



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Miguel Carlos da Silva Nunes

**Boas práticas de laboratório de micologia médica: elaboração de  
manual de procedimentos técnicos e de ilustrações fúngicas**

Rio de Janeiro  
2018

Miguel Carlos da Silva Nunes

**Boas práticas de laboratório de micologia médica: elaboração de manual de procedimentos técnicos e de ilustrações fúngicas**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Murillo Neufeld

Rio de Janeiro

2018

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

N972 Nunes, Miguel Carlos da Silva.

Boas práticas de laboratório de micologia médica: elaboração de manual de procedimentos técnicos e de ilustrações fúngicas / Miguel Carlos da Silva Nunes.- 2018.

Orientador: Paulo Murillo Neufeld

Dissertação (mestrado) Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Programa de Pós-Graduação em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense.

1. Micologia médica – Teses. 2. Micologia – Manuais de laboratório – Teses. 3. Técnicas de Laboratório Clínico. 4. Diagnóstico de laboratório – Teses. I. Neufeld, Paulo Murillo. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616-002.72

Bibliotecária: Angela da Silva Velho CRB7/4780

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Miguel Carlos da Silva Nunes

**Boas práticas de laboratório de micologia médica: elaboração de manual de procedimentos técnicos e de ilustrações fúngicas**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 31 de outubro de 2018.

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Paulo Murillo Neufeld (Orientador)  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof. Dr. José Firmino Nogueira Neto  
Faculdade de Ciências Médicas– UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana Cristina Rivas da Silva  
Universidade Castelo Branco

Rio de Janeiro

2018

## DEDICATÓRIA

Dedico àqueles que estiveram ao meu lado em todos os momentos dessa caminhada. Para minha amada mãe, Vitória, meu amado pai, Salvador, minha irmã Michele e à minha amada esposa, Ariane. Vocês são fundamentais em minha vida. O meu amor e gratidão.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder saúde e força para a realização desse sonho.

Agradeço aos meus pais, Vitória e Salvador, por me incentivarem constantemente a estudar, para vencer os obstáculos da vida com sabedoria.

Agradeço a Ariane, minha doce, meiga e compreensiva esposa, pelo respeito, incentivo e apoio incondicional.

Ao meu orientador e amigo, Prof. Paulo Murillo Neufeld, pela amizade, pelos ensinamentos e por ser meu melhor exemplo e referência do que é ser PROFESSOR.

Aos amigos do laboratório da UFRJ, Debora, Elis...minha gratidão

Aos amigos da Micologia do Hospital Universitário, Glória, Henrique e Marilene, pelos ensinamentos e contribuições com as imagens que ajudaram a compor o atlas desse trabalho.

Aos amigos da Bacteriologia do HFA: Bruna, João, Mirian, Selma e Sheila. As “feras” da Microbiologia do HFA, pela boa convivência, pela amizade, incentivo e ajuda nos momentos turbulentos desse trabalho.

Aos amigos e funcionários do HFA, Raquel (pela ajuda com as lâminas de histopatologia), Lucia e Tania pelo estímulo e apoio.

Aos amigos do Laboratório de Niterói, em especial, Claudio e Márcia, pela flexibilidade e apoio nesse projeto.

Aos amigos do mestrado, pelos ótimos momentos (curtos, mais eternos).

Agradeço a UERJ, aos professores, a Simone (secretária), pela oportunidade de cursar o Mestrado.

E, finalmente, a todos que muito provavelmente esqueci de citar, mas que, com certeza, sabem que foram e serão sempre importantes para mim.

Meu melhor Obrigado!

Ando devagar porque já tive pressa e levo esse sorriso porque já chorei demais. Hoje me sinto mais forte, mais feliz, quem sabe; só levo a certeza de que muito pouco sei, ou que nada sei.

*Almir Sater e Renato Teixeira.*

## RESUMO

NUNES, Miguel Carlos da Silva. *Boas Práticas de Laboratório de Micologia Médica: elaboração de manual de procedimentos técnicos e de ilustrações fúngicas*. 2018 166 f. Dissertação (Mestrado em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Os fungos são responsáveis por diversos processos infecciosos tanto comunitários quanto nosocomiais. Notadamente mais críticas em pacientes imunocomprometidos, as infecções fúngicas têm sido desencadeadas pelo progresso da tecnologia médica que, de forma muito frequente, determina um aprofundamento dos estados consumptivos em indivíduos hospitalizados ou que apresentem importantes processos de base. Com características oportunistas, essas infecções se mostram refratárias aos tratamentos propostos, bem como de diagnóstico difícil. O aumento de casos de infecções graves tem determinado certo interesse em relação à micologia médica e às formas de manejo dos pacientes. A compreensão dos mecanismos de agressão dos fungos, a resposta à terapêutica, o diagnóstico laboratorial e o comportamento *in vitro* frente às drogas de uso clínico têm sido as áreas de maior interesse da comunidade científica. Em decorrência da complexidade morfológica e biológica e da especificidade da eco-epidemiologia desses organismos, o estudo dos fungos patogênicos ainda tem apresentando grandes limitações, o que tem mantido esses organismos amplamente desconhecidos das diversas especialidades médicas, particularmente, da medicina laboratorial. O reflexo mais concreto de todo esse baixo interesse e limitação é a ausência da disciplina de micologia, tanto na graduação quanto na pós-graduação, em muitos cursos médicos e da área da saúde. Além disso, apesar de mais disponível, atualmente, há certa escassez de literatura sobre micologia laboratorial no idioma português. A dificuldade inerente ao estudo micológico e a falta de recursos humanos especializados, cursos de formação e material didático, retroalimenta esse sistema de desconhecimento e desinteresse acerca dos fungos patogênicos. A constatação dessa realidade levou a proposição, no presente trabalho, da elaboração de um manual de boas práticas em laboratório de micologia médica associado a um atlas de imagens fúngicas. Esse manual constitui-se de uma descrição pormenorizada de tópicos como biologia e morfologia de fungos de interesse médico e laboratório de micologia médica onde são contempladas as características macro e microscópicas e fisiológicas dos fungos e suas taxonomias, espaço físico, arquitetura laboratorial, biossegurança e controle ambiental, ergonomia, equipamentos, materiais e métodos de pesquisa e identificação de fungos e controle da qualidade, além de conter um atlas imaginográfico cultural e tecidual dos principais agentes fúngicos. Efetivamente, esse manual consiste em um guia ou um compêndio técnico de bancada. Desse modo, o manual elaborado representa uma ferramenta importante para a montagem laboratorial e a correta execução dos procedimentos em micologia médica, contribuindo, assim, com a difusão do conhecimento técnico e micológico, formação de um pensamento crítico e diminuição dos frequentes erros diagnósticos.

Palavras-chave: Micologia. Diagnóstico laboratorial. Manual de boas práticas.

Atlas.

## ABSTRACT

NUNES, Miguel Carlos da Silva. *Good Laboratory Practices of Medical Mycology*: elaboration of manual of technical procedures and fungal illustrations. 2018 166 f. Dissertação (Mestrado em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Fungi are responsible for several infectious processes, both community and nosocomial. Notably more critical in immunocompromised patients, fungal infections have been triggered by the progress of medical technology, which very often leads to a deepening of the consumptive states in hospitalized individuals or those who present important underlying processes. With opportunistic characteristics, these infections are resistant to the proposed treatments, as well as difficult diagnosis. The increase in cases of serious infections has had some interest in the medical mycology and patient management. The understanding of fungal aggression mechanisms, response to therapeutics, laboratory diagnosis and in vitro behavior towards drugs of clinical use have been the areas of greatest interest to the scientific community. Due to the morphological and biological complexity and the eco-epidemiology specificity of these organisms the study of pathogenic fungi still presents great limitations, which has kept these organisms largely unknown in the various medical specialties, particularly laboratory medicine. The most concrete reflection of all this low interest and limitation is the absence of the discipline of mycology, both undergraduate and postgraduate, in many medical and health courses. In addition, although more available, there is currently a shortage of literature on laboratory mycology in the portuguese language. The difficulty inherent to the mycological study and the lack of specialized human resources, training courses and didactic material, feed this system of ignorance and disinterest about pathogenic fungi. The verification of this reality led to the proposition, in the present work, of the preparation of a manual of good practices in a laboratory of medical mycology associated to an atlas of fungal images. This manual is a detailed description of topics such as biology and morphology of fungi of medical interest and medical mycology laboratory where are studies the macro and microscopic and physiological characteristics of fungi and their taxonomies, physical space, laboratory architecture, biosafety and environmental control, ergonomics, equipment, materials and methods of research and identification of fungi and quality control, as well as containing an cultural and tissue imaginographic atlas of the main fungal agents. Effectively, this manual consists of a bench technical guide or compendium. Thus, the manual elaborated represents an important tool for the laboratory assembly and the correct execution of the procedures in medical mycology, thus contributing to the diffusion of technical and mycological knowledge, formation of critical thinking and reduction of frequent diagnostic errors.

Keywords: Laboratory diagnosis. Good practice manual. Atlas.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Posição ergonômica adequada .....	43
Figura 2 -	Modelo de um laboratório de Micologia Médica e seus equipamentos .....	44
Figura 3 -	Recipiente para transporte de amostras biológicas .....	52
Figura 4 -	Algoritmo de processamento de amostras .....	76
Figura 5 -	<i>Microsporum canis</i> .....	103
Figura 6 -	<i>Microsporum gypseum</i> .....	103
Figura 7 -	<i>Microsporum nanum</i> .....	103
Figura 8 -	<i>Trichophyton rubrum</i> .....	104
Figura 9 -	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> .....	104
Figura 10 -	<i>Trichophyton tonsurans</i> .....	104
Figura 11 -	<i>Trichophyton schoenleinii</i> .....	105
Figura 12 -	<i>Trichophyton verrucosum</i> .....	105
Figura 13 -	<i>Epidermophyton floccosum</i> .....	105
Figura 14 -	Parasitismo ectotrix .....	106
Figura 15 -	Parasitismo endotrix .....	106
Figura 16 -	<i>Tinea favosa</i> .....	106
Figura 17 -	<i>Aspergillus fumigatus</i> .....	107
Figura 18 -	<i>Aspergillus flavus</i> .....	107
Figura 19 -	<i>Aspergillus niger</i> .....	107
Figura 20 -	<i>Aspergillus nidulans</i> .....	108
Figura 21 -	<i>Aspergillus clavatus</i> .....	108
Figura 22 -	<i>Aspergillus terreus</i> .....	108
Figura 23 -	<i>Penicillium</i> sp.....	109
Figura 24 -	<i>Sarocladium</i> sp ( <i>Acremonium</i> ).....	109
Figura 25 -	<i>Scedosporium apiospermum</i> .....	109
Figura 26 -	<i>Geotricum</i> sp.....	110
Figura 27 -	<i>Paecilomyces variotii</i> .....	110
Figura 28 -	<i>Fusarium</i> sp.....	110
Figura 29 -	<i>Alternaria</i> sp.....	111
Figura 30 -	<i>Curvularia</i> sp.....	111
Figura 31 -	<i>Drechslera</i> sp.....	111

Figura 32 -	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> .....	112
Figura 33 -	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i> .....	112
Figura 34 -	<i>Aureobasidium pullulans</i> .....	112
Figura 35 -	<i>Bipolaris</i> sp.....	113
Figura 36 -	<i>Ulocladium</i> sp.....	113
Figura 37 -	<i>Exophiala</i> sp.....	113
Figura 38 -	<i>Cladosporium</i> sp.....	114
Figura 39 -	<i>Nigrospora</i> sp.....	114
Figura 40 -	<i>Fonsecaea pedrosoi</i> .....	115
Figura 41 -	<i>Phialophora verrucosa</i> .....	115
Figura 42 -	<i>Cladophialophora carrionii</i> .....	115
Figura 43 -	<i>Rhinocladiella aquasperma</i> .....	116
Figura 44 -	<i>Cunninghamella</i> sp.....	117
Figura 45 -	<i>Syncephalastrum</i> sp.....	117
Figura 46 -	<i>Lichthemia</i> sp ( <i>Absidia</i> ).....	117
Figura 47 -	<i>Mucor</i> sp.....	118
Figura 48 -	<i>Rhizomucor</i> sp.....	118
Figura 49 -	<i>Rhizopus</i> sp.....	118
Figura 50 -	<i>Conidiobolus coronatus</i> .....	119
Figura 51 -	<i>Basidiobolus ranarum</i> .....	119
Figura 52 -	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> – fase micelial.....	120
Figura 53 -	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> – fase leveduriforme.....	120
Figura 54 -	<i>Sporothrix schenckii</i> <i>complexo</i> – fase micelial.....	121
Figura 55 -	<i>Sporothrix schenckii</i> <i>complexo</i> – fase leveduriforme.....	121
Figura 56 -	<i>Histoplasma capsulatum</i> - fase micelial.....	122
Figura 57 -	<i>Histoplasma capsulatum</i> – fase leveduriforme.....	122
Figura 58 -	<i>Coccidioides immitis/ C. posadasii</i> – fase micelial.....	123
Figura 59 -	<i>Coccidioides immitis/ C. posadasii</i> – fase leveduriforme.....	123
Figura 60 -	<i>Talaromyces marneffeii</i> ( <i>P. marneffeii</i> ) – fase micelial.....	124
Figura 61 -	<i>Talaromyces marneffeii</i> ( <i>P. marneffeii</i> ) – fase leveduriforme.....	124
Figura 62 -	<i>Lacazzia loboi</i> (KOH 20%)- Lobomicose.....	125
Figura 63 -	<i>Lacazzia loboi</i> (40 x) – Lobomicose.....	125
Figura 64 -	<i>Candida albicans</i> .....	126
Figura 65 -	Clamidósporo ( <i>C. albicans</i> ).....	126

Figura 66 -	<i>Candida krusei</i> .....	126
Figura 67 -	<i>Candida parapsilosis</i> Complexo.....	127
Figura 68 -	<i>Candida tropicalis</i> .....	127
Figura 69 -	<i>Candida glabrata</i> .....	127
Figura 70 -	CHROMagar <i>candida</i> .....	128
Figura 71 -	<i>Cryptococcus</i> sp (nanquim).....	129
Figura 72 -	<i>Cryptococcus</i> sp (gemulação).....	129
Figura 73 -	<i>Rhodotorula</i> sp.....	129
Figura 74 -	<i>Madurella grisea</i> .....	130
Figura 75 -	<i>Madurella mycetomatis</i> .....	130
Figura 76 -	Leveduras ou blastoconídios.....	131
Figura 77 -	Hifas septadas hialinas.....	131
Figura 78 -	Hifas septadas demáceas.....	131
Figura 79 -	Hifas asseptadas ou cenocíticas.....	131
Figura 80 -	Hifas septadas hialinas (exame direto-pele).....	132
Figura 81 -	Material ungueal com esporos de <i>Fusarium</i> sp.....	132
Figura 82 -	<i>Malassezia</i> sp – exame direto.....	132
Figura 83 -	Hifas septadas demáceas e ramificadas.....	132
Figura 84 -	Hifas septadas e artrosporadas – KOH + tinta Parker.....	132
Figura 85 -	Artroconídios.....	132
Figura 86 -	Hifas septadas demáceas sinuosas e espessas.....	133
Figura 87 -	<i>Hortaea werneckii</i> .....	133
Figura 88 -	<i>Malassezia furfur</i> .....	134
Figura 89 -	Piedra Branca.....	135
Figura 90 -	<i>Trichosporon</i> sp (agente etiológico da Piedra Branca).....	135
Figura 91 -	Piedra Negra.....	136
Figura 92 -	<i>Piedraia hortae</i> (agente etiológico da Piedra Negra).....	136
Figura 93 -	Dermatófitos - Hifas septadas hialinas. PAS (40x).....	137
Figura 94 -	Hifas septadas e ramificadas. Coloração de Gram.....	137
Figura 95 -	Hifas septadas hialinas, ramificada e dicotômicas. HE (40x).....	137
Figura 96 -	Hifas com ramificações e ou sem ramificação dicotômica Aspergilose. Prata-metanamina (10x) .....	138

Figura 97 -	Hifas hialinas septadas unidirecionadas. PAS (10x).....	138
Figura 98 -	Aspergiloma (bola fúngica) - Cabeças aspergiliares e conídios em alvéolo pulmonar. Prata-metanamina (10x).....	138
Figura 99 -	Hifas demáceas e ramificadas. HE (40x) .....	139
Figura 100 -	Feohifomicose no couro cabeludo. Prata-metanamina (10x) ....	139
Figura 101 -	Corpos fumagóides aos pares. HE (20x) .....	139
Figura 102 -	Corte histológico mostrando os corpos fumagóides. PAS (40x)..	139
Figura 103 -	Blastoconídios bem evidenciados. PAS (40x).....	140
Figura 104 -	Presença de fungo confirmada pela lâmina corada em Prata-Metanamina (40x).....	140
Figura 105 -	Células leveduras multibrotantes. Prata-Metanamina (40x).....	140
Figura 106 -	Células de levedura de parede dupla com base de inserção estreita entre a célula parental e a célula filha. HE (20x) .....	140
Figura 107 -	Células de leveduras com presença de hifas. PAS (20x).....	141
Figura 108 -	Presença de corpos asteroides. HE (20x).....	141
Figura 109 -	Esférulas com endósporos. HE (20x).....	141
Figura 110 -	Esférulas repletas de endósporos. PAS (20x).....	141
Figura 111 -	Células globosas com cadeias lineares ou ramificadas. Prata-metanamina (10x).....	142
Figura 112 -	Células em forma de “limão” ou com dupla gemulação em forma de ampulheta. PAS (10x).....	142
Figura 113 -	Esférulas ostioladas com endósporos. HE (10X).....	142
Figura 114 -	Células globosas e ovais. Algumas gemulando. HE (10x).....	143
Figura 115 -	Acentuado espessamento da parede. Cápsula fortemente corada. Alcian Blue (20x).....	143
Figura 116 -	Numerosas células globosas e capsulas bem caracterizadas. Mucicarmim de Meyer (20x).....	143
Figura 117 -	Presença de hifas na periferia do grão.....	144
Figura 118 -	Formas arredondadas e entrelaçamento visível na periferia do grão .....	144
Figura 119 -	Reação de Splendore- Hoeppli .....,.....	145

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Resumo das doenças fúngicas e seus sítios de ação .....	28
Quadro 2 -	Faixas de refletância para ambientes internos.....	39
Quadro 3 -	Programação física de um laboratório de Micologia.....	45
Quadro 4 -	Procedimentos para a execução dos testes de esterilidade e viabilidade dos meios de cultura.....	101

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AEQ	Avaliação Externa de Qualidade
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Bread Heart Infusion
BPLC	Boas Práticas de Laboratório Clínico
CCIH	Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CEQ	Comissão Externa de Qualidade
CIE	International Commission Illumination
CIQ	Comissão Interna de Qualidade
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CTNBIO	Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EPC	Equipamento de Proteção Coletiva
EPI	Equipamento de Proteção Individual
HE	Hematoxilina Eosina
HEPA	High Efficiency Particulate Arrestance
ISO	International Organization for Standardization
NBR	Norma Brasileira
PAS	Ácido periódico-Schiff
PCR	Polymerase Chain Reaction
POP	Procedimento Operacional Padrão
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RSS	Resíduos de Serviço de Saúde
SABHI	Sabouraud Brain Heart Infusion
SNC	Sistema Nervoso Central
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
mL	Mililitro
cm	Centímetro
cm <sup>3</sup>	Centímetros cúbicos
rpm	Rotações por minute
m <sup>2</sup>	Metro quadrado
m/s	Metro por segundo
°C	Grau Celsius
db	Decibel
g	Grama
nº	Número
mm	Milímetro

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
1	<b>OBJETIVO E METAS.....</b>	<b>20</b>
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
3	<b>DESENVOLVIMENTO.....</b>	<b>22</b>
3.1	<b>Biologia e morfologia de fungos patogênicos.....</b>	<b>22</b>
3.2	<b>Infecções fúngicas.....</b>	<b>28</b>
4	<b>LABORATÓRIO DE MICOLOGIA MÉDICA.....</b>	<b>31</b>
4.1	<b>Espaço físico.....</b>	<b>31</b>
4.2	<b>Biossegurança.....</b>	<b>32</b>
4.3	<b>Documentos de um laboratório de saúde aplicados à Micologia Médica.....</b>	<b>33</b>
4.4	<b>Objetivos do laboratório de Micologia.....</b>	<b>35</b>
4.5	<b>Escopo do laboratório de Micologia.....</b>	<b>35</b>
4.5.1	<u>Estratégia do espaço físico.....</u>	<b>36</b>
4.5.2	<u>Características gerais.....</u>	<b>37</b>
4.5.3	<u>Dimensão.....</u>	<b>37</b>
4.5.4	<u>Controle do ar.....</u>	<b>38</b>
4.5.5	<u>Iluminação e instalações hidráulicas e sanitárias.....</u>	<b>38</b>
4.5.6	<u>Conforto acústico.....</u>	<b>40</b>
4.5.7	<u>Protocolos de incêndio e sinalização de segurança.....</u>	<b>41</b>
4.5.8	<u>Equipamentos.....</u>	<b>41</b>
4.5.9	<u>Ergonomia.....</u>	<b>42</b>
4.6	<u>Áreas de apoio.....</u>	<b>44</b>
5	<b>BIOSSEGURANÇA EM MICOLOGIA MÉDICA.....</b>	<b>46</b>
6	<b>MATERIAL E MÉTODOS DE PESQUISA E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS PATOGÊNICOS.....</b>	<b>51</b>
6.1	<b>Coleta e transporte de espécimen clínico.....</b>	<b>51</b>
6.1.1	<u>Pelos e cabelos.....</u>	<b>53</b>
6.1.2	<u>Pele.....</u>	<b>53</b>
6.1.3	<u>Unhas.....</u>	<b>54</b>
6.1.4	<u>Abscessos.....</u>	<b>55</b>
6.1.5	<u>Úlceras e feridas.....</u>	<b>56</b>

6.1.6	<u>Cascas e crostas</u> .....	56
6.1.7	<u>Mucosas</u> .....	57
6.1.8	<u>Olhos e conjuntivas</u> .....	57
6.1.9	<u>Conduto auditivo</u> .....	58
6.1.10	<u>Nariz e seios paranasais</u> .....	58
6.1.11	<u>Garganta e nasofaringe</u> .....	59
6.1.12	<u>Escarro e secreções pulmonares</u> .....	59
6.1.13	<u>Urina e fezes</u> .....	60
6.1.14	<u>Líquido Cefalorraquidiano (LCR)</u> .....	60
6.1.15	<u>Medula Óssea</u> .....	61
6.1.16	<u>Sangue e cateter intravascular</u> .....	61
6.1.17	<u>Fluidos corporais</u> .....	62
6.1.18	<u>Tecidos</u> .....	62
6.1.19	<u>Critérios de rejeição</u> .....	63
7	<b>PROCESSAMENTO GERAL DOS ESPECIMENS</b> .....	64
7.1	<b>Espécimens dermatológicos</b> .....	64
7.2	<b>Espécimens de abscessos</b> .....	66
7.3	<b>Espécimens de membranas mucosas</b> .....	67
7.4	<b>Espécimens oftalmológicas e otorrinolaringológicas</b> .....	68
7.5	<b>Espécimens pulmonares</b> .....	68
7.6	<b>Espécimens de urina</b> .....	69
7.7	<b>Espécimens de fezes</b> .....	70
7.8	<b>Espécimens de LCR e fluidos corporais</b> .....	70
7.9	<b>Espécimens de sangue e medula óssea</b> .....	71
7.10	<b>Espécimens de biópsias</b> .....	72
8	<b>PRÉ-TRATAMENTO DOS ESPÉCIMENS CLÍNICOS</b> .....	73
9	<b>EXAME MICROSCÓPICO DIRETO DO ESPÉCIME CLÍNICO</b> .....	74
9.1	<b>Preparação com hidróxido de potássio (KOH)</b> .....	76
9.2	<b>Preparação com Ácido Periódico de Schiff (PAS)</b> .....	77
9.3	<b>Preparação com Calcofluor Branco</b> .....	77
9.4	<b>Preparação com Tinta da China</b> .....	78
9.5	<b>Preparação com Giemsa</b> .....	78
9.6	<b>Preparação com GRAM</b> .....	78
10	<b>CULTURA DO ESPECIMEN CLÍNICO</b> .....	80

11	<b>IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS.....</b>	84
12	<b>HISTOPATOLOGIA.....</b>	87
13	<b>MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO NÃO BASEADOS EM CULTURA...</b>	89
13.1	<b>Testes sorológicos.....</b>	89
13.2	<b>Detecção de metabólitos não-antigênicos.....</b>	90
13.3	<b>Detecção de Ácidos Nucléicos.....</b>	92
13.4	<b>Diagnóstico por imagem.....</b>	92
14	<b>QUALIDADE NO LABORATÓRIO DE MICOLOGIA.....</b>	94
14.1	<b>Introdução.....</b>	94
14.2	<b>Controle da Qualidade.....</b>	95
14.3	<b>Controle Interno da Qualidade (CIQ).....</b>	96
14.4	<b>Controle Externo da Qualidade (CEQ)/ Ensaio de Proficiência.....</b>	97
14.5	<b>Procedimento Operacional Padrão (POP).....</b>	98
14.6	<b>Laboratório de Referência.....</b>	99
14.7	<b>Acreditação.....</b>	99
14.8	<b>Controle de Meios de Cultura.....</b>	100
14.9	<b>Coleção de Culturas de fungos.....</b>	101
15	<b>ATLAS DE ILUSTRAÇÕES FÚNGICAS –</b>	103
	<b>MICROMORFOLOGIA.....</b>	
16	<b>ATLAS DE HISTOPATOLOGIA DAS MICOSES.....</b>	137
	<b>DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....</b>	146
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	152

## INTRODUÇÃO

Classicamente, os fungos têm sido estudados por conta de sua ação decompositora sobre alimentos e matéria orgânica, produção de micotoxinas, capacidade fitopatogênica e infecção sobre seres humanos e animais (HÖFLING; GONÇALVES, 2016). Apesar de serem capazes de produzir doença humana, os fungos têm menor prevalência quando comparados a outros agentes etiológicos como bactérias e vírus (WEBSTER, 2007). Em decorrência disso, os processos nos quais estão envolvidos são, invariavelmente, negligenciados ou subestimados (MEZZARI, A; FUENTEFRIA, 2012). Contudo, mudanças nas taxas de incidência das doenças fúngicas têm sido verificadas, particularmente, no grupo dos pacientes imunocomprometidos, tendo em vista apresentarem uma maior vulnerabilidade, por suas doenças de base, frente à agressão por fungos potencialmente patogênicos, bem como devido à tecnologia médica, que os tornam ainda mais susceptíveis por também interferirem com seus mecanismos de defesa (GUILHERMETTI. et al, 2004; KOZEL; WICKES, 2013). Nesse contexto, microrganismos de vida sapróbia passaram a ser protagonistas de infecções de caráter oportunista, exibindo, com frequência, elevados percentuais de morbimortalidade (CUENCA-ESTRELLA; RODRIGUEZ-TUDELA, 2002).

Na realidade, o manejo clínico-laboratorial da doença fúngica oportunista tem apresentado importante grau de dificuldade, em função da natureza ambiental de seus agentes, que podem levar à contaminação acidental das amostras clínicas a serem avaliadas no laboratório, gerando equívocos de interpretação e falsos diagnósticos (SILVA, 2015). Contribuindo para uma prática diagnóstica deficiente, pode ser relacionada, ainda, uma formação micológica inadequada onde faltam conhecimentos acerca da epidemiologia das doenças fúngicas, assim como das características morfofisiológicas dos fungos associados a processos infecciosos (NEUFELD, 1999).

Essa dificuldade no diagnóstico *in vitro* do agente fúngico ratifica a urgente necessidade de formação e atualização em micologia médica, por parte dos profissionais de medicina laboratorial, haja vista a complexidade e o prolongado tempo para a aquisição dos conteúdos micológicos e desenvolvimento de *expertises* (REIS et al. 2015).

Nesse sentido, para a melhoria do desempenho em micologia médica, é de grande importância que os profissionais tenham acesso à informação de qualidade que permita fundamentar criticamente o trabalho com os fungos de interesse médico, de maneira a torná-los promotores de boas práticas em micologia e gestores de serviços de diagnósticos especializados (BRASIL, 2013).

No que se refere ao Brasil, o diagnóstico laboratorial das doenças fúngicas é, claramente, de baixa qualidade (BARROSO; MELICO-SILVESTRE; TAVEIRA, 2014). Resultados equivocados são frequentes, principalmente, em decorrência do fracasso no isolamento do agente fúngico ou do isolamento de fungos contaminantes. Associado a isso, a falta de conhecimento sobre o protocolo micológico impede a determinação exata das etiologias, que, em sua maioria, é realizada através da análise de fenótipos morfológicos e perfis bioquímico (XAVIER; OLIVEIRA; SEVERO, 2009).

Devido a toda essa problemática diagnóstica, o objetivo do presente trabalho é contribuir com a formação dos profissionais da área de medicina laboratorial, no que tange à eco-epidemiologia dos fungos e de suas doenças, às metodologias de identificação fúngica, às boas práticas do laboratório de micologia, ao controle de qualidade em micologia e às estratégias para a implantação de um serviço de micologia hospitalar, através de ampla revisão dos métodos de pesquisa e identificação de fungos patogênicos e desenvolvimento de material didático com imagem e conteúdo teórico.

## **1. OBJETIVO E METAS**

Produzir material técnico para subsidiar a correta execução dos procedimentos de diagnóstico laboratorial dos agentes fúngicos causadores de doença humana, consolidando as informações que se encontram dispersas na literatura nacional e internacional.

Contribuir com a formação e o desenvolvimento dos profissionais da área da medicina laboratorial que desempenham suas funções em laboratórios de microbiologia médica e/ou micologia médica, bem como facilitar um roteiro para a implantação de boas práticas de laboratório de micologia médica.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

Para a confecção do manual de procedimentos técnicos e de ilustrações fúngicas foi feita busca ativa nas diferentes bases de dados e literatura técnica da área de laboratório clínico, microbiologia e micologia clínica, biossegurança, legislação e arquitetura, gestão e controle de qualidade laboratorial bem como foram capturadas imagens microscópicas do acervo de lâminas de micopatologia e culturas fúngicas do Laboratório de Micologia Médica e Forense da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro [UFRJ].

### 3. DESENVOLVIMENTO

#### MANUAL DE BOAS PRÁTICAS DE LABORATÓRIO DE MICOLOGIA MÉDICA

##### 3.1. Biologia e morfologia de fungos patogênicos

A micologia médica é a parte da microbiologia que estuda os fungos como patógenos humanos (LACAZ, C.S.; PORTO, E, 1998). Os fungos formam um grupo bastante heterogêneo, mas por compartilharem características comuns e serem suficientemente diferentes dos outros seres vivos são considerados separadamente no Reino Fungi (WEBSTER,2007). Esses microrganismos são eucariontes, podendo apresentar um ou vários núcleos individualizados por uma membrana dupla e com poros, bem como serem uni ou multicelulares e incapazes de motilidade (SIDRIM, 2004). A parede celular é composta por quitina, celulose, glucanas, mananas e outras manoproteínas (RUSSEL; PATERSON; LIMA, 2016). A membrana plasmática contém ergosterol e os componentes citoplasmáticos são semelhantes àqueles encontrados nas células dos animais superiores (NEUFELD, 1999).

A estrutura vegetativa (talo) pode ser constituída por células arredondas, chamadas de leveduras ou por filamentos tubulares, denominados de hifas ou coletivamente de micélio (CRUZ, 2016). De acordo com a presença ou ausência de septações, as hifas podem ser classificadas em septadas ou asseptadas (KIBBLER et al., 2017). Tipicamente, as hifas septadas (apocíticas) apresentam, em intervalos regulares, projeções transversais da parede celular que delimitam compartimentos, que se intercomunicam por um poro central, encontrado nessas projeções – septos- (BARROSO; MELICO-SILVESTRE; TAVEIRA, 2014). No caso das hifas asseptadas (cenocíticas), tais divisões não estão presentes e o material nuclear e citoplasmático circula livremente por toda a extensão do micélio (LIN et al. 2015). As hifas septadas podem ser ainda classificadas em demáceas ou hialinas, segundo a coloração de sua parede celular (QUINDÓS, 2015).

Devido ao elevado conteúdo de pigmentos melanóides na parede fúngica, as hifas demáceas apresentam coloração escurecida e, em decorrência da menor

quantidade ou ausência de melanina, as hifas hialinas são normalmente incolores ou transparentes (LIN et al., 2015; NEUFELD, 1999).

Os fungos podem ser também separados com base na morfologia celular, sendo denominados de filamentosos (multicelulares), quando formados por elementos hifálicos, e leveduriformes (unicelulares), quando as unidades formadoras são leveduras (CLSI, 2013). No entanto, em diferentes condições de cultivo, alguns fungos podem apresentar ambos os tipos morfológicos (NEUFELD, 1999; SILVA, 2006). Esses organismos são classicamente conhecidos como fungos dimórficos (GERALDINO et al., 2012).

O dimorfismo fúngico tem uma natureza termo nutricional com a fase filamentosa, ocorrendo a temperatura ambiente ou em vida sapróbia, e a fase leveduriforme, sendo obtida a temperatura de 37° C ou em parasitismo (KIBBLER et al., 2018). Normalmente, as colônias dos fungos filamentosos apresentam uma textura granular, velutino ou algodinoso e aquelas dos fungos leveduriformes são circulares, restritas e com uma consistência pastosa ou mucoide (BENELLI et al., 2014; BRASIL, 2004; GERALDINO, 2012; SOMENZI; RIBEIRO; MENEZES, 2006).

Ao contrário dos vegetais, os fungos são desprovidos de cloroplastos, clorofila ou qualquer outro pigmento fotossintetizante (SIDRIM; ROCHA, 2010). Por isso, são considerados heterotróficos, necessitando de substratos orgânicos para a obtenção de carbono e energia para o metabolismo (LACAZ, 2002; MEZZARI, A; FUENTEFRIA, 2012; OLIVEIRA, 2013; SILVA, 2006). Assim, estão sempre associados à matéria orgânica como sapróbios ou decompositores, simbioses, comensais ou parasitas (OLIVEIRA, 2013; SIDRIM, 2004). A tomada de nutrientes é feita por absorção, pois a fagocitose é dificultada devido à rigidez da parede celular (MEZZARI; FUENTEFRIA, 2012). Como a parede fúngica também é impermeável às macromoléculas, exoenzimas digestivas são produzidas para o desdobramento extracelular das substâncias nutritivas (HOFLING, 2016; MINAMI, 2003). A reserva glicídica dos fungos é representada pelo glicogênio e não pelo amido, à semelhança da célula animal (NEUFELD, 1999). O metabolismo energético nesse grupo pode apresentar algumas variações, mas os fungos de importância médica são fundamentalmente aeróbios (KOZEL; WICKES, 2013).

A unidade reprodutiva dos organismos fúngicos são os esporos (FISHER; COOK, 2001). Esses elementos de propagação podem ter uma origem sexuada

e/ou assexuada (ALMEIDA, 2008; FISHER; COOK, 2001; OLIVEIRA, 2013). A reprodução sexuada (teleomórfica) se caracteriza pela união de corpos diferenciados ou especializados com carácter de sexualidade - gametas ou núcleos gaméticos (ALMEIDA, 2008). Plasmogamia, cariogamia e meiose são as principais fases dessa reprodução (ALMEIDA, 2008). Geralmente, o estado sexuado ocorre de maneira mais restrita no ciclo biológico dos fungos e produz menor número de esporos (ALMEIDA, 2008; ZAITZ, 2010). Todavia, a variabilidade genética é alta, já que a meiose é a divisão nuclear envolvida nesse processo (KIBBLER et al., 2018). Por sua vez, a reprodução assexuada (anamórfica) ocorre puramente por transformações do sistema vegetativo, sem a participação de gametas (MEZZARI; FUENTEFRÍA, 2012). Essa forma de reprodução acontece durante todo o ciclo biológico dos fungos, sendo importante para a disseminação dos organismos nos ecossistemas (LIN, 2015). No entanto, por esses esporos serem produzidos por mitose, a variabilidade genética é baixa e dependente de mutações (LACAZ; PORTO; HEINS- VACCARI, 1998; NEUFELD, 1999).

Na reprodução sexuada são formados dois tipos principais de esporos cuja origem, forma, tamanho e coloração variam consideravelmente (SIDRIM; ROCHA, 2010).

Os fungos filamentosos e leveduriformes podem produzir esporos sexuados denominados basidiósporos e ascósporos (SILVA, 2006). Os basidiósporos são formados no exterior de células especializadas chamadas de basídias e os ascósporos são produzidos no interior de estruturas saculiformes conhecidas com ascos (DUARTE, 2018). Envolvendo ascos e ascósporos podem ser ainda formadas estruturas de frutificação denominadas de ascocarpos (WEBSTER, 2007). De acordo com a morfologia e modo de comunicação com o meio externo, esses ascocarpos podem ser divididos em cleistotécios e gimnostécios que são estruturas globosas e fechadas, peritécios que são estruturas piriformes e ostioladas e apotécios que são estruturas em forma de taça onde os ascos e ascósporos ficam totalmente expostos ao meio ambiente (LACAZ, 1998). Outros fungos filamentosos, como aqueles de hifas cenocíticas, tipicamente produzem zigósporos (KERN; BLEVINS, 1999; NEUFELD, 1999; SIDRIM, 2004; SILVA, 2006).

Na reprodução assexuada, também são encontrados dois tipos principais de esporos (SILVA, 2015). Os fungos de hifas septadas demáceas ou hialinas produzem esporos conhecidos com conídios que se desenvolvem no exterior de

células especializadas denominadas de células conidiogênicas (ZAITZ, 2017). Essas células são estruturas formadas e sustentadas por hifas reprodutivas chamadas de conidióforos que são elementos filamentosos produzidos diretamente sobre o micélio (NEUFELD, 1999). Os conidióforos podem ser morfológicamente mais complexos dando origem a estruturas assexuadas denominadas de Sinêmios, esporodóquios, soros e acérvulos e picnídios em cujo interior são produzidos os conídios (HIBBETT, 2007). No grupo dos fungos de hifas asseptadas, os esporos formados são chamados de esporangiósporos (LACAZ, 1991). Esses esporos assexuados são produzidos no interior de estruturas globosas ou alongadas denominados de esporângios (ZAITZ, 2017). Como nas células conidiogênicas, os esporângios são formados e sustentados por outras hifas reprodutivas conhecidas como Esporangióforos que são também produzidos diretamente sobre o micélio (LACAZ, 2002). No caso dos fungos leveduriformes, a reprodução assexuada ocorre fundamentalmente por gemulação ou brotamento (ARENAS, 2008). Os esporos produzidos nesse tipo de reprodução são denominados de blastósporos (MCGINNIS, 2012). Além de esporos, uma estrutura filamentos a chamada de pseudohifa pode ser formada no processo de gemulação (ARENAS, 2014). Na verdade, as pseudohifas são constituídas por gêmulas que não se separaram e que, por isso, formam, de maneira característica, uma estrutura em cadeia (TORTORA; FUNKE; CASE, 2004). Cissiparidade ou divisão binária e broto fissão são outras formas de reprodução encontradas em leveduras (ALMEIDA, 2003).

Algumas estruturas de propagação podem ser ainda formadas por um mecanismo assexuado chamado de fragmentação do talo (SIDRIM; MOREIRA, 1999). Os esporos produzidos dessa forma são denominados de artrósporos ou artroconídios (FISHER; COOK, 2001; KERN; BLEVINS, 1999; SILVA; NEUFELD, 2010). Após a fragmentação de segmentos da hifa septada, os artrósporos são então liberados para o meio ambiente através de um processo de fragmentação e desarticulação (QUINDÓS, 2015). Do mesmo modo, também a partir do próprio micélio ou da célula de levedura, podem ser produzidas estruturas denominadas de clamidósporos (KIBBLER, 2017). Essas estruturas têm uma forma arredondada, paredes espessas, conteúdo citoplasmático rico, posição terminal ou intercalar na hifa vegetativa e funcionalmente agem como elementos de resistência (KIBBLER, 2017).

Outro tipo particular de propágulo, são os chamados balistósporos que depois de formados são violentamente expelidos para o meio exterior (SILVA, 2014). Esses esporos são produzidos tanto por fungos filamentosos quanto por leveduriformes (BONIFAZ, 2015).

A morfologia das estruturas reprodutivas é bastante variada e apresenta grande importância para a identificação fúngica, pois as diferenças morfológicas dos elementos de reprodução são utilizadas para separar gêneros e espécies (ARORA;2014). A taxonomia e a nomenclatura dos fungos obedecem às regras internacionais que regem a classificação dos outros seres vivos (ENE, 2014).

Assim, são empregadas as mesmas unidades taxonômicas (reino, filo, classe, ordem, família, gênero e espécie) e a denominação binominal específica (HEITMAN, 2011). O reino *Fungi* é formado pelos seguintes filios: Basidiomycota, Ascomycota, Zygomycota e Chytridiomycota (DUARTE, 2017). Resumidamente, o filo Basidiomycota apresenta micélio septado ou células de levedura e esporo sexuado do tipo basidiósporo formado sobre basídias (ARENAS, 2014). O Ascomycota apresenta micélio septado ou células de levedura e esporo sexuado do tipo ascósporo formado no interior de ascos, o Zygomycota apresenta micélio asseptado e esporo sexuado (zigósporos) e assexuado (esporangiósporo) formado dentro de esporângios e o Chytridiomycota apresenta micélio asseptado ou estrutura unicelular e esporo assexuado flagelado-zoósporo (HEITMAN, 2011). A ancestralidade e o grau de parentesco, bem como a morfologia das estruturas de reprodução sexuada são a base da classificação fúngica (NEUFELD, 1999). Aqueles fungos cuja reprodução sexuada é desconhecida ou inexistente não são incluídos nesse sistema (KIBBLER, 2017).

Esses fungos são denominados ordinariamente de fungos anamórficos, independentemente de sua origem filogenética (BARON, et al., 2013). Na realidade, o termo anamórfico não corresponde a uma classificação taxonômica, mas sim a uma designação sob a qual estão agrupadas as formas assexuadas de alguns fungos Basidiomycota e Ascomycota (KOZEL; WICKES, 2013). Outros organismos tradicionalmente estudados pela micologia médica são atualmente classificados nos reinos *Protozoae Chromista*, tendo em vista os resultados obtidos pela taxonomia molecular (BARROSO; MELICO-SILVESTRE; TAVEIRA, 2014).

Como a classificação dos fungos está apoiada na micromorfologia das estruturas reprodutivas, e alguns fungos podem apresentar os dois tipos de

reprodução, muitos desses organismos poderão exibir duas denominações taxonômicas, uma em função da morfologia sexuada e outra em função da morfologia assexuada (BONIFAZ, 2015). Isso ocorre porque as estruturas de reprodução sexuada e assexuada são morfologicamente distintas (WEBSTER, 2007). Desse modo, um mesmo fungo poderá ser conhecido pelo seu nome sexuada (teleomórfico) ou pelo seu nome assexuada (anamórfico) (ZAITZ, 2017). Contudo, na prática clínico-laboratorial, os fungos são tratados mais frequentemente por sua designação anamórfica, por ser essa mais frequentemente encontradas em infecção (MARTINEZ; MORENO; ROCHA, 2005).

