

BIO-17



**UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE**

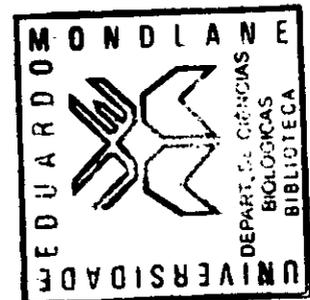
Faculdade de Ciências  
Departamento de Ciências Biológicas

**Trabalho de Culminação de Estudos  
(Estágio)**

**Tema : Diagnóstico Laboratorial das Micoses Superficiais,  
Cutâneas e oportunistas**



**Autor: José Carlos Langa**





**UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE**

Faculdade de Ciências

Departamento de Ciências Biológicas

**Trabalho de Culminação de Estudos  
(Estágio)**

**Tema : Diagnóstico Laboratorial das Micoses Superficiais,  
Cutâneas e oportunistas**

**Autor:**

José Carlos Langa

**Supervisores:**

Prof.<sup>a</sup> Doutora Elena Folgosa  
Dr Arlindo Chaúque

**Orientadores do Estágio**

Dra. Alice Manjate  
Sr. Samuel Muianga  
Sr. Samuel Simbine  
Sr. Ventura Relvas

*Maputo, Novembro de 2006*



## Agradecimentos

- Aos supervisores prof<sup>a</sup> Dra. Elena Folgosa e Dr. Arlindo Cháuque, pela assistência e orientação científica;
- As Dr<sup>as</sup> Josefa Mello e Alice Manjate, pelo encorajamento, conselho e valiosos comentários;
- Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina, nomeadamente o Sr. Samuel Muinga, Samuel Simbine e Sr. Ventura Relvas, pelo apoio e orientação técnica;
- A todos funcionários do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina, colegas e amigos que contribuíram para a realização deste trabalho;
- À minha família pela paciência e encorajamento.

**Dedicatória**

À minha mãe Argentina Ganhane

## Declaração de Honra

Declaro por minha honra que os resultados obtidos são verdadeiros e as técnicas descritas no presente trabalho são usados no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina para o diagnóstico de fungos patogênicos.

*José Carlos Langa*

(José Carlos Langa)

## **Lista de Abreviaturas**

AV - Avenida

CP - Caixa postal

HCM – Hospital Central de Maputo

LCR - Líquido cefalorraquidiano

LM- Laboratório de Microbiologia

MISAU - Ministério da Saúde

SIDA - Síndrome de Imunodeficiência Adquirida

UEM - Universidade Eduardo Mondlane

## Resumo

O estágio foi realizado no Laboratório de Microbiologia da faculdade de Medicina, sector de Micologia, e teve como objectivos; aprender técnicas usadas neste Laboratório para a identificação de fungos patogénicos; estimar a frequência de infecções por fungos (micoses) e identificar os agentes etiológicos mais implicados.

O estágio foi realizado em duas fases. A primeira fase foi de adaptação técnica ao Laboratório e decorreu no período compreendido entre Março e Maio do corrente ano. A segunda fase, foi de realização de todas actividades protocoladas, tendo decorrido de Julho ate Outubro de 2006.

As principais actividades desenvolvidas foram: preparação de meios de cultura; colheita, registo e processamento de amostras (identificação preliminar e definitiva de fungos patogénicos); participação nas aulas práticas da disciplina de Microbiologia Médica e num estudo de *Tinea capitis* nas crianças de aldeia SOS- Maputo.

O motivo do estágio reside no desejo de aprender as técnicas de diagnóstico de fungos e desejo de alertar os Clínicos sobre a ocorrência das micoses.

Durante o estágio, o sector de Micologica processou-se 169 amostras para a pesquisa de fungos, das quais 144 foram de raspados da pele, 13 de lavado broncoalveolar, 8 de liquido cefalorraquidiano (LCR) e 4 de tecidos biopsiados.

As percentagens de isolamento dos agentes etiológicos em micoses Superficiais e cutâneas foram: *Microsporium audouini* (33,3%); *Trichophyton violaceum* (21,6%), *T. mentagrophytes* (13,7%), *T. rubrum* (13,7%), *T. tousurans* (2%); *Epidermopyton floccosum* (2%) e *Candida albicans* (13,7%). Foi identificado *Malassezia furfur* no exame directo e não foi necessario o seu isolamento em meios de cultura.

Das micoses oportunistas foi possível isolar *C. albicans* (72,7%), *Aspergillus fumigatus* (18,2%) e (9,1%) *Cryptococcus neoformans*; Não foi possível identificar trofozoitos nem quistos de *Pneumocystis carinii*.

A maior parte de pacientes que frequentaram o Laboratório de Microbiologia Faculdade de Medicina queixavam-se de Micoses superficiais e cutâneas; Poucas amostras foram recebidas para a pesquisa de fungos oportunistas.

Durante o estágio concluiu-se que o Diagnostico Laboratorial das micoses é muito importante pois auxilia o Clínico nas suas decisões de modo a estabelecer o tratamento adequado.

## ÍNDICE

<b>1. Apresentação e caracterização do local de estágio .....</b>	<b>1</b>
1.1. Historial do Laboratório .....	1
<b>2. Programa do Estágio .....</b>	<b>3</b>
3. Objectivos .....	4
3.1. Objectivo geral .....	4
3.2. Objectivos Específicos .....	4
<b>4. Apoio concedido ao estudante por parte da Unidade de Estágio .....</b>	<b>5</b>
<b>5. Revisão Bibliográfica .....</b>	<b>6</b>
5.1 Colheita de amostra .....	8
5.2 Exame directo .....	10
5.3 Meios de cultura .....	11
5.4 Exame cultural .....	11
5.5. Identificação .....	12
<b>6. Actividades desenvolvidas .....</b>	<b>14</b>
6.1. Material e equipamento .....	14
6.2. Metodologia .....	14
6.2.1. Prova do tubo germinativo .....	17
6.2.2. Técnica de fita adesiva .....	18
6.2.3. Prova de urease .....	18
6.3. Outras actividades desenvolvidas .....	19
6.4. Resultados obtidos .....	20
6.4.1. Análise de resultados e Discussão .....	22
<b>7. Perspectiva Crítica .....</b>	<b>23</b>
<b>8. Conclusão .....</b>	<b>24</b>
<b>9. Recomendações .....</b>	<b>25</b>
<b>10. Bibliografia .....</b>	<b>26</b>

Anexo

## 1. APRESENTAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO LOCAL DE ESTÁGIO

O Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina – Universidade Eduardo Mondlane, localiza-se na AV. Salvador Allende, nº 702, CP 257, Maputo.

Este laboratório faz parte do departamento académico de Microbiologia e está dividido em diversos sectores: **Micologia**, **Bacteriologia** e **Imunodiagnóstico** como ilustra a figura 1:

Está vocacionado ao ensino (docência) a estudantes dos cursos de Medicina e Biologia ramo de Saúde, pesquisas e Diagnósticos de doenças infecciosas em áreas de Bacteriologia, Imunodiagnóstico e Micologia, prestação de serviços na área de saúde em colaboração com HCM e MISAU; (LM, 1999).

Colabora em cursos de actualização sobre os cuidados aos doentes HIV- SIDA e em seminários nacionais de capacitação e actualização de técnicos médios no diagnóstico, supervisão e gestão de Laboratórios (LM, 1999).

