

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Pythium insidiosum* – RESULTADOS PARCIAIS

**CORRÊA, Bruna Ferraz¹; SILVEIRA, Júlia de Souza¹; BOTTON, Sônia de Ávila²;
AZEVEDO, Maria Isabel de²; PEREIRA, Daniela Isabel Brayer³**

¹ Acadêmicas do Curso de Ciências Biológicas; ² Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI)-
UFSM; ³ Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Laboratório de Micologia, Instituto de
Biologia-UFPel-RS.

E-mail para correspondência: brunafcorrea@gmail.com

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Pythium* está classificado no Reino Stramenopila, Classe Oomycetes, Ordem Pythiales e Família Pythiaceae. (MENDOZA, NEWTON; 2005) O gênero possui mais de 200 espécies, sendo algumas patógenas de plantas (MENDOZA, AJELLO, MCGINNIS; 1996) e a espécie *Pythium insidiosum* sendo a única patógena de mamíferos (SCHURKO, et al; 2003). *P. insidiosum* é o agente etiológico da pitiose (COCK, et al; 1987), uma doença granulomatosa que afeta cavalos, cães, gatos, bovinos e humanos (MENDOZA, AJELLO, MCGINNIS; 1996). A distribuição da doença ocorre em regiões temperadas, tropicais e subtropicais do mundo (SCHURKO, et al; 2003). A identificação e classificação das espécies de *Pythium* são baseadas frequentemente por características morfológicas, mas complicações podem surgir devido à ausência de estruturas sexuais e falhas para induzir a zoosporogênese em cultura. Em soma, fatores ambientais, assim como temperatura, tipo de meio e idade da cultura, podem afetar características morfológicas e fisiológicas e desta forma impedir o processo de identificação do agente (HENDRIX, PAPA; 1974). Entretanto, a habilidade de distinguir *P. insidiosum* de outras espécies de *Pythium* e de outros organismos que podem causar sintomas similares no hospedeiro é crucial para o diagnóstico precoce e tratamento da doença (SCHURKO, et al; 2003). Assim, o uso de técnicas de biologia molecular tem se tornado uma ferramenta bastante útil e segura para identificação de espécies de *Pythium* (WANG, WHITE; 1997). Pelo fato da grande maioria dos isolados brasileiros de *P. insidiosum* não ter sido caracterizada molecularmente e devido à possibilidade de existirem amplas variações genéticas torna-se importante analisar as características moleculares dos isolados brasileiros de *P. insidiosum*.

