

Proiect CNCSIS PN II – RU: TE_159/2010

EVALUAREA EFECTULUI ANTIFUNGIC AL NANOCONJUGATELOR
UNUI NOU DERIVAT DE PROPICONAZOL CU BETA-CICLODEXTRINĂ

RAPORT ETAPĂ 2010

Obiectiv: Testarea in vitro a efectului antifungic al nanoconjugatelor

Activitate: Încadrarea taxonomică a tulpinilor de proveniență clinică existente în colecția personală de microorganisme

1. Materiale și metode de lucru

1.1. Materialul de studiu a fost reprezentat de 326 tulpini levurice și de fungi filamentoși, de proveniență clinică, care au fost supuse identificării prin aprecierea caracterelor macro- și microscopice, teste fiziologice și biochimice. Toate tulpinile au fost stocate la -80°C până în momentul procesării.

1.2. Echipamente, reactivi și dispozitive

- Recoltoare de unică folosință pentru exsudate
- Medii de cultură: bulion Sabouraud (Merck, Germania), Potatoes Dextrose Agar (Merck, Germania), Agar Sabouraud Chloramphenicol (Biokar Diagnostics, Franța)
- Acid clorhidric, soluție 1N
- Soluție salină fiziologică (0,85% NaCl)
- Blastesis Medium (Bio-rad, Franța)
- Baterie de colorare Gram
- Set McFarland (bioMérieux, Franța)
- Galerii ID32C pentru identificarea levurilor (bioMérieux, Franța)
- Micropipete, pipetă automată
- Densimat (bioMérieux, Franța)
- Baie de termostatare (Mettler, Germania)
- Microscop optic binocular (Micros, Austria)
- Incubator termoreglabil BE200 (Mettler, Germania)
- Soft APIweb 1.2.1 pentru lecturarea galeriilor (bioMérieux, Franța)
- CandiSelect medium (Bio-rad, Franța)
- Lactofenol cu albastru de anilină (Merck, Germania)
- Lame, lamele
- Anse microbiologice calibrate, de unică folosință

1.3. Metode de lucru

a) **purificarea izolatelor.** Tulpinile izolate au fost repicate pe medii corespunzătoare și incubate 24-48 ore la $36^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (levurile) sau 72-96 ore la $30^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (fungii filamentoși). Levurile au fost verificate prin colorația Gram pentru eventuala contaminare bacteriană, indezirabilă în acțiunea ulterioară de identificare a speciei. Cele depistate ca fiind

contaminate bacterian în urma examinării microscopice a frotiurilor colorate Gram au fost pasate în bulion Sabouraud aditivat cu acid clorhidric, soluție 1N, conform schemei prezentate în figura nr. 1. Tulpinile au fost reincubate 24-48 ore la $36^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, apoi subcultivate pe CandiSelect pornind de la cultura dezvoltată în tubul aditivat cu cantitatea cea mai mare de acid clorhidric-soluție 1N. Mediul candiSelect permite evidențierea culturilor mixte de levuri, conținând două sau mai multe specii. Tulpinile astfel purificate au fost ulterior folosite pentru testele de identificare a speciei. În cazul fungilor filamentoși, din culturile obținute, s-a repicat o colonie izolată care a fost transferată pe un nou mediu de cultivare și utilizată pentru identificare prin teste morfologice.

b) **identificarea levurilor.** S-a realizat folosind metodologia prezentată schematic în figura nr. 2.

- *testul de filamentare (testul de blasteză).* În fiole cu Blastesis medium, s-au adăugat 0,5 ml suspensie levurică, iar apoi fiolele au fost menținute în baia de termostatare la 36°C timp de 2 ore. Suspensia levurică s-a preparat în soluție salină fiziologică, densitatea acesteia ajustându-se la 0,5 Mc Farland (cca. 10^6 celule/ml). După expirarea celor 2 ore, fiolele au fost agitate și din fiecare amestec am prelevat un volum de 25 μl care a fost etalat apoi între lamă și lamelă în amestec cu un volum similar de lactofenol colorat cu albastru de anilină. Preparatul extemporaneu astfel obținut a fost examinat la microscop ($\times 400$) în vederea decelării tubilor germinativi caracteristici tulpinilor de *Candida albicans* și *Candida dubliniensis*. Ca martor al filamentării, am utilizat de fiecare dată tulpina-tip *Candida albicans* ATCC 10231 (figura nr. 3).

