

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

SURTO DE PITIOSE EQUINA E PADRONIZAÇÃO DE qPCR  
PARA RÁPIDA DETECÇÃO DE *Pythium insidiosum*

GISELLE SOUZA DA PAZ

Botucatu – SP

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

SURTO DE PITIOSE EQUINA E PADRONIZAÇÃO DE qPCR  
PARA RÁPIDA DETECÇÃO DE *Pythium insidiosum*

GISELLE SOUZA DA PAZ

Tese apresentada junto ao Programa de  
Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
para obtenção do título de Doutora.

Orientadora: Prof. Dr. Sandra de Moraes  
Gimenes Bosco

Co-orientador: Prof. Dr. João Pessoa  
Araújo Jr.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Paz, Giselle Souza da.

Surto de pitiose equina e padronização de qPCR para rápida detecção de *Pythium insidiosum* : diagnóstico precoce de pitiose equina / Giselle Souza da Paz. - Botucatu, 2020

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

Orientador: Sandra de Moraes Gimenes Bosco

Coorientador: João Pessoa Araújo Jr.

Capes: 50502000

1. Cavalo - Doenças. 2. Pitiose. 3. *Pythium*. 4. Reação em cadeia da polimerase. 5. Oomicetos.

Palavras-chave: Elicitina; Isolamento ambiental; Oomicetos; PCR em tempo real; Pitiose.

Nome do Autor: Giselle Souza da Paz

Título: SURTO DE PITIOSE EQUINA E PADRONIZAÇÃO DE qPCR PARA RÁPIDA DETECÇÃO DE *Pythium insidiosum*

#### COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Drª Sandra de Moraes Gimenes Bosco

Presidente e Orientadora

Departamento de Ciências Químicas e Biológicas, Setor de Microbiologia e Imunologia -  
IBB - UNESP - Botucatu

Prof. Dr. Marcos Jun Watanabe

Membro

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal - FMVZ - UNESP - Botucatu

Profª Drª Leila Sabrina Ullmann

Membro

Instituto de Biotecnologia – IBTEC - UNESP - Botucatu

Profª Drª Virgínia Bodelão Richini Pereira

Membro externo

Centro de Laboratórios Regionais II Bauru – Instituto Adolfo Luz – Bauru

Prof. Dr. Anderson Messias Rodrigues

Membro externo

Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia – UNIFESP – São Paulo

Data de apresentação da tese: 27 de outubro de 2020

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família,  
que mesmo longe, sempre me deram  
forças para continuar caminhando.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família que mesmo desconhecendo os caminhos que tracei em minha vida acadêmica e profissional, sempre me apoiaram de forma incondicional.

Agradeço a minha orientadora e amiga Prof<sup>a</sup> Sandra de Moraes Gimenes Bosco pela confiança, pelo apoio humanitário, pelas oportunidades micológicas de aprendizado e crescimento acadêmico no mestrado e doutorado.

Agradeço a todos os meus professores pelas orientações e oportunidades, em especial à Prof<sup>a</sup> Carla Cristina Guimarães de Moraes por me apresentar as zoonoses e a medicina veterinária preventiva durante as iniciações científicas na UFPA, ao Prof<sup>o</sup> Helio Langoni pelo aprendizado compartilhado e pelas oportunidades durante a residência e o mestrado, a Prof<sup>a</sup> Virgínia Bodelão Richini Pereira por me iniciar na micologia médica, e ao Prof<sup>o</sup> Eduardo Bagagli por compartilhar conhecimentos sobre a biologia dos fungos e pelo auxílio em todos os momentos.

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro N<sup>o</sup> 2018/08009-0 e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 pela bolsa de estudos, aos quais foram essenciais para o desenvolvimento desta pesquisa. Ressaltamos a importância destas agências de fomento para o desenvolvimento da pesquisa no Brasil, pois neste momento de descrédito e sucateamento da ciência brasileira, necessitamos do apoio de empresas de financiamento sérias e comprometidas com o progresso científico.

Agradeço ao meu companheiro Roney de Carvalho Macedo Silva (Perobo), por todo amor, carinho, paciência, e ajuda seja nos momentos festivos, de alegrias, de cansaço e/ou desânimo. Juntos vamos mais longe meu amor.

Agradeço a todos os meus amigos e colegas do laboratório de Micologia Médica, do Laboratório de Biologia dos Fungos, da Vigilância Sanitária de Botucatu, do Hospital Veterinário da FMVZ, da UNESP, de Igarapé-açu-PA, e de Castanhal-PA. Agradeço a todos que direta ou indiretamente me ajudaram a realizar este trabalho e estiveram ao meu lado durante estes anos.

Enfim agradeço a Deus pela oportunidade de vivenciar tantas experiências positivas e a compartilhar aprendizados singulares com pessoas maravilhosas, e por encerrar este ciclo em êxtase por ter ultrapassado fronteiras inimagináveis.

Muito obrigada a todos!

## LISTA DE TABELAS

- Table 1.** Description of characteristics of equines with pythiosis during outbreak in Botucatu and São Manuel, SP, Brazil.....p.49
- Table 1** (Capítulo 2). Description of characteristics of equines with pythiosis during an outbreak in Botucatu and São Manuel, SP, Brazil.....p.67
- Table 2.** Description of the analytical values of five *P. insidiosum* isolates submitted to qPCR and their respective cycles of quantification (Cq), and melting temperature (Tm) with analysis of the mean and standard deviation per cycle.....p.70

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** **A)** Cultura de *P. insidiosum* em meio Sabouraud dextrose 4% mantida a 37°C por 5 dias; **B)** Hifas cenocíticas de *P. insidiosum* coradas por lactofenol azul algodão, aumento de 200x. Adaptado de Bosco et al. (2019).....p.4
- Figura 2.** **A)** Gramínea parasitada por *P. insidiosum* em meio líquido de indução, evidenciando grande quantidade de hifas hialinas. Aumento de 20x. Arquivo pessoal; **B)** Esporângio, localizado na extremidade da hifa demonstrando, internamente, a diferenciação do protoplasma em zoósporos. Aumento de 100x. Adaptado de Salas et al. (2012).....p.5
- Figura 3.** Ciclo biológico de *P. insidiosum* em ambiente aquático, o zoósporo livre encista-se em material vegetal, com formação de tubos germinativos, e posteriormente a produção de esporângios nas extremidades das hifas. Por meio de clivagens sucessivas formam-se zoósporos biflagelados. Após romperem a parede do esporângio os zoósporos ficam livres no meio, e podem iniciar outro ciclo em material vegetal, ou serem atraídos por quimiotaxia para tecido ou pelos de animais que pastam em ambiente alagado. Em cavalos, após encistamento e ativação do sistema imune, há a formação de estruturas denominadas ‘*kunkers*’ no interior das lesões. Ilustração criada em BioRender.com.....p.5
- Figura 4.** Árvore filogenética após análise de sequências da região ITS do rDNA de *P. insidiosum* pelo método de Neighbour-Joining. Adaptado de Schurko et al. (2003b).....p.7
- Figura 5.** Invasão tecidual por zoósporos de *P. insidiosum* em tecido animal lesionado submerso em ambiente aquático, e a cascata imunológica desencadeada pelos exoantígenos liberados pelas hifas do patógeno. Ilustração criada em BioRender.com.....p.9
- Figura 6.** Equino com lesão ulcerada causada por *P. insidiosum* acometendo parte do lábio superior e fossa nasal com presença de *kunkers* (seta). Adaptado de Romero et al. (2019).....p.13
- Figura 7.** Lesões únicas e granulomatosas localizadas em membros de equinos ocasionadas por *P. insidiosum*. Arquivo pessoal.....p.14



**Figura 8.** **A)** ‘Kunkers’ oriundos de lesões de um equino com diagnóstico de pitiose; **B)** Colônias de *P. insidiosum* após 48 horas do cultivo de fragmentos de ‘kunkers’ em ágar Sabouraud dextrose 4% mantidos a 37°C. Arquivo pessoal.....p.15

**Figura 9.** As imagens A e B mostram a lesão após a remoção do tecido necrosado (antes da imunoterapia). As imagens de C a G mostraram o gato nas semanas seguintes após a primeira imunoterapia com *Pythium*, com formação de tecido saudável ao redor da lesão. Adaptado de Dowst et al. (2019).....p.18

**Figure 1** (Capítulo 2). Distribution of the five cases of equine pythiosis outbreaks at the margins of the Tietê River from Botucatu and São Manuel counties, São Paulo state, Brazil.....p.50

**Figure 2** (Capítulo 2). Granulomatous lesions caused by *P. insidiosum* in the left forelimb (A, case 2) and right hindlimb (B, case 3), scrotum (C, case 4), and abdominal region (D, case 5) of affected equines during the outbreak associated with the Tietê River.....p.5

1

**Figure 3** (Capítulo 2). Phylogenetic analysis of clinical and environmental isolates of *P. insidiosum* based on partial sequences of the mitochondrial DNA cytochrome oxidase II (COXII) gene.....p.52

**Figure 1** (Capítulo 3). Alignment of the sequences used for the design of the primers (red) specific to the *P. insidiosum* ELI025 gene. Sequences 1 and 2: *Pythium oligandrum* GenBank: AB217820.1 and AB217821.1, respectively; Sequence 3: *Phytophthora sojae* Genbank: XM009531764.1; Sequences 4 to 14: *P. insidiosum*, Genbank: AB971191.1; AB971191.1; AB971192.1; AB971192.1; AB971196.1; isolate CBS101555 contig: 044905; isolate CBS573.85 contig: 009256; isolate Pi19 contig: 008992; isolated Pi-s contig: PINS000045; isolate Pi-s contig: PINS000703; isolate CDC B5653 contig00435, respectively.....p.71

**Figure 2** (Capítulo 3). **A)** Standard qPCR curve for ELI025 gen generated from serial 10-fold dilutions of gDNA of *P. insidiosum*; and **B)** melting curve (T<sub>m</sub>) with temperature mean of 88,7°C.....p.72

# SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1	
INTRODUÇÃO .....	1
REVISÃO DE LITERATURA .....	2
CAPÍTULO 2 – TRABALHO CIENTÍFICO.....	29
SUMMARY.....	30
CAPÍTULO 3 – TRABALHO CIENTÍFICO.....	52
ABSTRACT .....	53
CAPÍTULO 4	
DISCUSSÃO GERAL .....	73
CONCLUSÕES GERAIS.....	78
BIBLIOGRAFIA .....	79

PAZ, G.S. **Surto de pitiose equina e padronização de qPCR para rápida detecção de *Pythium insidiosum***. Botucatu, 2020. 115p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## RESUMO

A pitiose é uma doença granulomatosa causada pelo oomiceto *P. insidiosum*, com curso clínico progressivo e frequentemente fatal em humanos e animais. Descrevemos o primeiro surto de pitiose equina envolvendo cinco animais, diagnosticados por cultivo microbiológico e nested-PCR em maio de 2018 em Botucatu e São Manuel-SP, após pastejarem nas margens do rio Tietê. A combinação de técnicas microbiológicas, moleculares e filogenéticas permitiram o isolamento de *P. insidiosum* de amostras de água do rio e a caracterização filogenética, com a primeira identificação do clado III de *P. insidiosum* no Brasil. Além disso, realizamos a padronização de qPCR para o diagnóstico de *P. insidiosum* com alvo molecular o gene ELI025. Para tanto foram utilizadas 23 isolados de *P. insidiosum* e 10 amostras clínicas (09 de *kunkers* e 01 de tecido) de animais com pitiose previamente comprovada por cultivo microbiológico ou nested-PCR. O limite de detecção foi de 1pg/ $\mu$ L de DNA, correspondente a 17 cópias do genoma, curvas de dissociação com valor médio de 88,7°C e coeficiente de linearidade ( $R^2$ ) em 0,994. A sensibilidade, especificidade e acurácia da qPCR foram de 100% em comparação com a nested-PCR, com homologia de 99% dos produtos amplificados para o gene ELI025, específico de *P. insidiosum*. Concluimos que a descrição do primeiro surto de pitiose equina e a identificação da fonte de infecção podem auxiliar na implantação de medidas preventivas, e a padronização de qPCR com alvo no gene ELI025 auxiliará para o diagnóstico precoce da pitiose, contribuindo substancialmente para a melhora do prognóstico do paciente.

**Palavras-chave:** Pitiose, Ambiental, Oomicetos, Elicitina, PCR em tempo real.

PAZ, G.S. **Outbreak of equine pythiosis and qPCR standardization for rapid detection of *Pythium insidiosum***. Botucatu, 2020. 115p. Thesis (Ph.D.) – School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Universidade Estadual Paulista.

## ABSTRACT

Pythiosis is a granulomatous disease, caused by the oomycete *P. insidiosum*, with a progressive and often fatal clinical course in humans and animals. We described a first outbreak of equine pythiosis involving five animals diagnosed by microbiological culture of the agent and nested-PCR in May 2018 in the cities of Botucatu and São Manuel-SP, São Paulo state, after grazing on the margins of the Tietê River. The combination of microbiological, molecular, and phylogenetic techniques allowed the isolation of *P. insidiosum* from water samples of the river and the phylogenetic characterization of isolates in clades I and III. We also standardized qPCR for the diagnosis of *P. insidiosum* targeting the ELI025 gene. For this, 23 isolates of *P. insidiosum* and 10 clinical samples (9 from *kunkers* and 1 from tissue) from animals previously confirmed with pythiosis by microbiological culture or nested-PCR were employed. The detection limit was 1pg/μl of DNA, corresponding to 17 copies of the genome, maximum quantification cycle of up to 35.3 cycles, dissociation curves with a mean value of 88.7°C, and determination coefficient ( $R^2$ ) of 0.994. The sensitivity of the technique for clinical samples was 100%, with 99% homology for the ELI025 gene, which is specific to *P. insidiosum*. We concluded that the qPCR technique targeting the ELI025 gene helps in the early diagnosis and certainly will contribute to the significantly improvement of the prognosis of pythiosis.

**Keywords:** Pythiosis, Environmental, Oomycetes, Elicitin, Real-time PCR.

## 1 INTRODUÇÃO

2 As lesões granulomatosas apresentam um grande desafio na clínica equina, pois  
3 podem ter diferentes etiologias, inclusive origem infecciosa. O diagnóstico diferencial  
4 das infecções que induzem lesões granulomatosas é extremamente importante, pois cada  
5 enfermidade possui um tratamento específico e se realizado precocemente as chances de  
6 cura do animal aumentam significativamente (KNOTTENBELT e PASCOE, 1998).

7 A pitiose é uma doença crônica, piogranulomatosa causada pelo oomiceto *Pythium*  
8 *insidiosum*, com alta taxa de letalidade em regiões tropicais e subtropicais, tornando o  
9 diagnóstico precoce muito importante para um tratamento bem sucedido (GAASTRA et  
10 al., 2010; THONGSRI et al., 2013). Nos equinos ocorre as formas cutânea e subcutânea,  
11 principalmente nos membros, tórax, abdômen, pescoço, ombros, genitália e cabeça. As  
12 lesões são granulomatosas e circulares, apresentando exsudato sanguinolento  
13 característico, medindo em torno de 0,5 a 50 cm de diâmetro, com intenso prurido  
14 (MENDOZA et al., 1996). São caracterizadas pela presença de massas necróticas duras,  
15 denominadas *kunkers*, que são acumulações de hifas e células inflamatórias, que podem  
16 ser expelidos, e produzir esporângios e zoósporos em ambientes úmidos (MENDOZA et  
17 al., 1993).

18 Os casos de pitiose normalmente são diagnosticados em estado avançado, impedindo  
19 a completa ressecção cirúrgica, devido à extensa lesão do tecido envolvido ou o  
20 comprometimento de estruturas vitais adjacentes, resultando em um mau prognóstico  
21 para o animal (JAEGER et al., 2002). Desta forma, faz-se necessário o desenvolvimento  
22 de técnicas que possibilitem um diagnóstico rápido e precoce para a pitiose  
23 (FERNANDES et al., 2012).