Em micologia médica, uma classificação não-taxonômica orientada segundo a doença fúngica pode ser útil. Nesse esquema (apresentado no quadro 01), os fungos são agrupados em cinco grandes categorias: micoses superficiais, micoses cutâneas, micoses subcutâneas, micoses sistêmicas ou invasivas e oportunistas (PEMÁN; MARTÍN-MAZUELOS; CALVO, 2007). As micoses superficiais são processos limitados principalmente aos pelos (KERN; BLEVINS, 1999). As micoses cutâneas estão restritas a pele e seus anexos e membranas mucosas, não invadindo os tecidos profundos ou órgãos internos (MACGOWAN, 2011). As micoses subcutâneas estão ligadas ao tecido subcutâneo profundo com eventuais disseminações para outros órgãos, sendo a pele o órgão mais acometido secundariamente (MCGINNIS, 2012). As micoses invasivas são processos que acometem tecidos e órgãos internos, produzindo variado quadro anátomo-clínico (RIERA; CELI; THOMPSON, 2017). As micoses oportunistas, na verdade, podem ser estabelecidas para qualquer infecção micótica, pois o carácter oportunista é uma condição do organismo hospedeiro favorecendo a colonização/infecção (OSTROSKY-ZEICHNER, 2012).

Quadro 01 – Resumo das doenças fúngicas e seus sítios de ação

<b>Tipos de Infecções</b>	<b>Tecidos envolvidos</b>	<b>Agentes Fúngicos</b>
Superficiais	Camada externa da pele e dos cabelos / pêlos	<i>Exophiala, Malassezia, Trichosporon</i>
Cutâneas	Unhas, pele e cabelos (locais queratinizados) e membranas mucosas	<i>Trichophyton, Microsporum, Epidermophyton</i>
Subcutâneas	Músculos, ossos e tecidos conjuntivos e pele (secundariamente)	<i>Sporothrix, Cladosporium, Exophiala, Fonsecaea</i>
Sistêmicas / invasivas	Qualquer tecido ou órgão (pulmonar, linfático e sistema circulatório)	<i>Histoplasma, Coccidioides, Paracoccidioides</i>
Oportunistas	Qualquer órgão ou tecido	<i>Aspergillus, Rhizopus, Mucor, Candida.</i>

### 3.2. Infecções fúngicas

A capacidade dos fungos em causar infecção parece ser um fenômeno acidental, pois esses organismos são fundamentalmente decompositores, apresentando baixíssima patogenicidade (KAVANAGH, 2017). Por isso, os processos fúngicos estão primariamente relacionados ao grau de comprometimento imunológico do hospedeiro e à exposição ambiental (KIBBLER, 2017). Como solo e vegetais são os principais reservatórios fúngicos, a maioria dessas infecções são contraídas a partir de fontes na natureza e o contágio entre indivíduos é menos frequente (BROWN et al., 2012).

Normalmente, as principais vias de infecção são a inalação de elementos fúngicos em suspensão no ar e o traumatismo por corpos vulnerantes de natureza vegetal (PFALLER; PAPPAS; WINGARD, 2017). Contudo, de forma ocasional, o homem e os animais podem ser fonte de infecção cutâneo-mucosa (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014).

Caracteristicamente, a infecção fúngica ocorre pela associação de diversos fatores biológicos (LIN et al., 2015). Para produzir infecção, o agente fúngico deve possuir a habilidade de crescer a temperatura de 37° C, aderência e colonização de superfícies e órgãos, alteração fenotípica e dimorfismo, produção de toxinas e

enzimas, interação com hormônios e metabolismo de metais pesados (LACAZ, 2002). Além disso, são também fatores de patogenicidade fúngica a formação de cápsulas e produção de melanina (KOZEL; WICKES, 2013). Por sua vez, a proteção do hospedeiro contra as infecções fúngicas inclui a barreira física fornecida pela pele e membranas mucosas íntegras, níveis de pH, competição da microbiota por espaço e nutrientes, secreções naturais e mecanismos de remoção ciliar, natureza sexual e *status* hormonal, sequestro de ferro, resposta inflamatória com ação de células dendríticas, neutrófilos, macrófagos e citosina e imunidade celular mediada por linfócitos T (OSTROSKY-ZEICHNER, 2012).

Na realidade, por muito tempo, os fungos foram considerados patógenos de importância relativa (RUSSEL; PATERSON; LIMA, 2016). Os agentes e as formas clínicas eram classicamente conhecidas, as técnicas de diagnóstico e tratamento atendiam à demanda e a incidência de infecções fúngicas na população geral era baixa, especialmente quando se tratavam de casos sistêmicos e fatais (SILVA, 2014). Contudo, nos últimos anos, a frequência de infecções invasivas aumentou de maneira substancial e o espectro dos agentes etiológicos passou a apresentar alterações (BARROSO; MELICO-SILVESTRE; TAVEIRA, 2014). O principal determinante de mudanças no padrão epidemiológico das doenças fúngicas foram os avanços na tecnologia médica (QUINDÓS, 2015). A melhoria das técnicas de diagnóstico e de suporte e tratamento, apesar de oferecerem novas possibilidades terapêuticas e aumentarem a expectativa de vida, frequentemente comprometem a condição imunológica dos pacientes hospitalizados (KIBBLER, 2017). Em decorrência disso, as infecções fúngicas oportunistas surgiram como complicações iatrogênicas, nesse grupo de pacientes, que se tornou a principal população de risco (MICELI, 2011).

Uma variedade de fatores predisponentes associados a procedimentos médicos e processos de base tem sido reconhecida (COLE et al., 2017). Alterações na função e número de neutrófilos e outras células fagocitárias podem ser produzidas por radioterapia, quimioterapia, corticoterapia e terapia com imunossupressores (DUARTE; DENNING, 2017). Mucosites e destruição de epitélio desencadeadas por radioterapia e quimioterapia podem favorecer a translocação fúngica a outros sítios anatômicos (OSTROSKY-ZEICHNER, 2012). Da mesma forma, cateterização, nutrição parenteral, cirurgias abdominais, antibioticoterapia de largo espectro e colonização prévia podem facilitar a rota de infecção (KIBBLER,

2017). Comprometimentos do sistema imunológico podem ser também causados por doenças degenerativas, neoplasias sólidas e hematológicas, AIDS e má-nutrição (LIMPER et al., 2017). Outros importantes fatores de risco são transplantes de órgãos e medula óssea, diálise peritoneal e hemodiálise, ventilação assistida, tempo de hospitalização e, em neonatologia, prematuridade e baixo peso ao nascimento (YAMAGUCHI, 2018).

Normalmente, as infecções fúngicas invasivas em pacientes hospitalizados são graves, progressivas, refratárias à terapêutica e de diagnóstico difícil (DUARTE; DENNING, 2017). Com frequência, os sinais e sintomas de infecção invasiva são inespecíficos e testes micológicos convencionais podem não ser suficientes para o diagnóstico (KIBBLER, 2017). Todavia, mais recentemente, um conjunto de definições tem sido empregado para a diferenciação clínica dos processos patológicos (ZAITZ, 2017). Três elementos principais representados pelos fatores relacionados ao hospedeiro, fatores clínicos e fatores microbiológicos estão na base dessas definições (BARON et al., 2013). Associados à amostra clínica, esses fatores permitem o estabelecimento de níveis de probabilidade de infecção (COLE, 2017). Nesse contexto, infecções provada, provável e possível foram definidas. Na infecção provada, todos os fatores estão presentes e pela demonstração tecidual e isolamento em cultura do agente fúngico, essa categoria encerra o mais alto grau de certeza, sendo o diagnóstico dos processos invasivos obtido de forma definitiva (KIBBLER, 2017). Na infecção provável, há também a presença dos três fatores com a exceção da demonstração tecidual e isolamento em cultura do patógeno fúngico (DUARTE; DENNING, 2017). No caso das infecções possíveis, o fator clínico ou o fator microbiológico está ausente e também não há demonstração tecidual e cultura fúngica (COLE et al., 2017). Pacientes dessas duas últimas categorias são frequentemente febris, a despeito da antibioticoterapia de largo-espectro, e podem ter um foco potencial de infecção (LIMPER et al., 2017).

Protocolos de quimioterapia antifúngica profilática, empírica ou específica podem ser estabelecidos com base nesses níveis de probabilidade de infecção que têm como objetivo principal a diminuição dos percentuais de falhas terapêuticas e resistência microbiana (YAMAGUCHI, 2018).

## 4. LABORATÓRIO DE MICOLOGIA MÉDICA

### 4.1. Espaço físico

Os laboratórios de diagnóstico micológico precisam ser projetados privilegiando eventuais mudanças futuras, permitindo uma otimização por conta de uma alteração de procedimento ou necessitando de uma ampliação de espaço físico e, dessa forma viabilizando um aumento de produtividade (ALADOS, 2010; BRASIL, 1995; CLSI, 2013; OPLUSTIL et al., 2010).

Requisitos básicos devem ser previstos em um planejamento de laboratório de micologia clínica com o objetivo de proporcionar uma correta adequação física (BARREIRO; MAYNOU, 2008). Entre esses requisitos estão, a exigências em relação a minimizar possibilidades de contaminação cruzada, temperatura ambiental apropriada e controlada, ventilação adequada, iluminação, sinalização, nível de contenção, cuidados ergonômicos, conforto acústico e um programa de incêndio (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013; CLSI, 2012). Sendo, portanto, importante a criação de uma planta segregada e individualizada, podendo possuir um laboratório geral como apoio, caracterizando algumas necessidades a serem instituídas (ASSOCIACAO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2005; 2013).

Não obstante a esses fatos estruturais para que o funcionamento ocorra de forma plena e dentro da legislação, o cumprimento de uma série de exigências documentais se faz necessário. Par tanto, as resoluções da ANVISA (Agencia Nacional de Vigilância Sanitária) devem ser utilizadas como marco legal, dentre essas, devem ser consultadas:

- RDC N°050/02 – documento destinado ao planejamento, elaboração, avaliação e aprovação de projetos físicos de estabelecimento de saúde;
- RDC N°302/05 – funcionamento de laboratório clínicos;
- RDC N°222/18 – Gerenciamento de resíduos;
- RDC N°063/11 – Boas práticas de funcionamento para serviço de saúde;
- RDC N°011/12 - Funcionamento de laboratórios analíticos...

Um outro condicionante importante é a instituição de Normas de biossegurança para atender aos profissionais de laboratório diretamente associado a atividades de diagnóstico e ao pessoal de apoio (BARBOSA et al., 2015).

É de fundamental importância que o projeto de um laboratório de micologia privilegie as questões ligadas a segurança ambiental (BARCELOS; AQUINO, 2017; CARLOS et al., 2009).

Em decorrência disso a segregação de produtos tóxicos, corrosivos e inflamáveis deve ser feita da forma rígida, de acordo com a legislação correspondente (BRASIL, 2006). Como medida de prima ação, é necessário que equipamentos de segurança (lava olhos e chuveiros) estejam facilmente acessíveis e com sinalização adequada para o caso de uma emergência (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2014; BRASIL, 2004; HIRATA; HIRATA - FILHO, 2012).

Os resíduos de serviço de saúde (RSS) necessitam ser observados com rigor e devem ser tratados de acordo com sua natureza, usando como alternativa o recurso de empresas especializadas no descarte, bem como a criação de rede de armazenamento, sendo que é fundamental que o tratamento primário desse material seja realizado no local, pensando inclusive, numa gestão ambiental mais adequada (BRASIL, 2018). É importante que a gerenciamento, tanto interno quanto externo, dos RSS, se faça da forma correta considerando a importância da segregação eficiente da fonte e a orientação para que a disposição final seja apropriada, impedindo que o descarte inadequado produza passíveis ambientais e coloque em risco o meio ambiente e a sociedade (BRASIL, 2018). Todo o processo de descarte e cuidado com os resíduos estão amparados pelo Regulamento e Gerenciamento de Resíduos do Ministério da Saúde e descritos pelas RDC ANVISA N° 222/18 e CONAMA (Conselho Nacional de Meio Ambiente) N° 358/05 (BRASIL, 2018; CONAMA, 2005).

## **4.2. Biossegurança**

Diversas amostras que serão processadas no laboratório estão classificadas em grau de risco aos agentes biológicos, justificando todos os procedimentos de

Biossegurança adotados, possuindo um caráter construtivo, operacional e, até mesmo, informacional (SIMAS; CARDOSO, 2008).

Diante da complexidade dos patógenos é definido o Nível de Biossegurança adotado, visando sempre minimizar a exposição aos agentes infecciosos (BRASIL, 2004; CDC, 2009). Para um laboratório de Micologia clínica, padronizou-se o Nível de Biossegurança II - devido ao fato de a maioria dos fungos isolados serem agentes biológicos do grupo 2 (BRASIL, 2010). Hoje é recomendado que os laboratórios de micologia clínica sejam de Nível de Biossegurança III, por consequência do turismo e da imigração, aumentando os isolados dos chamados fungos emergentes e entre eles agentes dimórficos, como por exemplo, *Histoplasma capsulatum*, e, dessa forma, permitiu-se uma flexibilização em se tratando de possibilidades diagnósticas, já que estes microrganismos fúngicos exigem uma medida de biossegurança maior e o laboratório precisa estar preparado para esses casos especiais (ALADOS, 2010; CARLOS, 2009).

#### **4.3. Documentos de um laboratório de saúde aplicado à micologia**

A estratégia de espaço físico está relacionada ao ambiente necessário para o funcionamento adequado de um laboratório clínico. A RDC 50/02 define ambiente físico como um espaço, dentro das dimensões adequadas proposta pela legislação, para a realização e desenvolvimento de uma atividade específica, como um laboratório de micologia clínica (BRASIL, 2002). Antes da elaboração do espaço físico é necessário a descrição das atividades a que se destine o laboratório, instituído também, nesse conceito, a avaliação de risco e níveis de biossegurança relacionados ao serviço de análise micológica (BRASIL, 2004).

O projeto físico de um laboratório deve ser cumprido de acordo com as exigências estabelecidas na lei, principalmente diante de orientações contidas na RDC 50/2002, documento da Vigilância Sanitária que estabelece conceitos definidos de planejamento, programação, elaboração e avaliação de projetos físicos de estabelecimentos assistenciais de saúde (BRASIL, 2002).

Para a elaboração de um projeto arquitetônico básico de edificações laboratoriais em ambiente público, por exemplo, é necessário que a Lei nº 8.666/93

no artigo 6º seja consultada, pois contém toda a concepção dos sistemas propostos associados à RDC nº50/2002, demonstrando a viabilidade técnica para a elaboração de um empreendimento que não cause nenhum agravo ao meio ambiente, conservando-o da melhor forma possível (BRASIL, 2002; SIMAS; CARDOSO, 2008). Outra recomendação a ser verificada é a RDC nº302 de 13 de outubro de 2005, que junto a RDC nº50/2002 estabelece a existência de uma aprovação a ser feita junto à autoridade local, no que diz respeito à construção, reforma ou adaptação na estrutura física do laboratório clínico, regulamentando todos os laboratórios de saúde, dessa forma, também o laboratório de micologia (BRASIL, 2002, 2005; OPLUSTIL, 2010). Resumidamente, a RDC 302/2005, se refere às Boas Práticas de Laboratório, e a RDC 50/2002, está associada para estrutura física (BRASIL, 2002, 2005).

Em vista disso, diversos documentos precisam ser analisados em conjunto para que um laboratório de micologia venha a ser planejado conforme a legislação, atendendo assim todos os requisitos legais para seu funcionamento (BRASIL, 2005). De acordo com Manual de Diretrizes para Projetos Físicos, um projeto de laboratório deve seguir, basicamente, os seguintes documentos, além dos já comentados anteriormente, (BRASIL, 2004):

- NBR 6.492- representação de projetos arquitetônicos
- NRB 13.532 – Projetos de Edificações
- NBR 14.100 – Proteção contra incêndio
- NBR 9050 – Adequação das edificações e do mobiliário urbano para pessoas portadoras de deficiência.
- NBR 5261 – Símbolos gráficos de eletricidade – Princípios gerais para desenho de símbolos gráficos;
- NBR 7191 – Execução de desenhos para obras de concreto simples ou armado;
- NBR 7808 – Símbolos gráficos para projetos de estrutura;
- NBR 14611 – Desenho técnico- representação simplificada em estruturas metálicas;
- Portaria nº 3.214 da lei nº 6.514 de 22/12/77 – Ministério do Trabalho e suas normas regulamentadoras
- Lei nº8666/93 – Lei de licitações e contratos

- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) – NBR 10152 / NBR 5413 NBR 12179 / NBR 13534 / NBR 13434-2 / NBR 7256/ NBR ISO/CIE 8995-1 NBR -16291/14.

Todas essas orientações permitem atender às determinações no que se refere a planejamento, programação, elaboração e avaliação de projetos físicos de um laboratório e também às Boas Práticas de Laboratórios Clínicos (BPLC), que é um conjunto de Normas que garantem a eficácia de todos os processos executados conforme as recomendações dos órgãos fiscalizadores, garantindo assim ações adequadas das atividades laboratoriais em todos os seus aspectos (BRASIL, 2002; SES-RJ,1998).

#### **4.4. Objetivos do Laboratório de Micologia**

O objetivo do laboratório de micologia clínica é determinar a etiologia dos agentes fúngicos, causadores de infecção, fazendo a correta identificação, de forma rápida e efetiva, através da execução de procedimentos que identifiquem esses microrganismos (BIANCHI et al., 2017).

Resumidamente temos como princípios:

- Realizar exames relacionados à identificação e isolamento de espécimen fúngica e liberação de laudo técnico;
- Detecção rápida e eficiente de um isolado fúngico e determinar o envolvimento como um agente patogênico ou contaminante;
- Atividades de ensino e pesquisa (curso, treinamentos, atividades técnico-científica e pesquisa relacionadas à micologia clínica).

#### **4.5. Escopo do Laboratório de Micologia**

Como mencionado, a atividade primordial de um laboratório de micologia médica é proceder investigações com vista a pesquisar e identificar os agentes fúngicos nas amostras clínicas (GARDEWEG, 2012).

Um escopo para a implantação do laboratório de micologia clínica pode ser constituído tendo como princípio a execução dos seguintes procedimentos, segundo documento Programação Arquitetônica de Unidades Funcionais de Saúde, do Ministério da Saúde (2014):

- Biossegurança
- Controle de qualidade dos meios de cultura;
- Coleta e transporte de espécimens clínicos;
- Processamento de espécimens clínicos fúngicos;
- Exames microscópicos buscando identificar a presença de estruturas fúngicas;
- Avaliação de culturas (características macroscópicas dos fungos);
- Liberação de laudos, anotações técnicas e atividades administrativas
- Manutenção e controle de culturas fúngicas em estoque (micoteca);
- Esterilização dos equipamentos utilizados e material de cultura a ser descartado, conforme preconiza a RDC 222/18.
- Pesquisa científica e desenvolvimento profissional

#### 4.5.1. Estratégia de espaço físico

Não há dúvida de que o espaço físico está relacionado às atividades que serão desenvolvidas no laboratório, para atender às exigências da legislação no que concerne à documentação e disposições finais (BRASIL, 2002). A construção desse ambiente fundamenta-se de modo a permitir que todos os procedimentos sejam executados da forma mais organizada e dentro das melhores circunstâncias possíveis (BARREIRO; MAYNOU, 2008).

#### 4.5.2. Características gerais

É importante que o laboratório de micologia clínica tenha uma adequada separação física dos outros laboratórios e a acessibilidade seja por meio de portas duplas com sinalização, indicando que existe um potencial risco biológico, restrição de acesso e outras informações que limitam a presença de pessoal não autorizado (ALADOS, 2010).

#### 4.5.3. Dimensão

O critério para a dimensão, considerando a recomendação da RDC N°50/02, deve levar em conta o volume de análises a serem realizadas bem como a circulação do corpo técnico, pessoal administrativo e visitantes (BARCELOS; AQUINO, 2017; BRASIL, 2002). Por conseguinte, sugere-se que a área total para toda a atividade laboratorial geral de análises clínicas seja cerca de 14 m<sup>2</sup>, sendo que para um laboratório de micologia, são suficientes 6m<sup>2</sup>(ALADOS, 2010; BRASIL, 2002). Também, de acordo com o documento da ANVISA sobre Projetos Físicos, para o caso dos serviços específicos, como um laboratório de Micologia, a orientação é de 6m<sup>2</sup> de área mínima e de 16,20 m<sup>2</sup> de área média (BRASIL, 1994, 2004). As bancadas e mesas devem possuir uma superfície de 0,50 x 1,60 metros, altura de, aproximadamente 90 cm, permitindo que o trabalho seja realizado em pé ou sentado além de possibilitar equilíbrio e comodidade aos funcionários, possuir pia de lavagem e boa iluminação (BARCELOS; AQUINO, 2017; BRASIL, 1994, 2002) Bancos e cadeiras devem possuir largura de 40 cm, profundidade de 38 a 42 cm, devendo ser reguláveis e ainda estarem em local de fácil manuseio e serem de fácil limpeza e manutenção (BRASIL, 2002).

Também de acordo com a RDC 50 (2002), pisos, revestimentos e paredes (lisas e com cantos arredondados) precisam ser de fácil limpeza e higienização, o teto deve ser resistente a lavagem e também ao uso de desinfetante, o ambiente

apresentar uma climatização adequada (não pode haver recirculação de ar exaurido) e possuir uma correta sinalização (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2005; BRASIL, 1994, 2002). As dimensões das janelas devem respeitar o mínimo de 120 cm x 80 cm e com altura mínima de 270 a 300 cm do teto (BRASIL, 2002).

Importa mencionar que os laboratórios que desenvolvem atividades acadêmicas e de pesquisa requerem uma extensão na sua projeção (BRASIL, 1994, 2002).

#### 4.5.4. Controle do ar

O laboratório deve ter o ambiente controlado, onde a purificação e descontaminação seja feita por meio da utilização de filtros HEPA, (High Efficiency Particulate Air), regulamentado pela NBR 7256 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2005). O sistema deve ser independente, mantendo a circulação do ar de forma adequada. De preferência, o laboratório deve possuir pressão negativa, retirando o ar com pressão controlada de forma que ele não escape e, dessa forma, obter uma maior proteção do profissional diante das amostras fúngicas que estão sendo manipuladas (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2005; ALADOS, 2010). O índice de temperatura deve estar entre 20°C e 23°C, a velocidade do ar não deve ser superior a 0,75m/s e a umidade relativa do ar, deve ser inferior a 40% (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2005).

#### 4.5.5. Iluminação e instalações hidráulicas e sanitárias

Uma iluminação adequada condiciona um ambiente confortável permitindo que as tarefas sejam feitas com mais segurança possível (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2013). A Norma NBR-ISO 8995 estabelece

que um ambiente com luminosidade apropriada tem como consequências, conforto visual para os trabalhadores (impactando positivamente na produtividade) e aumento na segurança, permitindo observar com clareza possíveis perigos e riscos (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2013). Todavia, consequências negativas relacionadas com uma iluminação imprópria incluem: ofuscamento, fadiga visual, ambiente intedioso gerando alterações na produção (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2013). O nível de iluminamento para um ambiente geral é de 150 a 300 lux e para a mesa de trabalho, é considerado 300 a 750 lux (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 1992). O aproveitamento de luz natural, sem que haja incidência do sol sobre a bancada e equipamentos deve ser observado junto a luminosidade do ambiente, que deve estar de acordo com a refletância (o que é refletido numa superfície), podendo instituir como as mais úteis para ambiente interno as seguintes faixas de refletância, conforme quadro abaixo (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 1992):

Quadro 2: Faixas de refletância para ambientes internos

Teto	0,6 – 0,9 %
Paredes	0,3 – 0,8 %
Planos de trabalho	0,2- 0,6 %
piso	0,1 – 0,5 %

*Fonte: NBR-ISO 8995*

A Norma Brasileira ABNT 5410 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2008) pode ser consultada para o caso de instalações elétricas de baixa tensão. A NBR 13534 trata de instalações em Estabelecimentos Assistenciais de Saúde. Nela estão as preposições quanto ao adequado tratamento destinado a toda parte elétrica (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 1995).

A disposição hidráulica vai ser de acordo com a estrutura do laboratório (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 1992). É necessário que seja desenvolvido um estudo básico das instalações hidráulicas e sanitárias, estando de acordo com as proposições preliminares da estrutura física adotadas para a criação do laboratório (BRASIL, 1994). De acordo com o documento da ANVISA, (2004) o laboratório de micologia clínica deve possuir água fria, lavatório para as mãos (pia) e ter a coleta e afastamento de efluentes diferenciados, sendo considerado um condicionante ambiental.

#### 4.5.6. Conforto acústico

O laboratório de micologia e, laboratórios clínicos em geral, é um ambiente onde há exigência de constante atenção (BRASIL, 2002). Para a instituição de conforto acústico a NBR 10.152, que trata dos níveis de ruído, e a NBR 12.179, que tem como apresentação as definições para tratamento acústico em ambientes fechados, devem ser consultadas (ABNT, 1987, 1992). Em ambientes de laboratório a norma NBR 10.1532 estabelece níveis de ruído situados na faixa entre 40 a 50 dB (A) ou entre as curvas NC 35 e 45 (ABNT, 1992). Para isso, medidas de isolamento devem ser adotadas a fim de evitar que fontes externas não influenciem no ambiente interno, gerando uma propagação do som e causando desconforto aos analistas. Portanto, na estrutura física do laboratório medidas como, revestimento adequado, vedação, esquadrias precisam respeitar o estabelecido na RDC 50/2002.

A NBR 12179 define tratamento acústico como “o processo pelo qual se procura dar a um recinto, pela finalidade a que se destina, condições que permitam boa audição às pessoas nele presentes (...) este tratamento compreende o isolamento acústico e o condicionamento acústico” (ABNT, 1992). Diante disso, o atendimento a este requisito, no projeto de arquitetura depende da relação entre o laboratório e as fontes de ruído (zoneamento), da geometria do espaço (volume de ar, forma das superfícies) e da correta especificação de materiais de vedação, esquadrias e revestimentos (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS

TÉCNICAS, 1987). Dessa forma, a própria legislação estabelece que o projeto arquitetônico precisa manter o profissional isolado das fontes de ruídos que possam atrapalhar a natureza das atividades por eles desenvolvidas a partir de limites estabelecidos internacionalmente (COSTA; NIEMEYER, 2010), (BRASIL, 2002).

#### 4.5.7. Protocolos de Incêndio e sinalização de segurança

Sempre considerando o cumprimento das normativas para que o projeto seja o mais eficiente e claro possível, um quesito importante a ser contemplado no princípio de elaboração de um espaço físico é a questão do risco de incêndio e sua sinalização adequada. A NBR 13434-2 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2004) é a referência a ser consultada para esse assunto. Nela estão as informações referentes aos procedimentos a serem adotados em casos de incêndio e o reconhecimento das sinalizações e tipos de alerta (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2004).

#### 4.5.8. Equipamentos

Os equipamentos utilizados em um laboratório de micologia são similares ao que se utiliza para o trabalho em bacteriologia, porém a micologia básica / tradicional na maioria dos ambientes laboratoriais necessita de particularidades operacionais e técnicas que muitas das vezes é de baixo custo (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013; CARLOS et al., 2009; CDC, 2009). Uma exigência fundamental, porém, presente também no laboratório de bacteriologia é a utilização de uma CSB classe II para trabalhar com fungos patogênicos primários, porém o estudo de cepas de leveduras não necessita de

tamanho aparato, podendo ser realizado com a utilização de bico de Bunsen, dentro da câmara asséptica, contemplando um bom serviço (CLSI, 2012).

#### 4.5.9. Ergonomia

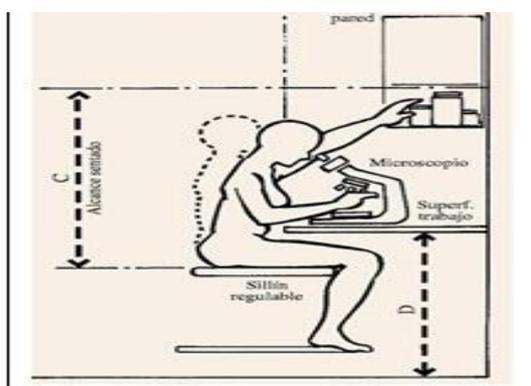
Todo laboratório deve adotar políticas de vigilância às questões sobre o bem-estar do funcionário visando a sua segurança e saúde, por isso, também deve ser incluída as recomendações de cuidados com os riscos ergonômicos (AZEVEDO, 2002; ROJO-MOLINERO et al., 2014). De acordo com Santos (1997 apud Azevedo, 2002, p.36), a Ergonomics Research Society conceitua Ergonomia como um “estudo do relacionamento do homem, ambiente ocupacional e equipamentos e, particularmente, a aplicação do conhecimento de Anatomia, Fisiologia e Psicologia aos problemas decorrentes”. Esse conceito demonstra a percepção dos riscos relacionados à ausência de condutas referentes aos agravos causados pelo seu negligenciamento ergonômico (AZEVEDO, 2002; DA SILVA, 2010). Dessa forma, fica compreendido que a atenção ergonômica deve ser considerada, a partir de um trabalho conjunto, envolvendo o homem, a organização e o ambiente gerando uma preocupação integral no que se refere à execução de políticas de cuidado com o conforto e a saúde dos trabalhadores (BÉRASTÉGUI et al., 2018; DA SILVA, 2010). Em se tratando de riscos de doenças ocupacionais, causadas pela fadiga física devido ao descaso ergonômico, é percebido que quando essa condição protetiva é corretamente executada, a consequência é uma maior qualidade e produtividade, tudo em vistas ter sido garantido o bem-estar físico, mental e social do profissional (BRASIL, 2007; LYNNE; PAULA; HAIDUKE; MARQUES, 2016).

Existe uma padronização referente ao plano de trabalho que deve ser seguido de forma rigorosa, buscando o bem-estar pessoal impactando o menos possível na sua atividade laboral (BRASIL, 2007). O desenho de um laboratório deve seguir as recomendações presentes no item dimensões, conforme estabelecido na RDC 50/2002, para que não ocorram agravos resultantes da não adesão às orientações estruturais (LYNNEA, 2016). Além disso, é importante que,

para fins ergonômicos, algumas outras questões, quanto a regulação para assentos, ajustada de acordo com a estatura e a função que está sendo exercida, encosto com conforto para a região lombar, e caso o profissional tenha dificuldades por conta da altura, deve ser disponibilizado apoio para os pés, adaptados ao comprimento da perna, dessa forma, permitindo manter a planta dos pés apoiado corretamente (AZEVEDO, 2002; BRASIL, 2007). Pensando na atividade profissional, e a mesma sendo realizada de forma sentada (como o trabalho manuseando um microscópio – prática muito comum no laboratório de micologia) ou em pé, medidas devem ser adotadas para cumprir com os requisitos recomendados referentes à ergonomia (ROJO-MOLINERO et al., 2014). Quando o profissional está em pé a posição implica numa área de trabalho de 95 cm (no máximo) e esse plano deve respeitar a ordem de 5-10 cm por debaixo do cotovelo (ROJO-MOLINERO et al., 2014).

Uma atitude a ser adotada para que haja uma diminuição dos riscos referentes ao cansaço ao se trabalhar sentado por muito tempo é o intervalo periódico recomendado de 10 minutos por hora que deve ser acompanhado de exercícios de relaxamento muscular (CARLOS et al., 2009). Quando o procedimento é realizado sentado (manuseando um microscópio, por exemplo), medidas importantes referentes a postura e proximidades aos objetos utilizados devem estar de acordo com a figura abaixo:

Figura 1 - Posição ergonômica adequada



Legenda: A- zona de atividade - 70cm;  
 B- Largura da mesa – 60cm;  
 C- Alcance sentado – 100 cm  
 D- Altura da mesa – até 90 cm

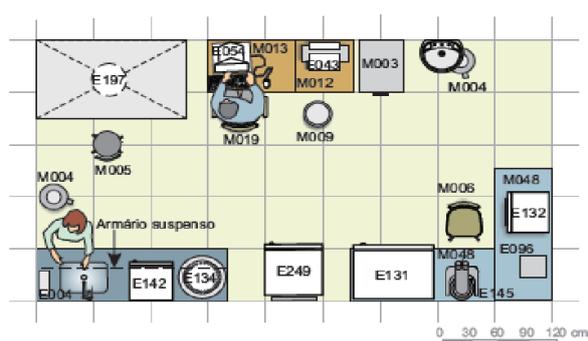
## 4.6 Áreas de apoio

É muito importante que dentro de um projeto de laboratório seja incluído uma área destinada para utilização administrativa, uma sala de espera, sala de reuniões, sala de estudo, vestuário, descanso..., ficando isolado da área técnica, permitindo não haver riscos relacionados a natureza do laboratório (ALADO, 2010). Todas as áreas devem respeitar as normas relacionadas às instalações e condições ambientais, conforme quadro 3 abaixo (BARREIRO; MAYNOU, 2008; CARLOS et al., 2009).

De acordo com a RDC 50/2002, os parâmetros sugeridos de áreas médias para os diversos ambientes de apoio são (BRASIL, 2002):

- Área para registro de pacientes, incluindo sala de espera: 24 m<sup>2</sup>
- Depósito de material de limpeza: 2 m<sup>2</sup>
- Sala de esterilização de material: 4 m<sup>2</sup>
- Sala de administração: 15m<sup>2</sup>
- Sanitários: 5 m<sup>2</sup>
- Sanitários para pacientes especiais: 10 m<sup>2</sup>

Figura 2. - Modelo de um laboratório de Micologia Médica e seus equipamentos.



<b>E004</b> - Analisador automático para hematologia	<b>E249</b> - Refrigerador laboratorial
<b>E043</b> - Impressora	<b>M003</b> - Arquivo tipo gavetas
<b>E054</b> - Microcomputador	<b>M004</b> - Balde cilíndrico porta detritos com pedal
<b>E096</b> - Balança analítica	<b>M005</b> - Banqueta giratória/mocho
<b>E131</b> - Estufa de secagem	<b>M006</b> - Cadeira
<b>E132</b> - Autoclave vertical	<b>M009</b> - Cesto de lixo
<b>E134</b> - Centrífuga de mesa	<b>M012</b> - Mesa para impressora
<b>E142</b> - Estufa bacteriológica	<b>M013</b> - Mesa para microcomputador
<b>E145</b> - Microscópio biológico binocular	<b>M019</b> - Cadeira giratória com braços
<b>E197</b> - Capela de fluxo laminar	<b>M048</b> - Mesa de trabalho em aço inox

Fonte: Ministério da Saúde, 2011

Quadro 3 - Programação física de um laboratório de Micologia Médica

AMBIENTE	MÓVEIS	EQUIPAMENTOS	INSTALAÇÕES	OBSERVAÇÕES
ATENDIMENTO(RECEPÇÃO) DE AMOSTRAS E ADMINISTRATIVO	ESTANTES, MESA, ARMÁRIOS E BANCADAS	COMPUTADOR E GELADEIRA	TELEFONE, AR CONDICIONADO	--
ÁREA TÉCNICA – CULTIVO	BANCADAS, ESTANTES	GELADEIRA, BICO DE BUNSEN, ESTUFAS, AGITADORES, BANHO MARIA, AGITADORES E CSB	AR CONDICIONADO, GAS, AGUA FRIA, ELETRICA EMERGENCIAL	--
ÁREA TÉCNICA- MICROSCOPIA	BANCADAS E ESTANTES	MICROSCÓPIO E LUPA ESTERIOSCÓPICA	AR CONDICIONADO	--
AREA TÉCNICA- LIMPEZA	BANCADA COM CUBA PROFUNDA, ARMÁRIOS E ESTANTES	AUTOCLAVES, ESTUFAS	EXAUSTOR, AGUA FRIA, AGUA DEIONIZADA/DESTILADA	A DESCONTAMINAÇÃO PODE SER FEITA EM OUTRO LUGAR
ARMAZENAMENTO	ESTANTES E PRATELEIRAS	FREEZER -20C° E -70°C, GELADEIRAS	ELETRICA EMERGENCIAL, AR CONDICIONADO	GUARDAR CEPAS, SOROS. FUNCIONAMENTO 24 HORAS

## 5. BIOSSEGURANÇA EM MICOLOGIA MÉDICA

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2013) a Biossegurança é o conjunto de ações voltadas para a prevenção, minimização ou eliminação de riscos inerentes às atividades de pesquisa, produção, ensino, desenvolvimento tecnológico e prestação de serviços. Riscos que podem comprometer a saúde do homem, dos animais, do meio ambiente ou mesmo a qualidade dos trabalhos desenvolvidos.

As medidas de precaução relacionadas à biossegurança devem estar bem instituídas no laboratório, já que os microrganismos podem se tornar agentes de importantes infecções (RICHMOND, 2004). É necessário cuidado e atenção no momento da manipulação dos agentes porque os agravos produzidos podem ser de difícil controle e resolução pelo sistema laboral (WHO, 2014).

Em termos de morfologia, os fungos são organismos tipicamente filamentosos ou unicelulares (SILVA; ZAROR, 2015). Os fungos filamentosos crescem sob a forma de micélio (conjunto de hifas) e em certas condições ambientais produzem seus esporos (conídios ou esporangiósporos), ou ainda fragmentam e desarticulam suas hifas formando os artroconídios (DUARTE, 2018). Estes elementos fúngicos são facilmente dispersos no ar e podem ser inalados, deglutidos ou traumáticamente implantados em hospedeiros suscetíveis, iniciando uma infecção (ROJO-MOLINERO et al., 2014). Assim sendo, manusear amostras biológicas requer alguns cuidados pois, quaisquer materiais provenientes do corpo humano podem conter agentes potencialmente infectantes (SIMAS; CARDOSO, 2008). Igualmente, o manuseio de culturas puras de fungos deve ser realizado sob rigorosa proteção a fim de se evitar o contato com os elementos fúngicos (GERALDINO et al., 2012).

Os profissionais que trabalham em laboratório devem ser treinados periodicamente quanto às práticas de segurança individual e coletiva, para minimizar os riscos de uma infecção adquirida a partir de materiais no laboratório (CLSI, 2013).

Collins (1984) descreve que a exposição aos microrganismos, inclusive os fungos, pode ocorrer por:

- Inalação de partículas fúngicas em suspensão no ar, após derramamento ou quebra de vidrarias ou após remoção de rolhas / tampão de algodão ou tampa de rosca;
- Ingestão de material fúngico por pipetagem com a boca, pela falta de lavagem das mãos após manuseio de culturas e/ou animais infectados;
- Inoculação direta como resultado de acidentes com agulhas, quebra de vidrarias, resultando em contato com a pele e subsequente entrada do organismo através de cortes e arranhões.

Ainda de acordo com Collins (1984), o trabalho com fungos requer certas normas específicas, além das regras básicas para o manuseio de material infectante em laboratório. Como recomendação, têm-se:

- Utilizar tubos com meio inclinado, ao invés de placas de Petri, para fungos patogênicos;
- Desinfecção regular de bancadas, pisos, equipamentos e outros materiais onde são manipulados materiais biologicamente perigosos, diminuindo o risco de uma exposição a esses organismos. Essa descontaminação pode ser feita com hipoclorito de sódio a 5% diluído a razão de 1:10, para obter uma concentração final de 5g de cloro livre;
- No trabalho de campo, deve-se utilizar máscara e luvas em locais onde se suspeita de fungos com risco de transmissão pelo ar;
- Recomenda-se, antes do trabalho prático, prestar atenção para a classificação dada aos fungos, segundo os critérios de risco, contida na Instrução Normativa nº 7 da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio, 2018);
- Fungos das classes de risco 2 e 3 devem ser manipulados em cabines de segurança biológica classe II ou III.

Segundo a CTNBio (2018), os níveis de biossegurança que devem ser adotados no trabalho com microrganismos, segundo a sua classificação de risco são:

- Nível de biossegurança 1: requer procedimentos para o trabalho com microrganismos (classe de risco 1), que normalmente não causam doença em seres humanos ou em animais de laboratório (ex.: *Acremonium strictum*, *Aspergillus ustus*, *Candida guilliermondii*);
- Nível de biossegurança 2: Requer procedimentos para o trabalho com microrganismos (classe de risco 2) capazes de causar doenças em seres humanos ou em animais de laboratório sem apresentar risco grave aos trabalhadores, comunidade ou ambiente. Os agentes não são transmissíveis pelo ar. Há tratamento efetivo e medidas preventivas disponíveis. O risco de contaminação é pequeno (ex.: *Epidermophyton floccosum*, *Cryptococcus neoformans*, *Exophiala jeanselmei*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis*).
- Nível de biossegurança 3: Requer procedimento para o trabalho com microrganismos (classe de risco 3) que geralmente causam doenças em seres humanos ou em animais e podem representar um risco se disseminado na comunidade, mas usualmente existem medidas de tratamento e prevenção. Esses exigem contenção para impedir a transmissão pelo ar (ex.: *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*).
- Nível de biossegurança 4: Requer procedimentos para o trabalho com microrganismos (classe de risco 4) que causam doenças graves ou letais para seres humanos e animais com fácil transmissão por contato individual casual. Não existem medidas preventivas e de tratamento para estes agentes (não existem fungos que requerem NB 4).

De um modo geral, a forma mais comumente relatada de infecções por fungos adquiridas em laboratório é a inoculação acidental ou a inalação de partículas fúngicas (AIRES et al., 2015). Um levantamento extenso sobre infecções adquiridas em laboratórios foi realizado por Sulkin Pike (1951) no qual relataram 1342 infecções adquiridas em laboratórios nos Estados Unidos, no período de 1930 a 1950. Eles constataram que 63 infecções foram causadas por fungos. Em continuação ao levantamento anterior, outro trabalho assinalou 58 infecções causadas por fungos, no período de 1951 a 1965 (PHILLIPS, G. B, 1965). Hanel, Kruzel e Richard (1967) publicaram uma revisão sobre micoses adquiridas em laboratório e das 288 micoses descritas, 108 foram causadas por *Coccidioides*

*immitis*, 81 por *Histoplasma capsulatum*, 8 por *Blastomyces dermatitidis*, 7 por *Sporothrix schenckii* complexo e 84 por dermatófitos. Dos acidentes conhecidos a autoinoculação com agulha e seringa foi a responsável pelo maior número de pessoas infectadas.

Os fungos mais citados nos manuais de biossegurança, com relação aos cuidados com o manuseio, são os patógenos dimórficos: *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Sporothrix schenckii*, além de patógenos emergentes como *Penicillium marneffeii*, *Cladophialophora bantiana*, *C. neoformans*, *Fonsecaea pedrosoi* e *Ochroconis gallopava* (Padhyeet al. 1998). Para Canalli (2010), medidas preventivas devem ser adotadas para minimizar o risco de contaminação. Sendo elas: limitar o acesso ao laboratório; usar roupas protetoras (uniformes, aventais, jalecos, máscaras); retirar o jaleco ou avental antes de sair do laboratório; não usar sapatos abertos; usar luvas; utilizar protetores de face; evitar o uso de lentes de contato; não fumar, não comer e não beber no local de trabalho; não recapear agulhas; não pipetar com a boca; autoclavar todos os resíduos biológicos gerados no laboratório (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013).

Muita atenção também deve ser dada no uso de animais de laboratório (RIGHETTI; VIEIRA, 2012). Importa lembrar que devem ser considerados, ao se iniciar o trabalho, o seguinte: ter adesão dos padrões, às leis e aos regulamentos para cuidado e manutenção de animais de experimentação; Alojamento dos animais em gaiolas com tampas; identificar todas as gaiolas com os dados dos animais e microrganismo inoculado; sacrificar os animais encontrados fora das gaiolas; autoclavar e incinerar as carcaças dos animais; desinfetar com solução de hipoclorito a 1% por cerca de 4 horas antes da limpeza com detergente, ensacar, autoclavar e incinerar (PAIVA;MAFFILI;SANTOS, 2005).

No caso de um acidente envolvendo fungos, as seguintes normas gerais de segurança devem ser cumpridas (McGinnis, 1980):

- Evitar respirar no recinto e deixe a sala imediatamente, fechando a porta;
- Informe ao pessoal do laboratório o ocorrido e não permita a entrada na área contaminada;
- Aguarde por aproximadamente 1h antes de retornar ao recinto para que os aerossóis gerados durante o acidente se depositem;

- Vestir indumentária de proteção e descontamine o local do acidente com hipoclorito de sódio a 5% diluído a 1:10. Deposite o desinfetante ao redor do sítio do acidente, mas não diretamente sobre o derramado para não produzir aerossóis. Colocar papel toalha embebido com desinfetante sobre o derramado e aguarde por 1h.
- Autoclavar todos os materiais contaminados durante o acidente;
- Limpar os equipamentos e acessórios do laboratório com desinfetante;
- Procurar atendimento médico, se necessário.

