

Suscetibilidade *in vitro* e *in vivo* de *Pythium insidiosum*: estudo comparativo entre acetato de caspofungina e imunoterapia em coelhos*

DANIELA ISABEL BRAYER PEREIRA

Laerte Ferreira (Orientador – UFRGS)

Janio Morais Santurio (Co-orientador – UFSM)

Banca: Sílvia S. Guterres (UFRGS), Sydney Hartz Alves (UFSM), Mário Carlos Araújo Meireles (UFPEl), João Roberto Braga Mello (UFRGS).

O oomiceto aquático *Pythium insidiosum*, classificado no Reino *Stramenipila*, é o agente etiológico da pitiose, uma doença crônica, piogranulomatosa, que acomete eqüinos, caninos, felinos, bovinos, ovinos e humanos que habitam regiões tropicais e subtropicais. Diversos protocolos para o tratamento da enfermidade têm sido utilizados, incluindo terapia com antifúngicos, cirurgia e imunoterapia. O presente estudo objetivou avaliar a suscetibilidade *in vitro* de 27 isolados clínicos de *Pythium insidiosum* ao acetato de caspofungina, bem como correlacionar os resultados obtidos *in vitro* com a resposta da terapêutica *in vivo* e comparar a eficácia de dois tratamentos, acetato de caspofungina e imunoterapia, utilizando coelhos como modelo experimental. Vinte e seis isolados de *Pythium insidiosum* provenientes de casos clínicos de pitiose em animais no Brasil (24 eqüinos, 01 canino e 01 ovino) e um isolado ATCC (58637) foram avaliados neste estudo. Os testes *in vitro* foram desenvolvidos utilizando-se a macrotécnica em caldo seguindo o protocolo internacional M38-A do CLSI. O inóculo consistiu de uma suspensão de $2-3 \times 10^3$ zoósporos de *Pythium insidiosum* diluído 1:10 em caldo RPMI. As concentrações finais do acetato de caspofungina variaram de 0,25 – 128 $\mu\text{g/mL}$. A leitura dos CIMs foi visual, considerando-se o crescimento ou não de hifas em 24 horas de incubação a 37°C, sendo adotados 3 critérios de leitura: CIM0; CIM1 e CIM2 (100%, 90% e 50% de inibição de crescimento, respectivamente), assim como também foi determinada a concentração fungicida mínima. No ensaio *in vivo*, 15 coelhos inoculados subcutaneamente com 20.000 zoósporos de *Pythium insidiosum* foram divididos em 3 grupos de 5 animais (grupo 1, controle; grupo 2, tratado com imunoterápico Pitium Vac® e grupo 3, tratado com acetato de caspofungina). Os tratamentos iniciaram-se 25 dias após a inoculação e consistiram de: 1) 8 doses de imunoterápico administradas em intervalos de 14 dias; 2) 1 mg/kg/dia de acetato de caspofungina durante 20 dias consecutivos. Dezoito semanas após o início do experimento, os animais foram necropsiados e fragmentos de lesões foram coletados para análise histopatológica e morfométrica. Quatorze isolados (51,8%) evidenciaram CIM0 de 64 $\mu\text{g/mL}$ e 24 (88,8%) CIM1 com variação de = 8 $\mu\text{g/mL}$ a 64 $\mu\text{g/mL}$. Na determinação da concentração fungicida mínima, 17 (62,9%) amostras requereram 64 $\mu\text{g/mL}$. Os animais de ambos os tratamentos apresentaram redução da área de lesões, quando comparados aos animais do grupo controle ($P < 0.05$). As áreas de lesões dos coelhos tratados com acetato de caspofungina evidenciaram redução durante o tratamento, porém rapidamente retornaram a progredir quando a administração do fármaco foi suspensa. O aspecto histológico das lesões foi similar entre os grupos estudados e a avaliação morfométrica evidenciou que os animais dos grupos 2 e 3 apresentaram menor quantidade de hifas nas áreas de necrose ($P < 0.05$). Os resultados obtidos evidenciam que, embora não tenha havido diferença entre os tratamentos avaliados, a imunoterapia, em função de seu custo, continua sendo a melhor alternativa para o tratamento da pitiose. A ocorrência de altas CIMs associada a falta de atividade fungicida do acetato de caspofungina observados neste estudo, sugerem que *Pythium insidiosum* é pouco suscetível a este antifúngico.

