

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE *Mycobacterium fortuitum* ATRAVÉS DA ESPECTROFOTOMETRIA

Simone de Carvalho Balian¹
Sandra Abelardo Sanches¹

RESUMO

O *Mycobacterium fortuitum* é um agente oportunista causador de doença em humanos e animais. Além disso, é um modelo biológico para estudos experimentais em substituição ao *Mycobacterium bovis*, que é mais patogênico. Este estudo apresenta metodologia alternativa à contagem de unidades formadoras de colônia por mililitro de inóculo, para determinar a concentração do *Mycobacterium fortuitum* utilizando espectrofotometria. Utilizaram-se 14 amostras de *Mycobacterium fortuitum*, cultivadas em meio Lowenstein-Jensen, sendo oito delas com sete dias de cultivo e as demais entre oito e 14 dias de cultivo. Todas as amostras foram semeadas e incubadas a 37°C por 7 dias em estufa. Fizeram-se, de cada amostra, leituras das variáveis absorvância (Abs) e transmitância (T%) em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda de 560nm e 600nm. Comparando-se os valores obtidos de UFC, Abs e T% por meio da análise de regressão linear simples, pelo programa estatístico SAS versão 8.2, observou-se forte evidência estatística que o aumento do valor da transmitância está associado com o decréscimo do valor de UFC em placas, seguindo o modelo matemático: $\text{LOG}_{10}(\text{UFC}) = 21.012 - 0.1936 * \text{Transmitância}$, com valor de $p = 0,0025$ e uma repetibilidade de mais de 80%.

Palavras-chave: *Mycobacterium fortuitum*, espectrofotometria, unidades formadoras de colônias.

DETERMINATION OF *Mycobacterium fortuitum* CONCENTRATION BY SPECTROPHOTOMETRY

ABSTRACT

Mycobacterium fortuitum is an opportunistic agent which causes disease in human and animals. It is also a biological model for experimental studies instead of using *Mycobacterium bovis*, which is more pathogenic. This work presents an alternative methodology using spectrophotometry to count colony forming units (CFU) per milliliter of inoculum, in order to determinate *Mycobacterium fortuitum* concentration. Fourteen *Mycobacterium fortuitum* samples were cultivated in Lowenstein-Jensen culture media, considering that eight of them were seven days old cultures and the others were between eight and 14 days old. All samples were seeded and incubated at 37°C for 7 days in an incubator. For each sample, the variables absorbance (Abs) and transmittance (T%) were read with an spectrophotometer and wave length of 560nm and 600nm. When the values of CFU, Abs and T% were compared through simple linear regression analysis and using the statistic software SAS Version 8.2., it was observed strong statistical evidence that the increase of transmittance value is associated to the

¹ Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, área de concentração: Inspeção de Higiene de Alimentos. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP. Contato principal para correspondência.

decrease of CFU plate values, according to the mathematic model: $\text{LOG}_{10}(\text{CFU}) = 21.012 - 0.1936 * \text{Transmittance}$, and p value = 0.0025 and a repeatability over 80%.

Keywords: *Mycobacterium fortuitum*, spectrophotometry, colony forming units.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE *Mycobacterium* POR ESPECTROFOTOMETRÍA

RESUMEN

Mycobacterium fortuitum es agente causante de enfermedad oportunista en humanos y animales. Es un agente biológico modelo para estudios experimentales que sustituyó *Mycobacterium bovis*, que es más patógeno. Este estudio presenta una metodología alternativa para el recuento de unidades formadoras de colonias por mililitro de inóculo para determinar la concentración de *Mycobacterium fortuitum* usando espectrofotometría. Catorce muestras se utilizaron *Mycobacterium fortuitum*, cultivadas en Lowenstein-Jensen, ocho de ellas de siete días de cultivo, y la otra entre 8 y 14 días en la cultura. Todas las muestras se colocaron en placas y se incubaron a 37°C durante 7 días en un invernadero. De cada muestra se hicieron lecturas las variables de absorbancia (Abs) y transmitancia (T%) en un espectrofotómetro, a una longitud de onda de 560 nm y 600 nm. La comparación de los valores de UFC, ABS y T% por análisis de regresión lineal simple, el estadístico SAS versión 8.2 del software, hubo una fuerte evidencia estadística de que el aumento del valor de transmitancia se asocia con la disminución en el valor de UFC chapado, siguiendo el modelo matemático: $\text{LOG}_{10}(\text{UFC}) = 21,012 - 0,1936 * \text{transmitancia}$, con $p = 0,0025$ y una repetibilidad de más de 80%.

