

TABOSA, I. M., RIET-CORREA, F., NOBRE, V. M., AZEVEDO, E. O., REIS-JUNIOR, J. L., AND MEDEIROS, R. M. Outbreaks of pythiosis in two flocks of sheep in Northeastern Brazil. **Vet. Pathol.**, v. 41, p. 412-5, 2004.

TRISCOTT, M.A.; WEEDON, D.; CABANA, E. Human subcutaneous pythiosis. **J.Cutaneous Pathol**, v.20, p. 267-71, 1993.

WHITE, T.J.; BURNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D.H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, 1990. p.315-322.

ZANADJA, N.R.; GROOTERS, A.M.; MARSELLA, R. PCR-based detection of *Pythium* and *Lagenidium* DNA in frozen and ethanol-fixed animal tissues. *Vet. Dermatol.*, v. 13, p. 187-94, 2002.

**Bolsa:** Fapesp, processo nº05/56399-2

sequenciados mostraram-se 100% homólogos com seqüências de *P. insidiosum* depositadas no GenBank. É importante ressaltar que o fragmento amplificado pelas técnicas moleculares (ITS1-5.8S-ITS2) é caracteristicamente maior neste patógeno cujo tamanho é de cerca de 850 pb, em relação à grande maioria dos fungos que é na faixa de 650 pb (Iwen et al, 2002).

Os dados experimentais (morfologia e biologia molecular) mostraram-se valiosos no melhor conhecimento deste patógeno, em especial no sentido de indicar as ferramentas e estratégias corretas para o estudo e detecção deste peculiar organismo. Estas informações também serão úteis para a realização de estudos futuros de ecoepidemiologia e filogenia molecular deste patógeno emergente.

## Referências Bibliográficas

- ALEXOPOULOS, C.J.; MINS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, 1996; Chap. 3, p.61-85.
- ALFARO, A. A., MENDOZA, L. Four cases of equine bone lesions caused by *Pythium insidiosum*. **Equine Vet. J.**, v. 22, p. 295-7, 1990
- BOSCO, S.M.G.; BAGAGLI, E.; ARAUJO Jr, J.P; CANDEIAS, J.M.; MARQUES, M.E.; FRANCO, M.F.; MENDOZA, L.; CAMARGO, R.P.; MARQUES, S.A. Human pythiosis, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v.11(5), p.715-7, 2005.
- CHAFFIN, M.K.; CHUMACHER, J.; MCMULLAN, W.C. Cutaneous pythiosis in the horse. **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.**, v.11, p.91-103, 1995.
- deCOCK, A.W.A.M.; MENDOZA, L.; PADHYE, A.A.; AJELLO, L.; KAUFMAN, L. *Pythium insidiosum* sp. nov., the etiologic agent of pythiosis. **J. Clin. Microbiol.**,v. 25, p.344-9, 1987.
- IWEN, P.C.; HINRICHS, S.H.; RUPP, M.E. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. **Med. Mycol.**, v.40, p.87-109, 2002.
- KAUFMAN, L. Penicilliosis marneffeii and pythiosis: Emerging tropical diseases. **Mycopathologia**, v. 143, p. 3-7, 1998.
- KENDRICK, B. The fifth kingdom. Waterloo: Mycologue Publications, 1983. p.9-19.
- LEAL, A.B.M.; LEAL, A.T.; SANTURIO, J.M.; KOMMERS, G.D.; CATTO, J.B. Pitiose equina no Pantanal brasileiro: aspectos clínicos-patológicos de casos típicos e atípicos. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 21(4), p. 151-6, 2001.
- McCULLOUGH, M.J.; DISALVO, A.F.; CLEMONS, K.V.; PARK, P.; STEVENS, D.A. Molecular epidemiology of *Blastomyces dermatitidis*. **Clin Infect Dis**, v.30, p.328-35, 2000.
- O'NEILL-FOIL, C. S., SHORT, B. G., FADOK, V. A., KUNGLE, G. A. A report of subcutaneous pythiosis in five dogs and a review of the etiologic agent *Pythium* spp. **J. Am. Ani. Hosp. Assoc.**, v., 20, p. 959-66, 1984.
- SANTURIO, J. M., MONTEIRO, A. B., LEAL, A. T., KOMMERS, G. D., de SOUZA, R. S., CATTO, J. B. Cutaneous pythiosis insidiosi in calves from the Pantanal region of Brazil. **Mycopathologia**, v. 141, p. 123-5, 1998.

com formalina por uma hora, e as lâminas montadas empregando-se a coloração de lactofenol azul algodão.

