

AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE *Pythium insidiosum* EM IMATUROS DE *Culex quinquefasciatus*

CAROLINE QUINTANA BRAGA¹; CAROLINA DOS SANTOS BERMANN²;
ANGELITA MILECH³; ÉLVIA HELENA VIANNA⁴, JOSIANE BONNEL⁵; DANIELA
ISABEL BRAYER PEREIRA⁶

¹UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS – carolineqbraga@hotmail.com

²UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS – carolbermann@hotmail.com

³UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS – angelitamilech@gmail.com

⁴UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS – elviavianna@gmail.com

⁵UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS – josiebonnel@hotmail.com

⁶UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS – danielabrayer@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Pythium insidiosum, um importante oomiceto patógeno é o agente etiológico da pitiose em mamíferos (GAASTRA et al., 2010), uma enfermidade grave e emergente, que afeta principalmente equinos no Brasil e humanos na Tailândia (SANTOS 2011 et al., 2001; WEIBLEN et al., 2015; KRAJAEJUM et al., 2018).

Epidemiologicamente, nota-se a exposição das espécies afetadas a ambientes alagados e pantanosos. O acúmulo de água estagnada e temperaturas entre 30°C e 40°C favorecem a reprodução assexuada do oomiceto, que origina zoósporos biflagelados móveis que constitui a forma infectante. Esses zoósporos ao serem liberados nas águas são atraídos para o pelo dos animais, penetram na pele através de lesões pré-existentes, produzindo a enfermidade (MENDOZA et al., 1996).

P. insidiosum além de estar presente em ambientes aquáticos, como áreas pantanosas e reservatórios de águas (Presser; Goss, 2015; Zambrano et al., 2017), também foi recuperado de larvas de *Culex quinquefasciatus* na Índia (Schurko et al., 2003) e de larvas de *Aedes aegypti* no Estado de Tocantins, região central do Brasil (VILELA et al., 2018). Este fato sugere que este micro-organismo apresenta afinidade por hospedeiros invertebrados, podendo utilizar larvas de mosquitos para completar seu ciclo de vida.

Na literatura há relatos de infecção em animais e humanos sem histórico de contato com ambientes aquáticos, bem como a ocorrência de lesões em regiões do corpo com pouca probabilidade de contato com águas contaminadas (Bissonnette et al., 1991; Pierezan et al., 2009; Santos et al., 2011), induzindo a questionamentos a respeito da presença de outras fontes de infecção.

Considerando que as larvas dos culicídeos e *P. insidiosum* compartilham o mesmo nicho ecológico e que este oomiceto foi previamente isolado de larvas de

C. quinquefasciatus e *A. aegypti*, torna-se relevante conhecer a participação destes insetos na epidemiologia da pitiose, bem como no ciclo biológico desse micro-organismo patógeno. O objetivo deste estudo foi verificar se *P. insidiosum* é capaz de infectar formas imaturas de *Culex quinquefasciatus*.

2. METODOLOGIA

A colônia de *C. quinquefasciatus* foi estabelecida conforme protocolo previamente descrito por VIANNA; COSTA; RIBEIRO (1996). Para a produção de zoospóros de *P. insidiosum* empregou-se uma cepa padrão oriunda de equino (CBS 101555). A zoosporogênese foi realizada conforme metodologia previamente descrita por Mendoza e Prendas (1988) com modificações. A cada recipiente contendo as fases imaturas do culicídeo foi adicionado um volume de 30 mL de meio de indução contendo aproximadamente 8×10^3 zoósporos de *P. insidiosum*/mL (PEREIRA et al., 2007). O grupo controle foi elaborado da mesma maneira, porém recebeu 30 mL de meio de indução sem zoósporos do oomiceto. Vinte e quatro horas após a exposição aos zoósporos de *P. insidiosum*, 500 larvas em estágio L1 e L2 (divididos em 10 pools de 50 imaturos); 500 larvas em estágio L3 e L4 (10 pools); 500 pupas (10 pools) e 500 ovos (10 pools) de *C. quinquefasciatus*.foram coletados e lavados em água destilada estéril por quatro vezes consecutivas e macerados. Alíquotas do macerado foram semeadas em agar bendazol (AB) e agar pentaclorobenzeno (APCB) (PRESSER & GOSS, 2015). As placas foram incubadas a 37°C/48 horas e colônias suspeitas de *P. insidiosum* foram identificadas por suas características macro e micromorfológicas. O mesmo procedimento foi realizado para o grupo controle e para análise da presença de *P. insidiosum* na água declorada. O experimento foi realizado em duplicata e em duas repetições realizadas em momentos diferentes.

Análise histopatológica: Larvas em estágio L4 infectadas (n=37) e controle (n=37) foram coletadas e acondicionadas em frascos contendo formalina 10%. Posteriormente foram rotineiramente processadas para análise histopatológica e submetidas à coloração de hematoxilina-eosina (H&E) e método de metenamina de prata (Grocott).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Vinte e quatro horas após a semeadura dos pools de larvas (L1-L4) observou-se o crescimento de colônias características de *P. insidiosum*. A análise microscópica das colônias revelou a presença de hifas cenocíticas que apresentavam raras septações e ramificações em ângulo reto condizentes com hifas do oomiceto, evidenciando que todos os estágios larvais foram infectados

com zoósporos de *P. insidiosum*. Esses resultados corroboram Schurko et al. (2003) e Vilela et al. (2018), comprovando que *P. insidiosum* é capaz de infectar os estágios larvais de mosquito. Os parâmetros de desenvolvimento, taxa de mortalidade e motilidade das larvas de *C. quinquefasciatus* infectadas com zoósporos não demonstraram alterações durante do período de experimento.

