



Pitiose: uma micose emergente

Pythiosis: an emergent mycosis

Janio Morais Santurio¹, Sydney Hartz Alves¹, Daniela Brayer Pereira² & Juliana Siqueira Argenta¹

RESUMO

A pitiose é uma enfermidade piogranulomatosa do tecido subcutâneo causada pelo *Pythium insidiosum*, microrganismo classificado no Reino *Straminipila*, Classe *Oomycetes*, Ordem *Pythiales*, Família *Pythiaceae*, Gênero *Pythium* e espécie *P. insidiosum*. Acomete várias espécies animais, porém a doença é mais frequentemente observada em equinos, podendo, também, afetar os humanos. Epidemiologicamente a pitiose está intimamente relacionada com o contato dos animais e humanos com águas contaminadas pelo agente, onde produz zoósporos móveis que constituem-se na forma infectante do *Pythium insidiosum*. A enfermidade em eqüinos caracteriza-se principalmente pelo desenvolvimento de lesões subcutâneas ulcerativas e granulomatosas de aparência tumoral com presença de massas branco-amareladas, chamadas internacionalmente de “kunkers”. Já nas outras espécies a formação dos “kunkers” não é observada. O diagnóstico de pitiose é realizado pelos sinais clínicos, histopatologia, isolamento e identificação do agente, técnicas sorológicas como imunodifusão, ELISA e imunohistoquímica e mais recentemente por PCR. A doença destaca-se pela dificuldade no tratamento, uma vez que as drogas antifúngicas disponíveis não mostram eficiência contra o *Pythium insidiosum*. Atualmente a utilização de imunoterápicos constitui-se na alternativa de terapia em eqüinos, com resultados animadores. Este trabalho tem por objetivos revisar os aspectos taxonômicos, epidemiológicos clínicos e histopatológicos da pitiose em diversas espécies. Também são abordados as técnicas diagnósticas e as perspectivas imunoterápicas.

Descritores: pitiose, *Pythium insidiosum*, coelho, zoósporos, imunoterapia, oomycota, cavalo.

ABSTRACT

Pythiosis is a granulomatous disease of the subcutaneous tissue caused by the *Pythium insidiosum*, zoosporeic fungi classified in the Kingdom Straminipila, Class Oomycetes, Order Pythiales, family Pythiaceae, genera Pythium and specie *P. insidiosum*. Occurs in some animal species, however the illness is more frequently observed in horses even though human beings can be affected too. Epidemiologically pythiosis is intimately related with the contact of the animals and human with contaminated waters for the agent, where it produces motile zoospores which are in the infectious form of the *Pythium insidiosum*. The disease in horses characterizes itself mainly for the development of ulcerative and granulomatous subcutaneous injuries of tumoral appearance with presence of white-yellowish masses, internationally calls of “kunkers”. Already in the other species the formation of “kunkers” is not observed. The diagnosis of pythiosis is carried through by the clinical signals, histopathology, isolation and identification of the agent, serological techniques as immunodiffusion, ELISA and immunohistochemical and more recently for PCR. The illness is distinguished for the difficulty in the treatment, became the available antifungal drugs do not show to efficiency against *Pythium insidiosum*. Currently the use of immunotherapy consists in the alternative of therapy in equines, with encouraged results. This work has for objectives to review the taxonomic, clinical epidemiologic and histopathological aspects of pythiosis in diverse species. The diagnostic techniques and the immunotherapeutic perspectives are boarded too.

Keywords: pythiosis, *Pythium insidiosum*, rabbit, zoospores, immunotherapy, oomycota, horse.

I. INTRODUÇÃO

II. *PYTHIUM INSIDIOSUM*

1. Classificação do agente

III. PITIOSE

1. Epidemiologia

2. Pitiose em eqüinos

3. Pitiose em cães e gatos

4. Pitiose em bovinos

5. Pitiose em ovinos

6. Pitiose em humanos

7. Pitiose em coelhos

8. Diagnóstico

9. Histopatologia

10. Tratamento

11. Imunoterapia

IV. CONCLUSÕES

I. INTRODUÇÃO

A pitiose é uma doença granulomatosa que atinge eqüinos, provocando quadro infeccioso na pele e tecido subcutâneo, caninos com apresentação gastrintestinal e cutânea, bovinos com doença cutânea, felinos e humanos apresentando quadro clínico de arterite, queratite e celulite periorbital. É mais prevalente em áreas tropicais, subtropicais ou temperadas [24,49,55,94]. É causada pelo oomiceto pertencente ao Reino *Straminipila*, *Pythium insidiosum* [2,14]. Nas espécies não domésticas, o *Pythium insidiosum* foi reconhecido como causa de doença pulmonar primária num jaguar (*Pantera onca*) da América Central, além de lesões cutâneas e gastrintestinais em um urso de zoológico e, também, como causa de lesão mandibular subcutânea em um camelo [24].

A enfermidade nos eqüinos caracteriza-se pela formação de granulomas com infiltrações de eosinófilos, com a presença de massas necróticas denominadas de “kunkers” [49,50,93].

Os caninos são a segunda espécie mais atingida e as infecções caracterizam-se pela formação de piogranulomas gastrintestinais e cutâneos [6,18,19,24,31,64]. Em humanos, a doença é comum no sudeste da Ásia, principalmente na Tailândia. A doença apresenta-se nas formas subcutânea, sistêmica e oftálmica, sendo

que as formas cutâneas e sistêmicas estão associadas à síndrome de α e β -talassemia, comuns nessa região [33,35].

Diversos protocolos para o tratamento da pitiose têm sido utilizados, principalmente em eqüinos, incluindo tratamento químico (antifúngicos), cirúrgico e de imunoterapia. A imunoterapia, proposta inicialmente por Miller [60], surgiu como uma alternativa concreta para o controle da doença e tem apresentado resultados animadores [57,70].

II. *PYTHIUM INSIDIOSUM*

1. Classificação do agente

Estudos detalhados sobre a classificação dos fungos, baseados em sistemática filogenética e análises moleculares, entre outros, dividiram os organismos anteriormente classificados como fungos em três reinos: *Fungi*, *Straminipila* e *Protista* [2]. Baseado nessa nova classificação, o agente etiológico da pitiose pertence ao Reino *Straminipila*, Classe *Oomycetes*, Ordem *Pythiales*, Família *Pythiaceae*, Gênero *Pythium* e espécie *P. insidiosum* [42,70]. Estudos taxonômicos mais aprofundados, baseados em análises de sequenciamento de gene do RNA ribossomal de *P. insidiosum*, confirmaram que os membros da classe *Oomycetes* são filogeneticamente distantes dos membros do Reino

Fungi e estariam relacionados de maneira mais próxima das algas que dos fungos [39]. A distância taxonômica entre os oomicetos e os fungos estão retratados ao nível celular através de diferenças na parede e composição da membrana. A quitina, um componente essencial da parede celular fúngica, está geralmente ausente na parede celular dos oomicetos, onde aparecem como componentes predominantes celulose e β -glucana [29]. Também os oomicetos diferem dos fungos quanto ao papel do ergosterol na membrana celular, ou seja, nos primeiros ele não é o principal esteroide. Nenhum dos oomicetos compartilham da mesma bioquímica dos esteróides como os fungos. Espécies dos gêneros *Pythium*, *Lagenidium*, e *Phytophthora* possuem esteróides auxotróficos, ou seja, eles incorporam os esteróides do ambiente em lugar de os produzirem como ocorre com os fungos. Os esteróides são importantes para produção de estruturas sexuadas *in vitro*, mas não são necessários para o crescimento da hifa vegetativa [24].

O gênero *Pythium* pertence ao filo *Oomycota*, cujos membros caracterizam-se por: 1) produção de zoósporos biflagelados durante a reprodução assexuada; 2) reprodução sexuada oogâmica; 3) parede celular composta de β -glucanas, celulose e hidroxipolina; 4) talo diplóide; 5) mitocôndria com crista tubular; 6) características moleculares e bioquímicas peculiares, como uma rota alternativa para síntese do aminoácido lisina [2,71]. Esse gênero possui mais de 120 espécies distribuídas em todo planeta, sendo a maioria habitantes do solo e patógenos de plantas. Espécies de *Pythium* são a principal causa da doença “damping-off” de plantas, ocasionando severos prejuízos em lavouras. Algumas espécies tem sido estudadas para utilização como controle biológico de fungos patógenos e larvas de mosquito, enquanto apenas a espécie *P. insidiosum* é conhecida como patógeno de mamíferos.