Para produção de zoósporos utilizou-se 30 ml de uma solução final contendo 0,5ml da solução 1 ( $K_2HPO_4$ , 87, 09 g,  $KH_2PO_4$ , 68,05g,  $(NH_4)_2HPO_4$ , 66,04g em 500mL de água destilada) e 0,1ml da solução 2 ( $Cl_2 \cdot 6H_2O$ , 25,42g e  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , 18,38g em 250 mL de água destilada) como meio líquido de indução e alguns substratos vegetais para indução da produção e germinação do zoósporo, tais como duas espécies de gramíneas conhecidas popularmente como batatais (*Brachiaria decumbens*) e esmeralda (*Zoysia japonica*), uma planta muito comum em cursos d'água conhecida como hortelã-do-brejo (*Heteranthera reniformis*) e duas espécies de grãos, o arroz (*Oryza sativa*) e o sorgo (*Sorghum vulgare*). O fragmento vegetal foi fervido por no mínimo 30 minutos e posto sobre o fragmento de *P. insidiosum* em placa de Petri contendo meio água-ágar 2%. Após um a trinta dias de incubação os fragmentos vegetais parasitados eram retirados e transferidos para placas de Petri contendo 30 ml do meio líquido de indução. A avaliação da produção de esporângios e zoósporos foi feita após 1, 2 e 3 horas de incubação em meio líquido nas temperaturas de 25°C e 35°C através da contagem do número de esporângios na borda do substrato vegetal.

A análise molecular consistiu da extração de DNA segundo protocolo de McCullough et al, 2000, seguido de reação de PCR da região ITS1-5.8S-ITS2 do DNA ribossomal com “primers” universais para fungos ITS4 e ITS5 (White et al, 1990) e reações de Nested-PCR com “primers” específicos para *P. insidiosum*, P11 e P12 (Znajda et al, 2002). O produto de PCR foi submetido à clonagem empregando-se o Kit pGEM-T Easy Vector Systems (Promega). Para verificação da assimilação do plasmídeo contendo o inserto pela bactéria *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen) foi realizada amplificação dos vetores por reação de PCR com os “primers” M13 Forward e M13 Reverse, que possui homologia nas regiões que flanqueiam o local de inserção do fragmento de rDNA de *P. insidiosum* no plasmídeo, o qual foi submetido ao sequenciamento.

Em ambos os isolados as colônias apresentaram-se com aspecto filamentosos, membranosos, micélio aéreo muito curto, porém, mais evidente no isolado humano (B01), sem coloração ou levemente esbranquiçado. O isolado B01 apresentou crescimento inicial mais rápido em meio SAB, porém, em meio BDA atingiu a borda das placas mais rapidamente. A coloração com lactofenol azul algodão permitiu boa visualização de hifas viáveis (bem coradas), apresentaram hifas bem largas, com diâmetros médios entre 5 e 9  $\mu m$ , ramificações predominantemente a 90°, presença de muitos vacúolos e regiões de granulações não homogêneas, septos esparsos, porém nos locais de hifas inviáveis (pouca coloração com lactofenol-azul algodão), estes apresentavam-se mais visíveis e em maior número, sendo que, após a terceira semana de cultivo em BDA, observou-se uma maior presença de hifas claras (provavelmente inviáveis) e muitos septos. Não houve produção de esporângios nestas condições de cultivo.

O isolado de *P. insidiosum* proveniente de equino (Eq) produziu maior número de esporângios em relação ao isolado B01, sendo a gramínea esmeralda e o hortelã-do-brejo os substratos vegetais em que foi observado maior produção de zoósporos. A maior produção de esporângio e zoósporos ocorreu em fragmentos vegetais mantidos no meio de indução na temperatura de 35°C, após 3 horas de cultivo. O tempo necessário para a maturação do esporângio e a liberação dos zoósporos foi dependente da temperatura ambiente. Este foi de cerca de 10-15 minutos nos dias em que a temperatura ambiente foi de 25°C ou mais, e de 30-80 minutos nos dias mais frios (abaixo de 18°C).

A análise morfológica de ambos os isolados (equino e humano) apontaram características peculiares a este microrganismo, que por si só auxiliam a diferenciação deste patógeno de outros fungos verdadeiros, em especial os zigomicetos, com os quais são geralmente confundidos. Ambos os isolados apresentaram preferência de crescimento pelo meio SAB, o qual é ligeiramente mais rico do que o BDA. Um provável fator que influenciou a produção de zoósporos foi a ocorrência de alterações da viabilidade dos fragmentos empregados para o cultivo no meio água-ágar 2%. Fragmentos obtidos dos bordos da colônia apresentaram maior viabilidade e conseqüentemente uma maior produção de esporângios e zoósporos.

