

# Influência do tempo e do meio de transporte no isolamento de fungos patogênicos de biópsias de pele \*

## *Effects of time delay and transportation on isolation of pathogenic fungi from skin biopsies \**

Rafael Taglialegna<sup>1</sup>

Cilene Maria Pelúcio Lopes<sup>2</sup>

João Evangelista Fiorini<sup>3</sup>

Cláudia Maria Leite Maffei<sup>4</sup>

**Resumo:** FUNDAMENTOS - Não está definido como o meio de transporte e o intervalo de tempo até o processamento final interferem no isolamento de fungos patogênicos em material obtido de biópsias de pele.

OBJETIVOS - Determinar o efeito da inoculação tardia de biópsias de pele, transportadas em diferentes meios líquidos, na taxa de isolamento de fungos patogênicos.

MÉTODOS - De 47 pacientes com lesões cutâneas suspeitas de micoses invasivas obtiveram-se 278 biópsias das lesões. Cada biópsia foi transportada em frascos com caldo Sabouraud com cloranfenicol ou solução salina de cloreto de sódio e inoculada em ágar Sabouraud após 48-72 horas (precoce) ou após 72 horas até sete dias (tardio), constituindo-se quatro grupos de estudo.

RESULTADOS - As medianas das taxas de isolamento dos quatro grupos de esporotricose foram 100% e de paracoccidioidomicose foram 84% e 50% nos grupos precoces/solução salina ou caldo Sabouraud e 64% e 84% nos grupos tardios/solução salina ou caldo Sabouraud, respectivamente ( $p=0,88$ ). Baixas taxas de contaminação resultaram em especificidade diagnóstica de 82% para doenças não fúngicas.

CONCLUSÕES - Biópsias de pele podem ser transportadas em caldo Sabouraud ou solução salina por períodos de até sete dias, à temperatura ambiente, sem afetar a viabilidade dos fungos.

Palavras-chave: Esporotricose; Fungos; Fungos/isolamento & purificação; Meios de cultura; Meios de cultura/isolamento & purificação; Micoses; Micoses/diagnóstico; Paracoccidioidomicose

**Abstract:** BACKGROUND - It is not clear how culture media used during transport and the interval between the biopsy procedure and final processing can affect the successful isolation of fungi.

OBJECTIVE - The aim of this study was to investigate the effects of late inoculation of skin biopsies, transported in different sterile fluids, on the isolation rate of pathogenic fungi.

METHODS - A total of 278 punch biopsy specimens were collected from 47 patients with suspected lesions of invasive mycoses. Each biopsy was transported in vials with Sabouraud medium with chloramphenicol or saline solution and finally inoculated on Sabouraud agar and 2% chloramphenicol after a 48-72-hour (early) or after 72-hour-7-day (late) interval, comprising four groups of study.

RESULTS - The medians of isolation rate of the four sporotrichosis groups were 100%. For paracoccidioidomycosis, the medians ranged from 50% to 84%, with no statistically significant difference among the groups ( $p=0.88$ ).

CONCLUSION - It was concluded that skin biopsies can be transported in Sabouraud medium or saline solution within a 7-day interval from specimen collection up to final inoculation, at room temperature, maintaining viability and growth rate of fungus in culture.

Keywords: Culture media; Culture media/isolation & purification; Fungi; Fungi/isolation & purification; Mycoses; Mycoses/diagnosis; Paracoccidioidomycosis; Sporotrichosis

Recebido em 16.11.2006.

Aprovado pelo Conselho Consultivo e aceito para publicação em 13.08.2008.

\* Trabalho desenvolvido no Hospital Universitário Alzira Velano da Universidade de Alfenas – Alfenas (MG), Brasil.

Conflito de interesse: Nenhum / Conflict of interest: None

Suporte financeiro: Nenhum / Financial funding: None

<sup>1</sup> Professor de Dermatologia da Universidade de Alfenas – Alfenas (MG); doutorando do Departamento de Biologia Celular, Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP) – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

<sup>2</sup> Professora doutora de Dermatologia da Universidade de Alfenas – Alfenas (MG), Brasil.