Schurko *et al.* [97], ao compararem 28 espécies de *P. insidiosum* originárias das Américas, Ásia e Austrália, através de comparação do espaço ribossomal intergênico pela técnica molecular de RFLP (“restriction fragment-length polymorphism”) e análise dos “clusters”, demonstraram haver grandes diferenças entre os isolados de *P. insidiosum* das 3 regiões estudadas com a possibilidade real de não serem todas a mesma espécie. Estes autores levantam a possibilidade de uma reclassificação como sub-espécies, pois cada cluster dos isolados representa populações geneticamente distintas.

III. PITIOSE

1. Epidemiologia

A pitiose ocorre em regiões de clima tropical, subtropical e temperado, tendo sido relatada nas Américas, alguns países europeus, sudeste asiático, Oceania e recentemente na África [12,20,55,84]. Não há predisposição por sexo, idade ou raça e a fonte de infecção são os zoósporos ambientais, não havendo relatos de transmissão direta entre animais e entre animais e homens [55].

As condições ambientais são determinantes para o desenvolvimento do organismo em seu ecossistema. Para haver a produção de zoósporos são necessárias temperaturas entre 30 e 40°C e o acúmulo de água em banhados e lagoas [61]. A grande maioria dos casos de pitiose foi observada durante ou após a estação chuvosa. Baseado nos dados epidemiológicos, acredita-se na existência de um período de incubação de várias semanas. No Pantanal brasileiro, a maioria dos casos de pitiose equina é registrada entre os meses de fevereiro e maio (verão-outono), período que corresponde ao ápice das cheias [43]. Grande parte dos 38 casos de pitiose observados na Paraíba foi registrada nos meses de julho a outubro, sete a dez meses após o início das chuvas na região [103].

Em 1983 [63], foi proposto um ciclo ecológico para descrever o comportamento ambiental e a cadeia infecciosa desse organismo. O ciclo baseia-se na colonização de plantas aquáticas, que servem de substrato para o desenvolvimento e reprodução do organismo, formando os zoosporângios. Os zoósporos livres na água, movimentam-se até encontrar outra planta (ou animal), onde se encistam e emitem tubo germinativo, dando origem a um novo micélio e completando seu ciclo. Análises *in vitro* demonstraram a atração dos zoósporos por pêlos, tecidos animal e tecido vegetal, sendo a quimiotaxia atribuída a algumas substâncias presentes nesses tecidos. Uma substância amorfa é liberada pelo zoósporo após o seu encistamento, a qual provavelmente é produzida em resposta ao fator quimiotático do hospedeiro; essa substância agiria como um adesivo para ligar o zoósporo a superfície do hospedeiro e permitir a formação de tubo germinativo [54].

Essas observações sustentaram a teoria de infecção, sugerindo que os cavalos em contato com águas contaminadas poderiam atrair os zoósporos, os quais germinariam a partir de uma pequena lesão cutânea [54,63]. Existe também, a possibilidade de penetração

dos zoósporos através dos folículos pilosos, baseados na detecção de hifas no interior do folículo de bovinos infectados naturalmente e no fato do quimiotaxismo ser mais ativo na região localizada dentro do folículo piloso [94]. Essa observação pode questionar a necessidade de lesão na pele para que ocorra a germinação dos zoósporos. Por outro lado, nos casos e relatos acompanhados no Brasil, foi possível detectar diferenças na suscetibilidade de equinos à infecção. Comparando-se com os dados de pitiose humana, onde a maior parte dos casos ocorrem em indivíduos talassêmicos, pode-se suspeitar da presença de alguma(s) característica(s) que torne alguns animais mais suscetíveis. São necessárias mais investigações nesse sentido [93].

No Brasil, a pitiose foi descrita em equinos, bovinos e caninos, porém a maioria dos casos relatados corresponde a lesões cutâneas em equinos. A primeira descrição de pitiose equina ocorreu no Rio Grande do Sul [90]. Desde então, os relatos de pitiose equina no Brasil somam mais de 90 casos e foram descritos em vários estados como Rio Grande do Sul [49,88,91], Mato Grosso do Sul [43,70], São Paulo [86], Pará [107], Paraíba [101], Paraná [26] e Rio de Janeiro [89]. Esses relatos comprovam a provável existência da pitiose equina em todo o País. Além disso, o Pantanal brasileiro é provavelmente o local de maior incidência e prevalência de pitiose equina do mundo [43,55,93]. O Pantanal é uma planície inundável de aproximadamente 140.000 km² e possui em torno de 139.760 equinos [101]. Embora não exista um levantamento preciso da incidência no Brasil, a pitiose equina representa um problema à criação de equinos, especialmente em regiões alagadiças como no pantanal brasileiro.

2. Pitiose em Equinos

A doença é conhecida por outros nomes como hifomicose, zigomicose, dermatite granular, “bursattee”, “Florida leeches”, granuloma ficomicótico e “swamp cancer” [12,20]; nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul o nome popular mais conhecido é “ferida da moda” [43]. O termo hifomicose inclui outras doenças causadas por fungos, especialmente *Conidiobolus ranarum* e *Basidiobolus haptosporum*, além de membros da ordem *Mucorales* [9].

A espécie equina é a mais atingida pela pitiose, não havendo predisposição de raça, sexo ou idade [20, 50]. As lesões cutâneas são as mais frequentes e atingem principalmente as extremidades distais dos membros e porção ventral da parede toraco-abdominal, provavel-

mente devido ao maior tempo de contato com águas contaminadas com zoósporos [12,61]. O zoósporo de *P. insidiosum* em contato com uma ferida, produz tubo germinativo com secreção de enzimas proteolíticas que penetram ativamente no tecido exercendo pressão de 0,14μN μm⁻² sobre eles para sua penetração [47,80]. Os sinais clínicos caracterizam-se por lesões ulcerativas granulomatosas, formando grandes massas teciduais (5 a 500 mm), com bordas irregulares, de aparência tumoral e com hifas recobertas por células necróticas, que formam massas branco-amareladas semelhante a corais, chamadas internacionalmente de “kunkers”. Os “kunkers” variam de 2 a 10 mm de diâmetro, tem forma irregular, ramificada, com aspecto arenoso e penetram no tecido granular, dentro de *sinus* formados ao longo do seu trajeto. O tamanho das lesões depende do local e duração da infecção e, apresentam secreção sero-sanguinolenta, muco-sanguinolenta, hemorrágica e, às vezes, mucopurulenta que flui através dos *sinus*. Os animais apresentam intenso prurido e normalmente mutilam a lesão na tentativa de aliviar o desconforto. Claudicação é freqüente nos cavalos atingidos nos membros [12,43,49,55,61]. A maioria dos casos descritos relata apenas uma lesão em cada animal, porém podem existir lesões cutâneas multifocais [11, 50,61]. Também a pitiose pode se disseminar para órgãos internos a partir de infecções sub-cutâneas [82]. Esses autores detectaram infecção generalizada em 3 equinos no estado de Minas Gerais, principalmente pulmões e fígado, sendo o achado de hifas confirmado através de PCR do DNA ribossomal como *P. insidiosum*. Leal *et al* [43], relatam casos atípicos de pitiose equina no pantanal brasileiro. Os animais mostram lesões deformantes mas, de forma diversa, não ocorre a saída constante de linfa e outros fluídos corporais e o tecido granulomatoso é recoberto com pele escurecida e grossa. Ao ser pressionada a lesão, facilmente consegue-se extrair “kunkers” com facilidade de onde foram isoladas estruturas posteriormente identificadas como *Pythium insidiosum*. Os equinos com tais lesões atípicas de pitiose não apresentam emagrecimento progressivo e, após um ano de observação as lesões permanecem do mesmo aspecto e tamanho. Segundo os autores, somente no pantanal brasileiro foram registradas estas formas bizarras da pitiose nos equinos.

O envolvimento intestinal é a segunda forma mais freqüente da infecção pelo *Pythium insidiosum* em equinos. Os casos descritos apresentaram-se como

episódios de cólica, cuja causa é a presença de massas teciduais, com diminuição e obstrução do lúmen intestinal ou ambos. Os achados de necropsia e excisão cirúrgica revelaram ulceração intestinal e massas nodulares localizadas na parede do jejuno, podendo atingir 20 cm de diâmetro [93]. Além da pitiose cutânea e intestinal, outros órgãos e tecidos podem ser atingidos secundariamente às lesões cutâneas. As lesões ósseas descritas na literatura referem-se a cavalos com lesões cutâneas crônicas, localizadas nos membros e com grande proliferação do tecido granulomatoso. Estas lesões ósseas ficaram limitadas aos ossos adjacentes às lesões cutâneas crônicas e, caracterizaram-se por exostoses, osteólises e osteomielite no exame radiológico além da presença de granulomas com infiltrado de eosinófilos com áreas de necrose e massas necróticas contendo hifas no exame histopatológico [3,16,51].