Nesse contexto o presente trabalho tem por objetivo realizar a identificação molecular do oomiceto *P. insidiosum* isolado de lesões clínicas de pitiose em equinos, caninos e ovino provenientes de diferentes regiões do Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas do período de janeiro de 2009 a julho de 2010, 50 amostras de *P. insidiosum*, isoladas de animais infectados, sendo 2 caninos, 1 ovino e 47 equinos. As amostras foram oriundas de diferentes regiões do Brasil, sendo 33 do Rio Grande do Sul, 15 do Mato Grosso do Sul, uma de São Paulo e uma de Mato Grosso. Para o desenvolvimento do PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), foram usadas *P. insidiosum* ATCC 58637 e *P. insidiosum* CBS 101155 como controle positivo e *Pythium aphanidermatum* como controle negativo. Para a extração do DNA, os isolados foram cultivados em frascos tipo Erlenmeyer com 100 ml de caldo Sabouraud e incubados a 37°C em agitação constante a 150 rpm por 5 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 e PI2), os quais amplificam a região alvo ITS1 do rDNA. Todas as amplificações foram realizadas em termociclador (modelo PTC-100), nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 3 min, 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 65°C por 30 s, extensão a 72°C por 30 s, extensão final a 72°C por 10 min. Uma alíquota de 10 µL da reação foi submetida à eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta. Para confirmação da identificação molecular, todos os isolados analisados foram também submetidos a uma PCR utilizando os *primers* universais ITS1 e ITS4. Os produtos amplificados desta reação foram enviados para o sequenciamento de DNA, realizado no laboratório de biologia molecular - LABDROS (Universidade Federal de Santa Maria). As sequências obtidas foram analisadas utilizando-se o pacote de programas STADEN (STADEN, 1996) e comparadas a sequências de referência de *P. insidiosum* disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os métodos tradicionais de identificação das diferentes espécies de *Pythium* normalmente são realizados pelas características morfológicas das estruturas sexuadas e assexuadas obtidas *in vitro*. Entretanto, essas metodologias empregadas apresentam algumas desvantagens como: realização de técnicas bastante trabalhosas e demoradas que muitas vezes falham na indução dessas estruturas; requerem profissionais capacitados com experiência na identificação e a influência de fatores ambientais, como temperatura, meio de cultura e idade do isolado, que podem afetar as características morfológicas e fisiológicas e impedir o processo de identificação (WANG, WHITE; 1997; SCHURKO, et al.; 2003). Pelo fato de existir aproximadamente 200 espécies de *Pythium* torna-se necessário utilizarem-se métodos mais seguros de identificação desses microrganismos. Dentre esses, as técnicas moleculares constituem-se em importantes ferramentas. Assim, na identificação de *P. insidiosum*, a PCR é uma das técnicas mais frequentemente utilizadas, uma vez que é simples de ser aplicada, é menos onerosa e permite a identificação rápida e segura de *P. insidiosum* a partir de cultivos ou tecidos infectados (GROOTERS e Gee, 2002; ZNAJDA et al., 2002; PESAVENTO et al., 2008; SUPABANDHU et al., 2008). No presente estudo, foi utilizado na PCR os *primers* específicos PI1 e PI2, previamente descritos por Grooters e Gee (2002), que amplificam a região ITS1 do rDNA do *P. insidiosum*. Em 50 isolados analisados, assim como também nas amostras controle positivo (*P. insidiosum* ATCC 58637 e CBS 101155), houve a amplificação de bandas de tamanho esperado (105pb), confirmando a identificação das referidas amostras como *P. insidiosum*. A identificação molecular foi confirmada pelo sequenciamento, onde todas os isolados analisados apresentaram homologia com as sequências de *P. insidiosum* depositadas no GenBank. Os resultados obtidos até o momento têm demonstrado que não há diferenças moleculares entre os isolados de *P. insidiosum* oriundos de diferentes regiões do Brasil.

4 CONCLUSÕES

Os resultados parciais da identificação molecular do oomiceto isolado de lesões clínicas de pitiose em equinos, caninos e ovino apresentam características morfológicas e moleculares da espécie *P. insidiosum*. Além disso, conclui-se que a técnica de PCR utilizando os *primers* específicos PI1 e PI2 é segura na identificação deste microrganismo, podendo ser utilizada como técnica de rotina na caracterização deste oomiceto.

5 AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com o apoio do CNPq e o Laboratório de Pesquisas Micológicas da UFSM (LAPEMI).

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COCK, A.W.A.M.; MENDOZA, L.; PADHYE, A.A; AJELLO, L.; KAUFMAN, L. *Pythium insidiosum* sp. nov., the etiologic agent of pythiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, 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**, v.16, p.147-152, 2002.

HENDRIX F.J.; PAPA K.E. Taxonomy and genetics of *Pythium*. **Proceedings of the American Phytopathological Society** , v.1, p.200–207, 1974.

MENDOZA, L., NEWTON, J.C. Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum*. **Medical Mycology**. v. 43, p. 477-486, 2005.

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

MENDOZA, L.; HERNANDEZ, F.; AJELLO, L. Life Cycle of the Human and Animal Oomycete Pathogen *Pythium insidiosum*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 11, p. 2967-2973, 1993.

PESAVENTO, P.A. et al. Cutaneous pythiosis in a Nestling White-faced Ibis. **Veterinary Pathology**, v. 45, p. 538-541, 2008.

SCHURKO, A.; MENDOZA, L.; COCK, A. W. A. M.; KLASSEN, G. R. Evidence for geographic clusters: Molecular genetic differences among strains of *Pythium insidiosum* from Asia, Australia and the Americas are explored. **Mycologia**, v. 95, n. 2, p. 200-208, 2003.

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

WANG, P.H.; WHITE, J.G. Molecular characterization of *Pythium* species based on RFLP analysis of the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA. **Physiology and Molecular Plant Pathology**, v. 51, p. 129-143, 1997.

ZNAJDA, N.; et al. PCR-Based detection of *Pythium* and *Lagenidium* DNA in frozen and ethanol-fixed animal tissues. **Veterinary Dermatology**, v. 13, p. 187-194, 2002.