



unesp
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ARTUR BIBIANO DE VASCONCELOS

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE INFECÇÕES FÚNGICAS NEGLIGENCIADAS: CRIPTOCOCOSE E PITIOSE

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Sandra de Moraes Gimenes Bosco

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a. Simone Baldini Lucheis

Botucatu - SP

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE INFECÇÕES FÚNGICAS
NEGLIGENCIADAS: CRIPTOCOCOSE E PITIOSE**

ARTUR BIBIANO DE VASCONCELOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária,
UNESP, para obtenção do título de
Doutor em Medicina Veterinária.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Sandra de
Moraes Gimenes Bosco

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Simone
Baldini Lucheis

FICHA CATALAGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA ANDRADE CRUZ E SANTOS-CRB

Vasconcelos, Artur Bibiano de.

Diagnóstico molecular de infecções fúngicas negligenciadas : Criptococose e Pitíase / Artur Bibiano de Vasconcelos. - Botucatu, 2023

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Sandra de Moraes Gimenes Bosco

Coorientador: Simone Baldini Luchesi

Capes: 21202010

1. Cryptococcus. 2. Reação em Cadeia da Polimerase Multiplex. 3. Reação em Cadeia da Polimerase. 4. Pitíase. 5. Biologia molecular.

Palavras-chave: Complexo Cryptococcus; Multiplex-PCR; Nested-PCR; Nordeste brasileiro; P. insidiosum.

Nome do autor: Artur Bibiano de Vasconcelos

Título: **DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE INFECÇÕES FÚNGICAS
NEGLIGENCIADAS: CRIPTOCOCOSE E PITIOSE**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr^a Simone Baldini Lucheis

Presidente e Coorientadora

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr^a Annelise Castanha Barreto Tenório Nunes

Membro

Departamento de Medicina Veterinária

UFAL

Prof. Dr^a Karla Patrícia Chaves da Silva

Membro

Departamento de Microbiologia Veterinária

UFAL

Prof. Dr Hélio Langoni

Membro

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Eduardo Bagagli

Membro

Instituto de Biociências de Botucatu – IBB- UNESP

Data da Defesa: 14 de março de 2023.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE ARTUR BIBIANO DE VASCONCELOS, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA, DA FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 14 dias do mês de março do ano de 2023, às 14:00 horas, no(a) Sala 4 da Central de Aulas do HV, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de ARTUR BIBIANO DE VASCONCELOS, intitulada **DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE INFECÇÕES FÚNGICAS NEGLIGENCIADAS: CRIPTOCOCOSE E PITIOSE**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa.Dra. SIMONE BALDINI LUCHEIS (Co-orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Depto de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva / FMVZ/Botucatu Unesp, Dra. KARLA PATRÍCIA CHAVES DA SILVA (Participação Virtual) do(a) Microbiologia Veterinária / Universidade Federal de Alagoas, Dra. ANNELESE CASTANHA BARRETO TENÓRIO NUNES (Participação Virtual) do(a) Patologia Veterinária / Universidade Federal de Alagoas, Prof. Dr. HELIO LANGONI (Participação Presencial) do(a) Depto. de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva / FMVZ/Botucatu - Unesp, Prof. Dr. EDUARDO BAGAGLI (Participação Presencial) do(a) Departamento de Ciências Químicas e Biológicas - Setor Microbiologia e Imunologia / Unesp - Instituto de Biociências do Câmpus de Botucatu - SP. Após a exposição pelo doutorando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: APROVADO. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Profa.Dra. SIMONE BALDINI LUCHEIS

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

Quero agradecer a minha família. Ao meu pai Carlos e minha mãe Teresa. Vocês nunca mediram esforços para realizar meus sonhos e vontades. Tudo o que pedi e sonhei vocês sempre fizeram o possível e o impossível para tornar real. Deram-me muito apoio, me educaram e me ensinaram a nunca desistir dos meus objetivos. A minha amada irmã Catarina, que sempre me incentivou nessa caminhada e que não importa a distância, ela sempre estará comigo. Aos meus avós, meus primos, tios e tias que torceram por mim, amo vocês.

À minha orientadora Profa. Dra. Sandra de Moraes Gimenes Bosco, por me receber como aluno de doutorado no seu laboratório. Obrigado pela confiança no meu trabalho, pelo respeito, pela paciência, por me ensinar, pela compreensão e pelos sábios conselhos.

À minha coorientadora Simone Baldini Lucheis que quando mais precisei de apoio e ajuda me acolheu de uma forma muito especial. Nunca esquecerei o que você fez por mim professora.

À minha orientadora de mestrado Profa. Dra. Karla Patrícia Chaves da Silva, pelo carinho de sempre e por ter depositado em mim a confiança de que eu poderia desbravar novos ares, me encorajando e incentivando a vir para UNESP Botucatu, instituição de grande renome na medicina veterinária nacional e mundial.

Muito obrigado aos membros do Programa de Pós-graduação em medicina veterinária pelo suporte, em especial aos professores do programa. Seus ensinamentos foram muitos e certamente contribuíram positivamente para a minha formação. Quero neste parágrafo igualmente agradecer a todos os professores, alunos e profissionais que contribuíram de forma ativa e presente para os importantes achados relatados em minha pesquisa.

Aos amigos do laboratório de Micologia Médica, Carol, Dani, Gabriel, Alana, Cauê, Débora, Hans, Gy, Jéssica, Pablo e Rayane. Vocês são muito importantes para mim, moram no meu coração. Obrigado por me receberem tão bem em Botucatu, sempre atenciosos, simpáticos e com boa vontade em me ajudar tanto no laboratório como nas questões de minha vida. Sem vocês eu também não conseguiria. Levarei sempre em minha memória cada momento com vocês.

Meu muito obrigado a todos os meus amigos que o destino me presenteou, cresci, amadureci, me aventurei com vocês e recebi muito amor, que os laços que formamos durem por todas nossas vidas. Em especial quero deixar toda minha gratidão para Nathalia, Vitória, Isadora, Luidy e Lívia que são anjos em minha vida.

Contudo, a minha fé não me permite deixar de agradecer a Deus, pois “tudo posso naquele que me fortalece”.

Lista de tabelas e figuras

Tabela 1. Isolados utilizados na padronização de Multiplex-PCR.....	25
--	----

Tabela 2. Número de depósitos no banco virtual (GenBank/NCBI) das espécies de <i>Cryptococcus</i> spp. utilizadas para o desenho de primers.....	27
---	----

Figura 1. Representação esquemática dos primers desenhados na região gênica PRP8 nas espécies de <i>C. neoformans</i> var. grubii, <i>C. neoformans</i> var. neoformans e <i>C. gatii</i>	29
--	----

Figura 2. Resultado Multiplex-PCR. Teste de gradiente de temperatura de anelamento dos primers, para melhor resolução das bandas.....	30
--	----

Figura 3. Resultado Multiplex-PCR. Teste de adição de DMSO na reação, em três gradientes para melhor resolução das bandas.....	31
---	----

Tabela 1. Dados referentes à amostras clínicas de equinos com lesões sugestivas de pitiose provenientes de cinco estados do Nordeste brasileiro.....	51
---	----

Figura 1. Lesões equinas das quais foram extraídas as amostras clínicas para o estudo. d – kunkers em solução antibiótica estéril.....	52
---	----

Figura 4. Resultado nested-PCR de amostras clínicas utilizando primer específico para <i>P. insidiosum</i>	54
---	----

Tabela 2. Amostras clínicas de equinos do Nordeste brasileiro com lesões granulomatosas e seus respectivos resultados para Nested-PCR e para cultivo microbiológico.....	54
---	----

Resumo

As infecções fúngicas têm se expandido em todo o mundo e devido a dificuldades no diagnóstico e tratamento, tem acarretado grave ameaça a saúde de animais e humanos. A Organização Mundial da Saúde destacou recentemente o Complexo de espécies de *Cryptococcus* como agentes críticos de ameaça a saúde pública devido a expansão da infecção e resistência antifúngica. Nesse contexto, destaca-se a importância do diagnóstico rápido e preciso a fim de se estabelecer melhores opções de tratamento e consequente melhora no prognóstico. Da mesma forma a pitiose é uma doença endêmica no Brasil, porém, com informações epidemiológicas simples, como notificação de casos e possíveis área de risco, inexistentes, principalmente na região do Nordeste Brasileiro. Neste trabalho determinamos técnicas moleculares para detecção diferencial no diagnóstico da criptococose e pitiose. No capítulo 1 padronizamos a técnica de Multiplex-PCR a partir do gene PRP8 para diferenciação das espécies do complexo *Cryptococcus*. Nossa metodologia padronizada possibilitou diferenciar pelo padrão de bandas em eletroforese, resultantes de uma única reação de PCR, as espécies *C. neoformans* var. *neoformans*, *C. neoformans* var. *grubii* e *C. gatti*. No Capítulo 2 testamos a sensibilidade da técnica de Nested-PCR no diagnóstico de casos suspeitos de pitiose na região Nordeste do Brasil. Do total de casos suspeitos para pitiose recebidos, 80% foram positivos por Nested-PCR, enquanto apenas 20% foi positivo para cultivo microbiológico. Nossos resultados representam os primeiros registros de pitiose em diferentes estados nordestinos, além de obtermos o primeiro isolado clínico do Maranhão. Nos dois capítulos desse trabalho abordamos as técnicas de biologia molecular como promissoras no diagnóstico diferencial tanto da criptococose quanto da pitiose e o quanto essas ferramentas podem contribuir para melhora no prognóstico de animais afetados, bem como para fornecer dados epidemiológicos para melhor compreensão da distribuição dessas doenças.

Palavras chaves: Multiplex-PCR, Nested-PCR, *P. insidiosum*, Nordeste Brasileiro, Complexo *Cryptococcus*, gene PRP8

Abstract

Fungal infections have expanded worldwide and due to the difficulty of diagnosis and treatment have become a threat to the health of animals and humans. The World Health Organization has recently highlighted the *Cryptococcus* species complex as critical agents and threats to public health due to the expansion of infection and antifungal resistance. In this context, the importance of rapid and accurate diagnosis is highlighted in order to establish better treatment options and consequent improvement in prognosis. Similarly, pythiosis is an endemic infection in Brazil, but simple epidemiological information, such as case notification and possible risk areas, is lacking, especially in the Northeast region of Brazil. In this work, we determine molecular techniques for differential detection in the diagnosis of cryptococcosis and pythiosis. In chapter 1, we standardized the multiplex-PCR technique using the PRP8 gene to differentiate species of the *Cryptococcus* complex. Our standardized methodology allowed us to differentiate the species *C. neoformans* var. *neoformans*, *C. neoformans* var. *grubii* and *C. gatti* by the electrophoretic band pattern resulting from a single PCR reaction. In Chapter 2, we tested the sensitivity of the nested-PCR technique in the diagnosis of suspected cases of pythiosis in the Northeast region of Brazil. Of the total number of suspected cases for pythiasis received, 80% were positive by Nested-PCR, while only 20% were positive for microbiological culture. Our results represent the first records of pythiosis in different northeastern states, and we also obtained the first clinical isolate from Maranhão. In the two chapters of this paper, we discuss promising techniques for the differential diagnosis of both cryptococcosis and pythiosis, and how these techniques may for improving the prognosis of affected animals, as well as to provide epidemiological data for a better understanding of the distribution of these diseases.

Key Words: Multiplex-PCR, Nested-PCR, *P. insidiosum*, Northeast Brazil, *Cryptococcus* complex, PRP8 gene

SUMÁRIO

<u>INTRODUÇÃO GERAL</u>	14
<u>OBJETIVOS GERAIS</u>	20
<u>CAPÍTULO 1: Padronização de ensaio Multiplex PCR na diferenciação das espécies do complexo <i>Cryptococcus</i> spp.</u>	21
<u>1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u>	21
<u>1.1 Criptococose</u>	21
<u>1.2 Epidemiologia e fatores de risco</u>	22
<u>1.3 Patogenia</u>	24
<u>1.4 Clínica</u>	25
<u>1.5 Diagnóstico</u>	27
1.5.1 Exame direto/tinta da China (nanguim).....	27
1.5.2 Cultura e identificação	27
1.5.3 Citologia e histopatologia.....	28
1.5.4 Sorologia	29
1.5.5 Métodos de diagnóstico molecular.....	29
<u>2. MATERIAL E MÉTODOS</u>	30
<u>2.1 Microrganismos</u>	30
<u>2.2 Extração de DNA das cepas cultivadas</u>	31
<u>2.3 Desenho dos primers</u>	31
<u>2.4 Ensaios do Multiplex PCR</u>	32
<u>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	33
<u>3.1 Desenho de primers Multiplex PCR</u>	33
<u>3.2 Ensaios do Multiplex PCR</u>	34
<u>5. CONCLUSÃO</u>	37
<u>CAPÍTULO 2: Diagnóstico molecular diferencial da pitiose no Nordeste Brasileiro</u> 39	
<u>1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u>	38
<u>1.1 Pitiose e o oomiceto <i>Pythium insidiosum</i></u>	38
<u>1.2 Epidemiologia da pitiose</u>	40
<u>1.3 A importância econômica da pitiose equina no Brasil</u>	41
<u>1.4 Sinais clínicos</u>	42
<u>1.5 Diagnóstico laboratorial</u>	46
1.5.1 Diagnósticos diferenciais para pitiose equina	50
<u>2. MATERIAL E MÉTODOS</u>	51

<u>2.1 Amostras</u>	51
<u>2.2 Cultura microbiológica</u>	51
<u>2.3 Extração de DNA</u>	52
<u>2.4 Nested-PCR</u>	52
<u>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	54
<u>3.1 Diagnóstico Tradicional: Cultura microbiológica</u>	54
<u>3.2 Diagnóstico molecular diferencial</u>	54
<u>4. CONCLUSÃO</u>	57
<u>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	58

INTRODUÇÃO GERAL

As micoses são enfermidades consideradas negligenciadas em todo o mundo. Dados epidemiológicos mostram que apesar das altas taxas de mortalidade constatadas, as micoses acabam não sendo diagnosticadas seja por falta do amparo de material específico ou por não suspeita clínica. Levantamento de informações revelam que os números anuais de ocorrências de infecções fúngicas são subestimados e, geralmente, os dados governamentais apresentados são baseados nos resultados de pesquisas científicas (BONGOMIN et al, 2017; GAFFI., 2018).

O Fundo Global de Ações contra Infecções Fúngicas (www.gaffi.org) nos revela uma situação crítica e alarmante. A cada ano mais de 400.000 pessoas desenvolvem pneumonia fúngica, por exemplo, e morrem sem acesso ao diagnóstico e à terapia, em média um bilhão de pessoas têm micoses de pele, mais de um milhão de olhos ficam cegos devido às ceratites fúngicas, e estima-se que mais de 300 milhões de seres humanos de todas as idades sofrem de alguma infecção fúngica grave no planeta, sendo que, desse total, mais de um milhão e meio irão a óbito. No Brasil, estimativas mostram que anualmente mais de três milhões de indivíduos sofrem de alguma doença fúngica grave e mesmo sendo claramente impactantes para a saúde pública, nenhuma doença fúngica tem notificação compulsória e tampouco são objeto de vigilância epidemiológica de rotina, exceção dos estados brasileiros que instituíram essa notificação por iniciativa própria no seu âmbito de gestão (GIACOMAZZI et al., 2016; GAFFI., 2018; DE MATOS et al., 2020).

As alternativas utilizadas para o tratamento das micoses em geral são caras, de eficácia questionável e associadas a muitos efeitos colaterais. Vacinas capazes de prevenir micoses são inexistentes, o que reforça a necessidade de pesquisas, medidas protetivas e de controle no intuito de garantir a saúde da população, além de incentivos na educação em saúde visando o esclarecimento sobre as micoses em escolas. São doenças extremamente onerosas, causando

problemas inclusive no âmbito econômico pois o custo do tratamento de doenças fúngicas pode superar o valor de R\$400 mil por paciente o que torna necessárias ações concretas, soluções inovadoras e apoio financeiro à pesquisa no cenário das doenças fúngicas (MCCARTHY; WALSH, 2017; RODRIGUES., 2019).

Neste cenário, temos a criptococose que é uma enfermidade infecciosa de etiologia fúngica de distribuição mundial. Causada pelo complexo de leveduras que envolve as espécies *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, a micose saproozoonótica apresenta evolução aguda, subaguda ou crônica, infecta, além de humanos, diferentes espécies de animais silvestres e domésticos. A infecção ocorre majoritariamente em pacientes com comprometimento imunológico, não possui predisposição sexual ou etária e é adquirida pela inalação do agente em forma de esporos aerossolizados como basidiósporos ou da própria levedura ressecada. A doença é caracterizada pelo acometimento do tecido pulmonar, sistema nervoso central (envolvendo as meninges) e por lesões localizadas em pele e membranas mucosas das cavidades oronasal. Pelo caráter oportunista, nos casos de imunossupressão avançada a criptococose apresenta altas taxas de mortalidade (CANAVARI et al., 2017; MEYA et al., 2019; CARRIJO et al., 2021; DO CARMO et al., 2022).

As espécies do gênero *Cryptococcus* pertencem ao filo Basidiomycota, da classe Basidiomycetes, ordem Tremellales e família Tremellaceae. São fungos leveduriformes que na forma de parasitismo evidenciam morfologia celular ovoide ou esférica de 3 a 8 µm envoltas por uma estrutura capsular mucopolissacarídica. Dentre as espécies existentes são relatados em maior número os casos atribuídos a *C. neoformans* mas a infecção por *C. gattii* apresenta uma virulência ainda maior, pois é capaz de causar doença grave de forma primária em indivíduos imunocompetentes. Cerca de 223.100 casos de meningite criptocócica são relatadas globalmente a cada ano, e estima-se que em 181.100 dos casos o indivíduo evolui para óbito. A grande parte das mortes constatadas acontecem em países subdesenvolvidos com recursos limitados, que sofrem com a escassez de medicamentos apropriados e o alto custo de tratamentos eficazes, o que revela a urgência em desenvolver terapêutica e

métodos diagnósticos rápidos e eficientes contra esses patógenos fúngicos (KWON-CHUNG et al., 2014; RAJASINGHAM et al., 2017; IYER et al., 2021).

A profilaxia e controle da criptococose é considerada difícil, pois a principal problemática quanto aos aspectos de saúde pública está ligada a exposição ambiental, uma vez que o contato com as fontes de infecção é cotidiano na grande parte dos centros urbanos. A presença de propágulos infectantes de *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* e *C. neoformans* var. *neoformans* é cosmopolita, ocorrendo em diversas fontes ambientais, principalmente em excretas ressecadas de pássaros com enfoque nas de pombos (*Columba livia*), além de matéria vegetal em decomposição e ocos de árvores. O acúmulo de fezes de pombos no ambiente urbano é considerado perigoso e áreas com agregação de pássaros devem ser limpas regularmente para a redução do número de fungos ambientais patogênicos. A presença de *Cryptococcus gattii* tem sido frequentemente descrita na literatura em associação a árvores em regiões subtropicais e tropicais (ROSARIO et al., 2008; COSTA et al., 2009; SPENNEMANN & WATSON, 2017).

O protocolo de investigação para o diagnóstico laboratorial da criptococose segue um modelo baseado no exame micológico direto, isolamento fúngico, testes bioquímicos para identificação das espécies, exame histopatológico e imunodiagnóstico. No geral, esses exames são trabalhosos e imprecisos, como por exemplo os testes fenotípicos devido a subjetividade da interpretação dos resultados, ou podem apresentar resultados falso-positivos nas técnicas imunológicas ou serem muito demorados, como na tentativa do isolamento microbiológico (HUSTON & MODY, 2009; WENGENACK & BINNICKER, 2009).