Casos de metástases via sistema linfático para pulmões e linfonodos regionais já foram relatados [12]. Foram descritos casos nos linfonodos cervicais inferiores, inguinais e submandibulares [13,41,74], sendo sempre os responsáveis pela drenagem linfática da região atingida pela lesão cutânea. Os linfonodos atingidos apresentavam “kunkers”, dos quais foi possível o isolamento do agente etiológico. Na maioria dos casos de pitiose cutânea, os linfonodos regionais encontram-se aumentados. No entanto, esse achado pode ser utilizado apenas como um indicativo de metástase. Em um estudo, foram examinados os linfonodos de 15 cavalos com pitiose e todos se apresentavam aumentados e edematosos, porém em apenas três animais foi detectada metástase no linfonodo inguinal [67].

3. Pitiose em Cães e Gatos

Os caninos são a segunda espécie mais atingida pela pitiose, também nas formas cutânea e gastrintestinal. A forma gastrintestinal é a mais comum e manifesta-se com distúrbios digestivos como vômito, anorexia crônica, perda de peso, diarreia (às vezes sanguinolenta) e presença de massas nodulares, quando submetidos a palpação abdominal [6,15,18,24,64]. Os cães afetados são normalmente oriundos de regiões rurais ou estiveram, esporadicamente, em locais alagados como açudes e banhados [15,18,19]. As lesões gastrintestinais caracterizam-se pela formação de grandes massas nas paredes do estômago e intestino que são compostas por inflamação granulomatosa e piogranulomatosa com áreas de necrose, intenso infiltrado eosi-

nofílico e presença de hifas [6,18,46,63,69]. O trato digestivo superior também pode ser atingido pela doença, sendo relatados 2 casos de esofagite crônica devido à infecção pelo *Pythium insidiosum* [76] e um caso de pitiose canina com uma massa na orofaringe, envolvendo a laringe e esôfago cranial [28]. Há relatos também de infecção no cólon e metástases na próstata, com sinais de hipertrofia do órgão e sintomas de tenesmo em um cão macho da raça Irish Setter com 4 anos de idade [36].

As lesões cutâneas apresentam-se como dermatite piogranulomatosa ulcerativa, contendo áreas de necrose infiltrada por neutrófilos e macrófagos e granulomas eosinofílicos [15,17,19,31]. Em 1997 foi relatado o primeiro caso de pitiose canina no Brasil, afetando uma fêmea com lesão cutânea no membro posterior direito [40]. Posteriormente, foram descritos outros dois casos de pitiose entérica no município de Santa Maria [81,85] e um no município de Pelotas, RS [83].

A pitiose em gatos é rara, havendo poucos relatos na literatura. Um relato refere-se a uma infecção nasal e retrobulbar, sem envolvimento de órgãos internos, cujo diagnóstico baseou-se em imunohistoquímica, sorologia através de imunodifusão e isolamento do agente [7]. Foil apud Mendoza *et al.* [55] mencionou a ocorrência de novos casos de pitiose em gatos na Flórida. Recentemente, foram relatados 2 casos de pitiose gastrointestinal em gatos nos EUA [79].

4. Pitiose em Bovinos

A pitiose bovina também é pouco freqüente, havendo apenas três relatos na literatura. O primeiro na região de Louisiana, EUA [68], o segundo na região do Pantanal, Brasil [94] e o terceiro na Venezuela [77]. Esses relatos descreveram lesões cutâneas, geralmente nos membros e caracterizadas por ulcerações, espessamento da derme e edema na região afetada. A idade dos animais infectados variou entre três e nove meses de idade. Histologicamente, as lesões apresentaram-se como granulomas dermais multifocais rodeados por tecido conjuntivo fibroso. No centro dos granulomas havia um pequeno número de hifas ramificadas, sem formação de “kunkers” [69,94]. Incrustação granular ao redor de porções de hifas, sugestiva de deposição de complexos antígeno-anticorpo ou reação de Splendore-Heoppli, foi observada nos casos descritos nos EUA [68]. Os casos observados no Brasil apresentaram cura espontânea das lesões [94].

5. Pitiose em Ovinos

A primeira descrição de pitiose em ovinos ocorreu em 2004. O primeiro e único surto de pitiose em ovinos foi descrito em 2 rebanhos no nordeste brasileiro, no estado da Paraíba [104]. Em um surto a pitiose afetou 40 ovinos de um rebanho de 120 ovinos deslançados. Este surto ocorreu quando este rebanho foi colocado em um potreiro com a presença de um açude, onde os animais entravam na água para comer o pasto verde da superfície. O segundo surto de pitiose ovina ocorreu em 6 ovinos de um rebanho de 80 ovinos deslançados num período de 60 dias. Este rebanho apresentava como dado significativo, ter ficado por longos períodos, na época da seca, em um banhado junto a um lago. Os animais afetados apresentaram feridas com lesões ulcerativas nas patas e também nas regiões pré-escapular e abdominal.

6. Pitiose em Humanos

A maioria dos casos de pitiose humana foi observada na Tailândia e esporadicamente, nos EUA, Austrália, Haiti e Nova Zelândia. Os primeiros casos foram relatados em 1986, por Thianprasit na Tailândia [55]. As infecções por *Pythium insidiosum* em humanos, podem apresentar-se de três formas: 1) lesões granulomatosas no tecido subcutâneo de pacientes talassêmicos. 2) forma sistêmica, caracterizada por desenvolvimento de arterite crônica, trombose arterial e gangrena, atingindo geralmente a extremidade dos membros inferiores de pacientes talassêmicos. 3) ceratite; podendo ou não ser associada à talassemia [34].

Sathapatayavongs *et al.* [96] relataram cinco casos de arterite, desses relatos de arterite, dois evoluíram para a ruptura fatal da aorta, dois necessitaram a amputação da perna afetada e um paciente foi curado com ressecção do aneurisma. A evolução desses casos demonstra a gravidade da pitiose arterial em humanos. Dois fatores contribuem para importância da pitiose humana na Tailândia: a prevalência da alfa e beta-talassemia e presença de grandes áreas algadiças utilizadas para agricultura [34,106]. Casos de ceratite, causada por *Pythium insidiosum*, foram descritos na Nova Zelândia [73] e Tailândia [35]. As lesões apresentaram-se na região periorbital e o aspecto histopatológico apresentou-se similar ao das infecções em eqüinos, porém não foram detectados “kunkers”. Relata-se também, um caso de pitiose pulmonar, em um menino com 12 anos de idade, portador de leucemia [27] e o

primeiro caso de pitiose humana no Brasil no Estado de São Paulo [8].

7. Pitiose em Coelhoos

Até o presente, não foi possível reproduzir a enfermidade através de infecção experimental nas espécies animais infectadas naturalmente. No entanto, a susceptibilidade de coelhos como modelo experimental para a pitiose foi demonstrada pela inoculação subcutânea de água rica em zoósporos. Houve o desenvolvimento de nódulos que evoluíram para fibrogranulomas eosinofílicos. Os coelhos inoculados por via intra-peritonial desenvolveram hepatite severa e peritonite, com áreas de necrose contendo hifas, reação granulomatosa com infiltrado de neutrófilos e eosinófilos. As lesões apresentaram características similares à infecção natural dos eqüinos e o *Pythium insidiosum* foi isolado das mesmas [65].

A inoculação subcutânea com zoósporos provoca abscedação progressiva, mas não ocorrem ulcerações comparáveis com a doença natural nos eqüinos, e tampouco a formação de “kunkers”. No entanto, na avaliação leucocitária, o quadro da pitiose em coelhos é semelhante aos eqüinos, ou seja, ocorre progressiva leucocitose com moderada neutrofilia e leve monocitose [65,66]. Portanto esta espécie serve como modelo experimental para estudo sorológico e avaliação de imunoterapia [44, 93].

8. Diagnóstico

Tradicionalmente, o diagnóstico da pitiose baseava-se nos aspectos clínicos, histopatológicos e no isolamento e identificação do agente através de suas características culturais, morfológicas e reprodutivas. A identificação precoce da doença, no entanto, torna-se difícil através desses métodos. Atualmente, métodos como imunohistoquímica e técnicas sorológicas auxiliam e suportam um diagnóstico precoce e correto [55]. Em 1988, Brown *et al.* [10] descreveram pela primeira vez o método de imunohistoquímica para diagnóstico da pitiose eqüina, que foi posteriormente utilizada por vários autores [18,31,78]. O diagnóstico diferencial inclui habronemose, neoplasia, tecido de granulação exuberante e granulomas fúngicos e bacterianos [11].

