



FURG

Vittalle

ISSN 2177-7853

Reprodutibilidade de distintas técnicas associadas à filtração na padronização de inóculo de conídios de *Aspergillus fumigatus*

Rubens Caurio Lobato*, Gabriel Baracy Klafke, Melissa Orzechowski Xavier

Laboratório de Micologia – Faculdade de Medicina – Universidade Federal de Rio Grande - FURG

RESUMO

Histórico do Artigo

Recebido em: 08/10/2016

Aceito em: 01/11/2016

Palavras-chave

Aspergillus

Espectrofotômetro

Mc Farland

Filtração

O objetivo deste estudo foi testar a reprodutibilidade de distintos métodos de padronização de inóculo de *Aspergillus fumigatus*. Foram utilizadas colônias jovens de *A. fumigatus* (AF 294) subcultivadas em Agar batata (PDA) por cinco dias a 37°C. A suspensão foi produzida adicionando-se 10 ml de solução salina estéril acrescida de Tween 20® e padronizada em escala 0.5 de Mc Farland e Espectrofotometria. Foi realizada a filtração por filtro Millipore® 5µm como etapa acessória. A confirmação da concentração do inóculo foi realizada através de Spread plate e contagem de conídios em hemocitômetro. Cada experimento foi repetido por cinco vezes. Na padronização por Mc Farland, o valor médio da contagem de conídios foi superior (8,95x10⁴ Con./ml; DP±4,9) ao encontrado após filtração (5,84 x10⁴Con./ml; DP±0,89). Os valores médios de UFC foram mais altos na suspensão não filtrada (96 x10³UFC/ml;DP±7,33), frente à filtrada (40x10³ UFC/ml; DP±3,32). Na Espectrofotometria, os valores de conídios não diferiram entre a suspensão filtrada (0,35; DP±0,14) e não filtrada (0,3; DP±0,11). Valores de UFC menores foram observados nas suspensões não filtradas (1,5x10³UFC/ml; DP±1,41), comparando-se às filtradas (6,1x10³UFC/ml DP±4,13). A espectrofotometria apresenta maior confiabilidade e a filtração auxiliou na obtenção de suspensões exclusivamente conidiais.

Reproducibility of different filtration techniques associated with the standardized inoculum of *Aspergillus fumigatus*

Keywords

Aspergillus,

Spectrophotometer

Mc Farland

Filtration.

ABSTRACT - The aim of the study was to test the reproducibility of different methods of *Aspergillus fumigatus* standarization inocula. Young colonies of *A. fumigatus* (AF 294) was used and subcultured on potato agar (PDA) for five days at 37 ° C. The suspension was produced by adding 10 ml of sterile saline plus Tween 20®. The suspension was standardized on a scale of 0.5 Mc Farland and Spectrometry in both techniques was tested prior to filtration Millipore® filter 5µm as accessory technique. Confirmation of the inoculum concentration was performed by Spread plate and conidia count by hemocytometer. Each experiment was repeated five times. In counting the conidia in Mc Farland, the average was higher (8,95x10⁴ Con./ml; SD±4,9) compared with the filtration (5,84 x10⁴Con./ml; SD±0,89). The average values of UFC in Spectrophotometry were higher in unfiltered suspension (96 x10³UFC/ml;SD±7,33), compared to filtered (40x10³ UFC/ml; DP±3,32). In the values tested did not differ between the suspension filtered (0,35; SD±0,14) and unfiltered (0,3; SD±0,11). UFC values lower in unfiltered (1,5x10³UFC/ml; SD±1,41), compared to the filtered (6,1x10³UFC/ml SD±4,13). To standardize inocula of *A. fumigatus* conidia, spectrophotometry offers greater reliability, and filtration helps to ensure the attainment of conidial suspensions exclusively.

1. Introdução

Doenças fúngicas tornaram-se um foco importante de diversos estudos nos últimos anos com o aumento de casos, em especial das micoses oportunistas, comumente associadas a pacientes imunocomprometidos. Estas enfermidades são um grave problema de saúde, devido ao fato de promoverem altas taxas de mortalidade, frequentemente relacionadas à

dificuldade diagnóstica e, conseqüentemente, tratamento tardio e prognóstico desfavorável (1-3).

