

Confiabilidade da quantificação de colônias de espécies de *Candida* utilizando métodos alternativos de plaqueamento

Reliability of quantification of Candida species colonies using alternative plating methods

Fiabilidad de la cuantificación de colonias de especies de Candida utilizando métodos alternativos de enchapado

Sarah Raquel de Annunzio¹, Filipe Silveira Fusco², Carolina Santezi², Bárbara Donadon Reina², Lívia Nordi Dovigo²

¹ Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Departamento de Análises Clínicas. Araraquara, SP, Brasil.

² Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Departamento de Odontologia Social. Araraquara, SP, Brasil.

ABSTRACT

Objective: to evaluate the concordance of different plating methods for quantification of *Candida* species colonies. **Method:** standardized suspensions of reference strains (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* and *Candida krusei*) were submitted to serial dilution and plating according to methods of track-dilution (TDM), drop plate (DPM) and the conventional spread plate (SPM). Data were submitted to construction of Bland-Altman diagrams, Intraclass Correlation Coefficient (ICC) and ANOVA ($\alpha=5\%$). **Results:** adequate concordance between the methods (CCI >0.71) was observed, and the execution of DPM was the fastest ($p<0.001$). However, DPM and TDM appear to result in greater values compared to SPM, especially for *C. tropicalis* and *C. krusei*. **Conclusion:** *C. albicans* and *C. glabrata* can be plated with DPM and TDM, but the use of these methods for *C. krusei* and *C. tropicalis* may result in count variation.

Descriptors: *Candida albicans*; *Candida tropicalis*; *Candida glabrata*; Data accuracy; Colony Count, Microbial.

RESUMO

Objetivo: avaliar a concordância de diferentes métodos de plaqueamento para a quantificação de colônias de espécies de *Candida*. **Método:** suspensões padronizadas das cepas de referência (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei*) foram submetidas à diluição seriada e plaqueamento segundo os métodos plaqueamento em rastro (MPR), plaqueamento por gota (MPG) e o convencional espalhamento em placas (MEP). Os dados foram submetidos à construção de diagramas Bland-Altman, Coeficiente de Correlação Intraclass (CCI) e ANOVA ($\alpha=5\%$). **Resultados:** foi observada adequada concordância entre os métodos (CCI $>0,71$), e a execução do MPG foi a mais rápida ($p<0,001$). No entanto, o MPG e MPR parecem resultar em valores superiores em relação ao MEP, especialmente para *C. tropicalis* e *C. krusei*. **Conclusão:** *C. albicans* e *C. glabrata* podem ser plaqueadas com MPG e MPR, mas a utilização desses métodos para *C. krusei* e *C. tropicalis* podem resultar em variação na contagem.

Descritores: *Candida albicans*; *Candida tropicalis*; *Candida glabrata*; Confiabilidade dos Dados; Contagem de Colônia Microbiana.

RESUMÉN

Objetivo: evaluar la concordancia de diferentes métodos de recubrimiento para la cuantificación de colonias de especies de *Candida*. **Método:** las suspensiones estandarizadas de las cepas de referencia (*Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei*) se sometieron a dilución en serie y recubrimiento de acuerdo con el recubrimiento de rastro (MRR), sembrado por gota (MSG) y los métodos de siembra convencionales (MEP). Los datos se sometieron a la construcción de diagramas de Bland-Altman, Coeficiente de Correlación Intraclass (CCI) y ANOVA ($\alpha=5\%$). **Resultados:** se observó un acuerdo adecuado entre los métodos (CCI $>0,71$), y la ejecución de la MSG fue la más rápida ($p<0,001$). Sin embargo, MSG y MRR parecen dar lugar a valores más altos que MEP, especialmente para *C. tropicalis* y *C. krusei*. **Conclusión:** *C. albicans* y *C. glabrata* se pueden colocar en placas con MSG y MRR, pero el uso de estos métodos para *C. krusei* y *C. tropicalis* puede dar lugar a variaciones en el recuento.

Descriptorios: *Candida albicans*; *Candida tropicalis*; *Candida glabrata*; Exactitud de los Datos; Recuento de Colonia Microbiana.

Como citar este artigo:

Annunzio SR, Fusco FS, Santezi C, Reina BD, Dovigo LN. Reliability of quantification of *Candida* species colonies using alternative plating methods. Rev Pre Infec e Saúde [Internet].2019;5:9426. Available from: <http://www.ojs.ufpi.br/index.php/nupcis/article/view/9426> doi: <https://doi.org/10.26694/repis.v5i0.9426>

INTRODUÇÃO

O gênero *Candida* é constituído por espécies fúngicas heterogêneas, sendo que algumas destas possuem capacidade de atuar como patógenos oportunistas do ser humano. A *Candida albicans* é considerada a espécie mais prevalente dentre as infecções,¹ porém outras espécies como a *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* e a *Candida krusei* têm sido frequentemente isoladas.²⁻⁴ As infecções por *Candida* conhecidas como candidose bucal e a candidose orofaríngea são consideradas as patologias fúngicas mais frequentes entre humanos.¹ Entre indivíduos imunocomprometidos, as infecções locais podem levar ao comprometimento sistêmico, nos quais o número de mortes devido à infecção por *Candida* spp. pode variar entre 40% a 80%.⁵⁻⁷

A busca por novas terapias eficazes na inativação das espécies de *Candida* e na redução de sua capacidade de aderir a substratos como próteses odontológicas, sem causar efeitos colaterais e/ou resistência antifúngica, é um importante campo de investigações científicas.⁸⁻⁹ Nesses estudos, o crescimento e a subsequente contagem de colônias em placas de Petri têm sido uma prática comum nas metodologias que buscam avaliar a eficácia de novos tratamentos antimicrobianos.¹⁰

O método convencional utilizado para a enumeração das unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) de espécies de *Candida* é denominado de espalhamento em placas (MEP; do inglês *spread plating*).¹¹ A enumeração pelo método do espalhamento se inicia normalmente com a diluição seriada da amostra, seguida da transferência de alíquotas das amostras diluídas à superfície de um ágar previamente solidificado e,

Quantificação de colônias de espécies de *Candida* com o auxílio de uma espátula de plástico, vidro ou aço, a alíquota é distribuída de forma uniforme sobre o meio de cultura.¹² Após a incubação das placas por períodos e em temperatura determinados, as colônias são contadas e, então, a concentração de células na amostra original pode ser estimada tendo como referência o volume da amostra plaqueada.