O desenvolvimento de técnicas sorológicas foi impulsionado por pesquisadores, que desenvolveram técnicas para o diagnóstico e monitoramento da resposta imunológica em eqüinos afetados [62]. Esses autores desenvolveram as técnicas de imunodifusão em gel de ágar (ID), fixação do complemento (FC) e

um teste de hipersensibilidade intradérmica (TI), para diagnosticar e avaliar a resposta imune humoral e celular de cavalos com pitiose. Os testes realizados em cavalos com pitiose clínica comprovada, diagnosticaram positivamente 100% (ID), 82% (FC) e 64% (TI) dos casos. Esses dados comprovaram que o teste de ID apresenta alta sensibilidade e especificidade para a detecção de anticorpos anti *P. insidiosum* [62]. O teste de FC foi utilizado somente na Austrália, pois além de menos sensível e específico que ID, é um teste difícil de realizar e requer pessoal experiente para sua realização [55].

A eficiência da ID para o soro-diagnóstico das zigomicoses causadas por *Basidiobolus ranarum* e *Conidiobolus coronatus* em humanos e animais, assim como para pitiose foi demonstrada, o que comprovou que este teste é eficiente para o diagnóstico diferencial destas três micoses em humanos e animais [37]. Outros autores também demonstraram a eficiência e utilidade da ID para o diagnóstico da pitiose.

Mendoza *et al.* [56] desenvolveram um teste de ELISA para o soro-diagnóstico de pitiose em humanos e animais, utilizando antígeno solúvel de hifas sonicadas. Amostras de soro de humanos e animais saudáveis e com pitiose clínica foram testadas e os resultados comparados com o teste de ID. Os resultados indicam que o teste de ELISA é eficiente para o diagnóstico da pitiose e possui especificidade semelhante à ID, porém com melhor sensibilidade. No Brasil, o desenvolvimento de um teste de ELISA para diagnóstico de pitiose equina [87] e uma técnica de “ELISA-conta” para detecção da soropositividade de eqüinos [5] apresentaram bons resultados. Já outros autores descreveram a padronização do teste ELISA para detecção de IgG em coelhos imunizados com antígenos de *P. insidiosum* [95]. Testes de ELISA para diagnóstico sorológico precoce de pitiose em caninos e humanos também foram desenvolvidos [23, 38].

Um teste de dot-blot modificado foi desenvolvido para detecção de IgG anti-*Pythium* em coelhos e eqüinos. A técnica desenvolvida utilizou sistema de luminescência química para visualização da reação, no entanto, a técnica pode ser adaptada para um sistema de visualização direta na membrana, podendo ser utilizada como um teste de campo, pela sua especificidade, sensibilidade, praticidade e baixo custo [42].

O sucesso no isolamento de *P. insidiosum* é alto quando amostras de biópsias forem armazenadas ou transportadas à temperatura ambiente, com o acréscimo de antibióticos, entre 1 e 3 dias antes de seu pro-

cessamento no laboratório. Quando o meio de transporte da biópsia não contiver antibióticos é melhor transportá-la a 4°C [22]. Estes dados sugerem que a inibição do crescimento bacteriano, que contamina a amostra, aumenta as chances de isolamento de *P. insidiosum* dos tecidos infectados. Alguns autores também sugerem o uso, como rotina para isolamento do agente, de ágar V8 [59], acrescido de estreptomicina (200µg/mL) e ampicilina (100µg/mL). Pedacos pequenos de tecido fresco, não macerados, podem ser distribuídos diretamente na superfície do ágar e incubado a 37°C. Crescimento típico é observado entre 12 e 24 horas após [24]. A identificação de isolados de *P. insidiosum* pode ocorrer através do aspecto da colônia e na característica das hifas. As colônias em ágar V8, sabouraud dextrose ou ágar farinha de milho (CMA), apresentam-se submersas de coloração branca ou hialina [14]. Os zoósporos podem ser produzidos, a partir do cultivo de *P. insidiosum* com 1 a 2 dias de cultivo, em folhas de grama estéreis sobre ágar água a 2% e incubação a 37°C pelo período de 18 a 24 horas. Após as folhas infectadas pelo *Pythium* são colocadas em solução de sais minerais diluída a 1%. Cerca de 2-4 horas de incubação a 37°C os zoósporos crescem a partir de hifas terminais [24].

O sequenciamento gênico com amplificação do RNA ribossomal, região ITS 1, através de PCR (reação de polimerase em cadeia) é uma ferramenta poderosa para detecção e identificação de *P. insidiosum* [21,73].

9. Histopatologia

Histologicamente nos eqüinos, os “kunkers” apresentam-se como coágulos eosinofílicos de tamanho variado e forma circular com contornos irregulares. Estes coágulos são compostos de hifas, colágeno, arteríolas e células inflamatórias, especialmente eosinófilos. Em torno das hifas, os eosinófilos estão degranulados e em direção a periferia os grânulos tornam-se mais evidentes. Na borda é comum encontrar-se eosinófilos intactos. A área ao redor do coágulo é composta por um exsudato inflamatório espesso de neutrófilos e eosinófilos. A área entre os “kunkers” é caracterizada por inflamação granulomatosa e supurativa [10,67]. Em cortes histológicos corados com coloração especial de prata, pode-se observar as hifas com paredes espessas, esparsamente septadas, irregularmente ramificadas (normalmente em ângulo reto) e medindo de 2 a 6 mm de diâmetro [12,67].

Os achados histopatológicos da pitiose intestinal equina variam de tecido conjuntivo fibroso com áreas de necrose de coagulação e focos de mineralização, células inflamatórias (macrófagos e neutrófilos) degeneradas, sem infiltrado eosinofílico [9], até ao granuloma eosinofílico crônico [4,72,78]. As hifas são visualizadas através da coloração especiais com sais de prata, medindo de 2 a 8 mm de diâmetro, com parede espessa, raras septações e ramificações irregulares, geralmente encontrados dentro de focos de mineralização. Os “kunkers”, característicos das lesões cutâneas não foram observados nos casos de pitiose intestinal [4,9,72,78].

A histopatologia das lesões da pele de coelhos inoculados via subcutânea, apresentaram alterações progressivas com necrose aguda acompanhada de infiltrado granulocítico 3 dias após a inoculação experimental. Vinte dias pós-inoculação, os coelhos passaram a apresentar lesões com abscesso eosinofílico fibrogranulomatoso [75,92,93].

10. Tratamento

O tratamento de infecções causadas pelo *Pythium insidiosum* em animais e humanos é complicado pelas características singulares do agente. O *P. insidiosum* difere dos fungos verdadeiros na produção de zoósporos móveis e na composição de sua parede celular. Os fungos verdadeiros possuem quitina em sua parede, enquanto o *Pythium* contém celulose e β -glucanas. A membrana plasmática não contém esteróides, como o ergosterol, que é o componente-alvo de ação da maioria das drogas antifúngicas [20]. Devido a essas características, não existe droga antifúngica eficiente contra o *P. insidiosum* [20,96]. Os fitopatógenos do gênero *Pythium* são sensíveis aos inseticidas normalmente utilizados em plantas, porém esses compostos são tóxicos aos mamíferos, impossibilitando seu uso para o tratamento da pitiose [96]. Um fungicida utilizado em plantas (Metalaxil) foi testado no tratamento de cães, porém com resultados pouco consistentes, em parte pela toxicidade do composto [20].

O sucesso das diferentes formas de tratamento é variável e, em muitos casos influenciados pelo tamanho e duração da lesão, idade e estado nutricional do animal. O tratamento tradicional da pitiose equina é cirúrgico, sendo o procedimento mais utilizado. A intervenção cirúrgica requer retirada de toda área afetada, com margem de segurança para evitar as recidivas, porém isso é dificultado pelas estruturas anatômicas envolvidas, principalmente nos membros [60].

O tratamento cirúrgico apresenta bons resultados apenas em lesões pequenas e superficiais, onde seja possível a retirada de toda área afetada.

No tratamento químico as drogas mais utilizadas até o momento foram a anfotericina B, cetoconazole, miconazole, fluconazole e itraconazole, além dos compostos iodínicos como iodeto de potássio e sódio [93]. Obteve-se 50% de eficiência num tratamento associando a remoção cirúrgica e anfotericina B; 30% apenas quando se utilizou somente anfotericina B e 20% dos casos não responderam aos tratamentos utilizados [48].