Dentre as doenças fúngicas oportunistas, a Aspergilose Invasiva (AI) tem se destacado devido a sua alta ocorrência e a dificuldade de diagnóstico por métodos tradicionais em Micologia Médica. A morbidade causada pela AI está intrinsecamente relacionada a quadros de neutropenia grave e/ou prolongada (1,2,4).

Em adição à dificuldade terapêutica da AI relacionada ao diagnóstico tardio, inúmeros estudos *in vitro* de susceptibilidade fúngica vem demonstrando resistência de isolados clínicos de *A. fumigatus* a diversos antifúngicos, inclusive aqueles indicados como fármacos de eleição no tratamento da AI, como voriconazol e anfotericina B (5-7). Tais testes de suscetibilidade são realizados de acordo com protocolos internacionalmente aceitos, elaborados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (5).

Entretanto, uma das dificuldades frequentemente descritas nos ensaios com fungos filamentosos está na padronização do inóculo fúngico, no que tange a produção de suspensões com concentrações definidas de conídios para garantir a confiabilidade e a reprodutibilidade de resultados. Isto se deve ao fato de que os fungos filamentosos são multicelulares e apresentam distintas características nas suas estruturas vegetativas e especialmente nas estruturas reprodutivas, determinadas por coloração variada, hifas de distintos diâmetros e septação, células conidiogênicas de diferentes formatos, tamanho e peso, além de diferenças de hidrofobicidade (8).

Segundo Araújo e colaboradores (8) a padronização de inóculos de fungos filamentosos apresenta restrições de método devido à especificidade de sua estrutura morfológica que, associada à diversidade de formas, estruturas reprodutivas, vegetativas, tamanho e dimensões, bem como da coloração, fatores estes que afetam a quantificação da densidade de inóculo, tanto em métodos visuais, bem como de técnicas espectrofotométricas. Além disso, estas estruturas podem conduzir a erros de diluição devido à sedimentação rápida em altas densidades.

De acordo com este panorama, este estudo tem como objetivo testar a reprodutibilidade de distintos métodos de padronização de inóculo de conídios de *A. fumigatus*, com e sem a utilização da filtração como uma etapa na padronização das suspensões fúngicas.

2. Material e métodos

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Micologia Médica, da Área Interdisciplinar de Ciências Biomédicas da Faculdade de Medicina (FAMED) da Universidade Federal do Rio Grande –FURG, durante o período de Outubro de 2011 à Janeiro de 2012.

A cepa utilizada para os experimentos de padronização do inóculo consistiu em uma cepa padrão de *A. fumigatus* (AF-294) a qual se encontra estocada na micoteca do Lab. de Micologia da FAMED-FURG.

Inicialmente esta cepa foi subcultivada em tubos de ensaio contendo ágar batata-dextrose por três dias a 37°C para obtenção de colônias jovens. Após este período, foram adicionados 10 ml de solução salina estéril (0,85%) acrescida de 1% de Tween 20, e realizada uma raspagem da superfície das colônias com auxílio de pipeta estéril para obtenção da suspensão com propágulos fúngicos. Esta suspensão foi transferida para tubo cônico estéril e após cinco minutos, tempo necessário para deposição das partículas mais pesadas, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e denominado de suspensão-mãe, sendo utilizado para padronização do inóculo por duas técnicas distintas: escala de McFarland e espectrofotometria.

A padronização por escala de McFarland foi realizada ajustando a turbidez da suspensão-

mãe com equivalência ao padrão de inóculo 0,5 de Mc Farland utilizando solução salina estéril para a diluição necessária. Enquanto que para padronização pela técnica de leitura espectrofotométrica a suspensão-mãe de *A. fumigatus* foi igualmente diluída e sua concentração ajustada em espectrofotômetro (530nm em 80 a 82% de transmitância; 0,09 a 0,11 de absorvância), sendo posteriormente submetida a uma diluição de 1:50 em solução salina estéril de acordo com protocolo descrito pelo CLSI (5).

Ambas as técnicas foram igualmente realizadas com a padronização do inóculo após filtração da suspensão-mãe com filtros Millipore® de malha de 5µm, para retenção de fragmentos de hifas e conídios em cadeia, permitindo a padronização somente com células conidiais isoladas.