Para aumentar a precisão da estimativa do número de UFC/mL nas amostras, alíquotas de cada diluição são plaqueadas em duplicata ou triplicata, e as colônias são contadas apenas nas placas referentes à diluição que gerou um número de colônias entre 30 e 300.^{11,13} Como a concentração real de micro-organismos presentes numa amostra após a conclusão de um experimento é desconhecida, as amostras são frequentemente diluídas até sete vezes a partir da amostra inicial, sendo que apenas as replicatas de uma única diluição serão efetivamente utilizadas para contagem.¹³ Por isso, esta técnica, apesar de ser relativamente precisa e amplamente utilizada, possui inconvenientes como o tempo despendido para preparo dos materiais e plaqueamento das amostras, e a grande quantidade de plásticos descartáveis e meios de cultura necessários para a sua adequada realização.^{12,14}

Métodos alternativos de plaqueamento, nos quais seja possível reduzir o volume de material e o tempo despendido para sua execução, têm sido propostos na literatura,¹⁵⁻¹⁷ como o de plaqueamento por gota (MPG; do inglês *drop plating*),^{11,13,18} plaqueamento em espiral (*spiral plating*)¹⁹ e plaqueamento em rastro (MPR; do inglês *track-dilution*).¹² Este último foi proposto inicialmente para a quantificação das

Annunzio SR, et al.

bactérias *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* plaqueadas em meio de cultura *Brain Heart Infusion* (BHI) e mostrou valores de UFC/mL estatisticamente semelhantes ao método de espalhamento convencional para as espécies selecionadas.¹² O MPR possui vantagens significativas em relação ao MEP, como sua simplicidade de execução, o menor tempo requerido para o preparo das placas, plaqueamento e contagem das colônias e o menor volume de material utilizado (placas e meio de cultura). Provavelmente por isso o MPR tem sido amplamente utilizado em estudos de microbiologia aplicada,²⁰⁻²¹ inclusive na área odontológica,²² e para quantificação de leveduras²³ e espécies de *Candida*.⁹

Embora o MPR seja amplamente utilizado, não são encontrados relatos que tenham verificado previamente a confiabilidade e a sua validade para o plaqueamento e quantificação de espécies de *Candida*. A questão de precisão da medida nos estudos laboratoriais é mais relevante hoje do que nunca. Resultados obtidos de forma enviesada, sem a avaliação prévia da precisão e confiabilidade das medidas efetuadas, podem levar a resultados incorretos e à divulgação de informações errôneas que, conseqüentemente, provocam a falta de reprodutibilidade em ciência e até a adoção de tratamentos antimicrobianos ineficazes em ensaios subsequentes.²⁴

Quando diferentes métodos de plaqueamento são empregados ou quando diferentes pesquisadores aplicam o mesmo método é comum ocorrerem variações nas contagens de micro-organismos.¹¹ Quando negligenciadas, tais variações podem afetar

Quantificação de colônias de espécies de *Candida* negativamente as conclusões dos estudos e tornar difícil a comparação de resultados de diferentes autores, principalmente os que buscam avaliar a eficácia de terapias antimicrobianas. Dados publicados na literatura já mostraram a importância de se propor procedimentos padronizados e de verificar confiabilidade e a reprodutibilidade do método de plaqueamento, a fim de se obter resultados confiáveis, quando se trata de quantificação microbiana. No entanto, tais estudos foram conduzidos somente para espécies bacterianas.^{11,13}

Um estudo publicado anteriormente²⁵ já mostrou que a obtenção de alta correlação entre dois métodos de plaqueamento foi dependente da espécie de *Candida*, uma vez que podem diferir quanto ao formato e ao tamanho das colônias. Os mesmos autores também enfatizaram que a aplicabilidade de um novo método para enumeração de *Candida* depende da sua capacidade de estimar os valores de UFC/mL a partir de amostras com alta ou baixa concentração de células. Além disso, o limite de detecção de cada método deve ser considerado.¹² Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi investigar a confiabilidade do MPR e MPG para a quantificação do número de UFC/mL de diferentes espécies de *Candida* a partir de amostras com diferentes concentrações celulares e comparar o tempo necessário para execução de cada método.

MÉTODOS

Delineamento experimental

Estudo experimental realizado em laboratório. As variáveis dependentes investigadas foram a UFC/mL e o tempo do procedimento (em

Annunzio SR, et al.

minutos). Como variáveis independentes considerou-se o método de plaqueamento (Método do espalhamento em placas - MEP, Método do plaqueamento em rastro - MPR e Método do plaqueamento em gota - MPG).

Cepas e condições de cultivo

Foram utilizadas cepas de referência provenientes da empresa *American Type Culture Collection* (ATCC), das espécies *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida glabrata* (ATCC 2001), *Candida tropicalis* (ATCC 4563) e *Candida krusei* (ATCC 6258). Os micro-organismos foram mantidos sob congelamento (-70 graus Celsius) até o momento de sua utilização em *Yeast-Peptone-Glucose* (Sigma Aldrich Co Ltd, Missouri, EUA).

Para obtenção das suspensões celulares, foram padronizados os procedimentos experimentais de incubação, lavagem e ressuspensão das células.²⁶ As células foram ressuspendidas em 3mL de tampão fosfato-salino (do inglês, *phosphate-buffered saline* - PBS) e diluições na ordem de 10 vezes foram realizadas. As amostras foram nomeadas de D0 (suspensão inicial) até D5 (última diluição). As amostras D0 a D5 foram obtidas de forma padronizada em todas as ocasiões do experimento, até que se totalizaram 30 repetições (n=30).

Plaqueamento das amostras

Cada amostra foi diluída serialmente em placas de 96 poços²⁷ (Kasvi, Paraná, Brasil) e alíquotas dessas diluições foram plaqueadas, em duplicata, em placas de Petri contendo meio *Sabouraud Dextrose Agar* com cloranfenicol (SDA; Acumedia Manufactures, Michigan, EUA). O plaqueamento,

Quantificação de colônias de espécies de *Candida* para posterior enumeração do número de colônias foi realizado segundo os três diferentes métodos propostos: MPR, MPG e MEP.