### 1.1. Historial do Laboratório

O Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina da Universidade Eduardo Mondlane, antes com instalações num pré - fabricado localizado nas traseiras do edifício da Faculdade, faz parte do Departamento Académico de Microbiologia, colabora com as autoridades responsáveis pelo controlo de epidemias no Ministério da Saúde desde a epidemia da cólera na cidade de Maputo em 1980 (LM, 1999).

Em 1997 é celebrado entre a direcção de Assistência Médica do Ministério da Saúde e a Direcção da Faculdade de Medicina um acordo cujo o âmbito é o reconhecimento do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina, como Laboratório Nacional de Referencia para o diagnóstico de doenças infecciosas dentre os programas Nacionais de controlo de endemias, formando e capacitando nessa área pessoal clínico e outros técnicos de saúde (LM, 1999).

Em Dezembro de 1998, ao fim de longos anos de espera vê finalmente concretizada a mudança para novas instalações (actuais) e a melhoria das suas condições de trabalho (LM, 1999).

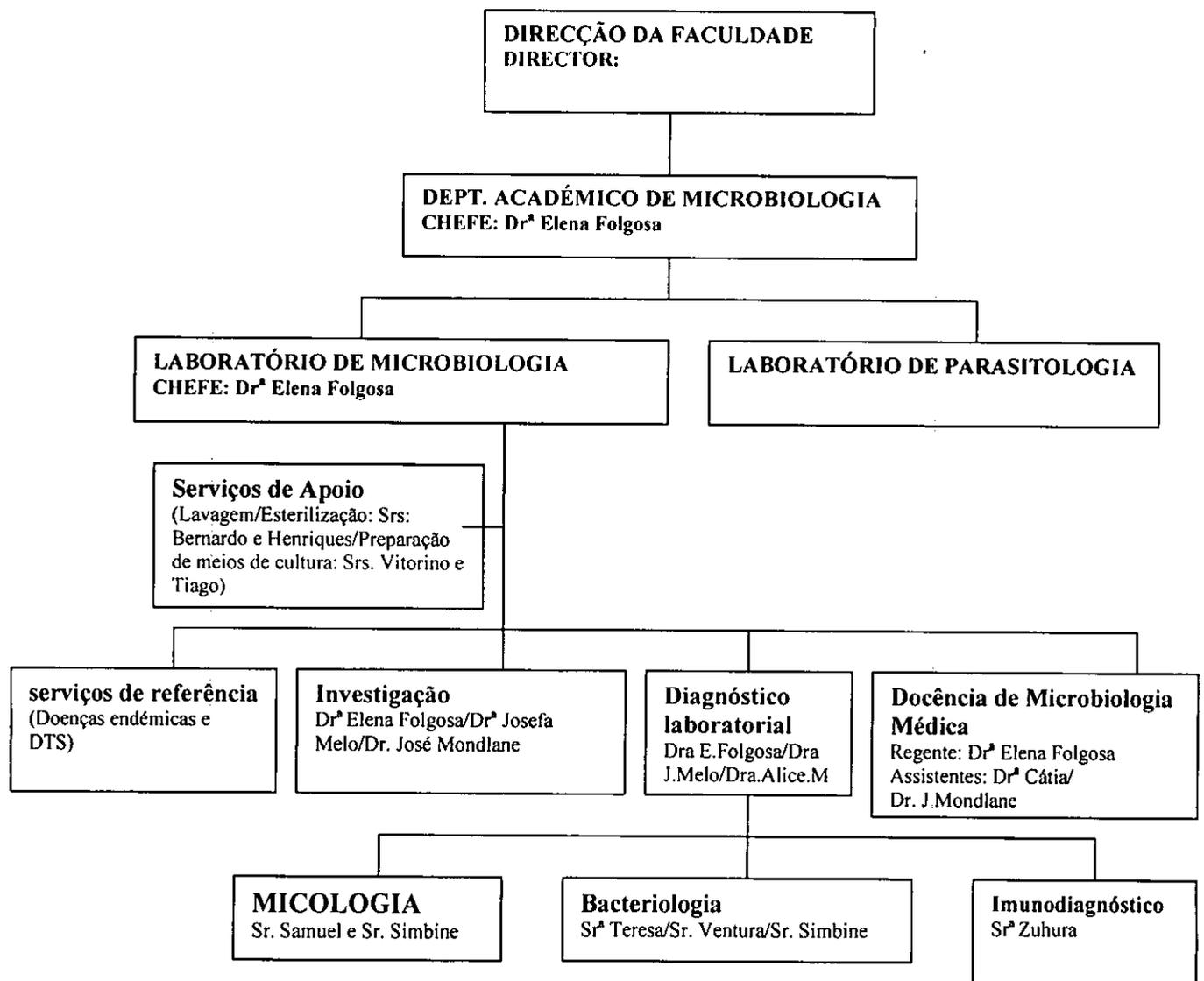


Figura 1. Organograma do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina - UEM

## 2. Programa do Estágio

O estágio foi realizado em duas fases. A primeira fase foi de adaptação técnica ao Laboratório, decorreu no período compreendido entre Março e Maio do corrente ano. E a segunda fase, foi de realização de todas actividades protocoladas, e incluiu o mês de Julho ate Outubro de 2006.

### Cronograma de actividades do Estágio

Fases	Períodos	Actividades
Primeira	Março - Maio de 2006	Adaptação técnica no laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina e elaboração do protocolo
Segunda	Julho - Setembro de 2006	Preparação de meios de cultura, Recolha e processamento das amostras
	Outubro – Novembro de 2006	Processamento de dados, elaboração e entrega do relatório final

### **3. Objectivos**

#### **3.1. Objectivo geral**

- Aprender e desenvolver habilidades práticas nas técnicas de diagnóstico laboratorial em Micologia, empregues no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina.

#### **3.2. Objectivos Específicos**

- Aprender e saber executar as técnicas empregues na identificação de fungos patogénicos;
- Identificar os agentes etiológicos mais implicados nas micoses superficiais, cutâneas e oportunistas;
- Estimar a frequência de infecções por fungos (micoses) em pacientes que frequentam o Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina.

#### **4. Apoio concedido ao estudante por parte da Unidade de Estágio**

- Disponibilidade imediata dos técnicos em todos momentos do estágio;
- Assistência e orientação científica;
- Facilidades na integração as actividades regulares do Laboratório e orientação técnica;
- Facilidades e oportunidade de aplicar os conhecimentos e capacidade adquiridas ao longo da formação.

## 5. Revisão Bibliográfica

Micologia é uma ciência que estuda os fungos. O estudo dos fungos está em processo de transição, e os avanços atribuíram grande importância ao papel destes nas infecções humanas. Tradicionalmente, a Micologia era quase totalmente descritiva e taxonomicamente orientada, resultando de sua associação estreita e histórica com a Botânica e a Dermatologia. Actualmente a micologia está passando por um período de rápido crescimento e interesse ( Murray *et al.*, 2004).

Os fungos são extremamente comuns na natureza onde levam uma existência como saprófitos de vida livre. São encontrados na superfície do corpo como colonizadores ambientais transitórios sem obter qualquer benefício evidente na relação parasitismo-hospedeiro e alguns, muito poucos, são patógenos, a sua presença no hospedeiro é prejudicial, podem produzir doenças ou micoses (Walters *et al.*, 1998).