Apesar de *P. insidiosum* não se tratar de fungo verdadeiro, a amplificação do segmento ITS1-5.8S-ITS2 pelos “primers” universais para fungos foi bem sucedida e os “primers” P11 e P12, mostraram-se mais uma vez específicos para *P. insidiosum* na reação de Nested-PCR. A clonagem do fragmento obtido por PCR da cepa B01 de pitiose humana foi realizada com sucesso e os amplicons

## **CARACTERIZAÇÃO MICOLÓGICA E MOLECULAR DE *Pythium insidiosum* OBTIDO DO PRIMEIRO CASO DE PITIOSE HUMANA NO BRASIL.**

Gabriela Martins Reis, Eduardo Bagagli, Sandra de Moraes Gimenes Bosco, Severino Assis da Graça Macoris, Sílvio de Alencar Marques. - Microbiologia - Ciências Biológicas - Departamento de Microbiologia e Imunologia - Instituto de Biociências - Campus de Botucatu.

A Pitiose é uma doença emergente que acomete o tecido cutâneo e subcutâneo, com o desenvolvimento de lesões de natureza granulomatosa (Triscott, 1993, Chaffin, 1995). É causada pelo *Pythium insidiosum*, um microrganismo semelhante a fungo, pertencente ao filo Oomycota, classe Oomycete (Kendrick, 1985). Estudos mais recentes têm sugerido que este pertence ao Reino Straminipila, que inclui organismos não fúngicos, porém com características morfológicas e ecológicas semelhantes aos fungos (Alexopoulos *et al*, 1996). Este organismo vive em ambiente aquático com presença de vegetação, embora pouco ainda se sabe sobre suas preferências ecológicas. As diversas espécies pertencentes ao gênero *Pythium* são primariamente fitopatogênicas, porém, até o presente momento, a única espécie relatada capaz de causar doença em animais, incluindo o homem é o *P. insidiosum* (deCock *et al*, 1987).

Em ambiente natural, este patógeno produz zoósporos biflagelados, os quais são originados de reprodução assexuada e corresponde à forma infectante. Para que a infecção ocorra é necessário que haja uma injúria no tecido cutâneo, a qual serve como fator atrativo para o zoósporo que, ao penetrar a pele, se encista causando a infecção primária (deCock *et al*, 1987).

A pitiose ocorre em países de clima tropical e subtropical que, caracteristicamente, apresentam temperaturas mais elevadas e abundantes cursos d'água. Nos animais, tem sido freqüentemente relatada na espécie eqüina e em cães (O'Neill-Foil *et al*, 1984, Alfaro & Mendoza, 1990). O primeiro caso humano foi diagnosticado em 1986 em um menino proveniente da Tailândia, país que concentra a maioria dos casos (deCock *et al*, 1987).

No Brasil, a doença tem sido freqüentemente observada em eqüinos e bovinos da região do Pantanal Matogrossense (Santurio *et al*, 1998, Leal *et al*, 2001). Um surto em ovinos foi recentemente reportado no nordeste provocando o óbito desses animais (Tabosa *et al*, 2004). Recentemente o primeiro caso da doença em humano foi descrito em um paciente que apresentava uma extensa lesão no membro inferior a qual foi adquirida após pescaria em rio no município de Paraguaçu Paulista/SP. Este paciente foi atendido junto ao Serviço de Dermatologia da Faculdade de Medicina de Botucatu e o diagnóstico foi confirmado em cooperação com pesquisadores do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu (Bosco *et al*, 2005).

A identificação do *P. insidiosum* é importante, pois essa infecção freqüentemente mimetiza quadros clínicos e achados histopatológicos de espécies pertencentes ao grupo de fungos zigomicetos (Kauffman *et al*, 1998).

Dado a importância deste primeiro relato de pitiose humana do Brasil, o presente projeto teve como objetivo aprofundar os estudos de caracterização morfológica (macro e microscópica) e molecular deste isolado de *P. insidiosum* humano, bem como a comparação deste com um isolado de *P. insidiosum* obtido de eqüino, de forma a melhor instrumentar os laboratórios para o diagnóstico e conhecimento deste emergente patógeno.

A avaliação macroscópica foi feita através de colônias gigantes em meio Sabouraud Dextrose Ágar (SAB) e Batata Dextrose Ágar (BDA), cujo inóculo foi padronizado como um fragmento de 80mm de diâmetro no centro da placa. As placas foram mantidas em estufa a 25°C por período de até oito semanas. A cada semana foram feitas medidas quanto ao diâmetro das colônias e observações da morfologia.

Para observação da micromorfologia, empregou-se a técnica de microcultivo em lâmina utilizando os meios de SAB e BDA. Os microcultivos foram mantidos em estufa a 25°C por um período de até cinco semanas, e a cada sete dias um microcultivo em BDA e um em SAB, era tratado