Com um alto potencial para suprir as limitações das técnicas empregadas no diagnóstico convencional os métodos moleculares existem como ferramentas disponíveis de alta sensibilidade e especificidade, capazes de detectar sequências gênicas do complexo *Cryptococcus* spp. de culturas puras e espécimes clínicos de forma ágil e satisfatória, como também podem ser empregados para identificação, tipagem e estudos de epidemiologia molecular. Esse tipo de diagnóstico é imprescindível e cada vez mais precisa ser inserido

na rotina clínica. Estudos epidemiológicos da criptococose que usaram como base as técnicas moleculares revelaram oito genótipos: VNI (sorotipo A), VNII (sorotipo A), VNIII (híbrido AD), VNIV (sorotipo D) para *C. neoformans* e VGI, VGII, VGIII, VGIV (sorotipos B e C) para *C. gattii* (LEAW et al., 2006; BOVERS et al., 2007; LEAL et al., 2008; TRILLES et al., 2008; MEYER et al., 2009).

O uso dos métodos moleculares contribui para melhorar o entendimento e o diagnóstico desta micose pelas análises de regiões definidas do genoma fúngico, auxiliam na compreensão dos dados epidemiológicos e da história natural da criptococose. Além disso permitem fornecer dados importantes ao monitoramento da presença, bem como o estabelecimento de genótipos, em determinada população ou região, diferenciando cepas patogênicas ambientais ou até mesmo diferenciar casos positivos de criptococose das demais doenças ocasionadas por leveduras. Uma ótima opção para tais feitos é a Multiplex PCR (LEAL et al., 2008; SIDRIM et al., 2010).

A aplicação da Multiplex PCR para fins de diagnóstico microbiológico é considerada promissora pois permite a amplificação de duas ou mais sequências alvo em apenas uma reação de PCR de forma rápida e utilizando pouca quantidade de DNA. Com diferentes combinações de *primers* a técnica pode ser utilizada para a identificação de *C. neoformans* e *C. gattii*, incluindo seus sorotipos. Além disso, a técnica de Multiplex PCR proporciona economia importante de tempo e esforço na rotina laboratorial. Desde a sua introdução, a técnica mostrou-se efetiva no ramo das doenças infecciosas, sendo considerada um valioso método na identificação de agentes virais, bacterianos, parasitários e fúngicos (ELNIFRO et al., 2000; LEAL et al., 2008; SIDRIM et al., 2010).

Neste mesmo cenário das infecções negligenciadas, a pitiose representa uma doença crônica não transmissível, de natureza piogranulomatosa e que afeta diversas espécies animais, incluindo o ser humano. A enfermidade é causada pelo oomiceto *Pythium insidiosum*, reino Stramenopila, filo Oomycota, classe Oomycetes, ordem Peronosporales e família Pythiaceae (ALEXOPOULOS et al., 1996; GAASTRA et al., 2010; PERMPALUN et al., 2019). São mais de 120 espécies pertencentes ao gênero já descritas na literatura, no entanto, a espécie de maior importância atualmente e responsável

pela endemicidade em muitos países é o *Pythium insidiosum*, um microrganismo com hifas hialinas e cenocíticas, micélio curto e produtor de zoósporos, com maior afinidade por ambientes aquáticos, como pântanos e campos alagados (CHOI et al., 2017). Após liberados e em contato com a pele de animais e seres humanos em ambiente aquático, os zoósporos promovem um encistamento na pele e dá-se início à produção do tubo germinativo, que corresponde ao início da formação da hifa, forma parasitária que promove a destruição tecidual, e em equinos a formação de massas teciduais chamadas *kunkers* (GAASTRA et al., 2010; WATANABE et al., 2015).

A Tailândia e o Brasil são os países que possuem maior prevalência de pitiose humana e equina, respectivamente (GAASTRA et al., 2010). No Brasil, são maiores os relatos de pitiose animal, especialmente em equinos, e estão relacionados à épocas de maior pluviosidade (SALLIS; PEREIRA; RAFFI, 2003; REIS et al., 2003; MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012; CARMO et al., 2015). Em um estudo de 2011, pesquisadores da região do pantanal brasileiro verificaram uma prevalência de 12,5% de equinos infectados e mortalidade média de 5,88%. Os resultados do estudo foram obtidos por histopatologia e isolamento do agente etiológico (SANTOS; SANTURIO; MARQUES, 2011). Em 2015, um inquérito sorológico realizado no sul do país evidenciou uma prevalência de 11,1% dos equinos amostrados, associando uma maior soropositividade à presença de açudes nas propriedades (WEIBLEN et al., 2015). Pesquisadores também da região sul obtiveram os primeiros resultados de estudo molecular no Brasil, detectando o agente diretamente de lesões cutâneas de 100% dos equinos enfermos por nested-PCR (BOTTON et al., 2011). Embora existam outras abordagens diagnósticas para a pitiose equina, somente a PCR (*Polimerase Chain Reaction*) e o isolamento por cultivo microbiológico podem confirmar a ocorrência do oomiceto na lesão, sendo o PCR o método mais fácil, rápido e seguro para isto (BOTTON et al., 2011).

O diagnóstico tardio da pitiose, impede a completa ressecção cirúrgica, favorece a progressão da lesão no tecido envolvido ou o comprometimento de estruturas vitais adjacentes, resultando num prognóstico ruim para o paciente, o que revela a necessidade do emprego e desenvolvimento de técnicas que possibilitem um diagnóstico rápido e precoce para a pitiose, principalmente o

diagnóstico diferencial de lesões granulomatosas que possam ser confundidas com esta enfermidade (JAEGER; ROTSTEIN; LAW, 2002; FERNANDES et al., 2012).

O desenvolvimento de técnicas moleculares específicas para detecção de *P. insidiosum* foi imprescindível para um diagnóstico diferencial rápido, bem como um prognóstico bem sucedido. Desenvolvida a partir da região gênica rDNA-ITS, a técnica de Nested-PCR para espécie tem se mostrado eficaz nesse aspecto, pois permite o diagnóstico específico sem a necessidade de sequenciamento, como exige as PCRs convencionais (GROOTERS & GEE, 2002; PAZ et al., 2021). Além disso, essa técnica apresenta alta sensibilidade e permite diagnóstico microbiológico a partir do DNA extraído de amostras clínicas, que podem apresentar baixa concentração de material genético do hospedeiro, bem como tecido, sangue, e no caso da pitiose equina, a partir de *Kunkers*, sem a necessidade de cultivo microbiológico (PAZ et al., 2021). No entanto, técnicas moleculares como essa são relativamente novas e pouco difundidas e utilizadas no diagnóstico microbiológico, principalmente em regiões onde a doença é negligenciada.

De modo geral, há muito a ser explorado sobre a pitiose no Brasil, os estudos sorológicos e moleculares se concentram nas regiões centro, sudeste e sul (WATANABE et al., 2015). No entanto sabe-se por exemplo que o estado que mais compra a vacina para pitiose equina é o estado do Maranhão, onde não existe relato da doença na literatura (Embrapa, 2014). A doença permanece sem maiores investigações na região Nordeste, onde já foram relatados alguns surtos, tanto em ovinos, equinos, bovinos e casos isolados em cães e gatos (TABOSA et al., 2004; CARRERA et al., 2013; FRADE et al., 2017; LEAL, 2018; MAIA et al., 2016; SOUTO et al., 2020).

O diagnóstico da pitiose equina na região Nordeste do país é deficiente, restringindo-se ao diagnóstico clínico e histopatológico, deixando dúvidas em relação a outros possíveis diagnósticos diferenciais, como a habronemose, a zigomicose e o sarcóide equino. São necessárias investigações moleculares do agente etiológico presente nas lesões desses animais, a fim de compreendermos melhor a epidemiologia da doença também nessa região do país (LEAL, 2018; MAIA et al., 2020; SOUTO et al., 2020).

OBJETIVOS

Dessa forma, o presente trabalho propõe padronizar a técnica Multiplex PCR para diferenciação dos agentes etiológicos da criptococose, além de diagnosticar por método molecular diferencial (nested-PCR) o agente causador da pitiose equina, *Pythium insidiosum*, em diferentes estados do Nordeste brasileiro.

CAPÍTULO 1: Padronização de ensaio Multiplex PCR na diferenciação das espécies do complexo *Cryptococcus* spp.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Criptococose

A criptococose é uma micose sistêmica, de distribuição cosmopolita, que acomete humanos e animais, sendo, neste último caso, mais frequente nos felinos (MALIK et al., 2006), também conhecida como torulose ou blastomicose européia (DARZÉ et al., 2000). É uma doença oportunista, causada por uma levedura encapsulada do gênero *Cryptococcus*, pertencente ao filo dos basidiomicetos, com mais de 30 espécies (KON et al., 2008, MAZIARZ; PERFECT, 2016), destacando-se *Cryptococcus neoformans* var *grubii*, *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* e *Cryptococcus gattii* como as mais comumente associadas com a doença (MAZIARZ; PERFECT, 2016). Foi descrito pela primeira vez em 1894 e 1895 na Alemanha por Otto Busse e Abraham Buschke como um organismo semelhante ao *Saccharomyces*, isolado da tibia de uma mulher (MAZIARZ; PERFECT, 2016). Foi isolado inicialmente na natureza do suco de pêssgo por Francisco Sanfelice em 1894 e do solo por Emmons em 1951 (EMMONS et al., 1955).

O fungo revela-se como leveduras com morfologia globosa ou ovalada, medindo cerca de 3 a 8µm de diâmetro, com brotamento único ou múltiplo, de colo estreito, e envolvidas por característica cápsula mucopolissacarídica a qual é mais evidente em parasitismo do que *in vitro*. Apresenta-se como colônia de cor branca a creme, brilhante, de textura mucóide, margem lisa e regular, após três dias à temperatura de 25 a 37 °C, em cultivo nos meios como Agar Sabouraud glicose 2% e Agar extrato de malte e levedura. A capacidade de produção de melanina com formação de colônias marrons em meios com extrato de sementes de Níger é característica de *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, não ocorrendo em outras espécies do gênero *Cryptococcus* e nem outras leveduras de interesse médico. As espécies do complexo C.

neoformans se diferem em aspectos bioquímicos, biológicos, ecológicos, antigênico e genéticos das espécies do complexo *C. gattii* (KON et al., 2008; BOSCO et al., 2016; MARTINS et al., 2017).

As espécies do complexo *Cryptococcus neoformans* – *Cryptococcus gattii* também são diferenciadas por técnicas microbiológicas, sorológicas e moleculares (LESTER, 2011). O complexo *C. neoformans* é composto das espécies *C. neoformans* var. *grubii* (sorotipo A) e *C. deneoformans* (cepa *C. neoformans* var. *neoformans* - sorotipo D). Enquanto o complexo *C. gattii* (sorotipo B e C), anteriormente conhecido como *C. neoformans* var. *gattii*, compreende as cinco espécies: *C. gattii*, *C. bacillisporus*, *C. deuterogattii*, *C. tetragattii* e *C. decagattii* (HAGEN et al., 2015).

Os agentes etiológicos da criptococose podem ser frequentemente isolados de diversas fontes, como, frutas e vegetais, ocos e cascas de árvores, mucosa oronasal, pele de animais e pessoas saudáveis e, principalmente, no solo rico em excretas de aves (QUEIROZ et al., 2008) onde pode permanecer viável por mais de dois anos (MARCASSO et al., 2005). As aves dificilmente se infectam pelo fungo, na maioria das vezes são apenas portadoras, devido à alta concentração de nitrogênio em suas fezes que favorece o desenvolvimento e a manutenção fúngica no solo (MÜLLER; NISHIZAWA, 2017).

1.2 Epidemiologia e fatores de risco

A criptococose era considerada uma infecção incomum antes da explosão da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) no mundo, quando sua incidência aumentou significativamente em meados da década de 1980, levando a que 80% dos casos de criptococose fossem associados a infecção pelo retrovírus, sendo que na década de 1970 a associação era principalmente a neoplasias, transplante de órgãos e certos tratamentos imunossupressores (MAZIARZ; PERFECT, 2016). Embora os casos de meningite criptocócica associada ao HIV tenha diminuído nos países com recursos disponíveis e com o aumento da acessibilidade a terapia antirretroviral, houve uma estimativa de 223.100 casos incidentes em todo o mundo no ano de 2014, dos quais 162.500 (73%) ocorreram na África subsaariana (RAJASINGHAM et al., 2017).

A frequência de casos de criptococose entre a população não portadora do HIV e não transplantada aumentou, sendo atribuída ao uso de terapias imunomoduladoras (BRATTON et al., 2012; SCHMALZLE et al., 2016). Em ambientes com recursos disponíveis, a mortalidade por meningite criptocócica é mais alta no grupo de pacientes imunossuprimidos, onde o diagnóstico tardio é um fator agravante (PERFECT; BICANIC, 2015; DEMING et al., 2019).

O estabelecimento do quadro clínico e a disseminação da infecção guardam estreita relação com a imunidade do hospedeiro. Como na maioria dos casos de infecções fúngicas, a imunidade celular é a que prepondera. A resistência natural de alguns espécimes é tão evidente que, por ocasião do surgimento dos primeiros sintomas ou lesões, deve-se buscar causas imunossupressoras predisponentes (LARSSON et al., 2003). Nos animais, além de imunossupressão iatrogênica (glicocorticóides) se buscam, também, infecções virais (leucemia - FeLV e imunodeficiência adquirida viral felina - FIV) ou riquetsianas (erliquiose canina), neoplasias e diabetes melito (GROSS; IHRKE, 1992).

Dentre os animais domésticos, o gato é o mais acometido, não sendo relatado predisposição sexual ou etária, porém, a infecção foi diagnosticada em maior número em gatos de meia idade a idosos. Quanto a predisposição racial, acredita-se que gatos de raças puras tenham maior susceptibilidade genética para alguns agentes infecciosos, incluindo *Cryptococcus* spp. Em cães, a doença é considerada esporádica e quando ocorre possui uma prevalência maior em animais de faixa etária mais jovem, atingindo animais com menos de 6 anos, no qual não foi observado predisposição sexual. Os felinos por possuírem hábitos diferentes em comparação aos caninos, como maior acesso à rua, maior contato com árvores, matéria orgânica e fezes de aves pode justificar essa diferença no padrão epidemiológico da doença (PEREIRA et al., 2013).

O acesso a rua em ambientes urbanos é um agravante que aumenta a predisposição de cães e gatos a contraírem a doença, no entanto, em ambientes fechados e ambientes domiciliares o risco também ocorre, devido ao contato com poeira, plantas, solo e objetos contaminados (LESTER, 2011).

Os dados do Sistema de Informação de Mortalidade (SIM) do Ministério da Saúde do Brasil demonstram que as micoses sistêmicas causam em média

3.583 mortes anuais em 23,6% dos municípios brasileiros, sendo a criptococose responsável por cerca de 25% dessas mortes. A doença apesar de apresentar elevada taxa de mortalidade, assim como as demais infecções fúngicas sistêmicas, não está incluída à lista de doenças de notificação compulsória nacional, o que dificulta dimensionar os verdadeiros números da doença no país (PRADO et al., 2009, Ministério da Saúde, 2020).

1.3 Patogenia

A infecção criptocócica geralmente se dá pela inalação de basidiósporos ambientais ou pequenas células de levedura ($<5\ \mu\text{m}$) que se depositam nos alvéolos pulmonares (GUSHIKEN; SAHARIA; BADDLEY, 2021). A resposta do hospedeiro à infecção criptocócica envolve alguns mecanismos, como a ação de células T *helper* com citocinas, incluindo fator de necrose tumoral (TNF), interferon- γ e interleucina-2, o que resulta em uma inflamação granulomatosa (PERFECT, 2005). A inoculação traumática nos tecidos foi descrita e pode ocorrer com menor frequência (MAZIARZ; PERFECT 2016).

Em alguns hospedeiros, a doença por *C. gattii* se mostrou mais provável de se apresentar como uma infecção pulmonar granulomatosa progressiva, mas menos provável de se disseminar para o sistema nervoso central (SNC), diferente da doença causada por *C. neoformans*. Essa observação geral foi feita em surtos humanos e caracterizada em modelos de camundongos, mas permanece uma sobreposição substancial entre as espécies (PHILLIPS et al., 2015; PERFECT, 2015; KROCKENBERGER et al., 2010).

Quanto à transmissão, não foi provado que pode ser passada diretamente de humanos para humanos, animais para humanos ou vice-versa, mas a transmissão presumida de humano para humano foi descrita (BEYT; WALTMAN, 1978; GLASER; GARDEN, 1985). Há relatos de vários casos de suposta transmissão de criptococose por transplante de órgãos (SINGH et al., 2012; CAMARGO, 2017).

Dentre os principais fatores de virulência do *Cryptococcus neoformans* destacam-se a termotolerância, os componentes da parede celular e da cápsula, a capacidade de adesão, os receptores de hormônios e a produção de enzimas (KUROKAWA et al., 1998). Embora a produção de cápsulas seja um processo

metabólico de alto custo, confere ao organismo diversas vantagens patogênicas: atua como barreira contra a fagocitose e dificulta a produção de anticorpos. Alterações na produção de cápsulas geram cepas avirulentas (ZAVALA; BADDLEY, 2020).

1.4 Clínica

C. neoformans e *C. gattii* têm predileção por estabelecer doença clínica no trato respiratório inferior e no sistema nervoso central, embora a infecção possa se disseminar infectando outros locais menos frequentes como a pele, próstata, olhos e ossos/articulações, no entanto, deve-se enfatizar a capacidade de disseminar amplamente e infectar a maioria dos órgãos em pacientes gravemente imunossuprimidos e, portanto, tem a capacidade de aparecer em qualquer local do corpo humano (MAZIARZ; PERFECT, 2016; GUSHIKEN; SAHARIA; BADDLEY, 2021). Em pacientes imunocompetentes, devido aos maus resultados associados a um diagnóstico tardio, também é importante considerar e avaliar apresentações atípicas de criptococose (GUSHIKEN; SAHARIA; BADDLEY, 2021).

No ser humano, a meningite criptocócica é a infecção do SNC mais frequente em portadores do HIV. Os sintomas geralmente são inespecíficos e podem ser subagudos, desenvolvendo-se ao longo de semanas, e são semelhantes aos observados em outros tipos de meningite, no entanto, em algumas ocasiões, pode surgir de forma mais aguda ou não apresentar características típicas, como cefaleia. Os sintomas comuns incluem cefaleia, febre, neuropatias cranianas, alteração mental, letargia, perda de memória e sinais de irritação meníngea (MAZIARZ; PERFECT, 2016; GUSHIKEN; SAHARIA; BADDLEY, 2021). O trato respiratório serve como a principal porta de entrada para a infecção, com isso, a infecção pulmonar está presente em até 50% dos pacientes com criptococose e é mais frequente em pacientes com infecção por *C. gattii*. As manifestações pulmonares podem variar de colonização assintomática das vias aéreas a nódulos pulmonares simples em uma radiografia de tórax e pneumonia de progressão rápida com a presença de uma síndrome do desconforto respiratório agudo. Quando sintomática, os infectados podem apresentar febre, tosse, dispneia, sudorese noturna, mal-

estar, dor torácica e, raramente, hemoptise. Pacientes imunocomprometidos são mais frequentemente sintomáticos do que pacientes imunocompetentes (MAZIARZ; PERFECT, 2016; ZAVALA; BADDLEY, 2020; GUSHIKEN; SAHARIA; BADDLEY, 2021).