- *cultivarea izolatelor la 45°C* – ca mijloc de diferențiere între tulpinile de *Candida albicans* și *Candida dubliniensis* – este un test a cărui sensibilitate și specificitate trebuie încă evaluate. Totuși, am utilizat acest test pentru o triere mai judicioasă a izolatelor, dată fiind simplitatea sa tehnică. Tulpinile care tolerează pentru dezvoltare temperatura de 45°C aparțin speciei *Candida albicans*.

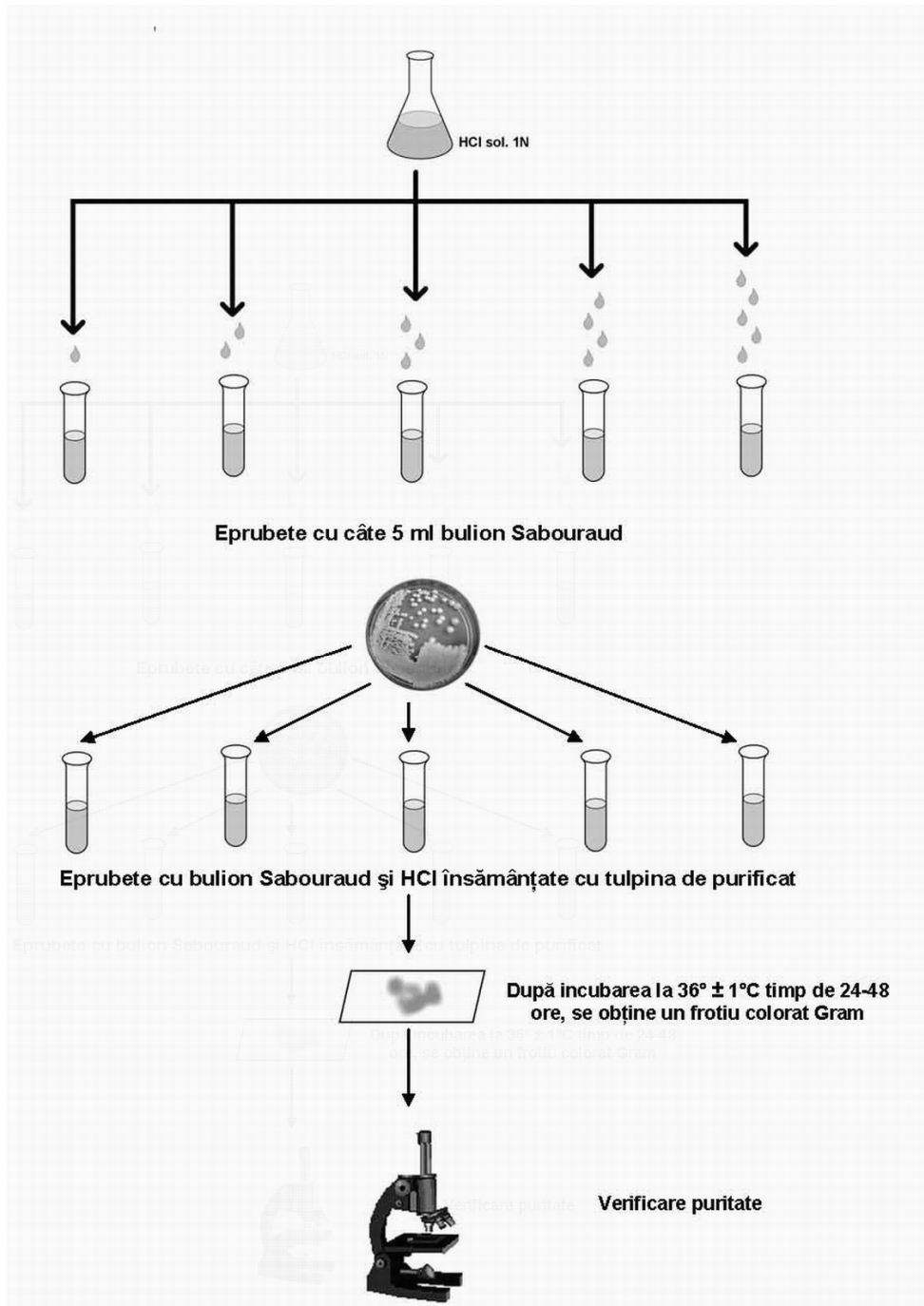


Figura nr. 1. Purificarea izolatelor – metodologie de lucru

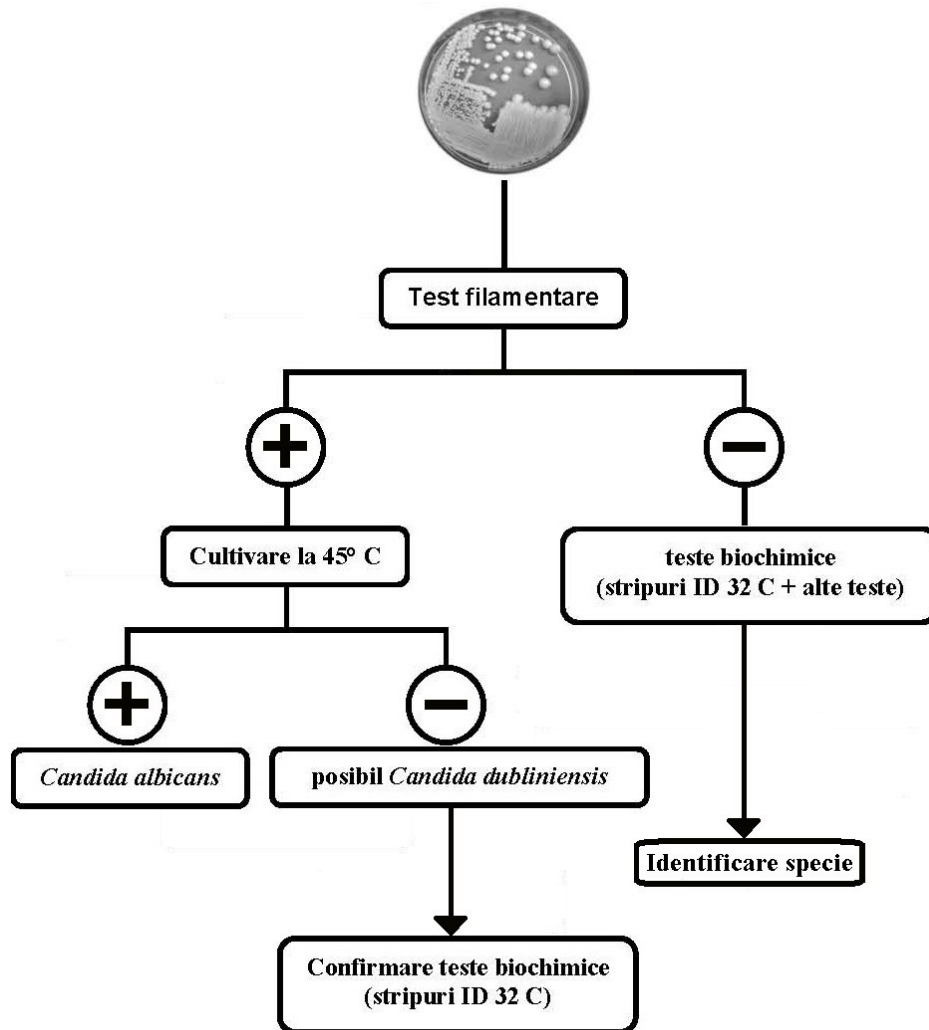


Figura nr. 2. Schema identificării izolatelor.

- *testele biochimice*. Tulpinile care nu au produs tubi germinativi prin incubare în Blastesis Medium, au fost considerate specii non-*albicans*/non-*dubliniensis* ale genului *Candida* sau aparținând altor genuri de levuri, ceea ce a impus investigarea fenotipului lor biochimic în vederea identificării. În acest sens, au fost utilizate galeriile ID32C – un sistem standardizat de identificare a levurilor pe baza a 32 teste de asimilare a diferitelor substraturi. Fiecare godeu al galeriei ID32C conține un substrat aparte, într-o cantitate prestabilită.