Palabras clave: *Mycobacterium fortuitum*, espectrofotometría, unidades formadoras de colonias.

INTRODUÇÃO

O *Mycobacterium fortuitum* é um agente patogênico, porém oportunista, podendo causar doenças pulmonares, granulomas torácicos e cutâneos (1), com potencial zoonótico, causando mastite no gado e transmissão pelo leite (2). É comumente resistente aos quimioterápicos usados para o tratamento da tuberculose e no cultivo *in vitro* necessitam de dois a seis dias sob temperaturas de 25 a 37°C para formar colônias visíveis (3).

Este agente é frequentemente utilizado em pesquisas experimentais, em substituição ao *Mycobacterium bovis*, que é mais patogênico e por isso representa risco de acidentes ocupacionais com consequências mais graves (4,5,6).

Os trabalhos experimentais que empregam inóculos que dependem de quantidades de agentes pré-conhecidas, geralmente se utilizam da contagem padrão em placas para confirmar a concentração microbiana por unidade de volume do diluente, porém é um método lento e por isso muitas vezes pouco aplicável (1,6).

A espectrofotometria é um método indireto de mensuração da concentração das partículas presentes em um inóculo, sendo mais rápido e prático do que a contagem padrão em placas. O princípio do método é quantificar indiretamente a concentração de dispersos

(micro-organismos) pela absorvância ou transmitância de forma rápida, objetiva, com reduzidas variáveis inclusive da intervenção humana, enquanto que a quantificação por semeadura em placas de Petri é mais lenta e dependente de muitas variáveis a partir da ação humana (7). A semeadura em placas oferecerá resultados após tempo de incubação, multiplicação bacteriana de células viáveis e que também sejam cultiváveis e, posterior contagem de unidades formadoras de colônias, expressando uma realidade bastante distante do inoculo, quando de sua elaboração.

Com o interesse de confrontar uma metodologia rápida de avaliação da concentração de inóculos bacterianos com o método convencional de semeadura e cultivo em meios sólidos, o presente trabalho teve como objetivo estudar um protocolo alternativo à contagem em placas para determinar a concentração de dispersos em um inóculo, pela espectrofotometria. Nesta técnica a concentração da suspensão é avaliada a partir do grau de absorvância e transmitância de luz.

MATERIAL E MÉTODOS

A partir de uma estirpe de *Mycobacterium fortuitum*, NCTN 8573, cultivada em Lowenstein-Jensen pesou-se 0,600 g de colônias e diluiu-se em 24 mL de solução salina 0,85 % e 1 mL de solução salina com Tween* 0,05 %, totalizando um volume de 25 mL por inoculo (4,5). Os inóculos de número um até oito foram preparados com cultivos de sete dias de *M.fortuitum* em meio Lowenstein-Jensen a 37° C, enquanto que as amostras de número nove até 14 foram preparadas com cultivos entre 11 a 14 dias. A partir de cada inóculo, semeou-se e fez-se a leitura das diluições de 10⁻⁵ até 10⁻⁸, em Espectrofotômetro Micronal B582®, com transmitância (T%) variando de 0 a 200; absorvância (Abs) de - 0,3 até + 3,0 e, comprimento de onda de 190 a 1.100 nm.