<sup>3</sup> Professor doutor de Microbiologia da Universidade de Alfenas – Alfenas (MG), Brasil.

<sup>4</sup> Professora Doutora, chefe do Laboratório de Micologia Médica do Departamento de Biologia Celular, Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina da (USP) – Ribeirão Preto (SP), Brasil.

## INTRODUÇÃO

É consenso entre os micologistas que biópsias de tecidos devem ser inoculadas nos meios de cultura o mais breve possível, idealmente até seis horas após a coleta.<sup>1,2</sup> Os laboratórios de micologia estão concentrados nos grandes centros urbanos ou em universidades. Os laboratórios clínicos que não trabalham com micologia e que necessitam de enviar esse tipo de material para serviços de referência vêem-se em dilema com o intervalo, que pode ser de várias horas ou mesmo de dias, desde a coleta até o processamento final, e em que meio remeter o tecido. Não há recomendações específicas para essa eventualidade, e, frequentemente, o médico apóia o diagnóstico micológico em dados clínicos e histopatológicos. Estudo anterior demonstrou que fungos patogênicos podem ser recuperados do escarro após vários dias de transporte à temperatura ambiente.<sup>3</sup>

Este estudo teve por objetivo determinar, de forma prospectiva e controlada, o efeito da inoculação tardia de biópsias de pele, transportadas em diferentes meios líquidos e em diferentes tempos de inoculação, na taxa de isolamento de fungos patogênicos.

## MATERIAL E MÉTODOS

No período de agosto/2003 a abril/2006 foram avaliados 47 pacientes com lesões cutâneas suspeitas de micoses invasivas, cujos diagnósticos finais foram de esporotricose (14), paracoccidioidomicose (12), cromomicose (um), histoplasmose (um), leishmaniose (12) e outros não infecciosos (oito). Após remoção de tecidos desvitalizados e anti-sepsia com álcool etílico 70%, obteve-se, do mesmo paciente, múltiplas biópsias com *punch* n. 3, de uma ou mais lesões. Cada fragmento foi transportado em frascos separados, contendo 5ml dos seguintes meios: a) solução de NaCl 0,9% (SF); b) caldo Sabouraud (CS) com cloranfenicol 0,2%; c) CS com cloranfenicol 2%; e d) CS com gentamicina 0,1% + penicilina G 100U/ml. Análise das primeiras 52 biópsias transportadas em CS com diferentes antibióticos não demonstrou diferença na taxa de contaminação por bactérias; as biópsias subsequentes foram, então, transportadas apenas em CS com cloranfenicol 0,2% ou SF.

Após as biópsias, dois intervalos foram escolhidos para a inoculação definitiva, em tubos com ágar Sabouraud e cloranfenicol 0,2%: a) precoce: de 48 a 72 horas e b) tardio: mais de 72 horas até sete dias, compondo, assim quatro grupos de estudo: SF precoce, CS precoce, SF tardio e CS tardio. Cada biópsia foi dividida em três ou quatro fragmentos que foram inoculados no mesmo tubo. As culturas foram observadas durante até 60 dias. Os fungos isolados foram identificados por técnicas morfológicas e fisiológicas. As 52 biópsias iniciais, colhidas em CS com diferentes anti-

bióticos, foram agrupadas e consideradas grupo CS único. Para cada paciente, em cada grupo de estudo, calculou-se a taxa de isolamento dividindo o número de tubos positivos para o agente patogênico pelo número de tubos inoculados e multiplicando por 100. Em três casos tardios, em que apenas um dado era falto, considerou-se a taxa de isolamento 0 (zero) se o meio de transporte fosse SF e 100% se fosse CS, supondo que a viabilidade seria pior em SF e garantida em CS.