A forma nasal é a mais comum em gatos, apresentando-se como doença naso-sinusal crônica, isoladamente ou em conjunto com disseminação local para a pele, tecido subcutâneo, ossos e linfonodos regionais (submandibulares). Induz edema nasofacial seguido de ulceração profunda não cicatrizante drenando exsudato gelatinoso, corrimento nasal crônico (unilateral ou bilateral) com aspecto seroso, mucopurulento ou sanguinolento, dispneia estertora e inspiratória, espirros e linfadenopatia submandibular. Anorexia e subsequente perda de peso também podem ser resultado da anosmia que afeta gatos com doença nasal crônica. Criptococose é um importante diferencial em gatos com secreção nasal crônica, independentemente da presença ou não de edema facial e/ou ulceração da pele. A doença do trato respiratório inferior pode se seguir e pode se manifestar radiologicamente apenas como nódulos pulmonares ou mediastinais. Observa-se a formação de massas firmes ou pólipos no tecido subcutâneo, principalmente sobre a região nasal, conferindo um aspecto característico de “nariz de palhaço” (PENNISI et al., 2013). O envolvimento do SNC provavelmente surge após a disseminação local através da placa cribiforme; nesses casos, surge a cegueira súbita por neurite óptica, acompanhada de convulsões ou alterações comportamentais. Em outros casos, a disseminação provavelmente ocorre por via hematogênica e induz encefalomielite granulomatosa com lesões únicas ou múltiplas. Muitos gatos apresentam dores na cabeça ou na coluna; outros sinais de envolvimento meníngeo (hiperestesia, rigidez de nuca) não são comuns (PENNISI et al., 2013).

Nos cães, a infecção geralmente é mais grave, sendo a principal manifestação clínica a síndrome neurológica, que se dá como uma meningoencefalomielite, porém, estes são mais prováveis de desenvolver uma doença disseminada grave (MARCASSO et al., 2005). Os sinais clínicos variam de acordo com o local da lesão, podendo ser observado depressão, desorientação, nistagmo, vocalização, diminuição da consciência, ataxia, espasticidade, andar em círculos, paresia, paraplegia, convulsões, anisocoria, midríase, déficit visual, cegueira, surdez, perda de olfato e dor cervical

(HONSHO et al., 2003; NELSON; COUTO, 2001; PEREIRA; COUTINHO, 2003). Na síndrome ocular, as anormalidades mais comuns são uveíte anterior, coriorretinite granulomatosa exsudativa, hemorragia retiniana, papiloedema, neurite óptica, midríase, fotofobia, blefarospasmo, opacidade de córnea, edema inflamatório da íris e/ou hifema, cegueira (HONSHO et al., 2003; LARSSON et al., 2003).

1.5 Diagnóstico

O diagnóstico definitivo da criptococose é feito pelo isolamento do agente proveniente de uma amostra clínica ou pela detecção direta do fungo de amostras de fluidos corporais por meio da coloração com tinta da China (Nanquim). Existem vários outros métodos utilizados para o diagnóstico de criptococose, como a histopatologia de tecidos infectados, métodos sorológicos e métodos moleculares, porém estes, apesar de disponíveis e amplamente utilizados para fins de pesquisa, não são utilizados corriqueiramente na prática clínica de rotina (MAZIARZ; PERFECT, 2016).

1.5.1 Exame direto/tinta da China (nanquim)

O método mais rápido para o diagnóstico da meningite criptocócica é o exame direto do líquido cefalorraquidiano (LCR) para detecção das leveduras encapsuladas pela preparação de tinta nanquim. Ele pode ser visualizado como uma célula de levedura globular encapsulada com ou sem brotamento, variando em tamanho de 5 a 20 μm de diâmetro. A sensibilidade da coloração com nanquim do LCR depende da carga fúngica e é relatada como sendo de 30% a 50% na meningite criptocócica não relacionada à AIDS e até 80% na doença relacionada à AIDS. Os falsos positivos podem resultar de linfócitos intactos, outras células de tecido e formas de levedura inviáveis, o que limita ainda mais a utilidade diagnóstica da microscopia direta do LCR para meningite criptocócica (DIAMOND; BENNETT, 1974).

1.5.2 Cultura e identificação

Cryptococcus spp. podem ser cultivados prontamente a partir de amostras biológicas, como LCR (líquido cefalorraquidiano/líquor), escarro e biópsia de

pele em meios de cultura fúngicos de rotina. As colônias são geralmente observadas em placas de Ágar Sabouraud 2% após 48 a 72 horas de incubação a 30°C a 35°C em condições aeróbicas e aparecerão como colônias opacas, brancas a creme que podem ficar laranja-amarronzadas ou marrons após incubação prolongada. A aparência mucóide da colônia está relacionada ao tamanho da cápsula ao redor das leveduras. Apesar do crescimento relativamente rápido para a maioria das cepas, as culturas devem ser mantidas por até 4 semanas, principalmente para pacientes que recebem tratamento antifúngico. Também é recomendado o cultivo em meio de sementes de Níger, meio diferencial que evidencia a produção de melanina em *C. neoformans* e *C. gattii*. O uso de agar Mycosel não é indicado em suspeitas de criptococose, uma vez que *Cryptococcus* spp. é sensível à presença de ciclohexamida presente nesse meio (MAZIARZ; PERFECT, 2016).

1.5.3 Citologia e histopatologia

A identificação por coloração histológica pode ser feita a partir de tecidos como pulmão, pele, medula óssea, cérebro e outros órgãos. A coloração histopatológica e a citologia de sedimentos de LCR centrifugados e outros fluidos corporais são mais sensíveis do que o método de coloração com tinta da China (MALABONGA; BASTI; KAMHOLZ, 1991; LEE et al., 1993; SRIPA; KANJANAVIROJKUL; PUAPAIROJ, 1997; SATO et al., 1999). O agente é observado como uma levedura que se reproduz por brotamento de base estreita. A levedura é mais bem identificada por colorações especiais que coram a cápsula polissacarídica, incluindo mucicarmina, ácido periódico-Schiff e colorações de azul de Alcian (CASADEVALL; PERFECT, 1998). A coloração de Fontana-Masson identifica a melanina na parede celular da levedura. Outros corantes fúngicos, como Calcofluor, que se liga à quitina fúngica, ou prata metenamina Gomori, que mancha a parede celular fúngica, também são usados para identificar o organismo a partir de amostras clínicas (KANJANAVIROJKUL; SRIPA; PUAPAIROJ, 1997; CASADEVALL; PERFECT, 1998;).

1.5.4 Sorologia

O diagnóstico de criptococose melhorou significativamente com o desenvolvimento de testes sorológicos para o antígeno capsular polissacarídeo criptocócico (CrAg), que é eliminado durante a infecção. Técnicas de aglutinação de látex e imunoensaio enzimático estão amplamente disponíveis (usando soro e LCR), sendo a primeira a metodologia mais usada até recentemente, com sensibilidades e especificidades gerais de 93% a 100% e 93% a 98%, respectivamente (WU; KOO, 1983; TANNER et al., 1994). A baixa carga fúngica, como na meningite crônica de baixo grau ou nos estágios iniciais da infecção, e o armazenamento inadequado de amostras podem causar resultados falso-negativos em testes de aglutinação de látex (BLOOMFIELD et al., 1963). O teste semiquantitativo oferece muitas vantagens sobre os outros métodos sorológicos, incluindo rapidez (aproximadamente 15 minutos), requisitos mínimos de infraestrutura laboratorial, estabilidade à temperatura ambiente, baixo custo e maior captura de polissacarídeos de *C. gattii* (JARVIS et al., 2011).

1.5.5 Métodos de diagnóstico molecular

Os métodos moleculares são importantes alternativas inclusive para o diagnóstico da criptococose na fase inicial. São mais rápidos em relação aos métodos convencionais de diagnóstico, apresentando boa sensibilidade e especificidade para detecção e identificação das espécies de interesse clínico de *Cryptococcus*. Para sua execução são necessárias pequenas quantidades de amostras e que, em comparação a outros métodos, permitem diagnósticos mais eficientes, auxiliando inclusive em estudos de geoprocessamento em saúde, distribuição geográfica, prevalência em hospedeiros e virulência, o que melhora a compreensão da epidemiologia e a diferenciação das espécies crípticas. Os benefícios desses métodos frente ao prognóstico da criptococose são indispensáveis, uma vez que cada espécie apresenta diferentes perfis de susceptibilidades a antifúngicos (DANESI et al., 2014; GRACIELE-MELO et al., 2016; PROEPI, 2018).

A pesquisa de novos métodos laboratoriais e aperfeiçoamento dos que já existem possibilitam o diagnóstico mais rápido e preciso. Testes de diagnóstico para a criptococose utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) têm sido descritos e propostos. Os ensaios moleculares baseados na amplificação do

DNA podem facilmente detectar *Cryptococcus* spp., sendo a multiplex PCR uma técnica que possibilita a detecção de várias sequências de DNA alvo em uma única reação, apresentando vantagens como rapidez, especificidade e reprodutibilidade na detecção, contribuindo na diferenciação não apenas de genótipos, mas também sorotipos do próprio gênero e identificação de focos primários de infecção por *Cryptococcus* de forma assertiva (ITO-KUWA et al., 2007; LEAL et al., 2008).

Dessa forma, nesta parte do trabalho visamos padronizar a técnica Multiplex PCR para identificação dos agentes etiológicos da criptococose.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismos

Para este estudo foram utilizadas culturas isoladas e identificadas, fornecidas pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz/RJ). Como controle positivo e amplificação dos agentes, utilizamos as cepas de *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* C. *neoformans* var. *neoformans*, *Cryptococcus gattii*. Para o teste de especificidade da amplificação dos agentes, utilizamos as cepas de *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*. Todos os microrganismos são representados na tabela 1. As culturas foram mantidas em ágar Sabouraud a 35°C.

Tabela 1. Isolados de *Cryptococcus* spp utilizados na padronização de Multiplex-PCR.

TAXON	REGISTRO CFP	REGISTRO EM OUTRA COLEÇÃO	CARACTERÍSTICAS
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>	CFP 55	WN 148	VNI
<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i>	CFP 56	WN 626	VNII
<i>Cryptococcus neoformans</i>	CFP 57	WN 628	VNIII
<i>Cryptococcus neoformans</i>	CFP58	WN 629	VNIV
<i>Cryptococcus gattii</i>	CFP 59	WN 179	VGI
<i>Cryptococcus gattii</i>	CFP 60	WN 178	VGII
<i>Cryptococcus gattii</i>	CFP 61	WN 161	VGIII
<i>Cryptococcus gattii</i>	CFP 62	WN 779	VGIV
<i>Candida albicans</i>	CFP 65	ATCC 90028	
<i>Candida krusei</i>	CFP 338	ATCC 6258	
<i>Candida parapsilosis</i>	CFO 64	ATCC 90018	

2.2 Extração de DNA das cepas cultivadas

Para a obtenção do DNA fúngico, realizamos a extração de DNA das colônias dos isolados utilizando *Yeast Genomic DNA Isolation Kit* (NORGEN BIOTEK CORPORATION®) específico para extração de DNA de levedura, seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante. A etapa de quebra enzimática por lyticase foi substituída por quebra mecânica utilizando Precellys® 24 (*Bertin Instruments*) com três ciclos de 40 segundos a 6000 rotações por minuto.

2.3 Desenho dos *primers*

Para o desenho dos *primers* de diferenciação das espécies de *Cryptococcus* spp. e suas variações, foi selecionada a região gênica da proteína PRP8, uma região altamente conservada relacionada ao maquinário *spliceossoma*. Esta região mostrou-se eficiente para estudos filogenéticos de alguns grupos de fungos patogênicos, como os fungos da ordem Onygenales (THEODORO et al., 2008; 2011; THEODORO & BAGAGLI, 2009; GARCES et al., 2020). Para este estudo foram utilizadas as sequências da região PRP8 das espécies de *Cryptococcus* depositadas no banco virtual (GenBank/NCBI), como apresentado na TABELA 1. Assim, foi realizado um estudo inicial da região gênica utilizando o *software* Augustus, estimando a distribuição e tamanho dos *introns* presentes. As regiões com presença destes *introns* foram utilizadas para o desenho dos *primers*, para a obtenção de fragmentos de diferentes tamanhos. O estudo *in silico* foi realizado utilizando o *software* MEGA X, onde as regiões foram alinhadas e analisadas manualmente. Os *primers* desenhados foram analisados quanto à sua especificidade e qualidade, considerando formação de dímeros e *hairpins*, utilizando as ferramentas *Primer-BLAST* e *OligoAnalyzer Tool*.

Amplamente distribuídos nas espécies fúngicas, especialmente em fungos da ordem Onygenales e em *Cryptococcus* sp. o *intein* PRP8 pode ser achado na forma de *mini-intein* ou *full-length-intein*, devido à ausência ou presença da *Homing-endonuclease* (HE), respectivamente. Este *intein* encontra-se inserido na proteína PRP8, que é a principal proteína dentro do *spliceossoma*,

sistema encarregado da retirada dos *introns* durante o *splicing* do RNA mensageiro. O *intein* PRP8 têm sido utilizados para fins diagnósticos mediante padrões de bandas em eletroforese (BUTLER; POULTER, 2005; PERLER, 2008; GARCIA GARCES; CORDEIRO; BAGAGLI, 2018).

Tabela 2. Número de depósitos no banco virtual (GenBank/NCBI) das espécies de *Cryptococcus* spp. utilizadas para o desenho de *primers*.

Espécie	Variedade	Cepa	Número de acesso NCBI
<i>Cryptococcus gattii</i>	NA	EJB2	ATAL01000259.1
<i>Cryptococcus gattii</i>	NA	MF34	VHDQ01000014.1
<i>Cryptococcus gattii</i>	NA	Ru294	ASCO01000021.1
<i>Cryptococcus gattii</i>	NA	WM1802	JACUVQ010000179.1
<i>Cryptococcus neoformans</i>	grubii	BK147	FWZN01000238.1
<i>Cryptococcus neoformans</i>	grubii	H99	XM_012191174.1
<i>Cryptococcus neoformans</i>	grubii	H99	NPNB01000014.1
<i>Cryptococcus neoformans</i>	grubii	RCT21	APKL01000007.1
<i>Cryptococcus neoformans</i>	neoformans	JEC21	XM_566595.2
<i>Cryptococcus neoformans</i>	neoformans	XL280alpha	CP072811.1
<i>Cryptococcus neoformans</i>	neoformans	B-3501A	AAEY01000001.1

2.4 Ensaios do Multiplex PCR

As amplificações para todas as regiões foram realizadas usando o termociclador Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, CA, EUA) e GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison USA), com volume total de 25µL.

A padronização do Multiplex foi realizada em duas etapas, sendo a primeira etapa, o teste de especificidade dos *primers* e a segunda, teste de padronização para o perfil ciclagem da reação de PCR.

Na primeira etapa, para o teste de especificidade, foram utilizadas as três espécies de *Candida* ssp. como o controle do agente negativo. Estes são considerados leveduras oportunistas e também é frequentemente associada a infecções hospitalares.

Na segunda etapa, foram realizados testes de gradiente de temperatura com 50°C, 51°C e 52°C para a determinação da melhor temperatura de *anelamento* e condições de ciclagem para os dois jogos de *primers* que foram empregados. A amplificação efetiva das espécies *Cryptococcus* foi verificada utilizando os DNAs extraídos das colônias anteriormente citadas.

Para a tentativa de otimização do ensaio de PCR também fora realizado um estudo de gradiente de DMSO, ajustado nos percentuais de 3%, 5% e 7,5%.

Após a amplificação, o produto de PCR foi submetido a corrida eletroforética em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio e colocado em cuba de eletroforese com tampão Tris-acetato-EDTA (0.5X) (Amresco®) para visualização sob a luz ultravioleta e fotodocumentação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Desenho de primers Multiplex PCR

Foram desenhados três *primers* na região PRP8: CryppRP8F (*primer* 1, 5'- GCG TTC AAG GAA GCT GGT ATT G -3'), CryppRP8R (*primer* 2, 5'- GTT GTT RAT ACC CTG ACA CC -3') e CryppRP8int (*primer* 3, 5'- TTC CCT AGT TGG RTC AAG -3'). Os *primers* foram analisados *in silico* quanto a sua especificidade pelo primer BLAST e quanto a formação de dímeros de primer utilizando *OligoAnalyzer™ Tool*, apresentando resultados satisfatórios em ambos aspectos.

A região gênica em que o *primer* foi desenhado, tal como o tamanho dos fragmentos dos *amplicons* do multiplex, estão representados na **Figura 1**. Nesta

é possível visualizar os três *primers* desenhados e os *amplicons* de diferentes tamanhos gerados nesta região polimórfica para cada uma das espécies do complexo. Assim, o conjunto dos *primers* 1-2 mostram amplificação de um fragmento de 315pb e 316pb em *C. neoformans* e *C. gatii* respectivamente, enquanto que amplificam fragmentos menores de 215pb em *C. grubii*, que não foi apresentada a região de *introns*. O conjunto de primers 3-2, amplificam apenas *C. neoformans* (129pb) e *C. grubii* (78pb), apresentando região polimórfica no *primer* 3 que impede o anelamento com *C. gatii*.

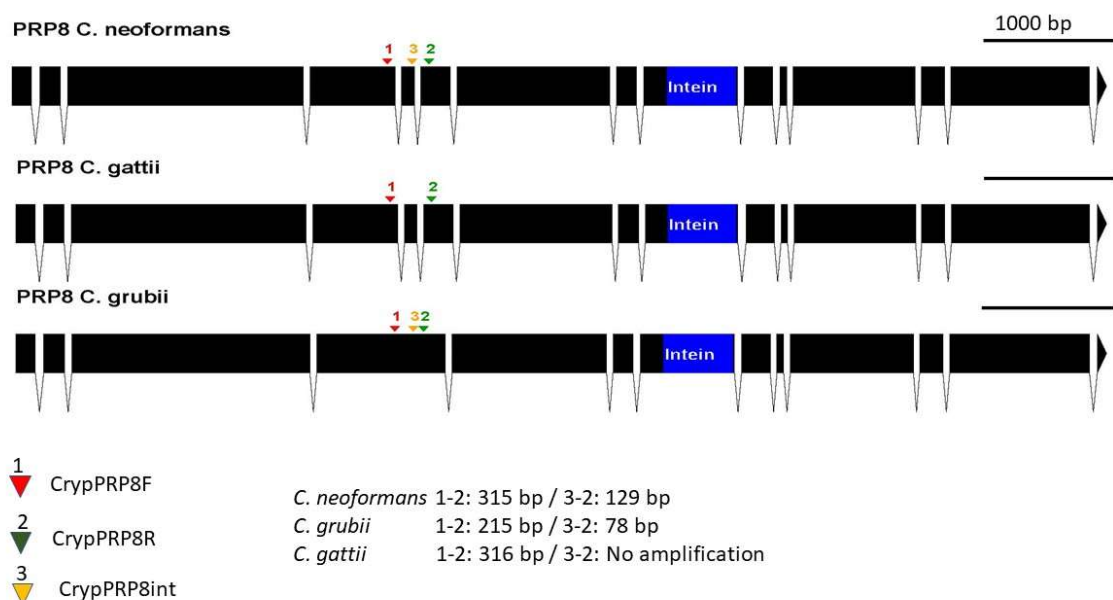


Figura 1: Representação esquemática dos primers desenhados na região gênica PRP8 nas espécies de *C. neoformans* var. *grubii*, *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. gatii*. Cada uma das setas coloridas demonstra um dos primers desenhados para o multiplex, com o tamanho de amplicons indicados no canto inferior-direito. As depressões em cada representação do gene indicam regiões de *introns*.

3.2 Ensaios do Multiplex PCR

Para início do ensaio do Multiplex PCR, utilizamos o perfil de ciclagem de desnaturação inicial de 95°C / 3 min; 35 ciclos de 95°C / 40 seg, 52°C / 40 seg e 72°C / 30 seg; e extensão final em 72°C por 5 min.

Os ensaios iniciais demonstraram resultados promissores quanto à especificidade, apresentando amplificações apenas para as espécies de *Cryptococcus*. Ambos conjuntos de primers não apresentaram nenhuma amplificação para as espécies de *Candida*, que serviram como controles negativos de especificidade dos primers desenhados.

Em relação ao tamanho dos *amplicons*, as bandas apresentaram tamanhos esperados de acordo com estudos *in silico*. Foi possível visualizar os diferentes tamanhos de fragmentos em gel de eletroforese, mesmo em *amplicons* com tamanhos relativamente próximos como no fragmento do conjunto de primers 3-2, de *C. neoformans* (129pb) e *C. grubii* (78pb) como demonstrado na **Figura 2**.

