

Método espectrofotométrico en la preparación del inóculo de hongos dematiáceos

Julman Rosiris Cermeño Vivas¹ y Josep M^a Torres Rodríguez²

¹Departamento de Parasitología y Microbiología, Escuela de Medicina, Universidad de Oriente, Ciudad Bolívar, Bolívar, Venezuela y ²Grup de Recerca en Micologia Experimental i Clínica (GREMEC), Institut Municipal de l'Investigació Mèdica (IMIM), Barcelona, España

Resumen

Con el objetivo de obtener un método estandarizado y reproducible en la preparación del inóculo para las pruebas de sensibilidad *in vitro* de hongos dematiáceos, suspensiones homogéneas de 52 aislados de hongos productores de micetomas, feohifomicosis y cromomicosis se ajustaron mediante espectrofotometría a dos longitudes de ondas: 530 y 550 nm a 40 y 50% T, obteniéndose una suspensión estandarizada del inóculo de $1-5 \times 10^6$ UFC/ml. Este inóculo fue verificado mediante cuantificación por cultivos en placas de agar glucosado de Sabouraud (UFC/ml). El inóculo así preparado y estandarizado mostró muy poca variabilidad en todos los aislados estudiados. Este método puede ser de utilidad para evaluar la sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos en hongos dematiáceos.

Palabras clave

Hongos dematiáceos, inóculo, estandarización, concentraciones inhibitorias mínimas, E-test

Spectrophotometric method for preparing the inocula of dematiaceous fungi

Summary

The aim of this study was to adapt a spectrophotometric method for preparing the inocula of dematiaceous fungi used for *in vitro* susceptibility tests. Fifty-two isolates of 17 different species of dematiaceous fungi were used for this purpose. Homogeneous suspensions of conidia and hyphae of these isolates were obtained and adjusted for reading at 530 and 550 nm at 40% and 50% of transmittance. The suspensions were standardised to $1-5 \times 10^6$ CFU/ml. Quality controls of the inocula were done by quantitative cultures on agar-Sabouraud plates. The inocula obtained by spectrophotometry showed little variability within all the isolates. This method can be useful for *in vitro* antifungal evaluation of dematiaceous fungi.

Key words

Dematiaceous fungi, inocula, standardisation, minimal inhibitory concentration, E-test

Las enfermedades causadas por hongos dematiáceos incluyen al micetoma eumicótico, la cromomicosis y la feohifomicosis. La formación de gránulos en el tejido subcutáneo por hongos causales es un signo diagnóstico de micetoma, análogamente, la producción de cuerpos escleróticos es diagnóstico de cromomicosis [1-3]. La feohifomicosis, por otra parte, comprende a un grupo heterogéneo de infecciones que van desde superficiales (cutáneas y subcutáneas) hasta sistémicas y son causadas por más de 100 especies de diversos hongos dematiáceos [1,4,5].

Estas enfermedades son cosmopolitas y, aunque son más frecuentemente observadas en áreas tropicales y subtropicales, también se han encontrado casos autóctonos en zonas templadas como Buenos Aires (Argentina) y

Nueva Inglaterra (USA) y en regiones frías como Finlandia y Rusia. Se han descrito casos en México, Pakistán, China, El Salvador e India, siendo Brasil el país con mayor incidencia de la infección [1-3,6].

La cromomicosis tiene alta incidencia en Venezuela, particularmente en el área rural de la región noroccidental del país que comprende los Estados Falcón, Lara y Zulia. *Cladophialophora carrionii* ha sido identificado como el agente causal más frecuente que causa esta enfermedad [7-12]. Actualmente, se ha observado un incremento de estas infecciones en pacientes inmunodeprimidos especialmente en pacientes con sida y en pacientes presumiblemente sanos [13-19].

Uno de los antifúngicos más empleados en el tratamiento de afecciones por hongos dematiáceos es la 5-fluorocitosina (5-FC). Aunque se ha descrito que en algunos casos las lesiones involucionan rápidamente, pueden ocurrir recidivas y en los tratamientos prolongados es frecuente observar la aparición de resistencias secundarias. Por ello no se aconseja usar esta droga como monoterapia, sino asociada a otros antifúngicos. En los últimos años se ha utilizado, con buena respuesta, la combinación de itraconazol y 5FC, durante 6 meses. Tanto la evolución clínica del paciente como la tolerancia a ambos fármacos resultan muy alentadoras [4,6,11,12,20].