Descritores: *Pythium insidiosum*, oomiceto, pitiose, acetato de caspofungina, imunoterapia, Pitium Vac, coelho.

Apresentada: 31 janeiro 2008

*Tese de Doutorado n. 86 (Especialidade: Micologia) 117f. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias [www.ufrgs.br/ppgcv], Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre/RS. CORRESPONDÊNCIA: D.I.B.Pereira [danielabrayer@gmail.com]

In vitro* and *in vivo* susceptibility of *Pythium insidiosum*: comparison study between caspofungin acetate and immunotherapy in experimental pythiosis in rabbits *

DANIELA ISABEL BRAYER PEREIRA

Laerte Ferreira (Adviser – UFRGS)

Janio Morais Santurio (Co-adviser – UFSM)

Committee: Sílvia S. Guterres (UFRGS), Sydney Hartz Alves (UFSM), Mário Carlos Araújo Meireles (UFPEL), João Roberto Braga Mello (UFRGS).

Pythium insidiosum is an oomycete classified in the Kingdom Stramenipila. It causes pythiosis, a chronic, difficult-to-treat, pyogranulomatous disease that affects mainly horses, but can also affect dogs, cats, cattle, sheep and humans that inhabit tropical and subtropical regions. Several protocols to treat pythiosis have been used, including antifungal drug administration, surgery and immunotherapy. The present study aimed to evaluate the *in vitro* susceptibility of 27 *Pythium insidiosum* clinical isolates to caspofungin acetate, as well as to relate the results obtained *in vitro* with the response of *in vivo* therapy, and to assess the efficacy of two treatments, immunotherapy and caspofungin acetate administration, in rabbits with experimental pythiosis. Twenty-six samples of *Pythium insidiosum* isolated from pythiosis lesions from animals in Brazil (24 horses, 01 dog and 01 sheep) and one ATCC isolate (58637) were studied. The *in vitro* tests were performed using the broth macrodilution method following the CLSI M38-A protocol. The inoculum consisted of a suspension containing $2-3 \times 10^3$ *Pythium insidiosum* zoospores diluted 1:10 with RPMI broth. The final concentrations of caspofungin acetate were 0.25 – 128 $\mu\text{g/mL}$. The MICs were read after 24 h of incubation at 37° C. The reading was visual and assessed the growth or absence of growth of hyphae. Three MIC reading criteria were adopted: MIC0, MIC1 and MIC2 (growth inhibition of 100%, 90% and 50%, respectively). The minimum fungicidal concentration was also determined. For the *in vivo* assay, fifteen rabbits were subcutaneously inoculated with 20,000 *Pythium insidiosum* zoospores and were divided into 3 groups of 5 animals (group 1, control; group 2, treated with Pitium Vac® immunotherapeutic; and group 3, treated with caspofungin acetate). The treatments were started 25 days after the inoculation, and consisted of: 1) 8 doses of the immunotherapeutic administered at 14-day intervals; and 2) 1mg/kg/day of caspofungin acetate during 20 consecutive days. The animals were necropsied eighteen weeks after the start of the experiment, and lesion fragments were collected for histopathologic and morphometric analyses. Fourteen isolates (51.8%) had an MIC0 of 64 $\mu\text{g/mL}$, and 24 (88.8%) had an MIC1 that varied between = 8 $\mu\text{g/mL}$ and 64 $\mu\text{g/mL}$. When subjected to the minimum fungicidal concentration assay, 17 (62.9%) samples required 64 $\mu\text{g/mL}$. The animals in both treatment groups displayed smaller lesion sizes compared to the animals of group control ($P < 0.05$). The subcutaneous lesion areas of rabbits treated with caspofungin acetate exhibited a reduction in their progression during the treatment. However, lesions quickly resumed growth when the administration of the drug was suspended. The histological aspect of the lesions was similar between the groups under study, and the morphometric evaluation showed that the animals in groups 2 and 3 had lower amounts of hyphae in necrotic areas ($P < 0.05$). The results obtained indicate that, even though the treatments did not differ significantly, the immunotherapeutic treatment is still the best alternative to treat pythiosis. In addition, the high MICs and lack of fungicidal activity of caspofungin acetate suggest that *Pythium insidiosum* is poorly susceptible to this antifungal drug.

Keywords: *Pythium insidiosum*, oomycete, pythiosis, caspofungin acetate, immunotherapy, Pitium Vac, rabbits.