

PADRONIZAÇÃO DE INOCULO PARA TESTE DE SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* DO OOMICETO *PYTHIUM INSIDIOSUM* – RESULTADOS PRELIMINARES.

Anelise Oliveira da Silva Fonseca¹; Bianca Delgado Menezes Hofstatter²; Beatriz Persici Maroneze³; Julia Souza Silveira Valente⁴; Daniela Isabel Brayer Pereira⁵; Mário Carlos Araujo Meireles⁶

¹Doutoranda PPG em Veterinária – UFPel; ²Mestranda PPG em Parasitologia – UFPel; ³Graduanda em Medicina Veterinária – UFPel; ⁴Graduanda em Biologia – UFPel; ⁵Departamento de Parasitologia e Microbiologia – Faculdade de Biologia – UFPel; ⁶Prof. Associado – Departamento de Veterinária Preventiva – Faculdade de Veterinária – UFPel – meireles@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

P. insidiosum, oomiceto do Reino Stramenipila (DE COCK et al., 1987), é a única espécie conhecida capaz de causar doença em animais e humanos (MOORE-LANDECKER, 1996). *P. insidiosum* é um microrganismo aquático que para a produção de zoósporos (estruturas infectantes) necessita temperaturas entre 30 e 40°C e acúmulo de água em banhados e lagoas (MILLER; CAMPBELL, 1982). A pitiose é uma doença crônica, piogranulomatosa, frequentemente observada em equinos e caninos e de difícil tratamento. Casos esporádicos também têm sido relatados em bovinos, felinos, ovinos, aves e espécies selvagens mantidas em cativeiro, como jaguar, urso e camelo (SANTURIO et al., 2006). Em humanos, é uma enfermidade de prognóstico desfavorável, sendo comum no sudeste da Ásia (KRAJAEJUN et al., 2006). Vários estudos de suscetibilidade de *P. insidiosum* frente a antifúngicos têm sido realizados nos últimos anos (ARGENTA et al., 2008; 2012; CAVALHEIRO et al., 2009; PEREIRA et al., 2007). Como o CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) não padroniza testes de suscetibilidade a este microrganismo, Pereira et al (2008) padronizaram a técnica de macrodiluição em caldo utilizando inoculo preparado a partir de contagem de zoósporos induzidos pela técnica de zoosporogênese descrita por Mendoza; Prendas (1988). Entretanto, esta metodologia apresenta algumas desvantagens como o tempo para produção dos zoósporos (em torno de 6 dias), ausência de zoosporogênese e dificuldades na obtenção do número de zoósporos para a realização da técnica (Pereira, 2012 – comunicação pessoal). Desta forma, estudos que avaliem metodologias menos laboriosas de preparação de inóculos são necessários. Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar e comparar a suscetibilidade de *P. insidiosum* a antifúngicos utilizando-se duas preparações diferentes de inóculos aplicados a testes *in vitro* de microdiluição em caldo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Isolados de *Pythium insidiosum*: Doze isolados de *P. insidiosum* oriundos de equinos com pitiose foram utilizados para a preparação dos inóculos para testes de suscetibilidade. Todas as amostras foram previamente caracterizadas por métodos morfológicos e moleculares.

Preparação dos inóculos: neste estudo foram utilizadas duas preparações de inóculo. A primeira compreendeu uma suspensão de 20.000 – 30.000 zoósporos/mL de *P. insidiosum*, obtidos por meio da técnica de zoosporogênese, como previamente descrito e padronizado por Pereira et al. (2007). O segundo inóculo foi preparado a partir de uma suspensão de micélio de *P. insidiosum*. Esta suspensão foi obtida a partir do cultivo do microrganismo em ágar levedura incubado durante 96 horas em estufa a 37°C. Estas culturas foram inundadas com 10mL de água destilada estéril e o micélio foi raspado com auxílio de lâmina de bisturi esterilizada. Posteriormente, essa solução foi transferida para um tubo de ensaio e o inóculo obtido foi então ajustado em espectrofotômetro a uma transmitância de 80 a 85% a 530 nm. Ambas as preparações de inóculo foram diluídas 1:10 em caldo RPMI 1640 glicosado e tamponado a pH 7,0 com 0,165 M de MOPS (ácido morfólicoopropanosulfônico).