Para a leitura, 3mL de cada diluição, de 10⁻⁵ a 10⁻⁸, de cada inóculo, foi agitado em vórtex por 30 segundos e em seguida colocado em cubetas quadradas de 10 mm³ Micronal®. A leitura foi feita em duas funções do aparelho: absorvância (Abs) e porcentagem de transmitância (T%) nos comprimentos de onda 560 nm e 600 nm. Antes de cada leitura e mudança de comprimento de onda fez-se o ajuste, utilizando-se 3 mL de uma solução de 24 mL de solução salina 0,85 % com 1 mL de Tween 80¹ (0,05 %).

Para a determinação da quantidade de unidades formadoras de colônias por mililitro de inóculo em UFC/mL, fez-se a contagem de três placas e a média simples, após cultivo em estufa B.O.D., 37°C, por sete dias.

Após tentativas de leituras com diferentes diluições, selecionaram-se as concentrações de 10⁻⁶ e 10⁻⁷. A diluição 10⁻⁵ apresentou-se incontável e a diluição 10⁻⁸ teve contagem entre zero e uma UFC/mL, não sendo possíveis de serem utilizadas. As leituras mais estáveis foram obtidas com as diluições 10⁻⁶ no comprimento 600 nm.

Os resultados foram analisados por regressão linear simples, pelo programa estatístico SAS versão 8.2. (SAS, 2001). Confrontaram-se as diluições com a escala de Mc Farland Bio Merieux®, de 0,5 a 5.

¹ 80 Polyoxyethylensorbitanmonooleat – Zur Synthese – Merck®

RESULTADOS

Considerando a escolha da diluição 10^{-6} /mL e o comprimento de onda de 600 nm, a tabela 1 apresenta os resultados das leituras para absorvância (Abs), transmitância (T%) e contagens de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL).

Tabela 1. Leituras de 14 amostras de inóculos de *Mycobacterium fortuitum* para absorvância (Abs), transmitância (%T) no comprimento de onda de 600 nm e contagem de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) - São Paulo, 2015.

Amostra - Inóculo M. fortuitum (10^{-6}/mL)	Abs 600 nm	T% 600 nm	<i>Mycobacterium fortuitum</i> UFC/mL
1*	- 0,009	102,2	$1,8 \times 10$
2	0	100,0	$5,4 \times 10^2$
3	- 0,005	101,4	$2,6 \times 10$
4	- 0,002	100,8	$2,2 \times 10$
5	- 0,001	100,3	$3,3 \times 10$
6	- 0,003	100,9	$2,9 \times 10$
7	0	100,0	$4,8 \times 10$
8	- 0,001	100,4	$4,1 \times 10$
9**	0	100	$1,1 \times 10^2$
10	0,001	100,3	$1,6 \times 10^2$
11	0	100,3	$9,6 \times 10$
12	0	100	$1,3 \times 10^2$
13	0	100	$1,5 \times 10^2$
14	0,001	100,2	$9,5 \times 10$

* : Amostras de número um até oito: cultivadas por sete dias a 37°C

** : Amostras de número nove até 14: cultivadas entre 11 e 14 dias a 37°C

O confronto das diluições com a escala Mac Farland não se mostrou útil, por não discriminar concentrações entre 10^{-3} e 10^{-8} .

Tabela 2. Leituras das diluições dos inóculos na escala Mc Farland Bio Merieux®, São Paulo, 2015.

Diluição do inóculo	Leitura na escala Mc Farland
10^0	> 5
10^{-1}	2 a 3
10^{-2}	1
10^{-3} até 10^{-8}	< 0,5

O programa de análise dos dados ajustou os resultados em UFC/mL para Log 10, automaticamente, quando necessário. Obteve-se o coeficiente de determinação (R²) para indicar a porcentagem de sucesso na repetição do modelo e também o valor de p, erro máximo aceitável (0,05) para o modelo ser significativo.

Tabela 3. Valores do coeficiente de determinação (R^2) e de p obtidos após análise por regressão linear simples, dos valores lidos em espectrofotômetro para absorvância (Abs) e transmitância (T%) e contagem de unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL), São Paulo, 2015.

