

DIMETILSULFÓXIDO - DMSO NO TESTE DE SENSIBILIDADE MICROBIANA *in vitro* EM CEPAS DE *Rhodococcus equi* ISOLADAS DE AFECÇÕES PULMONARES EM POTROS

In vitro EFFECT OF DIMETHYL SULFOXIDE - DMSO IN ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TEST OF *Rhodococcus equi* ISOLATED FROM PULMONARY INFECTIONS IN FOALS

Márcio Garcia Ribeiro¹ Aldo Santana de Carvalho Filho² Fernando José Paganini Listoni³

- NOTA -

RESUMO

Comparou-se a sensibilidade microbiana *in vitro* de isolados de *Rhodococcus equi* pelo teste padrão de difusão com discos, com o modificado, pela adição de 5% de dimetilsulfóxido-DMSO. Observou-se aumento da sensibilidade do *R. equi* no teste com DMSO, frente a aminoglicosídeos (canamicina, amicacina, estreptomicina) e ao cloranfenicol, enquanto para a eritromicina e derivados β -lactâmicos (penicilina G, cefalosporinas, amoxicilina, oxacilina), constatou-se redução da sensibilidade do agente.

Palavras-chave: *Rhodococcus equi*, sensibilidade microbiana, dimetilsulfóxido, afecções pulmonares em potros.

SUMMARY

In vitro antimicrobial susceptibility of strains of *Rhodococcus equi* by standard diffusion disk test and a modified method, by the addition dimethyl sulphoxide (5%), was evaluated. Increase in sensitivity of *R. equi* using modified method was observed in aminoglycosides group (kanamycin, amikacin, streptomycin) and chloramphenicol, while erythromycin and β -lactam derivatives (penicillin G, cephalosporins, amoxicillin, oxacillin) showed a reduction in sensitivity to the agent.

Key words: *Rhodococcus equi*, antimicrobial susceptibility test, dimethyl sulphoxide, pneumonia in foals.

Rhodococcus equi (*R. equi*) é reconhecido como patógeno de distribuição mundial, intracelular facultativo, oportunista, relacionado a afecções de difícil tratamento no homem e animais (LINDER, 1997). No homem, as infecções por *R. equi* têm sido descritas em indivíduos severamente comprometidos, como convalescentes de transplantes, pacientes com neoplasias malignas, sob terapia imunossupressiva, acometidos pela síndrome da imunodeficiência adquirida-AIDS (MOSSER & HONDALUS, 1996), ou mesmo em indivíduos saudáveis, especialmente crianças (MACGOWAN & MANGANO, 1991). Nos animais, o *R. equi* é considerado o principal agente etiológico no desenvolvimento de pneumonia em potros (GIGUÈRE & PRESCOT, 1997).

As limitações no sucesso da terapia antimicrobiana do *R. equi* têm gerado nos últimos anos, estudos de sensibilidade *in vitro* do agente, mediante ensaios com novas drogas (GIGUÈRE & PRESCOT, 1997; PRONOST *et al.*, 1997), bem como a associação de antimicrobianos com substâncias permeabilizantes de membranas celulares, como o dimetilsulfóxido-DMSO (POOTZ *et al.*, 1967). O DMSO é um produto com mais de

¹Disciplina de Enfermidades Infecciosas dos Animais, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública (DHVSP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista (UNESP), CP 560, 18618-000, Botucatu-SP. E-mail: mgribeiro@fmvz.unesp.br. Autor para correspondência.

²Acadêmico de Medicina Veterinária - FMVZ - UNESP/Botucatu-SP, Bolsista de Iniciação Científica-Programa PIBIC - CNPq - UNESP.

³Auxiliar técnico - DHVSP - FMVZ - UNESP/Botucatu-SP.

30 ações farmacológicas primárias, de baixa toxicidade, empregado há várias décadas em medicina humana e veterinária (JACOB, 1982; ALVES, 1998). A ação permeante de membranas biológicas do DMSO (JACOB, 1982) tem permitido a sua utilização como potencializador de drogas antibacterianas, antifúngicas, antivirais e antiparasitárias (POOTZ *et al.*, 1967; BRAYTON, 1986). Considerando a refratariedade do *R. equi* à terapia com antimicrobianos convencionais, o presente estudo objetivou investigar a sensibilidade microbiana *in vitro* em isolados do agente, de origem animal, no teste padrão de difusão com discos, comparativamente ao método modificado, pela adição do DMSO.