24 Dentre os métodos moleculares a qPCR (quantitative real-time *PCR*) é uma técnica  
25 de excelência para o diagnóstico de patógenos, pois possui a capacidade de detectar e  
26 quantificar ácidos nucleicos em uma ampla gama de amostras clínicas (BUSTIN et al.,  
27 2009). O processo de detecção na qPCR é o principal diferencial em relação aos demais  
28 ensaios de PCR, pois não necessita de manipulação pós-amplificação, devido os sinais  
29 fluorescentes serem diretamente detectados à medida que a amplificação do DNA ocorre,  
30 e os resultados são obtidos em uma hora, ou menos, com alta sensibilidade e  
31 especificidade (ESPY et al., 2006; MACKAY, 2004).

# 1 REVISÃO DE LITERATURA

## 2 Oomiceto *Pythium insidiosum*

3 Pitiose é uma enfermidade com curso crônico que afeta frequentemente equinos, cães  
4 e humanos, sendo causada pelo oomiceto *P. insidiosum* considerado um falso-fungo  
5 devido suas características morfológicas, bioquímicas e moleculares (GAASTRA et al.,  
6 2010).

7 Os oomicetos são um grupo diversificado de eucariotos em habitats terrestres,  
8 límnicos e marinhos em todo o mundo e incluem vários patógenos vegetais devastadores  
9 (CHOI et al., 2017). Eles estão entre o grupo mais problemático de organismos  
10 causadores de doenças na agricultura e aquicultura, e representam uma ameaça recorrente  
11 para a segurança alimentar global (DEREVNINA et al., 2016b).

12 Há uma grande diversidade de formas, variando desde saprófitos de vida livre, que  
13 obtêm nutrientes da matéria em decomposição, até patógenos oportunistas de plantas e  
14 animais (SAVORY et al., 2018). As espécies mais notórias são membros do gênero  
15 *Phytophthora*, como o patógeno *P. infestans*, que infecta plantas como batatas e tomates,  
16 sendo famoso por provocar a fome da batata na Irlanda em meados do século XIX  
17 (RISTAINO, 2002). Outros oomicetos importantes incluem *Aphanomyces invadans* e  
18 *Saprolegnia parasitica*, patógenos de vários peixes economicamente importantes,  
19 incluindo carpas, tilápias e salmónídeos (DEREVNINA et al., 2016b).

20 Os oomicetos se assemelham morfológicamente aos fungos, mas pertencem ao filo  
21 Stramenopila (Heterokonta) e descendem de um ancestral fagotrópico e possivelmente  
22 fotossintético (SAVORY et al., 2018). Possuem várias características biológicas únicas  
23 que os distinguem de vários outros microrganismos eucarióticos (KAMOUN, 2003;  
24 KWON-CHUNG, 1994). Os oomicetos são organismos diploides, possuem hifas  
25 cenocíticas, a maioria são esteroides auxotróficos e suas membranas plasmática contêm  
26 lipídios com ácidos graxos de cadeia longa que presumivelmente substituem os esteróis.  
27 As paredes celulares da maioria dos oomicetos consistem principalmente de 1,3-b-  
28 glucanos, alguns 1,6-b-glucanos e 1,4-b-glucanos (celulose) e hidroxiprolina. A quitina,  
29 que é um dos principais constituintes das paredes celulares dos fungos, foi detectada em  
30 pequenas quantidades em apenas alguns oomicetos (LATIJNHOUWERS et al., 2003).

1           Dentre o reino Stramenopila somente os gêneros *Pythium* e *Saprolegnia* são capazes  
2 de infectar animais, e apenas alguns oomicetos (*P. insidiosum*, *P. aphanidermatum* e  
3 espécies de *Lagenidium*) foram relatados como causadores de infecções fatais ou  
4 devastadoras em humanos e outros animais (CALVANO et al., 2011; FARMER et al.,  
5 2015; GROOTERS et al., 2003; KRAJAEJUN et al., 2006; REINPRAYOON et al., 2013;  
6 RUJIRAWAT et al., 2017; VILELA et al., 2015).

7           O gênero *Pythium* possui aproximadamente 120 espécies que ocupam diversos  
8 habitats. Várias espécies são patógenos vegetais, enquanto outras são saprófitos restritos  
9 do solo, ou são parasitas de insetos, mamíferos, algas ou peixes (MARTIN e LOPER,  
10 1999). Em humanos, *P. aphanidermatum* já foi relatado causando infecção disseminada  
11 fatal em dois soldados no Afeganistão após traumatismo por explosivos (CALVANO et  
12 al., 2011; FARMER et al., 2015). No entanto, *P. insidiosum* é o único capaz de infectar  
13 seres humanos e outros animais (GAASTRA et al., 2010; SANTURIO et al., 2006).

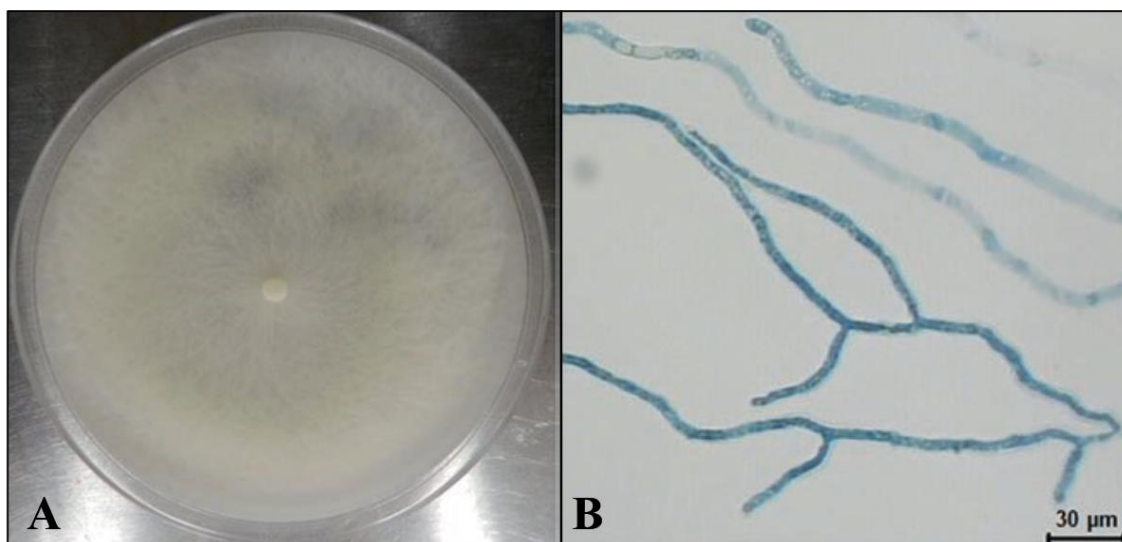
14           *In vitro*, *P. insidiosum* apresenta colônias membranosas, com coloração variando de  
15 branca a bege, micélio aéreo curto, e crescimento radial em 24 a 48 horas a 37°C, em  
16 condição de aerobiose (Figura 1A) (MENDOZA et al., 1996). Microscopicamente, os  
17 organismos produzem hifas hialinas, cenocíticas com ramos largos em ângulo agudo,  
18 esparsamente septados com diâmetro das hifas de 4 a 10 µm, sem produção de esporos  
19 (Figura 1B) (BOSCO et al., 2008). O zoósporo é a forma infectante de *P. insidiosum*, com  
20 liberação de 4 a 20 zoósporos por esporângio. Microscopicamente eles são globosos a  
21 ovóides, com dois flagelos e motilidade ativa de 10 a 60 minutos até reiniciarem novo  
22 ciclo (VANITTANAKOM et al., 2004).

23

24

25



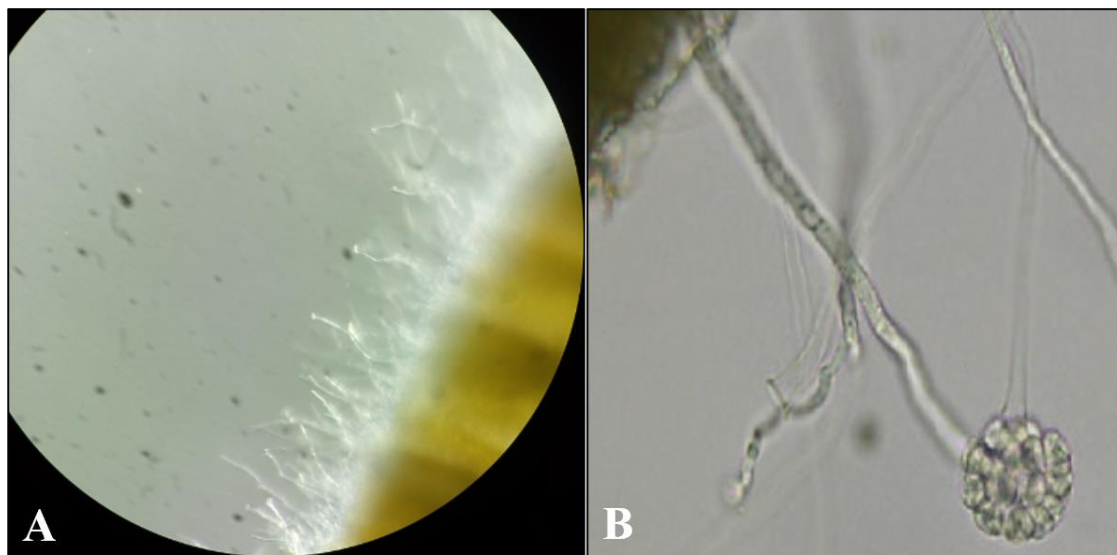


1  
2 **Figura 1.** A) Cultura de *P. insidiosum* em meio Sabouraud dextrose 4% mantida a 37°C por 5 dias; B) Hifas  
3 cenocíticas de *P. insidiosum* coradas por lactofenol azul algodão, aumento de 200x. Adaptado de Bosco et  
4 al. (2019).

5 O ciclo biológico de *P. insidiosum* ocorre de forma assexuada em meio aquático. O  
6 processo natural ocorre com a colonização de material vegetal, através do encistamento  
7 dos zoóporos e a formação de tubos germinativos no tecido parasitado (Figura 2A).  
8 Posteriormente ocorre a formação dos esporângios, com a migração de protoplasma para  
9 a extremidade das hifas, formando uma pequena vesícula, que progride de tamanho,  
10 ocorrendo clivagens sucessivas em seu interior (Figura 2B) e a produção de zoósporos  
11 biflagelados. Os zoósporos móveis quebram mecanicamente a parede do esporângio e são  
12 liberados no meio aquático (MENDOZA et al., 1993). Após liberados, continuam o ciclo  
13 natural penetrando em novos materiais vegetais submersos na água ou penetram na pele  
14 previamente lesionada de animais presentes em ambientes aquáticos culminando no  
15 desenvolvimento da pitiose (Figura 3) (BOSCO et al., 2019; MENDOZA et al., 1996). O  
16 processo de encistamento e tubos germinativos é mais rápido quando tecidos humanos  
17 ou animais estão presentes (MENDOZA et al., 1993).

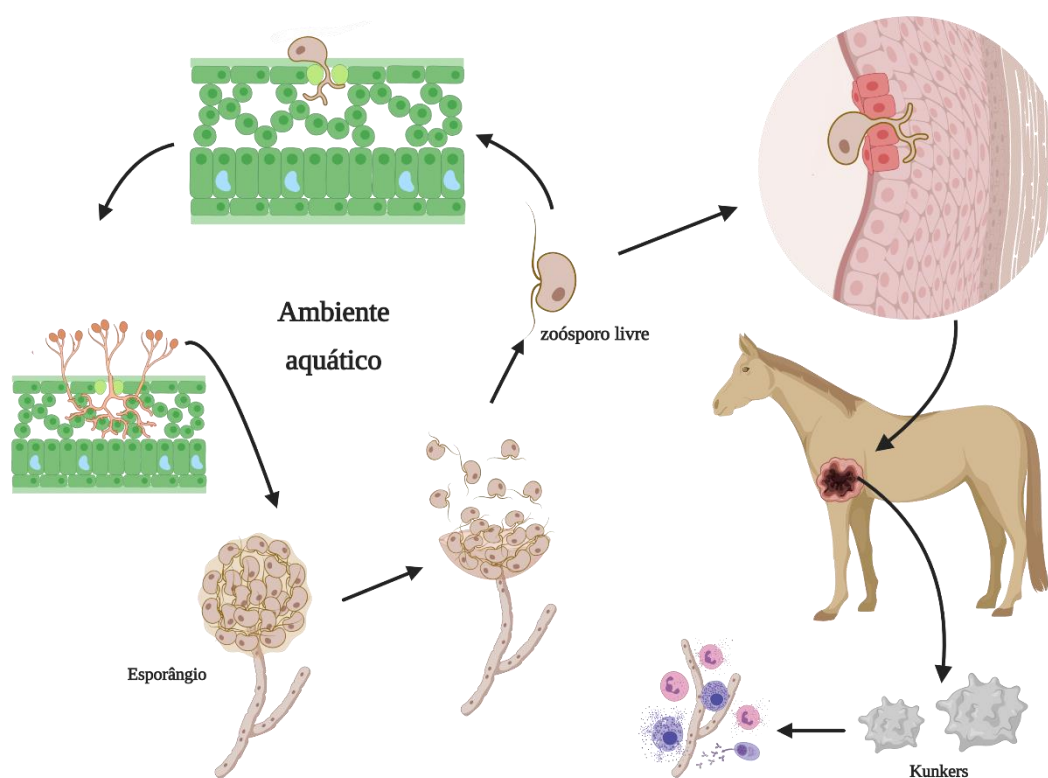
18

19



1

2 **Figura 2.** A) Gramínea parasitada por *P. insidiosum* em meio líquido de indução, evidenciando grande  
 3 quantidade de hifas hialinas. Aumento de 20x. Arquivo pessoal; B) Esporângio, localizado na extremidade  
 4 da hifa demonstrando, internamente, a diferenciação do protoplasma em zoósporos. Aumento de 100x.  
 5 Adaptado de Salas et al. (2012).