Prepararea inoculului presupune două etape:

- Pregătirea suspensiei de levuri cu densitatea 2 McFarland, utilizând culturi purificate, în vârstă de 20-24 ore, fiole *API® Suspension Medium* și dispozitivul *Densimat*.

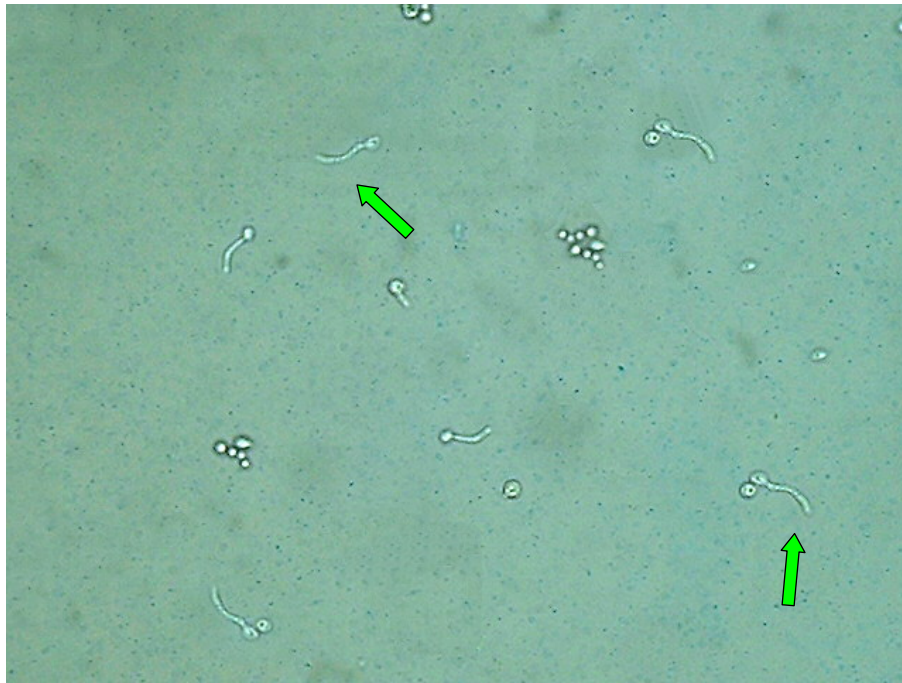
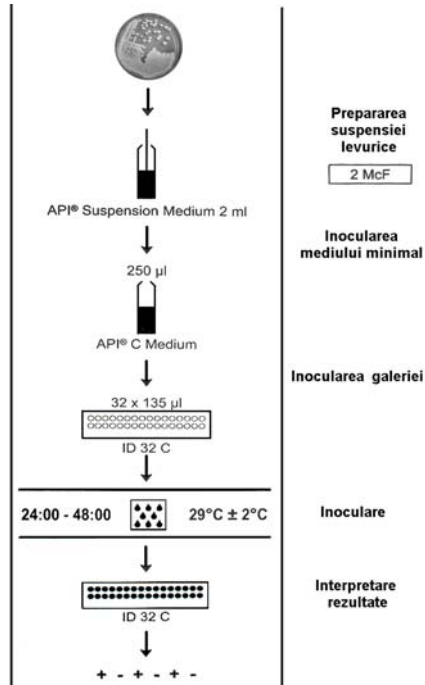


Figura nr. 3. *Candida albicans* – tubi germinativi (preparat extemporanu cu lactofenol Amann și albastru de anilină); x 400

- Însămânțarea mediului minimal semisolid (*API[®] C Medium*) cu un volum de 250 μ l suspensie levurică, urmată de omogenizarea acestora cu ajutorul pipetei automate *ATB[®]*. Modul de lucru este prezentat în fig. 4.

Inocularea galeriilor ID32C s-a realizat imediat după obținerea inoculului, prin distribuirea



unui volum de 135 μ l în fiecare godeu al galeriei, folosind pipeta electronică *ATB[®]* (figura nr. 5). Galeria inoculată au fost acoperite cu un capac de protecție și incubate la $30^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ timp de 24-48 ore.