Para o MEP, duas alíquotas de 100µL de cada diluição foram transferidas individualmente para duas placas de Petri redondas de superfície plana (90x15mm; Kasvi, Paraná, Brasil) contendo o meio SDA previamente solidificado. Com a ajuda de um bastão de vidro em L esterilizado, as alíquotas foram espalhadas de maneira uniforme sobre toda a superfície do meio de cultura. Para o MPR, alíquotas de 10µL das diluições seriadas foram transferidas, com auxílio de uma pipeta multicanal (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) para duas placas de Petri quadradas (100x15mm, grade de 13mm; Simport Scientific, Canadá) contendo o meio de cultura SDA previamente solidificado. Após a transferência das alíquotas, as placas foram inclinadas formando um ângulo de aproximadamente 45° em relação à superfície da bancada, permitindo que as alíquotas formassem os rastros sobre o meio de cultura. Nesse método, foi possível plaquear todas as amostras (D0 a D5) em uma mesma placa, e uma segunda placa foi utilizada para as duplicatas. Quando o rastro formado por qualquer uma das alíquotas atingiu a distância de 5mm em relação à borda do ágar, a placa foi ligeiramente inclinada para trás para evitar a agregação dos rastros na base da placa. Para o MPG, alíquotas em duplicata de 10µL das diluições seriadas foram transferidas, com auxílio de uma pipeta multicanal, para placas de Petri contendo o meio de cultura SDA previamente solidificado.

Para todos os métodos, as placas foram deixadas sobre a bancada por 10 minutos e então, invertidas e incubadas a 37°C. Para o MEP, o

Annunzio SR, et al.

tempo de incubação utilizado foi de 48h, o qual possibilita o crescimento das colônias em tamanho adequado para evitar sua união. No entanto, no MPR e MPG, a área para o crescimento das colônias foi muito menor e por isso, foi definido o tempo de incubação de 20h e 18h, respectivamente.

Após o período de incubação, todas as placas foram fotografadas sobre um fundo preto, de forma padronizada, e a contagem das colônias foi realizada nas fotografias, com auxílio da ferramenta Contagem do programa Adobe Photoshop (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, EUA), por dois pesquisadores prévia e devidamente calibrados (CCI=0,995). Para o MEP, o volume plaqueado foi de 0,1mL, e a contagem foi realizada na diluição que apresentou crescimento entre 30 e 300 colônias, considerado o padrão de contagem na literatura. Como no MPR e no MPG, o volume plaqueado foi de 0,01mL, o padrão de crescimento não possibilitou número de colônias contáveis acima de 30 colônias. Por essa razão, a contagem foi realizada na diluição que apresentou entre 3-30 colônias, uma vez que o volume plaqueado nesses métodos foi 10 vezes menor que o volume plaqueado no MEP. O tempo (em minutos) necessário para o plaqueamento (excluindo o procedimento de diluição seriada) e contagem das colônias foi medido com auxílio de um cronômetro digital (Kasvi, Paraná, Brasil), por um pesquisador independente.

Análise dos dados

Os valores de UFC/mL foram transformados em \log_{10} . A reprodutibilidade entre os métodos foi estimada por meio do Coeficiente de Correlação Intraclasse (CCI) e seu Intervalo de Confiança

Quantificação de colônias de espécies de *Candida* (IC_{95%}), considerando-se a concordância absoluta e o modelo de Análise de Variância a dois fatores mistos, para medidas médias.²⁸ Em função do valor de CCI obtido, o grau de concordância entre as medidas foi classificado segundo a proposta de Fermanian.²⁹ O efeito do tipo de plaqueamento sobre a variável \log_{10} (UFC/mL) também foi analisado por meio de uma análise de variância de medidas repetidas. A análise dos tempos de procedimento de plaqueamento e contagem utilizou Análise de Variância a um fator com correção de Welch, seguido do pós-teste de Games-Howell. A hipótese nula deste estudo foi de que não existe efeito dos diferentes métodos de plaqueamento e das diferentes espécies no número de colônias recuperadas após o plaqueamento e no tempo de execução dos métodos. O nível de significância adotado foi de 5% em todas as análises, as quais foram realizadas no programa *IBM Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) Statistics 21*.