6

7 **Figura 3.** Ciclo biológico de *P. insidiosum* em ambiente aquático, o zoósporo livre encista-se em material  
 8 vegetal, com formação de tubos germinativos, e posteriormente a produção de esporângios nas  
 9 extremidades das hifas. Por meio de clivagens sucessivas formam-se zoósporos biflagelados. Após  
 10 romperem a parede do esporângio os zoósporos ficam livres no meio, e podem iniciar outro ciclo em  
 11 material vegetal, ou serem atraídos por quimiotaxia para tecido ou pelos de animais que pastam em

1 ambiente alagado. Em cavalos, após encistamento e ativação do sistema imune, há a formação de estruturas  
2 denominadas 'kunkers' no interior das lesões. Ilustração criada em BioRender.com

3

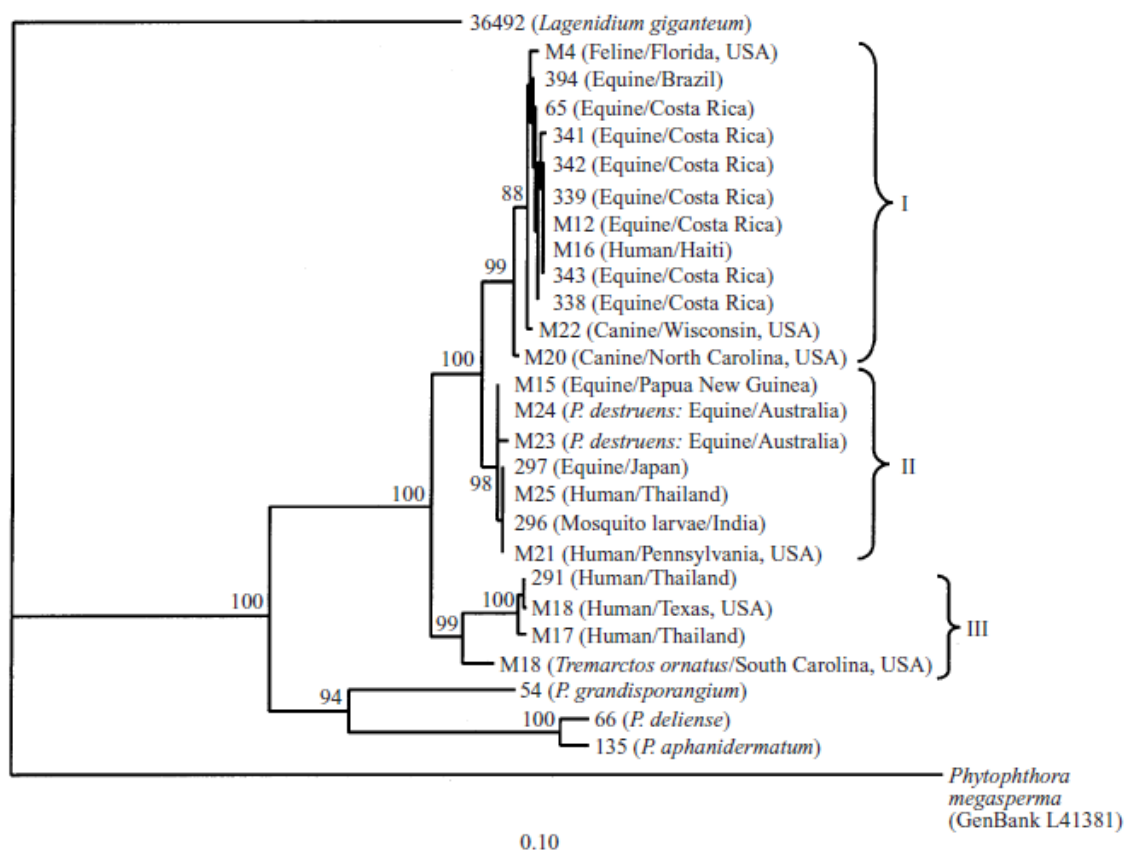
#### 4 *Filogenia Pythium insidiosum*

5 Historicamente os oomicetos, por apresentarem características de crescimento  
6 semelhantes aos fungos, foram considerados uma classe dentro do reino Fungi  
7 (LATIJNHOUWERS et al., 2003). Após estudos filogenéticos constatou-se que os  
8 oomicetos formam uma linhagem filogenética distinta de microrganismos eucarióticos,  
9 sendo intimamente relacionados a algas fotossintéticas, como algas marrons e  
10 diatomáceas (BRUNS et al., 1991; FÖRSTER et al., 1990; GUARRO et al., 1999). Em  
11 termos taxonômicos, *P. insidiosum* pertence ao gênero *Pythium*, família Pythiaceae,  
12 ordem Pythiales, classe Oomycetes, filo Oomycota, reino Stramenipila (MCGOWAN e  
13 FITZPATRICK, 2017; PERMPALUNG et al., 2019).

14 Após análise filogenética da região rDNA-ITS em diferentes espécies, o gênero  
15 *Pythium* apresentou uma subdivisão relacionada a forma esporangial (globoso e  
16 filamentos), distinguindo-se em 11 clados filogenéticos categorizados de A a K,  
17 alocando *P. insidiosum* no clado C juntamente com *Pythium grandisporangium*, um  
18 microrganismo isolado apenas de substratos em ambientes marinhos (LÉVESQUE e DE  
19 COCK, 2004). Análises filogenéticas da região rDNA-ITS demonstraram que a espécie  
20 *P. insidiosum* está dividida em três clados genéticos que exibem um alto grau de  
21 isolamento geográfico (Figura 4) (SCHURKO et al., 2003b, 2003a). Análises  
22 filogenéticas de cepas tailandesas ambientais de *P. insidiosum*, utilizando as regiões ITS,  
23 revelaram características filogenéticas em comum com os isolados clínicos recuperados  
24 de humanos na Tailândia (SUPABANDHU et al., 2008).

25 O gene do citocromo c oxidase subunidade II (COX II, DNA mitocondrial) tem sido  
26 amplamente utilizado para identificação, taxonomia e filogenia de vários grupos de  
27 oomicetos (CHOI et al., 2017; VILLA et al., 2006). O COX II é um gene codificado por  
28 mitocôndrias que geralmente é considerado mais variável que o DNA nuclear  
29 (KAMMARNJESADAKUL et al., 2011). Árvore filogenética utilizando sequências de  
30 COX II também revelaram três grupos principais entre os isolados de *P. insidiosum*,  
31 grupos A, B e C. O clado B e C incluíram a maioria dos isolados tailandeses de fontes

- 1 humanas e ambientais, enquanto o clado A agrupou isolados dos EUA e do Brasil  
 2 (AZEVEDO et al., 2012; KAMMARNJESADAKUL et al., 2011).



- 4 **Figura 4.** Árvore filogenética após análise de sequências da região ITS do rDNA de *P. insidiosum* pelo  
 5 método de Neighbour-Joining. Adaptado de Schurko et al. (2003b).

6 Com base na análise parcial do gene COX II, e da região do 5.8S do rRNA e do ITS2  
 7 do rDNA (ITS), foi demonstrado que os isolados brasileiros oriundos de diferentes  
 8 regiões do Brasil são geneticamente semelhantes e compartilham um único ancestral  
 9 comum, possivelmente procedente de regiões asiáticas, uma vez que os isolados  
 10 tailandeses foram repetidamente mostrados como parafiléticos em relação aos isolados  
 11 americanos (AZEVEDO et al., 2012).

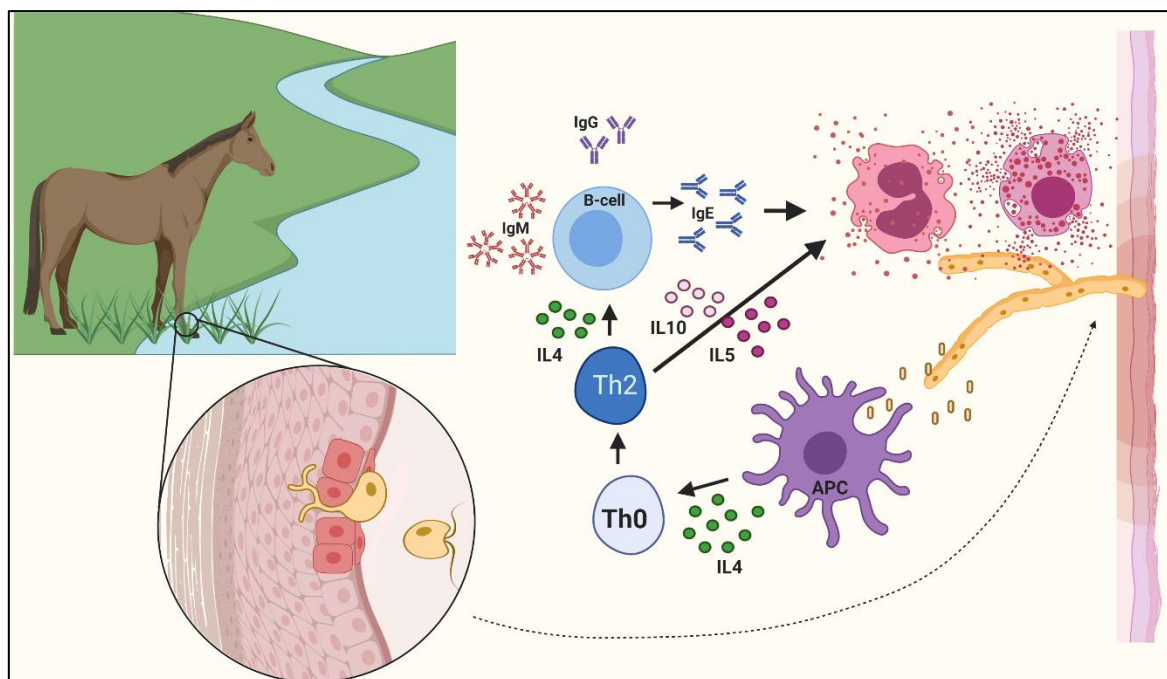
12 Análises filogenéticas baseadas em sequências do gene *exo-1,3-β-glucanase*  
 13 (*EXO1*), que codifica uma proteína imunodominante envolvida no remodelamento da  
 14 parede celular, também inferiu sobre três clados: o primeiro e o segundo englobando  
 15 isolados tailandeses (denominado Clado 1 ou Thai1 e Clado 2 ou Thai2) e o terceiro  
 16 contendo isolados brasileiros e a cepa ATCC 58637 da Costa Rica (denominado Clado 3  
 17 ou Br) (RIBEIRO et al., 2017).

## 1 Epidemiologia da pitiose

2 É provável que o primeiro caso de pitiose equina tenha sido relatado em 1884, porém  
3 somente em 1987, mais de um século depois, *Pythium insidiosum* foi descrito como  
4 agente etiológico da pitiose (DE COCK et al., 1987). As denominações populares da  
5 pitiose são variadas, sendo conhecida em diferentes regiões por “bursatte”, “dermatite  
6 granular”, “hifomicose destruens equi”, “ficomicose”, “granuloma ficomicótico”,  
7 “câncer dos pântanos” (*swamp cancer*) como é conhecida na Flórida, ou ainda "Ferida  
8 Brava" e "Ferida da Moda" na região do Pantanal Mato-grossense (DE COCK et al., 1987;  
9 GAASTRA et al., 2010; GROOTERS et al., 2002b; LEAL et al., 2001; SANTURIO et  
10 al., 2006).

11 A infecção por *P. insidiosum* ocorre em ambiente aquático como pântanos e campos  
12 alagados, após a penetração de zoósporos biflagelados em tecido injuriado. Os zoósporos  
13 se aderem ao tecido e após o encistamento, dá-se início à produção do tubo germinativo,  
14 que corresponde ao início da formação da hifa (MENDOZA et al., 1993). Com o  
15 crescimento das hifas no tecido animal, há a liberação de exoantígenos que atuam como  
16 fatores quimiotáticos para as células apresentadoras de antígenos, especialmente as  
17 células dendríticas. Essas células secretam interleucina 4 (IL-4) que estimula a  
18 subpopulação de linfócitos Th0 a diferenciar-se em perfil de resposta imune do tipo Th2,  
19 que por sua vez secreta mais IL-4 e IL-5. A secreção de IL-4 estimula as células B a  
20 produzirem as imunoglobulinas IgM, IgG e IgE. As IL-5 e IgE mobilizam eosinófilos e  
21 mastócitos para o local da infecção (Figura 5), formando uma reação granulomatosa no  
22 centro de microabscessos eosinofílicos semelhante ao fenômeno de Splendore-Hoeppli  
23 (BOSCO et al., 2019; MENDOZA e NEWTON, 2005). A degranulação de eosinófilos e  
24 mastócitos (células inflamatórias) ao redor das hifas, contribui para o dano tecidual, e a  
25 formação das extensas lesões. Nos equinos, a reação eosinofílica é tão exacerbada que  
26 formam-se estruturas firmes ao redor das hifas, conhecidas por "kunkers" (Figura 3),  
27 sendo uma possível estratégia evolutiva de *P. insidiosum* para evadir-se da defesa do  
28 hospedeiro (BOSCO et al., 2019; MENDOZA e NEWTON, 2005).

29



1

2 **Figura 5.** Invasão tecidual por zoósporos de *P. insidiosum* em tecido animal lesionado submerso em  
 3 ambiente aquático, e a cascata imunológica desencadeada pelos exoantígenos liberados pelas hifas do  
 4 patógeno. Ilustração criada em BioRender.com

5 A pitiose é uma doença não transmissível de ocorrência esporádica (GAASTRA et  
 6 al., 2010), com casos descritos em várias partes no mundo, principalmente em regiões  
 7 tropicais e subtropicais (APPAVU et al., 2020; BERNHEIM et al., 2019; BOSCO et al.,  
 8 2005; GAASTRA et al., 2010; MACHADO et al., 2018; MARQUES et al., 2006;  
 9 MENDOZA e NEWTON, 2005; RIVIERRE et al., 2005).

10 A Tailândia e o Brasil são os países que possuem maior prevalência de pitiose  
 11 humana e equina, respectivamente (GAASTRA et al., 2010). Curiosamente, verificamos  
 12 muitos casos de pitiose humana na Tailândia (KRAJAEJUN et al., 2006;  
 13 PERMPALUNG et al., 2019; SERMSATHANASAWADI et al., 2015; SHARMA et al.,  
 14 2015) e apenas um caso em equino recentemente relatado (TONPITAK et al., 2018). No  
 15 Brasil ocorre o contrário há muitos relatos de pitiose em animais, especialmente em  
 16 equinos (CARMO et al., 2015; HEADLEY e ARRUDA-JUNIOR, 2004; MACIEL et al.,  
 17 2008; MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012; MEIRELES et al., 1993; REIS JR. et al.,  
 18 2003; SALLIS et al., 2003; SANTOS et al., 2011b, 2014; WATANABE et al., 2015;  
 19 WEIBLEN et al., 2015), e cães (FERNANDES et al., 2012; PEREIRA et al., 2010;  
 20 TORRES-NETO et al., 2009; TORRES et al., 2014) e um único caso em humano  
 21 (BOSCO et al., 2005; MARQUES et al., 2006). Acreditamos que em ambas as regiões

1 ocorre falta de diagnóstico, uma vez que as condições ambientais são muito semelhantes  
2 e favoráveis ao desenvolvimento do patógeno.

3 A pitiose humana no sudeste da Ásia ocorre normalmente durante a estação chuvosa  
4 e verão, com frequências particularmente altas durante o pico de produção na lavoura de  
5 arroz, sendo a pitiose considerada uma doença ocupacional aos agricultores  
6 (VANITTANAKOM et al., 2014). Como grande parte da Tailândia consiste em  
7 pântanos, adequados ao ciclo de vida de *P. insidiosum*, as pessoas que vivem nessas áreas  
8 têm maior probabilidade de entrar em contato com o patógeno e adquirir infecção  
9 (KRAJAEJUN et al., 2006). A pitiose humana apresenta altas taxas de mortalidade na  
10 Tailândia variado entre 36,4 a 40% (KRAJAEJUN et al., 2006;  
11 SERMSATHANASAWADI et al., 2015). Na Tailândia observou-se forte associação de  
12 casos de pitiose vascular com distúrbios hematológicos (KRAJAEJUN et al., 2006;  
13 SERMSATHANASAWADI et al., 2015). Observou-se que 90% dos pacientes com  
14 pitiose vascular tinham talassemia, sugerindo uma associação marcante entre pitiose  
15 vascular e talassemia. Como a talassemia predispõe o paciente à pitiose ainda é  
16 desconhecido (KRAJAEJUN et al., 2006), acredita-se que a sobrecarga de ferro circulante  
17 observado nesses pacientes favoreça o desenvolvimento de *P. insidiosum*, uma vez que o  
18 ferro é essencial ao metabolismo de diversos patógenos, fato esse já observado na  
19 mucormicose (IBRAHIM, 2011) e na pitiose experimental em coelhos (ZANETTE et al.,  
20 2013b, 2013a).

21 Apesar de apresentar distribuição global, faltam estudos epidemiológicos de  
22 exposição ao *P. insidiosum* na população em geral. Neste intuito foi realizado estudo de  
23 soroprevalência em 2641 indivíduos saudáveis na Tailândia e encontrou-se prevalência  
24 estimada de 0,07% (32.000 sororreagentes em toda a população tailandesa). O número  
25 estimado de 32.000 pessoas com anticorpos anti-*P.insidiosum* são significativos,  
26 considerando o risco em escala populacional de exposição a um patógeno que  
27 potencialmente leva à condição infecciosa de difícil diagnóstico, tratamento e com risco  
28 à vida (LOHNOO et al., 2019).