Foram utilizados 30 isolados de *Rhodococcus equi* oriundos de afecções pulmonares em potros, obtidos do material de Diagnóstico Microbiológico da FMVZ-UNESP/Botucatu-SP; da Universidade Federal de Santa Maria-RS e da Coleção de Culturas do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo-SP, bem como duas cepas padrão de *R. equi* (ATCC 33.701 – e ATCC 33.701 +), cedidas pelo Instituto de Biociências da UNESP/Botucatu-SP, provenientes da Faculdade de Medicina Veterinária de Ontário (Guelph), Canadá; totalizando a avaliação de 32 cepas de *R. equi*.

Os 30 isolados de *R. equi* e as duas cepas ATCC foram submetidos ao teste padrão de sensibilidade microbiana *in vitro*, pelo método de difusão com discos (BAUER *et al.*, 1966), e ao modificado, pela adição do DMSO a 5%, não autoclavado (CORRÊA & CORRÊA, 1992), frente a 26 antimicrobianos (Tabela 1). O DMSO (puro para análise-Synth) foi adicionado asépticamente ao meio de Müller-Hinton, após a autoclavação e resfriamento do meio, antes da disposição nas placas de Petri. Em cinco dos isolados de *R. equi* (incluindo as duas ATCC), realizou-se o teste modificado com o DMSO a 10% e 20%.

A análise estatística foi realizada mediante a comparação entre duas proporções com amostras dependentes, pelo teste de χ^2 de McNemar (CURI, 1997), considerando diferença significativa para valores de $P < 0,05$.

Os maiores índices de sensibilidade do *R. equi* na prova padrão foram observados para a eritromicina (100,0%), vancomicina (100,0%), rifampicina (97,0%) e neomicina (94,0%) (Tabela 1). Em medicina veterinária, a associação entre rifampicina e eritromicina tem sido apontada como a terapia de eleição para a rodococose pulmonar (PRONOST *et al.*, 1998). A alta sensibilidade *in vitro* do *R. equi* à eritromicina e a rifampicina verificada no presente estudo, ratifica a condição

destas drogas, como de primeira escolha na indicação terapêutica de afecções pulmonares pelo *R. equi* em potros. Entretanto, de maneira geral, observaram-se altos índices de resistência do agente, especialmente para os derivados β -lactâmicos (Tabela 1). Este resultado concorda com os obtidos por PRESCOTT (1991) e GIGUÈRE & PRESCOTT (1997), cujos estudos também evidenciaram alta resistência do *R. equi* em ensaios de sensibilidade *in vitro* frente a antimicrobianos convencionais.

No método modificado com o DMSO, observou-se, no presente estudo, aumento estatisticamente significativo ($P < 0,05$) da sensibilidade do *R. equi* para canamicina, amicacina, estreptomicina e cloranfenicol, além do acréscimo na efetividade de outras drogas (enrofloxacina, ciprofloxacina, doxiciclina e gentamicina). CORRÊA *et al.* (1981) investigando o mesmo método em microrganismos isolados de mastite bovina, também concluíram que a adição do DMSO favoreceu a ação *in vitro* do cloranfenicol, estreptomicina, neomicina e furadantina. O mecanismo de ação dos aminoglicosídeos e do cloranfenicol depende, fundamentalmente, da veiculação dos princípios ativos para o interior dos microrganismos, proporcionando a atuação destas drogas no ribossoma bacteriano (TAVARES, 1996). No presente estudo, a propriedade permeante de membranas biológicas atribuídas ao DMSO (JACOB, 1982), pode ter favorecido a difusão dos aminoglicosídeos e do cloranfenicol pela parede bacteriana do *R. equi*, otimizando o mecanismo de ação destas drogas, resultando no incremento da sensibilidade do agente.

Ainda que a adição do DMSO tenha favorecido a sensibilidade *in vitro* do único isolado de *R. equi* resistente à rifampicina, em contrapartida, constatou-se 41% de redução na sensibilidade do agente à eritromicina, bem como redução na efetividade dos derivados β -lactâmicos (com exceção do imipeném) (Tabela 1). WOOD & WOOD (1975) já haviam alertado para esse efeito, embora não esclarecessem se seria decorrente da estimulação e/ou favorecimento do DMSO à produção de enzimas pelos microrganismos (semelhantes às β -lactamases), que inativassem a ação de determinados antimicrobianos. Estes resultados alertam para a limitação da indicação do DMSO no tratamento antimicrobiano de eleição da rodococose em potros (associação entre rifampicina e eritromicina), em virtude da possível redução na atividade da eritromicina.

Não foi possível a avaliação *in vitro* do DMSO a 10 e a 20%, em virtude da ausência de crescimento dos cinco isolados de *R. equi* nestas

Tabela 1 - Sensibilidade microbiana em isolados de *Rhodococcus equi* na prova padrão de difusão com discos e na modificada, pela adição do dimetilsulfóxido-DMSO.