Para os testes *in vitro* foi realizada a técnica de microdiluição em caldo, em duplicata, de acordo com as normas descritas no documento M38-A2 do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Os antifúngicos usados foram: miconazol, cetoconazol e terbinafina, diluídos primeiramente em DMSO (dimetilsulfóxido) na concentração 1000 vezes maior que a de uso e após em água destilada estéril até se obter as concentrações que variaram de 64 µg/mL até 0,125 µg/mL. A leitura levou em consideração o crescimento ou não de hifas, sendo identificada a concentração inibitória mínima (CIM), definida como a menor concentração em que não houve o crescimento de hifas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados dos testes de suscetibilidade *in vitro* dos 12 isolados de *P. insidiosum* estão especificados na Tabela 1.

Houve diferença entre os MICs de acordo com o tipo de preparação do inóculo. Entretanto, observou-se que, o maior montante de isolados avaliados, tanto com o inóculo com hifas quanto com zoósporos, comportou-se dentro da mesma faixa de variação de MICs, sendo de 4 – 2 µg/mL para miconazol (7 e 8 isolados para inóculo com hifas e zoósporos, respectivamente) e de 16 – 8 µg/mL para terbinafina (10 e 11 isolados para inóculo com hifas e zoósporos, respectivamente). Exceção ocorreu com o cetoconazol onde a maioria dos isolados evidenciou MICs de 8 – 4 µg/mL (9 isolados) quando o teste de suscetibilidade foi realizado com hifas e MICs de 32 – 16 µg/mL (11 isolados) quando o inóculo foi preparado a partir de zoósporos. Sugere-se que a variação entre os valores de MICs observados entre os dois inóculos avaliados podem ser inerentes ao processo de preparação do próprio inóculo. Todavia, o significado e a origem dessas diferenças precisam ser estudadas.

Tabela 1: Valores dos MICs para inóculos de hifas e zoósporos para cada antifúngico testados:

Antifúngico	Hifas MIC* em µg/mL (nº isolados)	Zoósporos MIC* em µg/mL (nº isolados)
Miconazol	16 µg/mL (4)	16 µg/mL (2)
	8 µg/mL (1)	8 µg/mL (2)
	4 µg/mL (2)	4 µg/mL (5)
	2 µg/mL (5)	2 µg/mL (3)
Cetoconazol	32 µg/mL (1)	32 µg/mL (4)
	16 µg/mL (2)	16 µg/mL (7)
	8 µg/mL (4)	8 µg/mL (0)
	4 µg/mL (5)	4 µg/mL (1)
Terbinafina	32 µg/mL (1)	32 µg/mL (0)
	16 µg/mL (6)	16 µg/mL (3)
	8 µg/mL (4)	8 µg/mL (8)
	4 µg/mL (1)	4 µg/mL (1)

* MIC= concentração inibitória mínima

Nos estudos que avaliaram a suscetibilidade *in vitro* de *P. insidiosum* apenas Sekhon et al (1992), utilizou inóculo de hifas, obtendo MICs que variaram de 25 - 12,5 µg/ml para cetoconazol, o que é similar aos MICs encontrados em nosso estudo (4 - 32 µg/mL). Já com miconazol, os MICs apresentaram-se bastante diferentes, variando de 2-32 µg/mL para os 12 isolados aqui avaliados, e de 0,78-0,39 µg/mL nos 8 isolados do trabalho de Sekhon et al (1992).

Cavalheiro et. al (2009) e Argenta et al. (2008, 2011) avaliaram a suscetibilidade de *P. insidiosum* a cetoconazol, miconazol e terbinafina, entre outros fármacos utilizando inóculo padronizado com suspensão de zoósporos. Os resultados desses autores foram similares aos encontrados no presente estudo, em ambos os inóculos avaliados. A preparação do inóculo com zoósporos de *P. insidiosum* é mais trabalhoso, necessitando de maior tempo para sua preparação. Além disso, como utiliza a metodologia da zoosporogênese, a frequência de contaminação é alta e muitas vezes não se consegue obter o número de zoósporos necessários (20.000 a 30.000/mL) a serem empregados nos testes de suscetibilidade. Por outro lado, o emprego de inóculo com hifas de *P. insidiosum* se mostrou menos laborioso, envolvendo menos tempo e menor risco de contaminações secundárias durante sua preparação.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem inferir que o inóculo utilizando suspensão de hifas de *P. insidiosum* pode se constituir numa boa opção para os testes de suscetibilidade *in vitro* com *P. insidiosum*. Entretanto, o significado das diferenças observadas entre os MICs deverá ser melhor avaliado, assim como também é necessário testar-se maior número de isolados para confirmar os resultados.

