

Meios de cultura em micologia

A escolha do meio de cultura é uma etapa muito importante no processo de identificação de fungo em uma amostra. O meio de cultura pode ser escolhido, basicamente, segundo o tipo de amostra ou agente etiológico pressupostamente presente na mesma. Há a possibilidade de, a partir de aspectos observados ao exame microscópico da amostra, não ser possível a identificação, nesses casos há necessidade de realização de cultivo, seguido de nova observação microscópica. Nesse contexto, deve-se escolher o meio mais adequado para que seja possível confirmar a identificação do agente.

- **Ágar Sabouraud Dextrose (ASD)**

Meio básico em laboratório de micologia, também denominado simplesmente de ágar Sabouraud. Trata-se de meio com nutrientes que, devido às altas concentrações de carboidratos, favorece o crescimento de diversos fungos leveduriformes e filamentosos.

Preparação do meio

- Dextrose: 40 g
 - Peptona: 10 g
 - Ágar: 15 g
 - Água destilada: 1000 ml
1. Dissolver os componentes na água destilada
 2. Acertar o pH em 5,6
 3. Aquecer até a completa dissolução
 4. Distribuir cerca de 10 ml por tubo
 5. Esterilizar em autoclave a 120°C por 15 minutos

O meio não dispõe de inibidores de microflora acompanhante, mas agentes inibidores podem ser adicionados, como cloranfenicol.

Preparação do meio com cloranfenicol

1. Dissolver 100 mg de cloranfenicol em 10 ml de álcool 95°C
2. Adicionar em 1 litro de ASD antes da esterilização

Já a variante do meio com cloranfenicol e cicloheximida (meios comerciais Mycosel, Micobiotic agar ou Meio Seletivo para fungos) é comumente utilizado para isolamento de fungos patogênicos, principalmente dermatófitos.

A Cicloheximida é utilizada para selecionar dermatófitos, inibindo parcialmente, ou totalmente, o crescimento de fungos anemófilos; já o cloranfenicol inibe o crescimento de bactérias e de alguns fungos filamentosos. Seu uso está indicado para cultivo de materiais coletados de lesões com suspeita de dermatofitose, uma vez que aumenta a sensibilidade no isolamento desses fungos, como já citado. No entanto, deve-se ter em vista que esta substância poderá inibir o isolamento de fungos oportunistas, como *Aspergillus* sp., *Histoplasma capsulatum* na fase leveduriforme e certas leveduras patogênicas dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*.

Preparação do meio com cicloheximida e cloranfenicol

1. Diluir separadamente 400 mg de cicloheximida (Actidione) em 10 ml de acetona
2. Diluir 50 mg de cloranfenicol em 10 ml de álcool 95°C
3. Misturar as soluções e adicionar em 1 litro de ASD antes da esterilização
4. Acertar o pH em 7,0

- **BHI – Brain Heart Infusion**

É um meio enriquecido, derivado de nutrientes de cérebro e coração, peptona e dextrose. A peptona e a infusão são fontes de nitrogênio, carbono, enxofre e vitaminas, já a dextrose é um carboidrato que os microrganismos utilizam para fermentação. Sua constituição possibilita o metabolismo de microrganismos com diferentes exigências nutritivas. É geralmente utilizado como meio para cultivo de estreptococos, pneumococos, meningococos, enterobactérias, não fermentadores, leveduras e fungos.

Pode ser acrescido de 5 a 10% de sangue de carneiro, assim como de antibióticos (de preferência, cloranfenicol ou penicilina e estreptomina).

Preparação do meio com cloranfenicol

1. Dissolver 50 mg de cloranfenicol em 10 ml de álcool 95°C
2. Adicionar em 1 litro de BHI desidratado antes da esterilização

- **Meio para a realização de Zimograma**

Preparação do meio

- Peptona: 1,0 g
 - Indicador de Andrade: 0,5 ml
 - Água destilada: 100 ml pH: 7,0
1. Distribuir 3,6 ml por tubo
 2. Esterilizar a 120°C por 20 minutos
 3. Adicionar separadamente 4,0 ml das soluções de açúcares a 20%
- Açúcares: glicose, lactose, maltose, sacarose. Os açúcares devem ser esterilizados por filtração.

Indicador de Andrade:

- Fucsina ácida: 0,5 g
- NaCH 1 N: 16,0 ml
- Água destilada: 100ml

O indicador de Andrade é um indicador de pH que sofre uma viragem nítida para o vermelho em pH abaixo de 7.0.

- **Ágar Fubá**

Meio geralmente utilizado para o crescimento de fungos do gênero Candida.

Preparação do meio

- Fubá: 20 g
 - Ágar: 10 g
 - Tween 80: 5 ml
1. Adicionar o fubá em 250 ml de água e ferver até borbulhar
 2. Filtrar o fubá em gaze dobrada em quatro
 3. Dissolver o ágar em 250 ml de água
 4. Restaurar o volume da infusão de fubá para 250 ml, com água quente e juntar as suspensões
 5. Ajustar o pH para 6,6 – 6,8
 6. Adicionar o Tween 80

- **Ágar Base Uréia (Christensen)**

Meio utilizado para determinar a habilidade do microrganismo de degradar a uréia em duas moléculas de amônia pela ação da enzima urease, reação que resulta na alcalinização do meio.

Preparação do meio

1. Adicionar solução de uréia a 40% (40 g uréia em 100 ml de água destilada) à base de Ágar
2. Não deixar o meio em temperatura ambiente pode ocorrer autohidrólise
3. Não aquecer a solução base da uréia, pois a uréia pode se decompor se aquecida
4. Não utilizar a uréia de Stuart porque é menos sensível para detectar a presença de urease

A solução de uréia a 40% é uma solução hipertônica e o risco de contaminação é baixo

- **Ágar Niger**

Meio seletivo e diferencial utilizado na identificação de amostras contendo fungos da espécie *Cryptococcus neoformans*.

Preparação do meio

- *Guizotia abyssinica*: 50 g
 - Glicose: 1 g
 - KH₂PO₄: 1 g
 - Creatinina: 1 g
 - Ágar: 15 g
 - Água destilada: 1000 ml
 - Aditivos: para cada 500 ml:
 - Penicilina G (20 unidades/ml): 0.5 ml
 - Gentamicina (40 mg/ml): 0.5 ml
1. Adicionar as sementes de *Guizotia abyssinica* moídas a 1000 ml de água destilada
 2. Ferver por 30 minutos
 3. Passar por papel filtro e completar o volume com água destilada para 1000 ml
 4. Adicionar os ingredientes remanescentes (exceto pelo Ágar e os antibióticos) e filtrar
 5. Deixar resfriar e ajustar o pH para 5,5
 6. Adicionar 7.5 g de Ágar para cada 500 ml
 7. Após autoclavar, esfriar até 48°C e adicionar a Penicilina G e a Gentamicina

Literatura Consultada

- WAHINGTON WINN, Jr.; ALLEN, Stephen; JANDA, William; KONEMAN, Elmer; PROCOP, Gary; SCHRECKENBERGER, Paul & WOODS, Gail. **Koneman Diagnóstico Microbiológico**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1565 p.
- Links:
 - http://www.mycology.adelaide.edu.au/Laboratory_Methods/Culture_Techniques_and_Media/bird.html
 - <http://www.pmlmicro.com/assets/TDS/170.pdf>
 - <http://www.bd.com/ds/technicalCenter/inserts>