ANTIMICROBIANOS (concentração da droga)	Sensibilidade sem DMSO			Sensibilidade com DMSO		
	No. de isolados sensíveis / No. de isolados testados (%)			No. de isolados sensíveis / No. de isolados testados (%)		
	sensível	intermediária	resistente	sensível	intermediária	resistente
Amicacina (30mcg)	19/32 (59)	9/32 (28)	4/32 (13)	31/32 (97)	1/32 (3)	0/32 (0)
Amoxicilina (10mcg)	3/32 (9)	0/32 (0)	29/32 (91)	1/32 (3)	1/32 (3)	30/32 (94)
Amox./Ác. Clav. (30mcg)	22/32 (68)	6/32 (19)	4/32 (13)	2/32 (6)	14/32(44)	16/32(50)
Ampicilina (10mcg)	4/32 (13)	5/32 (16)	23/32 (71)	4/32 (13)	7/32 (22)	21/32 (65)
Canamicina (30mcg)	0/32 (0)	10/32 (31)	22/32 (69)	16/32 (50)	15/32 (47)	1/32 (3)
Cefalexina (30mcg)	0/32 (0)	0/32 (0)	32/32 (100)	0/32 (0)	0/32 (0)	32/32 (100)
Cefalotina (30mcg)	1/32 (3)	0/32 (0)	31/32 (97)	0/32 (0)	0/32 (0)	32/32 (100)
Cefazolina (30mcg)	3/32 (9)	1/32 (3)	28/32 (88)	2/32 (6)	0/32 (0)	30/32 (94)
Cefotaxima (30mcg)	7/32 (22)	11/32 (34)	14/32 (44)	2/32 (6)	0/32 (0)	30/32 (94)
Ciprofloxacina (5mcg)	21/32 (66)	10/32 (31)	1/32 (3)	25/32 (78)	6/32 (19)	1/32 (3)
Cloranfenicol (30mcg)	7/32 (22)	19/32 (59)	6/32 (19)	15/32 (47)	14/32 (44)	3/32 (9)
Doxiciclina (30mcg)	27/32 (84)	4/32 (13)	1/32 (3)	30/32 (94)	2/32 (6)	0/32 (0)
Enrofloxacin (5mcg)	11/32 (34)	18/32 (57)	3/32 (9)	17/32 (53)	13/32 (41)	2/32 (6)
Eritromicina (15mcg)	32/32 (100)	0/32 (0)	0/32 (0)	19/32 (59)	13/32 (41)	0/32 (0)
Estreptomicina (10mcg)	18/32 (56)	7/32 (22)	7/32 (22)	30/32 (94)	2/32 (6)	0/32 (0)
Gentamicina (10mcg)	29/32 (91)	2/32 (6)	1/32 (3)	32/32 (100)	0/32 (0)	0/32 (0)
Imipeném (10mcg)	27/32 (84)	0/32 (0)	5/32 (16)	28/32 (87)	0/32 (0)	4/32 (13)
Lincomicina (2mcg)	0/32 (0)	0/32 (0)	32/32 (100)	0/32 (0)	0/32 (0)	32/32 (100)
Metronidazole (50mcg)	0/32 (0)	0/32 (0)	32/32 (100)	0/32 (0)	0/32 (0)	32/32 (100)
Neomicina (30mcg)	30/32 (94)	0/32 (0)	2/32 (6)	32/32 (100)	0/32 (0)	0/32 (0)
Oxacilina (5mcg)	1/32 (3)	0/32 (0)	31/32 (97)	0/32 (0)	0/32 (0)	32/32 (100)
Penicilina G (10UI)	1/32 (3)	0/32 (0)	31/32 (97)	0/32 (0)	0/32 (0)	32/32 (100)
Rifampicina (5mcg)	31/32 (97)	0/32 (0)	1/32 (3)	32/32 (100)	0/32 (0)	0/32 (0)
Sulfa/Trimetoprim (25mcg)	0/32 (0)	5/32 (16)	27/32 (84)	2/32 (6)	0/32 (0)	30/32 (94)
Tetraciclina (30mcg)	2/32 (6)	18/32 (56)	12/32 (38)	0/32 (0)	10/32 (31)	22/32 (69)
Vancomicina (30mcg)	32/32 (100)	0/32 (0)	0/32 (0)	32/32 (100)	0/32 (0)	0/32 (0)

mcg = microgramas No. = número de cepas

mm = milímetro

Amox./Ác. Clav. = Amoxicilina/Ácido Clavulânico

Sulfa = Sulfadiazina

concentrações da droga. Estes dados discordam dos obtidos por CORRÊA *et al.* (1981), que empregaram o DMSO a 20% na técnica de difusão com discos, frente a outros microrganismos. Entretanto, posteriormente, CORRÊA & CORRÊA (1992) assinalaram inibição do crescimento de microrganismos nesta concentração, provavelmente pela atividade bacteriostática ou bactericida do produto a 20%, sugerindo a sua utilização a 5% no teste modificado *in vitro*.