A confirmação da concentração do inóculo obtido pelas distintas técnicas foi realizada pela técnica de “*Spread Plate*” e por contagem de conídios em hemocitômetro. Resumidamente, as suspensões foram submetidas a sete diluições seriadas de 1:10 em solução salina estéril e após homogeneização, uma alíquota de 100 µL de cada diluição foi semeada em duplicata por espalhamento em placas de Petri contendo Ágar Sabouraud com auxílio de alça de Digralski, as quais foram incubadas a 30°C por 72 horas para determinação do número de unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL). Concomitantemente, foi realizada a contagem de conídios dispondo 10 µl de cada diluição em câmara de Neubauer e observando ao microscópio óptico. Foi avaliada também a presença de fragmentos de hifas e/ou de conídios em cadeia, buscando comparar estes dados entre os inóculos padronizados com e sem filtração prévia por filtro Milipore® 5µm.

Para avaliar a reprodutibilidade dos métodos de padronização de inóculo, todos os experimentos foram repetidos cinco vezes para cada tipo de método, com e sem filtração prévia da suspensão-mãe. A análise de dados foi realizada através da confecção de tabelas de contingência dos valores representativos às contagens de conídios e UFC's das suspensões filtrada e não filtrada. Para avaliação da reprodutibilidade, os resultados das repetições dos experimentos foram expressos em média, desvio-padrão, máximo e mínimo e a significância estatística das diferenças entre as suspensões filtradas e não filtradas foi calculada através do Teste de Wilcoxon intervalo de confiança de 95% e $\alpha = 0,05$.

3. Resultados

A contagem de conídios por hemocitômetro da padronização do inóculo de *A. fumigatus* pela técnica de Mc Farland resultou em valores variando de $2,75 \times 10^6$ a $12,5 \times 10^6$ Con./ml, com média de $8,95 \times 10^6$ Con./ml (DP±4,9). Este valor médio foi superior ao encontrado quando se utilizou a mesma técnica associada à filtração, cujo valor médio foi de $5,84 \times 10^6$ Con./ml (DP±0,89). Após a utilização do filtro, os valores foram mais homogêneos entre as repetições, variando de $4,25 \times 10^6$ a $6,25 \times 10^6$ Con./ml. Não houve diferença significativa ao compararem-se os valores das suspensões filtrada e não filtrada (Tabela 1).

Em relação à quantidade de UFC do inóculo padronizado por escala de Mc Farland, valores médios mais altos também foram encontrados na suspensão não filtrada frente à filtrada, sendo a média de 96×10^3 UFC/ml e de 40×10^3 UFC/ml, respectivamente. Da mesma forma, a variação dos valores foi maior entre as repetições das suspensões não filtradas, com valores entre 30×10^3 a 200×10^3 UFC/ml (DP±7,33), sendo significativamente maior a homogeneidade das repetições encontradas nas suspensões submetidas à filtração prévia, as quais oscilaram em valores entre 10×10^3 e 90×10^3 UFC/ml (DP±3,32) (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados da padronização do inóculo de *A. fumigatus* por escala de Mc Farland com e sem filtração prévia da suspensão.

Mc Farland	Não filtrado	Filtrado	p valor
(Con. / ml)			
Intervalo	2,75 x10 ⁶ - 12,5x10 ⁶	4,25x10 ⁶ - 6,25x10 ⁶	0,27
Média	8,95x10 ⁶	5,84 x10 ⁶	
Desvio Padrão	±4,9	±0,89	
(UFC / ml)			
Intervalo	30x10 ³ - 200x10 ³	10x10 ³ - 90x10 ³	0,04
Média	96x10 ³	40x10 ³	
Desvio Padrão	±7,33	±3,32	

No que diz respeito à padronização em espectrofotometria, os valores mínimos e máximos de conídios não diferiram entre as suspensões filtrada (0,25 x10⁶ - 0,5x10⁶ Con./ml) e não filtrada (0,25x10⁶ - 0,5x10⁶ Con./ml). Os valores médios das contagens de conídios foram semelhantes nas repetições referentes às suspensões sem filtração prévia (X=0,35 Con./ml; DP±0,14) e com filtração (X=0,3 Con./ml; DP±0,11). Não houve diferença significativa ao compararem-se os valores das suspensões filtrada e não filtrada (Tabela 2).

