

XVIII

CIC

XI ENPOS
I MOSTRA CIENTÍFICA



Evoluir sem extinguir:
por uma ciência do devir



CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DE ISOLADOS DE *PYTHIUM INSIDIOSUM* – RESULTADOS PARCIAIS

PIZONI, Camila¹, MENDES, Josiara Furtado², CORRÊA, Bruna Ferraz², DE OLIVEIRA, Mariana Pires², NONNEMACHER, Douglas Vinicius Faccin², BOTON, Sonia de Ávila³, DE AZEVEDO, Maria Isabel³, PEREIRA, Daniela Isabel Brayer².

1. Bolsista de Iniciação Científica, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Laboratório de Micologia, Universidade Federal de Pelotas- cami.pizoni@hotmail.com

2. Laboratório de Micologia, Universidade Federal de Pelotas

3. Universidade Federal de Santa Maria

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Pythium* inclui oomicetos aquáticos classificados no reino Stramenipila. Dentre as várias espécies deste gênero, apenas *Pythium insidiosum* está associado a pitiose em animais e humanos (Supabandhu *et al.* 2008). Nos últimos anos é evidente o aumento do número de casos da enfermidade nestas espécies, um fato preocupante, devido às dificuldades de terapia e risco de morte das espécies afetadas (Pereira *et al.*, 2008).

Na maioria das vezes, a identificação e a classificação das espécies de *Pythium* baseiam-se nas características morfo-fisiológicas. Alexopoulos *et al.* (1996) afirmam que para realizar-se a correta identificação do *P. insidiosum* é necessário observar as características morfológicas dos zoosporângios, zoósporos, oogônia e anterídio obtidas através da técnica de zoosporogenese em meio líquido (Mendoza & Prendas, 1988). Entretanto problemas com ausência de estruturas sexuadas e falhas para induzir zoosporogênese *in vitro* são constantes (Alexopoulos *et al.*, 1996). Desta forma, uma identificação rápida e segura é fundamental para implementação de um diagnóstico diferencial e de um tratamento eficaz (Schurko *et al.* 2003). Paralelamente ao desenvolvimento de técnicas sorológicas (Mendoza *et al.*, 1997), o uso de métodos moleculares vem se tornando uma ferramenta imprescindível para identificação de *P. insidiosum* (Schurko *et al.* 2003). Dentre as diferentes técnicas moleculares já relatadas, assim como, utilização de sondas genéticas (Schurko *et al.*, 2004), *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) (Schurko *et al.* 2003), seqüenciamento (Mendoza *et al.*, 2003) e *random amplified polymorphic DNA* (RAPD) (Pannanusorn *et al.*, 2007), a PCR é a mais utilizada, uma vez que é simples de ser aplicada, é menos onerosa e permite a caracterização de *P. insidiosum* a partir de cultivos ou tecidos infectados (Berryessa *et al.*, 2008).

No presente estudo objetivou-se avaliar a aplicabilidade de uma Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) na caracterização molecular de 29 isolados brasileiros de *P. insidiosum* oriundos de lesões clínicas de eqüinos, assim como realizar identificação através de suas estruturas morfológicas.

2. MATERIAL E METODOS

Foram utilizadas 29 amostras de *P. insidiosum* provenientes de eqüinos doentes de diversas regiões do Brasil, previamente identificadas por suas características morfológicas. Para tal, pequenos blocos de agar dos isolados foram repicados para placas de petri contendo *Corneal Meal Agar* (CMA) e pedaços de grama (*Paspalum notatum*) cortados em 3 cm, previamente autoclavados a 121^oC por 20 minutos, foram distribuídos na sua superfície. As placas ficaram incubadas por um período de 3 a 5 dias a 37^oC. Posteriormente, a grama parasitada pelo *P. insidiosum* foi transferida para placa de petri contendo 30 ml de uma solução de sais a 1% (meio de indução), ficando incubadas a 37^oC durante 8 horas. Durante esse período, as gramas foram regularmente observadas, através de microscopia ótica entre lâmina e lamínula para identificação dos zoosporângios e zoósporos.

Para o desenvolvimento da PCR, foram usadas *P. insidiosum* ATCC 58637 and *P. insidiosum* CBS 101155 como controle positivo e *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 11481 como controle negativo da técnica. Os isolados de *P. insidiosum* foram cultivados em frascos tipo *Erlenmeyer* contendo 100 mL de caldo Sabouraud, incubados a 37^oC em agitação constante a 150 rpm durante cinco dias. Após cultivo, as hifas foram coletadas por filtração, acondicionadas em *criotubos* e congeladas em nitrogênio líquido até sua utilização.

A extração do DNA total foi obtida pelo método do CTAB, no qual 200 mg de hifas foram maceradas com tampão de lise e acrescidas de CTAB 10% e NaCl 5N, seguido da extração fenólica. A qualidade e concentração de DNA das amostras foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 1%.

