

## ISOLAMENTO DE *PYTHIUM INSIDIOSUM* EM AMBIENTES AQUÁTICOS NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

**SILVEIRA, Júlia de Souza<sup>1</sup>; CORRÊA, Bruna Ferraz<sup>1</sup>; BOTTON, Sônia de Avila<sup>2</sup>; AZEVEDO, Maria Isabel de<sup>2</sup>; PEREIRA, Daniela Isabel Brayer<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas- Universidade Federal de Pelotas-RS; <sup>2</sup> Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI)-Universidade Federal de Santa Maria-RS; <sup>3</sup> Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Laboratório de Micologia, Instituto de Biologia-Universidade Federal de Pelotas-RS.

### 1 INTRODUÇÃO

Segundo Kirk et al. (2001), o gênero *Pythium* possui 127 espécies conhecidas, de distribuição cosmopolita, sapróbias em ecossistemas terrestres e aquáticos e/ou parasitas. Dentre as várias doenças causadas por espécies desse gênero, destaca-se a pitiose em animais, descrita em regiões de clima tropical, subtropical e temperado, sendo causada pela espécie *P. insidiosum* (Alexopoulos et al., 1996). No Brasil, a pitiose foi descrita em diversas espécies, porém a maioria dos casos relatados corresponde a lesões cutâneas em eqüinos em diferentes Estados do País (Santurio et al., 2006). Segundo Mendoza et al. (1996), o ciclo de vida do *P. insidiosum* requer ambiente aquático com baixas concentrações de íons, pH próximo da neutralidade e uma planta como hospedeiro para manter seu ciclo na natureza, que baseia-se na colonização das plantas, que servem de substrato para o desenvolvimento e reprodução do microrganismo, formando os zoosporângios. Os zoósporos liberados ficam livres na água movimentando-se até encontrar outra planta, onde se encistam e emitem tubos germinativos, dando origem a um novo micélio e completando seu ciclo (Miller, 1983). Os animais provavelmente se infectam ao entrar em contato com esse ambiente, uma vez que comumente observa-se que os animais afetados permanecem por longos períodos em contato com águas paradas em lagos, açudes ou locais pantanosos (Chafin et al., 1995). *P. insidiosum* já foi isolado de áreas alagadiças por Miller (1983) na Austrália e por Supabandhu et al. (2008) na Tailândia, comprovando que esses locais são as prováveis fontes de infecção para as espécies afetadas. No RS, onde vários casos de pitiose eqüina e canina são citados na literatura, não existem dados de isolamento do agente de ambientes aquáticos. Assim, torna-se importante comprovar e monitorar a presença de *P. insidiosum* em áreas alagadiças onde a enfermidade é endêmica. Os objetivos deste trabalho são: isolar *P. insidiosum* de áreas alagadiças do Rio Grande do Sul, onde a pitiose eqüina é endêmica; estudar e comparar molecularmente as amostras de *P. insidiosum* isoladas dos ambientes aquáticos e relacioná-las com amostras de *P. insidiosum* provenientes de doença clínica em eqüinos e já caracterizadas; relacionar a presença desse oomiceto com as condições climáticas das regiões estudadas.

### 2 MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de água foram coletadas em municípios das regiões sul, central e oeste do Estado do Rio Grande do Sul. A seleção dos ambientes aquáticos (açudes, lagos, canais de irrigação, água acumulada em campos e restingas de arroz) priorizou o histórico da ocorrência da pitiose eqüina no local. Para a coleta foram utilizados frascos de 500mL estéril. A amostragem foi realizada a 5 ou 10 cm

