução salina

Solução salina fisiológica, ou simplesmente solução salina, é uma solução de água com 0,85% de cloreto de sódio. O propósito do uso dessa solução é prover um meio líquido isotônico para diluições e preparações de inóculos de microrganismos. Após o preparo, a solução resultante é armazenada em ambiente refrigerado não-estéril, logo, antes do uso, o volume a ser utilizado deve ser esterilizado em autoclave (ver tópico 3.2).

Material necessário

Cloreto de sódio	8,5 g
Água destilada	1 L

3.4. CEPAS MICROBIANAS EM LABORATÓRIO

As cepas dos microrganismos presentes em laboratório são provenientes de duas origens: *American Type Culture Collection* (ATCC) e da coleção própria do laboratório (também chamadas de cepas clínicas), sendo estas últimas as presentes em maior número. As cepas ATCC são utilizadas apenas para pesquisas e para comparação com as cepas clínicas.

Em todo caso, tanto as cepas ATCC quanto as clínicas devem ser armazenadas para uso futuro. O armazenamento de cepas deve ser feito em criotubos, tubos de plástico específicos para armazenamento e congelamento. Miçangas ou sílica são adicionadas ao tubo, para prover uma superfície de aderência ao microrganismo, e meio de cultura líquido adequado também é adicionado. O meio de cultura pode ser caldo Sabouraud (ver tópico 3.5.3.), óleo mineral ou leite, dependendo da necessidade do microrganismo ou da intenção do armazenamento. O armazenamento *in situ* pode ser feito em temperatura ambiente, em freezer -20 °C, ou em freezer -80 °C. Cada método tem suas particularidades, como sua efetividade no armazenamento de diversas espécies. O método de congelamento em freezer -20 °C usando caldo Sabouraud é mais efetivo no armazenamento de espécies do gênero *Candida* (Alexandre *et al.*, 2022).

3.5. PREPARO DE MEIOS DE CULTURA

A seleção do meio de cultura a ser utilizado em determinado processo ou projeto depende do objetivo a ser alcançado. Por exemplo, o meio de cultura ágar Sabouraud é ideal para cultura geral de fungos, enquanto o ágar batata é melhor para induzir a formação de estruturas de reprodução em fungos filamentosos. Para a produção de meios de cultura, se dissolve pó do meio de cultura selecionado em água destilada. A solução resultante é pré-aquecida até próximo do seu ponto de ebulição, para que a mistura se torne uniforme e possa ser distribuída. Além desse pré-aquecimento, a solução passa pela autoclave a 121 °C por 15 minutos para esterilização do meio de cultura. O meio de cultura líquido, após a autoclave, é distribuído em placas de Petri dentro da câmara de fluxo laminar com a identificação escrita em cada uma. Por fim, cada placa é submetida à luz ultravioleta para esterilização das placas *in situ*.

3.5.1. Ágar Base de Carbono

O ágar base de carbono é utilizado para certos testes específicos, como o auxanograma (ver tópico 3.6.1). É um meio com carbono controlado, logo a assimilação de carbono por fungos só acontecerá mediante a adição de açúcares durante o teste. A combinação específica entre os açúcares permite a identificação do fungo. Os componentes do ágar devem ser adicionados separadamente, um a um, para que o pH possa ser controlado. Após a mistura dos ingredientes, o processo segue o padrão de aquecimento, esterilização e distribuição em placas (ver tópico 3.5).

Material necessário

Sulfato de Magnésio heptahidratado	500 mg
Fosfato de Potássio monobásico	1 g
Sulfato de amônio	5 g
Ágar	20 g
Água destilada	1 L

3.5.2. Ágar Base de Nitrogênio

O ágar base de nitrogênio, assim como o base de carbono, é utilizado para certos testes específicos, como o auxanograma (ver tópico 3.6.1). É um meio com nitrogênio controlado, funcionando por princípios semelhantes ao ágar base de carbono. Após a mistura dos ingredientes, o processo segue o padrão de aquecimento, esterilização e distribuição em placas (ver tópico 3.5).

