

ESPÉCIES DE *PYTHIUM* ISOLADAS DE AMBIENTES AQUÁTICOS NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

SILVEIRA, Júlia de Souza¹; MARONEZE, Beatriz Persici²; BOTTON, Sônia de Avila³; AZEVEDO, Maria Isabel de⁴, SALLIS, Elisa Simone Viégas⁵; PEREIRA, Daniela Isabel Brayer⁶

¹ Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas- Universidade Federal de Pelotas-RS- juliassilveira@gmail.com ; ² Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária- Universidade Federal de Pelotas-beatrizpersici@ibest.com.br; ³ Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI)-Universidade Federal de Santa Maria-RS- sabott20@gmail.com; ⁴ Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI)- Universidade Federal de Santa Maria-RS- beelazevedo@gmail.com; ⁵ Faculdade de Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Pelotas- esvsallis@yahoo.com.br; ⁶ Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Laboratório de Micologia, Instituto de Biologia-Universidade Federal de Pelotas-RS- danielabrayer@gmail.com.

1. INTRODUÇÃO

Pythium insidiosum é um oomiceto patógeno para mamíferos e o único agente etiológico da pitiose. É descrita em regiões de clima tropical, subtropical e temperado, em países do continente Americano, Oceania e África, afetando diversas espécies domésticas e selvagens e também humanos (Gaastra et al., 2010). No Brasil, a pitiose tem sido bem documentada e ocorre em equinos (Marcolongo-Pereira et al. 2012), bovinos (Grecco et al. 2009), ovinos (Santurio et al. 2008), caninos (Pereira et al. 2013) e humanos (Marques et al. 2006), porém a maioria dos casos corresponde a lesões cutâneas em equinos (Santurio et al. 2006).

O acúmulo de água em banhados e lagoas, a presença de vegetação aquática e temperaturas entre 30 e 40°C, são fatores essenciais que influenciam o ciclo de reprodução de *P. insidiosum*. Nesses ambientes o oomiceto forma zoósporos infectantes, que ao serem liberados nas águas são atraídos por quimiotaxia para tecidos danificados, onde se fixam dando início a enfermidade (Mendoza et al. 1996, Miller 1983). Comumente, observa-se que os animais afetados permanecem por longos períodos em contato com águas estagnadas (Chaffin et al. 1995). *P. insidiosum* já foi isolado de pântanos 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 (Marcolongo-Pereira et al., 2012) e canina (Pereira et al. 2013) são citados na literatura, têm se verificado a presença de espécies de *Pythium* em áreas alagadas do estado (Silveira et al., 2011).

Os objetivos deste trabalho são: isolar *P. insidiosum* de áreas pantanosas 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 o pH das águas coletadas.

2. METODOLOGIA

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 restevas 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

No período de janeiro de 2009 a agosto de 2013 foram coletadas 116 amostras de água, em 66 estabelecimentos dos municípios de Bagé, Capão do Leão, Chuí, Jaguarão, Camaquã, Canguçu, Pelotas, Rio Grande, Santa Vitória do Palmar, Santa Maria e Uruguaiana. Entre as amostras coletadas, em 19% (n=22) houve o isolamento de micro-organismos cujas características macro e micromorfológicas foram condizentes com o gênero *Pythium* e em 81% (n=94) das amostras não houve isolamento de oomicetos. Das 22 amostras suspeitas, em apenas uma confirmou-se *P. insidiosum*; em sete identificou-se outras espécies de *Pythium* (Tabela 1).

Estudos anteriores citam a ocorrência de *P. insidiosum* em áreas alagadiças na Austrália e Tailândia (Miller, 1983; Supabandhu *et al.*, 2008). Embora tenhamos obtido apenas um isolado de *P. insidiosum*, o que difere dos resultados de Supabandhu *et al.* (2008) que obtiveram 59 isolados do micro-organismo a partir de 325 amostras de água analisadas, nossos resultados corroboram com esses autores comprovando a participação de ambientes pantanosos como fonte de infecção aos animais suscetíveis. As diferenças observadas na obtenção do número de isolados podem ser explicadas pelas características ambientais e abundância do micro-organismo nas áreas estudadas na Tailândia, já que a pitiose é uma enfermidade endêmica para o homem nesse País. No entanto, o isolado obtido no presente estudo foi oriundo de uma área onde havia relatos frequentes da enfermidade em equinos. Azevedo *et al.* (2012) ao realizar a análise filogenética desse isolado

evidenciaram 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*, o que foi também demonstrado por Supabandhu et al. (2008).