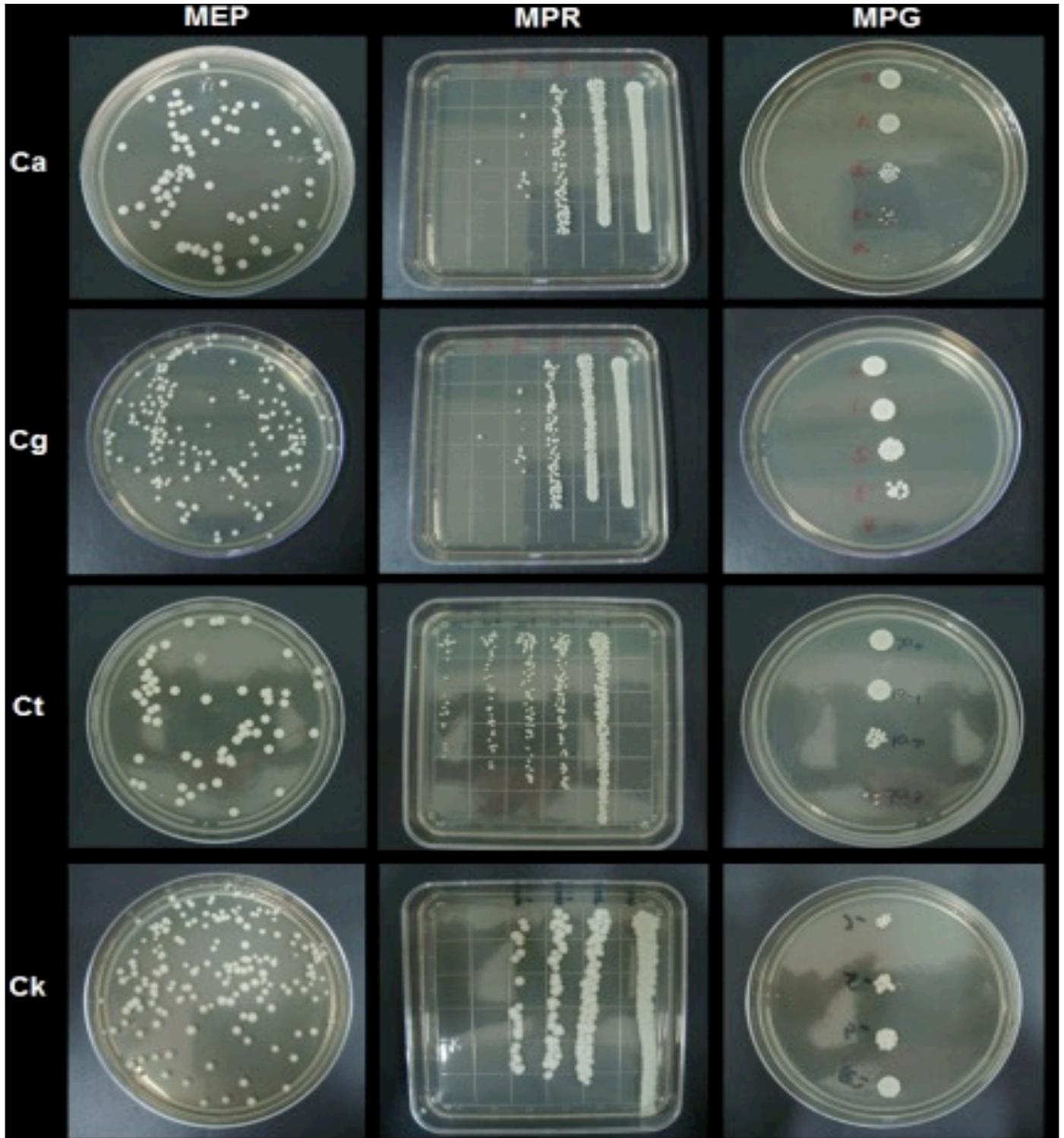
RESULTADOS

Nesse estudo, os três métodos de plaqueamento foram comparados quanto à sua concordância para obtenção dos valores de UFC/mL (Figura 1). A análise descritiva dos dados apontou que, de uma forma geral, ambos os métodos alternativos (Método do plaqueamento em rastro - MPR e Método do plaqueamento em gota - MPG) pareciam resultar, sistematicamente, em valores de \log_{10} (UFC/mL) ligeiramente superiores em relação ao método tradicional (Método do espalhamento em placas - MEP) (Tabela 1). Os diagramas de Bland-Altman³⁰ (Figura 2) corroboraram esse comportamento, especialmente para as espécies *Candida*

tropicalis e *Candida krusei*, uma vez que a maioria das diferenças entre os valores de

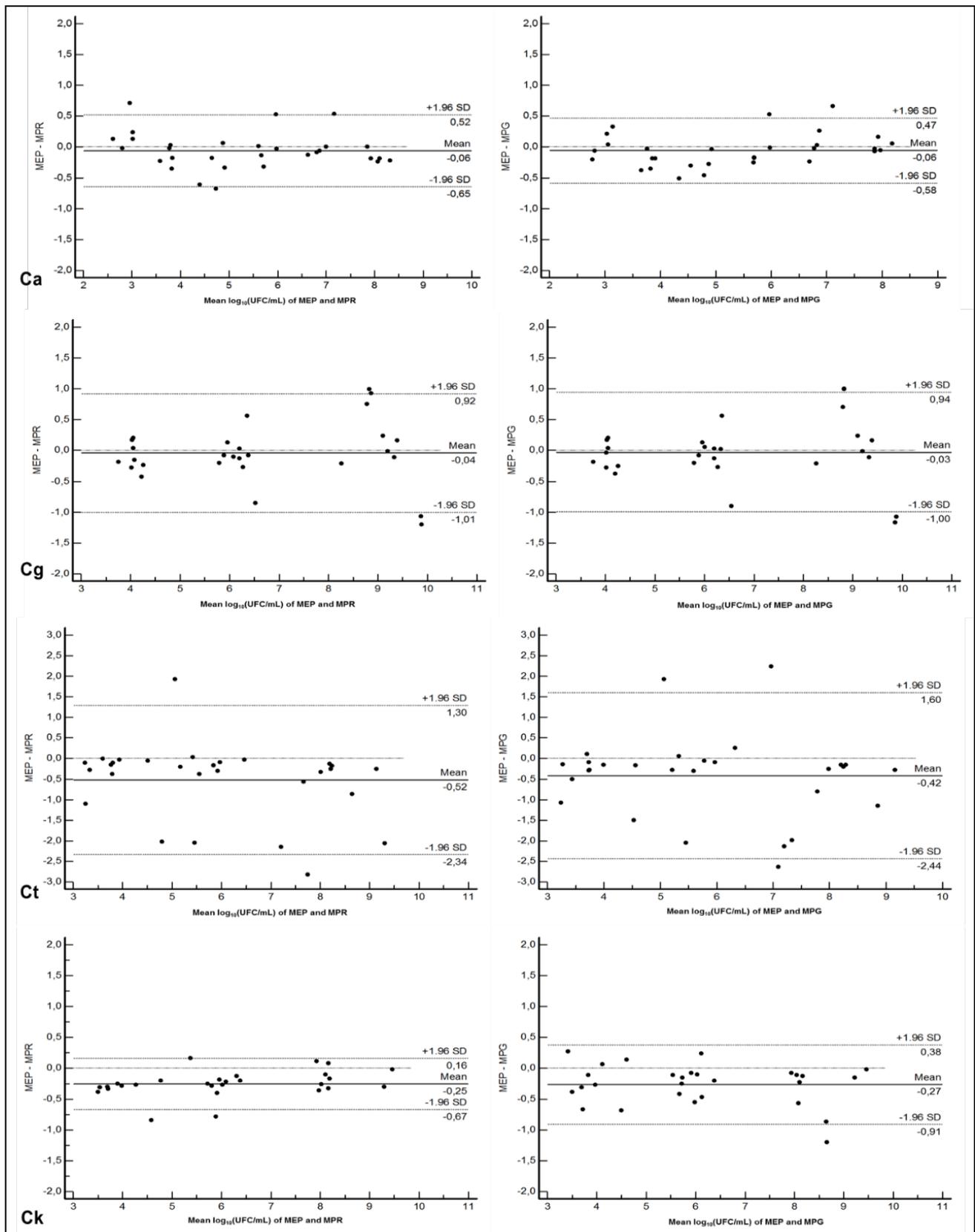
$\log_{10}(\text{UFC/mL})$ (MEP - MPR e MEP - MPG) foi negativa.