Para as análises estatísticas, foram utilizados o teste de Wilcoxon para a comparação das medianas entre dois grupos pareados e o teste de Friedman (teste não paramétrico para múltiplas amostras pareadas) para testar a hipótese nula de não diferença das medianas das taxas de isolamento entre os quatro grupos de estudo.

## RESULTADOS

Os números de biópsias por grupo de doenças foram: esporotricose (116), paracoccidioidomicose (89), histoplasmose (quatro), cromomicose (três), leishmaniose (44) e outras não infecciosas (22). As amostras de cromomicose foram inoculadas após 48 horas, e do caso de histoplasmose após 72 horas e sete dias. Os valores para o cálculo das taxas de isolamento dos casos de esporotricose (ES) e paracoccidioidomicose (PB) encontram-se nas tabelas 1 e 2, respectivamente. As medianas das taxas de isolamento dos casos de ES nos quatro grupos de estudo foram 100% ( $p=0,16$ ). Nos casos de PB as medianas foram: SF precoce=84%; CS precoce=50%; SF tardio=64% e CS tardio=84% ( $p=0,88$ ). Não houve diferença significativa entre as medianas das taxas de isolamento entre os grupos de estudo em ambas as doenças. As taxas de isolamento entre os grupos SF precoce e CS precoce, de ambas as doenças, também não foram significativamente diferentes ( $p=0,71$  para ES e  $p=0,37$  para PB). Obteve-se isolamento positivo em todos os inóculos dos casos de cromomicose e histoplasmose, independente do meio de transporte ou do intervalo de inoculação.

As taxas de contaminação por bactérias, leveduras e fungos filamentosos, segundo o meio de transporte SF ou CS, nessa ordem, foram 3,9% e 2,7%; 1,6% e 4,7%; 2,3% e 3,3%. Houve crescimento de contaminantes em 12 das 66 biópsias (18%) de doenças não fúngicas (especificidade=82%) e em 14 dos 57 (25%) inóculos das biópsias de doenças fúngicas, dos quais não se isolou o agente patogênico.

## DISCUSSÃO

Não existem estudos investigando o efeito do meio de transporte e da inoculação tardia de biópsias

TABELA 1: Taxas de isolamento (a/b) dos casos de esporotricose distribuídos nos grupos de estudo

Paciente	48 - 72 horas ¶		>72 horas - 7 dias ¶		Total
	SF	CS	SF	CS	
1	0/2	2/6	0/1	3/3	5/12
2	1/1	1/3	*	2/2	4/6
3	1/1	3/3	1/1	4/4	9/9
4	1/1	3/3	0/1	2/3	6/8
5	1/1	3/3	4/4	3/3	11/11
6	1/1	1/1	1/1	1/1	4/4
7	2/2	2/2	9/9	5/5	18/18
8	0/2	1/2	2/2	1/2	4/8
9	1/1	1/1	1/1	1/1	4/4
10	3/4	0/4	1/3	*	4/11
11	2/2	2/2	2/3	2/2	8/9
12	1/1	1/1	2/2	1/1	5/5
13	1/1	1/1	1/1	1/1	4/4
14	0/2	1/1	2/3	1/1	4/7
<b>Total</b>	<b>15/22</b>	<b>22/33</b>	<b>21/32</b>	<b>27/29</b>	<b>85/116</b>

a: número de tubos positivos para o agente patogênico; b: número de tubos inoculados; \*: valores faltosos; ¶: intervalo entre a biópsia e cultivo; SF: solução de NaCl 0,9%; CS: caldo Sabouraud com cloranfenicol 0,2%

teciduais. Houve sempre a impressão de que as células fúngicas no tecido tornar-se-iam inviáveis para cultura, dependendo do tempo decorrido entre a coleta e a inoculação definitiva em condições ideais de cultivo. O presente estudo, porém, demonstrou que as células fúngicas se mantêm viáveis até sete dias depois de coletadas, à temperatura ambiente, mesmo se transportadas em SF sem a adição de antibióticos. Na