29 Casos de pitiose equina são relatados em todas as regiões brasileiras, com maior  
30 prevalência no Pantanal, onde há relação direta com o período das chuvas (LEAL et al.,  
31 2001; SANTOS et al., 2014). Em estudo realizado por Santos et al. (2011) observou-se  
32 prevalência de pitiose equina de 12,5%, com variação de incidência mensal de 5,88 a

1 28,57%, taxa de mortalidade média de 5,88%, e letalidade 45,45%, sendo os meses de  
2 dezembro e janeiro os que apresentaram maior concentração de casos, coincidindo com  
3 os meses mais chuvosos do ano na região pantaneira (SANTOS et al., 2011). Em inquérito  
4 sorológico realizado em equinos no Rio Grande do Sul por Weiblen et al. (2015), do total  
5 de 1.002 soros testados pela técnica de ELISA, 11,1% (IC95% 9,23-13,22) foram  
6 soropositivos para *P. insidiosum*. Dentre as variáveis analisadas evidenciou-se maior  
7 soropositividade (74,4%) em propriedades com presença de açudes, apresentando  
8 associação de Oddis ratio de 2,13 (IC95%, 1,16-3,91) em comparação com propriedades  
9 sem açude (WEIBLEN et al., 2015). Poucos estudos evidenciam o desfecho da pitiose  
10 equina e merece destaque uma análise retrospectiva realizada por Watanabe et al. (2015),  
11 na qual relata-se o atendimento clínico-cirúrgico de 28 casos de pitiose equina atendidos  
12 junto ao Serviço de Cirurgia de Grandes Animais, do Hospital Veterinário da  
13 FMVZ/Unesp, Botucatu, chamando a atenção para quanto mais distal a lesão nos  
14 membros, pior é o prognóstico para essa espécie animal (WATANABE et al., 2015).

15 No pantanal Mato-grossense também se observa a ocorrência de pitiose em bovinos,  
16 com incidência média anual foi de 0,22%, sem relato de óbitos (SANTOS et al., 2011).  
17 No Brasil já foram relatados dois surtos de pitiose ovina (TABOSA et al., 2004) e três  
18 de pitiose bovina (GABRIEL et al., 2008; GRECCO et al., 2009; KONRADT et al.,  
19 2016), e em quatro surtos os animais realizaram pastoreio em águas estagnadas, como  
20 lagos artificiais nas propriedades (GABRIEL et al., 2008; GRECCO et al., 2009;  
21 TABOSA et al., 2004) e um dos surtos foi relacionado a um rio (KONRADT et al., 2016).

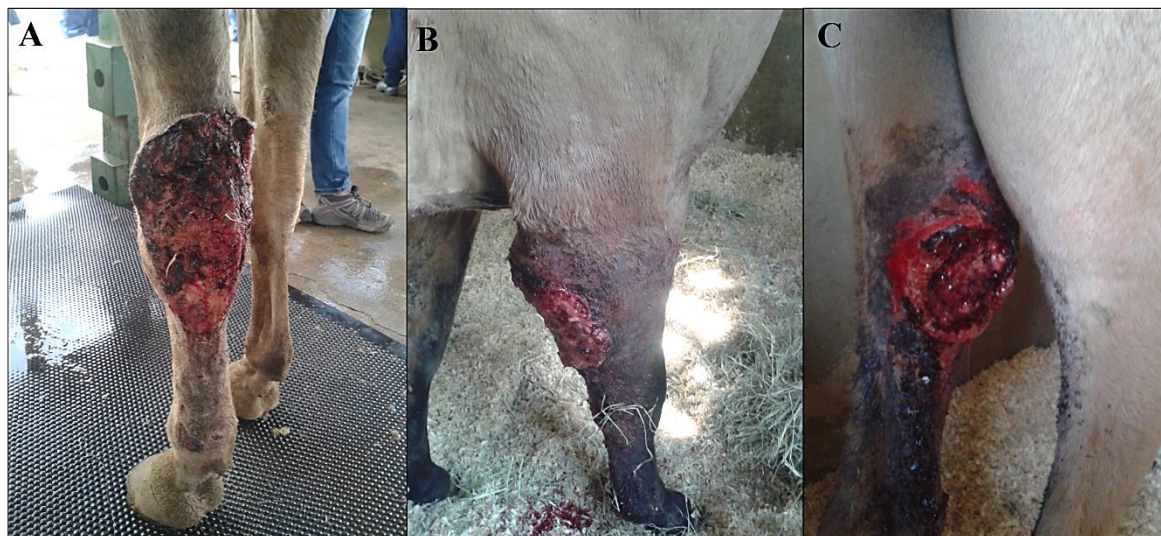
22

## 23 Sintomatologia

24 As infecções causadas por *P. insidiosum* em equinos afetam principalmente os  
25 tecidos cutâneos e subcutâneos. As lesões normalmente são únicas e localizadas nas  
26 porções distais dos membros, principalmente dos posteriores e na região ventral do  
27 abdômen caracterizadas por seu crescimento lento, insidioso e de forma circular,  
28 formando grandes granulomas ulcerados com até 50 cm de diâmetro (Figura 7)  
29 (MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012; SALLIS et al., 2003; WATANABE et al.,  
30 2015). Essas áreas são mais afetadas por serem mais susceptíveis a lesões traumáticas e  
31 por ficarem em contato com a água no momento em que os animais entram nos açudes,

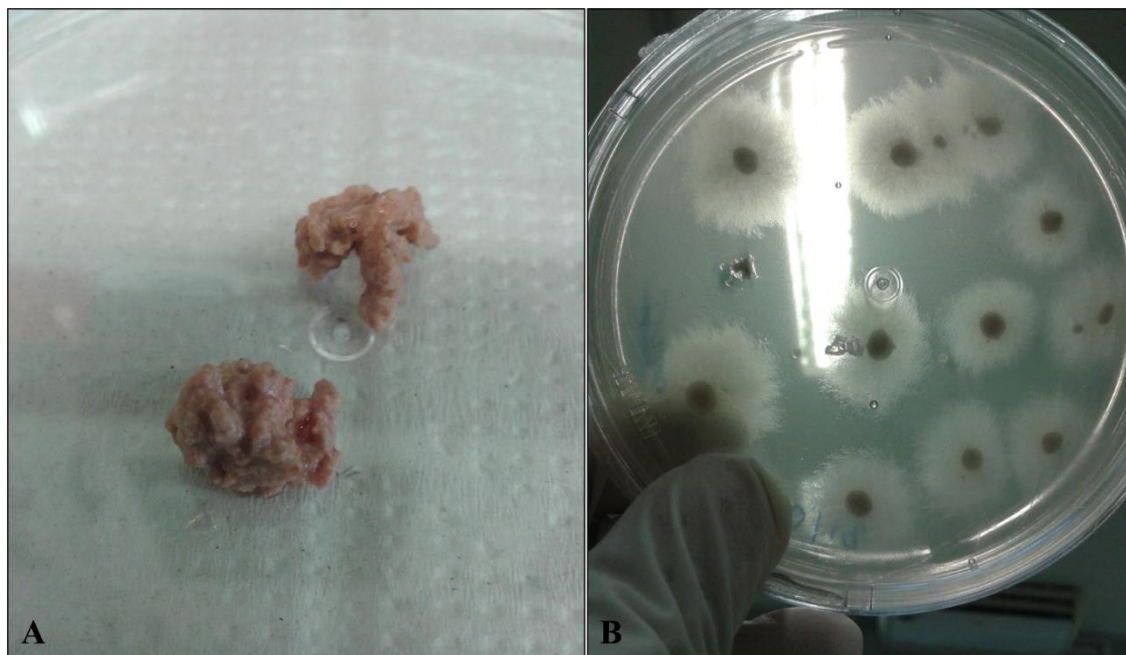


- 1 lagoas para beber água ou pastar a vegetação que brota nesses locais (SALAS et al., 2012;
- 2 SALLIS et al., 2003).



3  
4 **Figura 7.** Lesões únicas e granulomatosas localizadas em membros de equinos ocasionadas por *P.*  
5 *insidiosum*. Arquivo pessoal.

6 Exclusivamente na espécie equina, há a formação de material necrótico cinza-  
7 amarelo acinzentado, chamados de ‘*kunkers*’, localizados nos tecidos e fístulas de  
8 drenagem com tamanho de até 2 cm (Figura 2A). Os *kunkers* são formados pela  
9 degranulação de eosinófilos sobre as hifas invasivas de *P. insidiosum*. Novos eosinófilos  
10 degranulam sobre os velhos e a massa estrutural cresce em tamanho. Em casos de pitiose  
11 crônica, o único local onde as hifas de *P. insidiosum* podem ser encontradas é dentro dos  
12 *kunkers*, sendo o material de escolha para diagnóstico de pitiose equina (Figura 2B)  
13 (CHAFFIN et al., 1995; GAASTRA et al., 2010; LEAL et al., 2001; MENDOZA et al.,  
14 1996).



1  
 2 **Figura 8.** A) ‘Kunkers’ oriundos de lesões de um equino com diagnóstico de pitiose; B) Colônias de *P.*  
 3 *insidiosum* após 48 horas do cultivo de fragmentos de ‘kunkers’ em ágar Sabouraud dextrose 4% mantidos  
 4 a 37°C. Arquivo pessoal.

5 A pitiose equina apresenta prurido intenso e emagrecimento progressivo dos animais  
 6 acometidos (REIS JR. et al., 2003). Formas incomuns foram relatadas, com envolvimento  
 7 ósseo (ALFARO e MENDOZA, 1990), intestinal (ALLISON e GILLIS, 1990; BROWN  
 8 e ROBERTS, 1988) e pulmonar (GOAD, 1984). Pitiose sistêmica foi relatada em três  
 9 equinos no Brasil acometendo diversos órgãos, como glândula mamária, fígado, pulmão,  
 10 septos nasais, nódulos linfáticos e baço (REIS JR. et al., 2003).

11 Em humanos as principais formas de manifestações clínicas da doença são  
 12 cutânea/subcutânea, vascular, ocular e disseminada (KRAJAEJUN et al., 2006;  
 13 PERMPALUNG et al., 2019). As lesões cutâneas/subcutâneas são caracterizadas por  
 14 edema crônico, nódulo e úlcera infiltrativa granulomatosa, principalmente nos membros  
 15 inferiores (BOSCO et al., 2005; MARQUES et al., 2006; KRAJAEJUN et al., 2006). As  
 16 apresentações clínicas nos casos de pitiose vascular variaram de claudicação intermitente  
 17 a ulceração gangrenosa, úlcera crônica, necrose nos dedos dos pés, massa pulsátil e  
 18 isquemia aguda dos membros. Outros sintomas relatados são febre, parestesia, prurido,  
 19 vesícula/bolha, úlcera cutânea, celulite, edema nas pernas, ausência de pulso arterial,  
 20 massa na virilha (aneurisma ilíaco ou femoral) e massa abdominal (aneurisma da aorta)  
 21 (KRAJAEJUN et al., 2006; SERMSATHANASAWADI et al., 2015). A pitiose vascular  
 22 em humanos na Tailândia apresenta predisposição em pacientes com anemia hemolítica

1 crônica; sendo a beta-talassemia a doença subjacente mais comum (PUPAIBOOL et al.,  
2 2006; SERMSATHANASAWADI et al., 2015).

3 Nos casos de pitiose ocular os pacientes geralmente apresentam úlcera de córnea ou  
4 queratite. Outros sinais incluíram dor, irritação, diminuição da acuidade visual, fotofobia,  
5 edema palpebral, e infiltrados corneanos (HASIKA et al., 2019; KRAJAEJUN et al.,  
6 2006). Casos de pitiose disseminada em humanos são raramente descritos (CALVANO  
7 et al., 2011; FARMER et al., 2015; KRAJAEJUN et al., 2006; PERMPALUNG et al.,  
8 2019).

9 Os cães são a segunda espécie animal mais acometida, e a doença é caracterizada  
10 pelo desenvolvimento de lesões cutâneas/subcutâneas e/ou gastrointestinais, com raros  
11 casos relatados de cães desenvolvendo as duas formas (PEREIRA et al., 2010). Cães com  
12 pitiose gastrointestinal desenvolvem espessamento segmentar focal ou multifocal grave  
13 e/ou massas granulomatosas expansíveis envolvendo o estômago, intestino delgado,  
14 cólon, reto e, algumas vezes esôfago. Os sinais clínicos associados incluem perda de peso,  
15 vômitos, diarreia, hematoquesia, tenesmo, perda de peso, dor abdominal, aumento dos  
16 linfonodos mesentéricos, múltiplos nódulos firmes no reto e no cólon descendente e,  
17 raramente na próstata (BERRYESSA et al., 2008; FERNANDES et al., 2012; JAEGER  
18 et al., 2002; PEREIRA et al., 2010; REAGAN et al., 2019; RODRIGUES et al., 2006;  
19 TROST et al., 2009). A forma gastrointestinal é grave e frequentemente fatal, pois a  
20 localização e extensão da lesão frequentemente impedem a ressecção cirúrgica completa  
21 (BERRYESSA et al., 2008; REAGAN et al., 2019; TROST et al., 2009).

22 A pitiose cutânea e/ou subcutânea é a segunda forma mais relatada em cães, com  
23 lesões ulceradas e pruriginosas na derme, febre e linfadenopatia (GROOTERS, 2003;  
24 OLDENHOFF et al., 2014; PEREIRA et al., 2010; TORRES-NETO et al., 2009;  
25 TORRES et al., 2014).

26 Em animais de produção, a pitiose já foi relatada em bovinos, ovinos e caprinos. Nos  
27 bovinos as lesões cutâneas são caracterizadas por edemas perilesionais, claudicações  
28 (SANTOS et al., 2011), ou lesões ulceradas (KONRADT et al., 2016), apresentando  
29 inicialmente pequenas áreas alopécicas e deprimidas de aspecto hemorrágico que ao  
30 evoluírem tornam-se áreas ulceradas, úmidas, hiperêmicas ou hemorrágicas, de tamanhos  
31 variados, podendo chegar a 15cm no seu eixo maior (GRECCO et al., 2009), que

1 desaparecem espontaneamente no período máximo de 90 dias (GRECCO et al., 2009;  
2 KONRADT et al., 2016; SANTOS et al., 2011).