Dirección para correspondencia:

Dra. Julman Rosiris Cermeño Vivas
Departamento Parasitología y Microbiología, Escuela de Medicina, Universidad de Oriente, Av. José Mendez, Ciudad Bolívar, 8001 Edo. Bolívar, Venezuela.
Tel/Fax: +58-85-22126

Aceptado para publicación el 19 de mayo de 1998

La gran variedad de especies causales de estas infecciones y su diferente respuesta a los antifúngicos, aconsejan la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) a los antibióticos ya que el tratamiento en muchos casos es difícil, siendo variable el grado de éxito [9,11,13-22]. Para ello, es prioritaria la estandarización del inóculo para las pruebas de sensibilidad *in vitro*.

El National Committee for Clinical Laboratory Standards Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (NCCLS) ha evaluado diferentes métodos de preparación del inóculo especialmente para levaduras [21-24]. El Comité recomienda el método espectrofotométrico como el procedimiento con menor variabilidad de resultados para el estudio de levaduras y que produce la mejor reproducibilidad en cada laboratorio y también entre distintos laboratorios. Esta evaluación ha sido corroborada en estudios posteriores [22,25,26].

El objetivo del presente estudio es adaptar este método de referencia para hongos filamentosos, dematiáceos, con la intención de realizar estudios de sensibilidad *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas empleadas. Se estudiaron 17 especies de hongos dematiáceos, con un total de 52 cepas, de las cuales 22 fueron aislados de pacientes con micetomas, feohiomicosis y cromomicosis de Venezuela y Brasil. Estas cepas fueron aportadas por la Universidad Experimental Nacional Francisco de Miranda, Coro-Venezuela, de la Cátedra de Micología de la Universidad Central de Venezuela y del Hospital de Clínicas de la Universidad Federal Do Paraná (Brasil). Las treinta restantes fueron aisladas de la naturaleza y proporcionadas por el Laboratorio de Micología del Instituto Municipal de Investigación Médica (IMIM) (Barcelona) y por la Sección de Micología del Instituto de Higiene, Facultad de Medicina (Montevideo-Uruguay).

La distribución por especies de los 52 aislados estudiados fue la siguiente: *Cladophialophora carrionii* (n=9), *Cladophialophora trichoides* (n=1), *Cladosporium cladosporioides* (n=1), *Cladosporium herbarum* (n=1), *Cladosporium sphaerospermum* (n=3), *Exophiala castellani* (n=1), *Exophiala dermatitidis* (n=3), *Exophiala jeanselmei* (n=3), *Exophiala moniliae* (n=1), *Exophiala spinifera* (n=6), *Fonsecaea compacta* (n=1), *Fonsecaea pedrosoi* (n=14), *Madurella grisea* (n=2), *Madurella mycetomi* (n=2), *Phialophora verrucosa* (n=2), *Pyrenochaeta romeroi* (n=1) y *Rhinocladiella aquaspersa* (n=1).

Cultivo. Las 52 cepas de hongos fueron mantenidas en placas de agar patata dextrosa (PDA) por resiembras periódicas [12].

Preparación de la suspensión celular. Cada aislado fue cultivado en medio PDA, incubándose durante 7-14 días a 30°C. Una vez crecidas las colonias, fueron cubiertas con 2 ml de solución salina estéril (8,5 g/l NaCl). Mediante un asa bacteriológica estéril, se frotó la superficie del hongo, de manera firme y suave. Luego se extrajo esta suspensión con una pipeta estéril. La suspensión, compuesta por conidios y fragmentos de hifas se transfirió a tubos Eppendorf estériles y se dejó que las partículas sedimentaran durante 20-30 minutos. El sobrenadante de la suspensión fue usado para la realización de las diferentes pruebas (solución *stock*), homogenizándolo bien antes de su uso.

Técnica espectrofotométrica. La turbidez de la suspensión celular fue medida por espectrofotometría

(Hewlett Packard 845) a una longitud de onda de 530 nm y 550 nm simultáneamente. Se ajustó cada suspensión celular a un 40-50% \pm 1% de transmitancia (T) con solución salina estéril.

Cuantificación del inóculo. La cuantificación del inóculo fue realizada en placas de Sabouraud glucosa agar (Difco Laboratories, USA), para determinar el número de viables, UFC/ml. La suspensión celular ajustada se agitó previamente con una pipeta estéril y fue diluida 1:100, en solución salina estéril. Se tomó una alícuota de 0,01 ml de esta suspensión y se sembró en toda la superficie de la placa de Sabouraud agar, mediante la técnica de agotamiento. Las placas fueron incubadas durante 7-14 días a 30°C y fueron observadas diariamente buscando la presencia de colonias fúngicas. Las colonias se contaron después que el crecimiento fue visible. Las UFC/ml del inóculo estandarizado se obtuvieron multiplicando el número de colonias crecidas por el factor de dilución.

Análisis estadístico. La media, desviación estándar y el coeficiente de variación fueron determinados durante cuatro días diferentes para valorar el tamaño del inóculo (UFC/ml) para cada especie.