No ensaio inicial, as bandas dos primers 3-2 não ficaram muito evidentes, com a necessidade de testagem das ciclagens e temperaturas, para a determinação de melhores condições para ambos conjuntos. Assim, realizamos o teste de ciclagem com gradientes de temperatura que estão representados na **Figura 2**. A temperatura de anelamento não mostrou uma variação significativa nas bandas do conjunto de primer 3-2 obtidas.

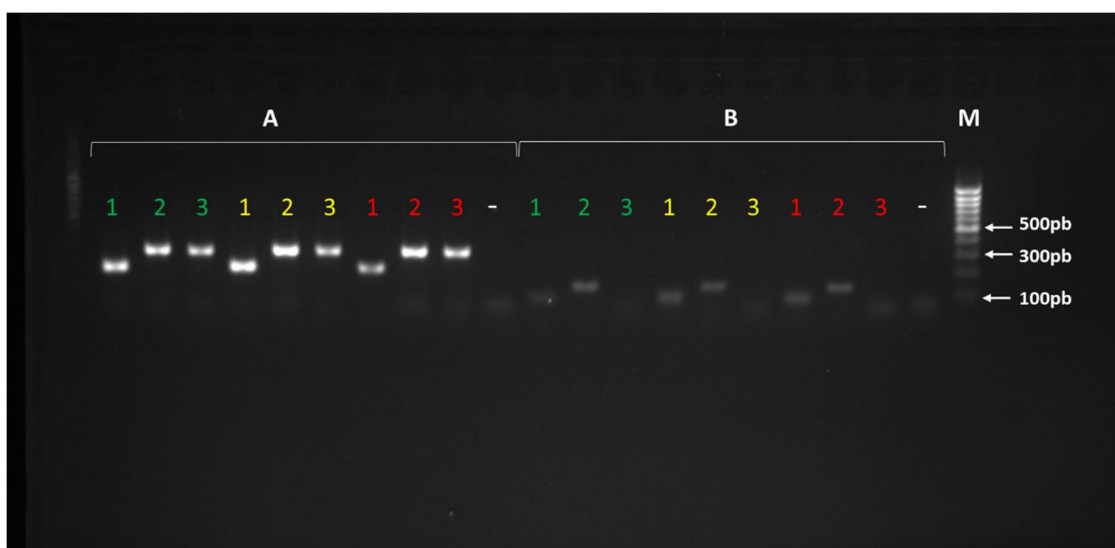


Figura 2. Resultado Multiplex-PCR. Teste de gradiente de temperatura para melhor resolução das bandas do Multiplex-PCR, representado em verde, 50°C; em amarelo, 51°C e em vermelho 52°C. A: primers 1 e 2, CrypPRP8F e CrypPRP8R, respectivamente; B: primers 3 e 2 (CrypPRP8int e CrypPRP8R, respectivamente). 1: *C. grubii*; 2: *C. neoformans*; 3: *C. gatti*.

Para a tentativa de melhoramento da amplificação do *primer 3-2*, testamos ainda, a adição de DMSO em diferentes concentrações. O DMSO sabidamente otimiza a reação de PCR quebrando as estruturas secundárias formados nos DNAs, que podem atrapalhar a reação de PCR . Aparentemente, esta adição demonstrou uma sutil melhora na visualização das bandas, mesmo em menores concentrações (**Figura3**). Ainda, a amostra de *C. gatii* não apresentou a problemática da falsa positividade que pode ocorrer com uso deste composto em maiores concentrações como descrito na literatura.

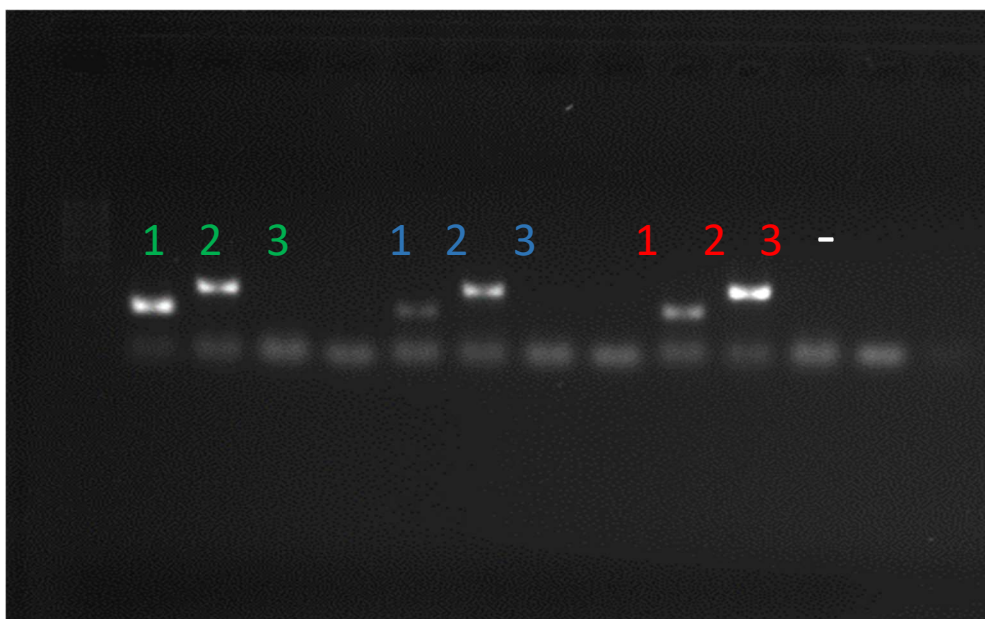


Figura 3. Teste de adição de DMSO em três gradientes para melhor resolução das bandas do Multiplex-PCR para o conjunto de primers 3 e 2 (CrypPRP8int e CrypPRP8R, respectivamente). Verde: 3% de DMSO, amarelo: 5% de DMSO e vermelho 7,5 % de DMSO. 1: *C. grubii*; 2: *C. neoformans*; 3: *C. gatii*. -: controle negativo.

A técnica de Multiplex PCR empregada para fins de diagnóstico, apresenta em geral baixa sensibilidade, o que impossibilita a aplicação direta de amostras clínicas, no entanto é uma ferramenta molecular de alta especificidade que proporciona ao avaliador em uma única reação detectar várias sequências de DNA alvo, obtendo respostas capazes de diferenciar um microrganismo dentro de um complexo de espécies relacionadas, podendo ser realizada para espécies de fungos filamentosos ambientais e até mesmo em pesquisa com leveduras do complexo *Cryptococcus*, contribuindo na diferenciação rápida a nível de espécie e identificação de focos primários de infecções (LEAL et al., 2008; SOUZA et al., 2013).

5. CONCLUSÃO

A PCR MULTIPLEX mostrou-se como uma técnica promissora, pois foi identificada uma região polimórfica que pode ser usada como marcadora; desta forma, padronizamos uma técnica de diferenciação para as espécies do complexo *Cryptococcus* sp, sendo possível chegar-se ao diagnóstico a nível de espécie com a utilização de apenas uma reação de PCR e sem a necessidade de sequenciamento. Sendo assim, verifica-se economia de tempo e de recursos para o diagnóstico específico e inequívoco da criptococose, além de contribuir para melhores esclarecimentos da epidemiologia do agente.

CAPÍTULO 2: Diagnóstico molecular diferencial da pitiose no Nordeste Brasileiro

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Pitiose e o oomiceto *Pythium insidiosum*

Os oomicetos são microrganismos pertencentes a um grupo diversificado de eucariotos em habitats terrestres, límnicos e marinhos em todo o mundo e são considerados em sua maioria patógenos vegetais devastadores (CHOI et al., 2017). Neste grupo existe uma grande diversidade de formas, variando desde saprófitos de vida livre, até patógenos oportunistas de plantas e animais (SAVORY et al., 2018).

O gênero *Phytophthora* com suas espécies se destacam. O patógeno *P. infestans*, amplamente conhecido por provocar a fome da batata na Irlanda em meados do século XIX (RISTAINO, 2002). Outros oomicetos como o *Aphanomyces invadans* e *Saprolegnia parasitica* são patógenos de peixes, causando graves prejuízos econômicos a piscicultura mundial (DEREVNINA et al., 2016a).

Os gêneros *Pythium* e *Saprolegnia* do filo Stramenopila são capazes de infectar animais, mas somente os oomicetos (*Pythium insidiosum*, *Pythium aphanidermatum* e espécies *Lagenidium*) foram relatados como causadores de infecções fatais ou de prognóstico ruim em seres humanos (GROOTERS et al., 2003; KRAJAEJUN et al., 2006; CALVANO et al., 2011; REINPRAYOON et al., 2013; FARMER et al., 2015; RUJIRAWAT et al., 2017). O gênero *Pythium* composto aproximadamente 120 espécies distribuídas em distintos habitats. Muitas são patógenos vegetais, enquanto outras são saprófitas do solo, ou parasitam insetos, mamíferos, algas ou peixes (MARTIN; LOPER, 1999). *P. insidiosum* é o único com capacidade de causar infecção em humanos e outros animais (GAASTRA et al., 2010).

A pitiose é uma doença de caráter crônico que acomete frequentemente equinos, humanos e os cães, tendo como agente o oomiceto *Pythium insidiosum*, considerado um pseudofungo devido suas características morfológicas, bioquímicas e moleculares (GAASTRA et al., 2010). Em termos taxonômicos, *P. insidiosum* pertence ao gênero *Pythium*, família Pythiaceae, ordem

Peronosporales, classe Oomycetes, filo Oomycota, reino Straminopila (ALEXOPOULOS et al., 1996; MCGOWAN; FITZPATRICK, 2017; PERMPALUNG; WORASILCHAI; CHINDAMPORN, 2019)

Após análise filogenética da região rDNA-ITS o gênero *Pythium* apresentou uma subdivisão das espécies relacionados a forma esporangial (globoso e filamentoso), distinguindo-o em 11 clados filogenéticos categorizados de A a K, alocando *P. insidiosum* no clado C juntamente com *P. grandisporangium*, um microrganismo isolado de substratos em ambientes marinhos (LÉVESQUE; DE COCK, 2004). Outros estudos da região rDNA-ITS revelaram que a espécie *P. insidiosum* está dividida em três clados genéticos que exibem um alto grau de isolamento geográfico (SCHURKO et al., 2003a).

Apesar da grande semelhança morfológica com os fungos, os oomicetos possuem características biológicas que os distinguem de vários outros microrganismos eucarióticos (KAMOUN, 2003; KWON-CHUNG, 1994). São organismos diploides, com hifas cenocíticas, a maioria são esteroides auxotróficos e sua membrana plasmática contém lipídios com e ácidos graxos de cadeia longa que substituem os esteróis. As paredes celulares da maioria consistem principalmente de 1,3-b-glucanos, alguns 1,6-b-glucanos e 1,4-b-glucanos (celulose) e hidroxiprolina. A quitina, que é um dos principais constituintes presentes na parede celular dos fungos, foi detectada em pequenas quantidades e em apenas alguns oomicetos, ainda, este falso-fungo apresenta uma característica bioquímica que se torna decisiva no tratamento da pitiose: a ausência da molécula de ergosterol em sua membrana plasmática. Esta molécula é comumente encontrada em fungos e é alvo da maioria dos agentes antifúngicos, o que torna o tratamento de pitiose ainda mais desafiador (LATIJNHOUWERS; DE WIT; GOVERS, 2003).

A pitiose é uma doença não transmissível de ocorrência esporádica (GAASTRA et al., 2010). Tem como forma infectante os zoósporos liberados pelos esporângios de *P. insidiosum* em ambiente aquático. Em observação microscópica os zoósporos são globosos a ovóides e apresentam dois flagelos, que possibilitam a locomoção dos mesmos até o seu encistamento, início do desenvolvimento de um tubo germinativo e posteriormente um filamento de hifa alongado após 24 h de incubação a 37°C (MENDOZA; HERNANDEZ; AJELLO,

1993). Cada esporângio pode conter de 4 a 20 zoósporos, que quando liberados possuem motilidade ativa por cerca de 10 a 60 minutos antes do encistamento e germinação (VANITTANAKOM et al., 2004).

1.2 Epidemiologia da pitiose

O primeiro caso de pitiose equina tenha foi relatado em 1884, porém somente em 1987, mais de um século depois, *Pythium insidiosum* foi descrito como agente etiológico da enfermidade. Conhecida em diferentes regiões por “bursatte”, “dermatite granular”, “hifomicose destruens equi”, “ficomicose”, “granuloma ficomicótico”, “câncer dos pântanos” (*swamp cancer*), ou ainda “Ferida Brava” e “Ferida da Moda” na região do Pantanal Mato-grossense (DE COCK et al., 1987; LEAL et al., 2001; GROOTERS et al., 2002; SANTURIO et al., 2006; GAASTRA et al., 2010) .

Existem casos descritos em várias partes no mundo, em destaques países localizados em regiões tropicais e subtropicais (MENDOZA; NEWTON, 2005; BOSCO et al., 2005; RIVIERRE et al., 2005; MACHADO; MARQUES et al., 2006; APPAVU; PRAJNA; GAASTRA et al., 2010; WEIBLEN; ESCOBAR, 2018; BERNHEIM et al., 2019; RAJAPANDIAN, 2020) . A Tailândia e o Brasil são os países que possuem maior prevalência de pitiose humana e equina, respectivamente (KRAJAEJUN et al., 2006; GAASTRA et al., 2010). No Brasil ocorre o contrário há muitos relatos de pitiose em animais, especialmente em equinos (REIS et al., 2003; SALLIS; PEREIRA; RAFFI, 2003; MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012; CARMO et al., 2015) , e cães (TORRES NETO et al., 2009; PEREIRA et al., 2010; FERNANDES et al., 2012; TORRES et al., 2014) e um único caso em humano (BOSCO et al., 2005; MARQUES et al., 2006). Acreditamos que em ambas as regiões ocorre falta de diagnóstico, uma vez que as condições ambientais são muito semelhantes e favoráveis ao desenvolvimento do patógeno.

A pitiose humana no sudeste da Ásia ocorre com grande incidência durante a estação chuvosa e verão e durante o pico de produção na lavoura de arroz, sendo mencionada como uma doença ocupacional aos agricultores (VANITTANAKOM; SZEKELY; KHANTHAWONG, 2014). Como grande parte da Tailândia consiste em pântanos, adequados ao ciclo de vida de *P. insidiosum*,

as pessoas que vivem nessas áreas têm maior probabilidade de entrar em contato com o patógeno e adquirir infecção. A doença em humanos apresenta altas taxas de mortalidade neste país, variando entre 36,4 a 40% (SERMSATHANASAWADI et al., 2015; KRAJAEJUN et al., 2006).

Apesar de apresentar distribuição global, os estudos epidemiológicos de exposição ao *P. insidiosum* na população em geral são escassos. No Brasil, casos de pitiose nos equinos são relatados em todas as regiões brasileiras, com maior prevalência no Pantanal Mato-grossense, com relação direta com o período das chuvas (LEAL et al., 2001). Em um estudo observou-se prevalência de 12,5%, com variação de incidência mensal de 5,88 a 28,57%, taxa de mortalidade média de 5,88%, e letalidade 45,45% (SANTOS; SANTURIO; MARQUES, 2011). Estudos que evidenciam o desfecho da pitiose equina são raros, em uma análise retrospectiva na qual relata o atendimento clínico-cirúrgico de 28 casos de pitiose equina atendidos junto ao Serviço de Cirurgia de Grandes Animais, do Hospital Veterinário da FMVZ/Unesp, Botucatu, verificou-se que quanto mais distal a lesão nos membros, pior é o prognóstico para essa espécie animal (WATANABE et al., 2015).

Outras espécies animais também apresentaram diagnóstico confirmado para pitiose no Brasil, como os bovinos, cuja incidência média anual foi de 0,22% sem relato de óbito (SANTOS; SANTURIO; MARQUES, 2011), sendo relatado três surtos de pitiose bovina (GABRIEL et al., 2008; GRECCO et al., 2009; KONRADT et al., 2016). Dois surtos de pitiose ovina (TABOSA et al., 2004), e em quatro surtos os animais realizaram pastoreio em águas estagnadas, como lagos artificiais, rios e açudes nas regiões dos estudos (TABOSA et al., 2004; GABRIEL et al., 2008; GRECCO et al., 2009; KONRADT et al., 2016).

1.3 A importância econômica da pitiose equina no Brasil

Com o quarto maior rebanho equino do mundo o Brasil possui mais de cinco milhões de cabeças, segundo dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), com distribuição entre as regiões do Brasil, Sudeste (1.373.299), Nordeste (1.340.456), Centro-Oeste (1.140.957), Norte

(981.739) e Sul (915.347) (IBGE, 2018). Sendo as maiores prevalências no Pantanal Matogrossense com relação direta com o período das chuvas (outubro-março) (LEAL et al., 2001), e nos Pampas do Rio Grande do Sul, acarretando prejuízos significativos (MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012; WEIBLEN et al., 2015). No semiárido do Brasil, entre as dermatopatias mais frequentemente diagnosticadas em equídeos, a pitiose foi a doença de pele com maior frequência, representando 24,38% dos casos diagnósticos (PESSOA et al., 2014). No Rio Grande do Sul a pitiose representou 16,5% dos casos (63/435) (MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012).

Na pitiose bovina as perdas econômicas são menores pois os bovinos apresentam cura espontânea com remissão total das lesões entre três semanas a três meses, sem qualquer registro de perda de escore corporal. Nos equinos, no entanto as lesões que inicialmente são circunscritas, à medida que cronificam tornam-se elípticas com superfície central projetada, friáveis e com secreções serosanguinolentas, apresentando focos necróticos com extração de *kunkers* com dois a 20mm. Os sintomas podem evoluir, em três a sete meses, para grave caquexia que normalmente antecede as mortes, apresentando taxas de letalidade de 45,45% (SANTOS; SANTURIO; MARQUES, 2011).

Desta forma, quando a doença não é diagnosticada e tratada precocemente, as perdas econômicas podem ser maiores pois devido a virulência da pitiose em equinos o animal geralmente vem a óbito, ou em alguns casos torna-se necessário a eutanásia (REIS et al., 2003; BANDEIRA et al., 2009; SOUTO et al., 2016). Além disso, as chances de recidivas são descritas na literatura (REIS et al., 2003), aumentando os custos com o tratamento veterinário, que em muitos casos é longo, chegando a 12 meses (MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012).

1.4 Sinais clínicos

As infecções causadas por *P. insidiosum* em equinos afetam principalmente os tecidos cutâneos e subcutâneos. As lesões normalmente são únicas e localizadas nas porções distais dos membros, principalmente dos posteriores e na região ventral do abdômen caracterizadas por seu crescimento lento,

insidioso e de forma circular, formando grandes granulomas ulcerados com até 50 cm de diâmetro (SALLIS; PEREIRA; RAFFI, 2003; MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012; WATANABE et al., 2015).

Exclusivamente na espécie equina, há a formação de material necrótico cinza-amarelado, denominado de “*kunkers*”, presentes nos tecidos e fístulas de drenagem com tamanhos variando deste um grão de arroz a 20 mm. Essas estruturas são formadas pela degranulação de eosinófilos sobre as hifas invasivas de *P. insidiosum*. Novos eosinófilos degranulam sobre os velhos e a massa estrutural cresce em tamanho. Nos casos de pitiose crônica, o único local onde as hifas de *P. insidiosum* podem ser encontradas é dentro dos *kunkers* (CHAFFIN; SCHUMACHER; MCMULLAN, 1995; LEAL et al., 2001; GAASTRA et al., 2010).