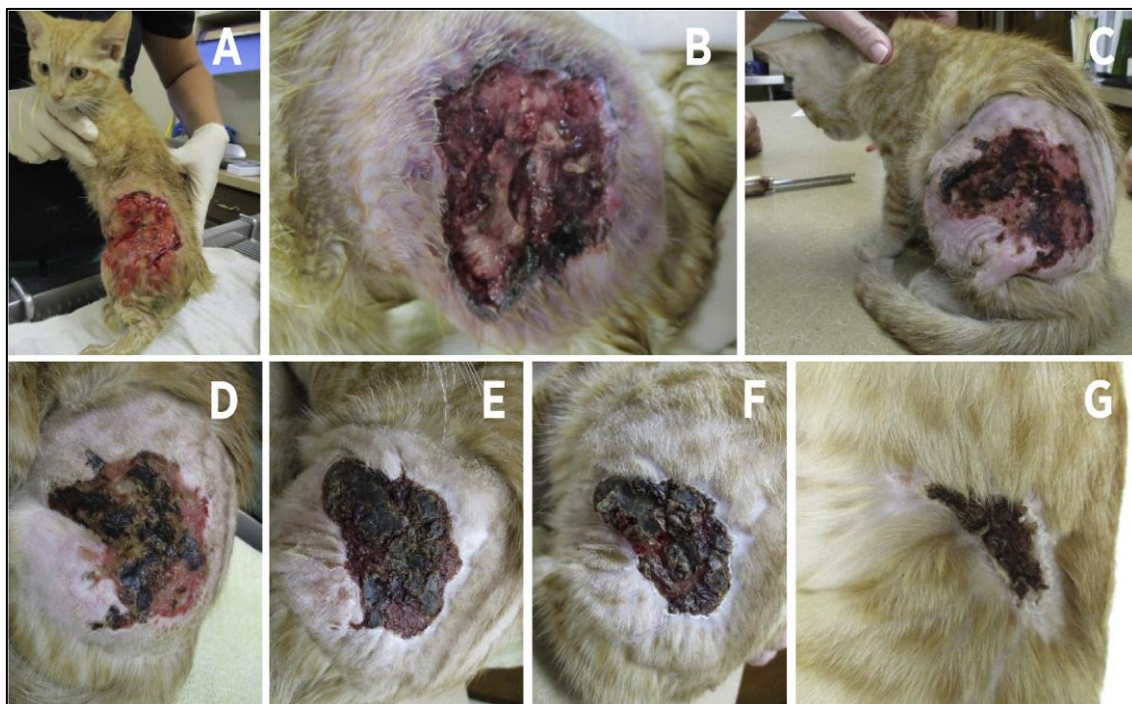
3 Em ovinos os sinais clínicos incluem aumento de volume e úlceras na região do  
4 vestíbulo nasal, com presença de secreção serosanguinolenta bilateral, fístula oronasal,  
5 aumento dos linfonodos retrofaríngeos, anorexia, epistaxe leve e intermitente, e  
6 acentuada deformidade nasal, sendo esta condição frequentemente confundida com  
7 conidiobolomicose causada por *Conidiobolus lamprauges* (CARRERA et al., 2013;  
8 SANTURIO et al., 2008; SILVA et al., 2007). A forma gastrointestinal foi relatada em  
9 dois cordeiros (PESSOA et al., 2012). Em surto de pitiose que acometeu 46 ovelhas  
10 provenientes de dois rebanhos no Nordeste brasileiro, os sinais clínicos foram  
11 caracterizados por lesões ulcerativas nos membros, abdômen ventral e região pré-capular.  
12 Nódulos multifocais no pulmão foram encontrados em dois dos quatro ovinos submetidos  
13 a necropsia (TABOSA et al., 2004).

14 Em Patos, Paraíba foi relatado o primeiro caso de pitiose em caprinos. O animal que  
15 tinha acesso diário a ambiente aquático, apresentou claudicação e perda de peso  
16 associados a uma lesão cutânea ulcerativa, exsudativa e pruriginosa no membro posterior  
17 esquerdo (CARMO et al., 2015).

18 A pitiose é considerada rara em felinos domésticos (GROOTERS, 2003), sendo  
19 relatada em quatro gatos com massas cutâneas e subcutâneas após levantamento de casos  
20 no Laboratório de Diagnóstico Médico Veterinário da Louisiana (DUNCAN et al., 1992).  
21 Posteriormente foi relatado o caso de um felino apresentando massa nasal e retrobulbar  
22 (BISSONNETTE et al., 1991), um caso com massa sublingual (FORTIN et al., 2017) e  
23 dois casos com pitiose intestinal (RAKICH et al., 2005). Recentemente foi relatado um  
24 caso incomum em felino com apresentação clínica de grande lesão cutânea ulcerativa,  
25 pruriginosa, redonda e de rápido crescimento causadas por *P. insidiosum*, com cura  
26 clínica após tratamento cirurgia e imunoterapia (Figura 9) (DOWST et al., 2019).

27 No Brasil, a pitiose felina foi relatada recentemente no estado do Mato Grosso em  
28 uma gata que apresentava massa invasiva próxima à região anal. O animal foi submetido  
29 à cirurgia e observou-se que essa massa envolvia o reto e aderências também foram  
30 observadas às estruturas adjacentes. A gatinha morreu no período pós operatório, sendo  
31 então realizada a necrópsia. Exames histopatológicos evidenciaram presença de hifas e o

1 diagnóstico foi confirmado por biologia molecular e imuno-histoquímica (SOARES et  
 2 al., 2019)



3  
 4 **Figura 9.** As imagens A e B mostram a lesão após a remoção do tecido necrosado (antes da imunoterapia).  
 5 As imagens de C a G mostraram o gato nas semanas seguintes após a primeira imunoterapia com *Pythium*,  
 6 com formação de tecido saudável ao redor da lesão. Adaptado de Dowst et al. (2019).

7 Em animais selvagens, infecções por *P. insidiosum* foram relatadas causando massa  
 8 abdominal em um tigre de Bengala (*Panthera tigris tigris*) na Flórida (BUERGELT et al.  
 9 2006), e massa multilobular com fibrose extensa e numerosos focos necróticos no lobo  
 10 esquerdo do pulmão em uma onça-pintada (*Pantera onca*) na América Central (CAMUS  
 11 et al., 2004). Em camelídeos foram relatados quatro casos até o momento, um causando  
 12 pitiose gástrica em um camelo (*Bactrianus Camelus*) mantido em cativeiro (HECK et al.,  
 13 2018), dois dromedários (*Camelus dromedarius*) com pitiose vulvar com emagrecimento  
 14 progressivo (VIDELA et al., 2012), e um caso de um dromedários (*C. dromedarius*) que  
 15 desenvolveu pitiose cutânea, gástrica e linfática (WELLEHAN et al., 2004).

16 Em aves pitiose foi relatada causando ulcerações multifocais na pele das asas,  
 17 pescoço, cabeça e membros de uma caraúna-de-cara-branca (*Plegadis chihi*) na  
 18 Califórnia (PESAVENTO et al., 2008) e em um avestruz (*Struthio camelus*) no Brasil  
 19 com disfagia causada pela obstrução da mucosa do esôfago (SOUTO et al., 2019).

20

## 1        **Importância econômica da pitiose equina no Brasil**

2        O Brasil possui o quarto maior rebanho equino do mundo, com mais de cinco milhões  
3 de cabeças, segundo dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e  
4 Agricultura (FAO), com distribuição semelhante entre as mesorregiões do Brasil, Sudeste  
5 (1.373.299), Nordeste (1.340.456), Centro-Oeste (1.140.957), Norte (981.739) e Sul  
6 (915.347) (IBGE, 2018).

7        As regiões brasileiras com maior prevalência de casos de pitiose equina são o  
8 Pantanal (LEAL et al., 2001; SANTOS et al., 2014; SANTOS et al., 2011) e os Pampas  
9 do Rio Grande do Sul (MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012; WEIBLEN et al., 2015)  
10 acarretando prejuízos significativos aos produtores (MORAES et al., 2013). Em  
11 levantamento no semiárido do Brasil sobre as dermatopatias mais frequentemente  
12 diagnosticadas em equídeos, a pitiose foi a doença de pele com maior frequência,  
13 representando 24,38% dos casos diagnósticos (PESSOA et al., 2014). No Rio Grande do  
14 Sul a pitiose representou 16,5% dos casos (63/435) (MARCOLONGO-PEREIRA et al.,  
15 2012).

16        Comparando os custos entre animais de produção, as perdas econômicas com a  
17 pitiose equina são maiores quando comparadas a pitiose bovina, pois normalmente os  
18 bovinos apresentam cura espontânea com remissão total das lesões entre três semanas a  
19 três meses, sem qualquer registro de perda de escore corporal (SANTOS et al., 2011).  
20 Nos equinos, no entanto as lesões que inicialmente são circunscritas, à medida que  
21 cronificam tornam-se elípticas com superfície central projetada, friáveis e com secreções  
22 serosanguinolentas, apresentando focos necróticos com extração de *kunkers* com dois a  
23 20 mm (Figura 6) (CHAFFIN et al., 1995; MENDOZA et al., 1996). Os sintomas podem  
24 evoluir, em três a sete meses, para grave caquexia que normalmente antecede as mortes,  
25 apresentando taxas de letalidade de 45,45% (SANTOS et al., 2011). Desta forma, quando  
26 as lesões são causadas por *P. insidiosum* e não são diagnosticadas e tratadas  
27 precocemente, as perdas econômicas podem ser maiores pois devido a agressividade da  
28 doença o animal geralmente evolui para o óbito (BANDEIRA et al., 2009; REIS JR. et  
29 al., 2003; SOUTO et al., 2016; VIANA, I et al., 2020).



1

2 **Figura 6.** Equino com lesão ulcerada causada por *P. insidiosum* acometendo parte do lábio superior e fossa  
3 nasal com presença de *kunkers* (seta). Adaptado de Romero et al. (2019).

4 Além disso, as chances de recidivas são frequentemente relatadas na literatura,  
5 dobrando os custos com o tratamento veterinário, e com diminuição da produção  
6 enquanto o animal se recupera (REIS JR. et al., 2003; SANTOS et al., 2011b). O  
7 tratamento em muitos casos é longo, chegando a 12 meses (MARCOLONGO-PEREIRA  
8 et al., 2012; ZARO et al., 2018), e em muitos casos é necessário a eutanásia (BANDEIRA  
9 et al., 2009; MEIRELES et al., 1993; REIS JR. et al., 2003; SANTOS et al., SOUTO et  
10 al., 2016).

11

## 12 Diagnóstico laboratorial

13 A pitiose é uma doença infecciosa de distribuição mundial, provavelmente  
14 subdiagnosticada, levando a alta mortalidade quando tratada como infecções fúngicas  
15 invasivas que não respondem adequadamente às terapias tradicionais (HILTON et al.,  
16 2016; MARQUES et al., 2006). Embora o diagnóstico diferencial seja crucial, a maioria  
17 dos laboratoristas não estão familiarizados com as técnicas de cultura necessárias para  
18 identificar o patógeno e o rápido crescimento bacteriano de amostras com infecção

1 bacteriana secundária muitas vezes impede o isolamento de *P. insidiosum* (GROOTERS  
2 et al., 2002b).

3 Para o diagnóstico da pitiose empregam-se as técnicas de cultivo, histopatologia,  
4 imuno-histoquímica, sorologia e técnicas moleculares (BOSCO et al., 2005; GAASTRA  
5 et al., 2010; GROOTERS e GEE, 2002; LOHNOO et al., 2019; RAKICH et al., 2005).  
6 *P. insidiosum* apresenta rápido crescimento em vários meios de cultura como, ágar fubá,  
7 ágar Sabouraud dextrose, ágar-chocolate, ágar-sangue e ágar de infusão de coração, tanto  
8 a 37°C quanto a 28°C (MENDOZA et al., 1996; VANITTANAKOM et al., 2004). Porém  
9 não cresce em ágar Mycosel<sup>®</sup>, devido aos antimicrobianos presentes em sua formulação,  
10 destacando-se a ciclohexamida (VANITTANAKOM et al., 2004).

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

20 As lesões histológicas causadas por *P. insidiosum* se caracterizaram por reação  
21 piogranulomatosa com áreas centrais de necrose, com granulomas infiltrados e/ou  
22 circundados por eosinófilos, acompanhados de um menor número de neutrófilos,  
23 macrófagos epitelióides, plasmócitos e células gigantes multinucleadas (TROST et al.,  
24 2009). Os cortes apresentam bons resultados quando corados pela técnica de metenamina  
25 nitrato de prata de Grocott- Gomori (GMS), com visualização das hifas com ramificações  
26 irregulares, raras septações e diâmetro de 4-10µm (HEADLEY e ARRUDA-JUNIOR,  
27 2004; RAKICH et al., 2005; TROST et al., 2009) e não apresentam boa coloração com  
28 hematoxilina-eosina (HE) (SUPABANDHU et al., 2008; TROST et al., 2009).

29 As características histológicas de *P. insidiosum* são semelhantes à lagenidiose  
30 (*Lagenidium giganteum*) e fungos Entomophthorales e Mucorales, apesar de serem  
31 causadas por organismos filogeneticamente distintos, tornando-as difíceis de distinguir



1 das hifas destes microrganismos apenas pela análise morfológica (GROOTERS, 2003;  
2 GROOTERS et al., 2002b; KAUFMAN, 1998; MENDOZA et al., 2004).

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

10 O diagnóstico sorológico pode ser realizado por imunodifusão e ELISA (Enzyme  
11 Linked Immunosorbent Assay), frequentemente utilizados no diagnóstico de pitiose  
12 humana (KRAJAEJUN et al., 2002). Em 2002 foi padronizada a técnica ELISA  
13 específica para pitiose canina (GROOTERS et al., 2002a) para monitorar a resposta  
14 imunológica à terapia médica ou cirúrgica nesta espécie (BERRYESSA et al., 2008;  
15 GROOTERS et al., 2002a; HUMMEL et al., 2011; PEREIRA et al., 2013),  
16 posteriormente modificada para o diagnóstico sorológico em felinos (RAKICH et al.,  
17 2005). Foi desenvolvido um teste imunocromatográfico utilizando a proteína bacteriana  
18 A/G, para detectar IgGs anti-*P. insidiosum* em humanos e animais (cães, cavalos, coelhos  
19 e bovinos). Os testes proporcionaram 100% de especificidade, e 90,6% de sensibilidade  
20 (INTARAMAT et al., 2016).

21 Na tentativa de aumentar a especificidade dos testes histológicos para *P. insidiosum*,  
22 Inkomlue et al. (2016) desenvolveram uma técnica imunohistoquímica baseada na  
23 detecção de anticorpos anti-ELI025 produzidos em coelhos. ELI025 é uma proteína do  
24 grupo das elicitinas, imunogênica e específica de *P. insidiosum* (LERKSUTHIRAT et al.,  
25 2015), descoberta recentemente após análises do transcriptoma de *P. insidiosum*  
26 (KRAJAEJUN et al., 2014). A especificidade de detecção, assim como a sensibilidade,  
27 e valores preditivos positivos e negativos do teste foram determinados como 100%, sendo  
28 adequada para detecção específica do oomiceto em tecidos (INKOMLUE et al., 2016).

29

30 **Diagnóstico molecular da pitiose**

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

9 Em 2015 foi proposta uma qPCR (*quantitative real-time PCR*) padronizada para a  
10 detecção de *P. insidiosum* utilizando iniciadores moleculares derivados da região gênica  
11 exo-1,3-b-glucanase (PinsEXO1). Foram utilizadas 29 culturas obtidos de 22 amostras  
12 clínicas de humanos, quatro isolados ambientais e duas amostras provenientes de animais  
13 (01 equino e 01 larva de mosquito). O ensaio apresentou 100% de sensibilidade e  
14 especificidade para detecção de *P. insidiosum*, sendo aplicável em análises quantitativas  
15 de DNA e estudos epidemiológicos. (KEERATIJARUT et al., 2015).

16 A técnica de qPCR é um excelente método para o diagnóstico de patógenos, pois  
17 possui a capacidade de detectar e quantificar os ácidos nucléicos em uma ampla gama de  
18 amostras clínicas (BUSTIN et al., 2009). O processo de detecção na qPCR apresenta um  
19 diferencial em relação aos demais ensaios de PCR, pois não necessita de manipulação  
20 pós-amplificação, devido os sinais fluorescentes serem diretamente detectados à medida  
21 que a amplificação do DNA ocorre, e os resultados são obtidos em uma hora, ou menos,  
22 com alta sensibilidade e especificidade (ESPY et al., 2006; MACKAY, 2004).

23 Em 2017 houve a padronização de uma PCR-multiplex (RUJIRAWAT et al., 2017)  
24 utilizando os iniciadores moleculares universais para fungos ITS1 e ITS4 (WHITE et al.,  
25 1990), juntamente com iniciadores moleculares anti-sense sintetizados durante a  
26 pesquisa, que proporcionaram a identificação de SNPs (*Single Nucleotide*  
27 *Polymorphisms*) na região do rDNA. Por meio dessa técnica, além de se detectar o  
28 patógeno em determinada amostra, é possível a diferenciação de *P. insidiosum* aos  
29 diferentes clados filogenéticos (RUJIRAWAT et al., 2017).

