

Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.UACAP.006 – Página 1/6	
Título do Documento	MICROBIOLOGIA: IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS	Emissão: 04/09/2025	Próxima revisão: 04/09/2027
		Versão: 03	

1. OBJETIVO(S)

- Descrever a técnica empregada no Laboratório da UACAP para identificação de fungos leveduriformes e filamentosos.

2. MATERIAL

- Painéis Phoenix yeast ID;
- Caldo Phoenix ID;
- Estação de inoculação;
- Alça bacteriológica estéril;
- Lactofenol azul de algodão;
- hidróxido de potássio (KOH)
- Microscópio;
- Lâmina;
- Lamínula;
- Tinta nanquim;
- Algodão hidrofílico;
- BD Phoenix System (fabricado por Becton Dickinson and Company - Registro Anvisa: 10033430436);
- BD PhoenixSpec Nephelometer (Fabricado por Becton Dickinson and Company).

3. DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

3.1. Identificação por exame microscópico de amostras

3.1.1. Exame microscópico direto com hidróxido de potássio (KOH) a 20%

Técnica utilizada para exame de pelos, raspado de pele e unha, exsudatos espessos e outros materiais densos.

1º Colocar uma gota de KOH (aquoso a 20%) em uma lâmina de microscopia e sobre

Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.UACAP.006 – Página 2/6	
Título do Documento	MICROBIOLOGIA: IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS	Emissão: 04/09/2025	Próxima revisão: 04/09/2027
		Versão: 03	

essa uma porção da amostra a ser examinada;

- 2º Cobrir a preparação com uma lamínula e colocar a lâmina em uma placa de petri com um pequeno chumaço de algodão úmido;
- 3º Vedar a placa com fita adesiva e aguardar 24 horas;
- 4º Realizar a leitura em microscópio óptico comum, inicialmente, com objetiva de 10x, seguida de 40x.

3.1.2. Exame microscópico direto com tinta nanquim (tinta da China)

Utilizado em amostras de líquido, urina, secreções ou exsudatos, para visualização de leveduras capsuladas do gênero *Cryptococcus*, que se tornam mais evidentes contra o fundo negro proporcionado pela tinta.

- 1º Colocar 10 uL de tinta nanquim e 50 uL do sedimento da amostra centrifugada sobre uma lâmina de vidro com o número do paciente e o tipo de amostra;
 - 2º Cobrir a preparação com lamínula;
 - 3º Observar em microscópio óptico (objetivas de 10x e 40x);
- **OBS:** Atentar-se para refringência da parede celular e das inclusões no citoplasma das leveduras, além da presença de brotamentos.

3.1.3. Exame microscópico por coloração de Gram

- 1º Identificar uma lâmina de vidro com o número do paciente e o tipo de amostra, e pingar uma gota de salina estéril;
- 2º Pegar pequena porção de uma colônia com o auxílio de alça estéril, e depositar sobre a gota de salina da lâmina;
- 3º Homogeneizar o material com movimentos circulares;
- 4º Aguardar para que seque e fixar a lâmina sobre a chama.
- 5º Prosseguir com a coloração de GRAM descrita no POP de preparo de lâminas para bacterioscopia (POP. nº 017 da UACAP).

3.2. Identificação de Fungos Filamentosos

- 1º Observar a morfologia da colônia e aspectos macroscópicos (cor, textura, superfície, pigmento difusível no meio de cultura, entre outros) e pode ser feita na cultura primária do fungo.
- 2º Observar o tempo de crescimento do fungo, que é fundamental para identificação

Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.UACAP.006 – Página 3/6	
Título do Documento	MICROBIOLOGIA: IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS	Emissão: 04/09/2025	Próxima revisão: 04/09/2027
		Versão: 03	

presuntiva. Podendo ter um crescimento rápido (< 7 dias), intermediário (8 a 14 dias) ou lento (> 15 dias).

3º Observar as estruturas microscópicas, tais como: hifa hialina ou demáceas, septada ou cenocítica, forma, disposição e formação dos esporos;

- **OBS:** A análise microscópica auxilia na identificação dos gêneros dos fungos filamentosos, mas nem sempre na caracterização das espécies. A morfologia microscópica é mais bem visualizada com a **técnica de microcultivo**.

3.2.1. Técnica de microcultivo

1º Colocar uma lâmina esterilizada dentro da placa de Petri estéril (a lâmina deve estar sobre um suporte, que pode ser formado por outra lâmina, ou um pequeno bastão de vidro recurvado, ou ainda, dois palitos de fósforo);

2º Colocar sobre essa lâmina um cubo de ágar nutriente sólido;

3º Semear o fungo, a partir de repique recente, nos 4 lados do cubo de ágar;

4º Recobrir com uma lamínula esterilizada;

5º Fazer uma câmara úmida embebendo um pequeno chumaço de algodão estéril e colocando-o dentro da placa, para evitar a dessecação do meio de cultura durante o crescimento do fungo;

6º Tampar e vedar a placa e deixar à temperatura $\pm 30^{\circ}\text{C}$ por 7 a 10 dias, até que se observe desenvolvimento de hifas com ou sem pigmentação;

7º Inativar a esporulação do fungo adicionando 1 mL de formol ao algodão e vedando a placa com fita adesiva durante 24-48 horas. O vapor de formol, além de inativar o fungo, irá auxiliar na fixação das estruturas microscópicas;

8º Retirar a lamínula com auxílio de uma pinça, cuidadosamente, uma vez que nela deverão estar aderidas as hifas e esporos do fungo;

9º Pingar uma gota de corante azul de lactofenol-algodão ("Cotton Blue") e montar sobre uma lâmina;

10º Desprezar o cubo de ágar e, em seu lugar, pingar outra gota de corante lactofenol-azul algodão e recobrir com lamínula, para visualizar esporos e hifas também aderidos à lâmina;

11º Observar em microscópio ótico com objetiva de 40x, o tipo e a cor da hifa, forma, disposição e formação de esporos.

Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.UACAP.006 – Página 4/6	
Título do Documento	MICROBIOLOGIA: IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS	Emissão: 04/09/2025	Próxima revisão: 04/09/2027
		Versão: 03	

3.3. Identificação de Fungos Dimórficos

- 1º Observar o comportamento do fungo para comprovar o dimorfismo;
 - 2º Observar o aspecto microscópico de cada fase (filamentosa e leveduriforme);
- **OBS:** a fase leveduriforme ocorre em temperatura acima de 30°C, preferencialmente a 37°C, onde o fungo filamentoso diminui a capacidade de filamentação e divide-se por brotamento, conferindo às colônias aspecto cremoso. Seu crescimento é lento (>15 dias) no primo-isolamento (*Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides brasiliensis*) ou moderado (8 a 14 dias), como *Sporothrix schenckii*.

3.4. Identificação de leveduriformes por inoculação em painéis para automação

3.4.1. Preparo do painel

- 1º Remover o painel da embalagem cuidadosamente tocando somente as laterais do painel;
 - 2º Colocar o painel na estação de inoculação com as duas aberturas para cima;
- **OBS:** O painel deve ser inoculado em até 2 horas após a remoção da embalagem.
- 3º Identificar o painel em cima da etiqueta azul.

3.4.2. Preparo do inóculo Yeast

- 1º Identificar o tubo ID como o número de acesso e o número do isolado;
 - 2º Usar técnicas assépticas e pinçar colônias de mesma morfologia e isoladas com alça estéril e ressuspender no tubo de identificação;
 - 3º Fechar o tubo e homogeneizar com auxílio do vórtex;
 - 4º Esperar 10 segundos para as bolhas de ar subam até a superfície do líquido;
 - 5º Usar o Nefelômetro para medir a turbidimetria (2,0 – 2,4);
 - 6º Colocar o tubo ID na estação de inoculação e verter o caldo em sua respectiva cavidade (ID à esquerda);
- **OBS:** A suspensão padrão deve ser usada, no máximo, 60 minutos após o preparo.
- 7º Selar a cavidade após o completo preenchimento dos poços com a tampa plástica;
 - 8º Colocar o painel na vertical na rack de transporte.
- **OBS:** Os painéis prontos devem ser introduzidos no Phoenix em até 30 minutos após serem inoculados e selados.

Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.UACAP.006 – Página 5/6	
Título do Documento	MICROBIOLOGIA: IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS	Emissão: 04/09/2025	Próxima revisão: 04/09/2027
		Versão: 03	

3.4.3. Inserção dos painéis do Phoenix

- 1º Inserir a identificação do paciente e número de acesso na tela de registro da amostra/entrada rápida do equipamento Phoenix;
- 2º Clicar no ícone de códigos de barra na grade de testes disponíveis e realizar a leitura do código de barras do painel;
- 3º Salvar e inserir o painel no Phoenix.

3.4.4. Calibração

- 1º Calibrar trimestralmente o nefelômetro no BD Phoenix Nephelometer, conforme indicação do fabricante (vide manual);
- 2º Realizar leitura diária no nefelômetro das quatro soluções fornecidas pelo fabricante.

3.4.5. Leitura

A identificação é realizada pelo BD Phoenix e a leitura é realizada através do sistema Epicenter.

3.5. Controle de qualidade

- **Controle da qualidade interno:** realizar mensalmente ou a cada troca de lote dos painéis de Yeast, utilizando a ATCC *Candida parapsilosis* 22019.
- **Controle da qualidade externo:** Realizado pelo Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ), vide POP. N^o 054 da UACAP.

4. REFERÊNCIAS

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada a Assistência à saúde. Módulo 4 – Procedimentos laboratoriais: da requisição do exame a análise microbiológica e laudo final.** Brasília: Anvisa, 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada a Assistência à saúde. Módulo 6 – Detecção e Identificação de Bactérias.** Brasília: Anvisa, 2013.



Tipo do Documento	PROCEDIMENTO / ROTINA	POP.UACAP.006 – Página 6/6	
Título do Documento	MICROBIOLOGIA: IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS	Emissão: 04/09/2025	Próxima revisão: 04/09/2027
		Versão: 03	

5. HISTÓRICO DE REVISÃO

VERSÃO	DATA	DESCRIÇÃO DA ALTERAÇÃO
01	24/06/2021	Elaboração do POP
02	08/08/2023	Revisão do POP
03	10/06/2025	Revisão do POP

Elaboração Letícia Cristina Limiere Janaina Narcizo Rodrigues	Data: 24/06/2021
Revisão 2ª Versão: Janaina Narcizo Rodrigues Letícia Cristina Limiere 3ª Versão: Nathalie Gaebler Vasconcelos Janaina Narcizo Rodrigues	Data: 08/08/2023 Data: 10/06/2025
Validação: Fuad Fayez Mahmoud – STGQ	Data: 29/08/2025
Aprovação: Viviane Regina Noro – Chefe da UACAP Tiago Amador Correia - GAS	Data: 31/07/2025 Data: 04/09/2025

Assinado eletronicamente no processo SEI23529.011397/2023-14