Os fungos são um grupo diferente de outros microorganismos, podem existirem na forma filamentosa constituindo uma estrutura vegetativa, hifa que se enrola com outras formando um emaranhado (micélio) e reproduzem-se por esporos ; ou podem existirem na forma de levedura cuja a característica comum é unicelular ovóide e a reprodução ocorre por gemulação (ou brotamento), (Ferreira e Avila 2001).

O crescimento dos fungos é tão lento que o das bactérias e o meio de cultura para seleccionar os fungos patogénicos é o Agar Sabouraud que contém antibióticos para impedir o crescimento de bactérias e fungos não patogénicos (Walter *et al.*, 1998).

As micoses (infecções) causadas por fungos, de uma maneira geral têm assumido ultimamente, papel de destaque entre as doenças que afectam a saúde e o bem-estar da população ao nível mundial, sendo mais frequente em regiões tropicais e subtropicais, onde o clima é quente e húmido e isto, deve-se a uma série de factores extrínsecos e intrínsecos (Mouro *et al.*, 1994).

Moçambique por ser um país de clima tropical em que há muita humidade atmosférica e elevadas temperaturas (Barka e Santos, 2005); os fungos encontram um ambiente propício para colonizarem a pele e outros órgãos do corpo, provocando diferentes tipos de Micoses. A gravidade da infecção é determinada pelo agente etiológico, grau de exposição e o estado imunológico do hospedeiro (Jawtz *et al.*, 1970; Moura *et al.*, 1994 e Murray *et al.*, 2004).

O homem está constantemente exposto aos fungos. A maioria dos indivíduos tolera esta exposição sem consequências, enquanto outros desenvolvem reacções de hipersensibilidade alérgica (Murray *et al.*, 2004).

Acredita-se que as estruturas fúngicas responsáveis pelo contágio, especialmente em dermatófitos antropofílicos, são esporos de forma oblonga a arredondada, denominados arthroconídios, que são visualizados em cabelos e escamas epidérmicas infectadas. A maioria dos estudos mostram que 2/3 das espécies de dermatófitos associados a doenças em seres humanos são antropofílicas (Ferreira e Avila 2001).

As doenças causadas por fungos são classificadas de acordo com os locais primários de infecção. As micoses superficiais limitam-se às camadas mais externas da pele e pêlos; são assintomáticas e raramente induzem uma reacção imune, visto que colonizam apenas tecidos mortos (Smith *et al.*, 1964). As micoses cutâneas (dermatofitoses) são infecções mais profundas da epiderme e derivados da pele como pêlos e unhas (Murray *et al.*, 2004). Estas infecções são causadas por fungos dermatófitos que têm uma grande afinidade para crescer em presença de queratina, apresentando enzimas que a degradam (Silva *et al.*, 2003). Os dermatófitos são fungos comumente transmitidos por contacto directo com animais ou pessoas infectadas ou objectos inanimados (fómites) previamente contaminados por fungos (Pelczar e tal., 1981).

As configurações clínicas destas micoses são conhecidas por “tinhas” ou *tineas* e filiadas, tendo como agentes etiológicos, 3 géneros: *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermopyton* (Jawtz *et al.*, 1970; Moura *et al.*, 1994; Gupta e Tu, 2001 e Murray *et al.*, 2004).

Ao contrário das infecções superficiais, as micoses cutâneas podem produzir várias respostas imunes celulares, causando alterações patológicas no hospedeiro, que podem manifestarem-se nos tecidos mais profundos da pele (Murray *et al.*, 2004).

Segundo Moura *et al.* (1994), Ferreira e Avila (2001), as dermatomicoses são classificadas de acordo com os critérios clínicos (*tinea*), conjugados às respectivas áreas de localização da lesão (veja tabela 1 do anexo).

As dermatomicoses mais comuns em pacientes infectados com HIV são: *Tinea pedis*, *tinea unguim* (*onychomycosis*) e *tinea cruris* (Ferreira e Avila 2001).

Os agentes etiológicos mais implicados nas micoses oportunistas, infecções causadas por fungos que se tornam patogénicos ao se aproveitarem da condição debilitada do hospedeiro, são: *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* e *Pneumocystis carinii* (Ferreira e Avila 2001; Rowen, 2001; Latgé e Caderon, 2002 e Murray *et al.*, 2004).

Os fungos oportunistas como (*Cryptococcus neoformans*) são transmitidos por inalação de propágulos da levedura ou por contacto com as fezes dos pombos; *Pneumocystis carinii* é transmitido por inalação de aerossóis infecciosos; *Aspergillus fumigatus* por contacto íntimo ou inalação dos conídios e alguns fungos como *Candida albicans*, fazem parte da flora normal do tracto digestivo e genital humano, (Raposo *et al.*, 1996; Bernardo *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2002; Filiú *et al.*, 2002 e Murray *et al.*, 2004).

### 5.1 Colheita de amostra

As colheitas são efectuadas após verificação de que nenhum anti-fúngico ou tópicos foi aplicado sobre as lesões há pelo menos 4 dias ( Frejaville e Kamoun, 1989 ).

A colheita deve ser feita nas áreas mais externas das lesões. Fragmentos de unhas, pêlos, cabelos, raspados da pele e subungueais são materiais mais adequados para o isolamento de dermatófitos (Ferreira e Avila 2001).

Nas micoses superficiais e cutâneas secas, as lesões são raspadas com auxílio de um bisturil estéril na periferia da lesão e as escamas são colhidas numa placa de Petri estéril ou entre duas laminas previamente flambadas (Frejaviile e Kamoun, 1989).

O bordo das lesões oferece material rico para o exame Micológico; O crescimento dos dermatófitos no tecido cutâneo do hospedeiro ocorre de forma radial, de modo que o centro das lesões consiste em material contendo fungos degenerados e inviáveis ( Ferreira e Avila 2001).

Nas micoses cutâneas exsudativas, retira-se a amostra com o auxílio de uma zaragatoa estéril embebida em soro fisiológico e efectua-se imediatamente esfregaços em lâminas microscópicas e sementeira em meios ágar Sabouraud, de seguida envia-se rapidamente ao Laboratório (Frejaviile e Kamoun, 1989).

Se há suspeita de Pitiríase versicolor faz-se a colheita com fita adesiva, após desengorduramento da pele com éter e aplica-se uma tira transparente da fita adesiva sobre as lesões; de seguida retira-se a fita por um golpe rápido e adere-se a uma lâmina para observação directa ao microscópico (Frejaviile e Kamoun, 1989).

Os cabelos e pêlos infectados são arrancados com sua raiz, com auxílio de uma pinça depilatória, e são colocados na placa de Petri, tubo estéril ou entre duas lâminas flambadas ( Frejaviile e Kamoun, 1989 ).

As unhas lesadas são cortadas com auxílio de um bisturil, um estilete de vacinação ou uma tesoura e os fragmentos colhidos são colocados num tubo de ensaio seco ou uma placa de Petri (Frejaviile e Kamoun, 1989 ).

A colheita de LCR para a pesquisa de *Criptococcus neoformans* é feita através da punção lombar no fundo do saco lombar, com o paciente sentado ou deitado; após a punção a mostra é colocada num frasco estéril, bem identificado e envia-se rapidamente ao Laboratório (Moura *et al.*, 1994).