A pitiose equina é uma doença altamente pruriginosa com caquexia progressiva dos animais acometidos (REIS et al., 2003). Formas incomuns foram relatadas, com envolvimento ósseo (ALFARO; MENDOZA, 1990), intestinal (ALLISON; GILLIS, 1990; BROWN; ROBERTS, 1988) e pulmonar (GOAD, 1984). A doença disseminada nesta espécie animal foi relatada em três casos crônicos no Brasil acometendo diversos órgãos, como glândula mamária, fígado, pulmão, septos nasais, nódulos linfáticos e baço (REIS et al., 2003).

Em humanos as principais formas de manifestações clínicas da doença são cutânea/subcutânea, vascular, ocular e disseminada (KRAJAEJUN et al., 2006; PERMPALUNG; WORASILCHAI; CHINDAMPORN, 2019). As lesões são caracterizadas por edema crônico, nódulo e úlcera infiltrativa granulomatosa, em especial nos membros inferiores (BOSCO et al., 2005; KRAJAEJUN et al., 2006). As principais características clínicas nos casos de pitiose vascular variaram de claudicação a ulceração gangrenosa, úlcera crônica, necrose nos dedos dos pés, massa pulsátil e isquemia aguda dos membros. Outros sintomas verificados são febre, parestesia, prurido, vesícula/bolha, úlcera cutânea, celulite, edema nas pernas, ausência de pulso arterial, massa na virilha (aneurisma ilíaco ou femoral) e massa abdominal (aneurisma da aorta) (KRAJAEJUN et al., 2006; SERMSATHANASAWADI et al., 2015). Na Tailândia, a pitiose vascular em humanos, apresenta determinada predisposição em pacientes com anemia hemolítica crônica, e têm a beta-talassemia a doença subjacente mais comum

(PUPAIBOOL et al., 2006; SERMSATHANASAWADI et al., 2015). Nos acometimentos oculares os enfermos geralmente apresentam úlcera de córnea ou queratite, assim como dor, irritação, diminuição da acuidade visual, fotofobia, edema palpebral, infiltrados corneanos e hipópio (HASIKA et al., 2019; KRAJAEJUN et al., 2006)..

Os cães são a segunda espécie animal mais acometida, e a doença é caracterizada pelo desenvolvimento de lesões cutâneas/subcutâneas e/ou gastrointestinais (PEREIRA et al., 2010). Cães com pitiose gastrointestinal desenvolvem espessamento segmentar focal ou multifocal grave e/ou massas granulomatosas expansíveis envolvendo o estômago, intestino delgado, cólon, reto e, algumas vezes esôfago. Os sinais clínicos associados incluem perda de peso, vômitos, diarreia, hematoquesia, tenesmo, disquesia, perda de peso, dor abdominal, aumento dos linfonodos mesentéricos, múltiplos nódulos firmes no reto e no cólon descendente e, raramente na próstata (JAEGER; ROTSTEIN; LAW, 2002; RODRIGUES et al., 2006; BERRYESSA et al., 2008; TROST et al., 2009; PEREIRA et al., 2010; FERNANDES et al., 2012; REAGAN et al., 2019;). A forma gastrointestinal é frequentemente fatal, pois a localização e extensão da lesão frequentemente impedem a ressecção cirúrgica completa (BERRYESSA et al., 2008; REAGAN et al., 2019; TROST et al., 2009). A pitiose cutânea e/ou subcutânea é segunda forma mais relatada em cães, com lesões ulceradas e pruriginosas na derme, febre e linfadenopatia (GROOTERS, 2003; TORRES NETO et al., 2009; PEREIRA et al., 2010; OLDENHOFF et al., 2014; TORRES et al., 2014) .

Em outras espécies animais, a pitiose já foi relatada em bovinos, ovinos e caprinos. Nos bovinos as lesões cutâneas são caracterizadas por edemas perilesionais, claudicações (SANTOS; SANTURIO; MARQUES, 2011), ou lesões ulceradas, apresentando inicialmente pequenas áreas alopecicas e deprimidas de aspecto hemorrágico que ao evoluírem tornam-se áreas ulceradas, úmidas, hiperêmicas ou hemorrágicas, de tamanhos variados, podendo chegar a 15cm no seu eixo maior, que desaparecem espontaneamente no período máximo de 90 dias (GRECCO et al., 2009; SANTOS; SANTURIO; MARQUES, 2011; KONRADT et al., 2016).

Em ovinos os sinais clínicos incluem aumento de volume e úlceras na região do vestíbulo nasal, com presença de secreção serosanguinolenta bilateral, fístula oronasal, aumento dos linfonodos retrofaríngeos, anorexia, epistaxe leve e intermitente, e acentuada deformidade nasal (SILVA et al., 2007; SANTURIO et al., 2008; CARRERA et al., 2013). A forma gastrointestinal foi relatada em dois cordeiros (PESSOA et al., 2012). No estado da Paraíba foi relatado o primeiro caso de pitiose em caprinos. O animal que tinha acesso a ambiente aquático, apresentou claudicação e perda de peso associados a uma lesão cutânea ulcerativa, exsudativa e pruriginosa no membro posterior esquerdo (CARMO et al., 2015).

A pitiose é considerada rara em felinos domésticos (GROOTERS, 2003), embora já tenha sido relatada em quatro gatos com massas cutâneas e subcutâneas após levantamento de casos no Laboratório de Diagnóstico Médico Veterinário da Louisiana (DUNCAN et al., 1992). Também fora relatada em um caso apresentando massa nasal e retrobulbar (BISSONNETTE et al., 1991), um caso com massa sublingual (FORTIN; CALCUTT; KIM, 2017) e dois casos com pitiose intestinal (RAKICH; GROOTERS; TANG, 2005). Um estudo recente revelou um caso incomum em felino com apresentação clínica de grande lesão cutânea ulcerativa, pruriginosa, redonda e de rápido crescimento causadas por *P. insidiosum* (DOWST et al., 2019).

Em animais selvagens, infecções por *P. insidiosum* foram relatadas causando massa abdominal em um tigre de Bengala (*Panthera tigris tigris*) na Flórida (BUERGELT; POWE; WHITE, 2006), e massa multilobular com fibrose extensa e numerosos focos necróticos no lobo esquerdo do pulmão em uma onça-pintada (*Panthera onca*) na América Central (CAMUS; GROOTERS; AQUILAR, 2004). Em camelídeos foram relatados quatro casos até o momento, um causando pitiose gástrica em um camelo (*Bactrianus camelus*) mantido em cativeiro (HECK et al., 2018), dois dromedários (*Camelus dromedarius*) com pitiose vulvar com emagrecimento progressivo (VIDELA et al., 2012), e um caso de um dromedário (*C. dromedarius*) que desenvolveu pitiose cutânea, gástrica e linfática (WELLEHAN et al., 2004).

Em aves, a pitiose foi relatada causando ulcerações multifocais na pele das asas, pescoço, cabeça e membros de uma caraúna-de-cara-branca (*Plegadis*

chihî) na Califórnia (PESAVENTO et al., 2008) e em um avestruz (*Struthio camelus*) no Brasil com disfagia causada pela obstrução da mucosa do esôfago (SOUTO et al., 2019).

1.5 Diagnóstico laboratorial

A pitiose é uma doença subdiagnosticada, levando a alta mortalidade quando tratada como infecções fúngicas que não respondem adequadamente às terapias tradicionais (MARQUES et al., 2006; HILTON et al., 2016). Embora o diagnóstico diferencial seja crucial, muitos laboratórios não dispõem das técnicas de cultura necessárias para identificar o patógeno e o rápido crescimento bacteriano de amostras com infecção bacteriana secundária acabam em muitos casos impedindo o isolamento de *P. insidiosum* (GROOTERS et al., 2002).

Para o diagnóstico da pitiose são utilizadas as técnicas de cultivo, histopatologia, imuno-histoquímica, sorologia e técnicas moleculares (GEE, 2002; BOSCO et al., 2005; RAKICH; GROOTERS; TANG, 2005; GAASTRA et al., 2010; GROOTERS; LOHNOO et al., 2019).

O método convencional de identificação de *Pythium* spp. é baseado na morfologia do estágio anamórfico e na produção de zoósporos. No entanto, esse método é minucioso, demorado e inespecífico para *P. insidiosum*, pois além de utilizar técnicas de manipulação e cultura que aumentam as chances de isolamento do agente etiológico, o diagnóstico bem-sucedido de pitiose baseado em cultura depende da identificação subsequente do patógeno, que compartilha características morfológicas (hifas largas, hialinas e esparsadamente septadas) semelhantes a fungos. Além disso, a produção de zoósporos biflagelados é compartilhado por outras espécies de *Pythium*, bem como por membros dos gêneros *Phytophthora* e *Lagenidium* (GROOTERS et al., 2002a).

P. insidiosum apresenta bom crescimento microbiológico em meios de cultura como, em ágar fubá e ágar Sabouraud dextrose, ágar-chocolate, o ágar-sangue e ágar infusão de cérebro e coração (MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996; VANITTANAKOM et al., 2004). Não é verificado crescimento de *P.*

insidiosum em ágar Mycosel®, devido aos antimicrobianos presentes em sua formulação, principalmente a ciclohexamida (VANITTANAKOM et al., 2004).

As observações da cultura revelaram o rápido crescimento dos isolados em vários meios, tanto a 37 quanto a 28°C. Microscopicamente, os organismos produziram hifas hialinas a esbranquiçadas, cenocíticas com ramos largos em ângulo agudo e esparsamente septados com um diâmetro das hifas de 4 a 10 µm, micélio aéreo curto, e sem produção de esporos (BOSCO et al., 2008).

As lesões histológicas causadas por *P. insidiosum* se caracterizaram por reação piogranulomatosa com áreas centrais de necrose, com granulomas infiltrados e/ou circundados por eosinófilos, acompanhados de um menor número de neutrófilos, macrófagos epitelióides, plasmócitos e células gigantes multinucleadas (TROST et al., 2009). Os cortes apresentam bons resultados quando corados pela técnica de metenamina nitrato de prata de Grocott (GMS), com visualização das hifas com ramificações irregulares, raras septações e diâmetro de 4-10µm (RAKICH; GROOTERS; TANG, 2005; TROST et al., 2009) e não apresentam boa coloração com hematoxilina-eosina (HE) (SUPABANDHU et al., 2008; TROST et al., 2009).

As características histológicas de *P. insidiosum* são semelhantes à lagenidiose (*Lagenidium giganteum*) e fungos das ordens Entomophthorales e Mucorales do filo Zygomycota, apesar de serem causadas por organismos filogeneticamente distintos, tornando-as difíceis de distinguir das hifas destes microrganismos apenas pela análise morfológica (KAUFMAN, 1998; GROOTERS et al., 2002; GROOTERS, 2003; MENDOZA; PRASLA; AJELLO, 2004).

Para o estudo de doenças infecciosas e neoplásicas em animais, a imuno-histoquímica é uma ferramenta auxiliar de diagnóstico devido a sua alta especificidade e sensibilidade, utilizada para detectar e identificar vários elementos fúngicos em tecidos fixados em formol (GALIZA et al., 2014). A imunohistoquímica é uma boa técnica para o diagnóstico de pitiose, pois combina a histopatologia com o uso de anticorpos mono ou policlonais, no entanto, reações cruzadas com fungos Entomophthorales e Mucorales podem ocorrer (GROOTERS, 2003).

O diagnóstico sorológico pode ser realizado por imunodifusão e ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), frequentemente utilizados no diagnóstico de pitiose humana (KRAJAEJUN et al., 2002). Em 2002 foi padronizada a técnica ELISA específica para pitiose canina (GROOTERS et al., 2002b) para monitorar a resposta imunológica à terapia médica ou cirúrgica nesta espécie (GROOTERS et al., 2002b; BERRYESSA et al., 2008; HUMMEL et al., 2011; PEREIRA et al., 2013), posteriormente modificada para o diagnóstico sorológico em felinos (RAKICH; GROOTERS; TANG, 2005). Foi desenvolvido um teste imunocromatográfico utilizando a proteína bacteriana A/G, para detectar IgGs anti-*P. insidiosum* em humanos e animais (cães, cavalos, coelhos e bovinos). Os testes proporcionaram 100% de especificidade, e 90,6% de sensibilidade (INTARAMAT et al., 2016).

Muitos estudos demonstraram a identificação molecular de *P. insidiosum* a partir da amplificação da região ITS-5.8S (*Internal Transcribed Spacer*) do DNA ribossomal, e posterior sequenciamento genético (BOSCO et al., 2005; GRANT et al., 2016; PEREIRA et al., 2013; REIS et al., 2003). O desenvolvimento de técnicas moleculares específicas para detecção de *P. insidiosum* iniciou-se em 2002 com a padronização de uma nested-PCR utilizando a região rDNA-ITS (GROOTERS; GEE, 2002). Posteriormente foi proposta uma nested-PCR em único tubo com amplificação de regiões da subunidade 18S do gene rRNA de *P. insidiosum* (THONGSRI et al., 2013).

Em 2015 foi proposta uma qPCR (*quantitative real-time PCR*) padronizada para a detecção de *P. insidiosum* utilizando iniciadores moleculares derivados da região gênica *exo-1,3-b-glucanase* (PinsEXO1). Foram utilizadas 29 amostras clínicas de humanos, quatro isolados ambientais e duas amostras provenientes de animais (01 equino e 01 larva de mosquito) (KEERATIJARUT et al., 2015).

A técnica de qPCR é um excelente método para o diagnóstico de patógenos, pois possui a capacidade de detectar e quantificar os ácidos nucleicos em uma ampla gama de amostras clínicas (BUSTIN et al., 2009). O processo de detecção na qPCR é o principal diferencial em relação aos demais ensaios de PCR, pois não necessita de manipulação pós-amplificação, devido os sinais fluorescentes serem diretamente detectados à medida que a amplificação do DNA ocorre, e os

resultados são obtidos em uma hora, ou menos, com alta sensibilidade e especificidade (ESPY et al., 2006; MACKAY, 2004).

Em 2017 houve a padronização de uma PCR-multiplex (RUJIRAWAT et al., 2017) utilizando os iniciadores moleculares universais para fungos ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990), juntamente com iniciadores moleculares anti-sense sintetizados durante a pesquisa, que proporcionaram a identificação de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) na região do rDNA, e a identificação das amostras de acordo com os clados filogenéticos de *P. insidiosum* (RUJIRAWAT et al., 2017).

Também merece destaque a padronização da qPCR-HRM (*High Resolution Melting-curve*) que realiza a diferenciação de isolados de *P. insidiosum* em clados filogenéticos a partir da amplificação da subunidade II do gene mitocondrial do citocromo c oxidase (COX II) (WORASILCHAI; PERMPALUNG; CHINDAMPORN, 2018). A *High Resolution Melting-curve* (HRM) foi desenvolvida em 2002 pela Universidade de Utah (USA) e a empresa Idaho Technology (USA), cuja finalidade é a amplificação do DNA na presença de corante intercalante, emitindo a fluorescência durante a formação controlada do *amplicon*. Este processo resulta em uma curva de dissociação (*melting*), que depende principalmente do conteúdo de guanina e citosina (GC), comprimento e a sequência do produto de PCR. Está é uma técnica simples e econômica que pode ser usada para genotipagem ou detecção de *SNP's* sem a necessidade de sequenciamento (REED; WITTWER, 2004; ERALI; VOELKERDING; WITTWER, 2008) .

Por eliminar etapas, como a nested-PCR, eletroforese e sequenciamento genético, e ser realizada em uma única reação, a qPCR-HRM está sendo utilizada para a distinção de diferentes agentes etiológicos (CHENG et al., 2006), incluindo os fungos da ordem Mucorales (HRNCIROVA et al., 2010), *Cryptococcus* spp. (GAGO et al., 2011), *Candida* spp. (ARANCIA et al., 2011; DUYVEJONCK et al., 2015), *Alternaria* spp. (GARGANESE et al., 2018), *Fonsecaea* spp. (SHI et al., 2018), e diferenciação das espécies do complexo *Trichophyton mentagrophytes* (SUN et al., 2016). A qPCR também foi utilizada para identificação de 18 espécies de fungos, utilizando as regiões ITS1 e ITS2 (LU et al., 2017).

Em 2018 foi padronizada a técnica de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* - análise de restrição por tamanho do fragmento) empregando a amplificação termofílica de DNA da helicase (thDA), que utiliza as ações das helicases para separar a fita dupla de DNA e polimerases de DNA para a síntese de novas fitas sem o uso de termocicladores. O ensaio utilizada iniciadores moleculares derivados da COX II para amplificar DNA de *P. insidiosum* e outros microrganismos semelhantes, e a enzima de restrição CviKI-1 para diferenciá-los (WORASILCHAI et al., 2018).

1.5.1 Diagnósticos diferenciais para pitiose equina

Massas cutâneas são comuns na espécie equina, e em vários casos o agente etiológico não é definido, salientando a importância de técnicas laboratoriais robustas para um diagnóstico definitivo (AXON; ROBINSON; LUCAS, 2004; SCHWARZ; BURFORD; KNOTTENBELT, 2009). Espera-se que o diagnóstico precoce e preciso minimize as taxas de mortalidade da pitiose a partir da instauração imediata do tratamento correto (CHAREONSIRISUTHIGUL et al., 2013).

Em estudo retrospectivo realizado no Laboratório de Diagnóstico Veterinário da Oregon, *State University* analisou-se dados sobre lesões cutâneas nodulares e proliferativas em cavalos, burros e mulas durante 3,5 anos. Foram identificadas 116 lesões nodulares e proliferativas não neoplásicas, compreendendo 18% de todas as lesões estudadas. As principais causas diagnosticadas foram tecido de granulação exuberante, granuloma eosinofílico, granuloma fúngico, cistos e habronemose constituindo 91% das lesões não neoplásicas em equinos (VALENTINE, 2005).

Casos de pitiose inicialmente diagnosticados e tratados como infecções fúngicas são descritos na literatura (MENDOZA; PRASLA; AJELLO, 2004; BOSCO et al., 2005; MARQUES et al., 2006;). Em Minas Gerais, Brasil, foi relatado o caso em uma égua com uma lesão na região inguinal do membro posterior direito, apresentando um curso clínico de, aproximadamente, 10 meses de evolução, nos quais, durante os seis primeiros meses foi tratado apenas para

habronemose cutânea. Nos últimos quatro meses o animal recebeu imunoterapia para *P. insidiosum* após diagnóstico clínico, apresentando melhora clínica no final do tratamento, no entanto, o animal emagreceu, abortou e, posteriormente, foi a óbito (MACIEL et al., 2008).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras

Cinco amostras clínicas de lesões de equinos sugestivas de pitiose (*kunkers*), foram obtidas de equinos de cinco estados do Nordeste brasileiro. Cada amostra individual de tecido (n = 5) foi colhida de animal diferente que exibiu uma lesão cutânea granulomatosa característica. As amostras foram acondicionadas em frasco coletor universal ou tubo falcon, ambos de 50mL, contendo salina (0,9%) e cloranfenicol (50µg/mL) e enviadas para serem processadas no Laboratório de Micologia Médica, Setor de Microbiologia, do Instituto de Biociências/UNESP. A origem das amostras, a localização da lesão e os demais dados dos animais podem ser conferidos na **Tabela 1**.

Tabela 1. Dados referentes à amostras clínicas de equinos com lesões sugestivas de pitiose provenientes de cinco Estados do Nordeste brasileiro.

Animal	Raça	Idade	Sexo	Origem	Localização da lesão
1	SRD	2 anos	Macho	Mossoró, Rio Grande do Norte	Região abdominal
2	SRD	2 anos	Macho	Presidente Dutra, Maranhão	Membro torácico esquerdo
3	SRD	3 anos	Macho	Paulista, Pernambuco	Região abdominal
4	SRD	3 anos	Macho	Palmeira dos Índios, Alagoas	Membro pélvico esquerdo
5	SRD	3 anos	Fêmea	João Pessoa, Paraíba	Região dorsal

Para verificar a presença de *P. insidiosum*, todas as amostras foram submetidas a cultura microbiológica com posterior detecção molecular das colônias crescidas e também à detecção molecular diretamente dos tecidos.