Medidas básicas de segurança para minimizar os riscos inerentes ao trabalho laboratorial (COSTA et al., 2009).

- Treinamento dos responsáveis pelo gerenciamento de projetos;
- Treinamento constante das pessoas expostas aos riscos;
- Adequação da infra-estrutura laboratorial;
- Publicação e disponibilização de manuais de biossegurança aos laboratórios;
- Organização de Procedimentos Operacionais Padrão (POP);
- Realização de cursos de biossegurança.

## 6. MATERIAL E MÉTODOS DE PESQUISA E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS PATOGÊNICOS

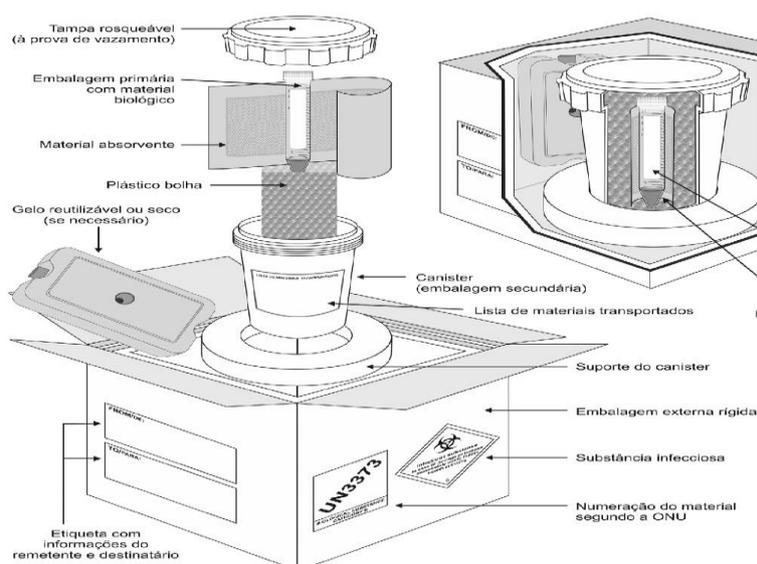
### 6.1. Coleta e transporte dos espécimens clínicos

A coleta e transporte da amostra clínica é uma das etapas mais importantes do processamento micológico (GARDEWEG, 2012). Os processos de obtenção das amostras devem ser adequados para ajudar a identificar o agente fúngico (CUENCA ESTRELLA et al., 2006). É importante que a coleta seja feita efetivamente nas lesões e sítios anatômicos, geralmente partindo de uma suspeita clínica (SALUD, 2007).

Procedimentos de coleta incorretos podem redundar em falhas no isolamento e na caracterização comprometendo o diagnóstico e, por conseguinte, a terapia antifúngica (WINN et al., 2008). É de fundamental importância inquirir o paciente com relação ao uso de produtos, geralmente de forma equivocada, como tentativa de mitigar o conforto das lesões, tendo em vista que o uso dos mesmos podem gerar artefatos ou inviabilizar o diagnóstico (LUQUE et al, 2017). A orientação quanto a proceder na administração de medicamentos, principalmente, tratamentos antimicóticos, prévios a coleta, deve ser procedida, pois o paciente deve ficar um período mínimo de 15 dias (variando de acordo com material a ser coletado) sem utilizar nenhuma substância (PEMÁN; MARTÍN-MAZUELOS; CALVO, 2007). Como uma boa prática de coleta, deve ser procedida, em todas as amostras clínicas, uma antisepsia das lesões com gaze embebida em álcool a 70%, a fim de diminuir a presença de organismos contaminantes (KOZEL; WICKES, 2013). Não deve ser empregado algodão na higienização dos processos fúngicos porque fibras vegetais podem ser introduzidas na amostra clínica como artefatos, mimetizando hifas e confundindo o diagnóstico (SIDRIM; ROCHA, 2010). O transporte do material clínico deve ser feito o mais prontamente possível e deve ter como objetivo precípua a manutenção de sua integridade e qualidade, bem como da viabilidade fúngica (GARDEWEG, 2012). No transporte das amostras, alguns cuidados importantes devem ser considerados: recipientes de transporte devem ser adequados (estéril e

sem conservantes), seguros e mantidos sob refrigeração (4°C), se atrasos forem inevitáveis (BARON et al., 2013; GARDEWEG, 2012). As amostras de material dermatológicos devem seguir em recipientes secos, podendo ser utilizados, envelopes de papel escuro, placas de Petri, entre laminas e outros meios de transporte (GERALDINO et al., 2012). Dependendo também do material clínico pode haver a necessidade de serem conservadas em temperatura ambiente, como no caso de suspeita de fungos dimórficos e dermatófitos, onde a refrigeração pode inviabilizar o isolamento, causando prejuízo na análise micológica (LACAZ, 2002). O deslocamento de material infectante deve seguir rigidamente as normas de biossegurança nacionais e internacionais (BRASIL, 2014). No Brasil a RDC nº20/2014 estabelece os princípios de transporte do material biológico de origem humana, devendo o laboratório de micologia se adequar para cumprir os conceitos apontados com relação ao modo de transporte, que deve ser feito em embalagem adequada, rotulagem, treinamento, biossegurança, saúde do trabalhador e equipe envolvida, tendo como objetivo não gerar agravos a população (BRASIL, 2014).

Figura 3 - Recipiente para transporte de amostras



Fonte: Aires et al. 2015

### 6.1.1. Pelos e cabelos

A coleta de pelos deve ser bem representativa, pois são importantes na suspeita clínica de dermatofitose do couro cabeludo (DIAZ, 2006). Não é necessária limpeza da região a ser coletado o material. Os pêlos devem ser coletados por arrancamento com uma pinça esterilizada selecionando a área e arrancando aproximadamente 10 a 12 fios (SILVA; NEUFELD, 2006). Os pelos que caem, se quebram ou que contenham nódulos são importantes espécimes a serem analisados (CLSI, 2012; PEMAN; MARTIN-MAZUELOS; CALVO, 2007). Os espécimens de couro cabeludo devem incluir o bulbo piloso. Escútuas de *tinea favosa* devem ser também coletadas por arrancamento (GARDEWEG, 2012). No local onde existe exsudato pode ser necessário a utilização de um *swab* para realizar uma coleta representativa (CLSI, 2012; PEMAN; MARTIN-MAZUELOS; CALVO, 2007). Para lesões inaparentes, pode ser utilizada a lâmpada de Wood com a finalidade de se detectar fluorescência esverdeada em pêlos infectados (SILVA; NEUFELD, 2006). É importante ressaltar a utilização de determinados sprays (utilizados pelo paciente) que podem ter fluorescência quando incide luz ultravioleta, falseando o resultado (CLSI, 2012). A técnica da escova de cabelo, que emprega uma escova plástica esterilizada em clorexidina a 1%, por 1 hora, e rinsada em água destilada estéril, e que, após sucessivos escovamentos, é pressionada contra o meio de cultura, e a técnica do quadrado de tapete, que utiliza massagens no couro cabeludo com um pequeno recorte de tapete de 1cm<sup>2</sup>, esterilizado por autoclavação, e que é comprimido contra a superfície do ágar, são outras técnicas usadas na detecção de lesões pilosas inconspícuas (PEMÁN; MARTÍN-MAZUELOS; CALVO, 2007).

### 6.1.2. Pele

O processo de descamação é uma situação natural que tem como objetivo a renovação celular (SIDRIM; ROCHA, 2010). São células epidérmicas que se

desprendem de forma espontânea, podendo esse processo ser exacerbado, devido a uma resposta infecciosa ou inflamatória (CONTI DIAZ; CIVILA; VEIGA, 2002). Os fungos produtores de micoses superficiais e cutâneas estão associados ao extrato córneo e, portanto, essas escamas se tornam um importante material para pesquisar esse microrganismos (MARQUISIO, 2000). As escamas de pele da margem da lesão, locais onde existe uma presença ativa do fungo, devem ser coletadas por raspagem com uma lâmina de bisturi estéril, ou uma cureta dermatológica ou com o vértice cortante de uma lâmina de microscopia esterilizada no calor ou álcool a 70% (SIDRIM; ROCHA, 2010). A área a ser pesquisada deve ser submetida a uma rigorosa antissepsia com álcool a 70% ou soro fisiológico, caso seja uma região exposta (CLSI, 2012). É importante a avaliação das lesões objetivando a busca, sempre que possível, de lesões mais recentes (SANTANA; AZEVEDO; FILHO, 2013). As bolhas e vesículas presentes devem ser totalmente excisadas. Lesões com pouca descamação podem ser coletadas com uma fita adesiva, pressionando a parte gomada contra a pele e puxando, em seguida, firmemente (MINAMI PS, 2003).

É fundamental que a quantidade de material coletado seja bem significativo, oriundo de diversas regiões, aumentando as chances de isolamento do agente fúngico (BARON et al., 2013; QUINDÓS, 2015).

### 6.1.3. Unhas

Necessário uma prévia limpeza com álcool, para evitar a presença de contaminantes e diminuir a sujidade das amostras (BARROSO; MELICO-SILVESTRE; TAVEIRA, 2014). Os espécimens de unha devem ser coletados por raspagem e/ou cortes profundos nas áreas descoloradas, distróficas e quebradiças, empregando a mesma metodologia de coleta das escamas de pele (PEMÁN; MARTÍN-MAZUELOS; CALVO, 2007). Os primeiros 4 a 5 raspados devem ser desprezados, pois esses materiais geralmente são inviáveis e passíveis de grande contaminação inviabilizando a amostra para análise (WALSH; HAYDEN; LARONE, 2018). As falhas de crescimento em culturas de unha são da ordem de 40-50%,

apesar dos elementos fúngicos serem frequentemente detectados à microscopia direta (LUQUE et al., 2017). O uso de levantadores de unha pode ser necessário para a coleta do material subungueal. Nos casos de paroniquias, a coleta ocorre ao redor e por debaixo da unha, e no caso de onicomicoses, as áreas esbranquiçadas são os sítios de escolha para coletar a amostra com maiores chances de recuperar o agente fúngicos (LIMA et al., 2007).

As escamas, pêlos e unhas coletadas podem ser acondicionadas em placas de Petri estéreis ou entre duas lâminas de microscopia (CLSI, 2012). Dessa forma podem ser transportadas também bolhas e vesículas (MACGOWAN, 2011). Os espécimens de pele coletados com fita adesiva podem ser transportados em uma lâmina de microscopia, colando-se a parte gomada da fita sobre o vidro (MINAMI PS, 2003).

#### 6.1.4. Abscessos

O pus contido em abscessos não-drenantes ou tratos sinuosos deve ser coletado, preferencialmente, por punção com seringa e agulha estéreis, com uma prévia limpeza na zona implicada com salina ou álcool a 70% (WINN et al., 2008). O material de abscessos drenantes e fístulas não são recomendados e devem ser coletados com *swabs* apenas se espécimens de melhor qualidade não estiverem disponíveis (ALMEIDA, 2008). Abscessos miliares devem ser abertos com lâmina de bisturi estéril e o conteúdo coletado. Os grânulos ou grãos presentes são de eleição e devem ser sempre coletados (CARVALHAES, 2014). Uma alternativa para a recuperação dos grânulos ou grãos, caso não sejam encontrados de imediato à coleta, é colocar gazes sobre a fístula por um período de 12 a 18 horas (geralmente essas lesões fistuladas estão presentes nos membros inferiores) e deixar com que o paciente ande normalmente (KIBBLER, 2017). Dessa forma, após esse período, os possíveis grânulos ou grãos serão recuperados para estudo (LACAZ, 2002). O pus retirado por punção pode ser transportado na própria seringa fechada (MACGOWAN, 2011). *Swabs* não são dispositivos adequados, pois devido ao

volume coletado existe um prejuízo na recuperação dos fungos, mas caso sejam empregados, os mesmos devem ser mantidos úmidos e transportados em frascos estéreis com meios de transporte, como meio de Stuart, Cary-Blair ou caldo Sabouraud (CLSI, 2012).

#### 6.1.5. Úlceras e feridas

Esses espécimens podem ser obtidos por aspiração ou *swab* (menos recomendáveis) da parte profunda da ferida (WINN et al., 2008). As úlceras de pele de pequenas dimensões são geralmente biopsiadas ou excisadas (CLSI, 2012). O transporte dos espécimens deve ser feito em recipientes estéreis com meios de transporte ou na própria seringa de coleta (MACGOWAN, 2011). Quando grânulos estão presentes devem ser coletados por aspiração ou gaze umedecida em salina ou água destilada estéreis colocadas sobre a lesão e submetidas a suave compressão (KIBBLER, 2017). Os grânulos podem ser transportados também na seringa ou gaze de coleta acondicionada em placa de Petri estéril (MACGOWAN, 2011).

#### 6.1.6. Cascas e Crostas

O material deve ser coletado por arrancamento com uma pinça esterilizada no calor ou álcool a 70%(BARON et al., 2013). O transporte dos espécimens pode ser feito em recipientes estéreis com ou sem salina ou água destilada para evitar a secagem do material. Eventuais grânulos devem ser coletados (MACGOWAN, 2011; SIDRIM; ROCHA, 2010).

### 6.1.7. Mucosas

Os espécimens de mucosa oral e vaginal podem ser coletados com *swabs* ou por raspagem com espátula ou cureta nas áreas epiteliais eritematosas ou esbranquiçadas (QUINDÓS, 2015). A coleta do material feita por raspagem apresenta maior qualidade comparativamente às feitas com *swab* (SILVA; NEUFELD, 2006). No entanto, *swabs* são frequentemente empregados porque são melhores para a coleta de descargas vulvovaginais e mais convenientes para o transporte (GERALDINO et al., 2012). Para os procedimentos laboratoriais é recomendado utilizar mais de um *swab* por lesão (MEZZARI, A; FUENTEFRÍA, 2012). Espécime de mucosa vaginal deve ser enviado o mais rápido possível para o laboratório, pois microrganismos da microbiota da mucosa gastrointestinal e genital, como *Candida* sp, podem proliferar, tornando o resultado não fidedigno (LACAZ, 2002). Caso não seja possível o envio imediato, recomenda-se, durante o processo de coleta confeccionar uma lâmina para ser feita coloração (GRAM), preservando a representatividade matinal (MOYA et al., 2018). Os *swabs* de espécimens de mucosa devem ser enviados em frascos estéreis contendo meio de transporte ou ser pelo menos umidificados em salina ou água destilada estéreis (MCGINNIS, 2012). *Swabs* secos são inapropriados, já que as leveduras perdem rapidamente viabilidade nesse tipo de dispositivo (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013).

### 6.1.8. Olhos e Conjuntivas

*Queratomiose*: O material de infecção na córnea deve ser coletado por raspagens da base e dos bordos da úlcera com espátula ou lâmina de bisturi oftalmológicos (QUINDÓS, 2015). *Endoftalmite*: O material de infecções do globo ocular deve ser coletado por punção do humor vítreo (ZAITZ, 2010). *Conjuntivites*:

O material de lesão na conjuntiva deve ser coletado do fundo do saco inferior ou do canto interno do olho *swabs* estéreis (SIDRIM; ROCHA, 2010). *Swabs* devem ser umidificados em salina ou água destilada (KOZEL; WICKES, 2013). Os espécimens devem ser transportados em tubos com meio de transporte (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2011). Material purulento deve ser coletado com *swab* e enviado rapidamente para o laboratório de micologia, caso haja demora, esse *swab* deve ser em meio de transporte a fim de manter a integridade da amostra (BARROSO; MELICO-SILVESTRE; TAVEIRA, 2014).

#### 6.1.9. Conduto Auditivo Externo

Os espécimens de lesão do conduto auditivo externo podem ser coletados por raspagens com espátula (SILVA; ZAROR, 2015). *Swabs* (não recomendados) devem ser umidificados (GUILHERMETTI et al., 2004). Os espécimens podem ser transportados em placas de Petri ou tubos com meios de transporte (LUQUE et al., 2017).

#### 6.1.10 Nariz e Seios paranasais

O material dos seios paranasais deve ser coletado por aspiração com seringa e agulha ou biópsia (PEMÁN; MARTÍN-MAZUELOS; CALVO, 2007). Os espécimens podem ser transportados na seringa de coleta (BRASIL, 2014). Dependendo da suspeita clínica a obtenção do material por meio cirúrgico pode ser o mais recomendado para retirar o material adequado (ALMEIDA, 2008). Materiais de biópsias podem ser acondicionados em recipientes contendo salina ou água destilada estéreis (SILVA, 2006).

### 6.1.11. Garganta e Nasofaringe

Os espécimens são obtidos por *swab* de faringe posterior - pilares tonsilares e úvula (OPLUSTIL et al., 2010). O transporte pode ser feito em frascos estéreis com meios de cultura (SILC, 2014; SILVA, 2006).

### 6.1.12. Escarro e Secreções pulmonares

Em decorrência do fato de que existem ambientes respiratórios diferenciados, onde o trato respiratório baixo é estéril e o alto possui colonização por bactérias e leveduras, a amostra ideal, desse sítio anatômico, é a representada por material obtido do trato respiratório baixo (LACAZ et al., 2002; OPLUSTIL et al., 2010; WINN et al., 2008). Isso demonstra a importância de critérios de avaliação rigorosos dessas amostras (OPLUSTIL et al., 2010). A amostra ideal é aquela da manhã, devido ao acúmulo de secreções durante a noite, tornando-a mais representativa (CLSI, 2012; WINN et al., 2008). *Expectoração Espontânea*: O paciente deve higienizar a cavidade bucal e a orofaringe antes da coleta com escovamento dos dentes com dentifrícios e gargarejos com assépticos (ZAITZ, 2010). Três amostras matutinas sucessivas de escarro (5,0-10,0ml) devem ser coletadas (CLSI, 2002). *Expectoração Induzida*: espécimens de escarro podem ser obtidos por meio de técnicas de fisioterapia ou nebulização (BARON et al., 2013). *Secreções Pulmonares*: amostras podem ser obtidas por aspiração transtraqueal, escovamento brônquico, lavagem broncoalveolar (XAVIER; OLIVEIRA; SEVERO, 2009). *Aspiração Gástrica*: suco gástrico (10,0ml) pode ser aspirado com sonda nasogástrica (PEMÁN; MARTÍN-MAZUELOS; CALVO, 2007). Os espécimens devem ser transportados em frascos estéreis (BRASIL, 2014). A demora entre a coleta e o processamento não deve exceder 1-2 horas (VANDEPITTE et al., 1993). Quando atrasos são inevitáveis, a amostra deve ser refrigerada uma temperatura de 4° C. Escarros de 24h. são inaceitáveis (SALUD, 2007).

### 6.1.13. Urina e Fezes

Os espécimens de urina podem ser coletados naturalmente pela técnica do jato médio de micção, obtendo três amostras consecutivas pela manhã, por cateterismo, a partir do fluxo livre da boca do cateter, ou por aspiração supra púbica (BARROSO; MELICO-SILVESTRE; TAVEIRA, 2014). Um volume de urina em torno de 25,0-50,0ml são necessários (ARENAS, 2014). No caso de urinas coletadas por sonda vesical implantada no momento da coleta ou punção supra púbica, o volume pode ser menor, em torno de 3-5 ml, pois são amostras bem representativas (LACAZ et al., 1998). Diversas micoses endêmicas podem ser recuperadas por meio de massagem prostática, tornando essa técnica um importante método de coleta (ZAITZ, 2010). Infecções renais podem ser causadas por diversos fungos invasivos devido a uma infecção sistêmica ou disseminada (CLSI, 2012). Esses espécimens devem ser imediatamente transportados em frascos estéreis (MOYA et al., 2017). A demora entre a coleta e o processamento não deve ultrapassar 1-2 horas (VANDEPITTE et al., 1993). A amostra deve ser refrigerada a uma temperatura de 4° C, quando atrasos são previstos (KOZEL; WICKES, 2013) Urinas de 24h. são insatisfatórias (KOZEL; WICKES, 2013). Os espécimens de fezes, normalmente destinados a pesquisa de leveduras (muitos autores não observam importância nesse tipo de amostra para essa finalidade), podem ser obtidos de forma natural ou com *swabs* retais (VIDOTTO, 2002). Esses espécimens devem ser transportados em recipientes estéreis de boca larga com tampas herméticas (AIRES et al., 2015).

### 6.1.14. Líquido cefalorraquidiano (LCR)

A coleta é feita por punção lombo-espinhal no espaço entre as vértebras L<sub>3</sub> e L<sub>4</sub>. Um volume total de 10,0ml é geralmente coletado em três tubos, sendo o terceiro selecionado para a microbiologia (QUINDÓS, 2015; SIDRIM; ROCHA,

2010; SILVA; ZAROR, 2015). Os espécimens devem ser transportados em frascos estéreis (MCGINNIS, 2012). Por ser um material naturalmente estéril qualquer microrganismo deve ser considerado e reportado como agente etiológico (TORTORA; FUNKE; CASE, 2004). O LCR é um espécimen que tem que ser processado o mais rápido possível, e caso não possa ser feito, o mesmo deve ser mantido em temperatura ambiente e enviado rapidamente para o laboratório, para análise (LUQUE et al., 2017). A refrigeração é prejudicial a viabilidade da amostra, pois agentes fúngicos, como *Cryptococcus* sp, são prejudicados com a baixa temperatura causando prejuízos no possível isolamento desse microrganismo (RODRÍGUEZ-TUDELA et al., 2003).

#### 6.1.15. Medula Óssea

Os espécimens devem ser coletados por punção do osso esterno ou ilíaco (LUQUE et al., 2017). Os dispositivos de coleta e transporte devem conter 0,5ml de heparina sódica (1:1000) estéril (BARROSO; MELICO-SILVESTRE; TAVEIRA, 2014). É comum a coleta em frascos (tipo de hemocultura) para que sejam usados em sistemas automatizados sempre seguindo as recomendações dos fabricantes (SILVA; ZAROR, 2015).

#### 6.1.16. Sangue e Cateter intravascular

O local de punção venosa deve ser adequadamente higienizado (ARAUJO, 2012). A coleta realizada de forma asséptica é um fator crítico na cultura do sangue (CLSI, 2012). Nas coletas de espécimens de sangue devem ser empregados os procedimentos de rotina, punção venosa com seringa e agulha estéreis ou sistemas fechados contendo um frasco com vácuo e um tubo coletor de agulha dupla

(BERNABÉ; CASTILLO, 2013). A coleta de sangue arterial é recomendada quando as culturas de sangue venoso falham na recuperação de fungos de pacientes com forte suspeita de fungemia (ALMEIDA, 2008; QUINDÓS, 2015). Os espécimens de sangue devem ser transportados nos frascos de coleta e nunca deve ser refrigerado (CLSI, 2012). Pontas de cateteres com 5cm comprimento devem ser enviados em recipientes estéreis (LUQUE et al., 2017).

#### 6.1.17. Fluidos Corporais

Fluidos torácicos, abdominais, sinoviais e prostáticos podem ser obtidos por aspiração ou drenagem (MACGOWAN, 2011). Devido a presença de pequenas quantidades de líquidos nas cavidades corporais um processo inflamatório ou infeccioso pode culminar com o aumento desse volume (MOYA et al., 2017). Os espécimens obtidos devem ser transportados em frascos estéreis com uma pequena quantidade de heparina (1:1000), que varia com o volume da amostra (1:10ml) (CLSI, 2012). A heparina é importante para evitar a coagulação, devido a presença de substâncias coagulantes, evitando a formação de coágulos, o que dificulta a observação (QUINDÓS, 2015).

#### 6.1.18. Tecido

Esses espécimens podem ser coletados por biópsia (BARROSO; MELICO-SILVESTRE; TAVEIRA, 2014). Os grânulos presentes devem também ser coletados (MACGOWAN, 2011). Biópsias em esporotricose deve ser evitada, pois o procedimento pode disseminar a doença (SILVA, 2006). Amostras de tecido devem ser enviadas de forma estéril em frascos contendo 1,0-2,0ml de salina ou água destilada ou em gaze umedecida com salina ou água destilada (LUQUE et al., 2017).

#### 6.1.19. Crítérios de Rejeição

Durante o processamento e análise do material a ser pesquisado, o micologista deve fazer algumas observações com o objetivo de caracterizar bem a amostra como sendo adequado ou não ao estudo micológico (MOYA et al., 2017). Características como, acondicionamento, consistência e coloração, são exemplos de informações macroscópicas importantes para uma observação inicial (WINN et al., 2008) Amostras de trato respiratório devem respeitar critérios de avaliação celular para serem consideradas representativas do sítio anatômico de origem (KOZEL; WICKES, 2013). Dessa forma, a presença de células da árvore respiratória são bons indicativos (XAVIER; OLIVEIRA; SEVERO, 2009). No caso de escarro, leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e células do epitélio (indicando a ação da resposta celular), são alguns critérios utilizados para a caracterização da amostra (XAVIER; OLIVEIRA; SEVERO, 2009).

## **7. PROCESSAMENTO GERAL DOS ESPÉCIMENS CLÍNICOS**

Como mencionado a amostra a ser analisada deve vir acompanhada de uma adequada coleta do material clínico, pois a qualidade da amostra é essencial, já que quando obtida erroneamente, impossibilita o micologista identificar e recuperar as estruturas fúngicas que, eventualmente, estejam presentes no tecido do hospedeiro (MALBR, 2016).

O laboratório precisa estabelecer prioridades para o processamento das amostras, em decorrência das suas características (MOYA et al., 2017). Geralmente, amostras de líquidos e cavidades estéreis, como líquido (LCR), devem ser processadas imediatamente à chegada no laboratório de micologia, assim como testes rápidos de detecção de antígenos, o que permite um resultado preliminar, contribuindo para o início da terapia do paciente (GARDEWEG, 2012; ROBLES; AUSEJO; CAVERO, 2007).

### **7.1. Espécimens dermatológicos**

Escamas de pele, fragmentos de unha, fios de cabelo, bolhas e vesículas, bem como cascas, crostas, úlceras e feridas devem ser colocados em uma gota de KOH a 10% ou 40% (unhas e peles), sobre uma lâmina de microscopia, cobertos com uma lamínula para o processo de clarificação, possibilitando a realização de um melhor exame microscópico direto, permitindo a visualização dos elementos fúngicos teciduais (MINAMI PS, 2003; NEUFELD, 1999). Todavia, os fragmentos de unha e fios de cabelo, devem ser depositados em KOH (em maior concentração, 40%), podendo aquecer a lamina rapidamente sobre a chama de um bico de Bunsen para agilizar o processo, tendo em vista a maior quantidade de queratina elementos como, estruturas proteináceas, são digeridas mais rapidamente. Importa mencionar que a morfologia do fungo é preservada devido a presença da parede celular, que confere resistência a essa substância (PÉREZ CALONGE; CASADO HERNÁNDEZ;

SANTIAGO NUÑO, 2017). Para a visualização microscópica dos fragmentos dérmicos, quando não é possível descamar a pele do paciente, deve-se adotar a técnica de Jarbas Porto, onde a amostra é coletada em fita adesiva e uma gota de KOH a 10% deve ser colocada sobre uma lâmina de vidro, deitando-se, em seguida, a fita, com sua parte gomada, sobre o corante em lâmina (ALMEIDA, 2003; OLIVEIRA J, 2013; SIDRIM; ROCHA, 2010) A leitura dessa preparação deve ser feita sem lamínula e esse material não é indicado para cultura, mas somente para exame direto (PEMÁN; MARTÍN-MAZUELOS; CALVO, 2001; SIDRIM; ROCHA, 2010) Escamas de pele e fios de cabelos de áreas centrais de lesões inflamatórias são desprovidos de fungo, por isso, o exame direto deve ser procedido de material coletado das partes úmidas e avermelhadas da região periférica das lesões, onde o fungos estará na sua fase proliferativa, viabilizando a amostra e aumentando as chances de recuperação do agente (GARDEWEG, 2012; MACGOWAN, 2011; STATE OF NEW HAMPSHIRE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2008).

Para a cultura, algumas escamas de pele devem ser retiradas dos dispositivos de transporte, com o auxílio de uma alça umedecida em água destilada ou salina estéril, e inoculadas diretamente em um meio de isolamento, com antimicrobianos (ágar mycosel), com o propósito de inibir o crescimento de bactérias e fungos contaminantes pois, dessa forma, aumenta a tensão de oxigênio favorecendo o crescimento do patógeno fúngico (CLSI, 2012). Para a inoculação dos espécimens coletados com fita adesiva, a parte gomada que contém o material deve ser colocada sobre a superfície do meio de cultura, tomando-se o cuidado de não permitir a formação de bolhas de ar e incubadas a 30°C por até 4 semanas (ALMEIDA, 2003). A fita adesiva deve ser deixada sobre o meio por até 3 dias sendo posteriormente retirada para permitir que eventuais colônias se desenvolvam, possibilitando a visualização das estruturas fúngicas em microscopia (KERN; BLEVINS, 1999; SILVA; NEUFELD, 2006). Os fios de cabelo coletados devem ser coletados com alça umedecida em salina ou água destilada estéril e, também, inoculados em ágar mycosel (KOZEL; WICKES, 2013). Para uma boa cultura dos espécimens de unha, o material distrófico e descolorado deve ser cortado em pedaços menores com uma lâmina de bisturi estéril (CLSI, 2012). Utilizando-se, igualmente, uma alça umedecida com salina ou água estéril, fragmentos de unha devem ser coletados e inoculados diretamente no ágar mycosel

e incubados a 30°C ou em temperatura ambiente, por até 4 semanas, e, em seguida, realizadas verificações diárias, para observação de colônias fúngicas (ALBERHASKY, 2004; SILVA; NEUFELD, 2006). As amostras devem ser consideradas negativas após o período de 4 a 8 semanas (fragmentos de tecidos), sendo descartadas conforme a orientação da legislação vigente de descarte de material biológico (SIDRIM; ROCHA, 2010; MCGINNIS, 2012). Por serem pesadamente contaminadas, escútuas, cascas e crostas devem ser cuidadosamente maceradas, lavadas em álcool ou em solução salina estéril antes da cultura (FISHER; COOK, 2001). Para o isolamento, as escútuas devem ser inoculadas em ágar *mycosel*, bem como cascas, crostas, úlceras e feridas, permitindo o isolamento fúngicos (GERALDINO et al., 2012).

## 7.2. Espécimens de Abscesso

Para uma avaliação inicial desse material clínico, é de extrema importância uma análise macroscópica criteriosa, verificando se existem elementos como grãos, que devem ser depositados em uma placa de Petri estéril, com uma pequena quantidade de água destilada (SIDRIM; MOREIRA, 1999; SILVA; NEUFELD, 2006). Esse achado é importante, pois caracteriza, junto a outras informações clínicas, como a presença de fístulas, um diagnóstico preliminar de micetoma, que pode ter como agente etiológico, bactérias (actinomicetoma) ou fungos (eumicetomas) (NENOFF et al., 2015). O material purulento deve ser concentrado por meio de centrifugação em uma rotação de 1500 a 2500 rpm, por 10 minutos, e dessa forma, a partir do concentrado, deve ser realizado um estudo pela micromorfologia, GRAM, e outros pelo KOH a 10% e observados em microscopia (GERALDINO et al., 2012). Materiais muito espessos podem ser tratados com uma substância digestiva (solução de pancreatina a 0,05%, N- acetilcisteína) para liquefação, antes da centrifugação (MOYA et al., 2017).

Toda amostra analisada deve ser semeada sobre o ágar de Sabouraud dextrosado, ágar BHI, para isolamento e identificação (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013).

Os grânulos presentes devem ser primeiramente lavados em tubos de ensaio, contendo 2 a 3ml de salina ou água destilada estéreis, que deve ser agitado e centrifugado a 1.500 rpm por 2 a 5 minutos, por pelo menos 3 vezes, para minimizar a possibilidade de contaminação da amostra por outros microrganismos que impossibilitariam o isolamento do agente etiológico (SIDRIM; MOREIRA, 1999). Usando um bastão de vidro estéril, esse material deve ser esmagado dentro do tubo. Com uma pipeta Pasteur estéril, uma alíquota da suspensão de grânulos deve ser transferida para uma lâmina e lamínula, com uma gota de KOH a 10%, para a realização do exame microscópico direto, para diferenciar e caracterizar o micetoma (SILVA; NEUFELD, 2006). Esfregaços dos grânulos corados pelo Gram podem ser também preparados para a observação de possíveis filamentos bacterianos - actinomicetoma (OLIVEIRA J, 2013). Uma outra alíquota da suspensão deve ser inoculada diretamente em um dos meios de isolamento primário, usualmente empregados em micologia médica (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013b; FISHER; COOK, 2001).

### **7.3. Espécimens de Membranas Mucosas**

Para a confecção de montagens microscópicas, o *swab* úmido deve ser rolado e comprimido sobre a superfície da lâmina de microscopia (NEUFELD, 1999; SIDRIM; ROCHA, 2010). Os espécimens obtidos por *swabs* secos devem ser emulsificados em salina ou água destilada estéril (ou pode ser usado uma gota de KOH a 10% ou em KOH/DMSO) e distendidos sobre uma lâmina de vidro para que o exame microscópico seja realizado (NEUFELD, 1999). Esse material deve ser coberto com uma lamínula e observado ao microscópio. Esfregaços de *swabs* corados pelo Gram devem ser também preparados (NENOFF et al., 2015). Para o isolamento, o *swab* deve ser esgotado sobre a superfície do meio de cultura (ágar de Sabouraud dextrosado, ágar BHI) (SILVA; NEUFELD, 2006).

#### **7.4. Espécimens Oftalmológicos e Otorrinolaringológicos**

Amostras oculares e de conjuntivas, por serem, em geral, obtidas em pequenas quantidades, devem ser coletadas com *swab* e serem inoculadas primariamente nos meios de cultura (ágar de Sabouraud dextrosado com cloranfenicol e ágar BHI), prescindindo-se do exame microscópico direto (CLSI, 2012; THOMAS, 2003). Amostras de ouvido, nariz, seios paranasais e garganta devem ser depositadas em uma gota de KOH a 10% para o exame direto. Esse material clínico deve ser inoculado diretamente sobre o meio de isolamento (MOYA et al., 2017).

#### **7.5. Espécimens pulmonares**

Escarro e secreções do pulmão devem ser avaliados macroscopicamente para a identificação de partes sanguinolentas, purulentas, caseosas e necróticas (J. VANDEPITTE et al., 1993; LACAZ et al., 1998). Deve-se utilizar a região supurada das amostras clínicas, pois, dessa forma, as chances de recuperação do agente fúngico são maiores (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013). O sucesso na recuperação do agente fúngico está, diretamente, relacionado com a qualidade da amostra. Nesse sentido, espécimen de escarro espontâneo ou induzido e de aspirado traqueal, devem ser considerados materiais alternativos, pois os mesmos apresentam uma intensa colonização por fungos ambientais, devendo seu valor ser avaliado conforme o agente identificado e a suspeita clínica. (CLSI, 2012a; QUINDÓS, 2015). Os espécimens com pouca viscosidade podem ser examinados diretamente ao microscópio com KOH a 10% sem a necessidade de um tratamento prévio (MCGINNIS, 2012). Um resultado negativo, neste exame, não deve ser considerado conclusivo e indica meramente que uma preparação liquefeita e concentrada deve ser analisada (MALBR, 2016). A liquefação do escarro para investigação micológica deve ser procedida com substanciais digestivas (N-acetil-

L-cisteína, ditiotreitól ou solução de pancreatina a 0,05%). A centrifugação de espécimen liquefeito deve ser realizada a 1500 rpm por 10 minutos para, com isso, dissolver a amostra e permitir que a identificação dos microrganismos fúngicos seja favorecida (OPLUSTIL et al., 2010b). Este tratamento também deverá ser feito se o espécimen se apresenta com densa viscosidade (QUINDÓS, 2015). Os lavados broncoalveolares por serem suficientemente líquidos podem ser centrifugados sem a necessidade de uma liquefação anterior (CLSI, 2012; LACAZ et al., 1998; SIDRIM; MOREIRA, 1999). O sedimento do material centrifugado deve ser colocado em uma gota de KOH a 10% (DUARTE, 2018). O material clínico (0,5ml) processado ou não deve ser inoculado diretamente sobre o meio de cultura (ágar de Sabouraud, ágar BHI) (MOYA et al., 2017).

## **7.6. Espécimens de Urina**

A urina deve ser centrifugada a 2000 rpm por 10-15 minutos com o objetivo de realizar uma análise cultural quantitativa (ALMEIDA, 2003, 2008). Uma alíquota de urina centrifugada deve ser colocada em uma gota de KOH a 10% sobre uma lâmina de microscopia para análise micromorfológica direta (QUINDÓS, 2015). Preparações corados pelo Gram, PAS, ou Nanquim podem ser úteis para a realização de um diagnóstico diferencial (MYCOLOGY ONLINE). O restante do material (0,5ml) deve ser inoculado diretamente no meio de cultura, podendo também utilizar o material não centrifugado para realizar uma análise qualitativa (ALMEIDA, 2008; CLSI, 2012a; KERN; BLEVINS, 1999). Através de uma alça microbiológica calibrada, pode ser realizada uma semeadura, pela técnica de esgotamento, nos meios de cultura ágar de Sabouraud e ágar BHI para obtenção de um resultado quantitativo e, dessa forma, ter uma avaliação em UFC (Unidades Formadoras de Colônias) e de micção, caso a contagem seja maior que  $10^3$  UFC/ml de uma infecção (ALBINI; SOUZA; SILVEIRA, 2012; PEMÁN; MARTÍN-MAZUELOS; CALVO, 2001; SIDRIM; ROCHA, 2010).

### 7.7. Espécimens de fezes

Esse tipo de material não é pouco aplicável para um diagnóstico de infecção fúngica, pois o trato intestinal é muito contaminado por diferentes microrganismos, inclusive *Candida* spp (TANGARIFE CASTAÑO, et al., 2015). Porém, uma avaliação, em casos de pacientes internados ou em casos de microbiota pura com fungos, observados pelo Gram, quando o paciente apresenta sintomatologia e não apresenta diagnóstico, a pesquisa nesse tipo de amostra clínica pode ter um significado relevante (ALMEIDA, 2008).

As amostras de fezes geralmente não requerem processamento. Montagens diretas podem ser feitas a fresco ou coradas pelo Gram (NEUFELD, 1999). Fezes pastosas podem ser inoculadas diretamente no meio de cultura (ágar de Sabouraud, ágar BHI). Os espécimens sólidos e representativo (0,3g) podem ser homogeneizados em salina ou água destilada estéreis (3,0ml). Diluições decimais são feitas em água destilada e pequenas alíquotas (0,1-0,5ml) devem ser inoculadas na superfície do meio em placa. *Swabs* retais também podem ser esgotados sobre a superfície do meio de cultura (LUQUE et al., 2017).

### 7.8. Espécimens de LCR e Fluidos Corporais

O LCR deve sofrer um pré-tratamento para sua concentração (NEUFELD, 1999). O LCR pode ser concentrado por centrifugação a 1500 rpm por 15 minutos ou por membrana filtrante de 0,45  $\mu$ m, devendo o concentrado ser utilizado para realização de culturas e o sobrenadante ser útil para a pesquisa de antígenos e anticorpos (BARROSO; MELICO-SILVESTRE; TAVEIRA, 2014). Para a visualização microscópica, esfregaços do sedimento devem ser corados pelo Giemsa ou Wright. Dependendo do agente suspeito (*Cryptococcus* spp), uma outra alíquota deve ser retirada do sedimento e misturada a uma gota de tinta nanquim, ou nigrosina, em montagens microscópicas (MARIA; MORAES; PAES, 2009). O

restante do sedimento deve ser inoculado diretamente no meio de cultura (ágar de Sabouraud, ágar BHI ou ágar Niger) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013). Importa mencionar que se deve ter cuidado na sementeira desse material no meio de cultura, ágar de Sabouraud com cicloeximida, pois esta substância não permite o crescimento do *Cryptococcus* spp, agente de infecção do SNC (SIDRIM; MOREIRA, 1999). Quando o volume for menor do que 2ml, insuficiente para a centrifugação ou filtração, esfregaços devem ser preparados e alíquotas de 1 a 3 gotas da amostra devem ser inoculados nos meios de cultura (TRUJILLO, 2012). As amostras de qualquer líquido orgânico devem ser centrifugadas por 15 minutos a 2500 rpm, afim de obter sedimentos para a realização de montagens microscópicas com KOH a 10% e/ou esfregaços pelo Gram ou outra coloração (TANGARIFE CASTAÑO, et al. 2015). O restante do material deve ser inoculado nos meios de cultura, ágar de Sabouraud dextrose e ágar BHI a temperatura ambiente (25° a 30°C) e acompanhados diariamente por 10 dias após o segundo dia de incubação e liberados como negativos após 30 dias (LACAZ et al., 1998; MEZZARI; FUENTEFRÍA, 2012).

## 7.9 Espécimens de Sangue e Medula Óssea

O sangue pode ser examinado em preparações microscópicas diretas, coradas pelo Gram, Giemsa ou Wright. As hemoculturas podem ser realizadas por sistemas manuais, cultivo bifásico e sistemas de lise centrifugação automatizados de monitoramento contínuo (BARBOSA et al., 2015). Quando há suspeita de fungos, a recomendação do CLSI e do Cumitech 1C – comunicado da Sociedade Americana de Microbiologia que reúne todas as Boas Práticas de rotina em hemocultura- é que sejam coletados um volume de 5 a 10ml por frasco em cada punção, totalizando 20 ml distribuídos por 2 frascos (1 amostra = 2 frascos) e que sejam totalizadas de 2 a 3 amostras, tanto para adultos quanto para crianças (CLSI, 2016). No caso de dificuldade em crianças, ou com pacientes especiais, é necessário que sejam respeitadas as recomendações relacionadas ao volume

coletado, onde para adultos é de cerca de 20 ml por amostra, enquanto que, para crianças e situações especiais, um volume de até 5 ml pode ser suficiente, devido à presença da concentração de microrganismos na circulação sanguínea caracterizando um episódio de fungemia (ARAUJO, 2012; QUINDÓS, 2015). Essa observação é de fundamental importância para verificar se a fungemia é transitória ou intermitente e deve ser respeitada um total de 2 a 3 amostras (mínimo de 2 frascos num total de até 20 ml) para que haja eficiência no método (RIERA; CELI; THOMPSON, 2017). As amostras de medula óssea podem ser visualizadas em preparações com KOH a 10%, Giemsa ou Wright e a metodologia segue a utilizada para o líquido (PEMÁN; MARTÍN-MAZUELOS; CALVO, 2001) O material deve ser inoculado diretamente no meio de cultura - ágar de Sabouraud dextrosado, ágar BHI, ágar semente de niger (GARDEWEG, 2012).

### **7.10 Espécimens de Biopsia**

Em uma placa de Petri estéril, contendo uma pequena quantidade de salina ou água destilada, deve ser feito um exame macroscópico do material clínico (MACGOWAN, 2011). Partes mais representativas, sanguinolentas, purulentas, caseosas e necróticas) devem ser escolhidas, bem como os eventuais grânulos presentes (ALMEIDA, 2003). Com uma lâmina de bisturi ou tesoura estéreis, o tecido deve ser cortado de maneira a produzir fragmentos menores (1-2mm) (NEUFELD, 1999). A trituração dos cortes de tecido não deve ser realizada, já que pode danificar as estruturas de alguns fungos, principalmente Zygomycota (MINAMI, 2003). Preparações microscópicas com KOH a 10% devem ser confeccionadas. Os fragmentos de tecido devem ser inoculados diretamente no meio de cultivo (ágar de Sabouraud dextrosado, ágar BHI ou ágar semente de niger) (GARDEWEG, 2012). Os grânulos devem ser lavados em salina ou água destilada estéreis e esmagados para exame direto e cultura (GERALDINO et al., 2012).