As amostras para a pesquisa de *Aspergillus spp* são obtidas com rigorosa assepsia: A expectoração é colhida após lavagem bucal; aspiração ou lavado broncoalveolar é obtida por broncoscopia e, por vezes, punção transparietal e biopsia por cirurgia (Frejaville e Kamoun, 1989).

## 5.2 Exame directo

O exame microscópico directo das amostras ( escamas, cabelos e unhas) após acção de um reactivo clareador ( KOH, e lactofenol azul de algodão) revela os filamentos micelianos, os esporos dermatófitos, leveduras e fungos filamentosos (Frejaville e Kamoun, 1989; Ferreira e Avila 2001; Gupta e Tu, 2001 e Brasil *et al.*, 2003 ). Para além de KOH a 10% pode-se usar um outro clarificador com igual eficácia, o “calcofluor white”, (Brasil *et al.*, 2003 ).

No caso de Pitiríase Versicolor, o exame microscópico directo evidencia facilmente as leveduras redondas e os filamentos curtos do agente patogénico, *Malassezia furfur* que tem um aspecto típico. Esses elementos podem serem igualmente pesquisados nas escamas colhidas por raspagem da pele, clareadas com KOH ou lactofenol azul de algodão assim como no teste de fita adesiva. A cultura de *Malassezia furfur* exige meios enriquecidos com produtos que contém lípidos ou gorduras (Frejaville e Kamoun, 1989 e Brasil *et al.*, 2003).

No Laboratório para a realização do exame directo e cultura a partir de amostras de LCR e lavado broncoalveolar, faz-se a centrifugação e retira-se uma porção da amostra, preferencialmente o sedimento (Moura *et al.*, 1994).

No exame microscópico directo de uma amostra de LCR com uma gota de tinta de china observam-se células esféricas com uma cápsula mucopolissacarídica, sugestivas de *C. neoformans*; As características microscópicas do género *Cryptococcus* incluem ausencia de blastoconídios e hifas (Moura *et al.*, 1994 e Ferreira e Avila, 2001).

O exame directo de lavado broncoalveolar consiste num esfregaço corado pelo método de Giemsa modificado cujo o objectivo é observar estruturas fúngicas patogénicas sugestivos de fungos oportunistas: *A. fumigatus*, *C. albicans* e *P. carinii*, (Ferreira e Avila, 2001).

### 5.3 Meios de cultura

Meios de cultura são nutrientes que se preparam no Laboratório e que podem ser muito simples ou altamente complexos (Folgosa e Mondlane, 2005).

Os meios de cultura bastante recomendados para o isolamento de dermatófitos e fungos não dermatófitos são ágar Sabouraud-dextrose e ágar Sabouraud com cloranfenicol ou actidiona (Ferreira e Avila, 2001).

Segundo Amorim (1999); Ferreira e Avila (2001), os componentes do meio ágar Sabouraud-dextrose são:

- Agar- substância mucilaginosa seca, usado para soldificar o meio;
- Dextrose- fonte de energia;
- Peptona- fonte de azoto.

Os meios ágar Sabouraud com cloranfenicol ou actidiona tem os mesmos componetes deferindo apenas no agente antibiótico adicionado (Ferreira e Avila, 2001).

Composição:

- Agar;
- Peptona;
- Cloranfenicol/actidiona- agentes antibacterianos.

### 5.4 Exame cultural

As amostras de raspado de pele e seus derivados tais como pêlos e unhas são semeadas no meio ágar Sabouroud com actidiona cuja a finalidade é observar após 10 a 15 dias de incubação dermatófitos filamentosos (Frejaille e Kamoun, 1989 ; Moura *et al.*, 1994; Larone, 1995 e Ferreira e Avila, 2001).

Segundo Amorim (1999), o desenvolvimento de fungos num meio de cultura depende de vários factores como:

- Disponibilidade de nutrientes adequados;
- Disponibilidade de oxigénio;
- Grau de Humidade;
- Temperatura;
- Condições de esterilidade;
- PH.

As amostras de LCR e lavado bronco alveolar são semeadas nos meios ágar Sabouraud com cloranfenicol ou dextrose. Após 5 a 7 dias de incubação pode-se observar as colónias sugestivas de *C. neoformans* que são elevadas, lisas, brilhantes, de consistência mucóide e húmida, a coloração varia de creme ao pardo; e as colónias suspeitas de *A. fumigatus* apresentam uma coloração verde (Moura *et al.*, 1994; Ferreira e Avila, 2001 e Filiú *et al.*, 2002).

### 5.5. Identificação

Segundo Moura *et al.* (1994), Ferreira e Avila (2001), para a Identificação de dermatófitos deve-se observar as características das colónias como cor ( superfície e anverso); textura (pulverulenta, granular, cotonosa, algodonsa, aveludada ou globosa); topografia (elevações, margens, dobras) e velocidade de crescimento. (veja tabela 2 do anexo).

A identificação microscópica de colónias com características morfológicas sugestivas de fungos filamentosos, é feita através da técnica de fita adesiva, que consiste em aplicar uma tira transparente da fita sobre as colónias; em seguida adere-se a fita a uma lâmina com uma gota de lactofenol azul de algodão. O objectivo deste exame é observar o arranjo, a estrutura e formação de hifas especiais; o tamanho e a quantidade dos conídios (Larone, 1995; Ferreira e Avila, 2001).

Para a identificação definitiva do *C. neoformans* a partir da cultura faz-se provas bioquímicas, que consistem na verificação da produção da enzima urease pela levedura que irá evidenciar-se pela mudança da cor do meio (ureia-indol) para violeta (Ferreira e Avila, 2001).

A identificação final de *A. fumigatus* efectua-se com a técnica da fita adesiva cujo o objectivo é observar fungos com hifas septadas, conidióforos simples, vesículas e conídios (Moura *et al.*, 1994 e Ferreira e Avila, 2001).

Para identificação definitiva do agente etiológico nas colónias brancas, lisas, elevadas e mucosas sugestivas de leveduras como *C. albicans* usa-se a prova de tubo germinativo cujo o objectivo é observar leveduras que germinam pseudofilamentos (Raposo *et al.*, 1996; Ferreira e Avila, 2001 e Lees e Barton, 2003).

Segundo Karaca e Koç (2004), Garg *et al.*(2006), após a identificação de estruturas fúngicas patogénicas procede-se ao isolamento do agente etiológico através da subcultura em meios apropriados, como agar sabouraud-dextrose e faz-se também testes de sensibilidade a antifúngicos usando o método de difusão de discos que permitem auxiliar o clínico de modo a escolher o antifúngico adequado ao tratamento.

## 6. Actividades desenvolvidas

### 6.1. Material e equipamento

- Veja o anexo

### 6.2. Metodologia

O estágio foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina, e as amostras consistiram em raspado de pele e unhas das regiões infectadas, cujo a colheita foi da responsabilidade do Laboratório e ainda amostras de LCR, lavado broncoalveolar, recebidas das consultas Especiais e do HCM.

As colheitas foram efectuadas após a confirmar com o doente que o mesmo não tinha aplicado qualquer agente antifúngico ou tópico sobre as lesões há pelo menos 3 a 5 dias.

Com auxílio de um bisturil estéril, as lesões foram raspadas e as escamas colhidas em placas de Petri também estéreis.