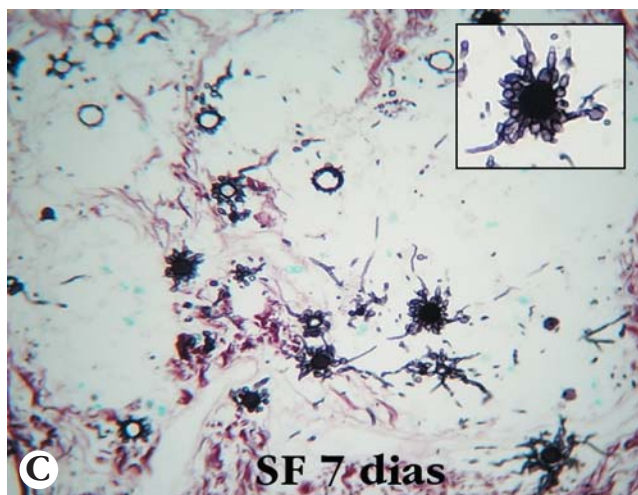
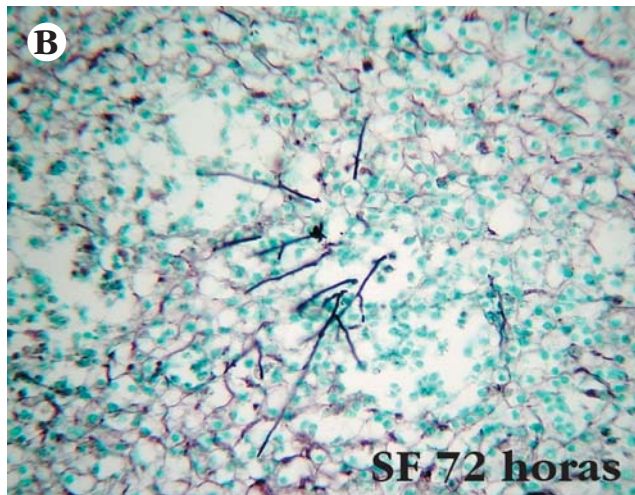
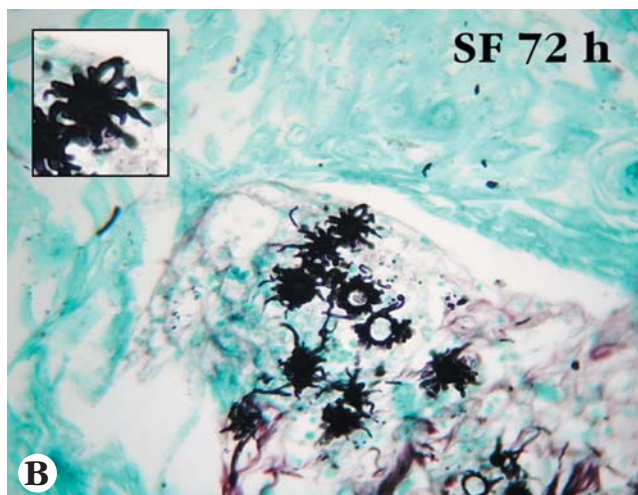
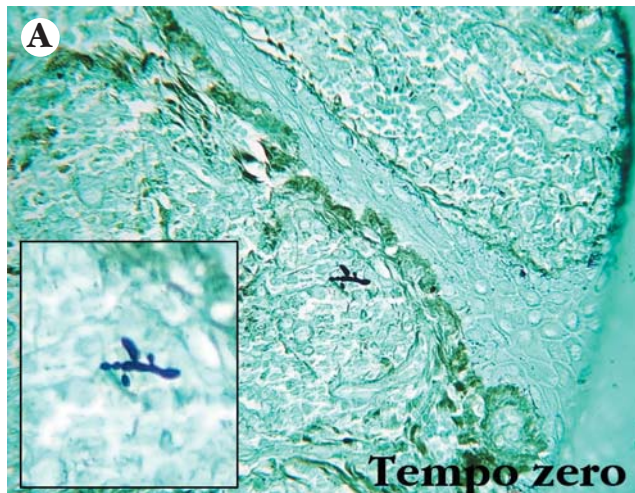
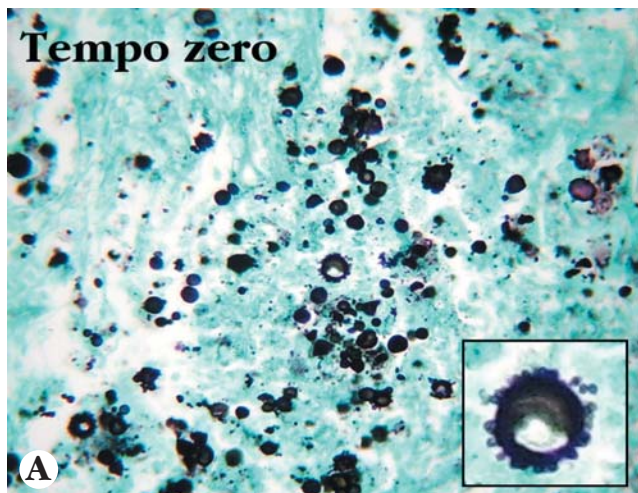
verdade, pôde-se demonstrar que o fenômeno de dimorfismo térmico já ocorre, na intimidade do tecido, durante o transporte em SF e que os fungos utilizam os componentes teciduais como matéria-prima para seu desenvolvimento (Figuras 1 e 2). A proliferação bacteriana, sempre existente, não prejudicou o isolamento, posto que o meio definitivo continha elementos antibacterianos.