## 8. PRÉ-TRATAMENTO DO ESPÉCIMEN CLÍNICO

A qualidade do espécimen que será processado é um fator importante para o sucesso da detecção tecidual e isolamento de fungos em cultura (ARENAS, 2014). Normalmente, os elementos fúngicos são encontrados em pequena quantidade nos tecidos, o que, entre outros fatores, determina o baixo rendimento das técnicas micológicas em infecções invasivas (KIBBLER, 2018). Contudo, objetivando melhorar a recuperação desses patógenos, podem ser procedidos tratamentos prévios dos espécimens clínicos (QUINDÓS, 2015).

Para otimizar o isolamento de agentes de onicomicoses, as amostras de unha podem ser maceradas ou cortadas em pequenos fragmentos (TOSTI; VLAHOVIC; ARENAS, 20017). Biópsias também podem ser cortadas em fragmentos menores (CAMPBELL; JOHNSON; WARNOCK, 2013). O isolamento de fungos da urina pode ser aumentado com uma centrifugação prévia (MOYA et al., 2017). Da mesma maneira, fluidos corporais podem sofrer um tratamento por centrifugação ou filtração. Lise e agentes mucolíticos podem ser utilizados em amostras do trato respiratório (SILVA; ZAROR, 2015).

## 9.EXAME MICROSCÓPICO DIRETO DO ESPÉCIMEN CLÍNICO

O diagnóstico presuntivo de infecção fúngica pode ser obtido através do exame direto dos espécimens clínicos (BARROSO; MELICO-SILVESTRE; TAVEIRA 2014). Como esse são uns procedimentos de execução simples e resultado rápido, o exame direto deve ser realizado em todos os espécimens que chegarem ao laboratório clínico (GARDEWEG 2012). Essa prova pode informar preliminarmente a presença de fungos leveduriformes ou filamentosos no tecido, determinando a etiologia fúngica do processo (LIN, 2015). Em certos casos, inclusive, a detecção tecidual de elementos morfológicos característicos pode oferecer um confiável diagnóstico do tipo de fungo presente e/ou doença fúngica (KIBBLER, 2018). Infecções por *Coccidioides immitis*, dermatófitos, *Histoplasma capsulatum*, *Sporothrix schenckii* complexo e *Paracoccidides brasiliensis* podem ser assim diagnosticadas (NG; SOO-HOO; NA, 2014).

O exame microscópico direto é também de valor na detecção de contaminações que podem ocorrer durante a coleta, transporte e processamento dos espécimens clínicos (MOYA, 2017). A distinção entre o organismo contaminante e o agente oportunista frequentemente só é possível pelo exame microscópico direto e/ou histopatologia, que permitem a visualização de estruturas morfológicas compatíveis com o fungo isolado em cultura (SILVA; ZAROR, 2015). A recuperação de fungos ambientais sem a contrapartida tecidual não pode ser considerada um elemento de diagnóstico (CAMPBELL; JOHNSON; WARNOCK, 2013). Por serem extremamente contaminantes, um exemplo clássico são os agentes da mucormicose (ARORA D; ARORA B, 2014). A cultura positiva para um membro da ordem Mucorales e o exame direto negativo não têm significado clínico-laboratorial, pois, não havendo achados teciduais, não há como considerar a etiologia e a suspeita de contaminação se consubstancia (KIBBLER,2018). Nesse caso, a observação no tecido de hifas asseptadas e ramificadas em ângulo reto é mais decisiva do que a própria cultura de Mucorales (CHANDLER, 1980).

Caracteristicamente, diferentes morfologias fúngicas são encontradas em cultura e em parasitismo (ZAITZ, 2015). Com frequência, os fungos podem apresentar polimorfismos culturais com estruturas somáticas e de frutificação distintas (DUARTE, 2018). Além disso, estruturas teciduais podem ser também

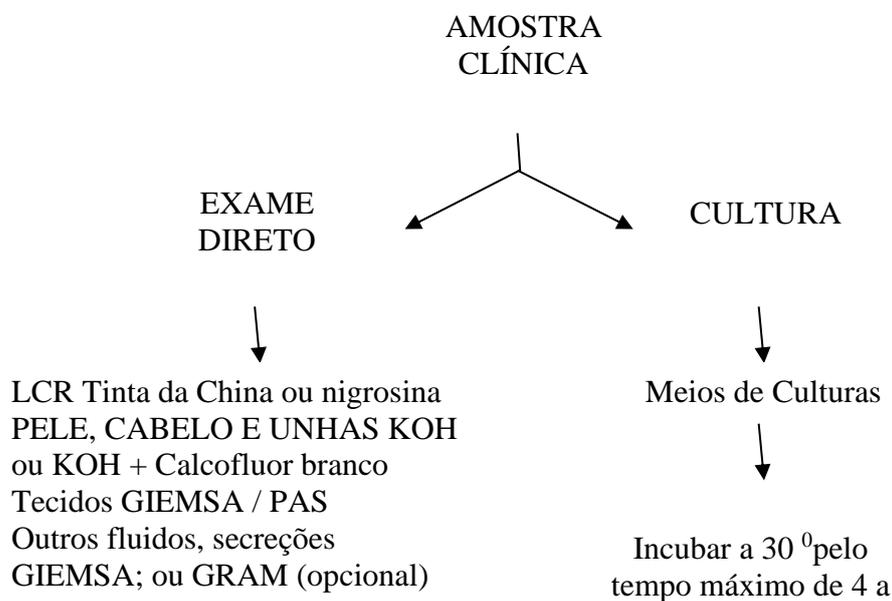
diversas daquelas produzidas em meios de cultivo (CHANDLER, 1980). Na realidade, a maioria dos fungos produz somente estruturas vegetativas no tecido, isso explica o motivo da identificação específica não ser possível (CAMPBELL; JOHNSON; WARNOCK, 2013). Dentre as estruturas que podem ser observadas ao exame direto estão células de leveduras uni ou multibrotantes, pseudo-hifas, hifas septadas hialinas e demáceas, hifas cenocíticas e esférulas (PEMÁN; MARTÍN-MAZUELOS; CALVO, 2001).

Certas limitações da técnica, no entanto, podem ser obstáculos importantes (VIDOTTO, 2002). Não raramente, resultados falso-positivos podem ocorrer (RUSSEL; PATERSON; LIMA, 2016). Diversas estruturas teciduais como linfócitos, fibras de colágenos e glóbulos de gordura podem mimetizar elementos fúngicos (WEBSTER 2007).

Resultados negativos ou falso-negativos podem também ser obtidos em decorrência da natureza e qualidade do espécimen clínico, quantidade de patógenos no sítio de infecção e tipo de paciente e doença de base (LACAZ, 2002). De qualquer modo, a avaliação micológica deve ser criteriosa e resultados negativos não devem ser prontamente considerados definitivos (CANALLI, 2010). Além disso, a cultura deve ser sempre procedida, tendo em vista ser mais sensível do que o exame direto (BIANCHI, 2013).

As preparações microscópicas são confeccionadas com diferentes líquidos de montagem cujo uso irá depender do material clínico e espécie de fungo envolvidas (ST-GERMAN, 2011). Preparações com hidróxido de potássio ou hidróxido de sódio, tinta da china, Calcofluor branco, Gram, Giemsa e ácido periódico de Schiff são efetivas (ALMEIDA, 2008). No entanto, as montagens microscópicas com hidróxido de potássio e tintas da china são as mais difundidas no laboratório de micologia (NG; SOO-HOO; NA, 2014). Apesar do Gram não ser uma coloração para fungos, muitos desses organismos são detectados na rotina da bacterioscopia (JOS, 2007; OPLUSTIL, et al., 2010). Para essa prova, podem ser empregados microscópios de campo claro, contraste de fase e campo escuro, bem como de ultravioleta (KOZEL, 2013).

Figura 4. Algoritmo de processamento de amostras.



### 9.1. Preparação com Hidróxido de Potássio (KOH)

A presença de material fibroso, esclerótico, proteináceas e pigmentado pode dificultar a detecção dos elementos fúngicos (NEUFELD, 1999). O hidróxido de potássio é capaz de macerar e clarificar as estruturas teciduais sem afetar a integridade fúngica, evidenciando os agentes (RIERA; CELI; THOMPSON, 2017). Para uma boa clarificação, as preparações devem ser deixadas em repouso pelo período de 15-20 minutos, antes da avaliação microscópica (BARREIRO; MAYNOU, 2008). Em alguns casos, pernoites podem ser necessários para uma efetiva clarificação do tecido, principalmente, se este é queratinizado (CHANDLER, 1980). Como os elementos fúngicos, em geral, estão escassamente presentes nos tecidos, aqueles espécimens com regiões sanguinolentas, necróticas, purulentas e caseosas devem ser preferencialmente escolhidos para a prova do exame direto, por apresentarem maior concentração de patógenos (LACAZ, 2002). O aquecimento da preparação na chama do bico de Bunsen ou a adição de dimetilsulfóxido aumentam a capacidade de digestão do KOH (KOZEL, 2013). Quando resultados negativos são obtidos com KOH, preparações a fresco com PAS

ou Calcofluor branco podem ser realizadas, porém a produção de artefatos é a maior desvantagem dessa técnica. (ZAITZ, 2015).

## **9.2. Preparação com Ácido Periódico de Schiff (PAS)**

Tradicionalmente, o ácido periódico de Schiff é empregado em preparações histopatológicas (BARAK; ASARCH; HORN, 2010). No entanto, sua utilização em preparações afresco pode ser tentada, quando o exame direto com KOH for negativo e existir forte suspeita de infecção fúngica (SILVA; ZAROR, 2014). Uma reação com os polissacarídeos da parede celular fúngica produz, especificamente, uma coloração púrpura sobre um fundo verde quando cristais verdes, são empregados como contraste (QUINDÓS, 2015).

## **9.3. Preparação com Calcofluor Branco**

O Calcofluor branco reage especificamente com a quitina da parede celular dos fungos, produzindo uma fluorescência esbranquiçada a esverdeada, quando submetida à luz ultravioleta (CAMPBELL; JOHNSON; WARNOCK, 2013). Uma combinação de KOH e Calcofluor branco pode ser empregada para aumentar a capacidade de detecção de estruturas fúngicas pelo exame direto (ZAITZ, 2015). A pouca capacidade de evidenciar a presença de esférulas e endósporos de *Coccidioides immitis* e a necessidade do uso de microscópio de fluorescência são algumas de suas limitações (BONIFAZ, 2015).

#### 9.4. Preparação com Tinta da China

A visualização de cápsulas de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gatti* em líquido cefalorraquidiano pode ser feita empregando a tinta da china ou a nigrosina (HOWELL; HAZEN; BRANDT, 2015). Efetivamente, esse procedimento não cora as estruturas fúngicas, mas a observação das cápsulas é possível pelo contraste formado entre esses elementos translúcidos e o fundo negro, produzido pela tinta da china (DUARTE, 2018). O exame é considerado positivo quando são detectadas células gemulantes com halos hialinos (HOWEL; HAZEN; BRANDT, et al., 2015). Como numerosos artefatos podem ser introduzidos por diferentes estruturas teciduais (leucócitos, hemácias, células da glia), mimetizando cápsulas de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, montagens com KOH a 10% devem ser procedidas como controle positivo (NEUFELD, 1999).

#### 9.5. Preparação com Giemsa

Preparações com Giemsa são de utilização restrita em micologia médica (Normalmente, esse procedimento é empregado para a evidenciação em sangue periférico de elementos leveduriformes de *Histoplasma capsulatum* que aparecem no citoplasma de polimorfonucleares como células de coloração púrpura envolvidas por halos hialinos (LINDSLEY, et al., 2015). Na realidade, esses halos não são estruturas fúngicas, mas sim artefatos de coloração (SNYDER; ATLAS; LAROCCO, 2011).

#### 9.6. Preparação com Gram

Apesar da preparação pelo Gram ser um procedimento mais aplicado à rotina da bacteriologia, elementos fúngicos gram-positivos podem ser notados por essa

técnica de coloração (SHEA, 2011). As estruturas melhor observadas são leveduras e blastósporos que apresentam um tamanho duas a três vezes maior do que aquele encontrado em cocos (LINDSLEY, et al., 2015). No caso das hifas, estas são menos evidentes, exibem um aspecto granular e são duas vezes mais largas do que os bastonetes (KLIBBER, 2017). Para a evidenciação de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* em líquido cefalorraquidiano, preparações pelo Gram mostram pouca efetividade (OGUNDE et al., 2016).

## 10. CULTURA DO ESPÉCIMEN CLÍNICO

A cultura da amostra clínica segue sendo o método de diagnóstico laboratorial mais utilizado em micologia médica (SIDRIM; ROCHA, 2010). Apesar de mais demorado, o isolamento em cultura permite a identificação em nível de espécie e o estudo *in vitro* da sensibilidade às drogas antifúngicas (ST-GERMAN; SUMMERBELL, 2011). A recuperação primária de fungos pode ser realizada em diferentes meios de cultura e a escolha destes está baseada na suspeita clínica e natureza da amostra (SILVA; NEUFELD, 2006). Meios não-seletivos e seletivos contendo antimicrobianos estão disponíveis e devem ser utilizados em conjunto, a fim de otimizar o isolamento (OPLUSTIL et al., 2010). Os meios não-seletivos permitem o crescimento de qualquer espécie fúngica, inclusive de bactérias, sendo, por isso, mais frequentemente empregados em sítios estéreis (ZAITZ, 2017).

Rotineiramente, são utilizados o ágar de Sabouraud dextrosado (SDA) e o ágar de infusão de cérebro-coração (ágar BHI) com ou sem sangue de carneiro (OLIVEIRA, et al., 2010). Podem ser empregados ainda o ágar sangue, o ágar de Sabouraud com infusão de cérebro-coração (ágar SABHI) acrescido ou não de sangue de carneiro e o ágar de infusão de cérebro-coração bifásico (QUINDÓS, 2015). Quando a amostra clínica enviada ao laboratório é obtida de um sítio não-estéril, meios mais seletivos para a recuperação primária são utilizados com o objetivo de inibir o desenvolvimento de organismos contaminantes (TORTORA; FUNKE; CASE, 2004). Normalmente, esses meios contêm antibacterianos e antifúngicos em diferentes combinações e concentrações. Cloranfenicol, estreptomicina, gentamicina e penicilina são comumente adicionados aos meios de cultura para inibir o crescimento bacteriano enquanto que a cicloheximida (actidione) é utilizada para prevenir o crescimento de fungos contaminantes (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2016).

O ágar de Sabouraud dextrosado com cloranfenicol e cicloheximida (ágar mycosel ou ágar micobiótico) é empregado para isolamento de dermatófitos, de espécimens de pele, pelo e unhas (LIMA, 2007). O isolamento de fungos dimórficos, que frequentemente apresentam um maior requerimento nutricional e outros fungos agentes de infecções invasivas pode ser feito empregando-se o ágar BHI com ou sem sangue de carneiro adicionado de cloranfenicol e cicloheximida. Cloranfenicol

e gentamicina ou cloranfenicol, gentamicina e cicloheximida podem ser ainda acrescentados a esse meio de cultura (GERALDINO et al., 2012). O ágar SABHI também pode ser utilizado nessas mesmas condições (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2016). O uso do ágar extrato de levedura-fosfato acrescido de hidróxido de amônia e cloranfenicol tem sido proposto para a recuperação de *Histoplasma capsulatum* e *Blastomyces dermatitidis* de amostras clínicas pesadamente contaminadas por bactérias (KIBBLER, 2017). Alguns fungos oportunistas agentes de hialohifomicose, feohifomicose, mucormicose e criptococose são sensíveis à cicloheximida, por isso, meios de cultura livres desse antifúngico devem ser também empregados (MALBR, 2016).

Mais recentemente, meios de cultura diferenciais que permitem a identificação de fungos leveduriformes e dermatófitos pela morfologia colonial ou produção de cores ou pigmentos estão disponíveis (SILVA; ALMEIDA, 2003). Esses meios podem ser divididos em cromogênicos e fluorogênicos. Nos cromogênicos, colônias com pigmentação característica são produzidas em decorrência da atividade enzimática do isolado fúngico, que ao degradar certas substâncias presentes nas formulações desses meios, dão origem a compostos que produzem cores (SILVA; ZAROR, 2014). Naqueles fluorogênicos, a atividade de enzimas fúngicas dá origem a compostos fluorescentes. Esses meios, quando empregados para o isolamento primário de leveduras, permitem a identificação de algumas espécies de *Candida* em 24-48 horas (SNYDER; ATLAS; LAROCCO, 2011). O isolamento de *Cryptococcus neoformans* de líquido cefalorraquidiano pode ser conseguido em meios como o ágar semente de niger ou similares que apresentam radicais fenólicos em sua composição e que podem ser oxidados à melanina por ação da enzima fúngica fenol-oxidase, produzindo colônias de *C. neoformans* negras (HOWELL; HAZEN; BRANDT, 2015). O dermatophyt test medium é um meio qualitativo para recuperação de dermatófitos de amostras clínicas baseado na produção de um pigmento avermelhado que se difunde no ágar pela presença do indicador de pH vermelho de fenol (MONWAR, et al., 2017).

O material clínico cru ou tratado previamente deve ser inoculado sob assepsia em um meio de cultura para isolamento primário e incubado a temperatura ambiente ou preferencialmente a 30° C (ARENAS, 2008). Exames diários devem ser realizados para a visualização do desenvolvimento fúngico (BARROSO; MELICO-SILVESTRE; TAVEIRA, 2014). Essa temperatura de incubação (30° C)

deve ser aplicada inclusive para aqueles fungos dimórficos que requerem temperaturas de 35- 37°C para à conversão à fase leveduriforme, pois alguns fungos podem ser inibidos ou se tornar sensíveis aos antimicrobianos acrescentados aos meios primários em temperaturas mais elevadas (GAUTHIER, 2017). Desse modo, quando há suspeita de infecção por um fungo dimórfico, esse deve ser isolado primariamente em sua forma filamentosa a 30° C e posteriormente subcultivado e incubado a 37° C para a obtenção do estado leveduriforme, que é o critério absoluto de diagnóstico para esse grupo (GERALDINO et al., 2012; BONIFAZ, 2015). Ao se suspeitar de um agente fúngico particular, outras temperaturas podem ser também aplicadas. O *Sporothrix schenckii* apresenta um crescimento ótimo em temperaturas de 27-28° C e o *Aspergillus fumigatus* pode crescer a 45° C, por sua termotolerância (GAUTHIER, 2017). A taxa de crescimento fúngico é fortemente dependente de fatores genéticos e das condições de cultivo, por isso, para a maioria dos fungos, o descarte das culturas como negativas é feito depois de 4 semanas de incubação, contudo, no caso do *Histoplasma capsulatum*, as culturas devem ser mantidas por até 12 semanas (CARVALHAES, 2014; CLSI, 2016).

Hemoculturas podem ser realizadas se existe a suspeita de fungemia e infecções fúngicas invasivas (ARAUJO, 2012). O procedimento mais simples é inocular diretamente o sangue centrifugado sobre o ágar BHI e incubar a 30° C (ARAUJO, 2012; MURRAY, 2007). Um melhor isolamento pode ser obtido empregando-se frascos de hemocultura bifásico contendo ágar BHI e caldo BHI (ARAUJO, 2012; ZAITZ, 2017). Esses frascos devem ser ventilados e incubados a 30° C, em posição vertical durante 30 dias (OPOTA, et al., 2015). Todavia, o sistema de lise-centrifugação (*isolator sistem*) e os sistemas de hemocultura automatizados com monitoramento contínuo são os mais sensíveis, sobretudo para o isolamento de *Candida* sp, *C. neoformans/C.gattii*, *H. capsulatum* e *Malassezia* sp amostras de sangue (CLSI, 2012).

Frequentemente, resultados insatisfatórios nos meios de isolamento primário podem ser observados. Terapias antifúngicas prévias e a presença de antimicrobianos nas formulações desses meios podem interferir no crescimento e na produção de estruturas de reprodução (MARTINEZ, et al., 2012). Por isso, subcultivos para meios secundários que promovam uma boa esporulação e permitam o desenvolvimento de características específicas e diferenciais, podem

ser requeridos (SILVA; ZAROR, 2014). Além disso, cultivos em meios secundários, também podem ser necessários para a purificação de culturas ou para a execução de provas bioquímicas ou fisiológicas (MURRAY, 2007). Os meios de cultura mais empregados são o ágar de Sabouraud dextrosado, ágar batata dextrosado, ágar malte, ágar milho, ágar lactrimel e ágar BHI (BONIFAZ, 2015). A inoculação é feita por perfurações no ágar com o auxílio de uma alça de metal dobrada em ângulo reto (alça em L), quando o fungo apresentar uma natureza filamentosa, ou por esgotamento com alça bacteriológica (alça em gota), quando for de natureza leveduriforme (LACAZ, 2002; WEBSTER, 2007). Dependendo do tipo fúngico, a incubação pode ser feita a 30° C ou 37° C. (CLSI, 2012). À semelhança dos isolamentos primários, avaliações diárias devem ser procedidas para a detecção de crescimento e o descarte das culturas negativas deve ocorrer também após 4 semanas (MCGINNIS, 2012).

## 11. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS FÚNGICOS

A recuperação de fungos de amostras clínicas pode ser considerado um procedimento relativamente simples, no entanto, a identificação e caracterização dos organismos, bem como a determinação de sua pertinência clínica é bem mais complexa (TRUJILLO, 2012). De qualquer forma, uma vez que colônias fúngicas tenham sido obtidas de cultivos dos espécimens clínicos, a definição da etiologia pode ser procedida (BERNABÉ; CASTILLO, 2013).

Diversos critérios podem ser empregados no processo de identificação fúngica, contudo, por serem mais estáveis, a micromorfologia reprodutiva e a capacidade de assimilação e fermentação de carboidratos e outros nutrientes são a base para o estudo dos fungos de interesse médico (KIBBLER et al., 2018). A análise das características coloniais como textura, topografia, bordas ou margens, formação de película, produção de pigmentos e tipo de crescimento é de emprego mais limitado porque podem variar em decorrência das condições de cultivo (RICHARDSON; WARNOCK 2012). Todavia, a avaliação macroscópica pode permitir a distinção entre fungos filamentosos (algodonoso) e leveduriformes (pastosos) e a definição da coloração do micélio (hialino e demáceo) (FISHER; COOK, 2001)

A identificação de fungos filamentosos está fundamentalmente apoiada nas diferenças morfológicas das estruturas de reprodução sexuada e/ou assexuada e no modo pelo qual os esporos são formados (DUARTE, 2018). O exame microscópico direto da cultura e o microcultivo em lâmina são as duas técnicas empregadas para o estudo das estruturas reprodutivas (PERES; FIEGENBAUM; TASCA, 2012). Para a realização do exame microscópico direto, um fragmento de cultura fúngica é retirado e colocado entre lâmina e lamínula com um líquido de montagem apropriado (ST-GERMAIN; SUMMERBELL, 2011). Uma análise imediata das características micromorfológicas dos organismos recuperados é a principal vantagem dessa prova (HOFLING, 2016; MINAMI, 2003). A desorganização das frágeis estruturas fúngicas pela manipulação durante a confecção das preparações microscópicas é uma importante desvantagem, pois pode dificultar, ou mesmo impedir, a identificação dos isolados (SILVA, 2006).

No entanto, para uma identificação mais acurada ou quando o exame direto de culturas primárias ou secundárias inconclusivo, pode ser empregada a técnica do microcultivo em lâmina (LUQUE et al.,2017). Essa técnica consiste em se inocular um fragmento de cultura secundária em meios sólidos, previamente depositados sobre lâminas de vidro, contidas em placas de Petri estéreis (MINAMI, 2003; LUQUE, 2017). Após a incubação, o microcultivo é então corado e submetido à inspeção microscópica. A maior vantagem desse procedimento é a manutenção da integridade das estruturas vegetativas e reprodutivas dos fungos que, por não serem manipuladas diretamente, conservam o seu arranjo e disposição originais (OLIVEIRA, 2010). Entretanto, são desvantagens o aumento do tempo de retenção do diagnóstico e o supercrescimento vegetativo que pode impedir a visualização dos elementos de frutificação (LACAZ, 2002). O tipo de líquido de montagem utilizado na visualização microscópica pelas técnicas do exame direto e microcultivo em lâmina irá depender da pigmentação da parede celular dos fungos (MINAMI, 2003). Desse modo, fungos hialinos devem ser examinados com lactofenol com azul de algodão e aqueles demáceos com lactofenol de amann (ST-GERMAN, 2011; QUINDÓS, 2015; KIBBLER, et al., 2018). Outras provas para a identificação de fungos filamentosos e dimórficos incluem testes nutricionais, teste do crescimento em arroz, teste da urease, produção de pigmentos, perfuração de fio de cabelo, taxa de crescimento, resistência à cicloheximida, termotolerância, dimorfismo e demonstração de balistósporos detecção de exoantígeno (KIBBLER, et al., 2018; SILVA; ZAROR, 2014; BONIFAZ, 2015).

Ao contrário dos fungos filamentosos, a morfologia reprodutiva é menos valorizada na identificação dos fungos leveduriformes, pois essas estruturas apresentam pequena diferenciação entre as espécies e pobre significado diagnóstico (RUSSEL; PATERSON; LIMA, 2016). No entanto, alguns critérios microscópicos podem fornecer informações para a caracterização de certos isolados (OPLUSTIL et al., 2010). No laboratório clínico, as provas do tubo germinativo para a identificação de *C. albicans* de produção de hifas verdadeiras, pseudo-hifas, blastósporos, clamidósporos e artrósporos para identificação de *C. albicans*, *Trichosporon* sp, *Blastochizomyces* sp e *Geotrichum* sp são as mais utilizadas (ROBLES; AUSEJO; CAVERO, 2010; ZAITZ, 2015). Outras estruturas também empregadas na identificação de leveduras são balistósporos, ascósporos, basidiósporos e cápsulas. Para a análise da micromorfologia, coloração de Gram,

exames diretos e microcultivo em lâmina podem ser procedidos (CANALLI, 2010). Não obstante o uso de outros critérios, o diagnóstico definitivo dos fungos leveduriformes está baseado em testes bioquímicos e fisiológico (PEMAN; MARTIN-MAZUELOS; CALVO, 2007).

Tradicionalmente, a assimilação de nutrientes hidrocarbonados ou nitrogenados contidos em meios de cultura tem sido utilizada para a caracterização seletiva de leveduras (CARVALHAES, 2014). Métodos auxanográficos manuais, semi-automatizados e automatizados estão disponíveis para identificação de grande número de isolados fúngicos (BARROSO; MELICO-SILVESTRE; TAVEIRA, 2014). A detecção de atividade enzimática em substratos cromogênicos e/ou fluorogênicos, empregando-se ou não sistemas comerciais, tem sido também utilizada para o diagnóstico de diversas espécies de *Candida* de importância clínica (KIBBLER, 2018).

Relacionadas à identificação de *C. neoformans*/ *C. gattii*, estão as provas da urease e urease rápida, bem como das enzimas nitrato-redutase e fenol-oxidase (HOWEL; HAZEN; BRANDT, 2015). A distinção entre *Trichosporon* sp e *Geotrichum* spp também pode ser obtida pela prova da uréase (SIDRIM; ROCHA, 2010). A identificação rápida (4-5 horas) de fungos leveduriformes pode ser procedida com a utilização de métodos que conjugam provas bioquímicas e enzimáticas (LIMPER, et al., 2017).

## 12.HISTOPATOLOGIA

A combinação de histopatologia e cultura de espécimens clínicos representa a metodologia de diagnóstico micológico mais efetiva (BARON et al., 2013; CUENCA ESTRELLA et al., 2006; MACGOWAN, 2011). Em muitos casos, a confirmação da natureza fúngica de uma infecção somente é obtida pela avaliação histopatológica (PEMÁN; MARTÍN-MAZUELOS; CALVO, 2001). Todavia, a caracterização da espécie de fungo envolvida é normalmente feita após o isolamento em diferentes meios de cultivo (MALBR, 2016). Um diagnóstico definitivo pode ser fornecido pelo exame histopatológico, quando estruturas morfológicas típicas de uma determinada espécie são detectadas em tecido (CHANDLER; KAPLAN; AJELLO, 1980). Com base no aspecto tecidual, o diagnóstico de *Lacazzia loboi*, *Coccidioides immitis* s, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Rhinosporidium seeberi* e *Sporothrix schenckii* complexo, pode ser procedido (ZAITZ, 2015).

Uma variedade de colorações tem sido empregada para a detecção de elemento fúngicos em tecido (LEE, et al., 2010). A Hematoxilina e Eosina (HE) é de emprego rotineiro no laboratório de patologia e fornece informações sobre a magnitude do processo inflamatório que normalmente é comum à diferentes etiologias (GUARNIER; BRANDT, 2011). Os fungos podem exibir uma coloração rosácea ou púrpura, entretanto, como a técnica não é específica para esses organismos, muitos não se coram ou se coram pobremente (SANGOI, et al., 2009).

O fenômeno de Splendore-Hoeppli observado em mucormicose e formação de corpos asteroides em esporotricose podem ser revelados pela Hematoxilina-Eosina (ZAITZ, 2015).

Para uma melhor detecção e caracterização da morfologia fúngica, colorações especiais como ácido periódico de Schiff, Gromori-Grocott e Gridley podem ser realizadas (LEE, et al., 2010).

A coloração pelo ácido periódico de Schiff permite a visualização de elementos avermelhados com um satisfatório grau de contraste tecidual (GUARNIER; BRANDT, 2011). A base química da técnica é a reação entre os aldeídos produzidos pela oxidação de grupamentos hidroxila dos polissacarídeos

da parede celular fúngica com o ácido periódico (SANGOI, et al., 2009). Preparações pelo Gromori-Grocott produzem um forte contraste dos elementos fúngicos que apresentam uma coloração amarronzada (GUARNIER; BRANDT, 2011). A deposição de complexos de nitrato de prata reduzidos pelos aldeídos formados pela oxidação dos grupamentos hidroxila na presença do ácido crômico explica a reação (SCHELL, 2000). A prata também é utilizada na técnica de Fontana-Masson que é empregada para a detecção de fungos demáceos, já que produz um forte contraste tecidual ao corar a parede celular desses organismos (FURUTA; HASHIMOTO, 2000). A técnica de Gridley cora as estruturas fúngicas de púrpura sobre um fundo amarelo, também permitindo a pronta visualização de detalhes morfológicos (GUARNIER; BRANDT, 2011). No entanto, diferentemente das outras preparações histológicas, as células não-viáveis não são coradas (LEE, et al., 2010). A coloração de elementos do hospedeiro, bactérias e artefatos diversos, bem como a perda da capacidade de avaliação da resposta tecidual à agressão de patógenos fúngicos e a impossibilidade de definição da pigmentação natural das hifas são algumas das desvantagens dessas técnicas teciduais específicas (SANGOI, et al., 2009).

Apesar de não serem técnicas fungo-específicas, preparações pelo Mucicarmim de Mayer e o azul de Alcian podem ser utilizadas para a evidênciação de cápsula de mucopolissacarídeo de *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* através da produção de coloração avermelhada e azulada, respectivamente. *Rhinosporidium seeberi* e *Blastomyces dermatitidis* podem ser também evidenciados pelo Mucicarmim (GUARNIER; BRANDT, 2011; HOWELL; HAZEN; BRANDT, 2015).

## 13 - MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO NÃO BASEADOS EM CULTURA

### 13.1. Testes Sorológicos

O diagnóstico de infecção invasiva pode ser obtido pela mensuração dos níveis séricos de anticorpos e antígenos fúngicos (KIBBLER, et al, 2018). Basicamente, os mesmos procedimentos sorológicos utilizados para o diagnóstico de infecções bacterianas e virais são empregados em micologia clínica (SILVA; ZAROR, 2014). Em pacientes imunocompetentes, a detecção de anticorpos é enorme valor para o diagnóstico de aspergilose broncopulmonar alérgica, bola fúngica (aspergiloma), candidíases disseminadas, coccidioidomicose, histoplasmose, paracoccidioidomicose e infecção por *Talaromyces marneffe* (FRARE, et al., 2010).

Essas provas podem ainda ser empregadas na determinação do prognóstico e monitoramento da terapia antifúngica (BONIFAZ, 2015). Aglutinação em látex, imunofluorescência indireta, radioimunoensaio, ensaio imunoenzimático têm sido utilizadas, com bastante frequência, na detecção de anticorpos para fungos (CAMPBELL;JOHNSON;WARNOCK, 2013).No entanto, são limitações importantes, a falta de padronização de antígenos e métodos de quantificação de anticorpos, a reatividade cruzada com componentes não-proteicos quando preparados brutos de antígenos são utilizados, a detecção de anticorpos em presença de colonização e ausência de infecção e a impossibilidade de utilização em pacientes com quadros agudos ou que sejam imunocomprometidos (ST-GERMAIN;SUMMERBELL, 2011).

Nos indivíduos onde falhas nos mecanismos de defesa ocorrem como complicações de processos de base ou procedimentos médicos, a detecção de antígenos é mais efetiva e pode fornecer um pronto diagnóstico (ARORA, D; ARORA, B, 2014). Diferentemente dos anticorpos, os antígenos não são dependentes da indução de uma resposta aos agentes fúngicos, por isso, sua detecção não é influenciada pela condição imunológica dos pacientes (SCHELENZ et al., 2015). Essa metodologia tem sido desenvolvida para a maioria das micoses

invasivas, demonstrando grande utilidade no diagnóstico de aspergilose, candidíase, criptococose e histoplasmose (KIBBLER, et al., 2018). O marcador antigênico ideal deve ser de surgimento precoce e não muito transiente, estar associado mais à infecção do que à colonização e limitado ao patógeno de interesse para que reações cruzadas com antígenos humanos e microbianos não ocorram (ST-GERMAIN; SUMMERBELL, 2011).

Dentre os diversos marcadores antigênicos, aqueles relacionados à parede celular fúngica são os mais estudados (HIBBETT et al. 2007). Atualmente, mananas e galactomananas são largamente utilizados para o diagnóstico de candidíases e aspergiloses invasivas, respectivamente (COLE et al., 2017). Outros marcadores também empregados são enolase (antígeno citoplasmático), proteína termo-lábel e polissacarídeos capsulares (MARTINEZ et al., 2012). Anticorpos mono e policlonais têm sido usados para a detecção desses antígenos (RUSSEL; PATERSON; LIMA, 2016).

Comercialmente estão disponíveis para a detecção de mananas séricas o *Pastorex Candida* (BioRad) que é um teste de aglutinação em látex e o *Platelia Candida* (BioRad), um ELISA-Sandwich (MEULEMANS, L. et al..1991; KIBBLER, et al., 2018). Da mesma forma, as galactomananas do soro, urina e lavados broncoalveolares podem ser detectadas pelo *Pastorex Aspergillus* e *Platelia Aspergillus* (HOWELL; HAZEN; BRANDT, 2015). Todavia, características peculiares da antigenemia fúngica podem restringir o uso dessas técnicas (LUQUE et al., 2017). A remoção de antígenos da circulação pela formação de imunocomplexos e pela endocitose das células de Kupffer do fígado e o fato de determinadas infecções fúngicas nem sempre estarem associadas aos mesmos antígenos são alguns dos aspectos restritivos (COLOMBO, 2007).

### **13.2. Detecção de Metabólitos Não-Antigênicos**

A detecção de 1,3- $\beta$ -D-glucana sérica é outra estratégia de diagnóstico que tem sido proposta. A 1,3- $\beta$ -D-glucana é um componente da parede celular

fúngica que pode ser liberada em circulação durante a infecção invasiva (TANGARIFE CASTAÑO. et al., 2015). Sistemas comerciais (Fungitec G Test; Seikagaku Corp., Tóquio, Japão) podem detectar a presença desse elemento no soro de pacientes com aspergilose, candidíase, pneumocistose e infecções por *Acremonium* sp, *Fusarium* sp e *Trichosporon* sp (ZAITZ et al., 2015). O método depende da ativação pela glucana do fator G que é um componente do fator de coagulação do *Limulus polyphemus* (HUTCH, et al, 2017). Resultados positivos funcionam apenas como marcadores de infecção, já que essa prova não permite a identificação da espécie fúngica envolvida (HOWEL; HAZEN; BRANDT, 2015). Devido à ausência ou a pequena quantidade de 1,3-β-D-glucana na parede celular de Zygomycota e *Cryptococcus neoformans/Cryptococcus gattii* os resultados encontrados são frequentemente negativos (SHA; XESS; JAIN; 2009).

O D-arabinitol é um metabólito produzido por espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*) em cultura e em tecido (SENDIB et al., 2003). A detecção de D-arabinitol sérico e urinário por cromatografia gasosa e métodos enzimáticos comerciais (NacalaiTesque, Kyoto, Japão) tem sido utilizada como marcador para candidíases invasivas (KIBBLER et al., 2018). Em decorrência de alterações na função renal, as concentrações séricas de D-arabinitol fúngico e L-arabinitol e creatinina dos pacientes devem ser criteriosamente mensuradas (SILVA; ZAROR, 2014). Um outro metabólito produzido em grande quantidade por diferentes fungos é o manitol. Como o *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger* *C. neoformans/ Cryptococcus gattii* produzem altos teores de manitol em cultura (HOWEL; HAZEN; BRANDT, 2015). A utilidade dessa substância como marcador de infecção fúngica invasiva tem sido avaliada (Infecções experimentais por *A. fumigatus* e *C. neoformans/ C. gattii* em animais de laboratório têm mostrado taxas elevadas de manitol nos tecidos, líquido cefalorraquidiano e outros fluidos orgânicos (GARDEWEG, 2012; ROBLES; AUSEJO; CAVERO, 2007).

### 13.3. Detecção de Ácidos Nucléico

A aplicação de técnicas moleculares no diagnóstico de infecções fúngicas invasivas tem sido também avaliada (LUQUE et al., 2017). Como essas técnicas podem fornecer um rápido e acurado diagnóstico, diversos protocolos para a detecção de DNA fúngico em tecidos, fluidos corporais e lavados broncoalveolares empregando PCR foram desenvolvidos (EKER et al., 2010). Esses protocolos podem incorporar iniciadores universais para a detecção de genes que estejam presentes nos fungos (PCR pan fúngico), permitindo seu uso como um marcador de infecção invasiva, bem como iniciadores específicos para a detecção de genes presentes em uma determinada espécie (PCR específico) (MALBR, 2016). Contudo, a realização de PCR pan fúngico tem sido uma tendência na maioria dos estudos (LUQUE et al., 2017). A amplificação de sequências altamente conservadas em todos os fungos, apesar de menos específica, tem se mostrado extremamente mais sensível (MOYA, 2017). A hibridização com sondas espécie-específicas permite a identificação do produto amplificado em nível de espécie (EKER et al., 2010). O recente desenvolvimento do PCR em tempo real tem permitido uma rápida amplificação com quantificação da carga fúngica e redução da contaminação (RUSSEL; PATERSON; LIMA, 2016). As limitações para uso das provas moleculares no laboratório de micologia clínica estão principalmente relacionadas a dificuldades de execução da metodologia e à falta de padronização e validação dos protocolos (SANDHU, 1995; MANCINI et al., 2010).

### 13.4. Diagnóstico por Imagem

Tradicionalmente, o diagnóstico laboratorial de infecções por *Aspergillus* spp é feito pela detecção de elementos fúngicos no tecido e pelo isolamento em cultura (GUARNIER; BRANDT, 2011). No entanto, a demora na caracterização da etiologia e a baixa sensibilidade dos métodos micológicos convencionais têm sido

importantes limitações no grupo dos pacientes imunocomprometidos, onde a aspergilose invasiva pode apresentar taxas de mortalidade de até 100% (SILVA; ZARCOR, 2014). Por sua possibilidade de utilização precoce e relativa especificidade dos achados radiográficos, o diagnóstico por imagem tem sido proposto (BONIFAZ, 2015). Dentre os processos patológicos produzidos pelo *Aspergillus* spp, podem ser definidos radiologicamente o aspergiloma, a aspergilose broncopulmonar alérgica, a aspergilose invasiva de vias aéreas, a aspergilose crônica necrosante e a aspergilose angioinvasiva (HOWELL; HAZEN; BRANDT, 2015). As imagens em tomografia computadorizada mais indicativas de infecção pulmonar invasiva são o sinal do halo e o sinal do crescente aéreo (ZAITZ, et al., 2015). O sinal do halo é caracterizado por um halo periférico com densidade aumentada (baixa atenuação) circundando uma área de opacidade nodular e que surge normalmente em uma fase inicial da infecção (KIBBLER, et al., 2018). Essa imagem corresponde a lesão fúngica central com hemorragia e necrose em seu bordo (SCHELENZ et al., 2015). A separação dos fragmentos hemorrágicos e necróticos das áreas adjacentes do parênquima pulmonar pela ação de polimorfonucleares resulta em cavitação cuja manifestação radiológica é o sinal do crescente aéreo (KOZEL; WICKES, 2013). Na tomografia computadorizada, o sinal do crescente aéreo se apresenta com um halo hipodenso (hiperluciente) entorno da opacidade original (LUQUE et al., 2017). Esse achado é frequentemente observado durante o período de convalescença (2-3 semanas após iniciado o tratamento) e é concomitante com a resolução da neutropenia. (SCHELENZ et al., 2015; LUQUE et al., 2017). A tomografia computadorizada e a ressonância magnética têm sido também importantes instrumentos para o diagnóstico da sinusite alérgica fúngica (KIBBLER, et al., 2018).

## 14.QUALIDADE NO LABORATÓRIO DE MICOLOGIA

### 14.1 – Introdução

Qualidade é uma combinação de procedimentos que tem por objetivo assegurar que todos os insumos, processos, equipamentos e pessoal envolvido estejam trabalhando dentro de padrões adequados de confiabilidade, gerando resultados corretos e estabelecendo uma relação custo-consumo dentro do esperado (FISHER; COOK, 2001).

Os programas de qualidade asseguram que os resultados sejam precisos, confiáveis e reproduzíveis, monitorando todos os fatores continuamente, e identificando as possíveis áreas que necessitam de melhorias (PEMÁN; MARTÍN-MAZUELOS; CALVO, 2007).

O grande objetivo de um sistema de qualidade é proporcionar condições necessárias para o aprimoramento dos processos, estabelecendo melhorias (OPLUSTIL et al., 2010).

Os processos estão divididos nas fases: pré-analítica, analítica e pós-analítica (ABOL, 2016).

Fase pré-analítica: contempla a elaboração de manuais de instrução, Pops (Procedimentos Operacionais Padrões), por exemplo, onde itens como coleta, conservação, transporte, prazo, critérios de preparo do paciente para alguns procedimentos, raspado, por exemplo, critérios para aceitação e rejeição de amostras e dados dos procedimentos para futura rastreabilidade (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA 2017).

Fase analítica: garantia da qualidade técnica dos colaboradores, por meio de equipamentos de proteção (EPI e EPC), harmonização com a CCIH (muito importante para as questões epidemiológicas, principalmente no trato de relato de

resultados), procedimentos analíticos e controle de dados, controle dos equipamentos, controle dos insumos (CLSI, 2015). É a fase onde os procedimentos são executados, podendo ocorrer a monitoração do Controle de Qualidade Interno (CIQ) e do Controle Externo de Qualidade (CEQ), por meio dos ensaios de proficiência ou de Avaliação Externa de Qualidade (AEQ), onde no AEQ é feita uma avaliação inter-laboratorial (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2017; VIEIRA et al., 2011).

Fase pós-analítica: fase em que os resultados são obtidos e ocorre a formação e liberação do laudo para interpretação pelo médico solicitante (ABOL, 2016; RICÓS, GARCIA-VICTORIA, FUENTE, 2004).