Material necessário

Sulfato de Magnésio heptahidratado	500 mg
Fosfato de Potássio monobásico	1 g
Dextrose	20 g
Ágar	20 g
Água destilada	1 L

3.5.3. Ágar batata/cenoura

O ágar batata/cenoura é ideal para o crescimento de fungos filamentosos, por estimular a produção de conídios e outras estruturas de reprodução de fungos. Visto que essas estruturas têm caráter filogenético, são utilizadas para a identificação do fungo a nível de espécie. Batatas e cenouras são utilizadas para fazer este meio, logo devem ser selecionadas e fervidas antes do preparo do ágar. 40 gramas de cada legume são utilizados para fazer os caldos. O processo seguinte segue o padrão de aquecimento, esterilização e distribuição em placas (ver tópico 3.5).

Material necessário

Caldo de batata	250 ml
Caldo de cenoura	250 ml
Ágar bacteriológico	15 g
Água destilada	500 ml

3.5.4. Ágar Casetone

O ágar Casetone é um ágar específico utilizado para testes de antifungigrama por disco de difusão (ver tópico 3.6.2). O processo padrão após a adição de todos os ingredientes é a mesma (ver tópico 3.5), contudo para a distribuição em placas deve seguir um padrão mais rígido. O meio de cultura, na placa, deve ter espessura de 4 mm, logo 25 ml de meio de cultura deve ser adicionado à placas médias e 60 ml à placas grandes.

Material necessário

Casetone	2,7 g
Extrato de levedura	1,5 g
Citrato trissódico	3 g
Fosfato dissódico	300 mg
Fosfato trissódico	300 mg
Glicose	3 g
Ágar	6 g
Água destilada	300 ml

3.5.5. Ágar Kiming

O ágar Kiming é utilizado exclusivamente para espécies do gênero *Malassezia*, visto que é um gênero que necessita de óleo para seu cultivo adequado (lipofítica). Quando estão crescidas, as colônias têm aspecto circular, pequeno e amarelado. Após a adição de todos os ingredientes, o processo segue o padrão de aquecimento, esterilização e distribuição em placas (ver tópico 3.5).

Material necessário

Extrato de malte	18 g
Peptona	3 g
Ágar bacteriológico	7,25 g
Tween 80	10 ml
Bile de boi	10 g
Óleo de girassol	2,5 ml
Ácido oleico	2,5 ml
Água destilada	500 ml

3.5.6. Ágar Mueller-Hinton

O ágar Mueller-Hinton é usado, principalmente, para testes de susceptibilidade à antifúngicos no teste de antifungigrama, assim como o ágar Casetone, porém é mais indicado para leveduras (especialmente do gênero *Candida*). Colônias crescidas podem ser reconhecidas mais facilmente em comparação com outros tipos de ágar (Mueller, Hinton, 1941). Para a produção do meio de cultura utilizando material da empresa McKesson, o material utilizado no laboratório, se dissolve 38 g do meio de cultura em 1 L de água destilada. O processo seguinte segue o padrão de aquecimento, esterilização e distribuição em placas (ver tópico 3.5).

Material necessário

Meio de cultura em pó	38 g
Extrato de carne em pó	2 g
Digestão ácida de caseína	17,5 g
Amido	1,5 g
Glicose	17 g
Água destilada	1 L

3.5.7. Ágar Mycosel

Segundo a fabricante BBL (2021), o ágar Mycosel é um meio de cultura altamente seletivo para fungos patogênicos, contendo cicloheximida e cloranfenicol. Para a produção do meio de cultura utilizando material da empresa BBL, se dissolve 36 g do meio de cultura em 1 L de água destilada. O processo seguinte segue o padrão de aquecimento, esterilização e distribuição em placas (ver tópico 3.5).

Material necessário

Meio de cultura em pó	36 g
Digestão papaica de farinha de soja	10 g
Dextrose	10 g
Agar	15,5 g
Cicloheximida	400 mg
Cloranfenicol	50 mg
Água destilada	1 L

3.5.8. Ágar Sabouraud

O ágar Sabouraud é um tipo de ágar seletivo para fungos, mais indicado para dermatófitos. Este tipo de ágar contém glicose, ágar e peptona, e pode ser modificado para incluir cloranfenicol. A adição de cloranfenicol, por ser um antibiótico de amplo espectro, torna o meio extremamente seletivo para fungos (Hare, 2013). Para a produção do meio de cultura utilizando material da empresa Sigma-Aldrich, o material utilizado no laboratório, se dissolve 65 g do meio de cultura em pó em 1 L de água destilada. O processo seguinte segue o padrão de aquecimento, esterilização e distribuição em placas (ver tópico 3.5).