O tratamento das ficomicoses subcutâneas respondem eficientemente ao iodeto de potássio quando este é usado após a extirpação cirúrgica do granuloma [25]. Alguns autores também relataram o sucesso do tratamento cirúrgico seguido da utilização de iodeto de sódio [11]. Entretanto, resultados negativos também foram observados no tratamento com iodeto de potássio endovenoso, até mesmo quando associado à cirurgia [49].

Até o presente momento, nenhuma das terapias antifúngicas propostas para a pitiose canina (sistêmica ou cutânea) apresentaram resultados satisfatórios. Entre as drogas testadas destacam-se a anfotericina B, iodeto de sódio, flurocitosina, cetoconazole [1,5, 17]. A última droga testada foi o itraconazole (5mg/kg/60 dias), porém não apresentou nenhuma melhora [15]. Segundo alguns autores, a cirurgia continua como opção mais segura para o tratamento da pitiose canina [30].

Os resultados obtidos com as drogas antifúngicas são controvertidos, tanto no tratamento clínico como nos testes de sensibilidade *in vitro*. Em um estudo, os poliênicos anfotericina B, hamycina e seus análogos não apresentaram atividade satisfatória, enquanto os azólicos fluconazole, cetoconazole e miconazole inibiram os isolados de *P. insidiosum* testados *in vitro*, com o miconazole apresentando os melhores resultados [99]. Em outro estudo de sensibilidade, as drogas anfotericina B, flucitosina, miconazole e griseofulvina não inibiram o crescimento do fungo, enquanto o itraconazole apresentou atividade moderada e a terbinafina foi ativa contra o *P. insidiosum* testado [100]. De acordo com estes autores, a associação de terbinafina e itraconazole apresentou efeito sinérgico e foram utilizados, com sucesso, no tratamento de um menino com infecção facial. Em outro relato, dois jovens com infecção subcutânea na região periorbital responderam bem ao tratamento com anfotericina B [106], contrariando os resultados obtidos nos testes *in vitro*. Também

se obteve remissão clínica de um quadro de pitiose pulmonar, em um menino com 12 anos de idade acometido de leucemia, após 12 meses de tratamento com itraconazole em combinação com anfotericina B lipossômica [27].

Como alternativas de tratamento, obteve-se sucesso no uso de raio laser vermelho de alumínio, neodímio e ítrio como terapia suplementar após a remoção cirúrgica de lesões de pitiose equina [98]. Porém, alguns autores afirmam que a ressecção cirúrgica total do granuloma combinada com imunoterapia específica para *P. insidiosum* é o tratamento mais indicado para cura de pitiose clínica em equinos [32].

11. Imunoterapia

Uma alternativa interessante para o tratamento da pitiose equina foi proposto por Miller [60]. Este pesquisador desenvolveu um imunobiológico (imunoterápico) a partir de culturas do próprio agente, utilizando um macerado de hifas, sonicadas e acondicionados em frascos. O índice de eficiência da imunoterapia foi em torno de 53% e 75% quando associado a cirurgia [60,62].

No decorrer da década de 80 e 90 vários autores utilizaram a imunoterapia, cada um com modificações na técnica originalmente descrita. A utilização de antígeno obtido do sobrenadante das culturas, com o objetivo de diminuir a reação no local de aplicação, induziu a recuperação de 3 animais entre os 5 tratados [50]. Mendoza *et al.* [52], compararam duas vacinas para tratamento da pitiose equina em 71 cavalos infectados. Uma vacina utilizou massa celular como antígeno e a outra utilizou um antígeno solúvel concentrado. As duas vacinas apresentaram resultado positivo em cavalos com lesões com menos de dois meses, com 60% e 70% de eficiência, respectivamente.

No Brasil, o teste de eficiência de um imunobiológico (PitiumVac) para o tratamento da pitiose equina, produzido a partir de culturas do *Pythium insidiosum*, baseando-se na metodologia anteriormente descrita por Miller, demonstrou índice de cura que variou de 50% a 83,3% entre os grupos tratados [70]. Recentemente, a utilização do imunoterápico na pitiose bovina demonstrou eficácia de aproximadamente 100%. Em contrapartida aos resultados obtidos em equinos e bovinos, a imunoterapia em cães e gatos tem sido desapontadora. Somente 33% dos caninos e nenhum dos gatos tratados responderam ao tratamento [58].

Após insucesso com tratamentos a base de anfotericina B, iodetos, cetoconazole e cirurgia, o uso de um imunoterápico em um menino talassêmico de 14

anos de idade, infectado pelo *P. insidiosum*, induziu a cura após duas aplicações (100µl) do imunoterápico, com intervalo de 14 dias [105].

Apesar dos estudos sobre a doença e a imunoterapia, ainda não há um completo conhecimento dos mecanismos envolvidos na infecção por *Pythium insidiosum*, em parte pelas diferenças entre o *Pythium insidiosum* e os fungos patogênicos para os mamíferos. De acordo com Miller [60], o caráter progressivo da doença em equinos imunocompetentes sugere uma resposta imunológica inadequada ou um bloqueio na resposta imunológica. Esse autor acredita que mesmo sendo antigênicas, as hifas não são completamente reconhecidas pelo hospedeiro, devido à marcante reação inflamatória. O possível mecanismo imunológico desencadeado na pitiose equina foi proposto em 1996 [55]. De acordo com esta hipótese, no início da infecção, as hifas de *P. insidiosum* liberariam antígenos solúveis que estimulariam a produção de IgE. Essas imunoglobulinas ligar-se-iam a superfície das hifas e ativariam os mastócitos, que liberariam seus fatores quimiotáticos para atrair eosinófilos para o sítio da infecção. Os eosinófilos ligar-se-iam a porção Fc das IgE nas hifas e eventualmente degranulariam, protegendo a hifa do sistema imune. O mecanismo proposto seria semelhante ao relatado nas infecções parasitárias. Segundo os autores, há evidências da presença de antígenos solúveis dispersos na lesão e não apenas no interior dos “kunkers” [57].

As explicações para cura induzida pela imunoterapia são apenas propostas, baseadas nas características clínicas, histopatológicas e sorológicas da infecção e seu tratamento. Acredita-se que os antígenos citoplasmáticos expostos ao sistema imune dos animais via vacinação originariam uma resposta humoral e celular capaz de combater a infecção natural. A resposta humoral pode ser demonstrada pelos testes de imunodifusão e Western immunoblot, enquanto que a resposta celular pode ser evidenciada pelo teste de hipersensibilidade intradérmica e alteração no infiltrado inflamatório [55]. O soro de equinos infectados, testados pelo immunoblot, demonstraram a presença de três proteínas imunodominantes (28, 30 e 32 kDa) e amostras de soro equino obtidas um ano após a cura pela imunoterapia também apresentaram anticorpos contra esses três antígenos [53].

Trabalhando com western immunoblot Leal *et al.* [45] sugerem a presença de 5 antígenos imunodominantes. A avaliação de soro equino pré e pós-tratamento com imunoterápico, não apresentou alterações

no perfil de IgG durante a imunoterapia. Isso questiona sobre a real importância desses antígenos imunodominantes na cura dos equinos.

Dois modelos para explicar a ação dos anticorpos foram propostos. O primeiro seria um mecanismo de citotoxicidade dependente de anticorpo e mediado por células, que envolveria linfócitos, macrófagos e talvez eosinófilos ligados a anticorpos, sobretudo IgG. O segundo modelo envolveria anticorpos e o sistema complemento, os anticorpos específicos estimulados pela vacina ativariam o sistema complemento, danificando a parede celular e promovendo a lise do agente [60].

Acredita-se que os mecanismos envolvidos na cura pela imunoterapia baseiam-se principalmente na resposta celular. Este fato é sustentado pelas alterações teciduais após início da imunoterapia, com mudança de inflamação eosinofílica inicial para uma resposta mononuclear, mediada por macrófagos e linfócitos T ao final da resposta. É provável que os antígenos presentes no imunógeno induzam esta alteração no padrão inflamatório, culminando com a cura dos animais [55]. Entretanto, outros autores verificaram que o nível de anticorpos anti-*Pythium* aumenta em equinos doentes submetidos à imunoterapia. Assim sendo, o aumento do nível de anticorpos pode auxiliar na cura [75].

