

## CARACTERIZAÇÃO DE ESPÉCIES DE *PYTHIUM* ISOLADAS DE AMBIENTES PANTANOSOS DO RIO GRANDE DO SUL

Caroline Quintana Braga<sup>1</sup>; Júlia de Souza Silveira<sup>2</sup> Sônia de Avila Botton<sup>3</sup>; Maria Isabel de Azevedo<sup>4</sup>; Elisa Simone Viégas Sallis<sup>5</sup>; Daniela Isabel Brayer Pereira<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas- Universidade Federal de Pelotas-RS- [carolineqbraga@hotmail.com](mailto:carolineqbraga@hotmail.com) ;

<sup>2</sup> Mestranda do curso de Parasitologia- Universidade Federal de Pelotas-RS- [juliassilveira@gmail.com](mailto:juliassilveira@gmail.com)

<sup>3</sup> Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI)-Universidade Federal de Santa Maria-RS- [sabott20@gmail.com](mailto:sabott20@gmail.com);

<sup>4</sup> Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI)-Universidade Federal de Santa Maria-RS- [beelazevedo@gmail.com](mailto:beelazevedo@gmail.com);

<sup>5</sup> Faculdade de Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Pelotas- [esvsallis@yahoo.com.br](mailto:esvsallis@yahoo.com.br);

<sup>6</sup> Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Laboratório de Micologia, Instituto de Biologia-Universidade Federal de Pelotas-RS- [danielabray@gmail.com](mailto:danielabray@gmail.com).

### 1. INTRODUÇÃO

Oomicetos do gênero *Pythium* são micro-organismos termofílicos, ubíquos em ecossistemas de água doce e no solo. Incluem mais de 120 espécies, a maioria sapróbias ou patógenas de plantas (Alexopoulos, 1996). Até o momento, a única espécie relatada como patógena de mamíferos, causando pitiose, é *Pythium insidiosum* (Alexopoulos, 1996, Mendoza et al, 1996).

A pitiose é uma doença piogranulomatosa, sendo descrita em vários Países (Mendoza et al., 1996). No Brasil, a pitiose é bem documentada 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). Na região Sul do Rio Grande do Sul (RS), Marcolongo-Pereira et al. (2012), demonstraram que a pitiose equina é endêmica atingindo prevalências de 14,5% e correlacionaram a ocorrência da enfermidade com campos planos e sujeitos a alagamentos, propícios ao desenvolvimento do agente.

Em seu ciclo biológico, *P. insidiosum* utiliza plantas aquáticas para desenvolvimento e reprodução assexuada que caracteriza-se pela formação de zoósporos infectantes, que são liberados nas águas e movimentam-se até encontrar outra planta onde completam seu ciclo. Todavia, estes zoósporos também podem ser atraídos por quimiotaxia para tecidos danificados, onde se fixam e emitem tubos germinativos dando início a infecção (Miller, 1983).

A presença de *P. insidiosum* em áreas alagadiças foi demonstrada por Miller (1983) em áreas pantanosas da Austrália e por Supabandhu et al. (2008) em reservatórios de água utilizados para irrigação de lavouras na Tailândia, comprovando que esses ecossistemas aquáticos mantém o micro-organismo e se constituem na principal fonte de infecção aos hospedeiros suscetíveis.

Considerando a ocorrência da pitiose em áreas pantanosas do RS, elaborou-se o presente estudo que objetiva isolar e caracterizar espécies do gênero *Pythium* em áreas alagadiças, bem como estudar e comparar

molecularmente as amostras de *P. insidiosum* obtidas e relacioná-las filogeneticamente com isolados provenientes de doença clínica animais.

## 2. METODOLOGIA

As amostras de água foram coletadas em municípios das regiões sul, central e oeste do RS. Para a coleta foram utilizados frascos de 500mL previamente esterilizados. A amostragem foi realizada a 5 ou 10cm da superfície, priorizando as margens com vegetação, sendo amostrados 3 ou 4 pontos opostos. Para o isolamento de *Pythium* spp. foram utilizadas iscas de cabelo humano previamente esterilizadas (cinco a dez iscas/frasco), as quais eram introduzidas no interior dos frascos logo após a coleta de água. Todos os frascos foram incubados em estufa a 37°C durante 24-48 horas. Após esse período, a água era drenada e as iscas transferidas para placas de petri contendo agar VP3 e incubadas a 37°C por 48-72 horas. Colônias suspeitas foram repicadas para tubos contendo agar levedura, sendo posteriormente submetidas a metodologia de zoosporogênese para identificação morfológica. 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. Posteriormente, pedaços de grama parasitados foram 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 por microscopia ótica. Os isolados que produziram zoosporogênese foram cultivados em frascos tipo *Erlenmeyer* contendo 100 mL de caldo Sabouraud, incubados a 37°C em agitação constante a 120 rpm durante 5 dias. Posteriormente, o micélio foi separado e congelado em nitrogênio líquido para extração de DNA. A análise molecular foi processada pelo Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI) da Universidade Federal de Santa Maria, utilizando a metodologia de reação em cadeia de polimerase (PCR) e sequenciamento de DNA (Azevedo et al., 2012).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período de janeiro de 2009 a junho de 2014 foram coletadas 134 amostras de água, em 69 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 16,4% (n=22) houve o isolamento de micro-organismos cujas características macro e micromorfológicas foram condizentes com o gênero *Pythium* e em 83,5% (n=112) das amostras não houve isolamento de oomicetos. Das 22 amostras suspeitas, em apenas uma confirmou-se *P. insidiosum*; em (21) 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.

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

Número do isolado	Origem da amostra	Resultado
1	Santa Vitória	<i>Pythium</i> spp.
2	Santa Vitória	<i>Pythium rhizo-oryzae</i>
3	Santa Vitória	<i>Pythium rhizo-oryzae</i>
4	Santa Vitória	<i>Pythium rhizo-oryzae</i>
5	Santa Vitória	<i>Pythium torulosum</i>
6	Santa Vitória	<i>Pythium pachycaule</i> voucher
7	Santa Vitória	<i>Pythium</i> spp.
8	Santa Vitória	<i>Pythium</i> spp.
9	Santa Vitória	<i>Pythium catenulatum</i>
10	Jaguarão	<i>Pythium</i> spp.
11	Pelotas	<i>Pythium</i> spp.
12	Rio Grande	<i>Pythium torulosum</i>
13	Chuí	<i>Pythium catenulatum</i>
14	Chuí	<i>Pythium</i> spp.
15	Uruguaiana	<i>Pythium</i> spp.
16	Uruguaiana	<i>Pythium catenulatum</i>
17	Uruguaiana	<i>Pythium insidiosum</i>
18	Capão do Leão	<i>Pythium</i> spp.
19	Capão do Leão	<i>Pythium</i> spp.
20	Capão do Leão	<i>Pythium</i> spp.
21	Capão do Leão	<i>Pythium</i> spp.

Por outro lado, foram isoladas outras espécies de *Pythium* que embora não sejam relatadas como patógenas para animais, serão utilizadas em estudos posteriores para avaliar a sua patogenicidade para mamíferos.

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 Uruguaiana, uma área onde há 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).

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram que oomicetos do gênero *Pythium* estão amplamente distribuídos em áreas pantanosas e alagadiças do RS. Embora *P. insidiosum* tenha sido isolado em apenas uma ocasião, sua estreita relação filogenética com isolados clínicos de *P. insidiosum* evidencia que a origem do micro-organismo é a mesma, ou seja, os ecossistemas de água doce.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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.

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.

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.