Figura 1: Imagens das placas de Petri contendo as colônias de *Candida*.



Legenda: MEP: Método do espalhamento em placas; MPR: Método do plaqueamento em rastro; MPG: Método do plaqueamento em gota; Ca: *Candida albicans*; Cg: *Candida glabrata*; Ct: *Candida tropicalis*; Ck: *Candida krusei*.

Figura 2: Diagramas Bland-Altman para análise descritiva da concordância entre os métodos de plaqueamento segundo a espécie de *Candida*.



Legenda: MEP: Método do espalhamento em placas; MPR: Método de plaqueamento em rastro; MPG: Método do plaqueamento em gota; eixo x: média dos valores de cada método com os valores do MEP; eixo y: diferença entre cada método e o MEP.

A diferença entre as médias também foi investigada e foi considerada estatisticamente significativa para a espécie *C. krusei*. O pós-teste de Bonferroni apontou valores menores no MEP em comparação ao MPR e MPG ($p \leq 0,001$), sendo que estes últimos foram considerados

Quantificação de colônias de espécies de *Candida* semelhantes entre si ($p=1,000$). Ainda assim, a análise de reprodutibilidade apontou uma adequada concordância entre os métodos, uma vez que todos os valores de CCI estiveram acima do valor de 0,71 (Tabela 2).

Tabela 1: Valores médios (e desvio-padrão) de \log_{10} (UFC/mL) obtidos após plaqueamento das colônias das quatro espécies de *Candida* utilizando diferentes métodos de plaqueamento.

Espécie	MEP	MPR	MPG	p*
<i>Candida albicans</i>	5,32 (1,80)	5,38 (1,81)	5,38 (1,70)	0,333
<i>Candida glabrata</i>	6,61 (2,12)	6,64 (2,11)	6,63 (2,11)	0,696
<i>Candida krusei</i>	5,97 (1,85)	6,23 (1,80)	6,24 (1,91)	<0,001
<i>Candida tropicalis</i>	5,71 (1,90)	6,17 (2,10)	6,07 (1,97)	0,079

Legenda: * Valores obtidos após Análise de Variância de Medidas Repetidas. MEP: Método do espalhamento em placas; MPR: Método de plaqueamento em rastro; MPG: Método do plaqueamento em gota.

Tabela 2: Valores de Coeficiente de Correlação Intraclasse e respectivo Intervalo de Confiança de 95% para análise da reprodutibilidade entre os três diferentes métodos de plaqueamento de acordo com a espécie de *Candida*.

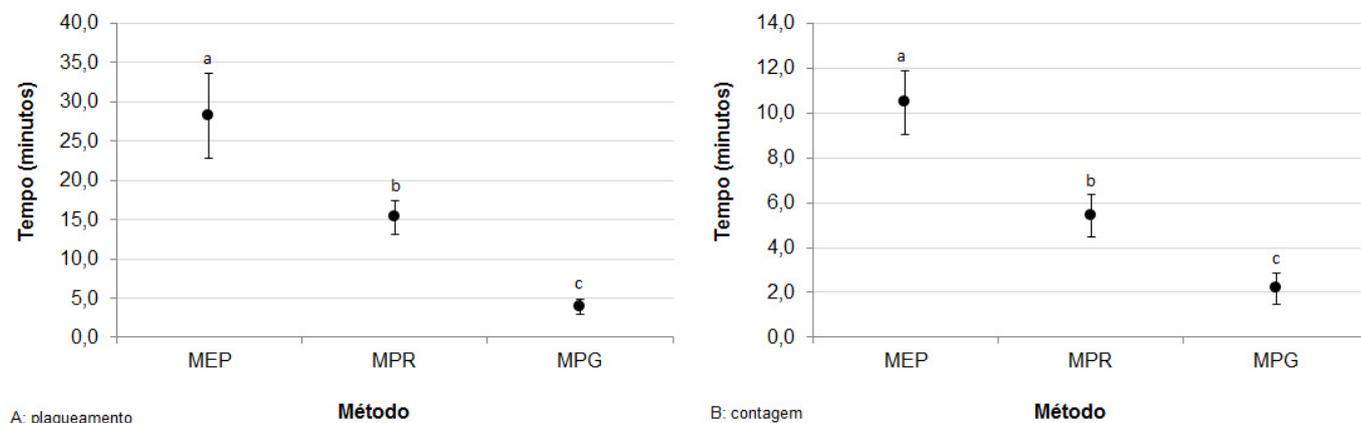
Espécie	CCI	IC _{95%}
<i>Candida albicans</i>	0,997	0,994 0,998
<i>Candida glabrata</i>	0,994	0,989 0,997
<i>Candida krusei</i>	0,993	0,983 0,997
<i>Candida tropicalis</i>	0,946	0,899 0,973

Legenda: CCI: Coeficiente de Correlação Intraclasse; IC_{95%}: Intervalo de Confiança de 95%.

Os resultados também mostraram que os dois métodos alternativos foram capazes de diminuir sensivelmente o tempo de trabalho em

comparação ao método tradicional, no que diz respeito tanto ao plaqueamento quanto à contagem das colônias (Figura 3).

Figura 3: Média do tempo (minutos), e desvio-padrão, para execução do plaqueamento (A) e contagem das colônias (B) das amostras de *Candida* de acordo com o método utilizado. Diferenças entre as médias foram consideradas estatisticamente significativas de acordo com a ANOVA de Welch (A: $F=613,410$; $p<0,001$ /B: $F=422,614$; $p<0,001$). Letras diferentes denotam médias diferentes de acordo com o teste de Games-Howell ($p<0,001$).



DISCUSSÃO

Infecções causadas por espécies de *Candida* estão normalmente associadas à formação de biofilmes pelas espécies fúngicas e são de difícil tratamento.¹ Por essa razão, pesquisas têm tentado compreender os aspectos genéticos e bioquímicos do desenvolvimento de biofilme e da resistência a drogas, bem como conhecer a prevalência em grupos vulneráveis e estabelecer novas estratégias antimicrobianas.³¹⁻³² Em todos esses tipos de estudos, é de fundamental importância quantificar de forma precisa e reprodutível o número de células viáveis nas amostras estudadas.