A hipótese que explica os efeitos curativos dos imunoterápicos contra pitiose, baseada em dados de humanos e equinos, encontra-se bem descrita [57,58]. Quando o hospedeiro entra em contato, através de uma ferida, com zoósporos de *P. insidiosum*, este forma um tubo germinativo que penetra mecanicamente no tecido. Uma vez nos tecidos, as hifas liberam exoantígenos denominados de antígenos de apresentação celular (APC). Os APC liberam IL4 (interleucina 4) que estimula a atração dos linfócitos T auxiliar (Th0), que também estimulam linfócitos Th2, que por sua vez induzem a produção de mais IL4 e IL5. As IL4 regulam a expressão de Th1 e estimulando, por sua vez, células B para produção de IgE, IgM e IgG que podem ser detectadas por testes de diagnóstico. As IL5

e IgE desencadeiam a mobilização de eosinófilos e mastócitos para o local da lesão. Estas células vão degranular (são responsáveis pelas lesões teciduais) sobre as hifas de *P. insidiosum*, provocando o fenômeno de Splendore-Hoeppli que, mais tarde, irá desenvolver os “kunkers” na pitiose equina, somente. As hifas de *P. insidiosum* multiplicam-se no interior dos “kunkers” onde produzem exoantígenos em grande quantidade; um evento que, no final, bloqueia a resposta imune devido ao Th2. Quando os imunógenos do imunoterápico são injetados no hospedeiro com pitiose, os antígenos que estão presentes no seu APC são distintos daqueles da infecção natural. Os APC liberam interferon γ (INF γ) que ativam Th0 para Th1. O Th1 ativado produz mais INF γ e, também, IL2. Por sua vez, IL2 e INF γ irão ativar mediadores de células mononucleares como resposta imune (CMI) composta por linfócitos T e macrófagos que danificam e destroem a hifa de *P. insidiosum*. Não está claro se durante a imunoterapia, as IL2 e INF γ também estimulariam linfócitos B para produzir IgG protetores. A produção de INF γ , no local da infecção, pelos APC e o Th1 produzidos, irão resultar numa menor transformação Th2. Portanto, a atração de Th1 e o bloqueio de Th2 poderia explicar porque equinos, cães e humanos com pitiose são curados após injeções com imunoterápicos.

Os imunoterápicos em uso podem ter sua atuação prolongada e potencializada através de adjuvantes, como ficou demonstrado em coelhos [44].

IV. CONCLUSÕES

A pitiose é uma micose zoospórica que, nos últimos anos, vem paulatinamente a merecer destaque na micologia clínica tanto veterinária como humana. Agora não é, tão somente, objeto de estudo em equinos, mas também, em todos os animais que possam entrar em contato com o agente em ambientes alagados, inclusive os humanos. Também é importante destacar que, em virtude do *Pythium insidiosum* resistir a maioria dos antifúngicos, as pesquisas com imunoterapia avançaram de maneira significativa a partir de 1998.

REFERÊNCIAS

- 1 **Ader P.L. 1979.** Phycomycosis in fifteen dogs and two cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 174: 1216-1223.
- 2 **Alexopoulos C.J., Mims C.W. & Blackwell, M. 1996.** Introductory Mycology. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., Chap. 23: Phylum Oomycota, p. 683-737.
- 3 **Alfaro A.A. & Mendoza L. 1990.** Four cases of equine bone lesions caused by *Pythium insidiosum*. *Equine Veterinary Journal*. 22: 295-297.

- 4 Allison N. & Gillis, J.P. 1990. Enteric pythiosis in a horse. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 196: 462-464.
- 5 Alves S.H., Boettcher C.S., Leal A.T. Leal A.M., Silva, J.E.P. & Santurio J.M. 2001. Aplicação do “ELISA-conta” no diagnóstico da pitiose. *Revista Brasileira de Análises Clínicas.* 33: 155-157.
- 6 Bentinck-Smith J., Padhye A.A., Maslin W.R., Hamilton C., McDonald R.K. & Woody B.J. 1989. Canine pythiosis-isolation and identification of *Pythium insidiosum*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* 1: 295-298.
- 7 Bissonnette K.W., Sharp N.J.H., Dykstra M.H.; Robertson I.R., Davis B., Padhye, A.A. & Kaufman, L. 1991. Nasal and retrobulbar mass in a cat caused by *Pythium insidiosum*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology.* 29: 39-44.
- 8 Bosco S.M.G., Bagagli E., Jr. Araújo J.P., Candeias J.M.G., Franco M.F., Marques M.E.A., Mendoza L., Camargo R.P. & Marques S.A. 2005. Human pythiosis, Brasil. *Emerging Infectious Diseases.* 11: 715-718.
- 9 Brown C.C. & Roberts E.D. 1988. Intestinal pythiosis in a horse. *Australian Veterinary Journal.* 65: 88-89.
- 10 Brown C.C., McClure J.J., Triche P. & Crowder, C. 1988. Use of immunohistochemical methods for diagnosis of equine pythiosis. *American Journal of Veterinary Research.* 49: 1866-1868.
- 11 Chaffin M.K., Schumacher J. & Hooper, N. 1992. Multicentric cutaneous pythiosis in a foal. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 201: 310-312.
- 12 Chaffin M.K., Schumacher, J. & McMullan, W.C. 1995. Cutaneous pythiosis in the horse. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice.* 11: 91-103.
- 13 Connole, M.D. 1973. Equine phycomycosis. *Australian Veterinary Journal.* 49: 214-215.
- 14 De Cock A.W., Mendoza L., Padhye A.A., Ajello, L. & Kaufman L. 1987. *Pythium insidiosum* sp. nov. the etiologic agent of pythiosis. *Journal of Clinical Microbiology.* 25: 344-349.
- 15 Dykstra M.J., Sharp N.J.H., Olivry T., Hillier A., Murphy K. M., Kaufman G.A., Kunkle G.A & Pucheu-Haston C. 1999. A description of cutaneous-subcutaneous pythiosis in fifteen dogs. *Medical Mycology.* 37: 427-433.
- 16 Eaton S.A. 1993. Osseous involvement by *Pythium insidiosum*. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian.* 15: 485-490.
- 17 English P.B. & Frost A.J. 1984. Phycomycosis in a dog. *Australian Veterinary Journal.* 61: 291-292.
- 18 Fischer J.R., Pace L.W., Turk, J.R., Kreeger J.M., Miller M.A. & Gossner H.S. 1994. Gastrointestinal pythiosis in Missouri dogs: eleven cases. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* 6: 380-382.
- 19 Foil C.S.O., Short B.G., Fadok V.A. & Kunkle G.A. 1984. A report of subcutaneous pythiosis in five dogs and a review of the etiologic agent *Pythium spp.* *Journal of the American Animal Hospital Association.* 20: 959-966.
- 20 Foil C.S. 1996. Update on Pythiosis (Oomycosis). *The North American Veterinary Conference.* 23: 57-63.
- 21 Grooters A.M. & Gee M.K. 2002. Development of a nested polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Pythium insidiosum*. *Journal of Veterinary Internal Medicine.* 16: 147-152.
- 22 Grooters A.M., Leise B.S., Lopez M.K., Gee M.K. & O'Reilly K.L. 2002b. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of pythiosis in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine.* 16: 142-146.
- 23 Grooters A.M., Whittington A., Lopez M.K., Borroughs M.N. & Roy, A.F. 2002. Evaluation of microbial culture techniques for the isolation of *Pythium insidiosum* from equine tissues. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* 14: 288-294.
- 24 Grooters A.M. 2003. Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. *The Veterinary Clinics Small Animal Practice.* 33: 695-720.
- 25 González H.E., Trheebilcok E., Montañó J. & León J.V. 1979. Tratamiento de la ficomicosis equina subcutanea empleando yoduro de potasio. *Revista IICA.* 14: 115-122.
- 26 Headley S.A. & Arruda H.N. Jr. 2004. Equine cutaneous pythiosis: a report of four cases. *Ciência Rural.* 34: 289-292.
- 27 Health J.A., Kiehn T.E., Brown A.E., Laquaglia M.P., Steinherz L.J., Baerman G., Wong M. & Steinherz P. G. 2002. *Pythium insidiosum* pleuropericarditis complicating pneumonia in a child with leukemia. *Clinical Infectious Diseases.* 35: 60-64.
- 28 Helman R.G. & Oliver J. 1999. Pythiosis of the digestive tract in dogs from Oklahoma. *Journal of the American Animal Hospital Association.* 35: 111-114.
- 29 Hendrix, J.W. 1964. Sterol induction of reproduction and stimulation of growth of *Pythium* and *Phytophthora*. *Science.* 144: 1028-1029.
- 30 Hnilica K.A. 1998. Difficult dermatologic diagnosis. Pythiosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 212: 1192-1193.
- 31 Howerth E.W., Brown C.C. & Crowder C. 1989. Subcutaneous pythiosis in a dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* 1: 81-83.

