

ISOLAMENTO DE *PYTHIUM INSIDIOSUM* EM ÁREAS ENDÊMICAS DE PITIOSE EQUINA NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL: RESULTADOS PARCIAIS.

SILVEIRA, Júlia de Souza¹; CORRÊA, Bruna Ferraz¹; BOTTON, Sônia de Avila²; DE AZEVEDO, Maria Isabel²; PEREIRA, Daniela Isabel Brayer³

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

1 INTRODUÇÃO

O oomiceto aquático *Pythium insidiosum* é um patógeno de mamíferos, causador da pitiose, uma enfermidade descrita em regiões de clima tropical, subtropical e temperado, afetando diversas espécies domésticas e selvagens e assim como humanos (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 equina e canina são citados na literatura, não existem dados de isolamento do agente desses 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 equina é endêmica e avaliar as características morfológicas e moleculares das amostras isoladas.

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, 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 pêlo eqüino 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 CMA, sendo posteriormente submetidas a metodologia de zoosporogênese. Para isto, as amostras foram repicadas para placas de petri contendo CMA, 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 pelo *P. insidiosum* 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 final do *P. insidiosum* foi baseada nas características morfológicas dos zoosporângios e zoósporos (De Cock *et al.*, 1987). A análise molecular dos isolados obtidos será processada no 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 posteriormente também serão submetidas ao seqüenciamento de DNA.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Até o momento, foram coletadas 96 amostras de água, em 46 estabelecimentos dos municípios de Bagé, Capão do Leão, Jaguarão, Pelotas, Rio Grande, Santa Vitória do Palmar, Santa Maria e Uruguaiana. De um total de 96 amostras coletadas, em 17,7% houve o isolamento de um oomiceto que apresentou características morfológicas condizentes com *P. insidiosum*; em 5,2% 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 uma outra espécie de *Pythium* ou oomiceto e em 77,08% amostras não houve isolamento de microrganismos com características similares a de oomicetos. As 17 amostras suspeitas de *P. insidiosum*, assim como as 5 amostras suspeitas de pertencer a outros gêneros ou espécies de oomicetos, estão sendo submetidas a identificação molecular por PCR e seqüenciamento para confirmação da caracterização. Dos estabelecimentos onde provavelmente isolou-se *P. insidiosum*, em 8 havia histórico de pitiose em equinos e em 8 não houve histórico da referida enfermidade. A média de pH de todas as amostras analisadas foi 6,73, estando estes valores de acordo com os estudos de Mendoza *et al* (1996), em que o autor afirma ser necessário pH próximo da neutralidade para o desenvolvimento desse oomiceto. Estes achados sugerem que a distribuição de *P. insidiosum* independe da ocorrência da pitiose em animais e que este oomiceto encontra-se largamente distribuído na natureza, particularmente em ambientes aquáticos que suprem as condições necessárias para o desenvolvimento de seu ciclo biológico. Os resultados obtidos no presente estudo são similares aos achados de Miller (1983) ao isolar *Pythium* sp. de áreas pantanosas na Austrália e Supanbandhu *et al* (2008) ao obter 59 isolados *P.*

insidiosum a partir de 325 amostras de água utilizadas na irrigação de lavouras de arroz na Tailândia. Esses achados sugerem que essas águas podem ser importantes fontes de infecção para animais e humanos que adquirem a pitiose ao entrar em contato com esses ambientes contaminados. O fato de não ter havido o isolamento do microrganismo em 74 amostras de água analisadas pode sugerir que a composição química da água interfira no desenvolvimento do oomiceto. Entretanto, estes dados não foram avaliados no presente trabalho e estudos que avaliem tal característica deverão ser desenvolvidos.

4 CONCLUSÕES

Os resultados parciais deste estudo permitem-nos concluir que os oomicetos do gênero *Pythium* estão amplamente distribuídos na natureza, sendo isolados das regiões sul, central e oeste do RS, particularmente de áreas pantanosas e alagadiças compostas por águas com valores de pH próximos a neutralidade.

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.

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.