As placas devidamente identificadas foram imediatamente enviadas ao Laboratório de Microbiologia onde as amostras foram protocoladas no livro de registo do Laboratório. No mesmo livro foram registados também as amostras de LCR e lavado broncoalveolar.

No mesmo Laboratório, fez-se o processamento das amostras, que consistiu em retirar uma parte da amostra para a realização do exame directo (a fresco ou esfregaço corado pelo método de Giemsa modificado) e a parte restante para o exame cultural.

A preparação do exame directo à fresco a partir de raspado da pele e seus derivados como pelos e unhas, consistiu simplesmente em:

- Colocar pequena porção da amostra na lamina microscópica através de uma ansa esterilizada;

- Através duma pipeta de Pasteur, adicionar uma gota de KOH a 10% e cobrir com uma lamela;
- Após 10 minutos da reacção observa-se ao microscópico (1º com objectiva de 10 e depois com a de 40X).

O objectivo deste exame é observar as diferentes estruturas fúngicas patogénicas:

- Aglomerados de leveduras e hifas curtas e curvas como “espaguete e carne moída”, sugestivo de Pitiríase Versicolor;
- Células leveduriformes pseudofilamentosas, sugestivo de Candidose;
- Hifas, sugestivo de fungos miceliares/ filamentosos;
- Muitos esporos em agrupamento;
- Esporos fora ou dentro dos pêlos ( ectotrix e endotrix ) respectivamente.

O exame directo a fresco da amostra de LCR, consistiu em centrifugar a amostra;

- Próximo a chama do bico de Bunsen e com todas condições de assepsia;
- retirou-se uma gota da amostra e colocou-se na lamina microscópica, de seguida adicionou-se uma gota de tinta de China;
- Cobriu-se com uma lamela e observou-se ao microscópico (1º com objectiva de 10 e depois com a de 40X).

O objectivo deste exame é observar leveduras esféricas capsuladas e em brotamento, sugestivo de *Cryptococcus neoformans* ( Ferreira e Avila, 2001).

A preparação do exame directo da amostra de lavado broncoalveolar consistiu em centrifugar a amostra, efectuar um esfregaço, fixa-lo e posteriormente colorá-lo pelo método de Giemsa modificado.

Os procedimentos detalhados da coloração de Giemsa modificado são:

1. Centrifuga-se a amostra 3500 rpm;
2. Retira-se uma porção da amostra com ansa esterilizada, espalha-se na lâmina e deixa-se secar a temperatura ambiente ou na estufa;

3. Fixa-se a amostra à lamina, passando 3 vezes a chama do bico de Bunsen;
4. Volta-se a fixar a amostra com o álcool metanol por 10 segundos;
5. Mergulha-se a lâmina no 1º corante (eosine) durante 10 segundos;
6. Com uma pinça retira-se a lâmina do 1º corante e mergulha-se no 2º corante (azul de metileno) também durante 10 segundos;
7. Passa-se água destilada para remover o excesso do corante;
8. Põe-se a secar na estufa;
9. Retira-se e observa-se ao microscópio com objectiva de óleo de Imersão (100X).

A finalidade deste procedimento é observar as seguintes estruturas:

- Quistos de parede espessa, esféricas ou elípticas com 4 a 8 núcleos e trofozoítos de parede fina, sugestivo de *Pneumocystis carinii*;
- Hifas septadas hialinas, com ramificações dicotómicas em ângulo de 45°, compactáveis com *Aspergillus fumigatus*;
- Células ovais de parede fina e gemulantes, sugestivo de *Candida albicans* (Ferreira e Avila 2001).

Para efectuar o exame directo a partir de tecidos biopsiados, foi necessário:

1. Triturar o tecido até a forma homogénea;
2. Efectuar um esfregaço na lamina;
3. Fixar na chama de bico de Bunsen;
4. Corar também com a técnica de Giemsa modificado e observa-se ao microscópio com objectiva de óleo de Imersão (100X).

O objectivo deste exame é observar:

- Hifas septadas ramificadas sugestivas de *Aspergillus spp*;
- Células leveduriformes sugestivo de *Candida albicans* (Ferreira e Avila, 2001).

Para identificação definitiva do agente etiológico implicado foi necessário proceder a cultura de fungos em meios apropriados com antibióticos para inibir o crescimento de bactérias e de

fungos saprófitas que poderiam desenvolver-se rapidamente e dificultar o isolamento de fungos patogênicos cujo o crescimento é lento (Murray *et al.*, 2004).

Porém, a parte remanescente da amostra de escamas de pele e seus derivados, com todos cuidados de assepsia foi retirada das placas e cultivada no meio ágar Sabouraud com actidiona com auxílio de uma ansa de platina esterilizada.

As amostras líquidas como LCR e lavado broncoalveolar, foram centrifugados, retiradas dos frascos e semeadas no meio ágar Sabouraud com cloranfenicol; as placas semeadas foram bem identificadas e datadas, sendo em seguida incubadas à temperatura ambiente por um período compreendido de 5 a 15 dias.

Os tecidos biopsiados primeiramente triturados, através de uma ansa de plantina esterilizada são semeados na superfície do meio Ágar Sabouraud-dextrose; cada placa do meio semeada foi bem identificada e datada sendo em seguida colocada na incubadora. Ao fim de 5 a 7 dias surgem colônias com coloração variada.

Após o crescimento de fungos, os meios foram retirados da incubadora e procedeu-se a identificação definitiva dos agentes etiológicos, baseando-se nas características morfológicas das colônias (cor, textura e topografia), (veja tabela 2 do anexo), características microscópicas e provas bioquímicas. (Moura *et al.*, 1994; Ferreira e Avila, 2001; Silva *et al.*, 2003).

Através das técnicas abaixo descritas efectuou-se a identificação dos agentes etiológicos baseando-se nas características microscópica das colônias e provas Bioquímicas;

#### **6.2.1. Prova do tubo germinativo**

1. Através de uma ansa estéril retirou-se uma porção da colônia e inoculou-se num tubo de ensaio contendo plasma humana;
2. Deixou-se a incubar por aproximadamente 2-4 horas na estufa regulada a 37°C;

3. Após o período de incubação, com todos cuidados de assepsia retirou-se uma porção da mistura para uma lâmina, cobriu-se com uma lamela e observou-se ao microscópio (1º com objectiva de 10 e depois com a de 40X).

Esta técnica permite identificar leveduras que germinam pseudofilamentos, exemplo *Candida albicans* ( Ferreira e Avila, 2001).

#### 6.2.2. Técnica de fita adesiva

1. Prepara-se uma lamina e coloca-se sobre ela uma gota de lactofenol –azul de algodão;
2. Corta-se um pedaço de fita adesiva e cola-se sob a colónia de modo que uma parte desta passe para fita;
3. Cola-se o pedaço da fita já com amostra á lamina com uma gota de lactofenol- azul de algodão e estende-se para facilitar a fixação e a observação;
4. A seguir observa-se ao microscópio (1º com objectiva de 10 e depois com a de 40X).

Esta técnica permite identificar dermatofitófitos filamentosos através de quantidade de conídios, arranjo e tamanho (macroconídios e microconídios) ( Veja tabela 2 do anexo).