Material necessário

Meio de cultura em pó	65 g
Glicose	40 g
Agar	15 g
Peptona	10 g
Água destilada	1 L

3.6. DIAGNÓSTICO FÚNGICO

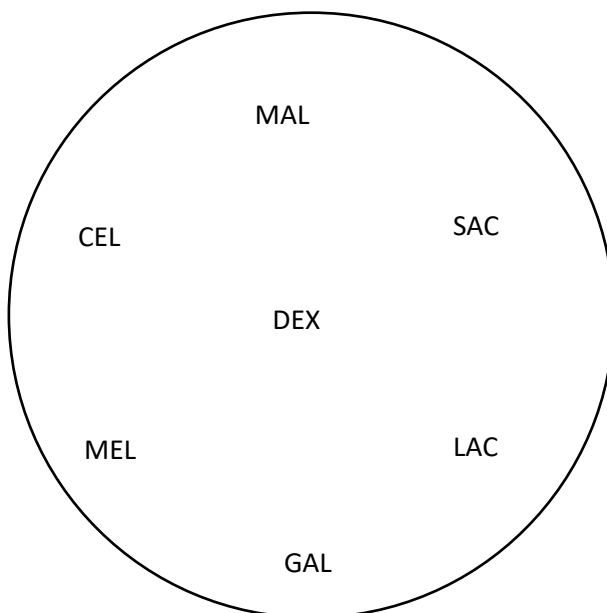
O diagnóstico fúngico é o processo pelo qual fungos patogênicos são identificados, para que um melhor diagnóstico seja fornecido aos médicos que requisitaram os exames.

3.6.1. Auxanograma

O teste de auxanograma tem como objetivo diagnosticar espécies fúngicas ao se analisar a assimilação de diferentes açúcares. Após o fungo de interesse ser isolado do paciente, é necessário preparar um inóculo para o teste. O inóculo é preparado em solução salina 0,85% na escala 7 de McFarland. Para o teste de auxanograma, três placas de Petri são utilizadas: uma média, com 90 mm de diâmetro, e duas grandes, com 150 mm de diâmetro cada.

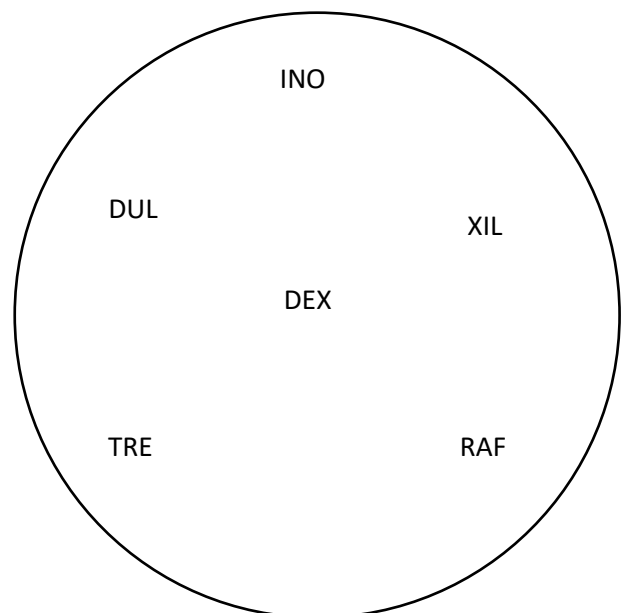
Após essa etapa, 150 µl do inóculo e 30 ml de ágar base de carbono são adicionados a cada placa grande, enquanto 100 µl do inóculo e 20 ml de ágar base de nitrogênio é adicionado na placa média. O ágar rapidamente solidifica e, por meio de movimentos circulares constantes no processo de solidificação, o inóculo e o ágar ficam uniformemente distribuídos pelas placas. Em seguida, certos componentes são adicionados às placas, para verificar a assimilação de açúcares e de nitrogênio, seguindo os esquemas das Figuras 2, 3, e 4.

Figura 2. Esquema da placa grande n. 1

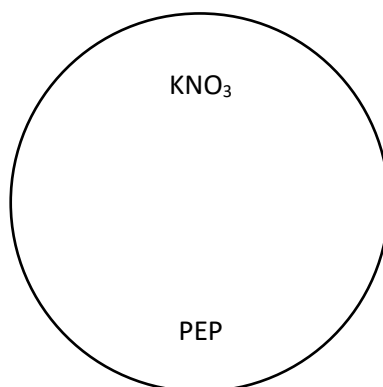


Fonte: Autor.