N	Variáveis	Valor R^2	Valor p	Modelo Matemático	Premissas violadas do teste
14	UFC e Abs	0,5781	0,0016	$\text{LOG}_{10}(\text{UFC}) = 1.8793 + 91.272 * \text{Abs}$	2 de 5
14	UFC e T%	0,5415	0,0027	$\text{LOG}_{10}(\text{UFC}) = 39.361 - 0.3742 * \text{T\%}$	0 de 5
08	UFC e Abs	0,6275	0,0191	$\text{UFC} = 42.518 + 3233.7 * \text{Abs}$	1 de 5
08	UFC e T%	0,8044	0,0025	$\text{LOG}_{10}(\text{UFC}) = 21.012 - 0.1936 * \text{T\%}$	0 de 5

Adotou-se o modelo matemático $\text{LOG}_{10}(\text{UFC}) = 21.012 - 0.1936 * \text{Transmit}$ considerando os valores de p , de R^2 e o fato de nenhuma premissa ter sido violada.

Tabela 4. Valores de UFC segundo modelo matemático. $\text{LOG}_{10}(\text{UFC}) = 21.012 - 0.1936 * \text{Transmitância}$, São Paulo, 2015.

Transmitância (%)	UFC
Espectrofotômetro Micronal B582 [®] . Comprimento de onda 600 nm	Método convencional em placas de Petri
99	70,08
100	44,87
100,1	42,91
100,2	41,04
100,3	39,25
100,4	37,54
100,5	35,90
100,6	34,34
100,7	32,84
100,8	31,41
100,9	30,04
101	28,73
101,1	27,48
101,2	26,28
101,3	25,14
101,4	24,04
101,5	22,99
101,6	21,99
101,7	21,03
101,8	20,11
101,9	19,24
102	18,40
102,1	17,60
102,2	16,83

DISCUSSÃO

O estudo permitiu reconhecer qual a grandeza, absorvância ou transmitância, expressou melhor correlação com a contagem padrão em placas de um inóculo de *Mycobacterium fortuitum*.

Observando a tabela 3, constata-se evidências estatísticas de associação entre absorvância e UFC/mL e entre Transmitância e UFC/mL.

Com relação à absorvância, os testes estatísticos mostraram haver forte evidência estatística de que seu aumento está associado ao aumento nos valores esperados das concentrações de UFC/mL, tanto para 14 quanto para oito amostras testadas, porém o valor de p (0,0016) foi menor para 14 amostras do que para oito amostras (0,0191), enquanto que o valor de R² foi maior para oito amostras do que para 14. A associação entre os parâmetros analisados em relação à absorvância existe, porém violando duas premissas do teste para 14 amostras e, uma premissa para oito amostras.

Relativamente à transmitância, os testes estatísticos mostraram haver forte evidência estatística de que seu aumento está associado à diminuição nos valores esperados das concentrações em UFC/mL, tanto para 14 quanto para oito amostras. Os valores de p obtidos, respectivamente, são próximos (0,0027 e 0,0025), porém o valor de R² a partir da análise com oito amostras mostrou-se superior àquele com 14 amostras (0,8044 e 0,5415, respectivamente), sem violar nenhuma das premissas.

Observou-se também que o tempo de incubação prévio do inóculo é fator determinante nas variações das leituras no espectrofotômetro. As amostras com período de incubação mais longo, quando analisadas em separado, revelaram coeficientes de determinação mais altos (0,6275 para Abs e 0,8044 para T%) do que quando a análise foi realizada com todas as amostras (0,5781 para Abs e 0,5415 para T%). Este achado informa que a inclusão de amostras, sob diferentes condições levam à perda de repetibilidade do protocolo. É aconselhável fixar, rigorosamente, todas as variáveis para a preparação de inóculo e leitura no espectrofotômetro, incluindo-se, origem da cepa, intensidade e tempo de agitação, temperatura e tempo de incubação e tempo para leitura de todas as diluições testadas.