2.2 Cultura microbiológica

Pequenos fragmentos de amostras de tecido e *kunkers* foram lavados cerca de cinco vezes em salina (0,9%) e cloranfenicol (50µg/mL) com auxílio do vórtex

e na última lavagem incubadas na mesma solução por 30 minutos a 37°C. Depois disso, as amostras foram inoculadas em ágar Sabouraud e incubadas a 37°C, sendo acompanhadas diariamente para observar o crescimento. Culturas que apresentavam aspectos macroscópicos semelhantes a *P. insidiosum* foram isoladas para detecção molecular.

Figura 1. Lesões equinas das quais foram extraídas as amostras clínicas para o estudo.



d – *kunkers* em solução antibiótica estéril.

2.3 Extração de DNA

A extração do DNA ocorreu diretamente das amostras de tecido (*kunkers*) dos animais lesionados e das colônias isoladas em ágar Sabouraud (SAB). As amostras, após as lavagens, foram fragmentadas e ressuspensas em tampão de lise dando início a extração de DNA conforme proposto por Van Burik et al. (1998), utilizando o kit comercial NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel, Alemanha). O DNA foi eluído em 100 µL de tampão de eluição (proveniente do Kit) e armazenado a -20°C. Para análise da concentração e qualidade do DNA adotamos o critério de análise por espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare®) em comprimento de onda de 260 nm (ZHANG et al. 2009).

2.4 Nested-PCR

Após a extração, as amostras foram submetidas à amplificação utilizando os iniciadores moleculares ITS1 (50-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-30) e ITS2P (50-TCCTCCGCTTATTGATGATGC-30), e em seguida, foi realizada nova amplificação empregando-se os iniciadores moleculares específicos *Pi1* (5'-

TTCGTCGAAGCGGACTGCT-3') e *Pi2* (5'-GCCGTACAACCCGAGAGTCATA-3') para *P. insidiosum* (GROOTERS & GEE, 2002). Foram utilizados como controle positivo, DNA de isolado da coleção de *P. Insidiosum* (Eq 16) do Laboratório de Micologia Médica, Setor de Microbiologia, do Instituto de Biociências/UNESP e como controle negativo água ultrapura.

Para a primeira amplificação, as reações foram realizadas em microtubos de 0,2 mL com volumes totais de 25 µL, contendo 10ng de DNA genômico, 1 µL de cada *primer* (diluição de 10pmol/µL), 7,5 µL de água ultrapura e 12,5µL de GoTaq® Green Master Mix (Promega). A incubação foi realizada em termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf), seguindo as seguintes condições cíclicas: desnaturação inicial a 95°C durante 3min, 32 ciclos de desnaturação a 95°C durante 30s, *anelamento* a 57°C por 30s, extensão a 72°C durante 30s e extensão final a 72°C durante 10min.

Para a segunda amplificação, as reações foram realizadas nas mesmas condições que descritos acima, utilizando 10ng do produto da primeira amplificação e os primers específicos da espécie. A incubação sofreu algumas modificações: desnaturação inicial a 94°C durante 3min, 28 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30s, *anelamento* a 65°C durante 30s, extensão a 72°C durante 30s e extensão final a 72°C durante 10min.

A visualização do material amplificado foi avaliada por corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5%. Foram utilizados 5µL do material amplificado e como marcador de peso molecular 5µL de 100pb *ladder* (Invitrogen). A corrida eletroforética foi realizada em cuba horizontal contendo TBE 1X (89 mM Tris-HCl, 89 mM ácido bórico e 20 mM EDTA) por 12 minutos na voltagem 80V seguida de 20 minutos a 120V. Após o término da corrida o gel foi visualizado em transluminador de luz UV e a imagem capturada pelo sistema de documentação digital (VisionWorks® LS Analysis Software).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Diagnóstico Tradicional: Cultura microbiológica

Houve crescimento microbiológico somente da amostra proveniente do animal 2, da região de Presidente Dutra, Maranhão, o que representa 20% dos casos submetidos a diagnóstico, tendo sido confirmado por diagnóstico molecular do DNA extraído da cultura isolada e do material genético dos *kunkers*. Após ser submetida ao Nested-PCR para detecção do agente, amplificou um fragmento de 105 pb, específico de *P. insidiosum*.

Em 80% das amostras de *kunkers* recebidas e cultivadas não foi possível diagnóstico convencional, nem mesmo PCR simples, pois não houve isolamento microbiológico, apenas crescimento bacteriano resultante de contaminação secundária, mesmo após as lavagens com solução antibiótica. Isso provavelmente aconteceu devido o período entre a coleta e o processamento do material clínico no laboratório.

3.2 Diagnóstico molecular diferencial

Detectamos resultado positivo em quatro das cinco amostras dos animais acometidos (4/5), o que representa 80% das amostras recebidas, sendo apenas a amostra 4 negativa para *P. insidiosum* por Nested-PCR.

Na **Figura 2**, podemos observar as bandas formadas no gel na utilização dos primers *Pi1* e *Pi2*, com *amplicons* de 105pb.

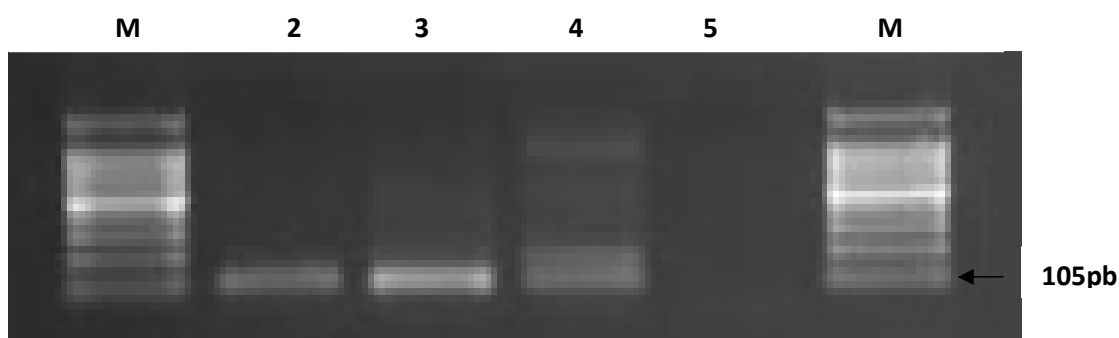


Figura 4. Amplificação da segunda reação de nested-PCR com DNA extraído diretamente de *kunkers* de lesões de equinos utilizando *primers* *Pi1* e *Pi2*, específico para *P. insidiosum*. 2. Amostra proveniente de Mossoró/RN e 3. Paulista/PE,. 4. Controle positivo, 5. controle negativo. Água ultrapura

Tabela 2. Amostras clínicas de equinos do Nordeste brasileiro com lesões granulomatosas e seus respectivos resultados;

Animal	Material	Cultura	Nested-PCR <i>P. insidiosum</i>
1	<i>kunkers</i>	-	+
2	<i>kunkers</i>	+	+
3	tecido e <i>kunkers</i>	-	+
4	tecido e <i>kunkers</i>	-	-
5	<i>kunkers</i>	-	+

(+) resultado positivo; (-) resultado negativo

A detecção molecular de *P. insidiosum* em 80% das amostras suspeitas e o crescimento microbiológico em apenas 20%, sugere que a Nested-PCR seria a técnica mais efetiva para fins de diagnóstico. 60% (3/5) não teriam o diagnóstico correto da doença caso fosse submetido somente ao cultivo microbiológico e isolamento. Esta técnica altamente sensível se mostra efetiva e importante para o diagnóstico da pitiose e uma ótima ferramenta para estudos epidemiológicos da doença. O diagnóstico por meio do cultivo microbiológico e até mesmo por meio de PCR tradicional que depende da cultura pura, fica comprometido de acordo com o tempo entre a coleta da amostra e seu processamento no laboratório, que pode propiciar o crescimento de contaminantes e até mesmo inviabilizar o patógeno ali presente. Dessa forma nossos resultados reforçam a importância do diagnóstico diferencial por nested-PCR para pitiose, principalmente para animais que se encontram em regiões afastadas (ZNAJDA et al, 2002; PESAVENTO et al, 2008; BOTTON et al, 2011). Além disso, a identificação morfológica do patógeno é trabalhosa e requer

conhecimento especializado. Para esse tipo de identificação, é necessário induzir a produção de estruturas reprodutivas *in vitro*, havendo dificuldades para tal (SCHURKO et al, 2003). A detecção molecular de casos de pitiose no Nordeste do Brasil são resultados inéditos, não havendo estudos do agente em equinos nos estados dessa região aqui representados.

O diagnóstico eficaz e rápido é fundamental para a recuperação dos equinos suspeitos da doença. No entanto, as técnicas clássicas de diagnóstico, como cultivo microbiológico e a histopatologia, apresentam limitações, geralmente levando dias a semanas para o resultado final (GROOTERS, 2003). Dentre os métodos disponíveis para o diagnóstico de doenças infecciosas, os moleculares são sem dúvida o que apresentam melhor desempenho em relação a sensibilidade, precisão e rapidez (ESPY et al., 2006). Alguns autores mencionam erros que podem acontecer na PCR devido a pequena quantidade de hifas presentes no tecido coletado (ZNAJDA et al. 2002). Apesar disso, nosso resultado sugere que a sensibilidade do Nested-PCR é maior ao cultivo microbiológico, técnica usualmente empregada no diagnóstico tradicional.

O diagnóstico diferencial da pitiose equina envolve algumas doenças de origem infecciosa, como a habronemose, o sarcóide equino e a papilomatose. No Nordeste brasileiro, a anamnese, os achados clínicos e histopatológicos, e raramente o cultivo microbiológico, costumam ser os únicos utilizados para a confirmação da pitiose. No entanto, é importante ressaltar que o diagnóstico errôneo pode resultar em um tratamento não eficaz para o animal ou até mesmo a eutanásia devido a não recuperação do paciente, o que reforça a importância de investimentos em técnicas moleculares frente a ocorrência de casos de pitiose nessa região (MENDOZA et al. 1985; CHAFFIN et al. 1995; LÓPEZ-SANROMÁN et al. 2000; AXON et al. 2004; MACIEL et al. 2008,).

Solicitações de exames inconclusivos, suspeitas clínicas equivocadas, casos de falso-negativos no cultivo microbiológico e a ausência do amparo de técnicas moleculares na região geram subnotificação da pitiose no Nordeste do Brasil. Neste contexto a Nested-PCR ganha mais destaque por ser uma técnica que não necessita o sucesso do cultivo microbiológico nem do posterior sequenciamento para obter o diagnóstico, pois pode ser realizada diretamente

de uma amostra do tecido acometido, como descrito no surto de pitiose equina no Sudeste brasileiro por PAZ et al. (2021).

A pitiose configura-se como um problema de saúde pública eminente. Estudos realizados na Tailândia, evidenciaram a ocorrência dessa enfermidade em trabalhadores agrícolas que residem em áreas pantanosas, gerando lesões subcutâneas, inflamações crônicas dos vasos sanguíneos, ceratite, aneurismas e gangrena (THONGSRI et al. 2013, RUJIRAWAT et al. 2018). O que pode justificar de certo modo a maior ocorrência de pitiose humana na Tailândia é a maior presença de indivíduos com talassemia, fator predisponente para o desenvolvimento das lesões por *P. insidiosum* (THONGSRI et al. 2013). Assim como as doenças fúngicas, as doenças oomíóticas são frequentemente negligenciadas por profissionais de saúde, e, embora alguns trabalhos ressaltem a problemática de infecções negligenciadas no Brasil e no mundo, curiosamente não citam ou incluem a pitiose nesse grupo (KWON-CHUNG, 1994; BROWN et al. 2012) .

4. CONCLUSÃO

Apesar do baixo número de amostras, este apresenta-se como um estudo inicial e instigante para a investigação molecular do *P. insidiosum* na região Nordeste, que até então se encontrava inexistente. Nosso estudo demonstrou que técnicas moleculares de diagnóstico são mais sensíveis para detecção do patógeno. Dessa forma, apoiamos a necessidade de novos estudos mais avançados a partir deste, a fim de notificar todas as regiões brasileiras acometidas pela pitiose e investigar a variabilidade genética do agente circulante no Brasil. O monitoramento da ocorrência de casos juntamente com estudos para esta espécie a nível nacional é ainda inexistente; entretanto, análises como estas são imprescindíveis para estabelecer a distribuição espacial de *P. insidiosum* e assim notificar áreas de riscos para os animais acometidos no Brasil.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS- ABNT. 2023.

ALFARO, A. A.; MENDOZA, L. Four cases of equine bone lesions caused by *Pythium insidiosum*. **Equine Veterinary Journal**, v. 22, n. 4, p. 295–297, 1990.

ALLISON, N.; GILLIS, P. J. Enteric pythiosis in a horse. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 196, n. 3, p. 462–464, 1990.

APPAVU, S. P.; PRAJNA, L.; RAJAPANDIAN, S. G. K. Genotyping and phylogenetic analysis of *Pythium insidiosum* causing human corneal ulcer. **Medical mycology**, v. 58, n. 2, p. 211–218, 2020.

ARANCIA, S. et al. Rapid, simple, and low-cost identification of *Candida* species using high-resolution melting analysis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 69, n. 3, p. 283–285, 2011.

AXON, J. E.; ROBINSON, P.; LUCAS, J. Generalised granulomatous disease in a horse. **Australian Veterinary Journal**, v. 82, n. 1–2, p. 48–51, 2004.

AZEVEDO, M. I. et al. Phylogenetic relationships of Brazilian isolates of *Pythium insidiosum* based on ITS rDNA and cytochrome oxidase II gene sequences. **Veterinary Microbiology**, v. 159, n. 1–2, p. 141–148, 2012.

BANDEIRA, A. M. P. et al. Pitiose equina no estado de Sergipe, Brasil. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 12, n. 1/2/3, p. 46–54, 2009.

BARRANTES-MURILLO, D. et al. Rinitis piogranulomatosa asociada a *Conidiobolus coronatus* en un caballo: reporte de caso. **Revista Ciencias Veterinarias**, v. 34, n. 2, p. 115–127, 2016.

BERNHEIM, D. et al. Pythiosis: case report leading to new features in clinical and diagnostic management of this fungal-like infection. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 86, p. 40–43, 2019.

BERRYESSA, N. A. et al. Gastrointestinal pythiosis in 10 dogs from California. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, p. 1065–1069, 2008.

BEYT JR, Bernard E.; WALTMAN, Stephen R. Cryptococcal endophthalmitis after corneal transplantation. **New England Journal of Medicine**, v. 298, n. 15, p. 825-826, 1978.

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.

BLOOMFIELD, Norman; GORDON, Morris A.; ELMENDORF JR, DuMont F. Detection of *Cryptococcus neoformans* antigen in body fluids by latex particle agglutination. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 114, n. 1, p. 64-67, 1963.

BONGOMIN, F., GAGO, S., OLADELE, R. O., & DENNING, D. W. (2017). Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. **Journal of fungi**, 3(4), 57.

BOSCO, S. DE M. G. et al. Human Pythiosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 5, p. 715–718, 2005.

BOSCO, S. DE M. G. et al. Morphological and molecular characterization of an equine isolate of *Pythium insidiosum* and comparison with the first human isolate from the same geographic region. **Medical Mycology**, v. 46, p. 557–565, 2008.

BOVERS, M., DIAZ, M.R., HAGEN, F., SPANJAARD, L., DUIM, B., VISSER, C.E., et al. Identification of genotypically diverse *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates by Luminex xMAP technology. **J. Clin. Microbiol.** v. 45, n. 6, p. 1874– 1883, 2007. doi:10.1128/JCM.00223-07.

BRATTON, EMILY W. ET AL. Comparison and temporal trends of three groups with cryptococcosis: HIV-infected, solid organ transplant, and HIV-negative/non-transplant. 2012.

BROWN, C. C.; ROBERTS, E. D. Intestinal pythiosis in a horse. **Australian**

veterinary journal, v. 65, n. 3, p. 88–89, 1988.

BROWN, G. D. et al. Hidden killers: Human fungal infections. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 165, p. 1–10, 2012.

BRUM, J. S.; SOUZA, T. M.; BARROS, C. S. L. Aspectos epidemiológicos e distribuição anatômica das diferentes formas clínicas do sarcoide equino no Rio Grande do Sul: 40 casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 10, p. 839–843, 2010.

BRUNS, T. D.; WHITE, T. J.; TAYLOR, J. W. Fungal molecular systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 22, p. 525–564, 1991.

BUERGELT, C.; POWE, J.; WHITE, T. Abdominal pythiosis in a bengal tiger (*Panthera Tigris Tigris*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 37, n. 2, p. 186–189, 2006.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of Quantitative Real-Time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.

BUTLER, M. I.; POULTER, R. T. The PRP8 inteins in *Cryptococcus* are a source of phylogenetic and epidemiological information. **Fungal Genet Biol**, v. 42, n. 5, p. 452– 63, maio 2005.

CALVANO, T. P. et al. *Pythium aphanidermatum* infection following combat trauma. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 10, p. 3710–3713, 2011.

CAMARGO, Jose F. Donor-derived infections in solid organ transplant recipients: Challenging the 30-day paradigm. **Transplant Infectious Disease: an Official Journal of the Transplantation Society**, v. 19, n. 2, 2017.

CAMUS, A. C.; GROOTERS, A. M.; AQUILAR, R. F. Granulomatous pneumonia caused by *Pythium insidiosum* in a central American jaguar, *Panthera onca*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 16, n. 6, p. 567–571, 2004.

CANAVARI, I. C., VARGAS, G. H., TINUCCI-COSTA, M., & CAMPLESI, A. C. (2017). Criptococose: revisão de literatura. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, v. 18, n.9, p. 1-5, 2017.

CARMO, P. M. S. et al. Cutaneous pythiosis in a goat. *Journal of Comparative Pathology*, v. 152, n. 2–3, p. 103–105, 2015.

CARRERA, M. V. et al. Pitiose em ovinos nos estados de Pernambuco e Bahia. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, v. 33, n. 4, p. 476–482, 2013.

CARRIJO, A. V., CARRIJO, B. V., MACHADO, L. N., DE ALMEIDA, R. J., & DE OLIVEIRA, P. P. C. Análise clínico-epidemiológica de criptococose em indivíduos com hiv: uma revisão sistemática. *Brazilian Applied Science Review*, v. 5, n. 2, p. 802-817, 2021.

CASADEVALL, Arturo; PERFECT, John R. *Cryptococcus neoformans*. Washington, DC: ASM press, 1998.

CHAFFIN, M. K.; SCHUMACHER, J.; MCMULLAN, W. C. Cutaneous pythiosis in the horse. *The Veterinary clinics of North America. Equine practice*, v. 11, n. 1, p. 91–103, 1995.

CHAREONSIRISUTHIGUL, T. et al. Performance comparison of immunodiffusion, enzyme-linked immunosorbent assay, immunochromatography and hemagglutination for serodiagnosis of human pythiosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 76, n. 1, p. 42–45, 2013.

CHENG, J. et al. Rapid detection and identification of clinically important bacteria by High-Resolution Melting Analysis after broad-range ribosomal RNA Real-Time PCR. *Clinical Chemistry*, v. 52, n. 11, p. 1997–2004, 2006.

CHOI, Y. et al. Towards a universal barcode of oomycetes – a comparison of the cox 1 and cox 2 loci. *Molecular Ecology Resources*, v. 15, n. 6, p. 1275–1288, 2017

COSTA, A.K., SIDRIM, J.J., CORDEIRO, R.A., BRILHANTE, R.S.N., MONTEIRO, A.J., AND ROCHA, M.F. Urban pigeons (*Columba livia*) as a

potential source of pathogenic yeast: a focus on antifungal susceptibility of *Cryptococcus* strains in Northeast Brazil. **Mycopathologia**, v. 169, n. 3, p 207-213, 2010 . doi:10.1007/s11046-009-9245-1.