- 32 **Hubert J.D. & Grooters A.M. 2002.** Treatment of equine pythiosis. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian.* 24: 812-815.
- 33 **Imwidthaya P. 1994a.** Systemic fungal infections in Thailand. *Journal of Medical and Veterinary Mycology.* 32: 395-399.
- 34 **Imwidthaya P. 1994b.** Human pythiosis in Thailand. *Postgraduate Medical Journal.* 70: 558-560.
- 35 **Imwidthaya P. 1995.** Mycotic keratitis in Thailand. *Journal of Medical & Veterinary Mycology.* 33: 81-82.
- 36 **Jaeger G.H., Rotstein D.S. & Law J.M. 2002.** Prostatic pythiosis in a dog. *Journal Veterinary Internal Medicine.* 16: 598-602.
- 37 **Kaufman L., Mendoza L. & Standard P.G. 1990.** Immunodiffusion test for serodiagnosing subcutaneous zygomycosis. *Journal of Clinical Microbiology.* 28: 1887-1890.
- 38 **Krajajum T., Kunakorn M., Niemhom S., Chongtrakool P. & Pracharktam R. 2002.** Development and evaluation of an in-house enzyme-linked immunosorbent assay for early diagnosis and monitoring of human pythiosis. *Clinical Diagnostic Laboratory of Immunology.* 9: 378-382.
- 39 **Kwon-Chung K.J. 1994.** Phylogenetic spectron of fungi that are pathogenic to humans. *Clinical Infections Diseases, Suppl* 1: 1-7.
- 40 **Larsson C.E., Meng M.C., Nahas C.R., Michalany N.S., Newton J., Rosa P.S., Bonavito D., Gambale W. & Soares E. S. 1994.** Pitiose canina – Aspectos clínicos e epidemiológicos de caso em São Paulo. In: *XXV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária* (Gramado, Brasil) p.155.
- 41 **Leal A.T., Santurio J.M. & Monteiro A.B. 1997.** Pitiose equina com envolvimento de linfonodos. In: *Resumos IV Jornada de Pesquisa, Extensão e Ensino da UFSM* (Santa Maria, Brasil). p.729.
- 42 **Leal A.T. 1999.** *Pythium insidiosum*: Caracterização antigênica preliminar e avaliação de adjuvantes na indução de resposta sorológica em coelhos. 94f. Santa Maria,RS. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria.
- 43 **Leal A.B.M., Leal A.T., Santurio J.M., Kommers G.D. & Catto J.B. 2001.** Pitiose equina no pantanal brasileiro: Aspectos clínico-patológico de casos típicos e atípicos. *Pesquisa Veterinária Brasileira.* 21: 151-156.
- 44 **Leal A.T., Santurio J.M., Leal A.B.M., Pinto A.M., Griebeler J., Flores E.F., Ferreira L. & Catto, J.B. 2002.** Resposta sorológica de coelhos imunizados com antígenos de *Pythium insidiosum* associados a diferentes adjuvantes. *Ciência Rural.* 32: 1027-1032.
- 45 **Leal A.T., Santurio J.M., Leal A.B.M., Catto J.B., Flores E.F., Lubrck I. & Alves S.H. 2005.** Characterization of the specificity of the humoral response to *Pythium insidiosum*. *Journal de Mycologie Médicale.* 15: 63-68.
- 46 **Liljebjelke K.A., Abramson C., Brokus C. & Greene C.E. 2002.** Duodenal obstruction caused by infection with *Pythium insidiosum* in a 12-week-old puppy. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 220: 1188-1191.
- 47 **MacDonald E., Millward L., Ravishankar J.P. & Money, N.P. 2002.** Biomechanical interaction between hyphae of two *Pythium* species (Oomycota) and host tissues. *Fungal Genetics and Biology.* 37: 245-249.
- 48 **McMullan W.C., Joyce J.R., Hanselka D.V. & Heitmann J.M. 1977.** Amphotericin B for the treatment of Localized subcutaneous phycomycosis in the horse. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 170: 1293-1297.
- 49 **Meireles M.C.A., Riet-Correa F., Fischman O., Zambrano A.F.H. & Zambrano M.S. 1993.** Cutaneous pythiosis in horses from Brazil. *Mycoses.* 36: 139-142.
- 50 **Mendoza L. & Alfaro A.A. 1986.** Equine pythiosis in Costa Rica: Report of 39 cases. *Mycopathologia.* 94: 123-129.
- 51 **Mendoza L., Alfaro A.A. & Villalobos J. 1988.** Bone lesions caused by *Pythium insidiosum* in a horse. *Journal of Medical and Veterinary Mycology.* 26: 5-12.
- 52 **Mendoza L., Villalobos J., Calleja C.E. & Solis A. 1992a.** Evaluation of two vaccines for the treatment of pythiosis insidiosi in horses. *Mycopathologia.* 119: 89-95.
- 53 **Mendoza L., Nicholson V. & Prescott J.F. 1992b.** Immunoblot analysis of the humoral immune response to *Pythium insidiosum* in horses with pythiosis. *Journal of Clinical Microbiology.* 30: 2980-2983.
- 54 **Mendoza L., Hernandez F. & Ajello L. 1993.** Life cycle of the human and animal oomycete pathogen *Pythium insidiosum*. *Journal of Clinical Microbiology.* 31: 2967-2973.
- 55 **Mendoza L., Ajello L. & McGinnis M.R. 1996.** Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. *Journal de Mycologie Médicale.* 6: 151-164.
- 56 **Mendoza L., Kaufman L., Mandy W. & Glass R. 1997.** Serodiagnosis of human and animal pythiosis using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology.* 4: 715-718.
- 57 **Mendoza L., Mandy W. & Glass, R. 2003.** An improved *Pythium insidiosum*-vaccine formulation with enhanced immunotherapeutic properties in horses and dogs with pythiosis. *Vaccine.* 21: 2797-2804.