Na histologia das larvas L4 infectadas com *P. insidiosum* evidenciou-se aparência normal da cabeça, tórax e abdômen. As células do epitélio do intestino apresentavam núcleos desordenados e estruturas tubuliformes e arredondadas foram observadas no corpo gorduroso, próximo ao tecido epitelial e tegumento. Tais estruturas foram evidenciadas impregnadas pela prata no Grocott, não sendo encontradas nas larvas do grupo controle.

Nos estágios de ovo e pupa de *C. quinquefasciatus* não foi possível detectar-se a presença do oomiceto. A ausência da infecção no estágio de ovo era esperada, uma vez que os ovos são depositados em forma de “jangada” sobre a lâmina de água, não ficando submersos. Além disso, possuem uma cutícula serosa quitinizada que os protege da entrada de patógenos (FORATTINI 2002). Segundo Ravishankar et al. (2001) *P. insidiosum* não é capaz de invadir tecidos intactos. Adicionalmente, em *C. quinquefasciatus* a fase de pupa é curta, ela não se alimenta e sofre uma série de mudanças fisiológicas, pois este estágio é intermediário entre a vida essencialmente aquática e a vida terrestre (adultos) (FORATTINI, 2002). Desta forma, acredita-se que essas mudanças poderiam explicar a ausência de infecção no estágio pupal.

4. CONCLUSÕES

Os resultados desta pesquisa evidenciam que *P. insidiosum* é capaz de infectar os estágios larvais L1, L2, L3 e L4 de *C. quinquefasciatus*, mas não os estágios de ovo e pupa. É provável que o oomiceto utilize as larvas desse hospedeiro invertebrado para manutenção de seu ciclo de vida nos ecossistemas aquáticos. No entanto, outras pesquisas são imprescindíveis para explicar a participação do culicídeo no ciclo deste importante oomiceto patógeno.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BISSONNETTE, K. W. et al. Nasal and retrobulbar mass in a cat caused by *Pythium insidiosum*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**. v.29, p.39-44, 1991.

FORATTINI, O. P. **Culicidologia Medica**. Volume 2. São Paulo: Edusp. 2002.

GAASTRA, W.; et al. Pythium insidiosum: an overview. **Veterinary Microbiology**, v.146, n.1-2, p.1-16, 2010.

KRAJAEJUN, T.; LOHNOO, T.; JITTORNTAM, P.; SRIMONGKOL, A.; KUMSANG, Y.; YINGYONG, W.; RUJIRAWAT, T.; REAMTONG, O.; MANGMEE, S. Assessment of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification and biotyping of the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum*. **International Journal of Infectious Diseases**, v.77, p.61-67, 2018.

MENDOZA, L.; et al. Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. **Journal de Mycologie Médical**., v.6, n.4, p.151-164, 1996.

PEREIRA, D. I. et al. Caspofungin *in vitro* and *in vivo* activity against Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals. **J Antimicrob Chemother**. v. 60, n.5, p.1168-1171, 2007.

PIEREZAN, F. et al. Achados de necropsia relacionados coa a morte de 335 equinos: 1968-2007. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.29, n.3, p. 275-280, 2009.

PRESSER, J. W.; GOSS, E. Environmental sampling reveals that *Pythium insidiosum* is ubiquitous and genetically diverse in North Central Florida. **Medical Mycology**, v.00, p.1–10, 2015.

RAVISHANKAR, J.P. et al. Mechanics of solid tissue invasion by the mammalian pathogen *Pythium insidiosum*. **Fungal Genetics and Biology**. v. 34, p. 161-175, 2001.

SANTOS, C. E. P. et al. Pitiose em animais de produção no Pantanal. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.12, p.1083-1089, 2011.

SCHURKO, A.; MENDOZA, L.; DE COCK, A.W.; 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.

WEIBLEN, C.; MACHADO, G.; JESUS, F.P.K.; SANTURIO, J.M.; ZANETTE, R.A.; PEREIRA, D.I.B.; DIEHL, G.N.; SANTOS, L.C.; CORBELLINI, L.G.; SÔNIA DE AVILA BOTTON, S.A. Seroprevalence of *Pythium insidiosum* infection in equine in Rio Grande do Sul, Brazil. **Ciência Rural**, v.46, n.1, p.126-131, 2015.

VIANNA, E. E. S. COSTA, P. R. P. RIBEIRO, P. B. Oviposição e longevidade de adultos de *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera: Culicidae) em condições ambientais, em Pelotas, RS. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.5, p.47-52, 1996.

VILELA, R. et al. *Pythium insidiosum* isolated from infected mosquito larvae in central Brazil. **Acta Tropica**. v. 185, p. 344-348, 2018.

ZAMBRANO, C.; GOMES, A.R.; BRASIL, C.L.; VALENTE, J.S.S.; BRAGA, C.Q.; DE AZEVEDO, M.I.; BOTTON, S.A.; PEREIRA, D.I.B. Influence of Temperature on *in vitro* Zoosporogenesis of *Pythium insidiosum*. **Medical Mycology**. v.56, n.7, p. 877- 883, 2017.