DANESI, P. et al. Molecular identity and prevalence of *Cryptococcus* spp. nasal carriage in asymptomatic feral cats in Italy. **Medical mycology**, 2014, 52.7: 667-673.

DARZÉ C., LUCENA R., GOMES I. & MELO A. 2000. Características clínicas laboratoriais de 104 casos de meningoencefalite criptocócica. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 33(1):21-26.

DE COCK, A. W. A. M. et al. *Pythium insidiosum* sp. nov., the etiologic agent of pythiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 344–349, 1987.

DE MATOS, M. P., DE SOUZA, A. P., SILVA, A. B., DE FIGUEIREDO SEABRA, P. R., & OLIVEIRA, L. N. (2020). Análises retrospectivas de mortalidade por micoses: artigo de revisão. *Referências em Saúde da Faculdade Estácio de Sá de Goiás-RRS-FESGO*, 3(01), 100-105.

DEMING, M. et al. Cognitive biases and knowledge deficits leading to delayed recognition of cryptococcal meningitis. **IDCases**, v. 18, p. e00588, 2019.

DEREVNINA, L. et al. Emerging oomycete threats to plants and animals. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 371, n. 1709, p. 20150459, 2016.

DIAMOND, RICHARD D.; BENNETT, JOHN E. Prognostic factors in cryptococcal meningitis: a study in 111 cases. **Annals of internal medicine**, v. 80, n. 2, p. 176-181, 1974.

DO CARMO, F. N., DE CAMARGO FENLEY, J., GARCIA, M. T., ROSSONI, R. D., JUNQUEIRA, J. C., DE BARROS, P. P., & SCORZONI, L. (2022). *Cryptococcus* spp. and Cryptococcosis: focusing on the infection in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1-17.

DOWST, M. et al. An unusual case of cutaneous feline pythiosis. **Medical**

Mycology Case Reports, v. 26, n. September, p. 57–60, 2019.

DUNCAN, D. et al. Cutaneous pythiosis in four cats. **Veterinary pathology**, v. 29, n. 5, p. 429, 1992.

DUYVEJONCK, H. et al. Validation of High Resolution Melting Analysis (HRM) of the amplified ITS2 region for the detection and identification of yeasts from clinical samples: Comparison with culture and MALDI-TOF based identification. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–16, 2015.

ELNIFRO, E. M., ASHSHI, A. M., COOPER, R. J., & KLAPPER, P. E. *Multiplex PCR: Optimization and Application in Diagnostic Virology*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 13, n. 4, p. 559-570, 2000. doi:10.1128/cmr.13.4.559-570.2000.

EMMONS, Chester W. et al. Saprophytic sources of *Cryptococcus neoformans* associated with the pigeon (*Columba livia*). **American Journal of Hygiene**, v. 62, n. 3, 1955.

ERALI, M.; VOELKERDING, K. V; WITTEWER, C. T. High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 85, n. 1, p. 50–58, 2008.

ESPY, M. J. et al. Real-Time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 165–256, 2006

FARMER, A. R. et al. Combat-related *Pythium aphanidermatum* invasive wound infection: case report and discussion of utility of molecular diagnostics. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 6, p. 1968–1975, 2015.

FERNANDES, C. P. M. et al. Gastric pythiosis in a dog. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 29, n. 4, p. 235–237, 2012.

FIGUEIREDO, T. P. et al. Antifungal susceptibility testing and genotyping characterization of *Cryptococcus neoformans* and *gattii* isolates from HIV-infected patients of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 58, 2016.

FIRMINO, M. DE O. et al. Sarcoide associado à infecção por *Habronema* spp.

em equinos no Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, n. Suppl 1, p. 160, 2016.

FÖRSTER, H. et al. Sequence analysis of the small subunit ribosomal RNAs of three zoosporic fungi and implications for fungal evolution. **Mycologia**, v. 82, n. 3, p. 306–312, 1990.

FORTIN, J. S.; CALCUTT, M. J.; KIM, D. Y. Sublingual pythiosis in a cat. **Acta Veterinaria Scandinavica**, p. 1–5, 2017.

FRENCH, D. D.; HAYNES, P. F.; MILLER, R. I. Surgical and medical management of rhinophycomycosis (conidiobolomycosis) in a horse. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 186, n. 10, p. 1105–1107, 1985.

FURLAN, F. H. et al. Conidiobolomicose causada por *Conidiobolus lamprauges* em ovinos no Estado de Santa Catarina. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 30, n. 7, p. 529–532, 2010.

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

GABRIEL, A. L. et al. Surto de pitiose cutânea em bovinos. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 28, n. 12, p. 583–587, 2008.

GAFFI. Global Fund for Fungal Infections. 2018. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/52059/2/TD_36.pdf> Acesso em: 3 de ago 2022.

GAGO, S. et al. High-Resolution Melting Analysis for identification of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* complex. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 10, p. 3663–3666, 2011.

GALIZA, G. J. N. et al. Utilização de três métodos imuno-histoquímicos na detecção de aspergilose e zigomicose em animais 1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 7, p. 637–642, 2014.

GARCIA GARCES, H., HAMAE YAMAUCHI, D., THEODORO, R. C., & BAGAGLI, E. PRP8 intein in Onygenales: distribution and phylogenetic aspects. *Mycopathologia*, v. 185, n.1, p. 37-49, 2020.

GARCIA GARCES, H., HRYCYK, M. F., GIACOBINO, J., CAPELA MACHADO, G., DOMINGOS ARANTES, T., THEODORO, R. C., BOSCO, S.M.G., BAGAGLI, E. Molecular identification and phylogenetical analysis of dermatophyte fungi from Latin America. *Mycoses*, v.59, n.12, p.787-797, 2016.

GARCIA GARCES, H.; CORDEIRO, R. T.; BAGAGLI, E. PRP8 intein in dermatophytes: Evolution and species identification. *Med Mycol*, v. 56, n. 6, p. 746–758, 1 ago. 2018

GARGANESE, F. et al. A new high-resolution melting assay for genotyping *Alternaria* species causing citrus brown spot. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 12, p. 4578–4583, 2018.

GIACOMAZZI, J., BAETHGEN, L., CARNEIRO, L. C., MILLINGTON, M. A., DENNING, D. W., COLOMBO, A. L., In Association with the LIFE Program. (2016). **The burden of serious human fungal infections in Brazil. *Mycoses***, 59(3), 145-150.

GLASER, Jordan B.; GARDEN, Adam. Inoculation of cryptococcosis without transmission of the acquired immunodeficiency syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 313, n. 4, p. 266, 1985.

GOAD, M. E. P. Pulmonary pythiosis in a horse. **Veterinary pathology**, v. 21, n. 2, p. 261–262, 1984.

GRACIELE-MELO, C. et al. Use of Polymerase chain reaction for *Cryptococcus neoformans* genome detection in cerebrospinal fluid for neu

GRANT, D. et al. Cutaneous pythiosis in a Red Brangus beef calf cured by immunotherapy. **Medical Mycology Case Reports**, v. 14, n. November, p. 1–3, 2016.

GRECCO, F. B. et al. Pitiose cutânea em bovinos na região Sul do Rio Grande

do Sul1. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 29, n. 11, p. 938–942, 2009.

GROOTERS, A. M. et al. Clinicopathologic findings associated with *Lagenidium* sp. infection in 6 dogs: Initial description of an emerging oomycosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 17, n. 5, p. 637–646, 2003.

GROOTERS, A. M. Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. **The Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v. 33, p. 695–720, 2003.

GROOTERS, A. M.; GEE, M. K. Development of a nested polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Pythium insidiosum*. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 16, n. 2, p. 147–152, 2002.

GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A. M. Developments in fungal taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 3, p. 454–500, 1999.

GUILLOT, J. et al. Two cases of equine mucormycosis caused by *Absidia corymbifera*. **Equine Veterinary Journal**, v. 32, n. 5, p. 453–456, 2000.

GUSHIKEN, Alexis C.; SAHARIA, Kapil K.; BADDLEY, John W. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics**, v. 35, n. 2, p. 493–514, 2021

HASIKA, R. et al. *Pythium* keratitis in South India: incidence, clinical profile, management, and treatment recommendation. **Indian Journal of Ophthalmology**, v. 67, p. 42–47, 2019.

HECK, L. C. et al. Gastric pythiosis in a bactrian camel (*Bactrianus Camelus*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 49, n. 3, p. 784–787, 2018.

HILTON, R. E. et al. Swamp cancer: a case of human pythiosis and review of the literature. **British Journal of Dermatology**, v. 175, n. 2, p. 394–397, 2016.

HONSHO, C. S. et al. Generalized systemic cryptococcosis in a dog after immunosuppressive corticotherapy. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, p. 155–159, 2003.

HRNCIROVA, K. et al. Rapid detection and identification of mucormycetes from culture and tissue samples by use of high-resolution melt analysis. **Journal of**

Clinical Microbiology, v. 48, n. 9, p. 3392–3394, 2010.

HUMBER, R. A. Entomophthoromycota: a new phylum and reclassification for entomophthoroid fungi. **Mycotaxon**, v. 120, p. 477–492, 2012.

HUMBER, R. A.; BROWN, C. C.; KORNEGAY, R. W. Equine zygomycosis caused by *Conidiobolus lamprauges*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 573–576, 1989.

HUMMEL, J. et al. Successful management of gastrointestinal pythiosis in a dog using itraconazole, terbinafine, and mefenoxam. **Medical Mycology**, v. 49, p. 539–542, 2011.

Huston, S.M., and Mody, C.H. Cryptococcosis: an emerging respiratory mycosis. **Clin. Chest Med.** v. 30, n. 2, p. 253–264, 2009. doi:10.1016/j.ccm.2009.02.006. PMID:19375632.

IBRAHIM, A. S. Host cell invasion in Mucormycosis: role of iron. **Current Opinion in Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 406–411, 2011.

INTARAMAT, A. et al. Protein A/G-Based immunochromatographic test for serodiagnosis of pythiosis in human and animal subjects from Asia and Americas. **Medical Mycology**, v. 54, n. 6, p. 641–647, 2016.

ITO-KUWA, S., NAKAMURA, K., AOKI, S., & VIDOTTO, V. (2007). Serotype identification of *Cryptococcus neoformans* by multiplex PCR. **Mycoses**, 50(4), 277-281.

IYER KR, REVIE NM, FU C, ROBBINS N, COWEN LE. Treatment strategies for cryptococcal infection: challenges, advances and future outlook. **Nat Rev Microbiol.** v. 19, n.7, p. 454-466, 2021. doi: 10.1038/s41579-021-00511-0.

JAEGER, G. H.; ROTSTEIN, D. S.; LAW, J. M. Prostatic pythiosis in a dog. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 16, p. 598–602, 2002.

JARVIS, Joseph N. et al. Evaluation of a novel point-of-care cryptococcal antigen test on serum, plasma, and urine from patients with HIV-associated cryptococcal meningitis. **Clinical infectious diseases**, v. 53, n. 10, p. 1019-1023, 2011.

JUDELSON, H. S. Dynamics and innovations within oomycete genomes: Insights into biology, pathology, and evolution. **Eukaryotic Cell**, v. 11, n. 11, p. 1304–1312, 2012.

KAMMARNJESADAKUL, P. et al. Phylogenetic analysis of *Pythium insidiosum* Thai strains using cytochrome oxidase II (COX II) DNA coding sequences and internal transcribed spacer regions (ITS). **Medical Mycology**, v. 49, p. 289–295, 2011.

KAMOUN, S. Molecular genetics of pathogenic Oomycetes. **Eukaryotic Cell**, v. 2, n. 2, p. 191–199, 2003.

KANJANAVIROJKUL, Nipa; SRIPA, Chongrak; PUAPAIROJ, Anucha. Cytologic diagnosis of *Cryptococcus neoformans* in HIV-positive patients. *Acta cytologica*, v. 41, n. 2, p. 493-496, 1997.

KAUFMAN, L. *Penicilliosis marneffei* and pythiosis: emerging tropical diseases. **Mycopathologia**, v. 143, p. 3–7, 1998.

KEERATIJARUT, A. et al. Detection of the oomycete *Pythium insidiosum* by real-time PCR targeting the gene coding for exo-1 , 3- b -glucanase. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, p. 971–977, 2015.

KNOTTENBELT, D. .; PASCOE, R. R. **Afecções e distúrbios do cavalo**. São Paulo: Manole, 1998.

KNOTTENBELT, D. C. A suggested clinical classification for the equine sarcoid. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 4, n. 4, p. 278–295, 2005.

KON, A. S. et al. Consenso em criptococose – 2008. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Uberaba, v. 41, n. 5, p. 524-544, 2008

KONRADT, G. et al. Pythiosis in calves: an epidemiologic, pathologic, serologic and molecular characterization. **Medical Mycology Case Reports**, v. 14, p. 24–26, 2016.

KORENEK, N. L. et al. Treatment of mycotic rhinitis with itraconazole in three horses. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 8, n. 3, p. 224–227, 1994.

KRAJAEJUN, T. et al. Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 5, p. 569–576, 2006.

KROCKENBERGER, Mark B. et al. Pathogenesis of pulmonary *Cryptococcus gattii* infection: a rat model. *Mycopathologia*, v. 170, n. 5, p. 315-330, 2010.

KUROKAWA, Cilmary Suemi; SUGIZAKI, Maria Fatima; PERAÇOLI, Maria Terezinha Serrão. Virulence factors in fungi of systemic mycoses. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 40, n. 3, p. 125-136, 1998.

KWON-CHUNG, K. J. Phylogenetic spectrum of fungi that are pathogenic to humans. **Clinical Infectious Diseases**, v. 19, n. Suppl 1, p. S1–S7, 1994.

KWON-CHUNG, K. J. Taxonomy of fungi causing mucormycosis and entomophthoromycosis (zygomycosis) and nomenclature of the disease: Molecular mycologic perspectives. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. SUPPL. 1, p. S8–S15, 2012.

Kwon-Chung, K. J., Fraser, J. A., Doering, T. L., Wang, Z. A., Janbon, G., Idnurm, A., & Bahn, Y. S. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 4, n. 7, 2014.

LARSSON, Carlos Eduardo et al. Criptococose canina: relato de caso. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 55, n. 5, p. 533-538, 2003.

LATIJNHOUWERS, M.; DE WIT, P. J. G. M.; GOVERS, F. Oomycetes and fungi: Similar weaponry to attack plants. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 462–469, 2003.

LATIJNHOUWERS, M.; DE WIT, P. J. G. M.; GOVERS, F. Oomycetes and fungi: Similar weaponry to attack plants. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 462–469, 2003.

LEAL, A. B. M. et al. Pitiose equina no pantanal brasileiro: aspectos clínico-patológicos de casos típicos e atípicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 4, p. 151–156, 2001.

Leal, A. L., Faganello, J., Bassanesi, M. C., and Vainstein, M. H. Cryptococcus species identification by multiplex PCR. **Med. Mycol.** v. 46, p. 377–383, 2008. doi: 10.1080/13693780701824429

Leaw, S.N., Chang, H.C., Sun, H.F., Barton, R., Bouchara, J.P., and Chang, T.C. Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions. **J. Clin. Microbiol.** v. 44, n. 3, p. 693–699, 2006. doi:10.1128/JCM.44.3.693-699.2006. PMID:16517841.

LEE, Li-Na et al. Diagnosis of pulmonary cryptococcosis by ultrasound guided percutaneous aspiration. *Thorax*, v. 48, n. 1, p. 75-78, 1993.

LERKSUTHIRAT, T. et al. The Elicitin-like glycoprotein, ELI025, is secreted by the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum* and evades host antibody responses. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0118547, 2015.

LESTER, S.J; MALIK, R.; BARLETT, K.H. Cryptococcosis: update and emergence of *Cryptococcus gattii*. *Veterinary clinical pathology*, v. 40, n. 1, p. 4-17, 2011.

LÉVESQUE, C. A.; DE COCK, A. W. A. M. Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. **Mycological Research**, v. 108, n. 12, p. 1363–1383, 2004.

LOHNOO, T. et al. Seroprevalence of anti-*Pythium insidiosum* antibodies in the Thai population. **Medical Mycology**, v. 57, n. 3, p. 284–290, 2019.

LÓPEZ-SANROMÁN, J. et al. Case report cutaneous mucormycosis caused by *Absidia corymbifera* in a horse. **Veterinary Dermatology**, v. 11, p. 151–155, 2000.

LU, S. et al. Dynamic time warping assessment of high- resolution melt curves provides a robust metric for fungal identification. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. 1–21, 2017.

LUNARDI, M. et al. Bovine Papillomavirus type 13 DNA in equine sarcoids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 7, p. 2167–2171, 2013.

MACHADO, G.; WEIBLEN, C.; ESCOBAR, L. E. Potential distribution of *Pythium*

insidiosum in Rio Grande do Sul, Brazil, and projections to neighbour countries. **Transboundary Emerging Diseases**, v. 65, n. 6, p. 1–9, 2018.

MACIEL, I. C. DE F. et al. Pitiose fatal em equino tratado inicialmente para habronemose cutânea. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36, n. 3, p. 293–297, 2008.

MACKAY, I. M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, n. 3, p. 190–212, 2004.

MALABONGA, Vic M.; BASTI, Jeffrey; KAMHOLZ, Stephan L. Utility of bronchoscopic sampling techniques for cryptococcal disease in AIDS. *Chest*, v. 99, n. 2, p. 370-372, 1991.

MALIK, R.; KROCKENBERGER, M.; O'BRIEN, C.R. et al. Criptococosis. In.: GREENE, C.E. (Ed). *Infectious diseases of the dog and the cat*. 3.ed. St. Louis: Saunders, 2006. p.584-598.

MARCOLONGO-PEREIRA, C. et al. Epidemiologia da pitiose equina na região sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 32, n. 9, p. 865–868, 2012.

MARQUES, S. A. et al. *Pythium insidiosum*: relato do primeiro caso de infecção humana no Brasil. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 81, n. 5, p. 483–485, 2006.

MARTIN, F. N.; LOPER, J. E. Soilborne plant diseases caused by *Pythium* spp.: ecology, epidemiology, and prospects for biological control. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 18, n. 2, p. 111–181, 1999.

MARTINS, M.A.; SANTOS, D.C.S; ARAÚJO, M.R.; REGINA, S. Criptococose: Atualização e análise de dados laboratoriais sobre a frequência de *Cryptococcus gattii* no Estado de São Paulo numa série temporal de 11 anos. *Boletim Epidemiológico Paulista*, 2017; 14(157):01-10.

MAZIARZ, Eileen K.; PERFECT, John R. Cryptococcosis. *Infectious Disease Clinics*, v. 30, n. 1, p. 179-206, 2016.

MCCARTHY, C. G. P.; FITZPATRICK, D. A. Phylogenomic reconstruction of the Oomycete phylogeny derived from 37 genomes. **mSphere**, v. 2, n. 2, p. e00095-17, 2017.

MCCARTHY, M. W. & WALSH, T. J. Drug development challenges and strategies to address emerging and resistant fungal pathogens. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, v.15, n. 6, p. 577–584, 2017.

MCGOWAN, J.; FITZPATRICK, D. A. Genomic, network, and phylogenetic analysis of the oomycete effector arsenal. **mSphere**, v. 2, n. 6, p. e00408-17, 2017

MCGOWAN, J.; FITZPATRICK, D. A. Genomic, network, and phylogenetic analysis of the oomycete effector arsenal. **mSphere**, v. 2, n. 6, p. e00408-17, 2017.

MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia. Roca: Rio de Janeiro, 2016.

MENDOZA, L. et al. Human fungal pathogens of Mucorales and Entomophthorales. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 5, n. a019562, p. 1–33, 2015.

MENDOZA, L.; AJELLO, L.; MCGINNIS, M. R. Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 6, n. 4, p. 151–164, 1996.

MENDOZA, L.; ALFARO, A. A. Equine subcutaneous zygomycosis in Costa Rica. **Mykosen**, v. 28, n. 11, p. 545–549, 1985.