30 Recentemente foi padronizada uma qPCR-HRM (*High Resolution Melting-curve*)  
31 para a diferenciação de isolados de *P. insidiosum* em clados filogenéticos a partir da  
32 amplificação da subunidade II do gene mitocondrial do citocromo c oxidase (COX II)

1 (WORASILCHAI et al., 2018). A *High Resolution Melting-curve* (HRM) foi  
2 desenvolvida em 2002 pela Universidade de Utah (USA) e a empresa Idaho Technology  
3 (USA), cuja finalidade é a amplificação do DNA na presença de corante intercalante,  
4 emitindo a fluorescência durante a formação controlada do *amplicon*. Este processo  
5 resulta em uma curva de dissociação (*melting*), que depende principalmente do conteúdo  
6 de guanina e citosina (GC), comprimento e a sequência do produto de PCR. Está é uma  
7 técnica simples e econômica que pode ser usada para genotipagem ou detecção de SNP's  
8 sem a necessidade de sequenciamento (ERALI et al., 2008; REED e WITTWER, 2004).

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

16

## 17 Diagnósticos diferenciais para pitiose equina

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

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

30 Casos de pitiose inicialmente diagnosticados e tratados como infecções fúngicas são  
31 descritos na literatura (BOSCO et al., 2005; MARQUES et al., 2006; MENDOZA et al.,

1 2004). Em Minas Gerais, Brasil, foi relatado o caso em uma égua com uma lesão na região  
2 inguinal do membro posterior direito, apresentando um curso clínico de,  
3 aproximadamente, 10 meses de evolução, nos quais, durante os seis primeiros meses foi  
4 tratado apenas para habronemose cutânea. Nos últimos quatro meses o animal recebeu  
5 imunoterapia para *P. insidiosum* após diagnóstico clínico, apresentando melhora clínica  
6 no final do tratamento, no entanto, o animal emagreceu, abortou e, posteriormente, foi a  
7 óbito (MACIEL et al., 2008).

8

### 9 Habronemose cutânea

10 A habronemose cutânea é uma enfermidade causada pela penetração errática de  
11 larvas de terceiro estágio dos nematódeos *Habronema microstoma*, *H. muscae* ou  
12 *Draschia megastoma* em regiões do corpo dos equídeos, como o canto medial do olho,  
13 pênis, prepúcio e feridas preexistentes (FIRMINO et al., 2016; SALLIS et al., 2003).

14 O ciclo de vida do parasita é composto pelos hospedeiros primários, os equídeos e  
15 hospedeiros intermediários, as moscas (principalmente *Musca domestica*, *M. autumnalis*  
16 e *Stomoxys calcitrans*). Os vermes adultos são geralmente encontrados nos estômagos  
17 dos equídeos, onde são produzidos os ovos, e após a movimentação pelo trato alimentar  
18 são excretados pelas fezes. As larvas do nematóide são ingeridas por larvas de moscas, e  
19 após duas mudanças, tornam-se infectantes (L3) na fase adulta da mosca. Enquanto as  
20 moscas se alimentam as larvas do verme do estômago migram para aparelho bucal da  
21 mosca, e são depositadas geralmente perto da boca, lábios ou feridas do hospedeiro  
22 primário (cavalo). As larvas então são ingeridas pelo cavalo e são capazes de completar  
23 seu ciclo de vida. No entanto, quando as larvas penetram regiões oculares, descargas  
24 nasais, ou descargas purulentas de feridas, desenvolvem as formas de habronemose  
25 conjuntival ou cutânea, devido a não conclusão do ciclo de vida do parasita (PUGH et al.,  
26 2014).

27 A habronemose possui distribuição sazonal, ocorrendo predominantemente na  
28 primavera e no verão, coincidindo com a maior atividade das moscas. Os sinais clínicos  
29 incluem feridas não cicatrizantes, ulceração de áreas úmidas, prurido intenso e a formação  
30 de tecido granulomatoso exuberante no local (PUGH et al., 2014; PUSTERLA et al.,  
31 2003). Estas lesões são circulares, com superfície ulcerada, e ao corte há um tecido

1 esbranquiçado com áreas focais branco amareladas e ocasionalmente focos  
2 mineralizados, que podem ser confundidos com *kunkers* (SALLIS et al., 2003). A  
3 confusão entre os diagnósticos e início tardio do tratamento correto da pitiose  
4 frequentemente leva a um prognóstico ruim e morte do animal (MACIEL et al., 2008).

5

## 6 **Zigomicose cutânea**

7 Anteriormente conhecidas como ficomicoses, a pitiose e as micoses causadas pelos  
8 fungos *Conidiobolus coronatus* e *Basidiobolus ranarum*, constituem um grupo de  
9 afecções micóticas de estreita semelhança anatomopatológica que acometem pele e tecido  
10 subcutâneo, e eventualmente trato digestivo e respiratório de equinos (MILLER, 1983;  
11 MILLER e CAMPBELL, 1982; RODRIGUES e LUVIZOTTO, 2000; SANTOS e  
12 LONDERO, 1974).

13 Recentes atualizações taxonômicas propuseram um novo filo para os fungos  
14 tradicionalmente tratados na ordem Entomophthorales, pertencentes agora ao filo  
15 Entomophthoromycota (HUMBER, 2012). O gênero *Conidiobolus* está atualmente  
16 classificado no filo Entomophthorales, classe Entomophthoromycetes, ordem  
17 Entomophthorales, família Ancylistaceae. O gênero *Basidiobolus* foi incluído no mesmo  
18 filo, porém em uma classe exclusiva denominada Basidiobolomycetes, ordem  
19 Basidiobolales, família Basidiobolaceae (HUMBER, 2012).

20 O termo zigomicose que caracterizava as doenças causadas por fungos das ordens  
21 Entomophthorales e Mucorales está obsoleto, sendo recomendado as designações da  
22 enfermidade de acordo com a sua etiologia, como entomofthoromicose ou mucormicose  
23 (KWON-CHUNG, 2012; MENDOZA et al., 2015).

24 *Conidiobolus* spp. são fungos saprófitos isolados do solo, de fontes vegetais, com  
25 várias espécies patógenos de insetos, e algumas de mamíferos (*C. coronatus*, *C.*  
26 *incongruus* e *C. lamprauges*) (VILELA e MENDOZA, 2018). As micoses causadas por  
27 *C. coronatus* em equinos são caracterizadas por massas granulomatosas ulcerativas nas  
28 narina e/ou cavidades nasais, frequentemente associada a secreção nasal bilateral,  
29 hemorrágica e mucopurulenta (BARRANTES-MURILLO et al., 2016; FRENCH et al.,  
30 1985; KORENEK et al., 1994; MENDOZA e ALFARO, 1985; ROBINSON et al., 2007;  
31 TAINTOR et al., 2004; ZAMOS et al., 1996).

1 As formas de infecção por conídios de *C. coronatus* na espécie equina foi descrita  
2 por MILLER (1983), relatando três possíveis mecanismos: 1) contato direto com esporos  
3 no solo resultando em lesões nas narinas; 2) descarga ativa de conídios diretamente no  
4 nariz causando lesões na cavidade nasal ou 3) inalação passiva de conídios. Devido aos  
5 hábitos dos cavalos, frequentemente os animais são expostos a fontes de contaminação  
6 enquanto pastejam e as narinas estão próximas ao chão, porém o desenvolvimento da  
7 enfermidade depende da suscetibilidade individual do animal (MILLER, 1983).

8 *C. lamprauges* é um fungo frequentemente relacionada a infecções nasofaciais em  
9 ovinos (FURLAN et al., 2010; PAULA et al., 2010; PEIXOTO et al., 2017), mas já foi  
10 descrito causando infecção nasal em equinos desenvolvendo uma grande massa fibrosa e  
11 granulomatosa, contendo numerosos nódulos semelhantes a *kunkers* no interior da lesão  
12 (HUMBER et al., 1989).

13 As lesões causadas por *Basidiobolus ranarum* confundem-se frequentemente com  
14 pitiose porque as lesões são granulomatosas e ulceradas, com exsudação  
15 serossanguinolenta e formam pequenos grânulos semelhantes a *kunkers* no local. As áreas  
16 mais afetadas são pescoço, pernas, região abdominal e genital, e a presença de prurido é  
17 um achado comum nos animais (MENDOZA e ALFARO, 1985; MILLER e POTT, 1980;  
18 OWENS et al., 1985). O desenvolvimento das lesões está relacionado a suscetibilidade  
19 imunológica individual e possivelmente a presença prévia de ferimentos (MILLER, 1983;  
20 MILLER e POTT, 1980).

21 Mucormicose cutânea é rara em equinos, sendo relatados apenas dois casos até o  
22 momento, ambos causados por *Absidia corymberea*: um associado a coinfecção por *A.*  
23 *fumigatus* (GUILLOT et al., 2000), e outro com sintomatologia clínica semelhante à  
24 pitiose (LÓPEZ-SANROMÁN et al., 2000).

25

26

## 27 Sarcóide equino

28 Os sarcóides equinos são tumores de pele fibroblásticos, não metastáticos, localmente  
29 agressivos. São os tumores de pele mais comuns na espécie equina, com prevalência de  
30 1% a 8% em todo o mundo (KNOTTENBELT, 2005; ZACHARY e MCGAVIN, 2013).

1 São causados por papilomavírus bovino tipo 1 ou 2 (OTTEN et al., 1993), e mais  
2 recentemente implicado também o tipo 13, todos pertencentes ao gênero  
3 *Deltapapillomavirus* (LUNARDI et al., 2013).

4 O sarcóide equino pode ser classificado de acordo com o aspecto clínico, em seis  
5 categorias: verrucoso, fibroblástico, nodular, misto, oculto e maligno (KNOTTENBELT,  
6 2005). Os membros são os sítios anatômicos mais acometidos, e independentemente da  
7 localização, a forma mais comum é a fibroblástica, que podem crescer acentuadamente e  
8 ser confundido com outras lesões de pele, como tecido de granulação exuberante,  
9 habronemose e/ou pitiose (BRUM et al., 2010). O sarcóide fibroblástico normalmente  
10 apresenta forma pedunculada, ulcerada, sangrando facilmente após mínimo traumatismo.  
11 Podem aumentar rapidamente e atingir dimensões consideráveis em poucas semanas, e  
12 tornar-se estático por anos. Estes tumores raramente regridem e muitas vezes recidivam  
13 após a terapia (KNOTTENBELT e PASCOE, 1998).

14

## 15 Tratamento

16 Em equinos os principais tratamentos utilizados incluem, associados ou não, cirurgia,  
17 imunoterapia e a administração de iodeto de potássio ou Anfotericina B (CHAFFIN et  
18 al., 1995; SANTURIO et al., 2006; WATANABE et al., 2015). O tratamento cirúrgico é  
19 o tratamento de escolha para os casos em que as estruturas vitais, como nervos, vasos e  
20 tendões não estão comprometidos e a excisão radical pode ser realizada com conforto,  
21 associado ou não a cauterização (DÓRIA et al., 2015; MENDOZA et al., 1996; MILLER,  
22 1981; MOSBAH et al., 2012). Apesar de apresentar boa aceitação na prática veterinária,  
23 os resultados das cirurgias são limitados, com altas chances de recidivas em equinos  
24 quando não retirado todo tecido acometido, e o animal geralmente submetido a eutanásia  
25 (MENDOZA et al., 1996; MOSBAH et al., 2012; REIS JR. et al., 2003, WATANABE et  
26 al., 2015).

27 A localização, comumente nos membros inferiores, associado a extensão e tempo de  
28 desenvolvimento da lesão, podem comprometer articulações e/ou ossos e impossibilitar  
29 a ressecção completa uma lesão, e/ou impedir a realização do tratamento cirúrgico  
30 (CHAFFIN et al., 1995; DÓRIA et al., 2015; MOSBAH et al., 2012; ROMERO et al.,  
31 2019; WATANABE et al., 2015; WHITE et al., 2008). A imunoterapia como forma de

1 tratamento para pitiose equina foi proposto em 1981, na época denominada hifomicose  
2 equina, em associação com o tratamento cirúrgico, demonstrando cura em 52,5% dos  
3 animais tratados apenas com o preparado de hifas e 30% curados com aplicação do  
4 imunoterápico após à cirurgia mal sucedida (MILLER, 1981). As preparações  
5 imunoterápicas propostas por Miller (1981) com modificações e Mendoza & Alfaro  
6 (1986) foram testadas em 71 cavalos na Costa Rica por Mendoza et al. (1992). O antígeno  
7 concentrado solúvel (MENDOZA e ALFARO, 1986) apresentou melhores resultados,  
8 pois permaneceu estável após 18 meses de preparação, apresentou pouca inflamação no  
9 local de aplicação, e cura nos equinos em seus estágios iniciais da enfermidade  
10 (MENDOZA et al., 1992).

11 A imunoterapia demonstrou ser segura, tanto em humanos como em animais, com  
12 cura ~60% dos hospedeiros tratados, e em 100% em casos tratados na fase inicial  
13 (MENDOZA e NEWTON, 2005). No Brasil, o Laboratório de Pesquisas Micológicas  
14 (LAPEMI) da Universidade Federal de Santa Maria em parceria com a Empresa  
15 Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) desenvolveram no ano de 2000 a  
16 vacina PithiumVac<sup>®</sup> para tratamento da pitiose equina, que se mostrou eficaz quando  
17 utilizada no início da infecção (BANDEIRA et al., 2009; SALLIS et al., 2003; SAMPAIO  
18 et al., 2016; SANTOS et al., 2011b, 2011a; SANTOS et al., 2011; ZARO et al., 2018)  
19 com crescente adoção pelo setor produtivo (MORAES et al., 2013).

20 Os mecanismos pelos quais a imunoterapia atua contra *P. insidiosum* são baseados  
21 principalmente na resposta celular, apresentando mudança da resposta inicial eosinofílica  
22 Th2 para mononuclear Th1, após eficiente apresentação de antígenos a linfócitos e  
23 macrófagos mononucleares que não foram apresentados adequadamente durante a  
24 infecção natural (MENDOZA et al., 2003; MENDOZA e NEWTON, 2005;  
25 THITITHANYANONT et al., 1998). Recentemente demonstrou-se em camundongos que  
26 a atividade imune desencadeada pelo imunoterápico PitiumVac<sup>®</sup> promoveu uma resposta  
27 Th1 e Th17, com aumento dos níveis das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-6 e IL-10 no soro  
28 dos animais testados, possivelmente relacionado ao conteúdo de (1,3) (1,6)- $\beta$ -glucanos  
29 identificados na composição do imunoterápico PitiumVac<sup>®</sup> (TONDOLO et al., 2020).

30 Apesar da aparência morfológica com fungos, *P. insidiosum* apresenta várias  
31 diferenças frente aos organismos do Reino Fungi, dentre a elas a ausência de ergosterol  
32 em sua membrana plasmática, explicando a resistência a maioria dos antifúngicos  
33 (MENDOZA e NEWTON, 2005). Casos de sucesso terapêutico em cães com uso de



1 itraconazol e terbinafina associados a corticoides (REAGAN et al., 2019), outros  
2 antifúngicos (HUMMEL et al., 2011) e imunoterapia (PEREIRA et al., 2013) foram  
3 relatados na literatura, mas ainda sem reprodutibilidade eficiente na prática veterinária.

4 Em equinos o tratamento quimioterápico consiste principalmente no uso de iodeto de  
5 potássio ou Anfotericina B, associados a cirurgia ou imunoterapia (CHAFFIN et al.,  
6 1995; WATANABE et al., 2015). O tratamento da pitiose equina com iodeto de potássio  
7 são relatados, mas com resultados clínicos contraditórios (MEIRELES et al., 1993;  
8 MENDOZA et al., 1996; SALOMÃO-NASCIMENTO et al., 2010; WATANABE et al.,  
9 2015).