RESULTADOS

Después de un período de 96 h (4 días) hasta 144 h (seis días) la gran mayoría de las colonias fueron visibles. Las colonias de algunas especies como *E. jeanselmei*, *M. mycetomatis* y *M. grisea* fueron visualizadas a los siete días de cultivo.

El rango de las UFC/ml para las 16 especies de hongos dematiáceos estudiados, y el porcentaje de T obtenido en cuatro días diferentes usando el método espectrofotométrico se resumen en las Tablas 1 y 2. Se observó poca variabilidad en los diferentes días en que fue evaluado el inóculo.

Tabla 1. Rangos de las UFC/ml y del porcentaje de T obtenido en cuatro días diferentes usando el método espectrofotométrico.

Hongo (Nº de aislados)	% T* intervalo	UFC/ml x 10 ⁶	Media	Desviación estándar	% CV**
<i>C. carrionii</i> (9)	40-50	1,0-3,0	245,45	91,58	37,31
<i>C. sphaerospermum</i> (3)	50	1,1	147,66	21,96	14,87
<i>E. dermatitidis</i> (3)	40	1,5-2,0	102,75	59,54	57,95
<i>E. jeanselmei</i> (3)	40-50	4,3	202,25	71,23	41,70
<i>E. spinifera</i> (6)	40-50	1,5-5,0	318,0	133,0	32,22
<i>F. pedrosoi</i> (14)	40-50	1,0-4,0	183,38	74,78	40,78
<i>M. grisea</i> (2)	40-50	1,5	135,5	68,94	16,59
<i>M. mycetomi</i> (2)	40-50	1,8	169,38	28,11	16,59
<i>P. verrucosa</i> (2)	50	1,8	152,63	32,35	21,20
Total (44)					

* Transmitancia 530-550 nm; ** Coeficiente de variación

Tabla 2. Rangos de las UFC/ml y del porcentaje de T obtenido en cuatro días diferentes.

Hongos (Nº de aislados)	%T*	UFC/ml x 10 ⁶
<i>C. cladosporioides</i> (1)	40	1,7-5,4
<i>C. herbarum</i> (1)	40	1,2
<i>C. trichoides</i> (1)	50	1,3-1,7
<i>E. castellani</i> (1)	50	3,1
<i>E. moniliae</i> (1)	50	1,5-1,7
<i>F. compacta</i> (1)	50	1,5-1,9
<i>P. romeroi</i> (1)	40-50	1,7
<i>R. aquaspersa</i> (1)	40-50	4,3
Total (8)		

* T: Transmitancia

DISCUSIÓN

Después de varios ensayos a diferentes concentraciones del inóculo, los resultados demuestran que para hongos melicarios, dematiáceos, el método espectrofotométrico probado utilizando una longitud de onda de 530 y 550 nm a 40-50% de $\pm 1\%$ T, permite conseguir una suspensión celular de 1 a 5×10^6 UFC/ml, verificada por medio del recuento en placa, simplificando notablemente el método de preparación del inóculo. La reproducibilidad de la técnica asegura la obtención de una concentración adecuada para los estudios de sensibilidad *in vitro* [22,23,27]. La principal utilidad del método descrito es la estandarización del inóculo, de manera fácil y relativamente rápida [21,24-26].

Al realizar lecturas sucesivas a 530 y 550 nm de longitud de onda a 40-50% $\pm 1\%$ T, se obtuvieron los mismos resultados a ambas longitudes de ondas, este % de T permitió conseguir una suspensión celular confiable.

El inóculo, así estandarizado mostró poca variabilidad para las diferentes especies. Este estudio demuestra que es indiferente usar 530 o 550 nm de longitud de onda a 40-50% $\pm 1\%$ T para ajustar el inóculo de un hongo dematiáceo.

Expresamos nuestro agradecimiento a las siguientes personas: Dr. Francisco Yegres (Universidad Experimental Francisco de Miranda Coro, Venezuela), Dra. Hilda Romero (Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela), Dra. Gioconda San Blas (Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas, Venezuela), Flavio de Queiroz Telles (Hospital de Clínicas, Universidad Federal Do Paraná, Brasil), Elbio Gezuele (Cátedra de Parasitología del Instituto de Higiene Montevideo, Uruguay) y Fina Gené (Univesitat Rovira i Vigili de Tarragona, España), por su colaboración en el envío y la identificación de los aislados clínicos.