A análise do pH das amostras de água, evidenciou que o valor médio das águas 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.

Tabela 1: Espécies de *Pythium* isoladas de ambientes aquáticos no RS.

Procedência da amostra	Resultado
Santa Vitória 1	<i>Pythium</i> spp.
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>
Uruguaiana 1	<i>Pythium</i> spp.
Uruguaiana 2	<i>Pythium catenulatum</i>
Uruguaiana 3	<i>Pythium insidiosum</i>

4. CONCLUSÕES

Os resultados 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, de uma área com relatos de pitiose equina. Por outro lado, isolaram-se outras espécies de *Pythium* que em estudos futuros serão utilizadas para avaliação da sua patogenicidade em modelo experimental.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEVEDO, M. I.; PEREIRA, D. I. B.; BOTTON, S. A.; COSTA, M. M.; MAHL, C. D.; ALVES, S. H.; SANTURIO, J. M. *Pythium insidiosum*: Morfological and molecular identification of Brazilian isolates. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.7, p.619-622, 2012.

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.

GAASTRA, W.; LIPMAN, L. J. A; DE COCK, A. W. A. M.; EXEL, T. K.; PEGGE, R. B. G.; SCHEURWATER, J.; VILELA, R.; MENDOZA, L. *Pythium insidiosum*: An overview. **Veterinary Microbiology**, v.146, p.1-16, 2010.

GRECO, F. B.; SCHILD, A. L.; QUEVEDO, P.; ASSIS-BRASIL, N. D.; KOMMERS, G. D., MARCOLONGO-PEREIRA, C.; SORES, M.P. Pitiose cutânea em bovinos na

região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.11, p.938-942, 2009.

MARCOLONGO-PEREIRA, C.; SALLIS, E. S. V.; RAFFI, M. B.; PEREIRA, D. I. B.; HINNAH, F. L.; COELHO, A. C. B.; SCHILD, A. L. Epidemiologia da pitiose equina na Região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.9, p.856-868, 2012.

MARQUES, S. A.; BAGAGLI, E.; BOSCO, S. M. G.; CAMARGO, R. M. P.; MARQUES, M. E. A. *Pythium insidiosum*: relato do primeiro caso de infecção humana no Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 81, n.5, p.483-485.

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.

PEREIRA, D. I. B.; BOTTON, S. A.; AZEVEDO, M. I.; MOTTA, M. A. A.; LOBO, R. R.; SOARES, M. P.; FONSECA, A. O.; JESUS, F. P.K.; ELVES, S. H.; SANTURIO, J. M. Canine gastrointestinal pythiosis treatment by combined antifungal and immunotherapy and review of published studies. **Myopathologia**, v.176, n.3-4, p.309-315, 2013.

SANTURIO, J. M.; ARGENTA, J. S.; SCHWENDLER, S. E.; CAVALHEIRO, A. S.; PEREIRA, D. I. B.; ALVES, S. H.; DUTRA, V.; SILVA, M. C.; ARRUDA, L. P.; NAKAZATO, L.; COLODEL, E. M. Granulomatous rhinitis associated with *Pythium insidiosum* infection in sheep. **Veterinary Record**, v.163, n.9, p.2176-7, 2008.

SILVEIRA, Júlia de Souza; STOLL, Franciele Elisa, CORRÊA, Bruna Ferraz; PEREIRA, Daniela Isabel Brayer. Estudo da patogenicidade de espécies de *Pythium* spp. isoladas de ambiente aquático. In: **Anais do XII Salão de Iniciação Científica**, Porto Alegre: PUCRS, 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.