10 O uso da anfotericina B por via sistêmica além de não atingir a concentração  
11 terapêuticamente eficaz no local da infecção, apresenta alto custo e pode causar  
12 nefrotoxicidade ao animal, limitando seu uso na rotina veterinária (CHAFFIN et al., 1995).  
13 Em uma pequena série de casos, a associação de 50mg de anfotericina B sob perfusão  
14 intravenosa regional de membro (IRLP; intravenous regional limb perfusion), após  
15 excisão cirúrgica e termocauterização apresentou bons resultados no tratamento de pitiose  
16 cutânea, com 92% (11/12) de remissão das lesões em 35 ou 60 dias após 1 ou 2  
17 tratamentos, respectivamente (DÓRIA et al., 2012). Ao associar o tratamento IRPL com  
18 solução de dimetilsulfóxido (DMSO) a 10% após excisão cirúrgica e termocauterização,  
19 os resultados foram satisfatórios, com resolução completa da lesão entre 6 a 9 semanas  
20 após um único tratamento IRLP nos 15 cavalos tratados (100%), sem complicações  
21 sistêmicas ou locais (DÓRIA et al., 2015).

22 Tratamentos alternativos vem sendo propostos, visto que ainda não há consenso  
23 sobre o tratamento de escolha para pitiose equina. A Terapia fotodinâmica mostrou-se  
24 promissora em estudo *in vitro* com taxa de inibição de 100% de inativação de hifas de *P.*  
25 *insidiosum* em 60 minutos de incubação com fotossensibilizador Fotoditazina (clorina)  
26 (PIRES et al., 2013; 2014). O tratamento com administração de 50 mg do corticosteroide  
27 sintético triancinolona acetona via intramuscular, quinzenalmente já foi relatado com  
28 sucesso no tratamento de pitiose cutânea (ROMERO et al., 2019), com regressão total da  
29 lesão até 60 dias após o início do tratamento (CARDONA-ÁLVAREZ et al., 2016).

30

31

32

## CAPÍTULO 2 – TRABALHO CIENTÍFICO

“Trabalho a ser enviado para a revista “Transboundary and Emerging Diseases”

As normas de submissão encontram-se disponíveis em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/18651682/homepage/ForAuthors.html>

### **Outbreak of equine pythiosis in a southeastern region of Brazil: environmental isolation and phylogeny**

#### **Outbreak of equine pythiosis**

Giselle Souza da Paz<sup>1</sup>, Gabriel Gasparini Camargo<sup>2</sup>, Eduardo Cury<sup>3</sup>, Emanuel Vitor

Pereira Apolonio<sup>1</sup>, Hans Garcia Garces<sup>2</sup>, Ana Carolina do Prado<sup>2</sup>, Jessica Luana

Chechi<sup>2</sup>, Alana Lucena<sup>1</sup>, Marcos Jun Watanabe<sup>1</sup>, Eduardo Bagagli<sup>2</sup>, Sandra de Moraes

Gimenes Bosco<sup>1,2\*</sup>

1- *UNESP* Univ Estadual Paulista, School of Veterinary Medicine and Animal  
Science, Brazil

2- *UNESP* Univ Estadual Paulista, Biosciences Institute, Brazil

3- Autonomous veterinarian, Brazil

\* Corresponding author:

Address: Laboratório de Micologia Médica, Depto. de Microbiologia e Imunologia,

Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista

Rua Dr. Plinio Pinto e Silva, S/N, Distrito de Rubião Jr., Zip code: 18618-681, Botucatu,

São Paulo, Brazil. Phone: (+55) 14-38800434

E-mail: [sandra.bosco@unesp.br](mailto:sandra.bosco@unesp.br)

## 1 SUMMARY

2           Pythiosis is a disease caused by the oomycete *Pythium insidiosum*, mainly  
3 reported in equines, dogs, and humans and directly transmitted through contaminant  
4 zoospores in aquatic environments. We report the first outbreak of equine pythiosis in  
5 five equines from three rural properties that had the Tietê River bank in common as the  
6 possible contamination source. Wound samples were submitted for diagnostic testing  
7 including mycological culture and nested PCR. Treatment approaches consisted of  
8 conventional and alternative therapies. Microbiological analyses were performed using  
9 water samples from the riverbanks close to where the animals had grazed. All animals  
10 were positive for *P. insidiosum* cultures, and two animals responded successfully to  
11 alternative therapy (ozone-therapy). After culture and molecular analysis of  
12 environmental samples, the presence of *P. insidiosum* in one section of the Tietê River  
13 was confirmed through a 99% sequence identity. Phylogenetic analyses using the  
14 cytochrome-oxidase II gene showed that the animal isolates clustered in clade I and the  
15 environmental isolates clustered in clade III. Although the environmental and clinical  
16 isolates belonged to different genetic clades, we concluded that the Tietê River is an  
17 important source of infection by *P. insidiosum* in nonhuman animals as well as in humans  
18 and that research concerning environmental isolation of *P. insidiosum* from rivers and  
19 lakes should be strongly facilitated in Brazil.

20 **Keywords:** horse, ecological microbiology, ozone-therapy, oomycetes, *Pythium*  
21 *insidiosum*

22

23

24

25

## 1 INTRODUCTION

2 Pythiosis is a disease that frequently affects equines, canines, and humans and is  
3 caused by the oomycete *P. insidiosum*, a fungus-like organism that has received increased  
4 recent attention in medical mycology (Gaastra et al., 2010). Infections by *P. insidiosum*  
5 occur in aquatic environments such as swamps and flooded fields through penetration of  
6 biflagellate zoospores into damaged tissues. The zoospores adhere to the tissue and, after  
7 encysting, begin germinative tube production, which corresponds to the beginning of  
8 hyphae formation, the parasitic form that promotes tissue destruction (Mendoza et al.,  
9 1993).

10 Phylogenetically, *P. insidiosum* is divided into three clades: I (American strains),  
11 II (American, Asiatic, Australian, and Thai strains), and III (American and Thai strains)  
12 (Schurko et al., 2003; Kammarnjesadakul et al., 2011). Sequences derived from the  
13 internal transcribed spacer (ITS) of ribosomal RNA (rDNA), cytochrome oxidase subunit  
14 II gene (COX II, mitochondrial DNA), and exo-1,3- $\beta$ -glucanase gene have been used to  
15 analyze phylogenetic relationships between *P. insidiosum* isolates, but COXII has been  
16 reported as the ideal choice for phylogenetic differentiation (Kammarnjesadakul et al.,  
17 2011; Azevedo et al., 2012; Ribeiro et al., 2017).

18 In equines, pythiosis occurs in cutaneous and/or subcutaneous forms, developing  
19 granulomatous wounds with irregular borders, especially on limbs, the thorax, and the  
20 abdomen, with intense serosanguineous discharges (Mendoza et al., 1996). The wounds  
21 evolve quickly and can be characterized by the presence of necrotic yellow tissue, called  
22 “kunkers,” which are clusters of hyphae and inflammatory cells. Some cases of the  
23 disease may evolve to progressive loss of weight of the animal, leading to death (Santos  
24 et al., 2011; Watanabe et al., 2015).

1           Pythiosis outbreaks have previously been reported in ovines (Tabosa et al., 2004),  
2   bovines (Pérez et al., 2005; Konradt et al., 2016), and humans (Thanathanee et al., 2013).  
3   Despite several cases reported in equine species, especially in the Pantanal region of  
4   Brazil, reports of equine outbreaks are scarce in the literature. Thus, we aimed to report  
5   the occurrence of a pythiosis outbreak in five equines, related to the Tietê River in the  
6   midwestern region of the state of São Paulo, and to discuss its epidemiological  
7   implications as well as the diagnosis, clinical outcome, and phylogenetic analysis of the  
8   *P. insidiosum* isolates.

9

## 10   MATERIALS AND METHODS

11           In May 2018, a pythiosis outbreak that affected five equines (4 females and one  
12   male) with ulcerative wounds was identified. The animals were from three farms located  
13   on the margins of the Tietê River.

14           After the diagnosis of pythiosis was confirmed, a survey to collect data from  
15   clinical cases and microbiological analysis of the possible source of contamination was  
16   performed. All related diagnostic procedures were approved by the Ethics Committee on  
17   Animal Use (CEUA) of the School of Veterinary Medicine and Animal Science, UNESP,  
18   Botucatu, under protocol No 0189/2017.

19

### 20           Culture and molecular diagnosis by nested-PCR

21           Clinical samples were transferred to 50 mL sterile conical tubes and were washed  
22   at least 3 times in sterile saline solution with cloranfenicol (50 µg/mL). Half of the  
23   material was destined for culture, and the other half was kept in DNase- and RNase-free  
24   microtubes at 20 °C until DNA extraction.

1 For culture, the “kunkers” were trimmed with a scalpel blade in fragments of 2  
2 mm sizes, seeded on Petri dishes with Sabouraud 4% dextrose agar, incubated at 37 °C,  
3 and evaluated daily. Colonies that resembled *P. insidiosum*, that is they exhibited  
4 macroscopical aspects such as a cream color and a membranous appearance, along with  
5 a microscopic evaluation showing cenocytic and thick hyphae, and without fruiting  
6 bodies, were re-isolated in Sabouraud dextrose agar for mycological and molecular  
7 evaluation.

8 The clinical samples (“kunkers” and tissue, 25 mg), which were kept at -20 °C,  
9 were ground with liquid nitrogen in a pestle mortar to form a fine powder, which was  
10 then subjected to DNA extraction using the commercial kit NucleoSpin® Tissue  
11 (Macherey-Nagel, Germany), according to the manufacturer’s instructions. Nested PCR  
12 reactions were carried out in 10 pmol/L outer primers, ITS1 (5’-  
13 TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3’) and ITS2P (5’-CCGCTTCACTCGCCGTTACT-  
14 3’), and inner primers, *Pi1* (5’-TTCGTCTGAAGCGGACTGCT-3’) and *Pi2* (5’-  
15 GCCGTACAACCCGAGAGTCATA-3’), which created and amplified a 105 bp  
16 fragment, specific for *P. insidiosum* (Grooters and Gee, 2002). PCR was performed in a  
17 Veriti Thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, USA) with Go-taq Master Mix  
18 (Promega). Molecular identification was performed using BLASTn  
19 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) from the National Center for Biotechnology  
20 Information (NCBI) database.

21

## 22 Environmental Analysis

23 To isolate *P. insidiosum* from the environment, water samples were collected from  
24 different points of the Tietê river bank, close to where the equines had grazed. The

1 samples were collected in 250 mL amber glass sterile bottles, according to the protocol  
2 described by Supabandhu et al. (2008). Isolated samples with positive characteristics for  
3 *P. insidiosum* underwent DNA extraction using the protocol described by Van Burik et  
4 al. (1998), and were then subjected to PCR with universal primers for fungi ITS 4 (5'-  
5 TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') and ITS 5 (5'-  
6 GGAAGTAAAAGTCGTAACAACG-3') (White et al., 1990) using the same  
7 thermocycler and polymerase reaction kit described above. The amplicons were purified  
8 with the commercial kit DNA Illustra™ (GE Healthacare), and the sequencing reactions  
9 were performed for both strands in a 3500 analyzer (Applied Biosystems, Foster City,  
10 CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The electroferogram was edited  
11 using MEGA 7, and the identification of the species was performed using BLASTn  
12 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

13

## 14 Phylogenetic Analysis

15 Once the isolates were confirmed as *P. insidiosum*, they were subjected to PCR  
16 for amplification of the cytochrome oxidase subunit II (COX II) gene from mitochondrial  
17 DNA using primers FM 66 (5'-TAGGATTTCAAGATCCTGC-3') and FM58 (5'-CCA  
18 CAAATTTCACTACATTGA-3') (Villa et al., 2006). The PCR reactions, amplification,  
19 purification, and sequencing were performed as previously described for the ITS region.

20 Gene sequences of the COX II gene were used to construct a *P. insidiosum*  
21 phylogenetic tree in order to determine the phylogenetic position of the isolates. The  
22 sequence alignments were performed by Clustal W using the software Mega 7 (Kumar et  
23 al., 2016), and the maximum likelihood method (ML) was used for the construction of a

1 phylogenetic tree with the Tamura 3-parameter model with 1000 bootstrap repetitions  
2 (Tamura, 1992).

3 Strains from clades I, II, and III from the GenBank database were used for  
4 analyses together with our isolates. *Phytophthora sojae* (DQ071416) and *L. giganteum*  
5 (AF086697) were used as outgroups.

6

## 7 RESULTS

8 The equines were from three farms located at the margins of the Tietê River, with  
9 four cases (case numbers 1, 2, 3 and 5) from Botucatu/SP (22°41'04"S; 48°21'28"W) and  
10 one case (number 4) from São Manuel/SP (22°35'49"S; 48°26'31"W), which are neighbor  
11 cities located in the midwestern region of São Paulo, Brazil (Fig. 1).

### 12 Cases 1, 2, 3

13 Three mares that belonged to the same farm presented with ulcerative  
14 granulomatous wounds with kunkers two weeks after grazing close to the margins of the  
15 Tietê River. Case 1 presented with wounds on the chest approximately 8 cm in diameter.  
16 Case 2 presented with facial wounds on the outer surface of the left forelimb (Fig. 2A).  
17 Case 3 showed a wide wound on the inside of the right hindlimb (Fig. 2B) and was in the  
18 third semester of gestation. After diagnosis, the animals were administered with 2 doses  
19 of the subcutaneous vaccine PitiumVac<sup>®</sup> (LAPEMI/EMBRAPA, Brazil), once every  
20 fortnight, according to the instructions of the manufacturer.

21 Due to a lack of significant improvement, the animals were subjected to an  
22 experimental treatment comprising a 6-min long application of ozone gas by rectal  
23 insufflation in increasing concentrations, starting at 20 µg/mL, in addition to direct



1 applications to the lesion using syringes containing the gas at an initial concentration of  
2 30 µg/mL, which was then gradually increased depending on the sensitivity of the  
3 animals. Additionally, topical applications of ozonized sunflower oil were performed on  
4 the lesion, and intramuscular administration of 10 mL ozonized oil was performed twice  
5 a week.

6 The animal in case 1 showed significant improvement, with total regression of the  
7 wound after 1 month of treatment with ozone. The animal in case number 2 showed  
8 wound regressions from 40 cm to 10 cm after 4 months of treatment, and was submitted  
9 to excision surgery of the injured tissue. However, after surgery, the wound worsened,  
10 tripling in size within a week, and the animal that was in the third trimester of gestation  
11 succumbed to the illness, and its pregnancy was terminated. The animal in case number  
12 3 presented with total wound regression after 4 months of treatment, giving birth during  
13 this period with no further complications during delivery or suckling.

#### 14 Case 4

15 Case 4 involved a male animal, aged 1 year and 8 months, that was attended to at  
16 the Hospital of the School of Veterinary Medicine and Animal Sciences at  
17 UNESP/Botucatu, Brazil, and had a circular serosanguineous wound 8 x 6 cm in diameter  
18 on the scrotum area, showing kunkers and necrotic areas (Fig. 2C). According to the  
19 owner, the animal had grazed at the margins of the Tietê River, in a property located in  
20 São Manuel city, São Paulo.

21 Immediately after clinical suspicion, treatment was initiated with 67 mg/kg  
22 potassium iodide via oral ingestion, once per day for 12 days, and 1.1 mg/kg flunixin  
23 meglumine intramuscularly once daily for 4 days. The animal was submitted to surgery

1 in order to remove the injured tissue and was discharged after two weeks of internment,  
2 with daily cleaning of the wound and recommendations to avoid flooded areas.

3

#### 4 Case 5

5 Case number 5 was an adult mare that had a granulomatous circular lesion for two  
6 weeks in the abdominal region, with serosanguineous exudates and necrotic areas with  
7 kunkers in a deep part of the lesion (Fig. 2D). The farm was located in Botucatu near the  
8 farm of cases 1, 2, and 3, and the animal had also grazed at the margins of the Tietê River,  
9 and eventually entered the water. The microbiological culture showed contamination and  
10 was discarded, but infection by *P. insidiosum* was confirmed via nested-PCR of the  
11 kunkers. After diagnosis, there was no further information on this animal.