## **14.2. Controle da Qualidade**

Com a necessidade de controlar, monitorar, avaliar e de obter uma melhora contínua, fica estabelecida a importância do Conceito de Qualidade em um laboratório, permitindo gerar resultados eficientes, rastreáveis e confiáveis para o médico e o paciente (BRASIL, 2013). Esse monitoramento é realizado por meio de Controle Interno e Controle Externo da Qualidade (PEMÁN; MARTIN-MAZUELOS; CALVO, 2007).

Tendo em vista a importância desses cuidados, os programas de Controle da Qualidade são desenhados para que padrões adequados sejam obtidos, onde as informações dos procedimentos realizados em um laboratório sejam acuradas e fidedignas (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2001).

Para o funcionamento, é importante que o laboratório esteja vinculado a um Programa da Qualidade Laboratorial, com o objetivo de revalidar suas atividades (MURRAY, 2007). Portanto, um Controle Interno e Externo da Qualidade determina

qualidade ao funcionamento de um laboratório (BARBOSA et al., 2015; SIDRIM; ROCHA, 2010).

Toda atividade em um Laboratório de Micologia, em qualquer laboratório de Análises clínicas, deve ser padronizada e as metodologias escritas em manuais e protocolos acessíveis aos usuários, com o objetivo de esclarecer qualquer dúvida pertinente aos procedimentos aplicados, evitar erros laboratoriais e administrativos, treinar a equipe e viabilizar a correta execução dos exames (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2000). A maior vantagem de se utilizar o recurso de controle é o baixo custo de implantação e de personalização técnica. Para que esses registros sejam seguidos, é necessário respeitar um formato padrão, de linguagem clara, didática e técnica conhecido como Procedimento Operacional Padrão (POP), onde o formato é estabelecido pela unidade e revisado anualmente, pelo laboratório, sendo o mesmo ajustado até se conformar aos critérios determinados pelos revisores (ANDRIOLO et al., 2010; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2001).

### **14.3. Controle Interno de Qualidade (CIQ)**

Um dos grandes focos de atenção do CIQ é avaliar a qualidade dos insumos que são utilizados, rotineiramente, no laboratório, pois a partir de atestada a qualidade, os mesmos serão liberados para utilização (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2000). Um exemplo é a utilização de cepas conhecidas, assegurando a correta manutenção dos meios de culturas (OPLUSTIL et al., 2010). Igualmente, atenção deve ser dada aos equipamentos utilizados no processamento das amostras e também ao pessoal operacional, pois uma educação continuada resulta em menos erros de execução de procedimentos, direcionando para um melhor índice de acertos (VIEIRA, 2012). Esse conjunto de cuidados assegura qualidade para obtenção de resultados mais fidedignos para o paciente ajudando o

clínico a chegar a um diagnóstico correto e viabilizando um tratamento adequado para os pacientes (CHAVES et al., 2016).

#### **14.4. Controle Externo da Qualidade (CEQ) / Ensaio de Proficiência**

O Ensaio de Proficiência tem grande importância no monitoramento dos processos e das medidas de gestão (ISO, 2017). Junto com o Controle Interno da Qualidade e Controle Externo garantem o bom funcionamento de todos os ensaios, sendo uma grande ferramenta utilizada para o monitoramento da garantia da Qualidade, gerando, inclusive melhoria continuada, pois trabalha na fase analítica de cada processo (OLIVEIRA, 2010).

Com o objetivo de avaliar o desempenho dos laboratórios, por meio de comparações entre diversos participantes, a fim de calcular uma média de resultado, amostras são enviadas a múltiplos laboratórios e com a avaliação de suas análises obtém-se relatórios com resultados gerais esperados e explicativos, contribuindo para verificar possíveis desvios e, principalmente, para uma educação continuada (LOUSANA, 2005).

É fato que o resultado errado de um exame tem grande influência no tratamento do paciente, podendo gerar sérias consequências na conclusão e interpretação do diagnóstico de uma enfermidade; podendo inclusive gerar ações judiciais (ZAITZ, 2015). Devido a isso, a avaliação e o monitoramento dos ensaios são de grande importância na área de diagnóstico (CHAVES et al., 2016).

Estar vinculado a um Programa Externo da Qualidade é fundamental para garantir a avaliação de desempenho de sistemas analíticos e isso é realizado por meio de ensaios de proficiência (MURRAY, 2007).

É muito importante a comparação dos resultados dos controles, pois quando observada discrepâncias, ações corretivas devem ser tomadas imediatamente.

Essas amostras devem ser integradas à rotina laboratorial e analisadas normalmente (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2001). É de suma importância também a interação da equipe, incorporando e entendendo o propósito do programa de Ensaio de proficiência e avaliação, principalmente, por parte do gestor do laboratório, dos relatórios gerados pelo programa, buscando melhorias, caso o resultado seja não conforme (OLIVEIRA 2010).

Toda amostra submetida ao teste de proficiência deve ter, pelo menos, 80% de acerto, para ser considerado um resultado desejável (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2001).

#### **14.5. Procedimento Operacional Padrão (POP)**

O fundamento principal dos Procedimentos Operacionais Padrões (Pops) é alcançar a uniformidade na execução de uma função ou metodologia específica. Portanto, é um componente vital para gerenciamento de qualidade (HATTEMER-APOSTEL, 2001).

O POP deve ser escrito de forma clara e detalhada com o objetivo de gerar uma uniformidade no serviço para que o mesmo seja realizado facilmente, permitindo que haja rastreabilidade nas etapas (HATTEMER-APOSTEL, 2001; LOUSANA, 2005). (PILONETTO M; PILONETTO, D.V, 1998).

A importância do POP está no rastreamento dos processos, fazendo um mapeamento de cada etapa específica, contemplando todos os passos para a realização deste (VIEIRA et al., 2011).

Para a elaboração de um POP uma série de etapas deve ser cumprida, como, presença de cabeçalho contendo o tipo de documento, título, código, logotipo da instituição, objetivo, abreviações, revisores (CLSI, 2015) É de grande importância o envolvimento de profissionais nas etapas de cada tarefa, uma vez que assim possibilita a melhor forma de padronizar o serviço, pois viabiliza, facilita e torna o POP mais eficiente (LOUSANA, 2005).

Os Pops devem ser assinados, datados, revisados pelo responsável técnico ou responsável pela operação do serviço e com o intuito de implementar, monitorar e avaliar o serviço (BRASIL, 2002).

#### **14.6. Laboratório de Referência**

É comum o laboratório possuir limitações para determinados procedimentos / exames, portanto, é fundamental que exista um contato com um laboratório de referência, onde amostras de microrganismos de referências, perfis atípicos e outras dúvidas analíticas possam ser resolvidas (SILVA; NEUFELD, 2006).

#### **14.7. Acreditação**

É muito importante o laboratório estar associado a um Programa de Acreditação, pois por meio desse é atestado à competência técnica e do sistema de gestão, com foco, no caso, nas práticas laboratoriais, buscando atualização científica e tecnológica, permitindo ter, como resultado, redução da variabilidade e do desperdício (CHAVES et al., 2016; SPPC/ML, 2018).

#### **14.8. Controle de Meios de cultura**

A padronização dos meios de culturas, tem por objetivo proporcionar rastreabilidade de todas as variáveis que possam impedir contaminações, fornecendo ferramentas que permitam que resultados confiáveis sejam obtidos (VIEIRA et al., 2011).

Para o meio de cultura preparado no laboratório deve ser estabelecido um documento de preparação (POP), indicando, com detalhes, todo o processo de fabricação e como o controle da qualidade deve ser realizado, indicando, inclusive, quais cepas de referências devem ser utilizadas (OPLUSTIL et al., 2016).

No caso de meios de culturas comerciais, uma inspeção no recebimento e a observação do cumprimento dos critérios da qualidade, como: resultados dos testes de esterilidade e fertilidade devem ser verificados (OPLUSTIL et al., 2016; MURRAY, 2007).

Todo meio de cultura utilizado no laboratório de micologia deve passar por rígidos testes de esterilidade e viabilidade (quadro 4), conforme recomendação de instituição de padronização (CLSI, 2015). O teste de esterilidade atesta que o meio de cultura está livre de possíveis contaminantes e a viabilidade / teste de fertilidade (Capacidade nutritiva dos meios de cultura), atesta a capacidade de permitir o crescimento dos micro-organismos a que se destina (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010).

Os controles de qualidade mais exigentes ficam a cargo do fabricante, que são os fornecedores dos reagentes utilizados, onde os mesmos atestam por meio de um índice decrescente de rejeição, o padrão da qualidade da fabricação (RIGHETTI; VIEIRA, 2012).

**Quadro 4. Procedimentos para a execução dos testes de esterilidade e viabilidade dos meios de cultura:**

<p><b>*Teste de esterilidade</b> Testar cada meio de cultura para verificar a esterilidade.</p>	<p>Também conhecido como <b>Controle Negativo</b>. Incubar, por 24 horas, na temperatura adequada. Não deve haver crescimento de micro-organismo <b>Resultado esperado:</b> ausência de crescimento de micro-organismos.</p>
<p><b>*Teste de Fertilidade / Viabilidade</b> Capacidade nutritiva dos meios de cultura</p>	<p><b>Meio de Cultura Líquido:</b> inocular menos de 100 UFC do micro-organismo teste no meio de cultura indicado. Incubar à temperatura adequada e observar o crescimento visível comparando com um controle branco do mesmo meio.</p> <p><b>Meio de Cultura Sólido:</b> inocular cada placa contendo o meio de cultura indicado com menos que 100 UFC do micro-organismo teste (cepas ATCC). Incubar à temperatura adequada e comparar o crescimento que não deve ser inferior a 50% em relação ao inóculo padronizado.</p>

FONTE: Farmacopeia Brasileira 5ª edição / ANVISA

Obs.: caso não seja possível a utilização de cepas do tipo ATCC, usar cepas conhecidas, com 100% positivas para as características que conferem qualidade a mesma (CRUZ, 2016).

#### 14.9. Coleção de culturas de fungos

Coleção de culturas são fundamentais para o setor de micologia, pois fornece auxílio na classificação dos fungos isolados na rotina laboratorial, permitindo reprodutibilidade acertada e favorecendo o rastreamento de possíveis erros de identificações, onde através de mecanismos de comparações das colônias isoladas

com as colônias padrões viabiliza a reprodutibilidade de lâminas e execução de microcultivo, favorecendo o treinamento do pessoal técnico e ensaios controles (MURRAY; CALVO,2007).

É muito importante que as cepas utilizadas sejam de fontes confiáveis e de referência, como ATCC e CECT (CRUZ, 2016). Existem algumas exigências para a manutenção de uma Micoteca de cultura de fungos, como, estabilidade, armazenamentos e conservação das cepas, permitindo a reprodução dos resultados (CRIZ, 2016). O armazenamento adequado é muito importante e processos como o congelamento a  $-70^{\circ}\text{C}$  e a liofilização são práticas comuns para evitar possibilidade de mutações, que inviabilizaria o uso (OLIVEIRA, 2010; PEMÁN; MARTIN-MAZUELOS; CALVO, 2007).

## 15 ATLAS DE ILUSTRAÇÕES FÚNGICAS – MICROMORFOLOGIA

### DERMATÓFITOS (*Tinea* ou *tinha*)

Fungos septados hialinos que parasitam a pele, pelos e unhas

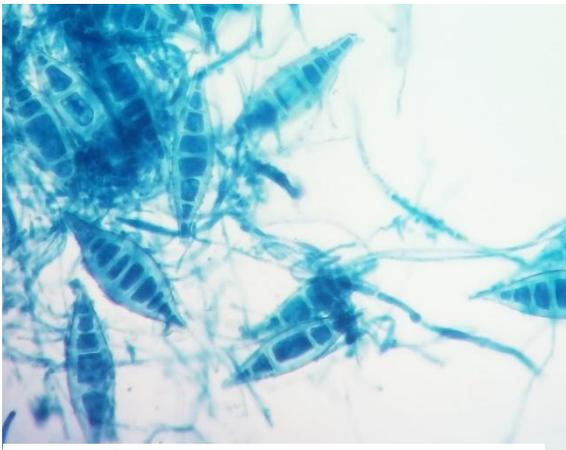


Figura 5 - *Microsporum canis*

**COLÔNIA:** Planas com textura algodonoosa/ penugenta podendo tornar-se arenosa e com sulcos radiais. Coloração de branco a creme com frequente produção de pigmento amarelo. Reverso com cor branco-amarelo. Possuem um Crescimento rápido.

**MICROSCOPIA:** Hifas hialinas septadas Macroconídios fusiformes com parede espessa, rugosa e ângulo fechado. Microconídios clavados a piriforme e sendo produzidos de forma sésil ao longo das hifas.

**PATOGENICIDADE:** Frequente causador de tinha do pelo e de pele glabra (*tinha capitis* e *tinha corporis*). Agente zoofílico e faz parasitismo ectothrix no pelo. Agente de dermatofitose.



Figura 6 - *Microsporum gypseum*

**COLÔNIA:** Apresentam textura penugenta e com o tempo torna-se plana e granular. Pode apresentar um aspecto franjado ou não na borda. Cor variando de branca a bege. Reverso apresentando um pigmento com característica pardacenta.

**MICROSCOPIA:** Hifas hialinas septadas. Macroconídios fusiformes e largos, menos cilíndricos, com característica de apresentar menos de 6 células e tendo como outra característica extremidades arredondadas e parede delgadas e rugosas que se formam isoladamente nos conidióforos. Microconídios formados diretamente na hifa vegetativa podendo ser também em pequenos e característicos conidióforos.

**PATOGENICIDADE:** Causa de *tinha corporis* e *capitis*. Agente geofílico. Parasitismo ectothrix no pelo. Agente de dermatofitose.

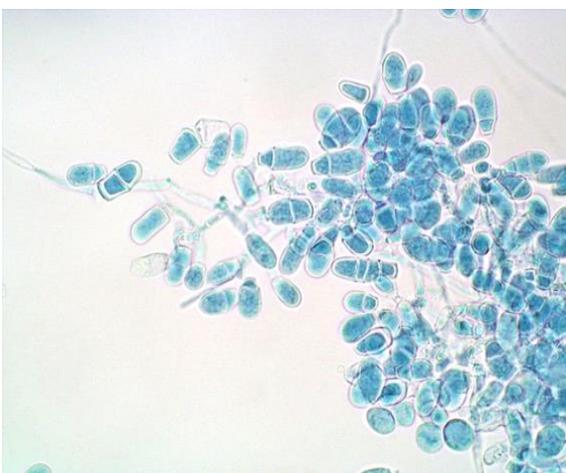


Figura 7- *Microsporum nanum*

**COLÔNIA** Algodonosa, inicialmente branca assumindo coloração amarelo. Reverso marrom-vermelho.

**MICROSCOPIA:** Hifas hialinas e ramificadas. Conídios grandes (macroconídios) ovoides ou piriformes, com um ou dois septos e paredes rugosas são produzidos. Microconídios piriformes são escassos ou ausentes.

**PATOGENICIDADE:** Raramente esses fungos fazem infecções em humanos.

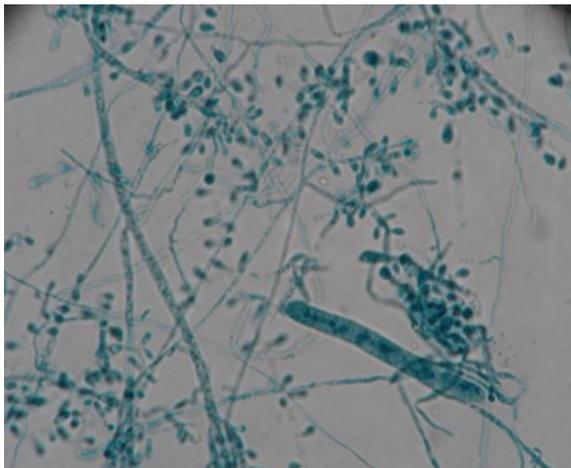


Figura 8 - *Trichophyton rubrum*

**COLÔNIA:** Textura inicialmente algodoadosa, aveludada ou granular e centro elevado. Colônias brancas, rosadas ou vermelhas e reverso com perfeito anel avermelhado ou rubro.

**MICROSCOPIA:** Hifas septadas e hialinas os macroconídios são esparsos, em forma de charuto, multicelulares; parede fina e lisa. Microconídios abundantes, fusiformes, simples, sésseis, formados diretamente no lado lateral das hifas.

**PATOGENICIDADE:** É um dos dermatófitos mais isolados. É causa de *tinea corporis* (corpo), *tinea cruris* (região crural), *tinea pedis* (pé) e *tinea manuum* (mãos). Infecta pêlos, pele e unha. Agente antropofílico. Parasitismo (raro) endothrix ou ectothrix no pelo.

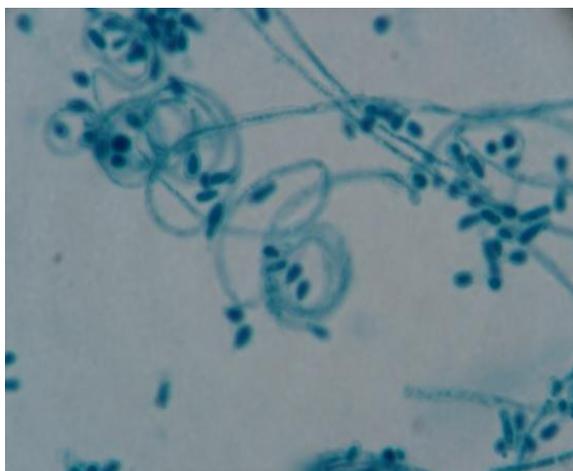


Figura 9 - *Trichophyton mentagrophytes*

**COLÔNIA:** Apresenta textura penugenta a pulverulenta (isolados antropofílico) ou granular (isolados zoofílico). Pigmentação variável de branco-amarelado ao castanho-avermelhado. Reverso pode apresentar cor creme, porém algumas cepas podem apresentar um reverso marrom-amarelado ou marrom-avermelhado (zoofílico) ou uma coloração de amarelo-claro a alaranjado (antropofílico).

**MICROSCOPIA:** Escassos macroconídios em forma de charuto ou taco, multisseptados, parede delgadas e lisas. Microconídios piriformes, formados diretamente na hifa ou em pequenos conidióforos. Presença frequente de hifas com aspecto característico em espiral.

**PATOGENICIDADE:** Dermatófito causador de *tinea pedis*, onicomicoses e de *tinea cruris*. *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* (zoofílico) *T. mentagrophytes* var. *Interdigitale* (antropofílica). Faz um raro parasitismo ectothrix no pelo.

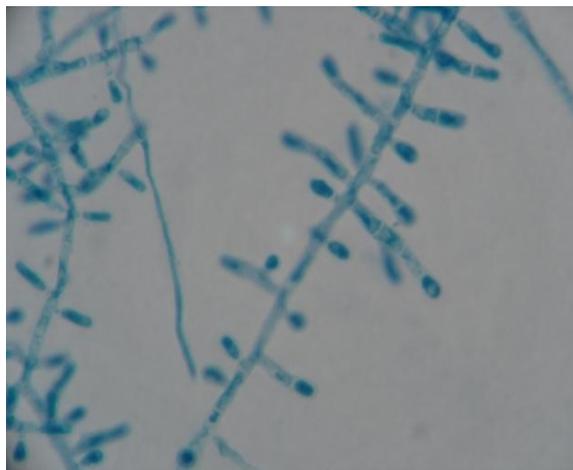


Figura10- *Trichophyton tonsurans*

**COLÔNIA:** Grande variedade de tipos de colônias, variando cor e textura de superfície. Geralmente, textura algodoadosa ou aveludada. Na medida em que a colônia se desenvolve podem ser formados sulcos radiais e dobras e, eventualmente, uma topografia cerebriforme. Cor branca a bege / canela e reverso com pigmento vermelho-ferruginoso.

**MICROSCOPIA:** Hifas hialinas septadas. Microconídios claviformes ou aspecto de gota, lateralmente em hifas diferenciadas. Macroconídios irregular, multisseptados, com paredes espessas ou ausentes.

**PATOGENICIDADE:** Principal dermatófito responsável por infecções em couro-cabeludo e, algumas vezes, em pele glabra. Agente antropofílico e faz parasitismo endothrix no pelo.

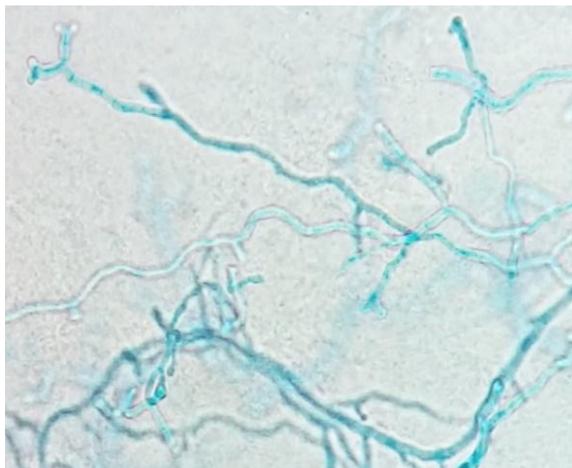


Figura11- *Trichophyton schoenleinii*

**COLÔNIA:** Topografia pregueada, podendo assumir um aspecto sulcado inicialmente lisa, apresentando cerosa. Após repiques e incubação prolongada pode tornar-se aveludada. Colônias inicialmente brancas passando a creme depois de envelhecidas.

**MICROSCOPIA:** Hifas com ramificações de diâmetro irregular que terminam em dilatações distais denominadas de candelabros fávicos. Macro e microconídios são totalmente ausentes.

**PATOGENICIDADE:** Agente etiológico da *tinea favosa* ou *favus*, uma infecção que tem como característica a formação de escútulas que são um acúmulo de hifas e detritos. Também são agentes de infecções em couro cabeludo fazendo um parasitismo endothrix. Agente antropofílico.



Figura 12 - *Trichophyton verrucosum*

**COLÔNIA:** Inicialmente lisa, cerosa apresentando topografia pregueada, podendo assumir um aspecto sulcado. Após repiques e incubação prolongada pode tornar-se aveludada. Colônias inicialmente brancas, depois de cor creme. Crescimento lento

**MICROSCOPIA:** Hifas hialinas septadas e tortuosas com sucessão de clamidoconídios intercalares. Macro e microconídios não são frequentes, mas quando produzidos apresentam paredes lisas, largos e filamento terminal e os microconídios são claviformes.

**PATOGENICIDADE:** Dermatofito causador de *tinea corporis* e *tinea capitis*. A formação de kérion é muito comum. Parasitismo ectothrix no pelo.

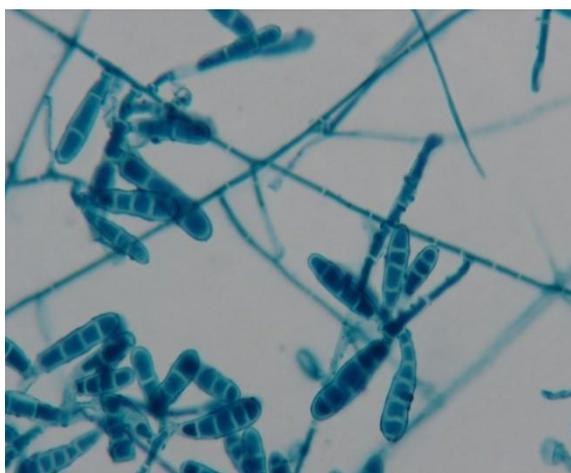


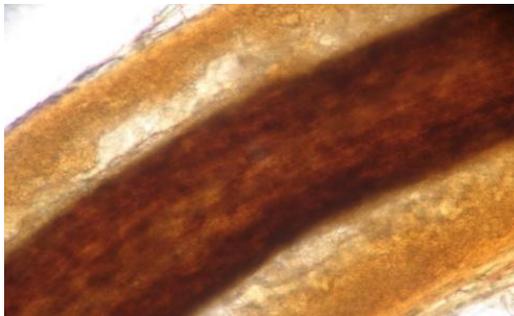
Figura 13 - *Epidermophyton floccosum*

**COLÔNIA:** Brancas, escassa e inicialmente membranosa com um pregueado no centro e uma periferia franjada, fina e achatada. Depois passa a ter um aspecto pulverulento, dependendo da produção de conídios, e torna-se algodosa (pleomorfismo). Cor verde-oliva, amarelo-mostarda ou kaqui com uma franja amarelada. Reverso marrom-amarelado ou podendo também apresentar-se como laranja amarelado

**MICROSCOPIA:** Hifas septadas, hialinas e ramificadas. Numerosos macroconídios em forma de "taco" com parede fina e lisa, solitários ou em grupos. Microconídios ausentes e presença de abundante de clamidoconídios formados em colônias maduras

**PATOGENICIDADE:** Dermatofito associado a infecções cutâneas, particularmente *tinea cruris* e pé.

## PARASITISMO NO PÊLO



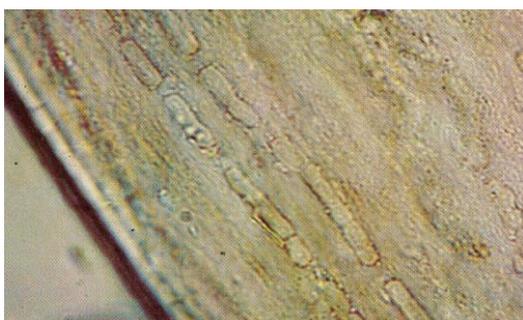
**Figura 14 - Parasitismo Ectotrix**

Tinea capitis tonsurante ectotrix. Arthroconídios fora do pelo. Agentes comuns: *Microsporum canis*, *Microsporum mentagrophytes*.



**Figura 15- Parasitismo Endotrix**

Tinea capitis tonsurante endothrix. Arthroconídios dentro do pelo. Agentes envolvidos: *Trichophyton tonsurans* e *Trichophyton violaceum*.



**Figura 16 - Tinea Favosa**

Crescimento hifático e formação de espaços aéreos (Hifas fantasmas) dentro do pelo. *Trichophyton schoenleinii*

## HIALOHIFOMICETOS

São fungos filamentosos hialinos e com hifas septadas.

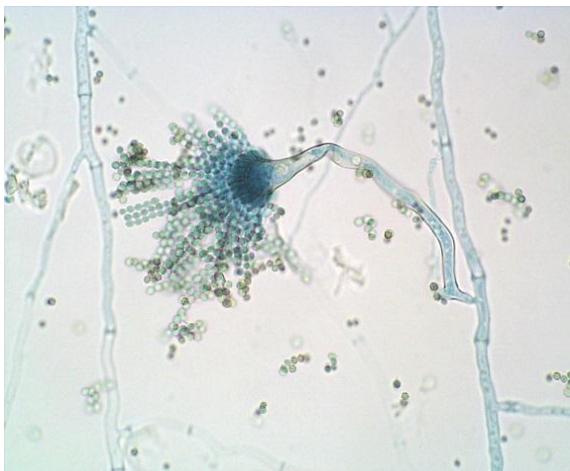


Figura 17 - *Aspergillus fumigatus*

**COLÔNIA:** Textura algodonoso a veludosa. Topografia plana. Coloração branca a cinza-esverdeada. Reverso creme a castanho. Crescimento rápido.

**MICROSCOPIA:** Hifas ramificada com conidióforo liso. Possuem uma única cadeia de fiálides originada da metade superior de uma vesícula em forma de cúpula de onde são produzidas cadeias de conídios agrupados colunarmente e também compactos.

**PATOGENICIDADE:** É o mais frequente agente oportunista de aspergilose em humanos, sendo responsável pela maioria das infecções graves, como: infecção pulmonar, aspergiloma (bola fúngica) alergias, sinusites, onicomicoses. Agente de hialohifomicose.

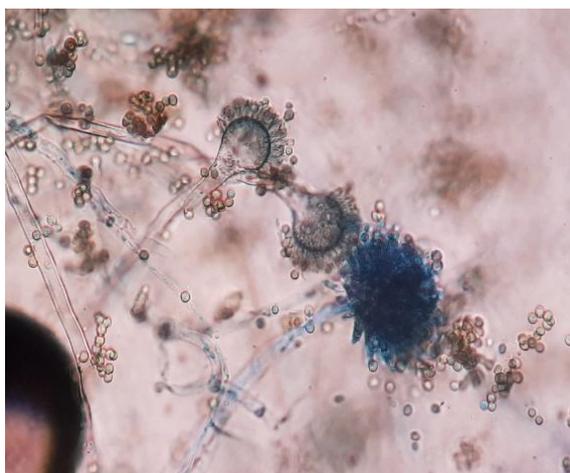


Figura 18 - *Aspergillus flavus*

**COLÔNIA:** Textura inicialmente algodonoso que ao amadurecer desenvolve aspecto arenoso. Topografia plana e rugosas. Cor amarelo, amarelo-esverdeado ou amarelo-castanho. Reverso de incolor a castanho-amarelado. Esses fungos possuem um crescimento rápido

**MICROSCOPIA:** Cabeça conidial frouxamente radiadas, e células conidiogênicas, bisseriada e colunar. Vesículas globosas e rugosidade presentes no conidióforo.

**PATOGENICIDADE:** Agente causador de infecções pulmonares, sinusite, grande produtor de toxina (aflotoxinas) onicomicoses. Agente de hialohifomicose.

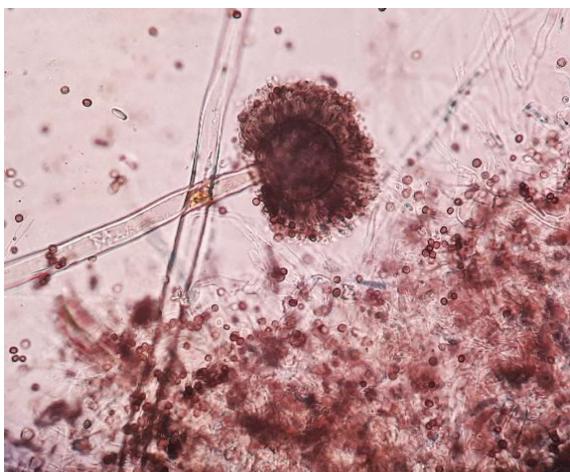


Figura 19 - *Aspergillus niger*

**COLÔNIA:** Textura inicialmente algodonosa e com o tempo, devido aos esporos negros, torna-se granulosa. Colônias planas e com coloração castanho escuro (borra de café). Reverso amarelo claro a castanho. Crescimento desse fungo é considerado rápido.

**MICROSCOPIA:** Cabeça conidial radiada com fiálides uni ou bisseriada, marrom-escuras a negras, cobrindo a superfície da vesícula esférica com presença de conídios com características rugosos.

**PATOGENICIDADE:** Agente causador de aspergiloma, infecções cutâneas, pulmonar, otites, principalmente em pacientes imunocomprometidos.

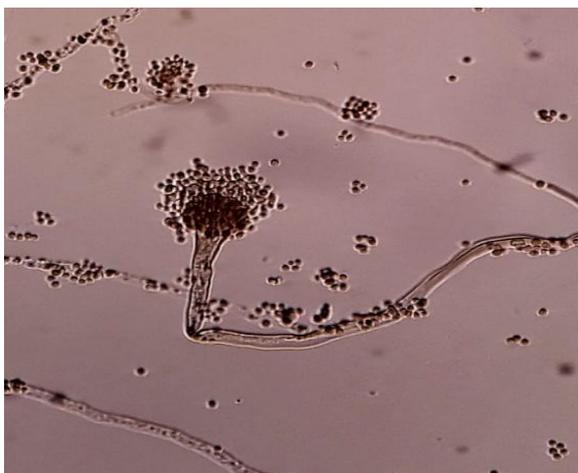


Figura 20 - *Aspergillus nidulans*

**COLÔNIA:** Textura penugenta para arenosa. Colônias verde escuro na superfície e Reverso incolor. Crescimento moderadamente rápido.

**MICROSCOPIA:** Cabeça conidial pequena, colunar e compacta. Conidióforo escuro. Fiálide bisseriada limitada a superfície superior da vesícula.

**PATOGENICIDADE:** Ocasionalmente podem causar infecções pulmonares em pacientes imunocomprometidos, sendo agente de infecção oportunista. Casos de sinusite e otomicose são relatados.

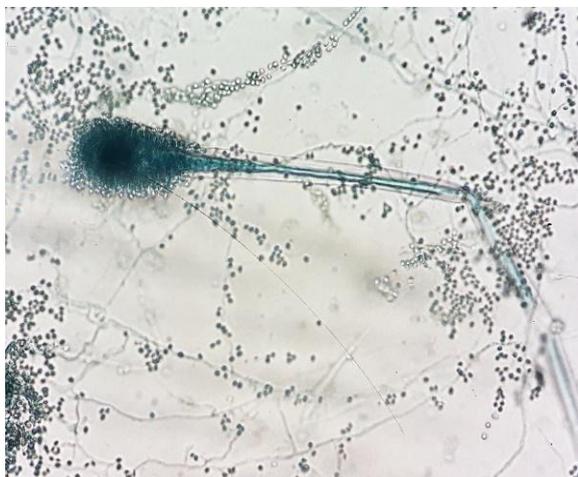


Figura 21 - *Aspergillus clavatus*

**COLÔNIA:** Textura arenosa, densas, planas e radiadas com aspecto sulcado. Colônias com coloração verde escura, acinzentada. O Reverso pode apresentar uma ausência de coloração (incolor) ou ser amarelo escuro.

**MICROSCOPIA:** Cabeça conidial radiada, fortemente clavada, apiculada ou quase cilíndrica. Observado a Presença de células conidiogênicas unisseriada.

**PATOGENICIDADE:** Produtor de micotoxinas.



Figura 22 - *Aspergillus terreus*

**COLÔNIA:** Textura inicialmente penugenta tornando, com o tempo, arenosa. Colônias variando de rugosas podendo apresentar uma topografia irregular. Coloração das colônias de canela até o marrom. Reverso apresentando coloração amarelo pálido ou marrom.

**MICROSCOPIA:** Hifas largas, conidióforos de paredes lisas e sem cor. Cabeças aspergiliares compactamente longas e colunares, células conidiogênicas com padrão bisseriado. Células podais no início do conidióforos.

**PATOGENICIDADE:** Causa de aspergilose pulmonar e relatos de meningite, osteomielite e endocardite em pacientes imunocomprometidos.

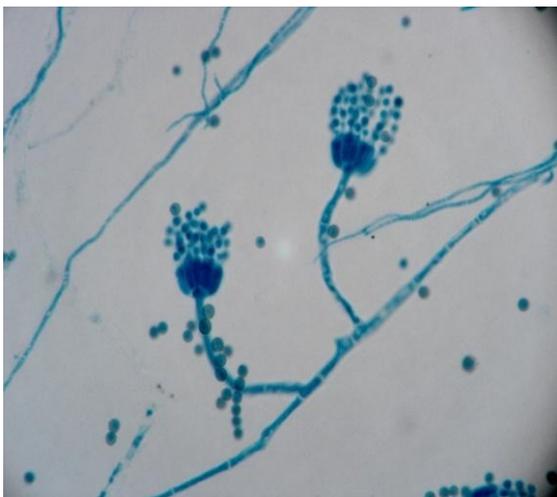


Figura 23 - *Penicilium* sp

**COLÔNIA:** Textura inicialmente algodoadosa para arenosa, rugosa ou plana. Coloração mais comum é a verde azulada e o reverso amarelo-pálido, variando de castanho-amarelado a castanho-avermelhado. Possuem um crescimento moderadamente rápido.

**MICROSCOPIA:** Hifas finas e com conidióforos eretos, septados e hialinos ou levemente coloridos apresentando ou não ramificações (ramos e métulas). Ausência de vesícula. Conídios produzidos em cadeia a partir das fiáldes, ampuliformes ou cilíndricas de pontas rombas.

**PATOGENICIDADE:** Geralmente a espécie patogênica é o *P. marneffe*, um dimórfico que pode causar infecção no sistema linfático. Ceratites, otites, sinusites, quadros alérgicos, infecções pulmonares, micotoxicose e diversos casos de hialohifomicose, normalmente em pacientes imunocomprometidos.



Figura 24 - *Sarocladium* sp (*Acremonium*)

**COLÔNIA:** Textura glabrosa, seca ou volumosa podendo se tornar algodoadosa. Coloração variando de branco a cinza, rosa a bege. Reverso bege, tendendo a acompanhar a coloração do verso. Crescimento rápido.

**MICROSCOPIA:** Conidióforos com extremidades afiladas, conídios globosos, ovóides, cilíndricos ou curvos, produzidos em cachos, unidos por substância mucilaginosa dando formação a aglomerados esféricos (bolas viscosas) na ponta da célula conidiogênica.

**PATOGENICIDADE:** Ocasionalmente é agente de micetoma de grão branco. Raros casos de queratite, endoftalmite, endocardite e meningite em pacientes imunocomprometidos.



Figura 25 - *Scedosporium apiospermum*

**COLÔNIA:** Textura penugenta a veludosa. Coloração marrom e reverso com zonas amarronzadas.

**MICROSCOPIA:** Apresenta hifas septadas hialinas. Conidióforo simples com conídios (aneloconídios) escuros, algumas vezes hialinos, produzidos de forma terminal, isolada ou em pequenos grupos. Sinêmios podem ser encontrados, formando uma espécie de "ramallete" de células conidiogênicas onde os conídios se encontram, na maioria das vezes no ápice.

**PATOGENICIDADE:** Tem sido reportado como agente de micetoma, artrite, osteomielite, otites externas, meningite e sendo um dos mais comuns colonizadores das vias aéreas em pacientes com fibrose cística. Casos de infecções sistêmicas é observado, mais comumente, em pacientes imunocomprometidos.

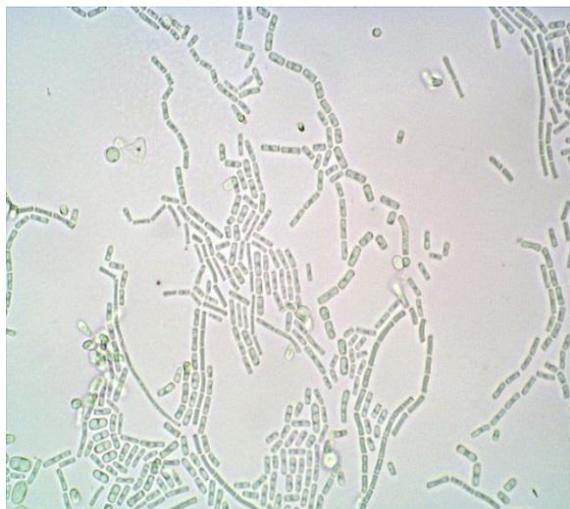


Figura 26 – *Geotrichum* sp

**COLÔNIA:** Textura glabrosa a furfurácea. Colônias leveduriformes que se espalham pela placa. Coloração creme a brancas, semelhantes leveduras. Reverso acompanha a coloração da superfície. Colônias que apresentam um melhor crescimento a 25°C, enquanto que a 37°C desenvolvem um crescimento superficial e esparso.

**MICROSCOPIA:** Hifas septadas e hialinas. Presença exclusiva de artrósporos retangulares germinantes e ausência de blastóporos.

**PATOGENICIDADE:** Agente causador de infecções pulmonares, septicemia, endoftalmite... (infecções pouco frequentes). Associado a infecções em pacientes imunocomprometidos.



Figura 27 – *Paecilomyces variotii*

**COLÔNIA:** Textura penugenta para pulverulenta. Superfície plana, com cores variadas a marrom-amarelado, lilás, bege ou branco e reverso esbranquiçado. Colônia de Crescimento rápido na presença de temperatura ambiente.

**MICROSCOPIA:** Hifas septadas e hialinas, o conidióforo não possui vesícula e fiáldes mais alongadas e cônicas (diferenciando de *Penicillium* sp), frequentemente ramificada. Conídios cilíndricos ou ovais em longas cadeias com possível presença de clamidósporos

**PATOGENICIDADE:** Raramente causa infecções em humanas e sua presença em cultura deve ser avaliada para a possibilidade de contaminação. Casos de queratite, endocardites após válvulas e peritonites em dialisados. Casos de pneumonia e celulites em pacientes imunodeprimidos são relatados.

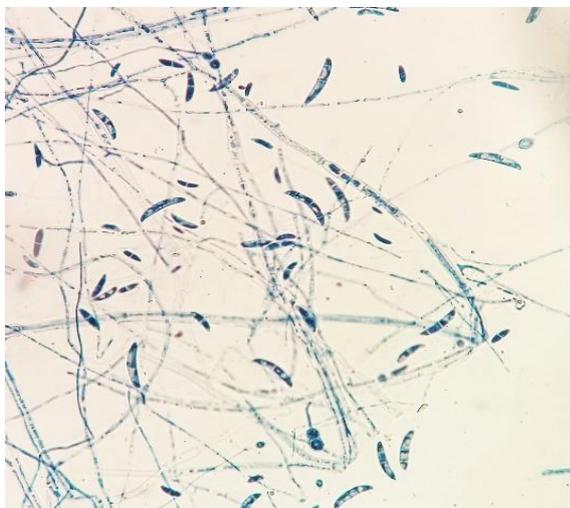


Figura 28 – *Fusarium* sp

**COLÔNIA:** Textura inicialmente veludosa tornando, com o tempo, penugenta a algodonosa. Coloração sendo, na maioria das vezes, rosa e violeta. Reverso da colônia geralmente acompanha a coloração da superfície.

**MICROSCOPIA:** Conidióforos curtos ou longos com ou sem ramificações, células conidiogênicas formando conídios grandes, fusiformes e multisseptados (macroconídios) e conídios pequenos, ovais e cilíndricos

**PATOGENICIDADE:** Estão envolvidos em uma grande variedade de infecções. Tem sido isolado em queratite, endoftalmite, onicomicoses, normalmente em pacientes imunocompetentes. É também causa de infecções em pacientes imunocomprometidos e estão envolvidos em casos de peritonites em dialisados.

## FEO-HIFOMICETOS

Constituído por fungos demáceo com coloração escura devido a presença de pigmentos melanóides



Figura 29 - *Alternaria sp*

**COLÔNIA:** Com textura veludosa. De cor inicialmente branca e com o passar dos dias ficando marrom-escuro (fungo demáceo). Reverso marrom ou apresentando uma coloração com característica enegrecida.

**MICROSCOPIA:** Hifas septadas e pigmentadas. Conidióforo septado, simples, ramificado e com pigmento escuro. Conídios grandes (muriforme) negros clavados ou ovoides, marrom-claros, septados longitudinal e transversalmente, formados em cadeia no ápice de conidióforos.

**PATOGENICIDADE:** Ocasional agente de onicomicoses, de infecções cutâneas ulceradas e sinusite paranasal, muito associado a pacientes imunocomprometidos.

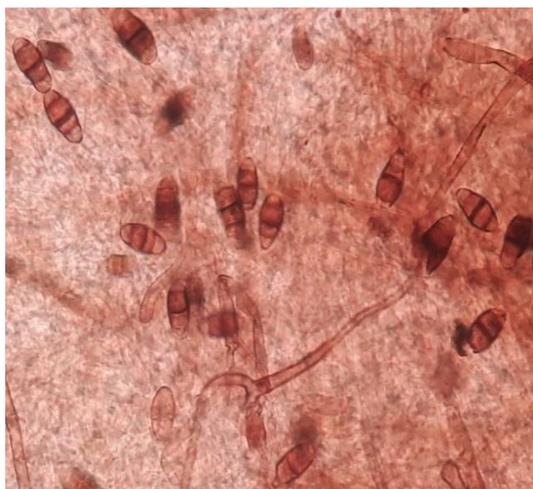


Figura 30 - *Curvularia sp*

**COLÔNIA:** Apresentam-se aveludadas ou lanosas. A cor varia do verde-oliva escuro ao marrom-escuro (colônia demáceas). Reverso marrom ou preto

**MICROSCOPIA:** Hifas demáceas e ramificadas. Conídios curvos e com três septos transversais, com coloração marrom, claros, são clavados ou fusiformes célula central maior e mais escura, formados a partir de poros presentes nos conidióforos.

**PATOGENICIDADE:** Ocasionalmente causa infecção em humanos, incluindo onicomicoses, queratite e feohifomicose paranasal, micetoma, infecções disseminadas (principalmente em pacientes imunocomprometidos...)