As amostras com mais de sete dias de cultivo, possivelmente continham um maior número de células viáveis e cultiváveis para uma mesma massa de bactérias. Esse fato explica porque em uma mesma leitura da transmitância, encontraram-se maiores valores de UFC, uma vez que a espectrofotometria é um método físico e não qualifica as partículas em suspensão.

Acredita-se que a leitura da transmitância de diluições seriadas de base 10 seja a mais indicada para se construir a curva de regressão linear dos dados. Dos quatro modelos matemáticos obtidos (tabela 3), o recomendado para o estudo de correspondência entre diluições e leitura em espectrofotômetro é o de transmitância dada pela fórmula: $LOG_{10}(UFC) = 21.012 - 0.1936 * Transmitância$.

O presente estudo desperta questionamentos quanto ao comportamento das leituras feitas a partir de outros micro-organismos. A utilização deste recurso representa a disponibilidade de um método rápido para a indicação de concentração de agentes em suspensões utilizadas em experimentações, porém algumas restrições e cuidados devem ser considerados como discutido anteriormente. Acredita-se ser necessário continuar com tais estudos buscando responder questões como: 1) espécies diferentes de bactérias, nas mesmas concentrações apresentam o mesmo comportamento em absorvância e transmitância? e 2) agentes com crescimento rápido (24h e 48h) oferecem a mesma correlação em absorvância e transmitância, nas leituras feitas em mesmo comprimento de onda e mesmas diluições, que aqueles agentes com crescimento lento (60 a 90 dias)?

CONCLUSÃO

Há uma forte evidência estatística que o aumento do valor da transmitância de uma amostra de inóculo de *Mycobacterium fortuitum*, cultivado por sete dias, está associado com o decréscimo do valor de UFC em placas, seguindo o modelo matemático $\text{LOG}_{10}(\text{UFC}) = 21.012 - 0.1936 \cdot T\%$, com valor de $p = 0,0025$ e uma repetibilidade de mais de 80%. É fundamental o desenvolvimento de outros protocolos no estudo da aplicação da espectrofotometria na quantificação de agentes microbianos em inóculos utilizados em estudos experimentais de infecção e contaminação.

REFERÊNCIAS

1. Blanco RM, Inumaru VTG, Martins MC, Giampaglia CMS, Ueki SYM, Chimara E. et al. Estratégias para identificação de espécies do complexo *Mycobacterium fortuitum*. Rev. Inst. Adolfo Lutz. 2002,61(2): 91-96.
2. Pardo RB, Langoni H, Mendonça LJP, Chi KD. Isolation of *Mycobacterium* spp. in milk from cows suspected or positive to tuberculosis. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci., 2001, 38(6): 284-287. ISSN 1413-9596.
3. Carter GR, Cole Jr. JR Diagnostic procedures in veterinarian bacteriology and mycology, 1990. p.360.
4. Nishimoto, E. Efeito da gordura do leite de vaca sobre o valor $D_{65^{\circ}\text{C}}$ do *Mycobacterium fortuitum* (NCTN 8573). São Paulo, 2006, 81p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
5. Starikoff KR. Efeito da gordura do leite de cabra sobre o valor $D_{65^{\circ}\text{C}}$ do *Mycobacterium fortuitum* (NCTN 8573). São Paulo, 2006, 83p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
6. Parti RPS, Srivastava S, Gachhui R, Srivastava KK, Srivastava R. “Murine Infection Model for *Mycobacterium fortuitum*.” *Microbes and Infection*. 2005, 7(3): 349–55. doi:10.1016/j.micinf.2004.11.006.
7. Harrigan HF. Laboratory methods in food microbiology, cap.5, 3ª.ed., 1998.
8. SAS. Statistical Analysis System. SAS user’s guide: Versão 8.2. Cary: SAS, 2001. 1 CD – ROOM.

Recebido em: 06/04/2015

Aceito em: 08/08/2016