- 58 **Mendoza L. & Newton J.C. 2005.** Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum*. *Medical Mycology.* 43: 477-486.
- 59 **Miller P.M. 1955.** V8 juice agar as a general purpose medium for fungi and bacteria. *Phytopathology.* 45: 461-462.
- 60 **Miller R.I. 1981.** Treatment of equine phycomycosis by immunotherapy and surgery. *Australian Veterinary Journal.* 57: 377-382.
- 61 **Miller R.I. & Campbell R.S.F. 1982.** Clinical observations on equine phycomycosis. *Australian Veterinary Journal.* 58: 221-226.
- 62 **Miller R.I. & Campbell R.S.F. 1982.** Immunological studies on equine phycomycosis. *Australian Veterinary Journal.* 58: 227-231.
- 63 **Miller R.I. 1983.** Investigations into the biology of three 'phycomycotic' agents pathogenic for horses in Australia. *Mycopathologia.* 81: 23-28.
- 64 **Miller R.I., Qualls C.W. & Turnwald G.H. 1983.** Gastrintestinal phycomycosis in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 182: 1245-1246.
- 65 **Miller R.I. & Campbell R.S.F. 1983.** Experimental pythiosis in rabbits. *Sabouraudia.* 21: 331-341.
- 66 **Miller R.I. & Campbell R.S.F. 1983.** Hematology of horses with phycomycosis. *Australian Veterinary Journal.* 60: 28-29.
- 67 **Miller R.I. & Campbell R.S.F. 1984.** The comparative pathology of equine cutaneous phycomycosis. *Veterinary Pathology.* 21: 325-332.
- 68 **Miller R.I., Olcott B.M. & Archer M. 1985.** Cutaneous pythiosis in beef calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 186: 984-986.
- 69 **Miller R.I. 1985.** Gastrointestinal phycomycosis in 63 dogs. *Journal of American Veterinary Medical Association.* 186: 473-478.
- 70 **Monteiro A.B. 1999.** Imunoterapia da pitiose equina: teste de eficácia de um imunobiológico e avaliação leucocitária em animais infectados naturalmente pelo *Pythium insidiosum*. 52 f. Santa Maria, RS, Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria.
- 71 **Moore-Landecker J. 1996.** Zoospore fungi. In: *Fundamentals of the Fungi.* 4th edn. New Jersey: Prentice Hall, Inc. , pp. 33-81.
- 72 **Morton L.D., Morton D.G., Baker G.J. & Gelberg H.B. 1991.** Chronic eosinophilic enteritis attributed to *Pythium* sp. in a horse. *Veterinary Pathology.* 28: 542-544.
- 73 **Murdoch D. & Parr D. 1997.** *Pythium insidiosum* keratitis. *Australian and New Zealand Journal of Ophthalmology.* 25: 177-179.
- 74 **Murray D.R., Ladds P.W., Johnson R.H. & Pott B.W. 1978.** Metastatic phycomycosis in a horse. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 172: 834-836.
- 75 **Newton J.C. & Ross P.S. 1993.** Equine pythiosis: an overview of immunotherapy. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian.* 15: 491-493.
- 76 **Patton C.S., Hake R., Newton J. & Toal R.L. 1996.** Esophagitis due to *Pythium insidiosum* infection in two dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine.* 10: 139-142.
- 77 **Pérez R.C., Luis-Leon J.J., Vivas J.L. & Mendoza L. 2005.** Epizootic cutaneous pythiosis in beef calves. *Veterinary Microbiology.* 109:121-128.
- 78 **Purcell K.L., Johnson P.J., Kreeger J.M. & Wilson D.A. 1994.** Jejunal obstruction caused by a *Pythium insidiosum* granuloma in a mare. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 205: 337-339.
- 79 **Rakich P.M., Grooters A.M. & Tang K. 2005.** Pythiosis in two cats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.* 17: 262-269.
- 80 **Ravishankar J.P., Davis C.M., Davis D.J., MacDonald E., Makselan S.D., Millward L. & Money N.P. 2001.** Mechanics of solid tissue invasion by the mammalian pathogen *Pythium insidiosum*. *Fungal Genetics and Biology.* 34: 161-175.
- 81 **Rech R.R., Graça D.L. & Barros C.L.S. 2004.** Pitiose em um cão: Relato de caso e diagnóstico diferenciais. *Clínica Veterinária.* 50: 68-72.
- 82 **Reis Jr. J.L., Carvalho E.C.Q., Nogueira R.H.G., Lemos L.S. & Mendoza, L. 2003.** Disseminated pythiosis in three horses. *Veterinary Microbiology.* 96: 289-295.
- 83 **Riet-Correa F., Ferreira J.L.M. & Schild A.L. 1998.** Pitiose em cão. *Boletim do Laboratório Regional de Diagnóstico-UFPEL.* Pelotas: Editora e Gráfica Universitária. 55 p.
- 84 **Rivierre C., Laprie C., Guiard-Marigny O., Bergeaud P., Berthelemy M. & Guillot J. 2005.** Pythiosis in Africa. *Emerging Infectious Disease.* 11: 479-481.

- 85 **Rodrigues A., Graça D.L., Fontoura C., Cavalheiro A.S., Henzel A., Schwendler S.E., Alves S.H. & Santurio J.M. 2006.** Intestinal dog pythiosis in Brazil. *Journal de Mycologie Médicale*. 16: 37-41.
- 86 **Rodrigues C.A. & Luvizotto M.C.R. 2000.** Zigomicose e pitiose cutânea em equínos: diagnóstico e tratamento. *Revista de Educação Continuada CRMV-SP*. 3: 3-11.
- 87 **Rosa P.S., Newton J.C. & Triche P. 1999.** An ELISA teste to detect *Pythium insidiosum* infection in horses. In: *XX Congresso Brasileiro de Microbiologia* (São Paulo, Brasil). p.151.
- 88 **Sallis E.S.V., Pereira D.I.B. & Raffi M.B. 2003.** Pitiose cutânea em equínos: 14 casos. *Ciência Rural*. 33: 899-903.
- 89 **Sanavria A., Fabris V.E., Campos, S.G., Peixoto P.F.V., Morais M.C. & Fernandes C.G.N. 2000.** Pitiose em equínos: Relato de cinco casos no Estado do Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*. 22: 170-172.
- 90 **Santos M.N. & Londero A.T. 1974.** Zigomicose subcutânea em cavalos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira - Série Veterinária*. 9: 7-8.
- 91 **Santos M.N., Metzdorf L.L., Braga M. M. & Wolle C.A. 1987.** Pitiose cutânea em equínos no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 7: 57-61.
- 92 **Santurio J.M. 2004.** *Pythium insidiosum*: Avaliação de imunoterápico para equínos, utilizando-se coelhos como modelo experimental. 64f. Porto Alegre, RS. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- 93 **Santurio J.M., Leal A.T. & Monteiro A. B. 2003.** Pythiose. In: Lefèvre P.C, Blancou J. & Chermette R. (Eds). *Principales Maladies Infectieuses et Parasitaires du Bétail – Europe et Régions Chaudes*. Paris: Editions TEC & DOC et Editions Médicales Internationales, pp.1231-1241.
- 94 **Santurio J.M., Monteiro A.B., Leal A.T., Kommers G.D., De Sousa R.S. & Catto J.B. 1998.** Cutaneous Pythiosis insidiosa in calves from the Pantanal region of Brazil. *Mycopathologia*. 141: 123-125.
- 95 **Santurio J.M., Leal A.T., Leal A.B.M., Alves S.H., Lubeck I. & Griebeler J. 2001.** Teste ELISA para o diagnóstico de Pitiose. In: *III Congresso Brasileiro de Micologia* (Águas de Lindóia, Brasil). p.126
- 96 **Sathapatayavongs B., Leelachaikul P., Prachaktam R., Atichartakarn V., Sriphojanart S., Trairatvorakul P., Jirasiritham S., Nontasut S., Eurvilaichit C. & Flegel T. 1989.** Human pythiosis associated with Thalassemia Hemoglobinopathy Syndrome. *Journal of Infectious Diseases*. 159: 274-280.
- 97 **Schurko A., Mendoza L., De Cock A.W.A.M. & Klassen G.R. 2003.** Evidence for geographic clusters: Molecular genetic differences among strains of *Pythium insidiosum* from Asia, Australia, and the Americas are explored. *Mycologia*. 95: 200-208.
- 98 **Sedrish S.A., Moore R.M., Valdes-Vasques M.A., Haynes P.F. & Viecek T. 1997.** Adjunctive use of a neodmium: yttrium-aluminum garnet laser for treatment of pythiosis granulomas in two horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 211: 464-465.
- 99 **Sekhon A.S., Padhye A.A. & Garg A.K. 1992.** *In vitro* sensitivity of *Penicillium marneffe* and *Pythium insidiosum* to various antifungal agents. *European Journal of Epidemiology*. 8: 427-432.
- 100 **Shenep J.L., English B.K., Kaufman L., Pearson T.A., Thompson J.W., Kaufman R.A., Frisch G. & Rinaldi M.G. 1998.** Successful medical therapy for deeply invasive facial infection due to *Pythium insidiosum* in a child. *Clinical Infectious Disease*. 27: 1388-1393.
- 101 **Silva R.A., Arosemena N.A., Herrera H.M, Sahib C.A. & Ferreira M.S. 1995.** Outbreak of trypanosomiasis due to *Trypanosoma evansi* in horses of Pantanal Mato-grossense, Brazil. *Veterinary Parasitology*. 60: 167-171.
- 102 **Smith F. 1884.** The pathology of bursattee. *Veterinary Journal*. 19: 16-17.
- 103 **Tabosa I.M., Medeiros V.T., Dantas A.F.M., Azevedo E.O. & Maia J.C. 1999.** Pitiose cutânea em equídeos no semi-árido da Paraíba. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 51: 27-30.
- 104 **Tabosa I.M, Riet-Correa F., Nobre V.T.M., Azevedo E.O., Reis-Junior J.L. & Medeiros R.M.T. 2004.** Outbreaks of pythiosis in two flocks of sheep in northeastern Brasil. *Veterinary Pathology*. 41: 412-415
- 105 **Thitithayanont A., Mendoza L., Chuansumrit A. Prachartam R., Laothamatas J., Sathapatayavongs B., Lolekha S. & Ajello L. 1998.** Use of an immunotherapeutic vaccine to treat a life-threatening human arteritic infection caused by *Pythium insidiosum*. *Clinical Infectious Disease*. 27: 1394-1400.
- 106 **Triscott J.A., Weedon D. & Cabana E. 1993.** Human subcutaneous pythiosis. *Journal of Cutaneous Pathology*. 20: 267-271.
- 107 **Túry E. & Corôa A.C. 1997.** Pitiose cutânea em equinos no Estado do Pará. In: *XXV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária* (Gramado, Brasil). p.150.