Figura 31 - *Drechslera sp*

**COLÔNIA:** Textura lanosa com uma franja entrelaçada. Inicialmente são colônias planas e espalhadas. Coloração cinza a cinza-oliva. Reverso varia de cinza a preto. Observa-se um crescimento rápido

**MICROSCOPIA:** Hifas septadas, demáceas e ramificadas, possuindo conídios marrom-claros, retos, ovoides ou clavados, divididos em 4 ou 5 células por septos transversos espessos. Presença de hilos Conidióforo septado e com característica escura

**PATOGENICIDADE:** Alguns relatos de queratite, alergia, sinusite e infecções da mucosa nasal.

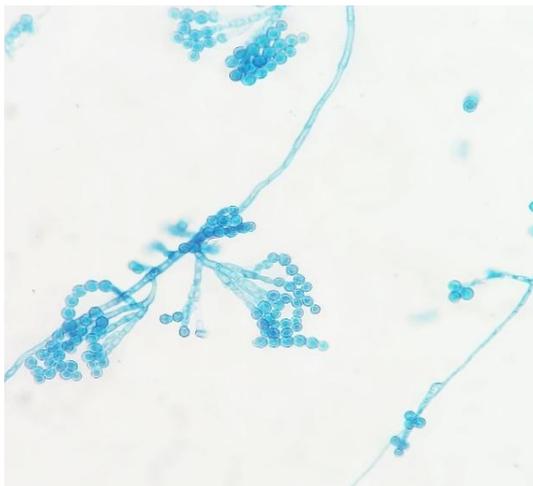


Figura 32 - *Scopulariopsis brevicaulis*

**COLÔNIA:** Inicialmente apresentam textura membranosas tornando-se arenosa a veludosa com pregas irregulares. Cor branca, bege ou castanho-claro com periferia mais clara. Reverso de coloração castanha e apresentando centro marrom. Crescimento rápido.

**MICROSCOPIA:** Hifas demáceas e ramificadas, largas e septadas. Conídios em cadeia, lisos e rugosos, arranjados em cadeia, com base truncada, hialino ou acinzentados, formados em conidióforos ramificados, conhecidos como anelóforos.

**PATOGENICIDADE:** Já foram isolados em pacientes portadores de onicomicoses. Outras infecções têm sido reportadas, como endocardite, queratite e raramente infecções profundas e quando ocorre está muito relacionado a pacientes imunocomprometidos.



Figura 33 - *Neoscytalidium dimidiatum*

**COLÔNIA:** Inicialmente membranosas tornando-se arenosa a veludosa com pregas irregulares. Cor branca, bege ou castanho-claro com periferia mais clara ainda. Reverso de cor castanha e centro marrom. Colônias apresentando como característica um crescimento rápido.

**MICROSCOPIA:** Presença de hifas septadas demáceas. Conidióforo simples ou ramificados com formação de conídios em sua extremidade. Artróconídeos hialinos ou marrom claro, uni ou bicelular, oval, elipsoidal ou retangular.

**PATOGENICIDADE:** Ocasionalmente é agente de infecções de pele e unha. Já foram relatados alguns casos de infecções subcutâneas ou disseminadas.



Figura 34 - *Aureobasidium pullulans*

**COLÔNIA:** Textura glabrosa, espalhada e plana. Colônias brancas para rosa pálida, ocasionalmente amarelas tornando-se marrons para preto. Reverso creme, podendo com, com o tempo, ficar marrom claro. Fungo apresentam um Crescimento rápido.

**MICROSCOPIA:** Hifas septadas hialinas, tornando-se marrons com a idade. Células conidiogênicas pouco diferenciadas, intercalares ou no terminal das hifas. Artrósporos demáceos podem ser também observados.

**PATOGENICIDADE:** Raramente causa infecções em pacientes imunocomprometidos, podendo, quando o fazem, ser agente de queratite ou infecção cutânea.

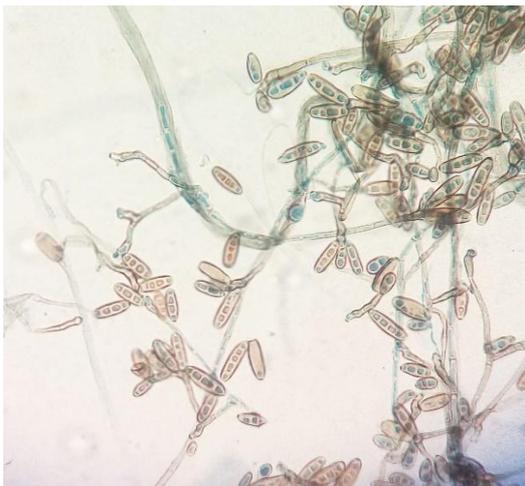


Figura 35 - *Bipolaris sp*

**COLÔNIA:** Textura algodonosa a penugenta. Coloração inicialmente esbranquiçada e com o tempo, apresentando pigmentos de cinza a marrom-escuro na superfície. Reverso acompanhando a pigmentação da superfície. Crescimento rápido das colônias.

**MICROSCOPIA:** Hifas septadas demáceas e ramificadas. Conidióforos pigmentados, flexuosos ou geniculados. Conídios marrons, retos, ovoides ou clavados, tipicamente contendo de 3 a 6 células e presença de hilo. Tubos germinativos desenvolvidos nas células terminais do conídio e orientados a ficarem paralelas ao eixo do conídio.

**PATOGENICIDADE:** Raramente causa feohifomicose associada a sinusite, peritonite, endocardite sempre dependente do imunocomprometimento do paciente.

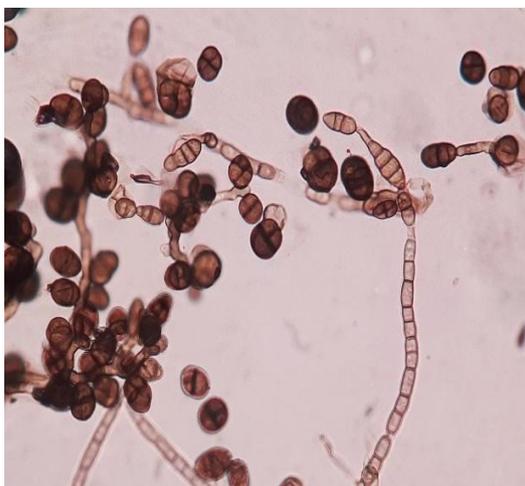


Figura 36 - *Ulocladium sp*

**COLÔNIA:** Textura de lanosa para cotonosa. Pigmentação marrom para preto na superfície. Reverso acompanhando a superfície, portanto preto.

**MICROSCOPIA:** Hifas septadas, demáceas e ramificadas. Conidióforos flexuosos, lisos ou verrucosos, marrons e fortemente geniculados com formação de conídios simpodiais marrons, muriforme e com septações transversais e longitudinais e a presença de um pequeno hilo terminal.

**PATOGENICIDADE:** Não há relatos significativos de infecções em humanos.

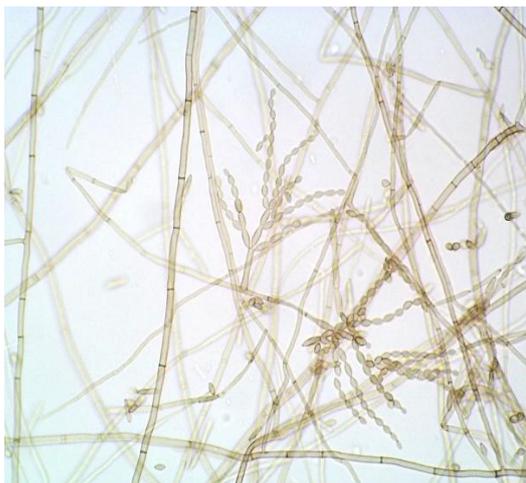


Figura 37 - *Exophiala sp*

**COLÔNIA:** Inicialmente glabrosa e com o tempo adquire uma textura veludosa, com topografia espalhada e pregueada. A pigmentação das colônias varia de oliva-acinzentado ao negro amarronzado. Reverso com pigmentação negra (demáceo).

**MICROSCOPIA:** Leveduras gemulantes, cilíndricas a fusiformes e escuras são observadas em culturas jovens. Presença de anelídeos marrons, cilíndricos ou levemente inflados. Conidióforos com dilatações em sua base formam conídios elípticos, hialinos a oliváceos, dispostos em grumos em seu ápice.

**PATOGENICIDADE:** Causa de micetoma e outra feohifomicose subcutâneas. Relatos de casos em pacientes com fibrose cística.

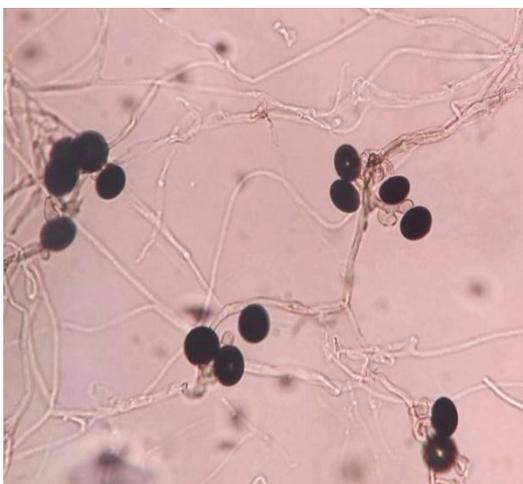


**Figura 38 - *Cladosporium* sp**

**COLÔNIA:** Textura aveludada ou lanosa. As colônias possuem cor verde-escuro ou verde-acinzentada. Reverso negro (demáceo). A topografia pode ser espalhada, dobrada ou elevada. Crescimento moderado.

**MICROSCOPIA:** Hifas septadas, demáceas e ramificadas. Conídios castanhos e lisos, em cadeia simples ou ramificadas, geralmente com 1 septo e com 2 cicatrizes polares que formam longas cadeias, produzidos na extremidade de hifas. Conidióforos se apresentam, na maioria das vezes, septados.

**PATOGENICIDADE:** Raramente reportado como agente de infecções em humanos.



**Figura 39 - *Nigrospora* sp**

**COLÔNIA:** Textura lanosa, compacta e preenchendo toda a placa. Inicialmente branca tornando-se cinza e com pontos negros onde existe a produção de conídios. Reverso negro. Crescimento rápido.

**MICROSCOPIA:** Hifas septadas, demáceas e ramificadas. Inicialmente são hialinas, mas na medida que a colônia envelhece passam a serem escurecidas. Conidióforos são hialinos, lisos, flexuosos e ramificados. São largos e possuem uma proeminente dilatação globular onde conídios negros grande, ovais ou arredondados se encontram aderidos.

**PATOGENICIDADE:** Raramente causam infecções humanas. Relatos raros de ceratite.

## CROMOBLASTOMICOSE (CROMOMICOSE)



Figura 40 - *Fonsecaea pedrosoi*

**COLÔNIA:** Textura aveludada com superfície achatada ou com pregas radiais (raros). Coloração variando de amarronzado / verde-oliva a preto. Reverso negro. Observa-se um Crescimento lento das colônias.

**MICROSCOPIA:** As hifas são septadas, demáceas e ramificadas. Três tipos de conídios podem estar presentes: tipo *Cladosporium*, tipo *Rhinocladiella* e, ocasionalmente a estrutura morfológica do tipo *Phialophora*.

**PATOGENICIDADE:** Agentes de Cromoblastomicose (Cromomicose), uma infecção cutânea caracterizada por lesões verrucosas de formação escura e destruição tecidual. Também é agente de Feohifomicose pulmonar.



Figura 41 - *Phialophora verrucosa*

**COLÔNIA:** Textura aveludada com superfície espalhada e plana. As Colônias se apresentam com a coloração cinza-escuras.

**MICROSCOPIA:** Hifas septadas, demáceas e ramificadas. Conidióforos, quando presentes, são curtos e semelhantes às hifas vegetativas. Células conidiogênicas cilíndricas ou em forma de frasco com colarete evidente. Conídios ovais a cilíndricos, lisos, hialinos ou pardos, agrupados em bola no ápice das importantes células conidiogênicas.

**PATOGENICIDADE:** São agente importante de Cromoblastomicose, podendo também causar infecções cerebrais e feohifomicose em pacientes imunocomprometidos.

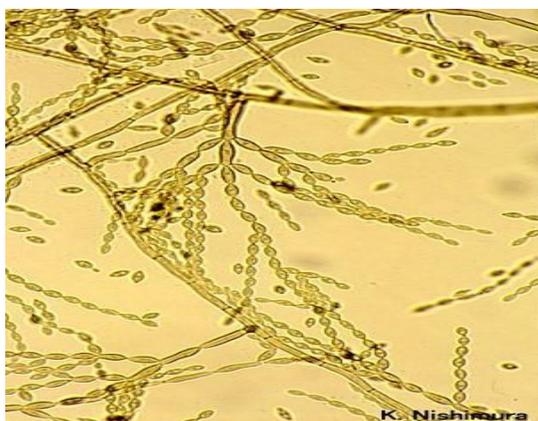


Figura 42 - *Cladophiala carrionii*

**COLÔNIA:** Textura veludosa ou algodonosa e topografia espalhada, dobrada ou elevada. Colônias verde-oliva ou verde-acinzentada. O reverso é negro. Crescimento moderado.

**MICROSCOPIA:** Hifas são septadas, demáceas e ramificadas. Os conidióforos são escuros, septados, eretos, de comprimento variado e não diferenciados de hifas vegetativas. Duas ou três escaras (disjuntores) podem estar presentes nos pontos de interseção entre os conídios na cadeia de alguns esporos

**PATOGENICIDADE:** Agente de Cromoblastomicose, feohifomicose cerebral e tem sido isolado em casos importantes de infecções em tecido subcutâneo.



**Figura 43-** *Rhinocladiella aquaspersa*

**COLÔNIA:** Textura aveludada com superfície espalhada e plana. Colônias cinza-escuras, marrom ou negras. Reverso preto acinzentado ou negro. Como característica possui um crescimento lento

**MICROSCOPIA:** Hifas septadas demáceas e ramificadas. Conidióforo cilíndrico, escuro e não ramificado. Conídio elipsoidal, fusiformes produzidos no ápice dos conidióforos e unidos por epículos.

**PATOGENICIDADE:** Relatos de possíveis e raras infecções subcutâneas.

## ZIGOMICETOS (ORDEM MUCORALES)



Figura 44 - *Cunninghamella* sp

**COLÔNIA:** Textura furfurácea a veludosa. Inicialmente as colônias são brancas tornando, com o tempo, acinzentadas. Reverso pálido. Crescimento rápido.

**MICROSCOPIA:** Hifas asseptadas. Esporangióforo longo, ramificado, com ramo verticilados ou solitários, terminados em vesículas cobertas com espículas que suportam um pequeno esporângio, que contém um único esporangióspero com carácter esférico.

**PATOGENICIDADE:** Agente de zigomicose pulmonar e disseminada.

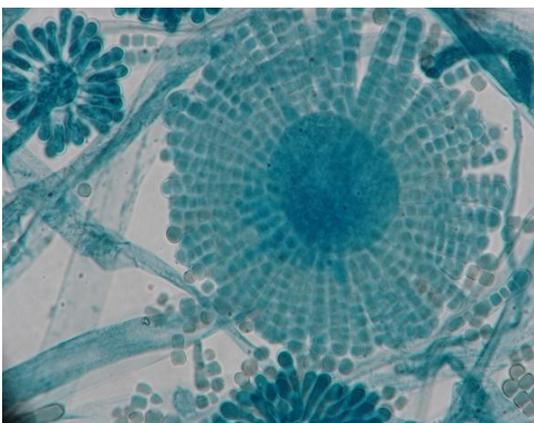


Figura 45 - *Syncephalastrum* sp

**COLÔNIA:** Textura lanosa com abundante micélio aéreo entrelaçado. Colônias com coloração inicial branca e com o tempo tornam-se cinza ou cinza-escuro na superfície. Reverso marrom ou amarelo-pálido. Apresentam um crescimento rápido

**MICROSCOPIA:** Hifas asseptadas ou com septos esparsos. Esporangióforo frequentemente ramificado, terminando em uma vesícula ovóide, onde esporângios (merosporângio) digitiformes contendo uma única cadeia de esporangiósperos globosos.

**PATOGENICIDADE:** Raramente causa infecções em humanos. Já foi isolado em onicomicoses, micetoma, mucormicose rino-orbitocerebral em paciente diabético.

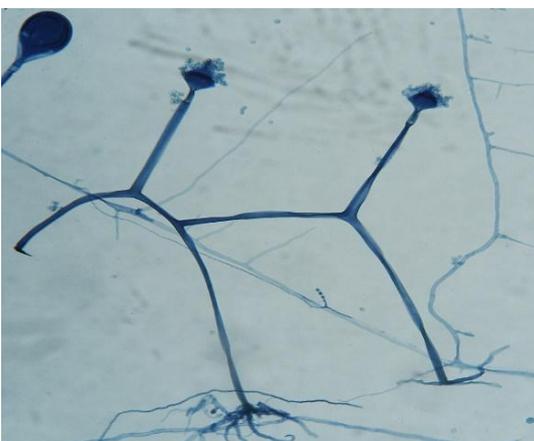


Figura 46 – *Lichthemia* sp (*Absidia*)

**COLÔNIA:** Textura densa e lanosa. Micélio aéreo abundante, entrelaçado e algodinoso, preenchendo completamente a placa ou o tubo de ensaio. Colônia branca para cinza palha e superfície pontilhada com esporângios acinzentados. Reverso incolor ou creme. O crescimento das colônias é rápido.

**MICROSCOPIA:** Hifas asseptadas dando origem a estolões e rizoides. Os finos conidióforos são fiáides e se formam diretamente sobre as hifas de forma ereta, com ângulo retos com a hifa. Formação de apófises (dilatações) abaixo da columela. Esporangióforos preenchidos com grande número de esporangiósperos.

**PATOGENICIDADE:** Agente de mucormicose, principalmente em paciente imunocomprometido.



Figura 47 - *Mucor* sp

**COLÔNIA:** Textura lanosas devido a produção de micélio aéreo abundante, preenchem completamente a placa de petri ou o tubo de ensaio. Colônias com coloração branca no início e, com o tempo, modificando para cinza ou amarelada. Reverso incolor. O Crescimento rápido e, geralmente, abundante

**MICROSCOPIA:** Hifas asseptadas. Os Esporangióforo são hialinos, ramificados e apresentam uma muito típica curvatura da haste, formando esporângios globosos terminais com columela, preenchida com numerosos esporangiósporo.

**PATOGENICIDADE:** Agente de mucormicose em pacientes imunocomprometidos, porém existem casos reportados em imunocompetentes.

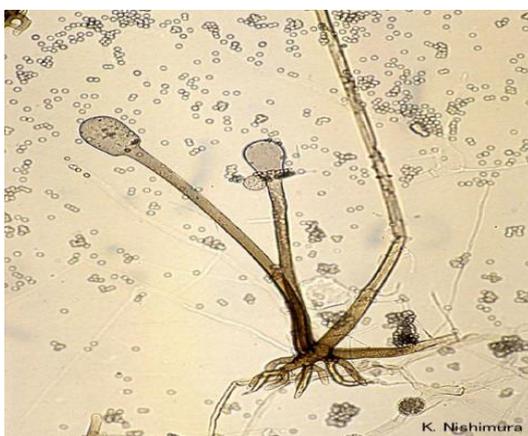


Figura 48 - *Rhizomucor* sp

**COLÔNIA:** Textura veludosa. Coloração inicialmente brancas tornando-se cinza e marrons. Superfície pontilhadas com pontos escuros. Reverso incolor ou creme

**MICROSCOPIA:** Hifas asseptadas com rizoides rudimentares entre os esporangiósporo nos estolões. Esporangiósporo geralmente eretos ramificado formando esporângios esféricos terminais com columela proeminente contendo numerosos esporangiósporo. Característica importante: a ausência de apófises.

**PATOGENICIDADE:** Agente de mucormicose sistêmica em paciente imunocompetente. Isolamento em pacientes imunocomprometidos, principalmente leucêmicos.



Figura 49 - *Rhizopus* sp

**COLÔNIA:** Com textura profundamente lanosa e, devido a abundante produção de micélio aéreo, preenche toda a placa de petri e ou tubo de ensaio, podendo, inclusive, levantar a tampa da placa. Colônia inicialmente branca e com o tempo torna-se cinza-escuro. A superfície é coberta por pontos escuros, caracterizados pela presença dos exuberantes esporângios. Reverso incolor. Crescimento rápido.

**MICROSCOPIA:** Hifas asseptadas e dão origem a estolões e rizoides na sua porção basal. Longos Esporangióforo não ramificados e retos. Esporângios globosos terminais, apresentando típica columela contendo numerosos esporangiósporo presentes no seu interior.

**PATOGENICIDADE:** Agentes importantes de Mucormicose. Mucormicose rino-orbitocerebral, cutânea, gastrointestinal, pulmonar, etc. a maioria relacionada a pacientes imunocomprometidos, como diabéticos e leucêmicos.

## ZIGOMICETOS (ORDEM ENTOMOPHYTORALES)

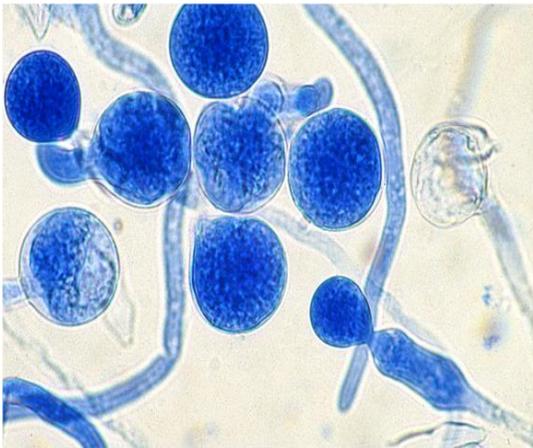


**Figura 50 -** *Conidiobolus coronatus*

**COLÔNIA:** Textura glabrosa para arenosa. Coloração inicialmente branca tornando-se bege para marrom. Reverso é incolor. O Crescimento é rápido.

**MICROSCOPIA:** Hifas largas, septos esparsos e com pouca ramificação. Esporóforos retos, não ramificados que são origem em sua extremidade a esporos esféricos ou piriformes que são expelidos dos esporóforos. Presença de papila basal. Clamidósporos podem estar presentes.

**PATOGENICIDADE:** Agente de Zigomicose crônica presentes, inicialmente, em infecções nas membranas mucosas nasais. Alguns casos de infecções disseminada já foram descritos.



**Figura 51 -** *Basidiobolus ranarum*

**COLÔNIA:** Textura arenosa a glabrosa e plana. Coloração amarelada para cinza pálido. Reverso incolor. O Crescimento desses fungos é moderadamente rápido.

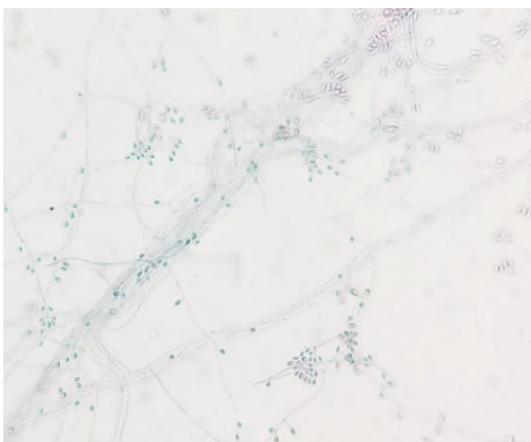
**MICROSCOPIA:** Hifas largas, septos esparsos e com pouca ramificação. Zigospórios, clamidósporos, esporóforos assexuadas são produzidos. Zigospórios globosos com paredes espessas e um proeminente bico é característico. Esporóforos com dilatação cônica ou vesícula na extremidade onde são formados esporos primários. Esporos secundários são alongados e têm forma de taco.

**PATOGENICIDADE:** Agente de entomofotoromicose caracterizado por um espessamento de tecidos subcutâneos e músculos adjacentes.

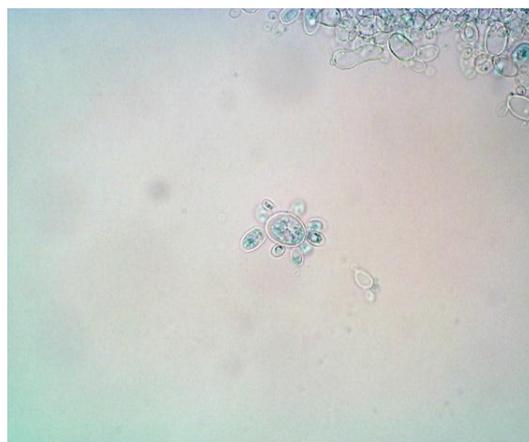
## FUNGOS DIMÓRFICOS

Fungos que, na dependência de fatores termo nutricionais, se apresentam sob duas formas morfológicas – filamentosa (micelial) e leveduriforme.

### *Paracoccidioides brasiliensis*



**Figura 52 - *Paracoccidioides brasiliensis***  
**Fase micelial**



**Figura 53 - *Paracoccidioides brasiliensis***  
**Fase leveduriforme**

**COLÔNIA:** Temperatura de 37°C possuem textura Glabrosa, brancas a castanho-claro ou cinza, com topografia em dobras ou enrugadas. Temperatura de 25°C possuem textura penugenta para veludosa com centro elevado. Coloração branca, rosa ou marrom na superfície com reverso amarelado para marrom. Em Ambas as fases o crescimento é lento.

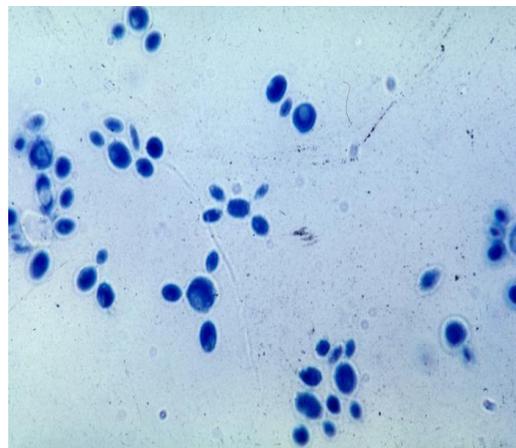
**MICROSCOPIA:** Fase micelial: hifas septadas, hialinas e ramificadas com Clamidosporos intercalares ou terminais. Conídios escassos, mas quando presentes, ovais a piriformes formados em pequenos conidióforos ou diretamente na hifa. Fase leveduriforme: células de paredes espessas, refringentes e com característica de apresentação multigermulantes.

**PATOGENICIDADE:** Agente de paracoccidioidomicose. Uma doença crônica adquirida por inalação com progressão pulmonar e possibilidade de infecção disseminada. Lesões na região oral, nasal ou gastrointestinal são consideradas lesões secundárias.

## ***Sporothrix schenckii* complexo**



**Figura 54 - *Sporothrix schenckii*  
fase micelial**



**Figura 55 - *Sporothrix schenckii*  
fase leveduriforme**

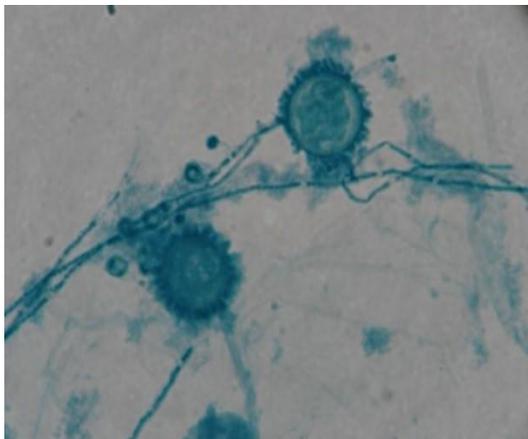
**COLÔNIA:** Temperatura de 37°C a textura é velutinas, planas com pigmento e reverso creme para bege escuro. Temperatura de 25 °C a textura é glabrosa e úmida. Coloração esbranquiçada para preto, podendo ser tanto na superfície quando no reverso. É observado, nessa fase, um crescimento moderadamente rápido nos meios de culturas.

**MICROSCOPIA:** Fase micelial: Hifas delgadas, septadas, hialina e ramificadas. Conidióforos delicados e afiladas, retos ou decumbentes. Uma expansão em sua extremidade forma pequena vesícula com denticulos que dão origem a conídios com forma de chama de vela ou formando rosetas, podendo ocorrer lateralmente no conidióforo ou diretamente na hifa.

Fase leveduriforme: Células gemulantes, esféricas, ovais ou em forma de charuto

**PATOGENICIDADE:** Agente da esporotricose. Uma infecção cutânea e subcutânea crônica, caracterizada pela presença de úlceras e abscessos ao longo dos canais linfáticos (forma mais comum), podendo ocorrer outras formas de apresentação, como a esporotricose invasiva e a esporotricose sistêmica.

## *Histoplasma capsulatum*



**Figura 56-** *Histoplasma capsulatum*  
**Fase micelial**



**Figura 57-** *Histoplasma capsulatum*  
**Fase leveduriforme**

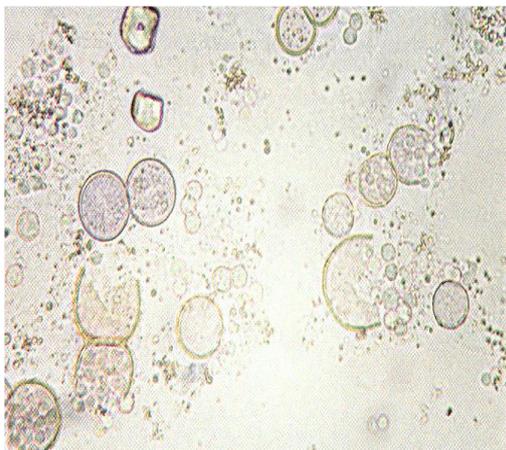
**COLÔNIA:** Grande variedade de formas. Colônias filamentosas com textura flocosa no início e com o tempo tornando-se lanosa. Variando de marrom ao bege com pigmento acastanhado e raramente marrons. Podem apresentar topografia elevada e enrugada com reverso branco ou amarelo. As colônias leveduriformes possuem textura membranosa grosseira e varia de branco a castanho

**MICROSCOPIA:** Fase micelial: hifas septadas, hialinas e ramificadas com macroconídios tuberculados e microconídios piriformes formando em pequenos conidióforos ou diretamente na hifa vegetativa.

Fase leveduriforme: células ovais, gemulantes com base de inserção estreita.

**PATOGENICIDADE:** Agente etiológico da histoplasmose. Uma infecção que tem como causa mais frequente uma clínica aguda pulmonar de variável gravidade, podendo afetar o sistema retículo endotelial.

## ***Coccidioides immitis***



**Figura 58 - *Coccidioides immitis***  
**Fase Micelial**



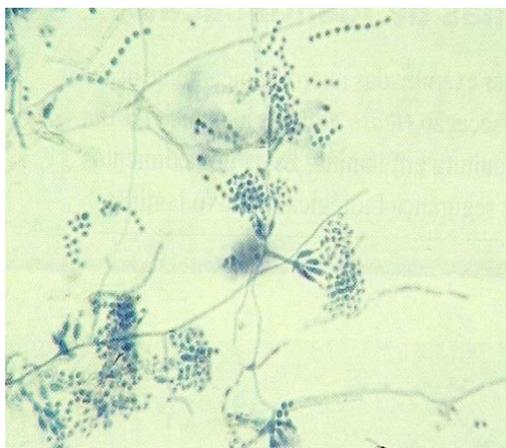
**Figura 59 - *Coccidioides immitis***  
**Fase Leveduriforme**

**COLÔNIA:** Textura inicialmente arenosa passando para glabrosa conforme vai amadurecendo com coloração bege. Tem aspecto membranoso ou glabras com uma cobertura de micélio aéreo algodinoso. Coloração acinzentada, podendo encontrar pigmentos de cor lavanda, acastanhados, canela e variações de marrom. Reverso variando entre o branco, marrom ou amarelo. As características se macroscópicas se mantêm em ambas temperaturas.

**MICROSCOPIA:** Hifas septadas, hialina e ramificadas com artrósporos e disjuntivos, desenvolvendo colônias filamentosas nas culturas de rotina. Fase de esférulas: nos tecidos, os arthroconídios transformam-se em esférulas ovaladas (sem ostíolos) com endósporos

**PATOGENICIDADE:** Agente etiológico da coccidioidomicose. Uma doença que devido a inalação de arthroconídios pode variar desde uma forma assintomática a uma infecção grave e sistêmica.

## *Talaromyces marneffe* (*Penicillium marneffe*)



**Figura 60 - *Talaromyces marneffe***  
(*Penicillium marneffe*)  
**Fase micelial**



**Figura 61 - *Talaromyces marneffe***  
(*Penicillium marneffe*)  
**Fase Leveduriforme**

**COLÔNIA:** Textura aveludada inicialmente para pulverulenta. Coloração bem variada passando de verde, cinza, amarelo e raramente roxo na superfície. O reverso geralmente incolor ou amarelado. Algumas vezes pode aparecer uma coloração vermelha ou roxa.

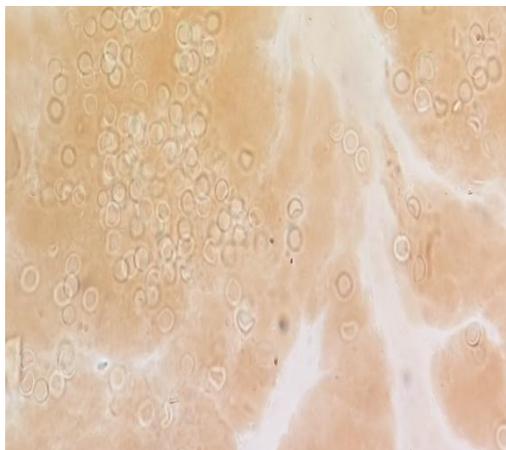
**MICROSCOPIA:** Fase micelial: Hifas septadas, hialinas e ramificadas. Conidióforo liso e ramificado com 3 a 5 sétulas. Conídios catenulados globoso e lisos. Fase leveduriforme: Células leveduriformes ovais a elípticas fazendo a divisão por cissiparidade.

**PATOGENICIDADE:** Causador de infecção no sistema linfático, sendo também associados a infecções oportunistas, *principalmente* pós-traumática, queratite e muitas vezes relacionados a paciente imunocomprometidos.

## ***Lacazzia lobo***



**Figura 62 - *Lacazzia lobo* (KOH 20 %) Lobomicose**



**Figura 63 - *Lacazzia lobo* (40x) Lobomicose**

**COLÔNIA:** Agente fúngico não cultivável até o momento.

**MICROSCOPIA:** Nos tecidos, se apresentam como células globosas em forma de “limão” (ou com dupla gemulação em forma de ampulheta), simples ou em curtas cadeias

**PATOGENICIDADE:** Agente da lacaziose. Uma doença crônica de pele e tecido subcutâneo, caracterizada pelo desenvolvimento de um aspecto queiloideforme e, algumas vezes, verrucoso em infecções ulceradas.

## **Candidas sp**



**Figura 64 - *Candida albicans***



**Figura 65 - Clamidósporos  
(*Candida albicans*)**



Fonte: Neufeld, 2010

**Figura 66 - *Candida krusei***

**COLÔNIA:** Textura glabrosa, brancas e convexas. A presença de franjas em torno da periferia é, raramente, visualizada. Com o tempo pode se tornar castanhas, ásperas.

**MICROSCOPIA:** Presença de blastoconídios globosos e ovóides e com paredes finas. Apresentam-se isolados ou em cachos nas constrições das pseudo-hifas. É observado a presença de clamidósporos.

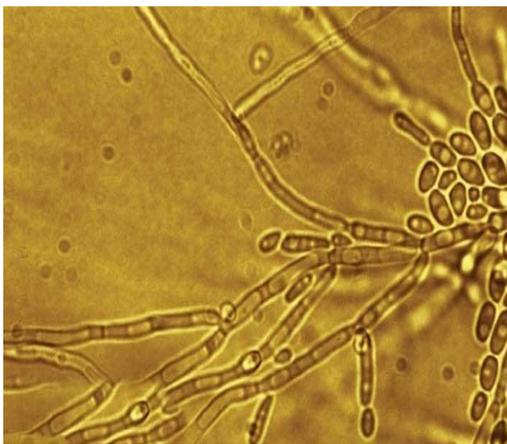
**PATOGENICIDADE:** Podem causar infecções locais e disseminadas, especialmente em imunocomprometidos. Infecções de pele, onicomicoses, orofaringite, vaginite são algumas das doenças causadas.

Prova positiva do clamidósporo (vesículas grandes, com paredes espessas e com protoplasma denso que ajudam os fungos a sobreviverem em ambientes hostis).

**COLÔNIA:** Achatadas e opacas e as mais antigas podem apresentar uma franja de micélio ao redor da colônia. Coloração branca a amarela e são bem similares a *Candida albicans*.

**MICROSCOPIA:** Células ovóides, alongadas ou cilíndricas. Presença de pseudo-hifas com cachos de blastóporos alongados, criando uma aparência de “palito de fósforo”.

**PATOGENICIDADE:** Relatos de isolamento em endocardite, peritonite e infecções do trato urinário e também vaginites. A resistência a fluconazol é característica.



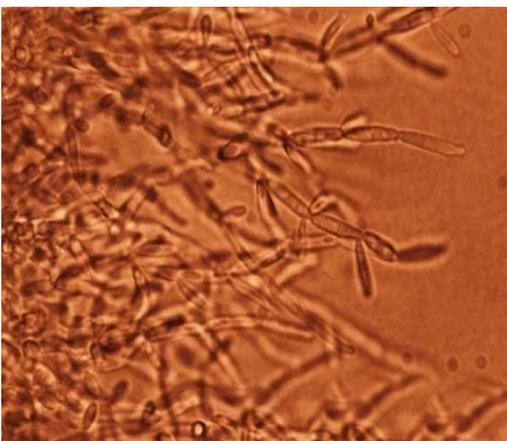
Fonte: Neufeld, 2010

**Figura 67 - *Candida parapsilosis* Complexo**

**COLÔNIA:** Colônias compactas e úmidas, com topografia lisa ou rendilhada. Coloração branca, brilhante ao creme. Com o tempo as colônias desenvolvem uma rugosidade no relevo e sua periferia desenvolvem uma coloração marrom.

**MICROSCOPIA:** Blastocónidios pequenos e alongados. Pseudo-hifas com cachos de blastóporos, criando uma aparência de “palito de fósforo”.

**PATOGENICIDADE:** Têm sido isoladas em infecções urinárias, pielonefrites, candidíase cutânea, otite, ceratite e outros, sendo também agente de infecção nosocomial.



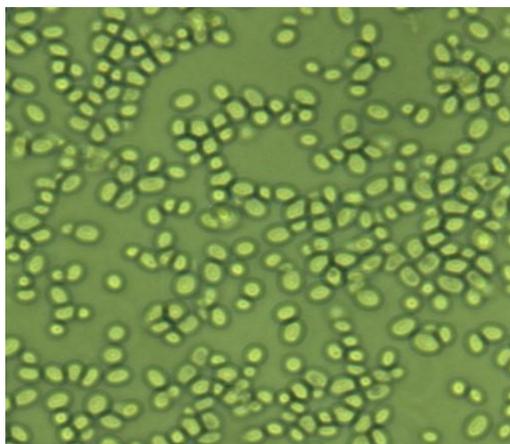
Fonte: Neufeld, 2010

**Figura 68 - *Candida tropicalis***

**COLÔNIA:** Textura glabrosa podendo ser úmidas, brilhantes e elevadas. Coloração do branco ao creme.

**MICROSCOPIA:** Apresentam Células alongadas, globosas e ovoides. Pseudo-hifas longas e ramificadas, originando blastóporos simples ou em cadeia e cachos devido a presença de constricção.

**PATOGENICIDADE:** Infecções na corrente sanguínea, levando a fungemia. Vaginites, candidíase graves, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Relacionadas a infecções nosocomiais.



Fonte: Neufeld, 2010

**Figura 69 - *Candida glabrata***

**COLÔNIA:** Glabrosa, pastosas e suaves. Coloração esbranquiçadas podendo ser creme e brilhantes.

**MICROSCOPIA:** Leveduras unicelulares, esféricas e ovoides, com simples gemulação terminal e sem formação de estruturas denominadas pseudomicélio.

**PATOGENICIDADE:** Isolados em infecções urinárias, queratite, infecções profundas, associadas a cateteres (biofilme).

## MEIOS CROMOGÊNICOS



Fonte: Neufeld, 2010

Figura 70 –CHROMagar Candida

Coloração da colônia: rosa opaco: *Candida krusei*, verde: *Candida albicans*, branca/ rósea: *Candida parapsilosis*, azul-cobalto: *Candida tropicalis*, violeta: *Candida glabrata*.

## *Cryptococcus* sp

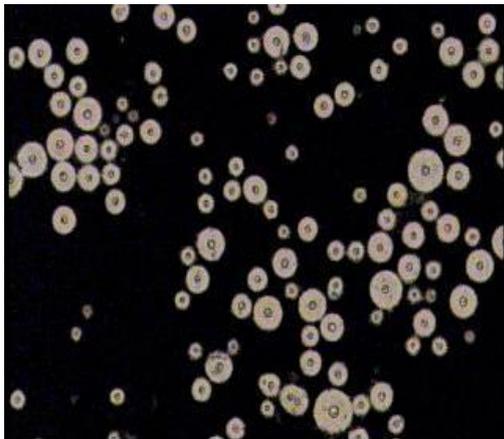


Figura 71- *Cryptococcus* sp - nanquim



Figura 72 - *Cryptococcus* sp (gemulando)

**COLÔNIA:** Glabrosa, mucoides e lisas. Coloração em ágar Sabouraud de cor creme.

**MICROSCOPIA:** Blastoconídios unilaterais, e ausência de hifas e pseudo-hifas. *Cryptococcus neoformans* produz células gemulantes, globosa a ovais. *Cryptococcus gattii*, produz células gemulantes, ovais, globosas ou em forma de limão. Produzem células mais alongadas, pseudo-hifas e micélio verdadeiro. A cápsula, observada por meio da preparação com nanquim ou tinta da china tem espessura variável.

**PATOGENICIDADE:** agente causador da doença criptococose. Infecção que pode acometer tanto pacientes imunocompetentes (*C. gattii*), quanto paciente imunocomprometidos (*C. neoformans*). Por possuírem predileção pelo Sistema Nervoso Central, são agentes de meningites, meningoencefalite. Também estão envolvidos em pneumonias e lesões cutâneas. Outras possíveis manifestações, menos frequentes, são: comprometimento ocular, articular e gastrointestinal.