Figura 3. Esquema da placa grande n. 2



Fonte: Autor.

Figura 4. Esquema da placa média

Fonte: Autor.

Os componentes adicionados variam por placa. A Figura 2 mostra o esquema de uma das placas grandes, onde é adicionado 10 mg dos açúcares Dextrose (DEX), Maltose (MAL), Sacarose (SAC), Lactose (LAC), Galactose (GAL), Melbiose (MEL) e Celibiose (CEL). Da mesma maneira, a Figura 3 mostra a outra placa grande, com 10 mg dos açúcares de Dextrose (DEX), Inositol (INO), Xilose (XIL), Rafinose (RAF), Trealose (TER) e Dulcitol (DUL). Por fim, a Figura 4 mostra o esquema da placa média, na qual é adicionada 10 mg de Nitrato de Potássio (KNO_3) e Peptona (PEP). Após a adição dos componentes desejados, as placas grandes são colocadas em estufa à 37 °C por 24 horas e a placa média à temperatura ambiente pelo mesmo tempo.

O resultado do auxanograma é a proliferação do fungo onde está o açúcar que o fungo consegue assimilar. A Dextrose e Peptona são controles positivos, logo todos os fungos devem assimilá-los. A combinação dos açúcares assimilados é única de cada espécie, logo a identificação do fungo é possível.

3.6.2. Antifungigrama

O teste de antifungigrama tem como objetivo diagnosticar a susceptibilidade de fungos a drogas. Primeiramente, uma placa de Petri média, com 90 mm de diâmetro, é preparada com meio de cultura Mueller-Hinton (ver tópico 3.5.6), com adição de 2% de glicose. É adicionado 25 ml de meio de cultura, para que a espessura do meio na placa não seja superior a 4 mm de altura.

O inóculo dos fungos de interesse é preparado usando uma solução salina 0,85%, com uma concentração equivalente à 0,5 na escala de McFarland. A semeadura é feita utilizando um swab, esfregando-o completamente sobre a placa ao menos oito vezes. Assim, os fungos ficarão

distribuídos de maneira uniforme sobre toda a placa. A placa é deixada para secar por 3 minutos, assim o inóculo será completamente absorvido pelo meio de cultura.

Discos de material absorvente contendo drogas antifúngicas são colocados sobre o meio de cultura, distantes de 2 a 4 cm entre si. Assim, a droga antifúngica será difundida pelo meio de cultura, inibindo o crescimento ou matando os fungos que estiverem à certa distância do disco. A placa é colocada numa estufa à 30 °C por 24 horas e, após esse período, os resultados são anotados. Os resultados são áreas de inibição de crescimento fúngico, formando círculos ao redor de cada disco, chamadas de “halos de inibição”. Os diâmetros destes halos são medidos e comparados.

3.6.3. Sorologia

O teste sorológico tem como objetivo diagnosticar micoses profundas e/ou sistêmicas ao se analisar a interação de antígenos e os anticorpos do paciente. Primeiramente, 1 ml de ágar purificado 1% é colocado sobre uma lâmina de vidro, espalhado uniformemente sobre a lâmina e colocado numa estufa à 37 °C por 18 horas para que o ágar seque e fique permanentemente aderido. Em seguida, 3 ml de ágar citrato é colocado sobre a lâmina, uniformemente segurado por tensão superficial. O ágar citrato rapidamente solidifica, ficando fixado no local. Seis furos são feitos na lâmina usando uma ponteira cortada, posicionados nos vértices de um hexágono imaginário. Para economizar material, é possível fazer dois conjuntos de furos por lâmina.

Para realizar o teste após a preparação do material, é necessário soro do paciente, geralmente adquirido em conjunto com o sangue de um hemograma. 12,5 µl do soro do paciente é colocado em cinco dos furos, nas concentrações puro, 1:2, 1:4, 1:8. O quinto furo é preenchido com 12,5 µl de soro controle positivo, e o último é preenchido com 12,5 µl de uma solução contendo o antígeno de interesse.

Após a adição dos soros e antígeno, é necessária a incubação da lâmina em quatro fases: primeiro, numa câmara úmida em temperatura ambiente por 48 horas; segundo, numa solução de citrato de sódio 5% por 5 minutos; terceiro, numa solução salina 0,85% por 48 horas; e quarto, numa estufa a 56 °C com papel umedecido até que o ágar seque completamente. O corante Brilliant Blue é adicionado para que o resultado possa ser observado.