A estimativa do número de microorganismos viáveis em amostras microbiológicas foi descrita há mais de cem anos e até hoje pode ser considerada um dos pilares da microbiologia. Essa quantificação é habitualmente realizada por meio da contagem do número total de unidades formadoras de colônias (UFC) crescidas em uma placa de ágar a partir de diluições seriadas. O método convencional utilizado para a enumeração das UFC de espécies de *Candida* é

denominado de espalhamento em placas (MEP).¹¹ No entanto, o MEP possui inconvenientes como o tempo despendido para sua execução e o grande volume de material necessário.^{12,14} Por isso, métodos alternativos de plaqueamento têm sido propostos na literatura.

No que se refere à concordância entre os métodos avaliados neste estudo, foi observado que ambos os métodos alternativos (Método do plaqueamento em rastro - MPR e Método do plaqueamento em gota - MPG) resultaram, sistematicamente, em valores de $\log_{10}(\text{UFC}/\text{mL})$ ligeiramente superiores em relação ao método tradicional (MEP). Já vem sendo reportado que o MEP pode subestimar os valores de UFC/mL em comparação com métodos alternativos de plaqueamento.¹¹ A utilização da alça de vidro ou de plástico, necessária para o espalhamento da amostra no MEP, pode provocar danos às células microbianas e afetar o número de UFC dependendo do tempo do espalhamento e da forma de execução, o que poderia explicar os resultados do presente estudo.

A diferença entre as médias foi considerada estatisticamente significativa somente para a espécie *Candida krusei*, sendo que os métodos alternativos foram considerados semelhantes entre si. Dessa forma, apesar da tendência observada no MEP a subestimar o valor de $\log_{10}(\text{UFC/mL})$, parece que esse problema foi de fato evidenciado apenas para a espécie *C. krusei*. O estudo conduzido por Walsh e colaboradores²⁵ também mostrou a ocorrência de correlação mais fraca entre o MEP e a técnica em espiral para *C. krusei*, em comparação com os resultados obtidos com a *Candida albicans* e *Candida glabrata*. O formato das colônias de *C. krusei* é diferente das demais espécies avaliadas, elas têm um crescimento mais espalhado com textura rugosa e podem exigir um menor tempo de incubação a fim de se evitar sobreposição das colônias e consequentemente erro das contagens. Já foi sugerido que, em culturas de única espécie, o tempo de incubação e a diluição selecionada para a contagem podem depender do tamanho das células e das colônias formadas.¹¹ Como a hipótese do dano celular devido à alça utilizada no MEP não foi avaliada em espécies de *Candida*, não se pode afirmar se o MEP subestimou as colônias ou, contrariamente, o MPR e MPG superestimou a estimativa. Apesar de significativa, a diferença na contagem de *C. krusei* observada nesse estudo entre o MEP e os demais métodos não ultrapassou, em média, 0,3 log, o que pode ser uma diferença sem importância prática, a depender da precisão exigida nos diferentes estudos que venham a utilizar os métodos alternativos. Assim, o plaqueamento da espécie *C. krusei* com MPG e MPR ainda deve ser vista com cautela e poderia

Quantificação de colônias de espécies de *Candida* ser investigado futuramente com a utilização de outras cepas como, por exemplo, isolados clínicos.

Ainda assim, a análise de reprodutibilidade apontou uma adequada concordância entre os métodos, uma vez que todos os valores de CCI estiveram acima do valor de 0,71, considerado limite para uma boa concordância. *Candida tropicalis* foi a espécie que apresentou menor valor de CCI e IC_{95%} mais impreciso. Esse resultado já havia sido sugerido pelo gráfico Bland-Altman,³⁰ no qual é possível verificar maior dispersão das diferenças nos valores de $\log_{10}(\text{UFC/mL})$ entre os métodos; algumas amostras apresentaram diferenças maiores que 2 log. Esse resultado mostra a importância de se utilizar mais de um método estatístico na análise para se concluir sobre a confiabilidade entre métodos. Apesar da ANOVA não ter identificado as diferenças nas médias para essa espécie, a decisão esteve próxima do limiar de significância o que também chama atenção para maior cautela na utilização de métodos alternativos para essa espécie.

O presente estudo também buscou realizar uma comparação do tempo do procedimento dos métodos MPG, MPR e MEP para quantificação de espécies de *Candida*. Os dois métodos alternativos foram capazes de diminuir sensivelmente o tempo de trabalho em comparação ao método tradicional. A diminuição do tempo para a realização do plaqueamento já era esperada, uma vez que ambos os métodos (MPG e MPR) possuem etapas muito simplificadas em relação ao MEP, e a duração do procedimento do MPR em espécies bacterianas já havia sido documentada.¹² Com relação à contagem das

Annunzio SR, et al.

colônias, a explicação mais provável para a diminuição do tempo está relacionada ao menor número de UFC obtido pelos métodos alternativos. Tanto no MPR como no MPG, o volume plaqueado é 10 vezes menor em relação ao MEP, e, portanto, um menor número de colônias é esperado. Por essa razão, estudos que utilizam o MPG indicam a contagem das colônias na diluição que apresentar entre 3-30 colônias,¹³ em oposição à recomendação padrão que fica entre 30-300 colônias.^{13,18} Nossos resultados mostraram que a execução do MPG, tanto do plaqueamento quanto contagem de colônias, foi mais rápida que o MPR e significativamente mais rápida que o MEP. Esse resultado está diretamente relacionado com o procedimento do referido método, uma vez que possibilita a utilização da pipeta multicanal e o plaqueamento de pelo menos seis alíquotas em uma mesma placa. Além disso, já foi reportado que quanto maior a concentração de micro-organismos na amostra, maior é a diferença no tempo para contagem das colônias entre o MPG e MEP.¹³ É importante salientar que, apesar do menor volume e, conseqüentemente, menor número de colônias formadas, o valor de UFC considerado é sempre relativo ao volume plaqueado (UFC/mL ou UFC/mg) não havendo, em teoria, discrepâncias justificadas por essas diferenças entre os métodos MPR e MPG com o MEP.