TABELA 2: Taxas de isolamento (a/b) dos casos de paracoccidioomicose distribuídos nos grupos de estudo

Paciente	48 - 72 horas ¶		>72 horas - 7 dias ¶		Total
	SF	CS	SF	CS	
1	2/3	3/6	1/2	1/3	7/14
2	1/1	3/3	*	*	4/4
3	0/2	0/5	0/1	*	0/8
4	0/1	0/1	3/3	1/2	4/7
5	3/3	1/2	2/2	0/2	6/9
6	1/1	1/1	*	*	2/2
7	0/2	0/2	1/2	1/2	2/8
8	2/2	2/2	3/5	2/3	9/12
9	3/3	2/2	4/4	2/2	11/11
10	1/1	1/1	2/3	1/1	5/6
11	0/1	1/1	0/1	1/1	2/4
12	1/1	0/1	1/1	1/1	3/4
<b>Total</b>	<b>14/21</b>	<b>14/27</b>	<b>17/24</b>	<b>10/17</b>	<b>55/89</b>

a: número de tubos positivos para o agente patogênico; b: número de tubos inoculados; \*: valores faltosos; ¶: intervalo entre a biópsia e cultivo; SF: solução de NaCl 0,9%; CS: caldo Sabouraud com cloranfenicol 0,2%





**FIGURA 1:** Biópsias de pele de paciente com paracoccidioidomicose fixadas em formol, imediatamente após a coleta ou após diferentes tempos de transporte em solução aquosa de NaCl 0,9%. **A.** No tempo zero, apenas formas de levedura com brotamentos múltiplos; **B.** Após 72 horas, formação de filamentos periféricos, diretamente da levedura mãe, formando imagens em "cabeça de medusa"; **C.** Após sete dias, hifas livres e septadas (coloração: GMS; aumento original 400x)

**FIGURA 2:** Biópsias de pele de paciente com esporotricose fixadas em formol, imediatamente após a coleta ou após transporte em solução aquosa de NaCl 0,9%. **A.** No tempo zero, estruturas leveduriformes com brotamentos concatenados e laterais; **B.** Após 72 horas, múltiplas hifas (coloração: GMS; aumento original 400x)