O resultado do teste de sorologia é o acúmulo de anticorpos ligados com antígenos em linhas azuis próximas aos furos, visto que tanto os anticorpos quanto os antígenos se difundem pelo ágar e precipitam ao se ligarem. Caso os anticorpos do soro do paciente se liguem ao antígeno assim como os anticorpos do soro do controle positivo, então o paciente está infectado com o microrganismo que proveu os antígenos.

3.6.4. Microcultivo

O teste de microcultivo tem como objetivo induzir o crescimento de estruturas de reprodução em fungos filamentosos ou leveduriformes, para que a identificação seja facilitada. Para fungos filamentosos, uma seção de meio de cultura ágar batata é cortada a partir de uma placa de Petri. Essa seção é cilíndrica, com cerca de 20 mm de diâmetro e 4 mm de altura. Em seguida, pequenos pedaços da colônia de fungos filamentosos que se deseja estudar são colocados sobre esse círculo de meio de cultura, especificamente em quatro pontos equidistantes nas bordas do círculo. O círculo de meio de cultura é colocado sobre uma lâmina de vidro, com uma lamínula sobre ele, e colocado numa câmara úmida à temperatura ambiente por, no mínimo, 5 dias. A análise do resultado em microscópio é feita ao se retirar a lamínula e coloca-la sobre uma nova lâmina de vidro com o corante azul de algodão.

Para fungos leveduriformes, é necessário o uso de ágar com fubá e de Tween-80 (um tipo de emulsificante). O ágar é colocado sobre uma lâmina de vidro e as leveduras são semeadas no meio de cultura em três estrias paralelas. O meio de cultura na lâmina é coberto por uma lamínula. O conjunto é colocado numa câmara úmida à temperatura ambiente por, no mínimo, 5 dias. A análise do resultado em microscópio é feita ao se retirar a lamínula e coloca-la sobre uma nova lâmina de vidro com o corante azul de algodão. Essa identificação é possível pois induz a germinação das leveduras em pseudo-hifas ou hifas verdadeiras.

3.7. MATERIAL DE AMBULATÓRIO

O Laboratório de Microbiologia da FAMERP faz coletas de material de pacientes do Sistema Único de Saúde no ambulatório do Hospital de Base como parte de seus serviços. A coleta do material para exames é feita de quartas-feiras a partir das 12:30 e, logo que a coleta acaba, o material passa por uma série de testes laboratoriais para gerar um diagnóstico. Primeiramente, o material é colocado em microscópio para um exame direto de identificação, baseando-se na morfologia do microrganismo. Em seguida, é colocado em meio de cultura adequado para cultivo e, conforme o pedido médico responsável pelo encaminhamento da coleta, outros procedimentos também são aplicados – podendo ser, por exemplo, um auxanograma e microcultivo. Esses procedimentos laboratoriais da coleta têm como objetivo auxiliar médicos no diagnóstico de patologias fúngicas.

3.8. ANÁLISE DE FUNGOS EM MICROSCÓPIO

A análise de fungos em microscópio é feita para que seja possível identificação visual e rápida do fungo de interesse. Essa análise pode ser feita em qualquer aumento, contudo a lente objetiva de 40x fornece a melhor resolução.

A Figura 5 mostra um fragmento de um fungo filamentosso hialino. Fungos filamentosos fazem hifas, células alongadas, e podem ser hialinos ou demáceos. Fungos hialinos são transparentes ou brancos, por não produzirem melanina em sua parede; e fungos demáceos são marrons, vermelhos ou pretos pela produção de melanina. Não é possível identificar qual o fungo exato que a figura mostra, porém é possível identificar a hifa, logo o protocolo específico para fungos filamentosos pode ser selecionado para futura identificação.