Bibliografía

1. Padhye AA, Hampton AA, Hampton MT, Hutton NW, Prevost-Smith E, Davis MS. Chromoblastomycosis caused by *Exophiala spinifera*. Clin Infect Dis 1995;22:331-335.
2. McGinnis MR. Chromoblastomycosis and phaeohyphomycosis: new concepts, diagnosis, and mycology. J Am Acad Dermatol 1983;8:1-16.
3. Romero H, Guedez E, Magaldi S. Evaluation of immunoprecipitation techniques in chromoblastomycosis. J Mycol Med 1996;6:83-87.
4. Naka W, Harada T, Nishikawa T, Fukushima R. A case of chromoblastomycosis: with special reference to the mycology of the isolate *Exophiala jeanselmei*. Mykosen 1986;29:445-452.
5. McGinnis MR. *Exophiala spinifera*, a new combination for *Phialophora spinifera*. Mycotaxon 1977;5:337-340.
6. Padhye AA, Ajello L, Chandler FW, et al. Phaeohyphomycosis in El Salvador caused by *Exophiala spinifera*. Am J Trop Med Hyg 1983;32:799-803.
7. Richard-Yegres N, Yegres F, Zeppenfeldt G. Cromomicosis: endemia rural, laboral y familiar en Venezuela. Rev Iberoam Micol 1992;9:38-41.
8. Vargas H. Ecología de la cromomicosis en Venezuela. Bol Inf Micosis Venez 1987;3: 37-38.
9. Yegres F, Yegres N, Medina E, Gonzalez R, Perez M, Caleiras E. et al. Cromomicosis en el Estado Falcón entre 1973-1988. Bol Inf Micosis Venez 1989;12:7-8.
10. Yegres F, Yegres N. Cromomicosis en Venezuela. Pasado y Presente. Bol Inf Micosis Venez 1990;18:17-20.
11. Negroni-Briz R. Cromomicosis. En: Torres Rodríguez JM, Palacio-Hernanz A, Guarro-Artigas J, Negroni-Briz R, Pereiro-Miguens M. (Eds.) Micología Médica. Barcelona, Masson 1993;215-221.
12. McGinnis MR, Salkin IF, Schell WA, Pasarell L. Dematiaceous fungi. In: Ballows A, Hausler Jr, Herrmann KL, Shadomy HJ (Ed.) Manual of Clinical Microbiology, 5th ed. Washington DC, American Society for Microbiology 1991:644-658.
13. Duggan JM, Wolf MD, Kauffman CA. *Phialophora verrucosa* infection in an AIDS patient. Mycoses 1995;38:215-218.
14. Emmens RK, Richardson D, Thomas W, et al. Necrotizing cerebritis in an allogeneic bone marrow transplant recipient due to *Chadophialophora bantiana*. J Clin Microbiol 1996;34:1330-1332.
15. Ajanee N, Alam M, Holmberg K, Khan J. Brain abscess caused by *Wangiella dermatitidis*: Case report. Clin Infect Dis 1996;23:197-198.
16. Naka W, Nishikawa T. *Fonsecaea pedrosoi* isolated from skin crusts of Bowen's disease. Mycoses 1994;38:127-129.
17. Gené J, Azón-Masoliver A, Guarro J, et al. Cutaneous phaeohyphomycosis caused by *Alternaria longipes* in an immunosuppressed patient. J Clin Microbiol 1995;33:2774-2776.
18. Scagnelli M, Nanetti A, Simonetto D, Calconi G, Rogoli R, Mazzoni A. Micosi emergenti in dermatologia: le infezioni da dematiaceae. Considerazioni diagnostiche. Micol Dermatol 1990;4:3-9.
19. Scagnelli M, Nanetti A, Simonetto D, Calconi G, Rigoli R, Mazzoni A. New mycoses in dermatology: diagnostic considerations on infections from dematiaceae. Micol Dermatol 1990;4:10-14.
20. Yu R. Successful treatment of chromoblastomycosis with itraconazole. Mycoses 1994;38:79-83.
21. 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.
22. Espinel-Ingroff A, Dawson K, Pfaller M, et al. Comparative and collaborative evaluation of standardization of antifungal susceptibility testing for filamentous fungi. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 314-319.
23. Pfaller MA, Burmeister L, Bartlett MS, Rinaldi MG. Multicenter evaluation of four methods of yeast inoculum preparations. J Clin Microbiol 1988;26:1437-1441.
24. Bezjak V. Standardization of hyphal inoculum of *Aspergillus* for amphotericin B susceptibility testing. J Clin Microbiol 1985;21:509-512.
25. Pujol I, Guarro J, Llop C, Soler L, Fernández-Ballart J. Comparison study of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility test for filamentous fungi. Antimicrob Agents Chemother 1996;40:2106-2110.
26. Gehrt A, Peter J, Pizzo PA, Walsh TJ. Effect of increasing inoculum sizes of pathogenic filamentous fungi on MICs of antifungal agents by broth microdilution method. J Clin Microbiol 1995;33:1302-1307.
27. Pfaller MA, Rinaldi MG, Galgiani JN, et al. Collaborative investigation of variables in susceptibility testing of yeasts. Antimicrob Agents Chemother 1990;34:1648-1654.