Para otimizar os resultados, minimizando o problema dos contaminantes fúngicos, a inoculação definitiva em meio Sabouraud com cicloeximida deve ser acrescentada na rotina do laboratório. O líquido do meio de transporte poderia ainda ser centrifugado, e o sedimento inoculado em outros meios de cultura enriquecidos ou específicos para alguns patógenos. Em todos os casos em que o fungo patogênico foi isolado do tecido, o mesmo sucedeu com o sedimento (dados não mostrados), uma vez que formas fúngicas, livres em suspensão em SF, permanecem viáveis (Figura 3), quando analisadas por coloração vital.<sup>4</sup>

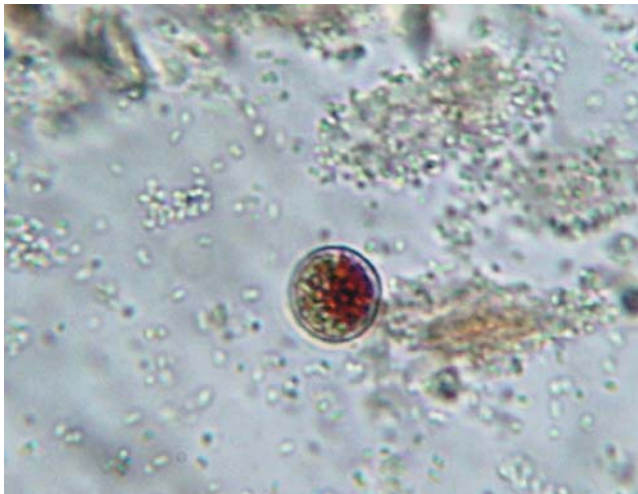


FIGURA 3: Forma em levedura de *Paracoccidioides brasiliensis*, livre na suspensão após 72 horas de transporte em solução aquosa de NaCl 0,9%. Viabilidade demonstrada pela coloração vital pelo vermelho neutro. Células vivas captam o corante, concentrando-o por transporte ativo, nos vacúolos intracitoplasmáticos

## CONCLUSÃO

Validou-se, assim, a possibilidade de remeter biópsias de pele para cultura de fungos em CS ou SF, com intervalo entre a coleta e a inoculação de até sete dias, para o isolamento de *S. schenkii* e *P. brasiliensis*. Considera-se importante ampliar o estudo para outros fungos oportunistas. □

## REFERÊNCIAS

1. Wilson ML. General principles of specimen collection and transport. *Clin Infect Dis*. 1996;22:766-77.
2. Denning DW, Kibbler CC, Barnes RA, British Society for Medical Mycology. British Society for Medical Mycology proposed standard of care for patients with invasive fungal infections. *Lancet Infect Dis*. 2003;3:230-40.
3. Hariri AR, Hempel HO, Kimberlin CL, Goodman NL. Effects of time lapse between sputum collection and culturing on isolation of clinically significant fungi. *J Clin Microbiol*. 1982;15:425-8.
4. Naka W, Hanyaku H, Tajima S, Harada T, Nishikawa T. Application of neutral red staining for evaluation of the viability of dermatophytes and *Candida* in human skin scales. *J Med Vet Mycol*. 1994;32:31-5.

---

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA / MAILING ADDRESS:

Rafael Taglialegna

Rua Paula Dias, 44

37120-000 - Paraguaçu - MG

Tel./Fax: (35) 32671680 (35) 32671680

E-mail: rafaeltaglialegna@bandasul.com.br

Como citar este artigo / *How to cite this article*: Taglialegna R, Lopes CMP, Fiorini JE, Maffei CML. Influência do tempo e do meio de transporte no isolamento de fungos patogênicos de biópsias de pele. *An Bras Dermatol*. 2008;83(2):131-5.