A mesma técnica foi aplicada para identificação de espécies do género *Aspergillus* que se caracterizam por apresentar conidióforos simples, hialinas ou pigmentadas que se originam da célula “pé”. O conidióforo em seu ápice dilata-se em uma vesícula de forma variada (globosa, subglobosa e clavada), hialina ou pigmentada, da qual surgem as fiálides, podendo ser uni ou biosseriadas ( Ferreira e Avila 2001).

#### 6.2.3. Prova de urease

1. Retira-se uma porção da colónia com ansa esterilizada;
2. Coloca-se na urea-indol por 15 a 45 min;
3. Diz-se urease positiva, quando a ureia muda de cor para violeta, sugestivo do *Cryptococcus neoformans*.

Esta técnica tem como objectivo a produção da enzima urease, sugestivo da presença do *Cryptococcus neoformans* que se verifica por mudança da cor do meio (urea-indol) para violeta.

### 6.3. Outras actividades desenvolvidas

- Participação nas aulas práticas da disciplina Micobiologia Médica;
- Participação no estudo de infecções por tinea capitis nas crianças de aldeia SOS-Maputo;
- Preparação de meios de cultura para fungos (ágar sabouraud) e distribuição em placas de Petri, segundo o procedimento:
  1. Pesa-se 27g do pó mycosel agar;
  2. Deita-se 750ml de H<sub>2</sub>O destilada num balão de 1000ml e adicionou-se o pó (mycosel agar) já pesado;
  3. Aquece-se a suspensão, em banho Maria agitando frequentemente até ferver;
  4. Esteriliza-se o meio no autoclave a 121°C durante 15min;
  5. Deixa-se o meio arrefecer até 50°C;
  6. Numa câmara do fluxo laminar distribui-se o meio em placas de Petri estéreis;
  7. Deixa-se o meio solidificar-se;
  8. Guardam-se as placas na geleira a temperatura de 4-8°C com a base virada para cima, para evitar a humedificação e contaminação do meio por microorganismos.

## 6.4. Resultados obtidos

Tabela 3. Amostras processadas no Laboratório

Tipo de amostra	Nº	%
Raspados da pele	144	85,2
Lavado broncoalveolar	13	7,7
Líquido cefalorraquidiano	8	4,7
Tecidos biopsiados	4	2,4
Total	169	100

Tabela 4. Relação entre o grupo etário e a espécie fúngica identificada

Grupos etários em anos	Micoses Superficiais e Cutâneas por:								Total	
	<i>M.f</i>	<i>T.m</i>	<i>T.r</i>	<i>T.v</i>	<i>T.t</i>	<i>M.a</i>	<i>E.f</i>	<i>C.a</i>	Nº	%
(1-6)	0	1	1	1	1	11	0	0	15	26,8
(7-12)	0	0	0	5	0	5	0	0	10	17,9
(13-18)	1	0	2	2	0	1	0	0	6	10,7
≥ 19	4	6	4	3	0	0	1	7	25	44,6
Total	5	7	7	11	1	17	1	7	56	100

Legenda:

*M.f*- *Malassezia furfur*

*T.m*-*Trichophyton mentagrophytes*

*T.r*- *Trichophyton rubrum*

*T.v*- *Trichophyton violaceum*

*T.t*- *Trichophyton tonsurans*

*M.a*- *Microsporum audouinii*

*E.f*- *Epidermophyton floccosum*

*C.a*- *Candida albicans*

Tabela 5. Relação entre as principais dermatofitoses e o grupo etário

Grupos etários (em anos)	Dermatofitose						Total	
	<i>T. manum</i>	<i>T. pedis</i>	<i>T. corporis</i>	<i>T. unguium</i>	<i>T. capitis</i>	<i>T. cruris</i>	Nº	%
(1-6)	0	2	5	0	16	0	23	16
(7-12)	2	2	2	1	12	0	19	13,2
(13-18)	0	5	8	0	2	1	16	11,1
≥ 19	13	23	30	12	3	5	86	59,7
Total	15	32	45	13	33	6	144	100

*T. Tinea*

Tabela 6. Relação entre dermatofitose (lesão) e a espécie fúngica isolada

Espécies isoladas	Dermatofitose						Total	
	<i>T. manum</i> n=15	<i>T. pedis</i> n=32	<i>T. corporis</i> N=45	<i>T. unguium</i> n=13	<i>T. capitis</i> n=33	<i>T. cruris</i> n=6	Nº	%
<i>T. mentagrophytes</i>	2	2	2	1	0	0	7	13,7
<i>T. violaceum</i>	0	0	4	0	7	0	11	21,6
<i>T. rubrum</i>	0	3	2	1	0	1	7	13,7
<i>M. audouinii</i>	0	0	2	0	15	0	17	33,3
<i>E. floccosum</i>	0	1	0	0	0	0	1	2
<i>T. tonsurans</i>	0	0	0	0	1	0	1	2
<i>C. albicans</i>	0	3	0	2	0	2	7	13,7
Total	2	9	10	4	23	3	51	100

Tabela 7. Espécies fúngicas isoladas em amostras provenientes de casos suspeitas de micoses oportunistas

Espécie	Nº de isolamento	%
<i>Candida albicans</i>	8	72,7
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1	9,1
<i>Asprgillus fumigattus</i>	2	18,2
<i>Pneumocystis carinii</i>	0	0
Total	11	100

### 6.4.1. Análise de resultados e Discussão

A colheita de amostras fez parte das actividades desenvolvidas pelo estagiário. Verifica-se na tabela 3 maior quantidade de amostras de raspados da pele devido ao periodo em que decorreu o estágio, durante o qual havia alta humidade atmosférica e elevadas temperaturas, o que é propício à proliferação dos fungos que colonizam a pele.

Segundo Ghannoum et al (2003); Gupta et al (2003) e Murray et al (2004) as crianças até á puberdade são mais susceptível às infecções por *tinea capitis*, cujo um dos agentes etiológicos em causa é o *Microsporum audouinii*.

A tabela 4 mostra a relação entre o grupo etário e a espécie fúngica identificada e a tabela 5 a relação entre as principais dermatofitoses (lesão) com o grupo etário.

Por essas tabelas pode constatar-se que *tinea capitis* é mais frequente em crianças de grupos etários que varia de (1-6) e de (7-12) anos sendo o *Microsporum audouinii* a espécie com maior número de isolamentos. Acredita-se que a fraca higiene pessoal que se regista na infância seja um factor que propociona a contaminação por *Microsporum audouinii*.

Verifica-se nas tabelas 5 e 6 maior frequência de infecções por *tinea corporis* e *tinea pedis* em individuos com idade igual e superior aos 19 anos, sendo vários agentes etiológicos envolvidos nestas lesões. Acredita-se que as lesões nestes locais (pés e dedos; tronco e membros) por vários agentes etiológicos seja devido ao maior grau de exposição e alta susceptibilidade a infecções por fungos patogénicos com capacidade de digerir a queratina.

A tabela 7 mostra a frequência de fungos oportunistas isolados, com maior destaque para a *Candida albicans*.

Segundo Raposo et al (1996); Ferreira et al (2002) e Murray et al (2004), *Candida albicans* é uma levedura que faz parte da flora normal do tracto digestivo e genital humano. Acredita-se que mediante as condições de imunodepressão a *Candida* facilmente-se desenvolve e dissemina através da corrente sanguínea atingindo muitos órgãos aumentando assim as possibilidades do seu isolamento.