Utilizando este mesmo método de padronização, os valores de UFC variaram de 15x10² a 59x10² UFC/ml nas suspensões não filtradas, e de 16x10² a 79,5x10² UFC/ml nas filtradas. O valor médio das repetições sem a utilização prévia de filtração na padronização do inóculo por espectrofotômetro foi menor (x=24,9x10² UFC/ml; DP±19,2) do que o obtido após filtração (x=49,5x10² UFC/ml DP±30,4). Ao compararem-se os valores das suspensões filtrada e não filtrada, observou-se diferença significativa entre os grupos (p < 0,05) (Tabela 2).

A presença de fragmentos de hifas e conídios em cadeia pôde ser detectada a partir da análise por hemocitômetro somente nas padronizações sem filtração prévia, ocorrendo em 60% das repetições (3/5) quando utilizada a padronização por escala de Mc Farland, e em 20% das repetições (1/5) na padronização por Espectrofotometria.

Tabela 2. Resultados da padronização do inóculo de *A. fumigatus* por Espectrofotometria com e sem filtração prévia da suspensão.

Espectrofotômetro	Não filtrado	Filtrado	p valor
(Concentração por ml)			
Intervalo	0,25x10 ⁶ - 0,5x10 ⁶	0,25 x10 ⁶ - 0,5x10 ⁶	0,31
Média	0,35x10 ⁶	0,3x10 ⁶	
Desvio Padrão	±0,14	±0,11	
(UFC / ml)			
Intervalo	15x10 ² - 59x10 ²	16x10 ² - 79,5x10 ²	0,04
Média	24,9x10 ²	49,5x10 ²	
Desvio Padrão	±19,2	±30,4	

4. Discussão

Os métodos para padronização de inóculo utilizados para bactérias e leveduras não demonstram reprodutibilidade, de acordo com a prática laboratorial, quando utilizados para fungos filamentosos, necessitando-se assim a padronização de métodos que possam ser facilmente executados na rotina diagnóstica. Estes procedimentos são, via de regra, fundamentais para ensaios laboratoriais, como a pesquisa de susceptibilidade a antifúngicos em Micologia Médica e testes sobre taxa de germinação de conídios (6,8,9).

O preparo de inóculo de *A. fumigatus* apresenta, além das dificuldades apresentadas anteriormente, a alta hidrofobicidade capacidade que impede uma homogeneização efetiva da diluição, promovendo erros sistemáticos ao longo de diluições seriadas, reduzindo ou aumentando a concentração dos conídios nas suspensões (8,10). Tal fato demonstra a necessidade da utilização de substâncias surfactantes, como Tween 20 utilizado em nosso estudo, que permitam a redução da tensão superficial, melhorando o desempenho da técnica, demonstrando a efetividade na redução da tensão superficial conídio-solvente, facilitando sua padronização.

De acordo com Araújo e colaboradores (8), a padronização de inóculos de fungos filamentosos por escala de Mc Farland apresenta boa correlação com hemocítmetro e contagem de UFC, no entanto não se caracteriza por uma técnica precisa sendo sua confiabilidade dependente de fatores subjetivos, como treinamento do observador, fato que onera o trabalho laboratorial e agrega incertezas ao método. Os resultados obtidos neste estudo corroboram tal afirmativa, pois, os valores médios obtidos (filtrado e não filtrado) em Mc Farland (40×10^3 UFC/ml e 96×10^3 UFC/ml) apresentam-se inversamente proporcionais daqueles obtidos através de espectrofotometria ($49,5 \times 10^2$ UFC/ml e $24,9 \times 10^2$ UFC/ml) a qual é considerada padrão para este tipo de padronização.

Neste estudo, suspensões padronizadas através da escala de Mc Farland, onde a filtração foi utilizada como técnica acessória de padronização demonstraram menor oscilação dos resultados ($DP \pm 0,89$) em comparação àquelas não filtradas ($DP \pm 4,9$). Tais dados demonstram a importância da filtração associada à técnica de padronização de inóculo, como já descrito por Santos e cols.(11) que realizaram a padronização de inóculos fúngicos associados à filtração para a exclusão de fragmentos de hifas e obtiveram resultados de crescimento fúngico mais homogêneo.

A retenção de propágulos fúngicos maiores que $5 \mu\text{m}$ (cadeia de conídios e fragmentos de hifas) culmina na obtenção de inóculos cuja concentração refere-se somente a conídios isolados, os quais apresentam menor densidade/peso molecular (11), obtendo-se a absorbância necessária com maior quantidade de células conidiais, resultando em um maior número de UFC como resultado final. Vale ressaltar que, neste estudo, confirmou-se este resultado quando se utilizou a técnica espectrofotométrica associada à filtração com o aumento no número final de UFC, quando comparada às contagens sem filtração.