Consideram-se como principais limitações desse estudo a utilização de apenas uma cepa por espécie e a utilização de apenas um tipo de meio de cultura para espécies fúngicas. Por isso, estudos futuros poderiam ampliar o

Quantificação de colônias de espécies de *Candida* conhecimento nesse tema, investigando essas outras variáveis.

CONCLUSÃO

As evidências desse estudo, considerando suas limitações, tornam possível concluir que a hipótese nula de que não existe efeito dos diferentes métodos de plaqueamento no número de colônias recuperadas após o plaqueamento somente pode ser aceita para as espécies *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*. Assim, essas espécies podem ser plaqueadas por meio do método do plaqueamento em rastro (MPR) e método do plaqueamento em gota (MPG) sem nenhum prejuízo à qualidade dos dados obtidos. No entanto, para a espécie *Candida krusei*, podem ser esperadas algumas variações na contagem de colônias em comparação ao método do espalhamento em placas, e, portanto, a utilização dos métodos alternativos deve ser feita com cautela a depender do objetivo e da precisão requerida em cada estudo. Se o objetivo não se basear na estimativa de frequências e prevalência numa dada população, e sim apenas na comparação de número de colônias entre grupos de estudo, acredita-se que os métodos possam ser aplicados sem prejuízos à informação. Em relação ao tempo de execução, a hipótese nula de que não existe efeito dos diferentes métodos de plaqueamento no tempo de execução dos métodos foi rejeitada. MPG e MPR reduziram consideravelmente o tempo de execução do plaqueamento e contagem de colônias das espécies de *Candida*, sendo o MPG aquele que exige menor tempo entre os três métodos.

REFERÊNCIAS

1. Millsop JW, Fazel N. Oral candidiasis. *Clin Dermatol* [Internet]. 2016 Jul [cited 2019 Dec 16]; 34(4):487-94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clindermatol.2016.02.022>
2. Kalantar E, Marashi SM, Pormazaheri H, Mahmoudi E, Hatami S, Barari MA, et al. First experience of *Candida non-albicans* isolates with high antibiotic resistance pattern caused oropharyngeal candidiasis among cancer patients. *J Cancer Res Ther* [Internet]. 2015 Apr [cited 2019 Dec 16]; 11(2):388-90. Available from: <http://dx.doi.org/10.4103/0973-1482.157307>
3. Cortegiani A, Misseri G, Chowdhary A. What's new on emerging resistant *Candida* species. *Intensive Care Med* [Internet]. 2019 Apr [cited 2019 Dec 16]; 45(4):512-515. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00134-018-5363-x>
4. Taei M, Chadeganipour M, Mohammadi R. An alarming rise of non-*albicans* *Candida* species and uncommon yeasts in the clinical samples; a combination of various molecular techniques for identification of etiologic agents. *BMC Res Notes* [Internet]. 2019 Nov [cited 2019 Dec 16]; 12:779-89. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13104-019-4811-1>
5. Brunetti G, Navazio AS, Giuliani A, Giordano A, Proli EM, Antonelli G, et al. *Candida* blood stream infections observed between 2011 and 2016 in a large Italian University Hospital: A time-based retrospective analysis on epidemiology, biofilm production, antifungal agents consumption and drug-susceptibility. *Plos one* [Internet]. 2019 Nov [cited 2019 Dec 16]; 4(11):1-10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0224678>
6. Antinori S, Milazzo L, Sollima S, Galli M, Corbellino M. Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review. *Eur J Intern Med* [Internet]. 2016 Oct [cited 2019 Dec 16]; 34:21-28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejim.2016.06.029>
7. Fernández-Ruiz M, Puig-Asensio M, Guinea J, Almirante B, Padilla B, Almela M, et al. *Candida tropicalis* bloodstream infection: Incidence, risk factors and outcome in a population-based surveillance. *J Infect* [Internet]. 2015 Sep [cited 2019 Dec 16]; 71(3):385-94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2015.05.009>
8. Carmello JC, Dovigo LN, Mima EG, Jorge JH, de Souza Costa CA, Bagnato VS, et al. In vivo evaluation of photodynamic inactivation using Photodithazine® against *Candida albicans*. *Photochem Photobiol Sci* [Internet]. 2015 Jul [cited 2019 Dec 16]; 14(7):1319-28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/c4pp00368c>
9. Dovigo LN, Carmello JC, de Souza Costa CA, Vergani CE, Brunetti IL, Bagnato VS, et al. Curcumin-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans* in a murine model of oral candidiasis. *Med Mycol* [Internet]. 2013 Apr [cited 2019 Dec 16]; 51(3):243-51. Available from: <http://dx.doi.org/10.3109/13693786.2012.714081>
10. Taff HT, Nett JE, Andes DR. Comparative analysis of *Candida* biofilm quantitation assays. *Med Mycol* [Internet]. 2012 Apr [cited 2019 Dec 16]; 50(2):214-8. Available from: <http://dx.doi.org/10.3109/13693786.2011.580016>
11. Thomas P, Sekhar AC, Mujawar MM. Nonrecovery of varying proportions of viable bacteria during spread plating governed by the extent of spreader usage and proposal for an alternate spotting-spreading approach to maximize the CFU. *J Appl Microbiol* [Internet]. 2012 Aug [cited 2019 Aug 30]; 113(2):339-50. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05327.x>
12. Jett BD, Hatter KL, Huycke MM, Gilmore MS. Simplified agar plate method for quantifying viable bacteria. *Biotechniques* [Internet]. 1997 Oct [cited 2019 Aug 30]; 23(4):648-50. Available from: <https://doi.org/10.2144/97234bm22>
13. Herigstad B, Hamilton M, Heersink J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *J Microbiol Methods* [Internet]. 2001 Mar [cited 2019 Aug 30]; 44(2):121-29. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00241-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00241-4)
14. Sieuwerts S, De Bok FA, Mols E, De Vos WM, Vlieg JE. A simple and fast method for determining colony forming units. *Lett Appl Microbiol* [Internet]. 2008 Oct [cited 2019 Aug 30]; 47(4):275-8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02417.x>
15. Hamilton CM, Anderson M, Lape J, Creech E, Woessner J. Multichannel plating unit for high-throughput plating of cell cultures. *Biotechniques* [Internet]. 2002 Sep [cited 2019 Aug 30]; 33(2):420-3. Available from: <https://doi.org/10.2144/02332ht02>
16. McNulty JJ, Dunn JJ. High-throughput transformation and plating using petristrips. *Biotechniques* [Internet]. 1999 Aug [cited 2019 Aug 30]; 26(3):390-2. Available from: <https://doi.org/10.2144/99263bm04>