da superfície, priorizando as margens com vegetação das áreas alagadiças, sendo amostrados 3 ou 4 pontos opostos, dependendo da extensão da área. De todas as amostras coletadas mediou-se o valor de pH (potencial hidrogeniônico) em aparelho de pHmetro (modelo pH 21-PR). Para o isolamento de *P. insidiosum* foram utilizadas iscas de cabelo humano ou pelo equino previamente esterilizadas. Cinco a dez iscas, de aproximadamente 3 cm, eram introduzidas no interior dos frascos logo após a coleta de água. Todos os frascos foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C durante 24-48 horas. Após esse período, a água era drenada e as iscas assepticamente coletadas foram transferidas para as placas de petri contendo o meio de cultura Agar VP3 (Ali-Shtayeh *et al.*, 1986), ficando incubadas a 37°C por 48-72 horas. Colônias suspeitas de *P. insidiosum* foram repicadas para tubos contendo meio Agar Levedura, sendo posteriormente submetidas a metodologia de zoosporogênese. Para isto, as amostras foram repicadas para placas de petri contendo Agar levedura, juntamente com pedaços de grama (*Paspalum notatum*), previamente autoclavadas. Todas as placas ficaram incubadas por 3-5 dias a 37°C. Após esse período de cultivo, os pedaços de grama parasitados eram transferidos para uma placa de petri contendo 30 ml de Meio de Indução, ficando incubados a 37°C por 8 horas. Durante esse período, as gramas eram regularmente observadas, através de microscopia ótica (100 e 400 X) entre lâmina e lamínula. A identificação morfológica foi baseada nas características morfológicas dos zoosporângios e zoósporos (De Cock *et al.*, 1987). A análise molecular dos isolados obtidos será processada pelo Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI) da Universidade Federal de Santa Maria, utilizando a metodologia de reação em cadeia de polimerase (PCR), previamente descrita por Grooters e Gee (2002), e seqüenciamento de DNA.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Até o momento, foram coletadas 100 amostras de água, em 50 estabelecimentos dos municípios de Bagé, Capão do Leão, Jaguarão, Canguçu, Pelotas, Rio Grande, Santa Vitória do Palmar, Santa Maria e Uruguaiiana. Entre as amostras coletadas, em 16% houve o isolamento de um oomiceto que apresentou características morfológicas condizentes com *P. insidiosum*; em 4% das amostras houve o isolamento de um microrganismo que apresentou formação de zoosporângios e zoósporos com características morfológicas diferentes daquelas observadas em *P. insidiosum*, provavelmente tratando-se de outra espécie de *Pythium* ou oomiceto e em 80% das amostras não houve isolamento de microrganismos com características similares a de oomicetos. As amostras suspeitas de *P. insidiosum*, assim como àquelas suspeitas de pertencer a outros gêneros ou espécies de oomicetos, estão sendo submetidas a identificação molecular por PCR e seqüenciamento de DNA. . Uma amostra foi caracterizada como *P. insidiosum*, a qual foi proveniente do município de Uruguaiiana, e outra amostra como *P. catenulatum*, sendo proveniente do município de Chuí. Os demais isolados obtidos durante o desenvolvimento deste trabalho estão sendo processados. Em estudos anteriores, *P. insidiosum* foi isolado de áreas alagadiças por Miller (1983) na Austrália e por Supabandhu *et al.* (2008) na Tailândia, comprovando a presença deste micro-organismo nesses ambientes.. . Dos estabelecimentos onde provavelmente isolou-se *P. insidiosum*, em oito havia histórico de pitiose em equinos e em oito não houve histórico da referida enfermidade. A média de pH de todas as amostras as quais suspeitou-se ser *P.*

*insidiosum* foi 7, estando estes valores de acordo com os estudos de Mendoza et al (1996), em que afirmam ser necessário pH próximo da neutralidade para o desenvolvimento desse oomiceto. Ao realizar-se a análise filogenética do isolado de *P. insidiosum* ambiental oriundo de Uruguaiiana evidenciou-se estreita relação filogenética com os isolados de *P. insidiosum* oriundos de casos clínicos de animais. Este achado sugere que não há diferenças genéticas entre isolados ambientais e clínicos de *P. insidiosum*.

#### 4 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo permitem-nos concluir que os oomicetos do gênero *Pythium* estão amplamente distribuídos na natureza, sendo isolados de áreas pantanosas e alagadiças das regiões sul, central e oeste do RS. O isolamento de *P. insidiosum* de uma amostra de água e a sua relação filogenética com isolados clínicos de *P. insidiosum* evidenciam os aspectos epidemiológicos da pitiose em animais, onde os mesmos se infectam ao entrar em contato com águas contaminadas pelos zoósporos do oomiceto.

#### 5 REFERÊNCIAS

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL. **Introductory Mycology**. 4.ed., New York: John Wiley & Sons ,1996 .Chap. 23, p. 683-737.

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. Phylum Oomycota.

ALI-SHTAYEH, M.S.; CHEE-LEN, L.; DICK, M.W. An improved method and medium for quantitative estimates of populations of *Pythium* species from soil. **Trans. Br. Mycol. Soc**, v. 86, n.1, p. 39-47, 1986.

CHAFFIN, M.K.; SCHUMACHER, J.; MCMULLAN, W.C. Cutaneous pythiosis in the horse. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, Texas A&M University, v. 11, n. 1, p. 91-103, 1995.

DE COCK, A.W.; MENDOZA, L.; PADHYE, A.A.; AJELLO, L.; KAUFMAN, L. *Pythium insidiosum* sp. nov. the etiologic agent of pythiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 344-349, 1987.

GROOTERS, A.M.; GEE, M.K. Development of a nested polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Pythium insidiosum*. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Louisiana State University, v. 16, n. 2, p. 147-152, 2002.

KIRK, P. M., P. F. CANNON, J. C. DAVID & J. A. STALPERS. **Dictionary of the Fungi**, Wallingford 9 ed. CAB International, p. 640, 2001.

MENDOZA, L.; AJELLO, L.; MCGINNIS, M.R. Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. **Journal de Mycologie Médicale**, Paris, v. 6, n. 4, p. 151-164, 1996.

MILLER, R.I. Investigations into the biology of three 'phycomycotic' agents pathogenic for horses in Australia. **Mycopathologia**, Louisiana State, v. 81, p. 23-28, 1983.

SANTURIO, J.M. Pitiose: uma micose emergente. **Acta Scientiae Veterinarie**, Porto Alegre, v. 34, n. 1, p. 1-14, 2006.

SUPABANDHU, J. Isolation and identification of the human pathogen *Pythium insidiosum* from environmental samples collected in Thai agricultural areas. **Medical Mycology**, v.46, n.1, p. 41-52, 2008.