Para a amplificação das reações de PCR foram utilizados *primers* específicos de *P. insidiosum* (PI1 and PI2), os quais amplificam a região alvo ITS1 do rRNA. Todas as amplificações foram realizadas em termociclador (modelo PTC-100), nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94^oC for 3 min., 40 ciclos de desnaturação a 94^oC for 30 s, anelamento a 65^oC por 30 s, extensão a 72^o C por 30 s, extensão final a 72^oC por 10 min. Uma alíquota de 10 µL da reação foi submetida a eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Zoosporângios hialinos e globosos, contendo zoósporos biflagelados em seu interior, característicos de *P. insidiosum*, conforme descritos por De Cock *et al.*(1987) foram observados nos bordos terminais das folhas, a partir de 3 horas de incubação a 37^oC, em todas as amostras avaliadas. Os zoósporos formados apresentavam movimentos rápidos de seus flagelos, que culminava na ruptura da membrana do zoosporângio, tinham forma ovóide, evidenciando a presença de dois flagelos e, uma vez livres no meio de Indução, nadavam em diferentes direções por meio de movimentos de rotação em torno de seu próprio eixo. Observações similares foram feitas por Pereira *et al* (2008).

No presente estudo, para o desenvolvimento da PCR foram utilizados os *primers* específicos PI1 e PI2, que amplificam a região ITS1 do rRNA do *P. insidiosum*, previamente descritos por Grooters *et al.* (2002). Diferentemente de relatos anteriores que utilizaram Nested PCR na caracterização de isolados de *P. insidiosum* (Grooters & Gee, 2002), no presente estudo não foi utilizada a referida técnica, todavia, houve a amplificação específica da região ITS1 de *P. insidiosum* nos isolados analisados. Embora Grooters & Gee (2002) afirmem que a Nested PCR

apresente maior sensibilidade e especificidade, em razão do enriquecimento seletivo das seqüências de DNA alvo e amplificação de um pequeno fragmento de DNA, o que diminui a probabilidade de amplificação de regiões inespecíficas, os resultados aqui descritos evidenciaram que a sensibilidade e especificidade foram mantidas. Além disso, os menores problemas de contaminação, a redução do tempo e dos custos de execução, justificam a utilização deste método, quando comparado com a Nested PCR. Resultados similares são citados em outros estudos, nos quais também foram utilizados primers específicos na identificação de *P. insidiosum* (Berryessa *et al.*, 2008).

4. CONCLUSÃO

Os resultados parciais deste estudo demonstram que os isolados analisados até o momento apresentam características moleculares de *P. insidiosum*. Embora a caracterização morfológica tenha possibilitado uma boa identificação, a utilização da PCR mostrou-se ser uma ferramenta segura e rápida na identificação deste oomiceto.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXOPOULOS, CJ *et al.*, 1996, **Phylum Oomycota**. *In: Introductory Mycology*, 4th ed., pp. 683-737. John Wiley & Sons, New York.

BERRYESSA, NA *et al.*, 2008, **Gastrointestinal pythiosis in 10 dogs from California**. *J Vet Intern Med* 22: 1065-1069.

DE COCK, A.W. *et al.*, 1987, *Pythium insidiosum* sp. nov. **The etiologic agent of pythiosis**. *Journal of Clinical Microbiology*, v.25, n.2, p.344-349, 1987

GROOTERS, AM, GEE, MK: 2002, **Development of a nested polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Pythium insidiosum***. *J Vet Intern Med* 16: 147-152.

PANNANUSORN S *et al.*, 2007, **Random amplified polymorphic DNA typing and phylogeny of *Pythium insidiosum* clinical isolates in Thailand**. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 38: 383-391.

PEREIRA DIB *et al.*, 2008, **Comparison between the immunotherapy and caspofungin as agents to treat experimental pythiosis in rabbits**. *J Med Mycol* 18: 129-133.

PEREIRA *et al.* **Zoosporogênese *in vitro* entre isolados do oomiceto *Pythium insidiosum***. *Ciência Rural*, v. 38, n.1, p. 143-147, jan-fev, 2008.

PESAVENTO, PA *et al.*, 2008, **Cutaneous pythiosis in a Nestling White-faced Ibis**. *Vet Pathol* 45: 538-541.

SCHURKO, A, *et al.* 2003, **Evidence for geographic clusters: Molecular genetic differences among strains of *Pythium insidiosum* from Asia, Australia, and the Americas are explored**. *Mycologia* 95: 200-208.

SCHURKO, A, et al., 2003, **A molecular phylogeny of *Pythium insidiosum***. Mycol Res 107: 537-544.

SCHURKO, AM, et al., 2004, **Development of a species-specific probe for *Pythium insidiosum* and the diagnosis of pythiosis**. J Clin Microbiol 42: 2411-2418.

SUPABANDHU, J, et al., 2008, **Isolation and identification of the human pathogen *Pythium insidiosum* from environmental samples collected in Thai agricultural areas**. Med Mycol 46: 41-52.