Para as drogas de aplicação em medicina humana na terapia do *R. equi*, observou-se alta sensibilidade do agente para vancomicina, doxiciclina e imipeném, superiores respectivamente,

a 84% e 88%, sem e com a adição do DMSO (Tabela 1). Apesar da efetividade *in vitro* destas drogas, o seu uso em humanos não tem surtido efeito clínico satisfatório (SAMIES *et al.*, 1986), resultado que, aliado ao custo e à apresentação somente para a linha humana tem, provavelmente, impossibilitado seu uso em equinos.

Denota-se no presente estudo, aumento na sensibilidade *in vitro* dos isolados de *R. equi* na prova modificada com o DMSO, para o grupo dos aminoglicosídeos e para o cloranfenicol, provavelmente pelo incremento na difusão destas drogas pela parede bacteriana, favorecendo o mecanismo de ação destes antimicrobianos. Estes

resultados sugerem estudos da eficácia destas drogas em associação ao DMSO nas infecções por *R. equi* em potros, visando protocolos terapêuticos alternativos para a rodococose equina. Entretanto, alerta-se para restrições na utilização de drogas que apresentaram redução da eficiência *in vitro* quando associadas ao DMSO, como os derivados β -lactâmicos, e principalmente, a eritromicina, considerada de eleição na terapia da rodococose equina.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Agueda Castagna de Vargas da UFSM-RS e ao Prof. Dr. Antônio Carlos Paes da FMVZ-UNESP/Botucatu-SP, bem como a Coleção de Culturas do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo-SP, pela cessão de isolados de *R. equi*; e ao Instituto de Biociências da UNESP/Botucatu-SP pelas cepas ATCC de *R. equi*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, G.E.S. Dimetilsulfóxido (DMSO). *Saúde Equina*, n.6, p.6-10, 1998.
- BAUER, A.W., KIRBY, W.M.M., SHERRIS, J.C., *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, v.45, p.493-496, 1966.
- BRAYTON, C.F. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *Cornell Vet.*, v.76, p.61-90, 1986.
- CORRÊA, W.M., CORRÊA, C.N.M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2.ed. Rio de Janeiro : Medsi, 1992. Mastites: p.117-131.
- CORRÊA, W.M., CORRÊA, C.N.M., LANGONI, H., *et al.* Ensaio "in vitro" de drogas antibacterianas e associadas ao dimetil sulfóxido (DMSO). *Arq Esc Vet UFMG*, Belo Horizonte, v.33, p.449-453, 1981.
- CURI, P.R. **Metodologia e análise da pesquisa em ciências biológicas**. Botucatu : Tipomic, 1997. 263p.
- GIGUÈRE, S., PRESCOTT, J.F. Clinical manifestations, diagnosis, treatment, and prevention of *Rhodococcus equi* infections in foals. *Veterinary Microbiology*, v.56, p.313-334, 1997.
- JACOB, S. DMSO. Mode of action and biologic effects. *Veterinary Medicine*, p.365-376, 1982.
- LINDER, R. *Rhodococcus equi* and *Corynebacterium haemolyticum*: Two "Coryneform" bacteria increasingly recognized as agents of human infection. *Emerging Infectious Diseases*, v.3, p.1-10, 1997.
- MACGOWAN, K.L., MANGANO, M.F. Infections on *Rhodococcus equi* in children. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v.14, p.347-352, 1991.
- MOSSER, D.M., HONDALUS, M.K. *Rhodococcus equi*: an emerging opportunistic pathogen. *Trends in Microbiology*, v.4, p.29-33, 1996.
- POOTZ, G., RAMPEY, J.H., BENJAMIN, F. The effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) in antibiotic sensitivity of a group of medically important microorganisms. A preliminary report. *Annales of New York Academic Press*, v.141, p.261-272, 1967.
- PRESCOTT, J.F. *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, v.4, p.20-34, 1991.
- PRONOST, S., FORTIER, G., LEGENDRE, M.F., *et al.* *Rhodococcus equi*: nouvelles approches et bilan de trois années d'études au laboratoire. *Prat Vét Equine*, v.30, p.57-65, 1998.
- SAMIES, J.H., HATHAWAY, B.N., ECHOLS, R.M., *et al.* Lung abscess due to *Corynebacterium equi*. Report of the first case in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Med*, v.80, p.685-688, 1986.
- TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos**. 2.ed. São Paulo : Atheneu, 1996. 792p.
- WOOD, D.C., WOOD, J. Pharmacologic and biochemical considerations of dimethyl sulfoxide. *Ann N Y Acad Sci*, v.243, p.7-19, 1975.