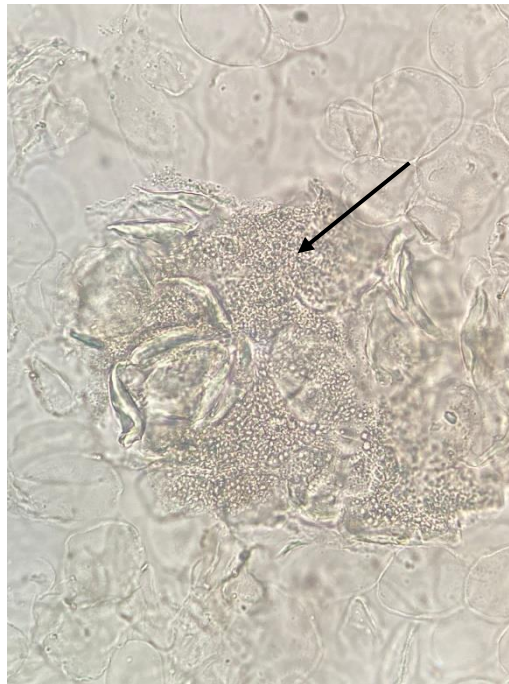
Figura 5. Fragmento de fungo hialino



Fonte: Autor.

A Figura 6, em contraste com a 5, mostra uma outra forma de fungos, as leveduras. A figura mostra um acúmulo de várias leveduras próximas a células da pele de um paciente. As leveduras, assim como as hifas, podem produzir ou não melanina, mudando de cor caso produzam. Não é possível identificar qual o fungo exato que a figura mostra, porém é possível identificar o acúmulo de leveduras, logo o protocolo específico para fungos leveduriformes pode ser selecionado para futura identificação.

Figura 6. Acúmulo de leveduras



Fonte: Autor.

4. CONCLUSÃO

O estágio no Laboratório de Microbiologia da FAMERP proveu importante experiência nos procedimentos e experimentos na área de microbiologia, em especial na micologia. Além disso, proveu convívio com profissionais experientes na área, dando oportunidades para a formação de conexões e melhoria no aprendizado.

Olhando para a experiência como um todo, de pontos positivos houveram a prática em laboratório, as amizades construídas, e o conhecimento obtido. A prática se relaciona aos métodos e os protocolos – o que fazer quando uma situação adversa ocorre, como utilizar uma autoclave, como operar uma câmara de fluxo laminar, etc. A construção de amizades é autoexplicativa, pois fiz amizade com os técnicos, alunos e professores do laboratório. O conhecimento obtido se relaciona ao conhecimento técnico acadêmico relacionado a cada atividade.

Ao mesmo tempo que houveram pontos positivos, também houveram pontos negativos. O principal ponto negativo ao meu ver foi a falta de métodos de ponta para a identificação de fungos (identificação baseada em estudos moleculares). Contudo, apesar disso, é possível entender o motivo da ausência desse método, visto que o Laboratório de Microbiologia da FAMERP é um centro para pesquisa e serviços que também atende às demandas do Hospital de Base. Os testes e experimentos requisitados pelo Hospital de Base não precisam da exatidão de estudos moleculares e demandam mais pressa nos métodos para que os diagnósticos sejam mais rápidos.

Concluindo, a experiência no laboratório foi extremamente proveitosa para minha experiência profissional e futuro como biólogo, promovendo notável melhoria no meu rendimento em laboratório durante o período de treinamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRE, V.; GADÊLHA, M. C.; STEPHANI, P.; REZENDE, T.; GRASSI, M. F. N. N. Atualização em métodos de conservação de fungos aplicados às coleções microbiológicas. *In: ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA*, 31., 2022, Maringá. **Resumos [...]**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2022.

BBL. **Mycoplasma Media, Mycosel™ Agar**. 2021. Disponível em: <https://cdn.media.interlabdist.com.br/uploads/2021/01/Mycosel-Agar.pdf>. Acesso em: 7 ago. 2024.

HARE, J. M. Sabouraud Agar for Fungal Growth. *In: GUPTA, V. K.; TUOHY, M. G.; AYYACHAMY, M.; O'DONOVAN, A.; TURNER, K. M. Laboratory Protocols in Fungal Biology*. New York: Springer, 2013. p. 211- 216.

MUELLER, J. H.; HINTON, J. A Protein-Free Medium for Primary Isolation of the Gonococcus and Meningococcus. **Experimental Biology and Medicine**, v. 48, n.1, p. 330 – 333, 1941. Disponível em: <https://doi.org/10.3181/00379727-48-13311>. Acesso em: 7 ago. 2024.

SOUZA REIS, C. R. de; GALINDO, E. F. **BIOSSEGURANÇA**. Recife: Editora Fiocruz, 2022, 225 p.

TEIXEIRA, P.; VALLE, S. **Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1996, 362 p.