Os valores de UFC/ml encontrados na padronização pela técnica de espectrofotometria neste estudo foram inferiores aos descritos por outros autores (8,10,12). Em adição, os resultados desta padronização mantiveram-se próximos ao intervalo estabelecido pelo CLSI (3) somente quando utilizada a filtração prévia ($0,8-10 \times 10^4$ UFC/ml), propondo-se que a filtração da suspensão consiste em uma etapa favorável à qualidade na produção de suspensões de conídios em *A. fumigatus*.

5. Conclusão

De acordo com os ensaios realizados, a padronização de inóculo de suspensões de conídios de *A. fumigatus* por espectrofotometria apresentou maior confiabilidade ao

apresentar um menor desvio-padrão entre as repetições. A filtração demonstrou ser um método seguro para se garantir a produção de inóculos fúngicos, para *A. fumigatus*, essencialmente constituídos por conídios, fato que sugere maior qualidade deste método de padronização para que possa ser instituído durante ensaios micológicos.

Agradecimentos: Ao Dr. Gabriel Baracy Klafke; a Biol. Cristiane Rodrigues pelo auxílio técnico e experimental.

Conflito de interesses: Os autores declaram não haver conflito de interesses

Referências

1. Pasqualotto AC, Xavier MO, Sanchez LB et al. Diagnosis of Invasive Aspergillosis in Lung Transplant Recipients by Detection of Galactomannan in the Bronchoalveolar Lavage Fluid. *Transplantation* 2010; 90: 306–11.
2. Pagano L, Caira M, Nosari A *et al.* Fungal infections in recipients of hematopoietic stem cell transplants: results of the SEIFEM B-2004 study – Sorveglianza Epidemiologica Infezioni Fungine Nelle Emopatie Maligne. *Clin. Infect. Dis.* 2007; 45:1161-70.
3. Chamilos G, Luna M, Lewis RE et al. Invasive fungal infections in patients with hematologic malignancies in a tertiary care cancer center: an autopsy study over a 15-year period (1989-2003). *Haema.* 2006; 91(7): 986-9.
4. Xavier MO, Pasqualotto AC. Galactomanana no diagnóstico de aspergilose invasiva. *Rev. Bras. Oncol. Clín.* 2011; 07: 41-50.
5. CLSI. Método de Referência para testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Fungos Filamentosos à Terapia Antifúngica: Norma Aprovada M38-A. 2ªed. 2002.
6. Schmalreck A, Willinger B, Czaika V, Fegeler W, Becker K, Blum G, Lass-Flörl C. Susceptibility Screening of Hyphae-Forming Fungi with a New, Easy, and Fast Inoculum Preparation Method. *Mycopathologia* 2012; 180:01-08.
7. Rodriguez-tudela JL, Chryssanthou E, Petrikkou E, Mosquera J, Denning DW, Cuenca-Estrella M. Interlaboratory Evaluation of Hemacytometer Method of Inoculum Preparation for Testing Antifungal Susceptibilities of Filamentous Fungi. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(11):5236-5237.
8. Araújo R, Rodrigues AG, Pina-Vaz C. A fast, practical and reproducible procedure for the standarization of the cell density of an *Aspergillus* suspension. *J. Med. Microbiol.* 2004; 53: 783-86.
9. Hadrich I, Makni F, Neji S, Abbes S, Cheikhrouhou F, Trabelsi H, Sellami H, Ayadi A. Invasive Aspergillosis: Resistance to Antifungal Drugs. *Mycopathologia* 2012; 174:131–141.
10. Petrikkou E, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Gomez A, Molleja A, Mellado E. Inoculum standardization for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi pathogenic for humans. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39, 1345–1347.
11. Santos DA, Barros MES, Hamdan JS. Establishing a Method of Inoculum Preparation for Susceptibility Testing of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(1): 98-101.
12. Espinel-Ingroff A, Kerkering TM. Spectrophotometric method of inoculum preparation for the *in vitro* susceptibility testing of filamentous fungi. *J. Clin. Microbiol.* 1991; 29, 393–394.