MENDOZA, L.; HERNANDEZ, F.; AJELLO, L. Life cycle of the human and animal oomycete pathogen *Pythium insidiosum*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 11, p. 2967–2973, 1993.

MENDOZA, L.; NEWTON, J. C. Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum*. **Medical Mycology**, v. 43, p. 477–486, 2005.

MENDOZA, L.; PRASLA, S. H.; AJELLO, L. Orbital pythiosis: a non-fungal disease mimicking orbital mycotic infections, with a retrospective review of the literature. **Mycoses**, v. 47, p. 14–23, 2004.

MENDOZA, L.; PRASLA, S. H.; AJELLO, L. Orbital pythiosis: a non-fungal disease mimicking orbital mycotic infections, with a retrospective review of the literature. **Mycoses**, v. 47, p. 14–23, 2004.

Meya, D. B., Kiragga, A. N., Nalintya, E., Morawski, B. M., Rajasingham, R., Park, B. J., ... & Boulware, D. R. Reflexive laboratory-based cryptococcal antigen screening and preemptive fluconazole therapy for cryptococcal antigenemia in HIV-infected individuals with CD4< 100 cells/μL: a stepped-wedge, cluster-randomized trial. **Journal of acquired immune deficiency syndromes (1999)**, v. 80, n. 2, p. 182, 2019.

Meyer, W., Aanensen, D. M., Boekhout, T., Cogliati, M., Diaz, M. R., Esposto, M. C., et al. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Med. Mycol.** v. 47, p. 561–570, 2009. doi: 10.1080/13693780902953886.

MILLER, R. I. Investigations into the biology of three “phycomycotic” agents pathogenic for horses in Australia. **Mycopathologia**, v. 81, p. 23–28, 1983.

MILLER, R. I.; CAMPBELL, R. S. F. Clinical observations on equine phycomycosis. **Australian Veterinary Journal**, v. 58, n. June, p. 221–226, 1982.

MILLER, R.; POTT, B. Phycomycosis of the horse caused by *Basidiobolus haptosporus*. **Australian Veterinary Journal**, v. 56, p. 224–227, 1980.

MÜLLER, M.; NISHIZAWA, M. A criptococose e sua importância na Medicina Veterinária. Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP. São Paulo: Conselho Regional de Medicina Veterinária, v. 15, n. 1, p. 24-29, 2017.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. Doenças Micóticas Polissistêmicas. Medicina Interna de Pequenos Animais, v. 3, p. 1249-1257, 2001.

OLDENHOFF, W. et al. Cutaneous pythiosis in two dogs from Wisconsin, USA. **Veterinary Dermatology**, v. 25, p. 52-e21, 2014.

OLDENHOFF, W. et al. Cutaneous pythiosis in two dogs from Wisconsin, USA. **Veterinary Dermatology**, v. 25, p. 52-e21, 2014.

OTTEN, N. et al. DNA of bovine papillomavirus type 1 and 2 in equine sarcoids: PCR detection and direct sequencing. **Archives of Virology**, v. 132, p. 121–131, 1993.

OWENS, W. R. et al. Phycomycosis caused by *Basidiobolus haptosporus* in two horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 186, n. 7, p. 703–705, 1985.

PAULA, D. A. J. DE et al. Molecular characterization of ovine zygomycosis in central western Brazil. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, p. 274–277, 2010.

PEIXOTO, T. DA C. et al. Outbreaks of conidiobolomycosis caused by *Conidiobolus lamprauges* in sheep in the state of Bahia, northeastern of Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 39, n. 4, p. 252–263, 2017.

PENNISI, Maria Grazia et al. Cryptococcosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 15, n. 7, p. 611-618, 2013.

PEREIRA, A. P. C.; COUTINHO, S. D. A. Criptococose em cães e gatos–revisão. *Clínica Veterinária*, v. 45, p. 24-32, 2003.

PEREIRA, D. I. B. et al. Canine gastrointestinal pythiosis treatment by combined antifungal and immunotherapy and review of published studies. **Mycopathologia**, v. 176, p. 309–315, 2013.

PEREIRA, D. I. B. et al. Cutaneous and gastrointestinal pythiosis in a dog in Brazil. **Veterinary Research Communications**, v. 34, p. 301–306, 2010.

PERFECT John R. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, editors. *Mandell, Douglas, and Bennett's*

principles and practice of infectious diseases. 8th edition. Philadelphia: Elsevier Saunders; p. 2934–48, 2015.

PERFECT, John R. *Cryptococcus neoformans*: a sugar-coated killer with designer genes. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, v. 45, n. 3, p. 395-404, 2005.

PERFECT, John R.; BICANIC, Tihana. Cryptococcosis diagnosis and treatment: What do we know now. *Fungal Genetics and Biology*, v. 78, p. 49-54, 2015.

PERLER, F. B. Inteins - A historical perspective. In: BELFORT, M. et al. (Eds.). *Homing endonucleases and inteins. Nucleic Acids and Molecular Biology*. Berlin ; Heidelberg: Springer, 2008. p. xix, 377 p

PERMPALUNG, N.; WORASILCHAI, N.; CHINDAMPORN, A. Human Pythiosis: emergence of fungal-like organism. ***Mycopathologia***, p. 1–12, 2019.

PESAVENTO, P. A. et al. Cutaneous pythiosis in a nestling white-faced ibis. ***Veterinary Pathology***, v. 45, n. 4, p. 538–541, 2008.

PESSOA, A. F. A. et al. Doenças de pele em equídeos no semiárido brasileiro. ***Pesquisa Veterinária Brasileira***, v. 34, n. 8, p. 743–748, 2014.

PESSOA, C. R. M. et al. Pythiosis of the digestive tract in sheep. ***Journal of Veterinary Diagnostic Investigation***, v. 24, n. 6, p. 1133–1136, 2012.

PHILLIPS, Peter et al. Longitudinal clinical findings and outcome among patients with *Cryptococcus gattii* infection in British Columbia. *Clinical Infectious Diseases*, v. 60, n. 9, p. 1368-1376, 2015.

Prado M, Silva MB, Laurenti R, Travassos LR, Taborda CP. Mortality due to systemic mycoses as a primary cause of death or in association with AIDS in Brazil: a review from 1996 to 2006. ***Mem Inst Oswaldo Cruz***. 2009 May; 104(3):513-521. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000300019>.

PROEPI. Associação Brasileira de Profissionais de Epidemiologia de Campo. *Geoprocessamento em Saúde*. 2ª Edição. 2018. cryptococcosis diagnosis. *Med Mycol Open Access*, v. 2, n. 2, p. 13, 2016.

PUGH, D. G.; HU, X. P.; BLAGBURN, B. Habronemiasis: biology, signs, and diagnosis, and treatment and prevention of the Nematodes and vector flies. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, n. 2, p. 241–248, 2014.

PUPAIBOOL, J. et al. Human Pythiosis. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 3, p. 517–518, 2006.

PUSTERLA, N. et al. Cutaneous and ocular habronemiasis in horses: 63 cases (1988-2002). **JAVMA**, v. 222, n. 7, p. 978–982, 2003.

Rajasingham, R., Smith, R. M., Park, B. J., Jarvis, J. N., Govender, N. P., Chiller, T. M., ... & Boulware, D. R. Global burden of disease of HIV-associated cryptococcal meningitis: an updated analysis. **The Lancet infectious diseases**, v. 17, n. 8, p. 873-881, 2017.

RAKICH, P. M.; GROOTERS, A. M.; TANG, K. N. Gastrointestinal pythiosis in two cats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 17, p. 262–269, 2005.

REAGAN, K. L. et al. Successful management of 3 dogs with colonic pythiosis using itraconazole, terbinafine, and prednisone. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 33, n. 3, p. 1434–1439, 2019.

REED, G. H.; WITTWER, C. T. Sensitivity and specificity of Single-Nucleotide Polymorphism Scanning by High-Resolution Melting Analysis. **Clinical Chemistry**, v. 50, n. 10, p. 1748–1754, 2004.

REINPRAYOON, U. et al. *Lagenidium* sp. ocular infection mimicking ocular pythiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 8, p. 2778–2780, 2013.

REIS, J. L. et al. Disseminated pythiosis in three horses. **Veterinary Microbiology**, v. 96, p. 289–295, 2003.

RIBEIRO, T. C. et al. Microevolutionary analyses of *Pythium insidiosum* isolates of Brazil and Thailand based on exo-1, 3- β -glucanase gene. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 48, p. 58–63, 2017.

RISTAINO, J. B. Tracking historic migrations of the Irish potato famine pathogen,

Phytophthora infestans. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 13, p. 1369–1377, 2002.

RIVIERRE, C. et al. Pythiosis in Africa. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 3, p. 479–481, 2005.

ROBINSON, C. S. et al. Treatment of a mare for *Conidiobolus coronatus* infection. **Equine Veterinary Education**, v. 19, n. 8, p. 396–403, 2007.

RODRIGUES, A. et al. Intestinal dog pythiosis in Brazil. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 16, p. 37–41, 2006.

RODRIGUES, C. A.; LUVIZOTTO, M. C. R. Zigomicose e pitiose cutânea em equinos: diagnóstico e tratamento. **Revista de Educação continuada CRMV-SP**, v. 3, n. 3, p. 3–11, 2000.

Rodrigues, M. L. (2019). Saúde Amanhã: Textos para Discussão 36: Negligenciadas entre a Negligenciadas: perspectiva de prevenção, controle e diagnóstico de doenças causadas por fungos.

Rosario, I., Acosta, B., & Colom, F.. La paloma y otras aves como reservorio de *Cryptococcus* spp. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 25, n. 1, p. 13-18, 2008.

RUJIRAWAT, T. et al. Single nucleotide polymorphism-based multiplex PCR for identification and genotyping of the oomycete *Pythium insidiosum* from humans, animals and the environment. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 54, p. 429–436, 2017.

SALAS, Y. et al. Equine Pythiosis :report in crossed bred (Criole Venezuelan) horses. **Mycopathologia**, v. 174, p. 511–517, 2012.

SALLIS, E. S. V.; PEREIRA, D. I. B.; RAFFI, M. B. Pitiose cutânea em equinos: 14 casos. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 899–903, 2003.

SANTOS, C. DUARDO P. DOS; SANTURIO, J. M.; MARQUES, L. C. Pitiose em animais de produção no Pantanal Matogrossense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 12, p. 1083–1089, 2011.

SANTOS, M. N. DOS; LONDERO, A. T. Zicomiose subcutânea em cavalos. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 9, p. 7–8, 1974.

SANTURIO, J. M. et al. Granulomatous rhinitis associated with *Pythium insidiosum* infection in sheep. **Veterinary Record**, v. 163, p. 276–277, 2008.

SANTURIO, J. M. et al. Pitiose: uma micose emergente. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n. 1, p. 1–14, 2006.

SATO, Yoshihiro et al. Rapid diagnosis of cryptococcal meningitis by microscopic examination of centrifuged cerebrospinal fluid sediment. *Journal of the neurological sciences*, v. 164, n. 1, p. 72-75, 1999.

SAVORY, F. R. et al. Ancestral function and diversification of a horizontally acquired oomycete carboxylic acid transporter. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 8, p. 1887–1900, 2018

SCHMALZLE, Sarah A. et al. Cryptococcus neoformans infection in malignancy. *Mycoses*, v. 59, n. 9, p. 542-552, 2016.

SCHURKO, A. et al. 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.

SCHURKO, A. M. et al. A molecular phylogeny of *Pythium insidiosum*. **Mycologia**, v. 107, n. 5, p. 537–544, 2003.

SCHWARZ, B.; BURFORD, J.; KNOTTENBELT, D. Cutaneous fungal granuloma in a horse. **Veterinary Dermatology**, v. 20, n. 2, p. 131–134, 2009.

SERMSATHANASAWADI, N. et al. Outcomes and factors influencing prognosis in patients with vascular pythiosis. **Journal of Vascular Surgery**, v. 64, n. 2, p. 411–417, 2015.

SHARMA, S. et al. *Pythium insidiosum* keratitis: clinical profile and role of DNA sequencing and zoospore formation in diagnosis. **Cornea**, v. 34, n. 4, p. 438–442, 2015.

SHI, M. et al. High-resolution melting analysis assay for identification of *Fonsecaea* species. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 32, n. 2, p. 1–4, 2018.

Sidrim, J. J. C., Costa, A. K. F., Cordeiro, R. A., Brilhante, R. S. N., Moura, F. E. A., Castelo-Branco, D. S. C. M., Rocha, M. F. G. (2010). *Molecular methods for the diagnosis and characterization of Cryptococcus: a review*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 13, n.4, p. 445–458, 2010 doi:10.1139/w10-030

SILVA, S. M. M. S. et al. Epidemiologia e sinais clínicos da conidiobolomicose em ovinos no Estado do Piauí. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 4, p. 184–190, 2007.

SINGH, N. et al. Donor-derived fungal infections in organ transplant recipients: guidelines of the American Society of Transplantation, infectious diseases community of practice. *American journal of transplantation*, v. 12, n. 9, p. 2414–2428, 2012.

SOARES, L. M. C. et al. Feline subcutaneous pythiosis. **Ciencia Rural**, v. 49, n. 3, p. e20180448, 2019.

SOUTO, E. P. F. et al. Esophageal pythiosis in an ostrich (*Struthio camelus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, n. 3, p. 1081–1084, 2019.

SOUTO, E. P. F. et al. Pythiosis in the nasal cavity of horses. **Journal of Comparative Pathology**, v. 155, n. 2–3, p. 126–129, 2016.

Spennemann, D. H., & Watson, M. J. (2017). Dietary habits of urban pigeons (*Columba livia*) and implications of excreta pH—a review. **European Journal of Ecology**, v. 3, n. 1, p. 27–41.

SUN, P. L. et al. Application of Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) and High Resolution Melting (HRM) analysis of beta-tubulin gene for species and strains differentiation in *Trichophyton mentagrophytes* species complex. **Journal of Dermatological Science**, v. 83, n. 3, p. 247–250, 2016.

SUPABANDHU, J. et al. Isolation and identification of the human pathogen *Pythium insidiosum* from environmental samples collected in Thai agricultural areas. **Medical Mycology**, v. 46, p. 41–52, 2008.

SUPABANDHU, J. et al. Isolation and identification of the human pathogen *Pythium insidiosum* from environmental samples collected in Thai agricultural areas. **Medical Mycology**, v. 46, p. 41–52, 2008.

TABOSA, I. M. et al. Outbreaks of pythiosis in two flocks of sheep in Northeastern Brazil. **Veterinary Pathology**, v. 41, n. 4, p. 412–415, 2004.

TAINTOR, J. et al. Treatment of conidiobolomycosis with fluconazole in two pregnant mares. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 18, p. 363–364, 2004.

TANNER, David C. et al. Comparison of commercial kits for detection of cryptococcal antigen. *Journal of clinical microbiology*, v. 32, n. 7, p. 1680-1684, 1994.

TEIFKE, J. P.; WEISS, E. Detection of bovine papillomavirus DNA in equine sarcoids using the polymerase chain reaction (PCR). **Berl Munch Tierarztl Wochenschr**, v. 104, n. 6, p. 185–187, 1991.

Theodoro, R. C.; Volkmann, G., Liu, X. Q., & Bagagli, E. PRP8 intein in Ajellomycetaceae family pathogens: sequence analysis, splicing evaluation and homing endonuclease activity. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, n. 2, p. 80-91, 2011.

Theodoro, Raquel C.; Bagagli, Eduardo; Oliveira, Claudio. Phylogenetic analysis of PRP8 intein in *Paracoccidioides brasiliensis* species complex. **Fungal Genetics and Biology**, v. 45, n. 9, p. 1284-1291, 2008.

Theodoro, Raquel Cordeiro; Bagagli, Eduardo. Inteins in pathogenic fungi: a phylogenetic tool and perspectives for therapeutic applications. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 497-504, 2009.

THONGSRI, Y. et al. Evaluation for the clinical diagnosis of *Pythium insidiosum*

- sing a single-tube nested PCR. **Mycopathologia**, v. 176, p. 369–376, 2013.
- TONPITAK, W. et al. First confirmed case of nasal pythiosis in a horse in Thailand. **JMM Case Reports**, v. 5, n. 1, p. 1–4, 2018.
- TORRES NETO, R. et al. Cutaneous pythiosis in a dog from Brazil. **Veterinary Dermatology**, v. 21, p. 202–204, 2009.
- TORRES, L. M. et al. Pitiose cutânea canina - Relato de caso. **ARS Veterinária**, v. 30, n. 2, p. 77–82, 2014.
- TRAVERSA, D. et al. Molecular diagnosis of equid summer sores. v. 150, p. 116–121, 2007.
- TRAVERSA, D. et al. Semi-nested PCR for the specific detection of *Habronema microstoma* or *Habronema muscae* DNA in horse faeces. **Parasitology**, v. 129, p. 733–739, 2004.
- TROST, M. E. et al. Aspectos clínicos, morfológicos e imuno-histoquímicos da pitiose gastrintestinal canina. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 29, n. 8, p. 673–679, 2009.
- VALENTINE, B. A. Equine cutaneous non-neoplastic nodular and proliferative lesions in the Pacific Northwest. **Veterinary Dermatology**, v. 16, p. 425–428, 2005.
- VAN BURIK, J. A. H. et al. Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous fungi. **Medical Mycology**, v. 36, n. 5, p. 299–303, 1998.
- VANITTANAKOM, N. et al. Identification of emerging human-pathogenic *Pythium insidiosum* by serological and molecular assay-based methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 9, p. 3970–3974, 2004.
- VANITTANAKOM, N.; SZEKELY, J.; KHANTHAWONG, S. Molecular detection of *Pythium insidiosum* from soil in Thai agricultural areas. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 3–4, p. 321–326, 2014.
- VIDELA, R. et al. Vulvar pythiosis in two captive camels (*Camelus dromedarius*).

Medical Mycology, v. 50, n. 2, p. 219–224, 2012.

VILELA, R. et al. *Lagenidium giganteum* pathogenicity in mammals. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 290–297, 2015.

VILELA, R.; MENDOZA, L. Human pathogenic Entomophthorales. **Clinical microbiology reviews**, v. 31, n. 4, p. 1–40, 2018.

VILLA, N. O. et al. Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and β -tubulin gene sequences. **Mycologia**, v. 98, n. 3, p. 410–422, 2006.

WATANABE, M. J. et al. Equine pythiosis: Report of 28 cases from São Paulo State, Brazil. **Semina:Ciencias Agrarias**, v. 36, n. 2, p. 909–916, 2015.

WEIBLEN, C. et al. Seroprevalence of *Pythium insidiosum* infection in equine in Rio Grande do Sul, Brazil. **Ciência Rural**, v. 46, n. 1, p. 126–131, 2015.

WELLEHAN, J. F. X. et al. Pythiosis in a Dromedary Camel (*Camelus Dromedarius*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 35, n. 4, p. 564–568, 2004.

Wengenack, N.L., and Binnicker, M.J. Fungal molecular diagnostics. **Clin. Chest Med.** v. 30, n. 3, p. 391–408, 2009. doi:10.1016/j.ccm.2009.02.014. PMID:19375643.

WHITE, T. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: **PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315–322.

WORASILCHAI, N.; PERMPALUNG, N.; CHINDAMPORN, A. High-resolution melting analysis: a novel approach for clade differentiation in *Pythium insidiosum* and pythiosis. **Medical Mycology**, v. 56, n. 7, p. 868–876, 2018.

WU, T. C.; KOO, S. Y. Comparison of three commercial cryptococcal latex kits for detection of cryptococcal antigen. *Journal of clinical microbiology*, v. 18, n. 5, p. 1127-1130, 1983.

ZAVALA, Sofia; BADDLEY, John W. Cryptococcosis. In: Seminars in respiratory and critical care medicine. Thieme Medical Publishers, 2020. p. 069-079.