## 7. Perspectiva Crítica

O estágio é uma actividade onde o estudante pode aplicar por um determinado período os conhecimentos e capacidades adquiridas ao longo do curso e no final ter uma visão crítica.

O Laboratório de Microbiologia Faculdade de Medicina é reconhecido como Laboratório Nacional de referência para o diagnóstico de doenças infecciosas, prestando até no momento melhores serviços de diagnóstico; há que referir o cumprimento de normas internacionais de biossegurança para evitar a contaminação e a utilização de técnicas correctas aplicadas para identificação de fungos patogénicos; No que diz respeito a colheita de amostras de salientar que os pacientes que se apresentaram na sala de colheita do Laboratório tendo aplicado tópicos ou outras substâncias de hidratação da pele, eram orientados e mandados voltar outro dia.

No que concerne os processos de isolamento de fungos patogénicos que a maioria das vezes o Laboratório tem sucessos, todavia, segundo Karaca e Koç (2004) e Garg *et al.*(2006), é possível realizar-se a avaliação da sensibilidade dos mesmos aos antifúngicos de modo a direccionar o Clínico ao tratamento correcto. No entanto, este teste não é executado nesta unidade.

A respeito do exame directo a fresco de raspados da pele, pêlos e unhas com KOH a 10%, em vez de se esperar a actuação de KOH por 10 minutos ou mais podia-se, segundo Esteves *et al* (1990) facilitar a acção de KOH e abreviar-se o exame por aquecimento à chama durante alguns segundos ( sem deixar ferver).

A respeito das técnicas de coloração com vista ao exame directo a partir de amostras de lavado bronco-alveolar ou tecidos biopsiados, sendo a técnica mais efectuada a de Giemsa modificado devido as condições do Laboratório; esta técnica confere cor púrpura ao núcleo e tons azuis ao citoplasma das estruturas fúngicas, de salientar que se o Laboratório tivesse meios financeiros para aquisição de material e reagentes necessários para a aplicação de outras técnicas de coloração como a técnica de Gomori-Grocoti modificado e azul de Ortoluidina, seria possível visualizar diferentes estruturas fúngicas em formação, como formas císticas com espessamento duplo focal, típico da parede de *Pneumocystis carinii*.

## 8. Conclusão

O aparecimento das micoses ocorre sobre certas condições adequadas de temperatura e humidade que favorecem o crescimento de fungos; Essas condições ocorrem em regiões tropicais e subtropicais.

Em Moçambique, devido à predominância do clima tropical em que há muita humidade atmosférica e elevadas temperaturas; Os fungos encontram um ambiente propício para se instalarem e colonizarem a pele e outros órgãos do corpo e aí proliferarem com bastante facilidade. Daí a importância e necessidade de diagnóstico precoce de casos de micoses.

A existência de Laboratórios com técnicas para identificação de fungos patogénicos é muito importante pois permite auxiliar o Clínico nas suas decisões de modo a melhorar a saúde dos pacientes. E com factores predisponentes como terapias antibióticas prolongadas, e o HIV/SIDA, a Micologia ganha ainda maior importância devido às infecções por fungos oportunistas que devem ser rapidamente diagnosticadas e tratadas de modo a adiar as mortes prematuras de indivíduos já debilitados.

O estagiário espera implementar no futuro os conhecimentos teóricos e práticos ganhos ao longo do curso e as capacidades de executar as técnicas de diagnóstico Micológico adquiridos no Laboratório de Microbiologia e que seja um grande profissional.

## 9. Recomendações

Por uma boa coordenação e dedicação dos elementos do Laboratório em apoiar o estagiário, há que apresentar propostas com vista ao melhoramento e manutenção da unidade do estágio.

- No exame directo a fresco a partir de raspados da pele e seus derivados como pêlos e unhas, recomenda-se o aquecimento do material junto com o KOH a 10% ou 20% durante alguns segundos, de modo a facilitar a acção deste e tornar breve o exame;
- A respeito das técnicas de coloração usadas para identificação de fungos patogénicos recomenda-se a aquisição de outros métodos de coloração com vista a melhorar o diagnóstico;
- Após identificação e isolamento de fungos patogénicos de modo a obter uma colónia pura, recomenda-se a realização de provas de sensibilidade aos antifúngicos, pois permite que o Clínico estabeleça o fármaco mais apropriada ao tratamento;
- Recomenda-se os interessados em estudar as infecções por fungos (micoses) que façam em épocas de alta humidade atmosférica e elevadas temperaturas, pois estas fornecem um ambiente propício para a instalação, colonização e proliferação de fungos na pele com bastante facilidade;
- Recomenda-se à população a evitar compartilhar roupas, pentes, escovas, toalhas e lençóis de modo a limitar a propagação de fungos patogénicos, uma vez que os dermatófitos são agentes que se transmitem por contacto directo e muitas vezes de forma indirecta através de fomites contaminados;
- Recomenda-se ao Clínico que informe incansavelmente os pacientes com micoses, a dirigirem-se aos locais de colheita de amostras sem ter aplicado qualquer agente antifúngico ou tópico, de modo a evitar os resultados falsos negativos.

## 10. Bibliografia

1. Amorim, M.M.T (1999). Tinea Capitis nas crianças-da-rua na cidade de Maputo. Tese de Licenciatura. 51pp.Maputo. Universidade Eduardo Mondlane.
2. Barka, A e Santos, T (2005). Geografia de Moçambique, Física e Economica,3ª edição, Dinâme, 191pp.
3. Bernardo, F.M; Martins, H.M; Martins; M.L (2001). Fontes Urbanas de *Cryptococcus spp*-Lisboa . Revista Portuguesa de Ciencias veterinárias. 96 (539) 157-160.
4. Brasil, K.W; Pinheiro, R.L; Pimentel, I.C (2003). Diagnóstico Laboratorial de micoses superficiais e Cutâneas: Comparação dos métodos de hidróxido de potássio e do Calcofluor White. An bras Dermatol, Rio de Janeiro, 78 (5): 547-551.
5. Esteves, J.A; Cabrita, J.D e Nobre, G.N (1990). Microbiologia Médica, 2ª edição, Fundação Calouste Gulbenkian-Lisboa, 1058pp.
6. Ferreira, A e Avila, S.L.M (2001) .Diagnostico Laboratorial, das principais doenças infecciosas e Auto imunes, 2ª edição, Guanabara- Koogan, Brasil, 433pp.
7. Ferreira,L; Jr Moreira, J.P.R; Appelt, C.E; Berg, V; Oliveira, I.A; Muschner, A.C; Reischalk, D e Chermette, R. (2002). Study of the Associations Between the Isolation of *Candida albicans* and Infection by the Feline Leukemia Virus ( FeLV), Treatment with Corticosteroids or Antimicrobials in cats. Acta scientiae veterinariae. 30(3) : 179-183.
8. Filiú, W.F.O; Wanke, B; Agüena, S.M; Vilela, V.O; Macedo, R.C.L.e Lazera, M. (2002). Cativeiro de aves como fontes de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. 35(6): 591-595.

