

Padronização do Meio de Cultura Utilizado no Isolamento Ambiental de *Pythium insidiosum*

Gabriel Gasparini Camargo, Ana Carolina Prado, Daniele Yamauchi, Sandra de Moraes Gimenes Bosco, Botucatu, Instituto de Biociências – IBB, Ciências Biológicas, Gabriel.gasparini@unesp.br

Palavras Chave: concentração inibitória, isolamento ambiental, *Pythium insidiosum*

Introdução

O gênero *Pythium* pertence à classe dos oomicetos, reino Straminopila, filo Oomycota e família Pythiaceae, que soma mais de 200 espécies de distribuição cosmopolita. A maioria das espécies de organismos do gênero *Pythium* são encontrados no solo e como patógenos de plantas, sendo que somente *Pythium insidiosum* é patogênico para mamíferos [2]. A pitiose, doença causada pelo *P. insidiosum*, é emergente e tem maior incidência em ambientes de clima tropical e subtropical, acometendo diferentes espécies de animais, incluindo humanos. A doença é de difícil tratamento, uma vez que o patógeno apresenta características taxonômicas diferentes dos considerados fungos verdadeiros e não possuem ergosterol como principal esteroide cujo é a principal rota de ação de medicamentos anti fúngicos [3]. Estudos têm sido feitos a fim de examinar a distribuição do *P. insidiosum* por meio do isolamento ambiental do organismo em locais de potencial, como plantações de arroz, lagos e lagoas [4]. Um meio de cultura que permita o crescimento do *P. insidiosum* e iniba o crescimento de outros organismos é de interesse para o sucesso do isolamento do oomiceto.

Objetivo

O presente estudo tem como objetivo padronizar meio de cultura utilizado no isolamento ambiental de *Pythium insidiosum* para eliminação de contaminantes presentes nas amostras de água.

Material e Métodos

A determinação da sensibilidade de um micro organismo frente a um fármaco tem como uma das principais metodologias a micro diluição em caldo, a qual permite prever a concentração inibitória mínima [1]. A microdiluição foi realizada em placas de 96 poços, com volume máximo de 200uL. Foram testados e avaliados a ação de quatro fármacos distintos, sendo Gentamicina [50µg/mL] e Cloranfenicol [50µg/mL] como antibióticos e Derosal [500mg/mL] e Anfotericina B [50µg/mL] como antifúngicos. As concentrações testadas, em ug/mL, desses fármacos foram, respectivamente, 160-0,3125; 224-4,375; 12000-23,438 e 32-0,0625. As concentrações iniciais dos fármacos foram determinados basendo-se nos registros encontrados

na literatura, a fim de testar a susceptibilidade do *P. insidiosum* a cada um dos medicamentos. O controle do experimento foi realizado com concentrações determinadas pelo The Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) para organismos conhecidos, como *Candida albicans* SC5314 e *Escherichia coli* ATCC 25922. Para inoculação do *P. insidiosum* foi realizado protocolo de quebra das hifas e contagem em câmara de Neubauer, para posterior diluição em salina 0,9% e até concentração de $2,5 \times 10^3$. A mesma concentração foi utilizada para preparação dos inóculos de controle.

Resultados e Discussão

Até o presente momento o teste de susceptibilidade de duas cepas, ambiental e clínica, de *P. insidiosum* sugere que a cepa obtida por isolamento ambiental é mais susceptível a fármacos quando comparada com a cepa clínica, sobretudo em resposta ao antifúngico Anfotericina B (Tabela 1). Não foi notado crescimento do organismo em concentrações mínimas, sugerindo a necessidade de ajuste no protocolo de fragmentação das hifas, a fim de promover maior viabilidade de crescimento.

Tabela 1: Concentrações inibitórias mínimas de isolados de *Pythium insidiosum*. (-) significa que não houve crescimento da cepa.

	Concentração Inibitória Mínima (ug/mL)	
	Isolado ambiental	Isolado Clínico
Anfotericina B	4,00	16,00
Derosal	-	-
Cloranfenicol	-	8,75
Gentamicina	-	10,00

- CAMPANA, E. H. et al. Avaliação das metodologias M.I.C.E.®, Estest® e microdiluição em caldo para determinação da CIM em isolados clínicos. **Bras Patol Med Lab**, v 47, n.2, p. 157-164, 2011.
- PEREIRA, D. I. B. et al. Caspofungin in vitro and in vivo activity against Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, [s.l.], v. 60, n. 5, p.1168-1171, 17 set. 2007
- Santurio J.M., Alves S.H., Pereira D.B., Argenta J.S. Pitiose: uma micose emergente. **Acta Scientiae Veterinarie**. 34(1): 1-14, 2006.
- SUPABANDHU, J. et al. Isolation and identification of the human pathogen *Pythium insidiosum* from environmental samples collected in Thai agricultural areas. **Medical Mycology**, v. 46, p. 41-52, fev. 2008.