17. Tornero P, Dangl JL. A high-throughput method for quantifying growth of phytopathogenic bacteria in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* [Internet]. 2002 Jan [cited 2019 Aug 30]; 28(4):475-81. Available from: <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2001.01136.x>
18. Barbosa HR, Rodrigues MF, Campos CC, Chaves ME, Nunes I, Juliano Y, et al. Counting of viable cluster-forming and non cluster-forming bacteria: A comparison between the drop and the spread methods. *J Microbiol Methods* [Internet]. 1995 Apr [cited 2019 Aug 30]; 22(1):39-50. Available from: [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(94\)00062-C](https://doi.org/10.1016/0167-7012(94)00062-C)
19. Robinson SE, Wright EJ, Williams NJ, Hart CA, French NP. Development and application of a spiral plating method for the enumeration of *Escherichia coli* O157 in bovine faeces. *J Appl Microbiol* [Internet]. 2004 Jun [cited 2019 Aug 30]; 97(3):581-9. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02339.x>
20. Dai T, Garcia B, Murray CK, Vrahas MS, Hamblin MR. UVC light prophylaxis for cutaneous wound infections in mice. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2012 Jul [cited 2019 Aug 30]; 56(7):3841-8. Available from: <https://aac.asm.org/content/aac/56/7/3841.full.pdf>
21. Stamps JA, Yang LH, Morales VM, Boundy-Mills KL. *Drosophila* Regulate yeast density and increase yeast community similarity in a natural substrate. *PLoS One* [Internet]. 2012 Jul [cited 2019 Aug 30]; 7(7):1-12. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042238>
22. Garcez AS, Nuñez SC, Hamblin MR, Ribeiro MS. Antimicrobial effects of photodynamic therapy on patients with necrotic pulps and periapical lesion. *J Endod* [Internet]. 2008 Feb [cited 2019 Aug 30]; 34(2):138-42. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.10.020>
23. Kato IT, Prates RA, Sabino CP, Fuchs BB, Tegos GP, Mylonakis E, et al. Antimicrobial photodynamic inactivation inhibits *Candida albicans* virulence factors and reduces in vivo pathogenicity. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2013 Jan [cited 2019 Aug 30]; 57(1):445-51. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3535901/pdf/zac445.pdf>
24. Viljoen A, Twomey PJ. True or not: uncertainty of laboratory results. *J Clin Pathol* [Internet]. 2007 Jun [cited 2019 Aug 30]; 60(6):587-8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1136/jcp.2006.042333>
25. Walsh TJ, Venanzi WE, Dixon DM. Quantification of medically important *Candida* species and *Torulopsis glabrata* by a spiral inoculation system: correlation with pour plate and spread plate methods. *J Clin Microbiol* [Internet]. 1985 Nov [cited 2019 Aug 30]; 22(5):745-7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC268518/pdf/jcm00112-0081.pdf>
26. Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro AP, Brunetti IL, Costa CA, Jacomassi DP, et al. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. *Photochem Photobiol* [Internet]. 2011 Apr [cited 2019 Aug 30]; 87(4):895-903. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2011.00937.x>
27. Chen CY, Nace GW, Irwin PL. A 6x6 drop plate method for simultaneous colony counting and MPN enumeration of *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*. *J Microbiol Methods* [Internet]. 2003 Nov [cited 2019 Aug 30]; 55(2):475-9. Available from: [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(03\)00194-5](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(03)00194-5)
28. McGraw KO, Wong SP. Forming inferences about some intraclass correlations coefficients. *Psychol Methods* [Internet]. 1996 Jan [cited 2019 Aug 30]; 1(1):30-46. Available from: <https://doi.org/10.1037/1082-989X.1.4.390>
29. Fermanian J. Mesure de l'accord entre deux juges. Cas qualitatif. *Rev Epidemiol Sante Publique* [Impresso]. 1984 [cited 2019 Aug 30]; 32(2):140-7.
30. Bland JM, Altman DG. Measuring agreement in method comparison studies. *Stat Methods Med Res* [Internet]. 1999 Apr [cited 2019 Aug 30]; 8(2):135-160. Available from: <https://doi.org/10.1177/096228029900800204>
31. Telles DR, Karki N, Marshall MW. Oral Fungal Infections. *Dent Clin North Am* [Internet]. 2017 Apr [cited 2019 Aug 30]; 61(2):319-349. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cden.2016.12.004>
32. Paulone S, Malavasi G, Ardizzoni A, Orsi CF, Peppoloni S, Neglia RG, et al. *Candida albicans* survival, growth and biofilm formation are differently affected by mouthwashes: an in vitro study. *New Microbiol* [Internet]. 2017 Jan [cited 2019 Dec 16]; 40(1):45-52. Available from: http://www.newmicrobiologica.org/PUB/allegati_pdf/2017/1/45.pdf

Submetido: 2019-11-03

Aceito: 2019-12-15

Publicado: 2019-12-31

COLABORAÇÕES

SRA, FSF, CS e BDR: contribuições substanciais na coleta, análise e interpretação dos dados e na redação do artigo. LND: contribuições substanciais na concepção ou desenho do trabalho; análise e interpretação dos dados e na redação do artigo. Todos os autores concordam e se responsabilizam pelo conteúdo dessa versão do manuscrito a ser publicada.

AGRADECIMENTOS

Não se aplica.

DISPONIBILIDADE DOS DADOS

Não se aplica.

FONTE DE FINANCIAMENTO

FAPESP 2013/03863-0 e 2013/04153-6.

CONFLITOS DE INTERESSE

Não há conflitos de interesses a declarar.

CORRESPONDÊNCIA

Lívia Nordi Dovigo

Endereço: Rua Humaitá, 1680, CEP:14801-903, Araraquara, SP, Brasil

Telefone: +55 (16) 33016552

E-mail: livia.dovigo@unesp.br