## OUTRO AGENTE LEVEDURIFORME

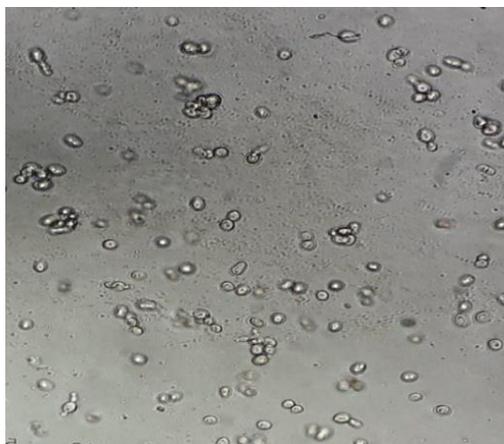
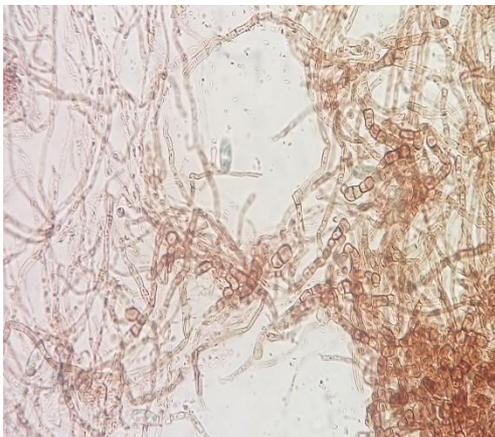
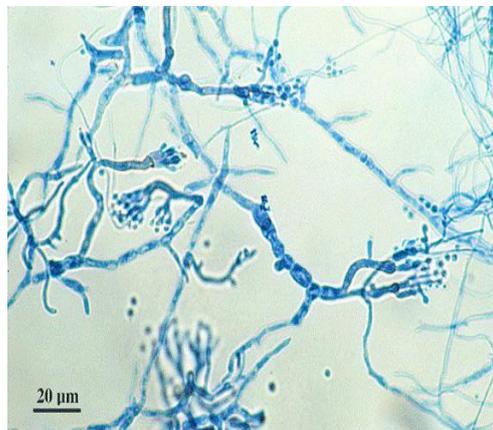


Figura 73 - *Rhodotorula* sp

**COLÔNIA:** Textura glabrosa, mas pode ser raramente seca. Coloração alaranjada a rosa pálido. Reverso branco-creme.

**MICROSCOPIA:** Presença de Blastoconídios grandes, redondos, elipsoides e gemulantes.

**PATOGENICIDADE:** Relatos de isolamento em infecção pulmonar concomitante com tuberculose, meningites e endoftalmite em pacientes imunocomprometidos.

***Madurella* sp****Figura 74 - *Madurella grisea*****Figura 75 - *Madurella mycetomatis***

**COLÔNIA:** Textura glabrosa para veludosa, planas e coriáceas. Coloração branco a amarelo a amarelado-castanho, tornando-se acastanhado, dobrado e amontoado com a idade, e com a formação de micélios aéreos. Um pigmento marrom difusível é caracteristicamente produzido em culturas primárias. O Reverso apresenta coloração marrom-escuro. Crescimento das colônias é lento.

**MICROMORFOLOGIA:** Na *Madurella grisea*, clamidósporos estão presentes, mas nenhum conídio é produzido. *Madurella mycetomatis* ocorre a formação de conidióforos com extremidades afiladas que são origem a conídios esféricos ovais. Formação de hifas septadas podendo também ser ramificadas com numerosos clamidósporos.

**PATOGENICIDADE:** Agente de micetoma de grão negro.

**LEVEDURAS / HIFAS**

**Figura 76 - LEVEDURAS OU  
BLASTOCONÍDIOS**



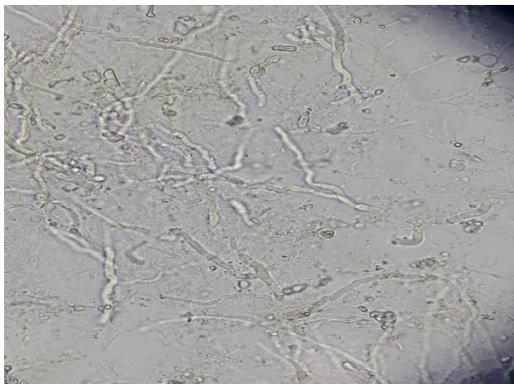
**Figura 77 - HIFAS SEPTADAS HIALINAS**  
sem cor e assumindo a coloração do  
corante utilizado na pesquisa.



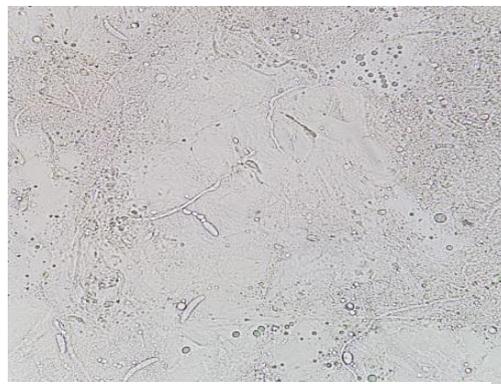
**Figura 78 - HIFAS SEPTADAS DEMÁCEAS**  
Hifas com cor castanha devido a  
presença de pigmentos melanóides.



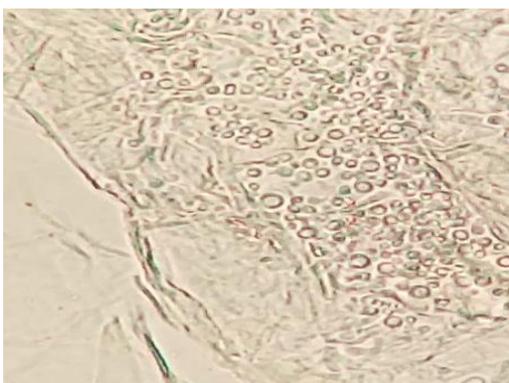
**Figura 79 - HIFAS ASSEPTADAS OU  
CENOCÍTICAS - Hifas sem septos\_**

**EXAME DIRETO**

**Figura 80-** Hifas septadas hialinas  
(exame direto – pele)



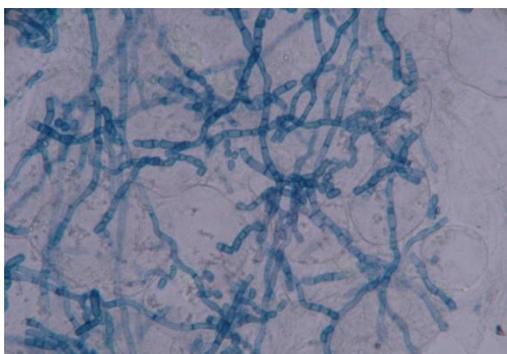
**Figura 81-** Material ungueal com  
esporos de *Fusarium* sp



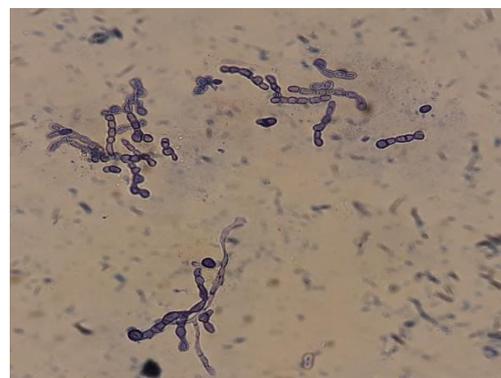
**Figura 82 -** *Malassezia* sp  
(Células de leveduras ovoide com  
gemulação polar)



**Figura 83 -** Hifas septadas demáceas e  
ramificadas.



**Figura 84 -** Hifas septadas e  
artrosporadas KOH + Tinta Parker

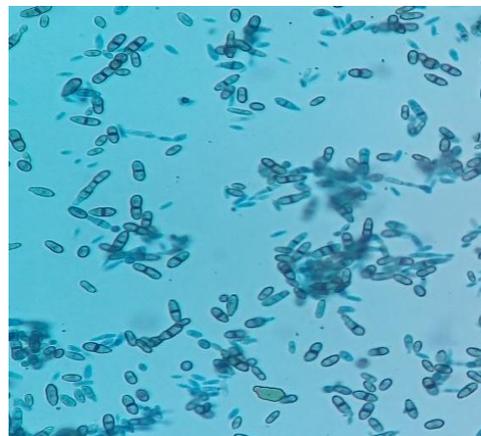


**Figura 85 -** Arthroconídios

## *Hortae werneckii*



**Figura 86-** Hifas septadas demáceas, apresentando-se sinuosas e espessas



**Figura 87-** *Hortae werneckii*. Leveduras cilíndricas e escurecidas, algumas septadas centralmente

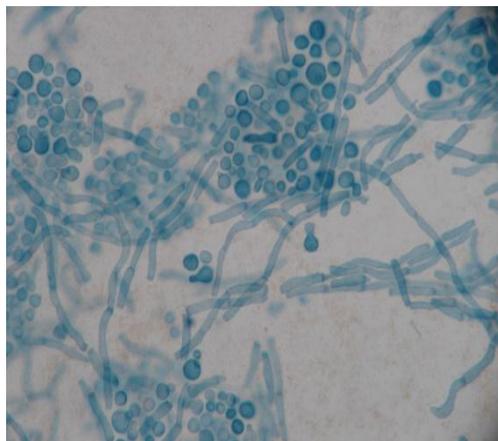
**COLÔNIA:** Inicialmente mucoides, leveduriformes e preto brilhante. Contudo com a idade desenvolvem micélios aéreos abundantes e tornam-se oliváceo escuro. Colônias apresentam como característica serem de crescimento lento.

**MICROSCOPIA:** Hifas septadas e numerosas células semelhantes a leveduras de cor marrom pálido, cilíndricas a fusiformes que se afinam em direção às extremidades. A maioria das células semelhantes a leveduras também possuem septos pigmentados de cor escura proeminentes.

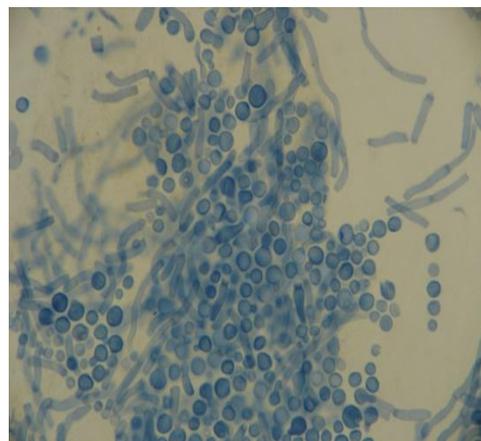
Os conídios são de um a duas células, cilíndricos a fusiformes, hialinos a marrom pálido e geralmente ocorrem em massas agregadas. Clamidósporos e anelídeos podem igualmente surgir.

**PATOGENICIDADE:** Agente de infecção superficial conhecida como Tinea nigra. Caracterizada por uma infecção superficial benigna que acomete o estrato córneo da pele.

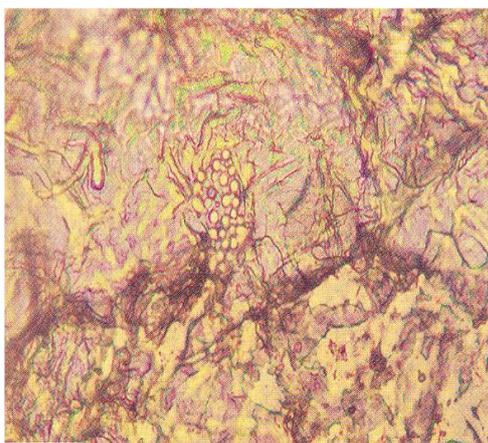
## *Malassezia sp*



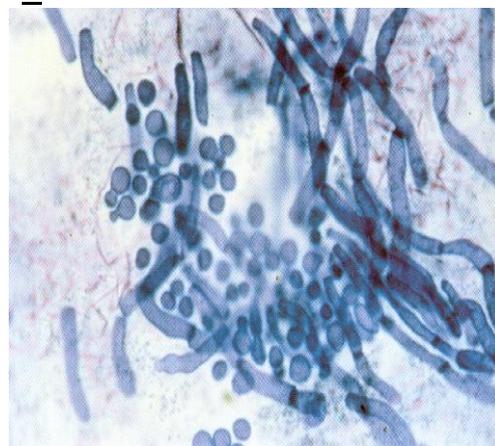
**A**



**B**



**C**



**D**

**Figuras 88 - *Malassezia furfur***

**COLÔNIA:** Crescimento em meio suplementado com ácido graxos e incubados a 37°C com crescimento de colônias semelhantes às de bactérias. Colônias brilhantes, brancas e que podem apresentar coloração com tom de bege com o tempo.

**MICROSCOPIA:** Células de leveduras ovóide de gemulação polar. Formação de colarete no local das gemulações. Hifas curtas e curvas. Aspecto tecidual típico de “ macarrão com almôndegas” Corante KOH 10 - 20% + Tinta Parker (**A**, **B** e **C**) Aspecto tecidual. Corante: KOH 10-20% (**D**) - Coleta com fita adesiva

**PATOGENICIDADE:** Agente de Pitiríase versicolor (*Tinea versicolor*). Uma micose superficial benigna e crônica. A *Malassezia sp* também está envolvida em Pitiríase capitis, dermatite seborreica, hiperqueratose e foliculite. Existem relatos de infecção disseminada em pacientes em uso de nutrição parenteral com lipídios.

## Piedras

### PIEDRA BRANCA



Figura 89 - Piedra branca



Figura 90 - *Trichosporon* sp (Agente etiológico de Piedra branca)

**COLÔNIA:** Textura glabrosa, com relevo variando de rugoso a cerebriforme. Coloração Variando de colônias brancas a creme. Reverso: Normalmente a coloração acompanha a superfície.

**EXAME DIRETO:** Hifas septadas, hialinas ou levemente coradas e ramificadas, aderidas à cutícula do pelo. Presença de Artrósporos poligonais e blastóporos.

**MICROMORFOLOGIA:** Hifas septadas, hialinas e ramificadas com abundante produção de artrósporos podendo também apresentar estruturas denominadas de blastóporos.

**PATOGENICIDADE:** Causada pelo *Trichosporon* sp. Infecção com caráter assintomático, benigno e de baixo contágio.

## PIEDRA NEGRA

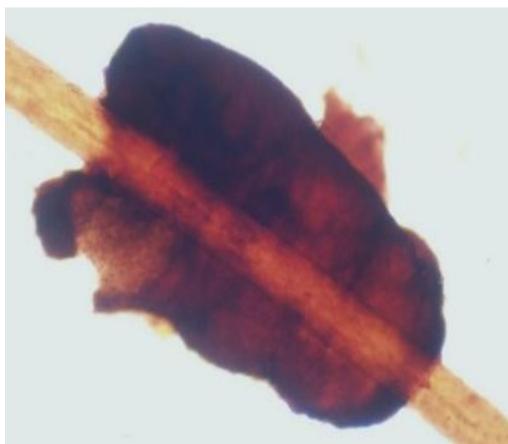


Figura 91 - Piedra negra



Figura 92 - *Piedraia hortae* (Agente etiológico da Piedra negra)

**COLÔNIA:** Colônia com textura glabrosa ou veludosa com centro epiculado tendendo a se tornar cerebriforme. Periferia plana com bordas irregular. Reverso negro. Coloração castanho-escuras, podendo se apresentar verde-oliva ou possuir uma coloração preta.

**EXAME DIRETO:** Nódulos negros, consistentes, fortemente aderidos à cutícula do pelo. Constituído por hifas marrom-escura e artrósporos retangulares. Como característica os ascos contêm 2 a 8 ascósporos curvos e fusiformes com filamento polar nas extremidades.

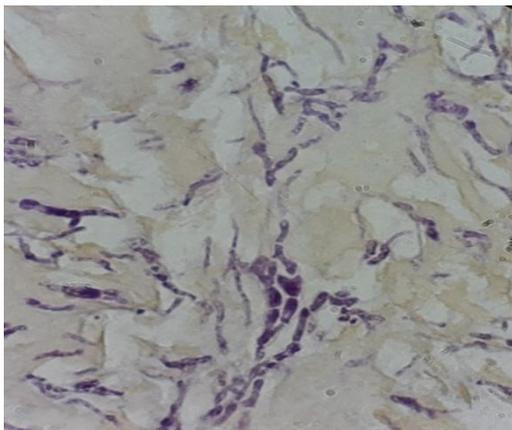
**MICROMORFOLOGIA:** Hifas septadas e ramificadas, de paredes espessas com numerosos clamidósporos e intumescências intercalares. Artrósporos retangulares formados pela fragmentação do micélio. Numerosos ascos contendo 2 a 8 ascósporos curvos, fusiformes apresentando caracteristicamente filamentos terminal nas extremidades.

**PATOGENICIDADE:** Feohifomicose superficial. Agente etiológico *Piedrae hortae*, um fungo demáceo. Infecção caracterizada pelo aparecimento de nódulos endurecidos e escuros nos pêlos. Doença benigna, crônica de baixo contágio.

## 16 ATLAS DE HISTOPATOLOGIA DAS MICOSES

### Dermatofitose

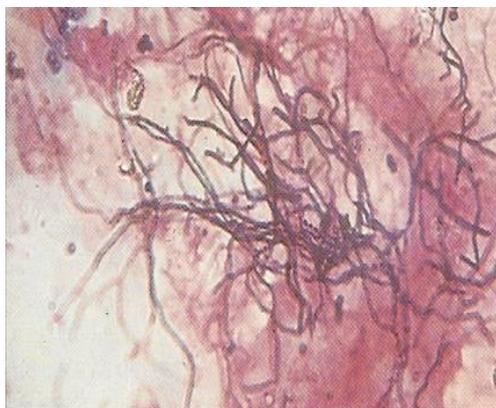
Geralmente as infecções causadas por dermatófitos afetam somente as camadas superficiais atingindo pele e unha e observa-se a presença de hifas septadas hialinas coradas por Hematoxilina e Eosina (HE) ou Acido Periódico de Schiff (PAS).



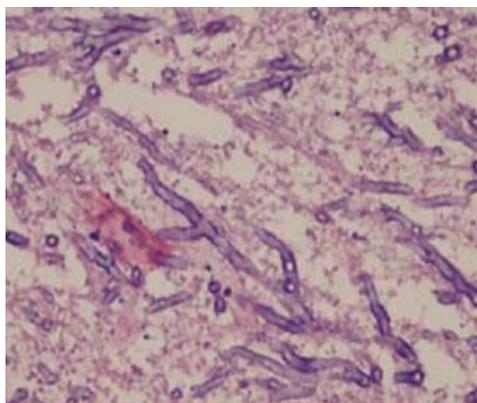
**Figura 93 - Dermatófito. Hifas septadas hialinas. (PAS 40x)**

### Hialohifomicose

Observa-se a presença de hifas, hialinas septadas ou com ramificação dicotômica. Não possível fazer nenhuma identificação do agente etiológico. As colorações mais utilizadas são: Gram, PAS e HE.



**Figura 94- Hifas septadas e ramificadas. GRAM**



**Figura 95- Hifas, septadas hialinas, ramificadas e dicotômicas. (HE 40x)**

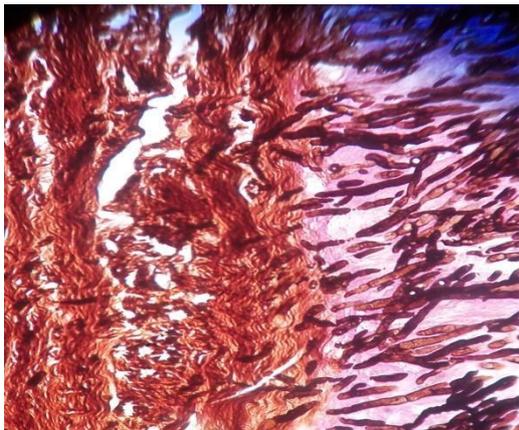


Figura 96- Hifas com ramificação ou e sem ramificação dicotômica. Aspergilose. (Prata-Metanamina 10x).

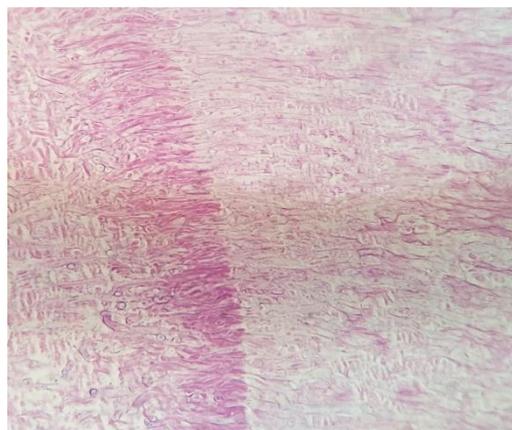


Figura 97- Hifas hialinas septadas uni direcionadas. (PAS 10x)

### Colonização Fúngica Intracavitária. Aspergiloma (Bola fúngica)

Colonização localizada (geralmente *Aspergillus fumigatus*) em um espaço pré-existente na cavidade pulmonar, formado naturalmente ou resultante de alguma doença pulmonar pré-existente.

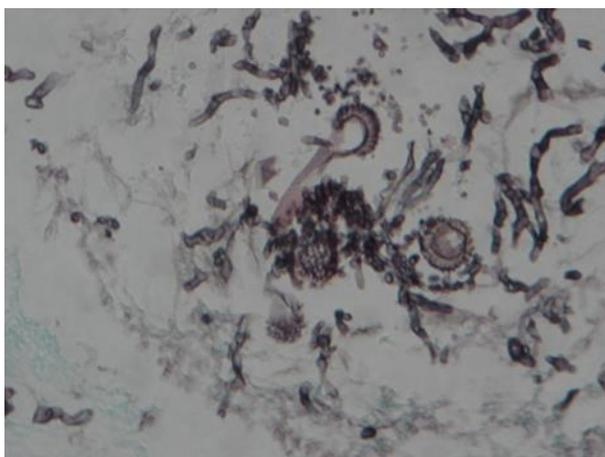


Figura 98- Aspergiloma (Bola Fúngica). Presença de cabeças aspergilares e conídios em alvéolo pulmonar. (Prata – Metanamina.10x).

## Feohifomicose

Infecções causadas por fungos demáceos e evidenciadas nos tecidos pela presença de hifas pigmentadas, comprimento variável, ramificadas ou não.

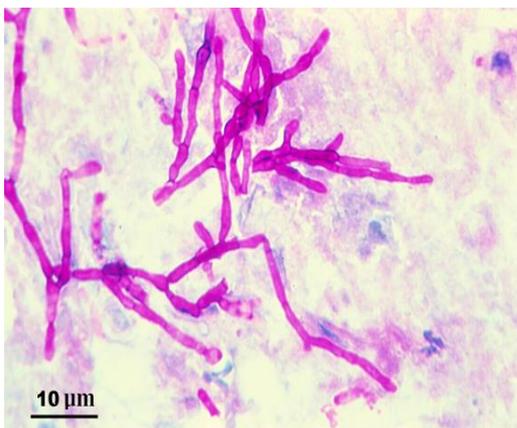


Figura 99- Hifas demáceas e ramificadas. (HE 40x)

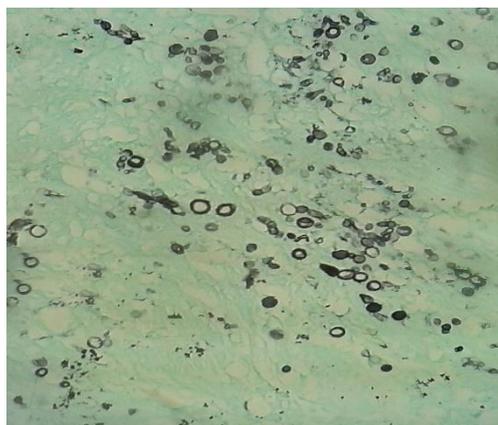


Figura 100- Feohifomicose no couro cabeludo. (Prata-Metanamina. 10x)

## Cromoblastomicose

Presença de células muriforme, apresentado como um corpúsculo acastanhado, em geral disposto aos pares. Conhecidos como corpúsculos escleróticos ou corpúsculos fumagóides.

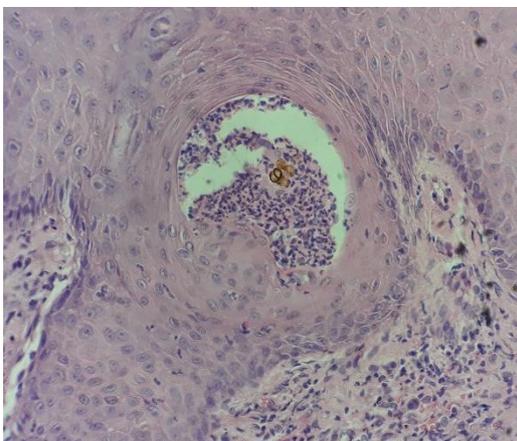


Figura 101- Corpos fumagóides aos pares. (HE, 20x)

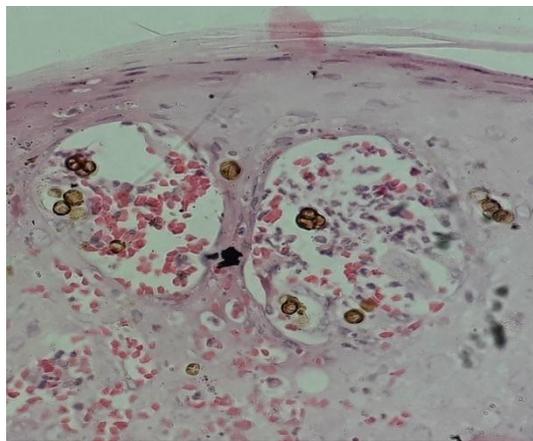


Figura 102- Corte histológico. Corpos fumagóides. (PAS, 40x)

## DIMÓRFICOS

### *Histoplasma capsulatum*

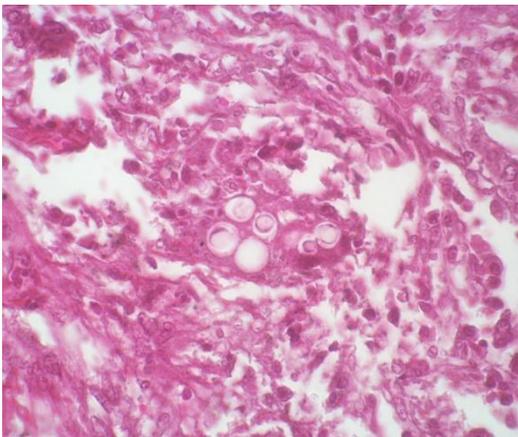


Figura 103- Blastoconídios bem evidenciados. (PAS 40x)

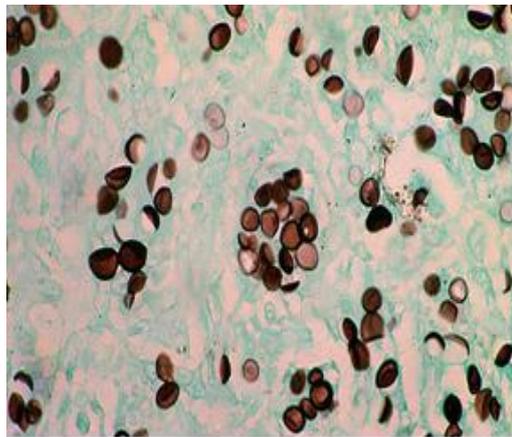


Figura 104- Presença de fungo confirmada pela lâmina corada Leveduras ovoides. Vacúolo intracelular e massa protoplasmática em forma de meia lua na extremidade maior. (Prata-Metanamina 40x)

### *Paracoccidioides brasiliensis*

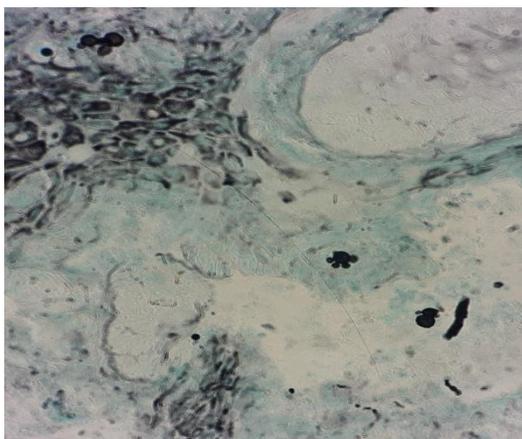


Figura 105- Células de leveduras multibrotantes. (Prata-Metanamina.40x)

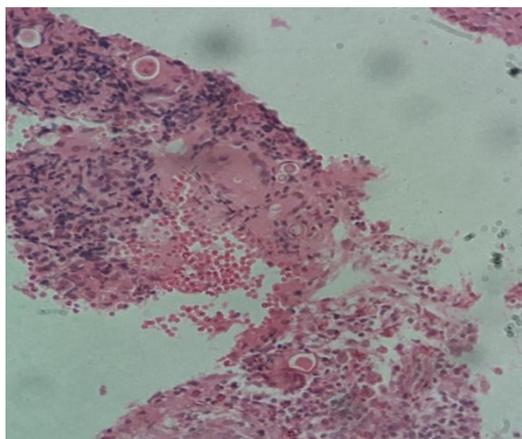
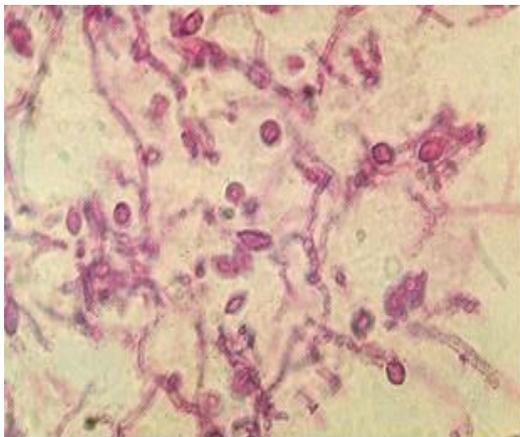
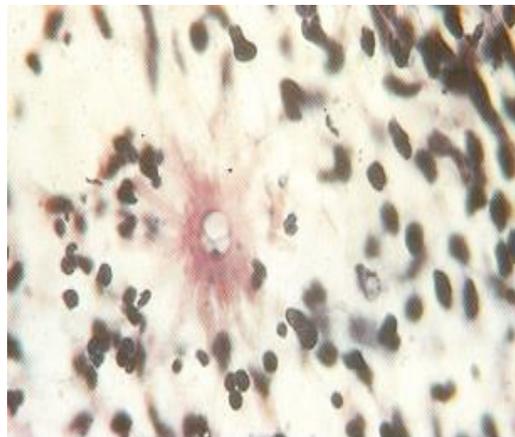


Figura 106- Células de levedura de parede dupla com base de inserção estreita entre a célula parental e a célula filha. (HE 20X)

### ***Sporothrix schenckii* Complexo**



**Figura 107- Células de leveduras com presença de hifas. (PAS 20x)**

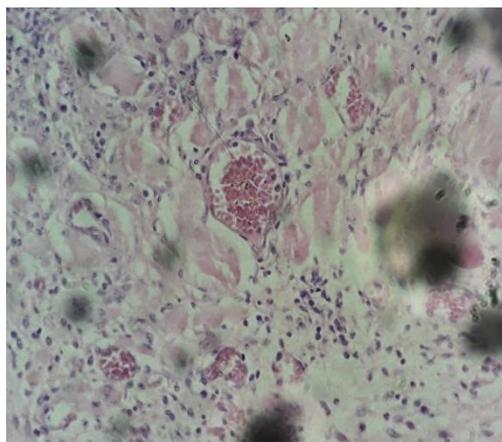


**Figura 108- Presença de corpos asteroide. (HE 20x)**

### ***Coccidioides immitis/ C. posadasii***



**Figura 109- Esférulas com endósporos. (HE 20x)**



**Figura 110- Esférulas repletas de endósporos. (PAS 20x)**

## Lobomicose (*Lacazia loboi*)

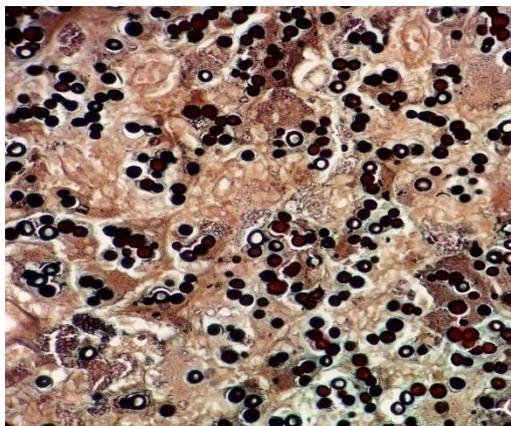


Figura 111- Células globosas, com cadeias lineares ou ramificadas. (Prata-metanamina 10x)

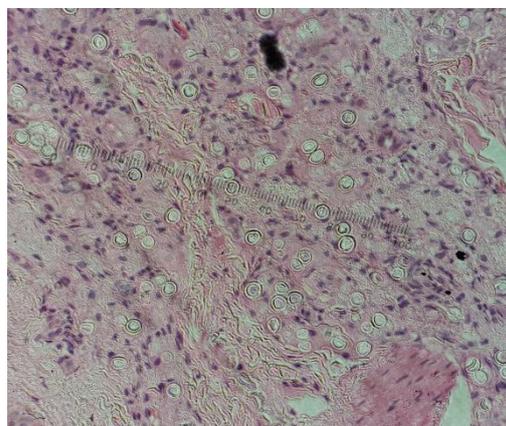


Figura 112- Células em forma de “limão”, ou com dupla gemulação em forma de ampulheta. (PAS 10x)

## Organismo não-fúngico associado: *Rhinosporidium seeberi*

A principal característica é a presença de cisto repleta de trofozoítas (elementos parasitários) em seu interior. Antes considerado fungo, hoje é classificado como um protista aquático do reino Protozoae. Pode ser confundido com *Coccidioides immitis*, porem as esférulas de *Rhinosporidium* sp são bem maiores.

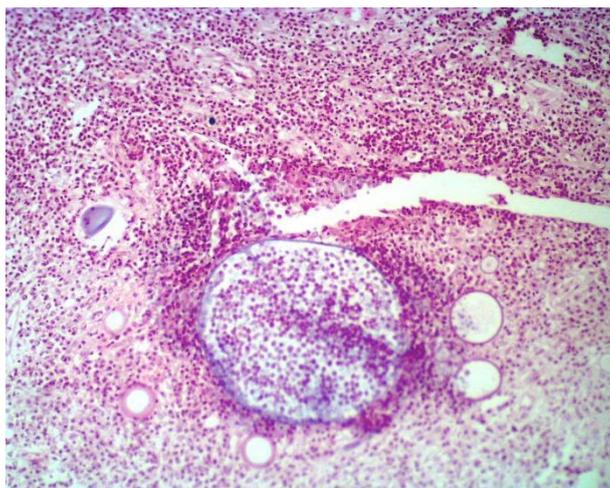
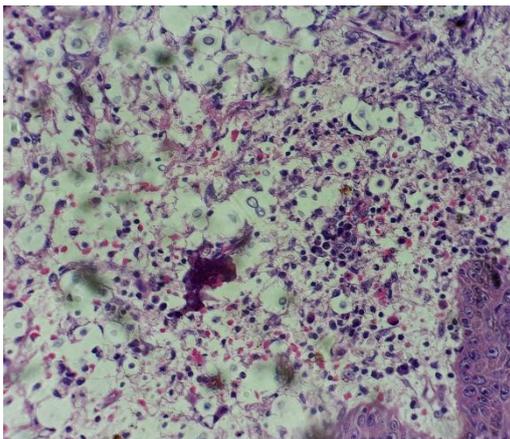


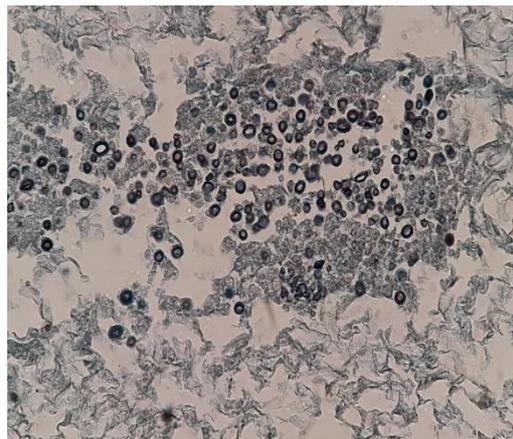
Figura 113- Esférulas ostioladas com endósporos. (HE 10x)

## ***Cryptococcus* sp**

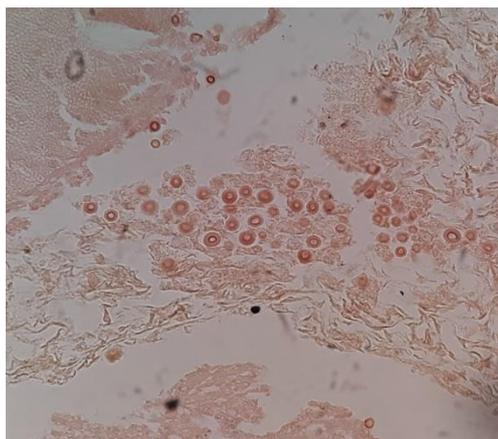
Nos tecidos os *Cryptococcus* sp aparecem na forma de células esféricas e com a típica cápsula, porém nem sempre observável, podendo levar a confusão com outro fungo, *Histoplasma* sp



**Figura 114- Células globosas e ovais, algumas gemulando. (HE 10x)**



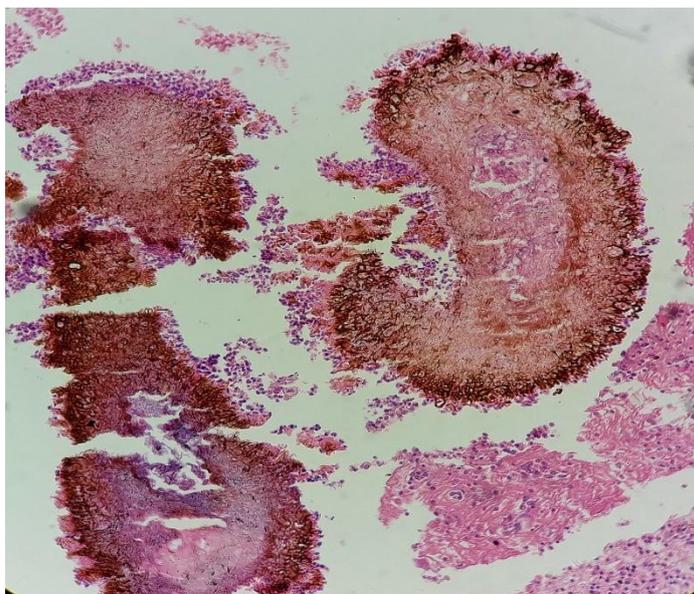
**Figura 115- Acentuado espessamento da parede. Cápsula fortemente corada. (Alcian Blue 20x)**



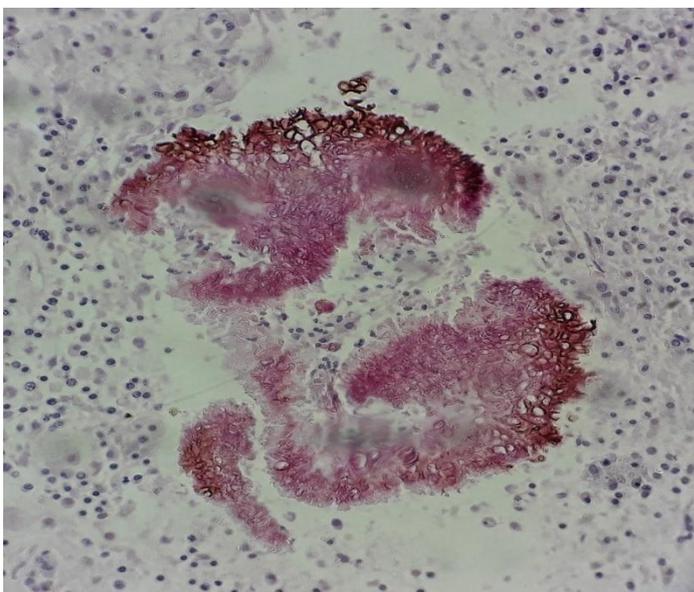
**Figura 116- Numerosas células globosas e capsulas bem caracterizadas. (Mucicarmim de Meyer 20x)**

## Micetoma

Filamentos miceliais entrelaçados (formando colônias) e clamidósporos com cor variando de acordo com a espécie envolvida.



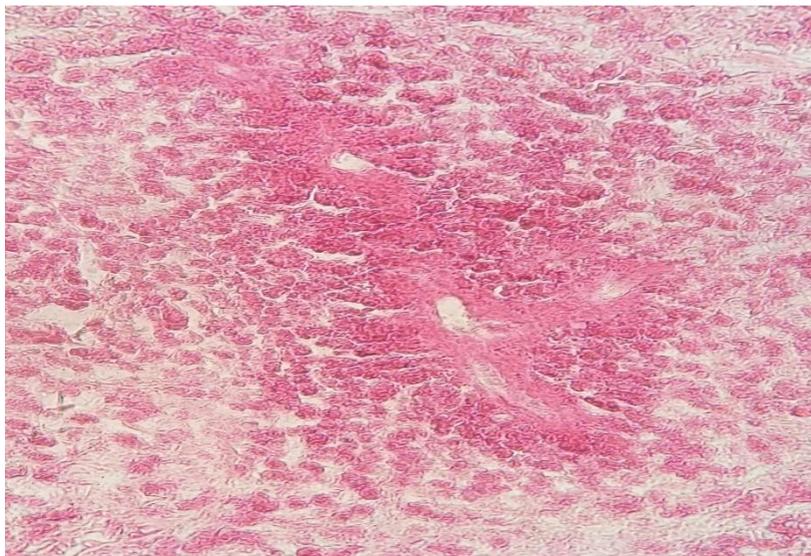
**Figura 117-** Presença de hifas na periferia do grão.



**Figura 118-** Formas arredondadas e entrelaçamento visível na periferia do grão.

## Reação de Splendore-Hoepli

Reação antígeno-anticorpo que rodeia intimamente, por meio de intenso material eosinofílico, a célula Fúngica.



**Figura 119- Reação de Splendore- Hoepli. Pode ser encontrada na esporotricose, coccidiomicose, micetoma, entre outros.**

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O processo de formação profissional tem sido alvo de importantes discussões e a necessidade de desenvolver novas estratégias que favoreçam a melhoria da qualidade do ensino, e agrupar *expertises* tem sido amplamente debatida (MACEDO, 2017). Para que o desenvolvendo profissional na área de medicina laboratorial seja realizado da melhor maneira possível, um fundamental e necessário recurso é a implantação de bons materiais de apoio acadêmico/profissional, como livro-atlas, por exemplo, sendo esse de grande auxílio na formação de analistas críticos e conscientes a respeito do tema micologia médica, contribuindo, principalmente, no seguimento profissional e de ensino aprendizagem (ELLER; BORTOLI, 2017).

Em consonância com o pensamento de Costa e Vandesmet (2019), a utilização de um texto com imagens permite que os alunos e professores criem uma estratégia de estudo por comparação, facilitando a absorção das informações, e sendo, dessa forma, um importante ponto de apoio no desenvolvimento e, no caso em questão, do reconhecimento das estruturas micológicas, fato imprescindível na prática diária.

De acordo com Xavier et al. (2009), o estudo dos fungos e suas particularidades, principalmente quando o objetivo é o diagnóstico micológico médico, tem efeito investigativo, sendo necessária a análise de diversas características para que o microrganismo seja identificado corretamente.

Em uma revisão recente, Restrepo e Cardona-Castro (2018) demonstraram a importância dos métodos micológicos por meio da realização de protocolos específicos, tendo como objetivo o reconhecimento mais preciso do agente etiológico fúngico. Uma avaliação mais detalhada, e respeitando todos os processos para identificação, é de fundamental importância, já que diminui a possibilidade de erros de liberação de fungos do ambiente que possam contaminar acidentalmente a amostra, levando a resultados equivocados, conforme relatados por Silva (2014).

Kavanagh (2017) deixa bem esclarecida a ideia de que a capacidade dos fungos de causar infecção pode ser considerada como uma ocorrência acidental, pois, na verdade, os fungos são exímios decompositores e, devido a isso, não

desenvolveram *expertises* suficientes para serem considerados bons patógenos. Porém, Arango e Morengo (2012) e Quindós (2015) lembram que o aumento de uma população de imunocomprometidos, também muito relacionado aos avanços da tecnologia médica, permitindo uma maior sobrevivência desses pacientes, trouxe um cenário de infecções por fungos oportunistas, já que o indivíduo se encontra desprovido de defesas, principalmente a imunidade celular.