5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARGENTA JS, ALVES SH, SILVEIRA F, MABONI G, ZANETTE RA, CAVALHEIRO AS, PEREIRA PL, PEREIRA DI, SALLIS ES, PÖTTER L, SANTURIO JM, FERREIRO L. In vitro and in vivo susceptibility of two-drug and three-drug combinations of terbinafine, itraconazole, caspofungin, ibuprofen and fluvastatin against *Pythiuminsidiosum*. *Veterinary Microbiology*.v.157, p 137-142, 2012.
- ARGENTA, J.S., SANTURIO, J.M., ALVES, S.H., PEREIRA, D.I.B., CAVALHEIRO, A.S., SPANAMBERG, A., FERREIRO, L., In vitro activities of voriconazole, itraconazole, and terbinafine alone or in combination against *Pythiuminsidiosum* isolates from Brazil. *Antimicrob.Agents Chemother*.52, 767–769, 2008.
- CAVALEIRO, A.S. ZANETTE,A.R., SPADER, T.B., LOVATO, L., AZEVEDO,M. I., BOTTON, S., ALVES, S.H., SANTURIO, J.M.. *In vitro* activity of terbinafine associated to anphotericin B, fluvastatin, rifanpicin, metronidazole and ibuprofen agint*Pythiuminsidiosum*. *Veterinary Microbiology*. v.137, p. 408-411,2009.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Reference method for broth dilution 143 antifungal susceptibility testing of filamentous fungi : approved standard, 2nd ed. M38-A2. CLSI, 144 Wayne, PA.
- DE COCK, A.W. MENDOZA, L, PADHYE, A A., AJELLO, L., KAUFMAN, L. *Pythiuminsidiosum* sp. nov.the etiologic agent of pythiosis. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 25, n. 2, p. 344-349, 1987.
- KRAJAEJUN, T., SATHAPATAYAVONGS, B., PRACHARKTAM, R., NITIYANANT, P., LEELACHAIKUL, P., WANACHIWANAWIN,W., CHAIPRASERT, A. , ASSANASEN, P., SAIPETCH, T., MOOTSIKAPUN, P., CHETCHOTISAKD, P., LEKHAKULA, A., MITARNUN, W.; KALNAUWAKUL, S., SUPPARATPINYO, S., CHAIWARITH, R., CHIEWCHANVIT, S., TANANUVAT, N., SRISIRI, S., SUANKRATAY, C., KULWICHIT, W., WONGSAISUWAN, M., SOMKAEW, S.Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. *Clinical Infectious Disease*. v. 43, p. 569-576, 2006.
- MENDOZA, L.; PRENDAS, J. A method to obtain rapid zoosporogenesis of *Pythiuminsidiosum*.*Mycopathologia*. v. 104, p. 59-62, 1988.
- MILLER, R.I., CAMPBELL, R.S.F. Clinical observations on equine phycomycosis. *Australian Veterinary Journal*. v. 58, p. 221-226, 1982
- MOORE-LANDECKER, J. Zoosporic Fungi. *Fundamentals of the Fungi*. 4 ed. New Jersey: Prentice Hall, 1996. Cap. 3, p. 33-79.
- PEREIRA, D.I.B., SANTURIO, J.M., ALVES, S.H., ARGENTA, J.S., POTTER, L., SPANAMBERG, A., FERREIRO, L.; Caspofungin in vitro and in vivo activity against Brazilian *Pythiuminsidiosum* strains isolated from animals. *J. Antimicrob. Chemother*. 60, 1168–1171. 2007.
- PEREIRA D.I.B., SANTURIO, J.M., ALVES, S.H., ARGENTA, J.S.,CAVALHEIRO, A.S., FERREIRO, L.; Zoosporogênese in vitro entre isolados do oomiceto*Pythiuminsidiosum*. *Ciência Rural*, v.38, n.1, p.143-147, 2008.
- SANTURIO, J.M., ALVES, S.H.; PEREIRA, D.B.; ARGENTA, J.S. Pitiose: uma micose emergente. *Acta Scientiae Veterinarie*..v. 34, n. 1, p. 1-14, 2006.
- SEKHON, A.S.; PADHYE, A.A.; GARG, A.K.In vitro sensitivity of *Penicilliummarneffe*i and *Pythiuminsidiosum*to various antifungal agents.*European Journal of Epidemiology*. v. 8, n. 3, p. 427-432, 1992.