9. Folgosa, E. M. P. e J. Mondlane (2005). Manual de Práticas de Microbiologia. 3ª edição, 62pp. Maputo, Universidade Eduardo Mondlane.
10. Frejaville, J.P e Kamoun, P (1989) Manual de Exames de Laboratório, Atheneu, São Paulo, 701pp.
11. Garg, S; Naidu, J; Singh, S.M; Nawange, S.R; Jharia, N; Saxena, M (2006). In vitro activity of terbinafine against Indian Clinical isolates of *Candida albicans* and non-albicans using a macrodilution method. *Journal de Mycologie Médicale*. 16: 119-125.
12. Ghannou, M; Isham, N; Hajjeh, R; Cano, M; Al-Hasawi, F; Yearick,D; Warner, J; Long, L; Jessup, C; Elewski, B (2003). Tinea Capitis in Cleveland: Survey of Elementary School Students. *American academy of Dermatology*. 48:189-193.
13. Gupta, A.K e Tu, L.Q (2006). Dermatophytes: Diagosis and Treatment. *American Academy of dermatology*. 54: 1050-1055.
14. Jawetz, E; Melnick, J. L; Aldelberg, E. A (1970). Microbiologia Médica, 2ª edição, Rio de Janeiro, Guanabara- Koogan, 534pp.
15. Jawetz, E; Melnick, J. L; Aldelberg, E. A; Brooks,G. F; Butel, J. S e Ornston, L. N . (1991), Microbiologia Médica, 18ª edição, Guanabara- Koogan, 518pp.
16. Karaca, N. e Koç, A.N (2004). In Vitro Susceptibility Testing of Dermatophytes: Comparison of disk diffusion and reference broth dilution methods. *Diagnostic Microbiology and infection Disease*. 48: 259-264.
17. Laboratório de Microbiologia (1999).
18. Larone, D.H (1995). Medically Important Fungi. A guide to Identification. 3ª edição, ASM Press, Washington, D.C. 274pp.

19. Latgé, J.P e Calderone, R ( 2002). Host-microbe interactions: fungi invasive human fungal opportunistic infection. *Current Opinion in Microbiology*, 5: 355-358.
20. Lees, L e Barton, R.C (2003). The use of Niger Seed agar to Screen for *Candida dubliniensis* in the Clinical Microbiology laboratory. *Diagnostic Microbiology and infections Disease* 46: 13-17.
21. Moura, R. De A; Purchio, A; Wada, C.S e Therezinha, V. De A. (1994), Técnicas de Laboratório ,3ª edição, Atheneu, 511pp.
22. Murray, P. R; Rosenthal, K. S; Kobayashi, G. S e Pfaller, M. A. ( 2004) Microbiologia Medica, 4ª edição, Guanabara Koogan, 762pp.
23. Pelczar, M.J; Chan, E.C.S e Krieng, N.R (1981). Microbiologia Conceitos e Aplicações, Vol.2, 2ª edição, Makron Books, 517pp.
24. Raposo, J.B; Nobre, M.O e Fernandes, C.G ( 1996). Candidiase Cutânea em um canino (25-28)pp.
25. Rodriguez, J. M. T; Hermandz, A ; Artigos, J.G; Briz, R.N e Miguens, M. P . (1993) Micologia Medica, Masson,s.a, 378pp.
26. Rowen, J.L (2001). Fungal Infection in the Neonatal Intensive Care Unit. *Seminars in Pediatric infection Diseases*. 12(2): 107-114.
27. Silva, V; Thomson, P; Maier, L e Anticevic. (2003), Infeccion y colonizacion por Dermatofitos en cánidos del área Sur de Santiago, Chile, *Iberoam Micol*, 20: 145-148.
28. Smith, G. H; Blank, H; Sarkany, I. (1964), Fungus Diseases and their Treatment, Little Brown, 494pp.

29. Walter, N.J; Estridge, B.H; Reynolds, A.P. (1998), Laboratório Clínico, Técnicas Básicas, 3ª edição, Artmed, 482pp.

# Anexo

## Material e equipamento

- Placas Petri para a colheita de amostra;
- Luvas;
- Bisturis novos e estéril;
- Ansas de platina;
- Microscópio óptico;
- Bico de bunsen;
- Estufa regulada a 37°C;
- Incubadora micológica ajustada à temperatura ambiente;
- Laminas;
- Lamelas;
- Geleira;
- Hidróxido de potássio (KOH) a 10%;
- Detergente;
- Água destilada;
- Corante lactofenol –azul algodão;
- Fita adesiva;
- Tinta de china.;
- Balança ;
- Balões volumétricos;
- Provetas graduadas;
- Pó (mycosel agar );
- Autoclave;
- Bico de Bunsen;
- Pipeta de Pasteur;
- Álcool a 70%;
- Centrífuga;
- Corante eosine;
- Corante azul de metileno;

- Pinças;
- Tesoura;
- Óleo de imersão;
- Papel higienico;

Tabela 1. Principais dermatofitoses, respectivas áreas de localização da doença e agentes etiológicos\*

<b>Dermatofitose</b>	<b>Localização</b>	<b>Espécies mais frequentes</b>
<i>Tinea manum</i>	mãos	T. mentagrophytes
<i>Tinea pedis</i>	Pés e dedos	T. mentagrophytes, T.rubrum
<i>Tinea corporis</i>	Tronco, ombro, membro e face	Varias espécies
<i>Tinea unguium</i>	unha	T.rubrum, T. mentagrophytes
<i>Tinea barbae</i>	Área da barba	T.verrucosum, T. mentagrophytes
<i>Tinea capitis</i>	Couro cabeludo	T.tonsurans, M.canis
<i>Tinea cruris</i>	Virilha, púbis e área perineal	T.rubrum, E.floccosum

\*Fonte: Ferreira e Avila (2001).

Tabela 2 .Morfologia das colônias de fungos e suas características microscópicas\*

	Fungo	Morfologia das colônias	Características microscópicas
	levedura	Lisas de coloração branca ou creme	Células esféricas com pseudofilamentos ( <i>C. albicans</i> ) e outras com capsula ( <i>C. neoformans</i> )
Dermatófitos filamentosos	<i>T. mentagrophytes</i>	Creme, marrom -clara ou rósea, plana, pulverulenta a granular ou penugenta, anverso marrom-claro, amarelado, vermelho ou vermelho - amarronzado	Microconídios em cachos ou isolados ao longo de hifas; macroconídios clavados ; hifas em espiral
	<i>T. rubrum</i>	Cotonoso, branco, avelulada as vezes pulverulenta; verso vermelho-sangue ou amarelo, laranja	Microconídios ao longo de hifas não ramificadas; macroconídios ausentes a raros
	<i>T. violaceum</i>	Pequenas de cor violeta; globosa ou velútinea; reverso purpura	Macro e microconídios geralmente ausentes; clamidoconídios eventuais
	<i>T. schoenleinii</i>	Branca a castanha; globosa ou céreo	Micro e macroconídios raros; clamidoconídios numerosos
	<i>E. floccosum</i>	Verde-Amarelada, plana ou com dobras, pulverulenta a avelulada; verso amarelo-marrom	Macroconídios abundantes, 0-4 septos, microconídios ausentes
	<i>M. canis</i>	Branco cotonosa e dourado, verso amarelo -alaranjado	Macroconídios numerosos, poucos microconídios
	<i>T. verrucosum</i>	Plana , creme a castanha ou branca	Macro e microconídios ausentes, numerosos clamidoconídios em cadeias
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Globosas com pigmentação verde	Conidiofóros simples, hialinas que se originam da célula pé

\*Fonte: Ferreira e Avila (2001).