Citirea și interpretarea rezultatelor s-a realizat în mod automatizat după 24 ore de incubare, utilizând *softul APIweb 1.2.1* de identificare on-line a speciilor levurice (figura nr. 6). Galeria pentru care indicațiile *softului* au fost “discriminare slabă”, “profil dubios sau inacceptabil” sau “identificare invalidă înainte de 48 ore”, au fost

reincubate 24 ore la $30^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ și interpretarea rezultatelor refăcută după expirarea acestui interval. În cazul în care *soft-ul APIweb* a indicat efectuarea unor teste suplimentare, acestea au fost realizate pentru a asigura o

Figura nr. 4. Inocularea galeriilor ID 32C

acuratețe mai crescută a identificării.

c) *identificarea fungilor filamentoși*. S-a realizat prin coroborarea caracterelor macroscopice (aspectul coloniei, viteza de creștere, culoarea aversului și reversului coloniei) și microscopice (morfologia corpurilor fructificanți și a sporilor, tipul de conidiogeneză, dimensiunea acestora). Pentru examinarea microscopică s-au utilizat preparate extemporanee între lamă și lamelă, precum și preparate obținute cu bandă adezivă, folosindu-se ca lichid disociant – lactofenolul Amann cu albastru de anilină.

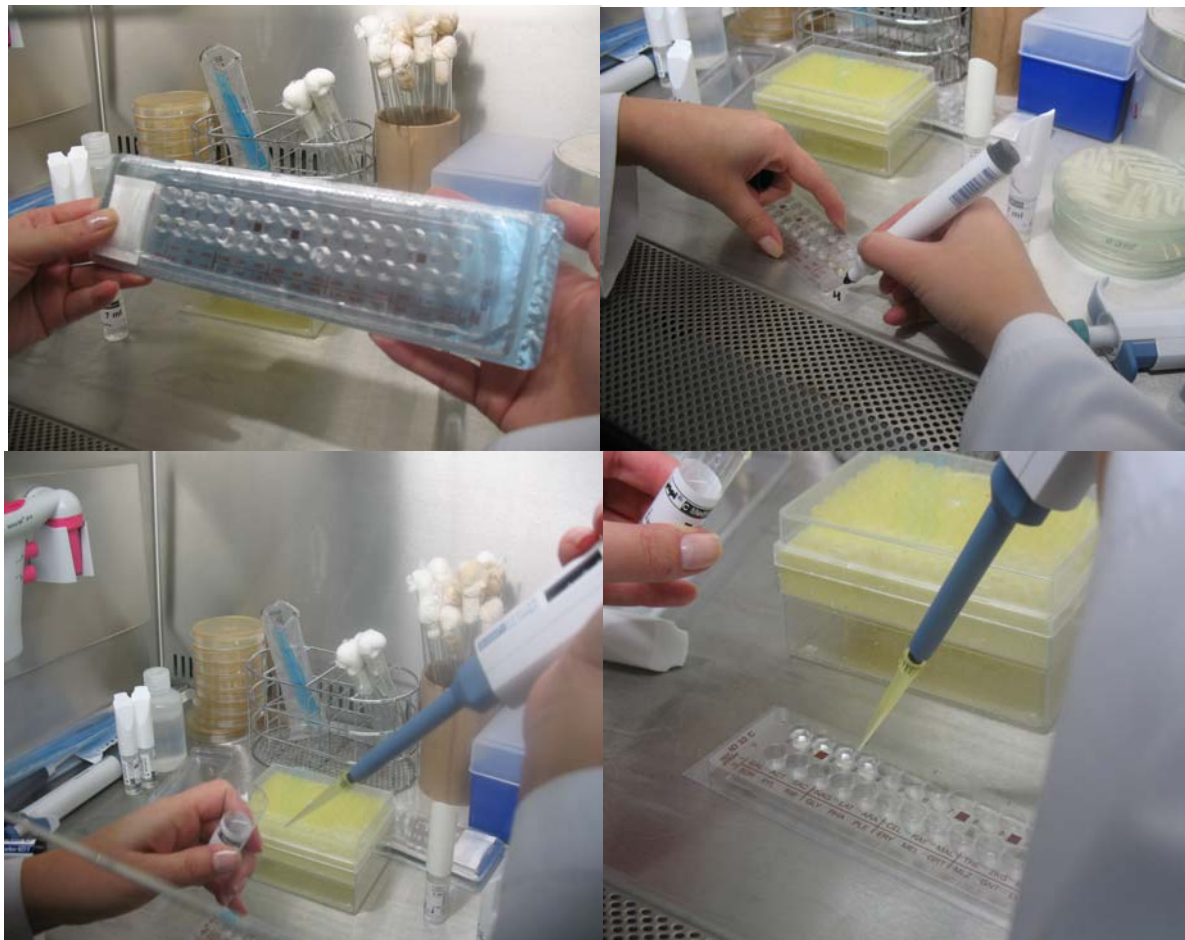


Figura nr. 5. Pregătirea și inocularea galeriilor ID32C

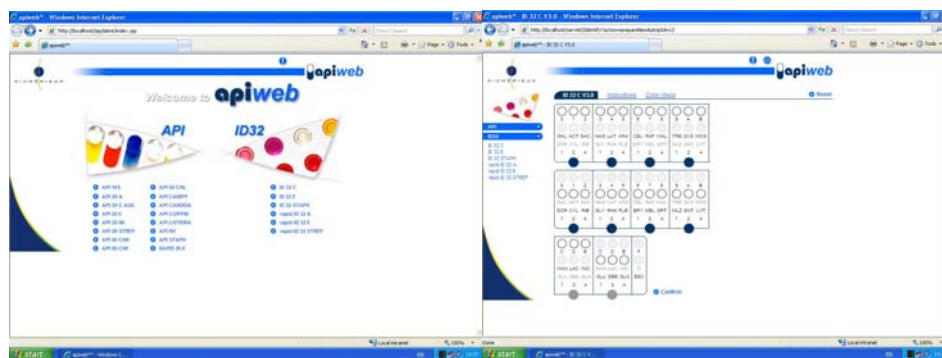


Figura nr. 6. Interfața softului APIweb 1.2.1

2. Rezultate