Outra informação importante, citada por Geraldino et al. (2012), é a ocorrência de fungos com capacidade patogênica. Temos como exemplo os fungos dimórficos, assim chamados devido à propriedade de assumir morfologias diferentes dependendo de condição termo - nutricional. Nemecek, Wüthrich e Klein (2006), explicam que os fungos dimórfico são considerados patógenos primários, pois possuem alguns fatores de patogenicidade, permitindo que sejam capazes de provocar doença sistêmica em indivíduos imunocompetentes. Associado à ideia de fungos causadores de infecção primária tem-se os dermatófitos e o *Cryptococcus gattii*, também importantes agentes de infecções em pacientes imunocompetentes (BROWN, D.G, et al., 2012).

Em relação ao ambiente laboratorial, para que o serviço de micologia médica e seus protocolos sejam realizados da forma mais eficiente possível, um ponto importante e fundamental é o local onde todo o processo irá ocorrer e, para isso, o laboratório precisa estar estruturado, respeitando os requisitos necessários para o funcionamento de acordo com a legislação vigente (ALADO, 2010; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013). Como descrito por Simas e Cardoso (2008), o laboratório é um sistema complexo e com muitas variáveis para serem analisadas, tal como: espaço físico, questões sobre biossegurança, documentos necessários para o funcionamento, recursos materiais, recursos humanos e um adequado controle de qualidade.

A ANVISA, órgão normatizador do Ministério da Saúde, determina, por meio da RDC nº 50/2002 condutas de ação para a formação de um ambiente adequado para o funcionamento do serviço de micologia médica (BRASIL, 2002). De acordo com Filho (2018), o ambiente físico laboratorial não é tratado de forma muito consolidada na literatura, principalmente, quando relacionado a um serviço específico, como o setor de Micologia Médica. Dessa forma, a vivência profissional associada à disponibilidade de documentos específicos produzidos “in door” acabam sendo determinantes para o adequado funcionamento do laboratório.

Um outro tema importante relacionado ao serviço de análises micológicas é a biossegurança que, segundo Wooley e Byres, (2017) deve ser tratada com muita responsabilidade, pois envolve questões fundamentais não somente aos profissionais de saúde como também ao meio ambiente. A própria ANVISA (2013) determina as ações voltadas para minimizar os riscos e agravos, devendo essas recomendações serem consideradas com o objetivo de promover a manutenção e o bem-estar ocupacional.

Simas e Cardoso (2008) explicam a necessidade de se preocupar com a possibilidade de contaminação por agentes biológicos, justificando a importância do conhecimento de procedimentos de biossegurança. Hirata et al. (2012), relatam os níveis de segurança que devem ser adotados para o trabalho com os microrganismos, de acordo com as classificações de risco, que variam de nível de segurança I a nível de segurança IV.

De acordo com Rojo-Moliner, (2015), os fungos são microrganismos de fácil dispersão (através dos esporos), no meio ambiente, e a possibilidade de uma contaminação, podendo ser também por meio de um trauma, é algo possível de acontecer, principalmente por conta da fragilidade imunológica de um hospedeiro susceptível.

Diante dessas informações, Alado (2010) e Carlos et al. (2009), orientam que, para se trabalhar com os fungos, apesar de a maioria ser classificada como agentes de nível de segurança classe II, é interessante que os laboratórios de micologia médica tenham a perspectiva do trabalho em nível de biossegurança classe III, já que a segurança biológica está associada com o agente biológico de maior nível. Assim sendo é necessário considerar os processos imigratórios, tão recorrentes hoje em dia e que possuem envolvimento com os isolados dos chamados fungos emergentes, entre eles os fungos dimórfico, por exemplo.

Importa mencionar que os fungos estão relacionados a diversas infecções, em diferentes órgãos e tecidos, entre elas podem ser citadas lesões de pele, superfície mucosa e infecções invasivas, que acometem múltiplos órgãos internos (KIM, 2016). Winn, et al. (2008), relatam que procedimentos incorretos podem ser prejudiciais no isolamento do agente. Por conta disso, informações e orientações sobre o uso prévio de medicamentos, a coleta adequada das amostras nos diversos sítios a serem pesquisados, os procedimentos de armazenamento, cultivo e

identificação do agente etiológico são fundamentais para que haja sucesso na recuperação do agente fúngico (LEBER, 2016).

Pantón (2002) afirma que o processamento das amostras deve respeitar certas prioridades. Moya et al. (2017) corrobora essa assertiva, pois comenta que amostras, como líquido, hemocultura e outros líquidos de cavidades estéreis precisam ser processadas o mais rápido possível, através de técnicas como exame direto, por exemplo, determinando, em muitos casos, o início da terapia do paciente.

Diversos métodos podem ser utilizados com o intuito de realizar o diagnóstico para esses patógenos, sendo que o crescimento em cultura ainda se mantém como a técnica padrão ouro (LOPES; SOUSA; TOMAZ, 2007).

As amostras devem ser processadas de acordo com suas características. Gardeweg (2012), por exemplo, orienta que as amostras de couro cabeludo devem ser representativas, principalmente quando há presença de escútuas de *Tinea favosa*. A adequada orientação para a coleta de amostras se estende a todos os outros espécimes clínicos e cabe ressaltar que o documento M54-A do *Clinical Laboratory Standart Institute* (CLSI) disponibiliza todos os protocolos de processamento das amostras destinadas ao estudo micológico (CLSI, 2012).

Em muitos casos, há a necessidade da utilização prévia de KOH em concentrações que variam de 10% a 40%, cujo objetivo é proporcionar a digestão de substâncias que possam interferir na visualização de elementos fúngicos (RESTREPO; CARDONA-CASTRO, 2018).

Outro recurso muito utilizado na micologia médica, segundo Baron et al. (2013), é a associação do procedimento de cultura com o método de histopatologia. De acordo com Guarner e Brandt (2011), a histopatologia é uma ferramenta diagnóstica muito importante, inclusive nos casos onde é dificultado o isolamento dos fungos em meios de cultura tradicionais, fornecendo informações sobre a resposta inflamatória, produzida no tecido, a causa da lesão e a observação das estruturas fúngicas através de técnicas específicas de coloração, podendo ser citado como exemplo a técnica de metenamina de prata de Grocott-Gomori (GMS).

Bonifaz (2015) comenta sobre a utilização da sorologia como recurso na determinação do prognóstico e monitoramento da eficácia terapêutica. Kaufman e Reis (1985), também consideram a sorologia como uma ferramenta proveitosa na detecção de antígenos fúngicos (pacientes imunocomprometidos) e anticorpos (pacientes imunocompetentes) produzidos no desenvolvimento da infecção.

Antes de tudo, cabe ressaltar que a dinâmica de um laboratório de micologia médica deve estar baseada em rígidos controles de qualidade, para assegurar que os laudos sejam precisos e confiáveis (PEMÁN; MARTIN-MAZUELO; CALVO, 2007). É importante mencionar que os processos micológicos precisam ser monitorados e nessa linha de raciocínio, os controles interno e externo desenvolvem este fundamental papel (FISHER; DOLT, 2002). A própria legislação, por meio da RDC 302/2005 determina que os laboratórios passem por programas de proficiência, que permitam atestar a qualidade de todos os exames realizados (BRASIL, 2005). Esse controle se torna muito necessário, em um laboratório de micologia médica, pois a dificuldade, por exemplo, na identificação fenotípica requer treinamento específico e ostensivo para que se conduza a resultados mais confiáveis e fidedignos (FISHER; DOLT, 2002).

De fato, Fisher e Dolt (2002) esclarecem que na formação do profissional de laboratório existe uma falha em relação ao conhecimento de metodologias simples. Contribuindo para um diagnóstico fúngico de baixa qualidade, também está a formação micológica deficiente dos profissionais de laboratório. Isto é muito favorecido pelo negligenciamento acerca da micologia médica, mesmo na época dos pacientes imunocomprometidos (Neufeld, 1999).

Essa informação pode ser observada em um estudo produzido por Costa e Levin (2007), que realizaram um Inquérito Nacional, tendo como alvo, alguns laboratórios de microbiologia do país, onde se observou que o tema micologia era pouco citado. Neste estudo, todavia, os tópicos infra-estrutura e recursos humanos faziam referência ao assunto.

Devido a toda essa problemática, a aplicação de recursos de ensino com o uso de imagens para ensino micológico, é de fundamental importância, pois essa ferramenta associada à teoria, facilita o aprendizado, melhorando a fixação de todo o conteúdo ministrado e fomentando a capacidade investigativa do aluno. A utilização de recursos pictóricos é uma estratégia útil para a prática de ensino e aprendizagem em micologia, pois a forma de trabalho no laboratório se baseia no estudo da morfologia fúngica (PEREIRA; COUTINHO, 2017).

Como observado por Zhao et al. (2012), o uso de imagens permite um ganho na aprendizagem, fornecendo um treinamento mental, principalmente quando existe relação na prática diária.

Na área da medicina e odontologia, alguns autores têm desenvolvido materiais didáticos que estimulam a aplicação de princípios e práticas de diagnóstico com impacto positivo na atenção ao paciente (CHAMBERLAIN; YATES, 2000; LOWE et al., 2001). De acordo com Brahler (2002), o tipo e a qualidade das tecnologias didáticas podem promover o pensamento crítico, melhorando a capacidade dos profissionais em analisar, avaliar, questionar, investigar, divergir, argumentar e experimentar.

Ainda na odontologia, laves et al. (2015) demonstram que estratégias de ensino- aprendizagem, como o uso de tecnologia de informação, favorecem a compreensão do conteúdo, constituindo-se em recurso de grande importância no processo de ensino. Em associação, a elaboração de um texto informativo, rico em detalhes, permite o aprendizado de conceitos e definições que são fundamentais para um entendimento integral dos temas ensinados.

Esse fato é corroborado por Peres (2012), quando salienta que o exame microscópico é uma etapa de grande importância para a Micologia médica, pois através das análises realizadas em microscopia associadas a utilização de um atlas (sendo em muitos momentos indispensável), é possível promover o estudo das estruturas vegetativas e reprodutivas dos fungos, permitindo, dessa forma, um direcionamento adequado para a identificação dos agentes micológicos.

Diante do exposto, o acesso a materiais escritos e imaginográficos é importante para incentivar revisões e reforçar conhecimentos aprendidos na formação regular ou durante a prática profissional (DONNELLY; AGIUS, 2005).

O material didático que foi elaborado visa, exatamente, produzir um aumento no nível de conhecimento, bem como estimular o pensamento crítico, para o estabelecimento de um diagnóstico micológico efetivo.

## REFERÊNCIAS

ABOL, J.C. Garantia da Qualidade no Laboratório Clínico. Ed. 5 2015-2016.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. Segurança no ambiente hospitalar. BRASIL, 2013. Disponível em:<[http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/seguranca\\_hosp.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/seguranca_hosp.pdf). Acesso em 24 set. 2018.

ARANGO, A.; MORENO, N. Mycological diagnosis from direct molecular methods. *Rev. Asoc. Colomb. Dermatol.* v.20, n.1 p.76-82, enero-marzo,2012

ARAUJO, M.R.H. Hemocultura: recomendações de coleta, processamento e interpretação dos resultados. *Journal of Infection Control*, v. 1, n. 1, 2012.

ARORA, D.R.; ARORA, B.B. *Medical Mycology*. New Delhi. CBS Publishers & Distributors PVT. Ed 5. 2014.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 10152. Níveis de ruído para conforto acústico. Rio de Janeiro, 1987.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 5410. Instalações elétricas de baixa tensão ,2008

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 5413. Iluminância de interiores. 1992. 13 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12179. Tratamento Acústico em Recintos Fechados. 1992.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 13534 Instalações elétricas em estabelecimentos assistenciais de saúde (EAS) - Requisitos para segurança. 1995.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 13434-2 Associação Brasileira de normas Técnicas - Sinalização de segurança contra incêndio e pânico, parte 2. 2004. 19 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 7256 Tratamento de ar em estabelecimento de saúde (EAS) - Requisitos para projeto e execução das instalações. 2005.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR ISO/CIE 8995-1- Iluminação de ambientes de trabalho, Parte 1: Interior, 2013.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 16291:2014 - Chuveiros e lava-olhos - Requisitos gerais. 2014

- AIRES, C. A. M. et al. Biossegurança em transporte de material biológico no âmbito nacional: um guia breve. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v. 6, n. 2, 2015. 73–81p.
- ALADOS, J. C. et al. Diseño de un Laboratorio de microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v. 28, n. 7, 2010. 453–460p.
- ALBINI, C. A.; SOUZA, SOUZA, H.A.P.H.M; SILVEIRA, A.C.O (Org.). *Infecções urinárias*. 1. ed. Curitiba. CRV, 2012.
- ALBERHASKY, Robert C. Laboratory diagnosis of onychomycosis. *Clinics in podiatric medicine and surgery*. v. 21, n. 4.2004. 565-78 p.
- TRUJILLO, A. B. *Micología Médica Básica*. 4 eds. 2012.
- ALMEIDA, S. R. DE. *Apostila de micologia clínica*. SAO PAULO: [s.n.].
- ALMEIDA, S. R. DE. *Micologia - Ciências Farmacêuticas*. Guanabara Koogan, 2008.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA Segurança e Controle de Qualidade no Laboratório de Microbiologia Clínica Módulo II. 2001.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA Resolução-RDC n. 20, de 5 de maio de 2011. Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição, isoladas ou em associação. DOU n. 87 de 9 de maio de 2011. Seção 1.2011. 39–41 p.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 1: Biossegurança e Manutenção de Equipamentos em Laboratório de Microbiologia Clínica. v. 1. 2013. 44p.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. Microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa, v. 6, 2013. 1–154p.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA Plano Nacional para a Prevenção e o Controle da Resistência Microbiana nos Serviços de Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, 2017. 1–81p.
- ARENAS GUZMÁN, R. *Micología médica ilustrada*. Mc Graw Hill. 4 ed. 2008
- AZEVEDO, M. D. F. M. *Análises de riscos em ambientes laboratoriais clínicos: Uma abordagem centrada em Biossegurança e Ergonomia*. UFSC, 2002.
- BARAK, O; ASARCH, A; HORN, T. PAS is optimal for diagnosing onychomycosis. *Journal of cutaneous pathology*, v. 37, n. 10, 2010.1038-1040 p.

BARBOSA, I. et al. Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial (SBPC/ML)- Boas Práticas em Microbiologia Clínica. Manole, 2015.

BARCELOS, L. F.; AQUINO, J. L. Tratado de Análises Clínicas. 1. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2017.

BARKLEY, W. E. et al. Manual de Segurança Biológica em Laboratório. GENEBRA Organização Mundial de Saúde (OMS), 2004.

BARON, E. J. et al. A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2013 Recommendations by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society for Microbiology (ASM) a. Clinical Infectious Diseases. v. 57, n. 4.2013.22–121p.

BARREIRO, J.; MAYNOU, X. Arquitetura sanitária. Diseño del laboratorio de análisis clínicos. Gestión y Evaluación de Costes Sanitarios, v. 9, n. 2. 2008.

BARROSO, H.; MELICO-SILVESTRE, A.; TAVEIRA, N. Microbiologia Médica. Lidel, 2014.

BENELLI, J. L. et al. Ensino da Micologia Clínica na graduação: elaboração de um guia prático ilustrado para identificação dos fungos agentes de micoses, 2014.

BÉRASTÉGUI, P. et al. Fatigue-related risk management in the emergency department: a focus-group study. Internal and Emergency Medicine, 2018.

BERNABÉ, S. L.; CASTILLO, L. F. V. Manual de prácticas de laboratorio de bacteriología y micología 1/52. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México, 2013. 1–52 p.

BIANCHI, R. et al. Micologia Clínica. Anuário, Pesquisa e extensão. Unoesc Xanxerê, v. 2, 2017. 1375p.

BONIFAZ, A. Micologia Médica Básica. 5. ed. McGraw-Hill: Interamericana Editores, S.A, 2015

BRASIL. Ministério da Saúde. Normas para projetos físicos de estabelecimentos assistenciais de saúde. 1995.

BRASIL. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. RDC. No. 50. Resolução de 21 De fevereiro De 2002. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para planejamento, programação, elaboração e avaliação de projetos físicos de estabelecimentos assistenciais de saúde.2002.

BRASIL. Ministério da Saúde- Resolução - RDC N 275, de 21 de outubro de 2002. Anvisa, v. 2002, 1–23 p.

BRASIL. Fundação Nacional de Saúde. Diretrizes para projetos físicos de laboratórios de saúde pública. Brasília, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Diretrizes Gerais para o Trabalho em Contenção com Material Biológico. Série A. N ed. Brasília: Comissão de Biossegurança em Saúde (CBS/MS), 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC 302. Resolução de 13 de outubro de 2005. Dispõe sobre regulamento técnico para funcionamento de laboratórios clínicos. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. Série A. N ed. Brasília: 2001.

BRASIL. Ministério do Trabalho e Emprego- Norma Regulamentadora - Ergonomia. Norma Regulamentadora nº 17, 2007. 14p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de ciência, tecnologia e insumos estratégicos. Departamento de ciência e tecnologia. Classificação de risco dos agentes biológicos. Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção relacionada a Assistência à Saúde. Módulo 8: Detecção e Identificação de Fungos de Importância Médica. 2013. 46p.

BRASIL. Programação arquitetônica de unidades funcionais de saúde. SOMASUS - Sistema de Apoio à Elaboração de projetos de Investimentos em Saúde. - Apoio ao Diagnóstico e à Terapia: Anatomia Patológica, Hemoterapia e Hematologia, Medicina Nuclear e Patologia Clíni. Ministério da Saúde, v. 4, 2014. 190 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC N° 20, de 10 de abril de 2014. Resolução. Dispõe sobre regulamento sanitário para o transporte de material biológico humano. 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC 222. Resolução de 28 de março de 2018. Regulamenta as Boas Práticas de Gerenciamento dos Resíduos de Serviços de Saúde e dá outras providências. Brasília, 2018.

BRASIL, R. F.; MINISTÉRIO DA SAÚDE; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde. Editora Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004.

BROWN, Gordon D. et. al. Hidden killers: human fungal infections. *Science translational medicine*, v. 4, n. 165, 2012.

CAMPBELL, C.K; JOHNSON, E.M; WARNOCK, D.W. Identification of pathogenic fungi, 2 ed. London, England: Wiley-Blackwell, West Sussex, 2013. 263–304 p.

CANALLI R.T.C; MORIYA T.M; HAYASHIDA M. Acidentes com material biológico entre estudantes de enfermagem. *Rev. Enferm. UERJ*. 2010;18(2):259-64 p.

- CARLOS, J. et al. Diseño de un laboratorio de Microbiología Clínica. Procedimientos en Microbiología Clínica Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. SEIMC, 2009.
- CARVALHAES, J. Tópicos em Micologia Médica. ControlLab, 2014.
- CASTRO, C; MARTÍN, E. Diagnóstico de la infección fúngica por levaduras del género *Candida*: *Candida dubliniensis*. *Control calidad SEIMC*, [s.d.]. 1–10p.
- CDC. US Department of Health and Human Services-Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. *Public Health Service*, v. 5th Edition, Revised December, 2009 438p.
- CHANDLER, F.W; KAPLAN, W.; AJELLO, L. Color Atlas and Text of the Histopathology of Mycotic Disease. England: *Wolfe Medical Pub-year Book*; 1980. 333p.
- CHAVES, C. D. et al. Norma PALC. Sociedade Brasileira de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial (SBPC/ML). 2016.64 p.
- CLSI. Clinical Laboratory Safety. Ed.3 Approved Guideline.
- CLSI. Quality Management System: Development and Management of Laboratory documents; 6th Ed. Approved Guideline. QMSO2-A6. Wayne: *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2013.
- CLSI. Nonconforming Event Management. Ed 2. Approved Guideline. QMS11. Wayne: *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2015.
- CLSI. Principles and Procedures for Detection of Fungi in Clinical Specimens-Direct examination and Culture; Approved Guideline. CLSI Document M54-A, Wayne, PA: *Clinical and Laboratory Standards Institute*:2016
- CLSI. Quality Management System: Leadership and Management Roles and Responsibilities: Approved Guideline. GP38-A. Wayne: *Clinical and Laboratory Standards Institute*: 2012
- COLE, Donald C. et al. Fungal infections 8 Improvement of fungal disease identification and management: combined health systems and public health approaches. 2017
- COLLINS, C. H. Safety in microbiology: a review. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, v. 1, n. 1, 1984.141-166 p.
- COLOMBO. A.L. Diagnóstico de doenças fúngicas oportunistas: O grande desafio para os centros médicos de atendimento terciário. In: *Revista Prática Hospitalar*. N.52 São Paulo: Editora e Publicidade, 2007, 50-55p.

COMISSÃO TÉCNICA NACIONAL DE BIOSSEGURANÇA. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI Comissão Técnica Nacional de Biossegurança - CTNBio Secretaria Executiva. Disponível em <http://www.ctnbio.gov.br>. Acesso em 18/09/2018.

CONAMA. Conselho Nacional de Meio Ambiente. RESOLUÇÃO CONAMA nº 358, de 29 de abril de 2005. Dispõe sobre o tratamento e a disposição final dos resíduos dos serviços de saúde e dá outras providências. Resoluções da CONAMA, v. 23, n. 9, 2005. 614–621p.

CONTI, D. I. A.; CIVILA, E.; VEIGA, R. The importance of microscopic examination in the management of desquamative diseases of the scalp. *Mycopathologia*, v. 153, n. 2, 2002. 71–75p.

CORTEZ, K. J.; GROLL, A. H.; WALSH, T. J. Resources for Medical Mycology on the World Wide Web. 2018.

COSTA, M. A. F. D. et al. Biossegurança e boas práticas laboratoriais. EPSJV. 2009.

COSTA, N.; NIEMEYER, M. L. Conforto acústico em laboratórios de contenção biológica. XIII Encontro Nacional de Tecnologia do Ambiente construído, n. 1, 2010.

CRUZ, F.V. Caracterização fenotípica de fungos isolados do controle microbiológico de bio-manguinhos/Fiocruz e estruturação de uma micoteca. 2016

CUENCA-ESTRELLA, M.; RODRIGUEZ-TUDELA, J. L. ¿ Pueden basarse las indicaciones de los antifúngicos en los estudios de sensibilidad *Rev.Iberoam Micol*, v. 19, 2002. 133–138 p.

CUENCA ESTRELLA, M. et al. Diagnóstico microbiológico y de la micosis y estudios de sensibilidad a los antifúngicos. *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica*, v. 25, n. 5, 2006. 336–340p.

DÍAZ, I. A. C. Micosis superficiales. [S.l.] BIOMEDICINA, v. 42. 2006.

DUARTE, E. A; DENNING, D. W. Serious fungal infections in Chile. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 36, n. 6, 2017.983-986p.

DUARTE, E.A. Reconociendo los hongos: Micología médica. Mikes ediciones. Santiago, Chile. 2018.

EKER, D.J; et al. New technology for rapid molecular diagnosis of bloodstream infections. *Expert Rev Mol Diagn*. 2010, p.399-415.

ENE, Iuliana V. et al. Metabolism in fungal pathogenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2014

- Farmacopeia brasileira, 5ª edição, São Paulo: Atheneu, 2010.
- FISHER, F; COOK, N. B. Micologia - Fundamentos e diagnóstico. Revinter, 2001.
- FRARE, R. et al. Capítulo 8-Infecções fúngicas em imunocomprometidos. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 36, n. 1, 2010:142-14p.
- FAULHABER, M.H.W.; FAULHABER, A.C.L. Gestão da qualidade como ferramenta para minimizar os erros pré-analíticos. In: Andriolo et al. Recomendações da sociedade Brasileira de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial (SBPC/ML). Fatores pré-analíticos e interferentes em ensaios laboratoriais. 01.Ed. Barueri-SP: Manole, 2018.
- FURUTA, T.; HASHIMOTO, S. Fontana-Masson-stained Tissue from Culture-proven Mycoses. *Pathology International*, v. 50, A152, 2000p.
- GARDEWEG, L. Diagnostico de Hongos y Leveduras. *Manual Microdiagnostica*, 2012.
- GAUTHIER, Gregory M. Fungal dimorphism and virulence: molecular mechanisms for temperature adaptation, immune evasion, and in vivo survival. *Mediators of inflammation*, 2017.
- GERALDINO, T. H. et al. Dimorfismo, produção de enzimas funcionais e adesinas de *Candida albicans*: Mini Revisão Dimorphism, functional enzymes production and adhesins of *Candida albicans*: a mini review, 2012. 26–41 p.
- GUARNER, J; BRANDT, M. E. Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21st century. *Clinical microbiology reviews*, v. 24, n. 2. 2011.247-280p.
- GUILHERMETTI.E.et al. Medical Mycology: an emergent subject in clinical analysis Eliana. RBAC. *Revista brasileira de análises clínicas*, v. 36, n. 1, 2004. 51–53p.
- HANEL, J.R.; KRUSE, E.; RICHARD, H. Laboratory-acquired mycoses. FORT DETRICK FREDERICK MD, 1967.
- HATTEMER-APOSTEL, R. Standard operating procedures - A novel perspective. *Quality Assurance Journal*, v. 5, n. 4, 2001. 207–219p.
- HEITMAN, Joseph. Microbial pathogens in the fungal kingdom. *Fungal biology reviews*, v. 25, n. 1, 2011. p. 48-60
- HIBBETT, David S. et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, v. 111, n. 5, 2007. p. 509-547
- HIRATA, R. D. C.; FILHO, J. M. Manual de Biossegurança. 2. ed. Barueri- SP: Manole, 2012.
- HÖFLING, J. F.; GONÇALVES, R. Isolamento e Caracterização de fungos patogênicos de importância médica. Jundiaí -SP: Paco Editorial, 2016.

HOWELL, S. A; HAZEN, K.C.; BRANDT, M.E. *Candida, Cryptococcus* and other yeast of medical importance, in: Jorgensen, M Pfaller K. Carroll et al., eds, *Manual of Clinical Microbiology*. Ed.11. Washington DC.ASM Press, 2015.

HUTCH, M. et al. Assessment of Cadmium Tolerance and Oxidative Stress Response in *Limulus polyphemus*. 2017.

ISO 15189. Laboratório de Análises Clínicas- Requisitos Especiais de Qualidade e Competência Ed.2; 2017.

JIMENEZ, J.M.V. et al. Técnica de recogida de muestra para onicomicosis en atención primaria. *Med fam Andal*, v. 18, 2017. 210–213p.

JOS, L. Diagnóstico microscópico de las micosis. 2007.

KAUFMAN, L.; REIS, E. Serodiagnosis of fungal diseases. *Manual of clinical Microbiology*. 1985. 924- 944 p.

KAVANAGH, K. (Ed.). *Fungi: biology and applications*. John Wiley & Sons, 2017.

KERN, M. E.; BLEVINS, K. S. *Micologia Médica - Texto e Atlas*. São Paulo: Editorial Premier, 1999.

KIBBLER, Christopher C. et al. (Ed.). *Oxford Textbook of Medical Mycology*. Oxford University Press, 2017.

KOZEL, T.R.; WICKES, B. *Fungal Diagnostics*. Cold Spring Harbor Laboratory, v. 968, 2013.

LACAZ C.S; PORTO E. M. J. *Micologia médica: fungos actinomicetes e algas de interesse médico*. 8ed. ed. São Paulo: Sarvier, 1998.

LACAZ C. et al. *Tratado de Micologia Médica*. Ed. 9. São Paulo: Sarvier. 2002. 1104 p.

LEBER, A.L. *Clinical microbiology procedures handbook*. v.1-2. 4. ed. Washington, DC: American Society for Microbiology. 2016.

LEE, S. et al. Discrepancy between histology and culture in filamentous fungal infections. *Sabouraud*, v. 48, n. 6, 2010. 886-888 p.

LEVY CE, et al. *Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde*. In: Módulo VII. Detecção de fungos de importância médica. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde, 2004.

LEVY, E.C.; FERREIRA, C.G.; CARDOSO, M.R.A. Análise do Inquérito Nacional sobre infra-estrutura, recursos humanos, equipamentos, procedimentos, controle de qualidade e biossegurança nos laboratórios de Microbiologia. Julho, 2007.

- LIMA, K. D. M. et al. Diagnósticos Clínicos e Laboratoriais das Onicomicoses. *News lab*, n. 83, p. 1, 2007. 84–196 p.
- LIN, X. et al. Fungal Morphogenesis., 2015. 1–26p.
- LINDSLEY, M. D. et al. Reagents, Stains, and Media: Mycology. In: *Manual of Clinical Microbiology*, Eleventh Edition. *American Society of Microbiology*, 2015. 1955-1964 p.
- LIMPER, A. H. et al. Fungal infections in HIV/AIDS. *The Lancet Infectious Disease*, 2017.
- LOPES, A.R.; SOUSA, A.S.; TOMÁS, J.G. Fundamentos básicos para el diagnóstico micológico. In: PEMÁN, J.; MARTIN-MAZUELOS, E.; RUBIO CALVO, M.C. *Guía Práctico de Identificación y Diagnóstico em Micología Clínica*. Bilbao: *Revista Iberoamericana de Micología*, 2007
- LOUSANA, G. Boas Práticas Clínicas nos centros de pesquisa. *Revinter*, 2005.
- LUQUE, A. et al. Guía de procesamiento de materiales clínicos. CEREMIC - *Centro de Referência de Micologia*, 2017. 1–27 p
- LYNNE, G. *Clinical Laboratory Management*. 4.ed. Washington, DC.; *American Society for Microbiology*, 2016.
- MACGOWAN, K. L. Specimen collection, transport, and processing: mycology. In: *Manual of Clinical Microbiology*. *American Society of Microbiology*, 2011. 1756 – 1766p.
- MALBR, C. G. *Curso a Distância y Taller de Identificación de Hongos Miceliales Oportunistas de Interés Médico*. 2016.
- MANCINI, N. et al. The era of molecular and other non-culture-based methods in diagnosis of sepsis. *Clin Microbiol Rev*. 10: 2010. 235-251p.
- MARCHISIO, V. F. Keratinophilic fungi: Their role in nature and degradation of keratinic substrates. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 17, 2000. 86–92p.
- MARIA, A.; MORAES, L. DE; PAES, R. D. A. *Micologia. Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde*, 2009. p. 399–496.
- MARTINEZ, R.L. et al. *Micología Médica: Procedimientos para el Diagnóstico de Laboratorio*. 3 ed. México: Trillas; 2012. 208p.
- MARTINEZ, F.C.; MORENO, J.J.; ROCHA, A.L. *Guía de Buena Prácticas Clínica em Infecciones Fúngicas. Atención Primaria de Calidad*. Madrid: IM&C.S.A. 2005.
- MCGINNIS, M. R. *Laboratory Handbook of Medical Mycology*. *Academic Press*, 2012. 661p.

- MEULEMANS, L. et al. Pastorex Candida, a new latex agglutination test for mannan detection in serum of patients with invasive candidosis. In: *Candida and Candidamycosis*. Springer, Boston, MA, 1991. 233-236 p.
- MENEZES E SILVA, C. H. P.; NEUFELD, P. M. Bacteriologia e Micologia para o Laboratório Clínico. Revinter, 2006.
- MEZZARI, A.; FUENTEFRIA, A.M. Micologia no Laboratório Clínico. 1ed. Barueri-SP: Manole, 2012.
- MICELI, M. et al. Emerging opportunistic yeast infections. *The Lancet infectious diseases*, v. 11, n. 2, 2011. 142-151 p.
- MINAMI P.S. Micologia -Métodos Laboratoriais de Diagnóstico das Micoses. Manole, 2003. 199 p.
- MONWAR, S. et al. Diagnosis of Dermatophytosis by Conventional Methods and Comparative analysis of Sabouraud Dextrose Ágar and Dermatophyte Test Medium for Isolation of Dermatophytes. *Mymensingh medical journal: MMJ*, v. 26, n. 2, 2017.293-299p.
- MOYA, J. M. G.L. et al. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología. In: Documentos Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2018 33–50p.
- MYCOLOGY ONLINE. [www.mycology.adelaide.edu.au](http://www.mycology.adelaide.edu.au). Acessado em:10 de março de 2018
- MURRAY, P.; ROSENTHAL, K; PFALLER, M. Medical Microbiology. 8. ed. Philadelphia: Elsevier, 2016
- NEMECEK, J. C.; WÜTHRICH, M.; KLEIN, B.S. Global control of dimorphism and virulence in fungi. *Science*, v. 312, n. 5773, p. 583-588, 2006.
- NENOFF, P. et al. Eumycetoma and actinomycetoma - an update on causative agents, epidemiology, pathogenesis, diagnostics and therapy. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, v. 29, n. 10, out. 2015. 1873–1883 p.
- NEUFELD P.M. Atlas para Identificação de Fungos de Importância Médica. Rio de Janeiro: PNCQ; 2010. 150p.
- NEUFELD, P.M. Micologia médica: Técnicas Básicas de Diagnóstico. PNCQ, 1999, 230 p.
- NG, K.P; SOO-HOO, T.S; NA, S.L. A guide to the study of medical mycology. Partridge. Malaysia: 2014.

OGUNDEJI, A. O. et al. Method for identification of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* useful in resource-limited settings. *Journal of Clinical Pathology*, v. 69, n. 4, 2016.352-357p.

OLIVEIRA J, C. Tópicos em Micologia Médica. 4ª ed. Rio de Janeiro: [s.n.].

OLIVEIRA, M. M. et al. Gestão da fase analítica do laboratório: como assegurar a qualidade na prática. *ControlLab*, v. 3, n. 1, 2010. 26–27 p.

OPLUSTIL, C. P. et al. Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica. Rio de Janeiro: Sarvier, 2010

OPOTA, Onya et al. Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: State of the art. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 21, n. 4, 2015. 313-322p.

OSTROSKY-ZEICHNER, L. Invasive mycoses: diagnostic challenges. *The American journal of medicine*, v. 125, n. 1, 2012.S14-S24 p.

PAIVA, F.P de; MAFFILI, V. V; SANTOS, A. C. S. Curso de manipulação de animais de laboratório. Fundação Osvaldo Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz, 2005.

PAULA, A. DE; HAIDUKE, I. F.; MARQUES, I. A. A. Ergonomia e Gestão: complementaridade para a redução dos afastamentos e do stress, visando melhoria da qualidade de vida do trabalhador. *Revista Conbrad* v. 1, 2016. 121–136p.

PEMÁN, J.; MARTÍN-MAZUELOS, E.; CALVO, M. R. Guía práctica de Identificación y diagnóstico en Micología Clínica. In: *Revista Iberoamericana de Micología*. 2. ed. Bilbao: Asociación Española de Micología, 2007. 1–10 p.

PERES, A; FIEGENBAUM, M; TASCA, T. Manual de consulta rápida em microbiologia. Porto Alegre: Universitária Metodista, 2012

PÉREZ CALONGE, J. J.; CASADO HERNÁNDEZ, I.; SANTIAGO NUÑO, F. Técnica de examen directo de la onicomicosis mediante microscopía con hidróxido de potasio. *Revista Española de Podología*, v. 28, n. 1, 2017. 46–52. p.

PFALLER, M. A.; PAPPAS, P. G.; WINGARD, J. R. Invasive Fungal Pathogens: *Current Epidemiological Trends*. v. 43, November, 2017. 3–14 p.

PHILLIPS, G. B. Causal factors in microbiological laboratory accidents and infections. A, 1965

PILONETTO, M; PILONETTO, D.V. Procedimentos laboratoriais em Microbiologia - Pops em Microbiologia. Curitiba Micro Science, 1998. 98p.

QUINDÓS, G. Micologia Clínica. Elsevier, 2015.

QUINDÓS, G.; CARRILLO-MUÑOZ, A. J. Procesamiento de las muestras de la cavidad oral y otorrinolaringológicas. [s.d.].

REIS, M.A.; REZENDE, C.A.F.; NEUFELD, P.M. External quality control in mycology: performance evaluation of clinical analysis laboratories participating in the National Program of Quality control. *Rev. Bras. Analises Clínicas RBAC*. Ed 47. v.1-2. 2015. 25-33 p.

RICHARDSON, M.D; WARNOCK, D.W. Fungal Infection: Diagnosis and Management. Ed 4. Blackwell, Oxford, 2012

RICHMOND, Jonathan Y.; MCKINNEY, Robert W. Biossegurança em laboratórios biomédicos e de microbiologia. 2004

RICÓS, C. GARCIA-VICTORIA M, de La Fuente B.- Quality indicators and specification for the extra-analytical phases in Clinical Laboratory management. *Clin chim lab. Med.* 42(6): 2004. 578-582 p.

RIERA, F.; CELI, A. P.; THOMPSON, L. Infecciones Fúngicas Sistémicas -Manual Práctico. 2. ed. Acuador: *Asociación Panamericana de Infectología*, 2017.

RIGHETTI, C.; VIEIRA, P.C. EM BIOTÉRIOS. *RESBCAL*, v. 1, n. 3, 2012. 251–254. p.

ROBLES, M. G.; AUSEJO, F. U.; CAVERO, J. C. Manual de Procedimientos y técnicas de laboratorio para la Identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas. LIMA: 2010.

RODRIGUEZ-TUDELA, J. L, et al. Presente y futuro de la micología médica. Enfermedades infecciosas Y Microbiología Clínica – *Enferm. Infec. Microbiología Clínica*. 21. 2003 75-80. p.

ROJO-MOLINERO, E. et al. Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica. v. 33. 2014

RUSSEL, R.; PATERSON, M.; LIMA, N. Introduction. In: RUSSEL, R.; PATERSON, M.; LIMA, N. (Org). *Molecular Biology of Food and Water borne Mycotoxigenic and Mycotic Fungi*. 1.ed. Florida, USA: CRC Press, 2016

SHA, D.C.; XESS, I; JAIN, N. Evaluation of conventional e serological methods for rapid diagnosis of Cryptococcosis. *Indian. J. Med. Res.* 2008 483-488p.

SALUD, M. DE. Manual de Procedimientos y técnicas de laboratorio para la Identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas. *Série de normas técnicas*, v. 44, 2007.

SANDHU, G.S; KLINE, B.C.; STOCKMAN, L; ROBERTS, G.D. Molecular probes for diagnosis of Fungal Infectious. *J Clin Microbiol* .33(11) 1995 2913-2919p.

SANGOI, Ankur R. et al. Challenges and pitfalls of morphologic identification of fungal infections in histologic and cytological specimens: a ten-year retrospective review at a single institution. *American journal of clinical pathology*, v. 131, n. 3, 364-375, 2009p.

SANTANA, J. O.; AZEVEDO, F. L. A. DE; FILHO, P. C. C. Pityriasis versicolor: clinical-epidemiological characterization of patients in the urban area of Buerarema-BA, Brazil. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 88, n. 2, 2013. 216–221. p.

SHCELENZ, S.; BARNES, R.A; BARTON, R.C. et al. British Society for Medical Mycology best practice recommendations for the diagnosis of serious fungal infections. *Lancet Infect Dis*. 15: 2015 .461-474p.

SCHELL, Wiley A. Histopathology of fungal rhinosinusitis. *Otolaryngology Clinics of North America*, v. 33, n. 2, 2000.251-276p.

SHEA, Yvonne R. General approaches for direct detection of fungi. In: Manual of Clinical Microbiology, 10th Edition. *American Society of Microbiology*, 2011. 1776-1792p.

SENDIB. B. et al. Contribution of the Platelia Candida-specific antibody and antigen tests to early diagnosis of systemic Candida tropicalis infection in neutropenic adults. *J Clin Microbiol* 41:2003, 4551-4558 p.

SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. Guanabara Koogan, 2010.

SILVA, V.; ZAROR, L. Diagnóstico Micológico em el Laboratório. Universidade Mayor, 2015. p. 233.

SILVA, D. B. DA; ALMEIDA, L. M. M. DE. Manual de Meios de Cultura. Plast Labor, 2003. 105 p.

SILC L. Diagnóstico Micológico em el Laboratorio. Ed 1. Santiago de Chile: Universidad Mayor, Facultad de Medicine. 2014.

SIMAS, C. M.; TELMA ABDALA DE OLIVEIRA CARDOSO. Biossegurança e Arquitetura em Laboratórios de Saúde Pública. Pós, v. 15, n. 24, 2008, 108–124p.

SOMENZI, C. C.; RIBEIRO, T. S.; MENEZES, A. D. Características Particulares da Micologia Clínica e o Diagnóstico Laboratorial de Micoses Superficiais. *NewsLab*. (77), n. 77, 2006. 1–11p.

SNYDER, James W.; ATLAS, Ronald M.; LAROCCO, Mark T. Reagents, stains, and media: mycology. In: Manual of Clinical Microbiology, 10th Edition. *American*

- Society of Microbiology*, 2011. 1767-1775 p.  
SPPC/ML - Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos, norma 216.  
Acesso em 15 de Set. 2018
- ST-GERMAN, G; SUMMERBELL Identifying Fungi: A Clinical Laboratory Handbook. Ed.2. California: Star Pub: 2011. 378p.
- STATE OF NEW HAMPSHIRE DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Mycology: Specimen Collection and Transport. Healthy New Hampshire, n. March, 2008. 1–2p.
- SULKIN, S. Edward; PIKE, Robert M. Survey of laboratory-acquired infections. *American Journal of Public Health and the Nation's Health*, v. 41, n. 7, 1951.769-781p.
- THOMAS, P. A. Current perspectives on ophthalmic mycoses. *Clinical microbiology reviews*, v. 16, n. 4, 2003. 730-797 p.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiology: An Introduction. Person Education, Inc., n. 8 ed, 2004. 894p.
- TOSTI, A.; VLAHOVIC, T. C.; ARENAS, R. Onychomycosis: An Illustrated Guide to Diagnosis and Treatment. Spring, 2017.
- TRUJILLO, A.B. Micologia médica básica. Ed.4a. McGraw Hill México, 2012.
- VANDEPITTE, J. et al. Métodos Básicos de Laboratório en Bacteriologia Clínica. *Organización Mundial de la Salud*, 1993.
- TANGARIFE CASTAÑO, V.J. et al. Diagnóstico micológico: de los métodos convencionales a los moleculares. *Med. lab.*, v. 21, n. 05/06, 2015.211-242p.
- VANDEPITTE J.et al. Métodos Básicos de Laboratorio en Bacteriologia Clínica. *Organización Mundial de la Salu*.Genebra, 1993.
- VIDAL, M. C. CURSO DE ESPECIALIZAÇÃO EM ERGONOMIA CONTEMPORÂNEA DO RIO DE JANEIRO. CESERG Ergonomia, n. Universidade do Brasil COPPE-UFRRJ, [s.d.]. p. 35
- VIDOTTO, V. Manual de Micologia Médica. *Tecmed*, 2002. 17–26p.
- VIEIRA, K. F. et al. A utilidade dos indicadores da qualidade no gerenciamento de laboratórios clínicos. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 47, n. 3, 2011. 201–21. p.
- WALSH, J.T.; HAYDEN, R.T.; LARONE, D.H. Larone's Medically Important Fungi. A Guide to Identification. 6.ed. Washington, DC: *American Society for Microbiology*, 2018
- WEBSTER J, WEBER, R. Introduction to fungi. Ed.3. New York, USA: Cambridge

University Press. 2007. 362-363 p.

WINN, W. et al. Diagnóstico Microbiológico- Texto e Atlas. Guanabara Koogan, 2008.

WOOLEY, D.; BYRES, K. Biological safety: principles and practices. 5. ed. Washington, DC: ASM, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidance on regulations for the transport of infectious substances 2017-2018. World Health Organization, WHO/HSE/2012.12, p. Disponível em: <[http://www.who.int/ihr/publications/who\\_hse\\_ih](http://www.who.int/ihr/publications/who_hse_ih)> Acesso em 05 de fev. 2018

XAVIER, M. O.; OLIVEIRA, F. DE M.; SEVERO, L. C. Curso de Atualização – Micoses. Chapter 1 - Laboratory diagnosis of pulmonary mycoses. *J Bras Pneumol.*, v. 35, n. 12, 2009. 1245–1249p.

YAMAGUCHI, H. Opportunistic fungal infections. In: *Animal Models in Medical Mycology*. CRC Press, 2018. 101-158 p.

ZAITZ, C. et al. compêndio de Micologia Médica. Guanabara Koogan, 2010. 423 p.