



Tipo de trabalho: RESUMO SIMPLES (MÁXIMO 2 PÁGINAS)

APLICAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO DA REGIÃO INTERGÊNICA (ITS) PARA IDENTIFICAÇÃO E GENOTIPAGEM DE ISOLADOS BRASILEIROS DE *PYTHIUM INSIDIOSUM*¹

Lara Baccarin Ianiski², Carla Weiblen³, Paula Cristina Stibbe⁴, Daiane Britto De Oliveira⁵, Janio Moraes Santurio⁶, Sônia De Avila Botton⁷

¹ Pesquisa científica

² Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Centro de Ciências da Saúde (CCS), RS, Brasil.

³ Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (PPGMV), Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS, Brasil.

⁴ Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Centro de Ciências da Saúde (CCS), RS, Brasil.

⁵ Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Centro de Ciências Rurais (CCR), RS, Brasil.

⁶ Departamento de Microbiologia e Parasitologia (DEMIP), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS, Brasil.

⁷ Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (PPGMV), Centro de Ciências Rurais (CCR), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS, Brasil.

Introdução

A pitiose é uma doença infecciosa geralmente fatal que acomete animais e humanos, causada pelo oomiceto aquático *Pythium insidiosum*. Essa doença apresenta distribuição mundial, sendo relatada em regiões pantanosas e alagadiças. No Brasil, o Pantanal Matogrossense e o sul do Rio Grande do Sul são considerados endêmicos para a pitiose equina, contudo, a Tailândia apresenta o maior número de casos de pitiose humana. Devido à dificuldade de diagnosticar a pitiose e os altos custos para a identificação laboratorial de *P. insidiosum*, bem como a semelhança com outros agentes, especialmente outros oomicetos e fungos filamentosos, há a necessidade do desenvolvimento de ferramentas diagnósticas que possam identificar rapidamente esse micro-organismo de grande relevância à saúde pública e animal. Técnicas de biologia molecular, principalmente utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR), têm auxiliado no diagnóstico, além de possibilitar estudos filogenéticos dos agentes microbianos. Estudo com marcador de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) tem sido utilizado para análise de diversidade e relacionamento em diferentes micro-organismos, incluindo *P. insidiosum*.

Objetivos

Este estudo teve por objetivo realizar a genotipagem de isolados clínicos brasileiros de *P. insidiosum* empregando os SNP baseado nas sequências intergênicas da região espaçadora do rDNA (ITS).



Tipo de trabalho: RESUMO SIMPLES (MÁXIMO 2 PÁGINAS)

Metodologia

Trinta e um isolados clínicos de *P. insidiosum* do Brasil, cepas padrão da Tailândia (n = 3), Japão (n = 1) e Índia (n = 1) foram analisadas. Adicionalmente, uma cepa padrão de *Pythium aphanidermatum* e uma espécie ambiental, *Pythium torulosum*, foram incluídas nesta pesquisa. Todos os isolados foram previamente cultivados em caldo Sabouraud a 120rpm/37°C/5dias e armazenados em freezer -80°C/24h. O DNA total foi obtido por extração fenólica e para a amplificação por PCR-multiplex SNP da região ITS foram empregados os *primers*: ITS1, R1, R2 e R3 em condições específicas de concentração e temperatura. Os produtos da PCR foram verificados em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídeo e fotodocumentados.

Resultados

Fundamentado na PCR-multiplex dirigida aos três SNPs identificados na região ITS, foi possível alocar os isolados analisados aos seus respectivos cladogramas; clado I (isolados brasileiros) forneceram dois amplicons de aproximadamente 490 e 660 pares de base (pb), clado II (isolados da Índia, Japão e Tailândia) e clado III (um isolado tailandês) apresentaram um amplicon de aproximadamente 490pb e 800pb, respectivamente. *P. aphanidermatum* e *P. torulosum*, não foram amplificados, uma vez que, esses isolados não pertencem a nenhum clado de *P. insidiosum*. Visando explorar aspectos relacionados à biologia e à evolução, sequências genômicas de *P. insidiosum* foram recentemente disponibilizadas, podendo ser um recurso investigativo bastante útil, uma vez que genes avaliados independentemente podem não fornecer muita informação quando comparados aos genomas.

Conclusão

Esta pesquisa, utilizou uma ferramenta molecular rápida e custo-efetiva, apresentando 100% de sensibilidade e especificidade, a PCR-multiplex- baseada em SNP da região ITS, possibilitando realizar, ao mesmo tempo, a identificação precisa e a genotipagem eficiente de *P. insidiosum* proveniente de isolados clínicos oriundos do Brasil.

Palavras-chave: Pitiose; Oomiceto; Análise molecular.

Agradecimentos: CNPq (442020/2014-7), FAPERGS/PqG (27293.414.15435.20062017) e CAPES (código 001) pelo apoio científico e financeiro.