În urma procesării tulpinilor fungice, au fost izolate următoarele specii ce vor constitui baza testărilor ulterioare pentru noul derivat de propiconazol cuplat cu beta-ciclodextrină (MXP4509):

- *Acremonium* sp. (n=1)
- *Alternaria alternata* (n=1)
- *Aspergillus ochraceus* (n=1)
- *A. terreus* (n=1)
- *A. niger* (n=1)
- *A. flavus* (n=2)
- *A. fumigatus* (n=5)
- *Candida albicans* (n=99)
- *C. krusei* (n=14)
- *C. parapsilosis* (n=48)
- *C. pelliculosa* (n=4)
- *C. glabrata* (n=24)
- *C. dubliniensis* (n=2)
- *C. intermedia* (n=3)
- *C. guilliermondii* (n=9)
- *C. kefyri* (n=14)
- *C. inconspicua/norvegensis* (n=5)
- *C. lipolytica* (n=9)
- *C. lusitaniae* (n=3)
- *C. lambica* (n=5)
- *C. tropicalis* (n=5)
- *C. sphaerica* (n=8)
- *C. pulcherrima* (n=1)
- *C. valida* (n=3)
- *C. zeylanoides* (n=3)
- *C. famata* (n=2)
- *C. colliculosa* (n=3)
- *C. catenulata* (n=1)
- *C. sake* (n=2)
- *Cryptococcus curvatus* (n=2)
- *C. laurentii* (n=2)
- *C. neoformans* (n=4)
- *Epidermophyton floccosum* (n=1)
- *Geotrichum capitatum* (n=8)
- *Microascus cirrosus* (n=1)
- *Microsporum audouinii* (n=1)
- *M. gypseum* (n=1)
- *M. cookei* (n=1)
- *M. persicolor* (n=1)
- *Penicillium citrinum* (n=1)
- *Rhizopus stolonifer* (n=1)
- *Rhodotorula mucilaginosa* (n=2)
- *Saccharomyces cerevisiae* (n=7)
- *Trichosporon asahii* (n=8)
- *T. inkin* (n=1)
- *T. mucoides* (n=1)
- *Trichophyton rubrum* (n=1)
- *T. mentagrophytes* (n=1)
- *T. terrestre* (n=1)
- *T. ajelloi* (n=1)