

ISOLAMENTO DE *PYTHIUM INSIDIOSUM* EM AMBIENTES AQUÁTICOS NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL – RESULTADOS PARCIAIS

SILVEIRA, Júlia de Souza¹; MARONEZE, Beatriz Persici²; BOTTON, Sônia de Avila³; AZEVEDO, Maria Isabel de³, SALLIS, Elisa Simone Viégas⁴; PEREIRA, Daniela Isabel Brayer⁵

¹ Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas- Universidade Federal de Pelotas-RS ;² Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária- Universidade Federal de Pelotas; ³ Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI)-Universidade Federal de Santa Maria-RS; ⁴ Faculdade de Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Pelotas; ⁵ Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Laboratório de Micologia, Instituto de Biologia- Universidade Federal de Pelotas-RS.
E-mail: juliassilveira@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Pythium* possui 127 espécies conhecidas, de distribuição cosmopolita, sapróbias em ecossistemas terrestres e aquáticos comportando-se também como parasitas (Kirk et al., 2001). 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 equinos em diferentes estados do país (Santurio et al., 2006) sendo considerada como uma doença endêmica no estado do RS (Silveira et al 2011). 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. Esta então serve de substrato para o desenvolvimento e reprodução do micro-organismo, formando os zoosporângios que dão origem a zoósporos biflagelados e móveis.

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 tendo sido comprovado em estudos anteriores, a importância de áreas alagadiças na etiopatogenia da doença (Miller, 1983; Supabandhu et al., 2008)., comprovando que esses locais são as prováveis fontes de infecção para as espécies afetadas. Em estudos anteriores têm se verificado a presença de espécies de *Pythium* em pântanos no estado do RS (Silveira et al., 2011). Entretanto, é necessário incrementar o monitoramento da ocorrência de *P. insidiosum* nessas regiões. Assim, os objetivos deste trabalho são: isolar *P. insidiosum* de áreas alagadiças do Rio Grande do Sul, onde a pitiose equina 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 equinos e já caracterizadas (Azevedo et al., 2012) e 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 equina no local. Para a coleta foram utilizados frascos de 500mL previamente esterilizados. 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. De todas as amostras coletadas mediou-se o valor de pH (potencial hidrogeniônico) utilizando pHmetro (modelo pH 21-PR). Para o isolamento de *P. insidiosum* foram utilizadas iscas de cabelo humano 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 sequenciamento de DNA.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De janeiro de 2009 a maio de 2012 foram coletadas 112 amostras de água, em 62 estabelecimentos dos municípios de Bagé, Capão do Leão, Chuí, Jaguarão, Camaquã, Canguçu, Pelotas, Rio Grande, Santa Vitória do Palmar, Santa Maria e Uruguaiana. Salienta-se que no ano de 2012 devido a grande seca que ocorreu no estado houve um prejuízo no número de coletas das amostras nas estações de verão e outono. Entre as amostras coletadas, em 20% houve o isolamento de microorganismos cujas características macro e micromorfológicas eram condizentes com o gênero *Pythium* e em 80% das amostras não houve isolamento de oomicetos. Estudos anteriores citam a ocorrência de *P. insidiosum* em áreas alagadiças na Austrália e Tailândia (Miller, 1983; Supabandhu et al., 2008), o que comprova a participação destes ambientes como fonte de infecção aos animais suscetíveis.

A média de pH das amostras de água nas quais houve suspeita de isolamento de *Pythium* foi 7,0, o que corrobora com os estudos de Mendoza et al (1996) que afirmam que os valores de pH devem estar próximos da neutralidade para o desenvolvimento desse oomiceto. Os resultados parciais da caracterização molecular são demonstrados na Tab. 1. Ao realizar-se a análise filogenética de um 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 (Azevedo et al., 2012). Este achado sugere que não há diferenças genéticas entre isolados ambientais e clínicos de *P. insidiosum*, o que foi também demonstrado por Supabandhu et al. (2008).

Tabela 1: Resultados parciais do sequenciamento de isolados suspeitos de *Pythium*

Procedência da amostra	Resultado parcial
Santa Vitória 1	<i>Pythium</i> sp.
Santa Vitória 2	<i>Pythium rhizo-oryzae</i>
Santa Vitória 3	<i>Pythium rhizo-oryzae</i>
Santa Vitória 4	<i>Pythium rhizo-oryzae</i>
Chuí	<i>Pythium catenulatum</i>
Uruguaiiana 1	<i>Pythium</i> sp.
Uruguaiiana 2	<i>Pythium catenulatum</i>
Uruguaiiana 3	<i>Pythium insidiosum</i>

4 CONCLUSÃO

Os resultados parciais deste estudo permitem-nos concluir que os oomicetos do gênero *Pythium* estão amplamente distribuídos na natureza, sendo isolados principalmente das regiões sul e oeste do RS, particularmente de áreas pantanosas e alagadiças. O sequenciamento das amostras suspeitas mostra que *P. insidiosum* foi isolado em apenas uma ocasião, por outro lado, indica a presença de outras espécies de *Pythium*. Cabe salientar que o sequenciamento das demais amostras isoladas está sendo realizado e estudos futuros avaliarão a patogenicidade dessas outras espécies de *Pythium* para animais.

5 REFERÊNCIAS

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

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. CABI Bioscience, 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.

SILVEIRA, J. S.; CORRÊA, B. F.; BOTTON, S. A.; AZEVEDO, M. I.; PEREIRA, D. I. B.; Isolamento de *Pythium insidiosum* de ambientes aquáticos no estado do Rio Grande do Sul. In: **XX CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**, 20. Pelotas, 2011. Anais do Congresso de Iniciação Científica, Pelotas: UFPEL, 2011.

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.