12

#### 13 Environmental isolates

14 Sequencing of the isolate obtained from the water source near case 4 showed 99%  
15 similarity with the KX369614.1 deposited sequence of *P. insidiosum*, while the isolate  
16 obtained from the water in cases 1, 2, 3, and 5 showed 99% similarity with the ITS region  
17 of the deposited sequence of *Pythium* spp., accession number MK072650.1.

18

#### 19 Phylogenetic analysis

20 The sequences of the cox-II gene obtained from the clinical cases were deposited  
21 in the GenBank database under accession numbers MT818228 (case 3), MT818229 (case  
22 4), MT818230 (case 1), and MT818231 (case 2). Phylogenetic analysis demonstrated  
23 that isolates from cases 1, 2, 3, and 4 grouped in clade I, while the isolate of *P. insidiosum*

1 obtained from water, in case 4, grouped in phylogenetic clade III (Fig. 3), and the  
2 accession number of its cox-II sequence was MT939910.

3

#### 4 DISCUSSION

5 Pythiosis has a widespread distribution and is considered one of the most serious  
6 diseases caused by oomycetes in equines in Brazil. The role of environmental factors that  
7 limit or facilitate infection is still unknown (Machado et al., 2018). In the present study,  
8 we reported five cases of pythiosis in equines in May 2018 from three distinct properties  
9 located at the margins of the Tietê River (Figure 1, Table 1). According to the owners,  
10 the equines often grazed near the river before the wounds began to appear. The animals  
11 exhibited wounds on the limbs, abdomen, chest, and inguinal region, supporting previous  
12 reports that the limbs and ventral parts of the abdomen are the most commonly affected  
13 anatomic sites because of direct contact with water contaminated by *P. insidiosum*  
14 zoospores (Gaastra et al., 2010).

15 During April and May 2018, variables that could have influenced or altered the  
16 infectivity rate of aquatic pathogens in Botucatu and São Manuel cities, such as increases  
17 in temperature, air humidity level, and pluviosity, were not observed (CIIAGRO, 2018).  
18 It is believed that the proximity to the margins of the Tietê River may have facilitated  
19 infections by *P. insidiosum*, corroborating with Machado et al. (2018) that described  
20 infections in areas with low vegetal cover, similar to regions in which the equines in this  
21 study were found grazing.

22 Equine pythiosis has been recorded in all Brazilian regions, but most commonly  
23 in Pantanal, demonstrating a direct relationship to rainy seasons, from October to March  
24 (Leal et al., 2001). Most reports of equine pythiosis in Brazil refer to a survey of cases,

1 such as Santos et al. (2014), which reported 76 cases between 2007 and 2010 from  
2 Pantanal, a midwestern region of Brazil. Watanabe et al. (2015) reported a series of 28  
3 cases between 2007 and 2012 from different counties in the state of São Paulo in the  
4 Southeast region. Marcolongo-Pereira et al. (2012) reported 63 cases from 1970 to 2011  
5 in several counties in the state of Rio Grande do Sul in the south, and Souto et al. (2016)  
6 reported 156 cases from 1986 to 2015 in the northeastern region of Brazil. Interestingly,  
7 all of these findings were observed during long periods of evaluation and over a large  
8 geographical area, while our report describes five cases in equines over nine days in a  
9 limited geographic area represented by the margins of the Tietê River (Figure 1, Table 1).

10         Outbreaks of pythiosis have been reported in Brazil in sheep from the northeastern  
11 region (Piauí state, Tabosa et al., 2004) and in cattle from the Southeast and Pantanal  
12 regions (Gabriel et al., 2008; Grecco et al., 2009; Konradt et al., 2016). Among the  
13 outbreaks in cattle, two were related to the grazing of animals in stagnant water (Gabriel  
14 et al., 2008, Grecco et al., 2009) and one was linked to the presence of animals in a river  
15 with extensive marshy regions (Konradt et al., 2016), similar to the setting of the equines  
16 in the present report.

17         The Tietê River is crucial to the Southeast region of Brazil and is used as a source  
18 of hydroelectric power as well as for fishing, irrigation, navigation, leisure/recreation, and  
19 tourism (Correa et al., 2006). The Tietê River rises at an altitude of 1,030 m from the  
20 Serra do Mar, 22 km from the Atlantic Ocean, crosses the metropolitan region of the city  
21 of São Paulo, and continues into the countryside of the state, flowing into the Paraná  
22 River, over a course of almost 1,100 km (Castro et al., 2008). Along the margins of the  
23 Tietê River, the region of focus in this study, there are several residences of fishers and  
24 there are some houses that are rented on the weekends and holidays for family leisure and

1 recreation, thus representing an important risk of infection in humans and their pets as  
2 well.

3 We successfully cultured the isolates of all clinical cases reported herein, except  
4 case 5, which was contaminated, and thus obtaining a pure culture was not possible.  
5 Molecular identification was confirmed by CoxII gene sequences and phylogenetic  
6 analyses grouped the clinical isolates into clade I (Fig. 3), corroborating the findings of  
7 previous analyses that grouped clinical isolates from the American continent into clade I  
8 (Schurcko et al., 2003 a, b; Bosco et al., 2008).

9 After culture and molecular analyses, we confirmed the isolation of *P. insidiosum*  
10 and *Pythium* spp. in water samples from the Tietê River in São Manuel and Botucatu,  
11 respectively. The phylogenetic analysis of our environmental *P. insidiosum* isolate based  
12 on the CoxII gene grouped it into cluster III (Fig. 3).

13 Environmental studies of *P. insidiosum* are scarce. In Thailand, the first isolation  
14 of *P. insidiosum* from water samples in areas endemic for human pythiosis was reported  
15 by Supabandhu et al. (2008). Among the 59 isolates obtained from water sources, 41 were  
16 grouped into clade B (clade II of Schurcko's study) and 18 into clade C (clade III of  
17 Schurcko's study). Vanittanakom et al. (2014) reported the molecular detection of *P.*  
18 *insidiosum* in 81 soil samples collected from 25 different irrigation sources in which  
19 human pythiosis was endemic. Presser and Goss (2015) evaluated 19 lakes and ponds in  
20 North Central Florida, USA, and found positivity for *P. insidiosum* in 12 of them.  
21 Phylogenetical analysis of 45 environmental isolates showed that 20 isolates grouped into  
22 cluster I, 20 into cluster IV, and 5 into cluster III, based on the ITS region (Press and  
23 Goss, 2015). In the southern region of Brazil, Zambrano et al. (2017) evaluated 186 water  
24 samples from lakes and dams, with a previous history of pythiosis in animals, and found

1 22 isolates that belonged to genus *Pythium*, and only one was confirmed as *P. insidiosum*,  
2 as we have described here. The isolate reported in the Zambrano study has already been  
3 molecularly evaluated by ITS and CoxII phylogenetic analysis and grouped into cluster I  
4 (Azevedo et al., 2012). Despite Schurcko's study as well as the findings of Bosco et al.  
5 (2008), Kammarnjesadakul et al. (2011), and Azevedo et al. (2012), who demonstrated  
6 that isolates of *P. insidiosum* from the American continent group into clade I, the finding  
7 in the present study that the environmental isolate grouped into clade III corroborates with  
8 the study of Press and Goss (2015), which grouped five water isolates from the US into  
9 the same clade. Considering that only low amounts of water isolates of *P. insidiosum*  
10 from Brazil have been evaluated, which were studied with regard to the genetic group to  
11 which they belong, it is difficult to infer any conclusion about its genetic relationships.  
12 We believe that more than one phylogenetic clade may be circulating among water  
13 sources in Brazil, and that additional isolates from the environment are necessary to arrive  
14 at firm conclusions.

15 In equines, the treatment decision depends on the size and location of wounds  
16 (Chaffin et al., 1995; Watanabe et al., 2015, Mosbah et al., 2012). In early diagnostic  
17 cases, surgical excision was the treatment of choice, as performed in case number 4, in  
18 association with potassium iodide. However, in cases in which extensive wounds  
19 preclude the surgery, such as cases 2, 3, and 5, some alternative treatment is  
20 recommended, such as immunotherapy, administration of potassium iodide, and  
21 administration of antifungal agents such as amphotericin B in a 10% solution of  
22 dimethylsulfoxide by intravenous regional limb perfusion (IRLP) (Chaffin et al. 1995;  
23 Watanabe et al., 2015, Dória et al., 2015), but reports of therapeutic success are still  
24 scarce.

25 In the present study, the success of ozone therapy in two animals was related to

1 clinical experience. Despite the cellular mechanisms of action of medicinal ozone (O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub>)  
2 not being completely understood, its oxidizing, anti-inflammatory, and antimicrobial  
3 properties have previously been reported in the treatment of more than 50 diseases (Zeng  
4 and Lu, 2018). Borges et al. (2017) evaluated the effects of ozone on wound healing *in*  
5 *vitro* by scratching cell cultures of fibroblasts and observed that ozone induced wound  
6 closure in all cellular lineages of fibroblasts. The authors also tested the inhibitory effects  
7 on *Candida albicans* and found a stronger association of ozone with chlorhexidine  
8 (Borges et al., 2017). Ouf et al. (2016) investigated the effects of gaseous ozone and  
9 ozonized oil on dermatophyte fungi cultures and observed that ozonized oil was more  
10 efficacious in decreasing spore production, loss of enzyme production, and in increasing  
11 leakage of electrolytes and sugar. Few studies have been conducted on ozone therapy in  
12 fungi, and no study associated with oomycetes of medical interest was found in the  
13 literature. Thus, more studies are needed to evaluate the efficacy of medicinal ozone in  
14 *Pythium insidiosum*, both *in vitro* and *in vivo*, to ensure its potential as an alternative  
15 treatment to equine pythiosis.

16

## 17 ACKNOWLEDGMENTS

18 To São Paulo State Research Foundation - FAPESP (Grants 2018/08009-0 and  
19 2018/17596-7) for financial supported. This study was financed in part by the  
20 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) -  
21 Finance Code 001.

22

23

24

## 1 CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

2 The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for  
3 the content and the writing of the paper.

4

5

## 6 REFERENCES

7 Azevedo, M.I., Botton, S.A., Pereira, D.I.B., Robe, L.J., Jesus, F.P.K., Mahl, C.D., Costa,  
8 M.M., Alves, S.H., Santurio, J.M., 2012. Phylogenetic relationships of Brazilian  
9 isolates of *Pythium insidiosum* based on ITS rDNA and cytochrome oxidase II gene  
10 sequences. *Vet. Microbiol.* 159, 141–148. doi:10.1016/j.vetmic.2012.03.030

11 Bandeira, A.M.P., Santos, J.C.A., Melo, C.B. de, Andrade, V.G., Dantas, A.F.M., Araújo,  
12 J.A.S., 2009. Pitiose equina no estado de Sergipe, Brasil. *Ciência Veterinária nos*  
13 *Trópicos* 12, 46–54.

14 Bosco, S. de M.G., Bagagli, E., Araujo-Júnior, J.P., Candeias, J.M.G., Franco, M.F. De,  
15 Marques, M.E.A., Mendoza, L., Camargo, R.P. de, Marques, S.A., 2005. Human  
16 Pythiosis, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 715–718. doi:10.3201/eid1105.040943

17 Chaffin, M.K., Schumacher, J., McMullan, W.C., 1995. Cutaneous pythiosis in the horse.  
18 *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.* 11, 91–103. doi:10.1016/S0749-0739(17)30334-  
19 6

20 Gaastra, W., Lipman, L.J.A., Cock, A.W.A.M. De, Exel, T.K., Pegge, R.B.G.,  
21 Scheurwater, J., Vilela, R., Mendoza, L., 2010. *Pythium insidiosum*: An overview.  
22 *Vet. Microbiol.* 146, 1–16. doi:10.1016/j.vetmic.2010.07.019



- 1 Gabriel, A.L., Kommers, G.D., Trost, M.E., Barros, C.S.L., Pereira, D.B., Schwendler,  
2 S.E., Santurio, J.M., 2008. Surto de pitiose cutânea em bovinos. *Pesqui. Vet. Bras.*  
3 28, 583–587. doi:10.1590/S0100-736X2008001200003
- 4 Grecco, F.B., Schild, A.L., Quevedo, P., Assis-Brasil, N.D., Kommers, G.D.,  
5 Marcolongo-Pereira, C., Soares, M.P., 2009. Pitiose cutânea em bovinos na região  
6 Sul do Rio Grande do Sul. *Pesqui. Veterinária Bras.* 29, 938–942.  
7 doi:10.1590/s0100-736x2009001100013
- 8 Grooters, A.M., Gee, M.K., 2002. Development of a nested polymerase chain reaction  
9 assay for the detection and identification of *Pythium insidiosum*. *J. Vet. Intern. Med.*  
10 16, 147–152. doi:10.1892/0891-6640(2002)016<0147:doanpc>2.3.co;2
- 11 Kammarnjesadakul, P., Palaga, T., Sritunyalucksana, K., Mendoza, L., Krajaejun, T.,  
12 Vanittanakom, N., Tongchusak, S., Denduangboripant, J., Chindamporn, A., 2011.  
13 Phylogenetic analysis of *Pythium insidiosum* Thai strains using cytochrome oxidase  
14 II (COX II) DNA coding sequences and internal transcribed spacer regions (ITS).  
15 *Med. Mycol.* 49, 289–295. doi:10.3109/13693786.2010.511282
- 16 Konradt, G., Bassuino, D.M., Bianchi, M.V., Castro, L., Caprioli, R.A., Pavarini, S.P.,  
17 Santurio, J.M., Azevedo, M.I., Jesus, F.P., Driemeier, D., 2016. Pythiosis in calves:  
18 an epidemiologic, pathologic, serologic and molecular characterization. *Med.*  
19 *Mycol. Case Rep.* 14, 24–26. doi:10.1016/j.mmcr.2016.11.004
- 20 Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics  
21 analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874.  
22 doi:10.1093/molbev/msw054
- 23 Leal, A.B.M., Leal, A.T., Santurio, J.M., Glauca, D., 2001. Pitiose equina no pantanal  
24 brasileiro: aspectos clínico-patológicos de casos típicos e atípicos. *Pesqui.*

- 1 Veterinária Bras. 21, 151–156. doi:10.1590/S0100-736X2001000400005
- 2 Machado, G., Weiblen, C., Escobar, L.E., 2018. Potential distribution of *Pythium*  
3 *insidiosum* in Rio Grande do Sul, Brazil, and projections to neighbour countries.  
4 Transbound. Emerg. Dis. 65, 1–9. doi:10.1111/tbed.12925
- 5 Marques, S.A., Bagagli, E., Bosco, S.M.G., Camargo, R.M.P., Marques, M.E.A., 2006.  
6 *Pythium insidiosum*: relato do primeiro caso de infecção humana no Brasil. An. Bras.  
7 Dermatologia 81, 483–485. doi:10.1590/S0365-05962006000500012
- 8 Mendoza, L., Ajello, L., Mcginnis, M.R., 1996. Infections caused by the oomycetous  
9 pathogen *Pythium insidiosum*. J. Mycol. Med. 6, 151–164.
- 10 Mendoza, L., Hernandez, F., Ajello, L., 1993. Life cycle of the human and animal  
11 oomycete pathogen *Pythium insidiosum*. J. Clin. Microbiol. 31, 2967–2973.
- 12 Ouf, S.A., Moussa, T.A., Abd-Elmegeed, A.M., Eltahlawy, S.R., 2016. Anti-fungal  
13 potential of ozone against some dermatophytes. Brazilian J. Microbiol. 47, 697–702.  
14 doi:10.1016/j.bjm.2016.04.014
- 15 Pérez, R.C., Luis-León, J.J., Vivas, J.L., Mendoza, L., 2005. Epizootic cutaneous  
16 pythiosis in beef calves. Vet. Microbiol. 109, 121–128.  
17 doi:10.1016/j.vetmic.2005.04.020
- 18 Presser, J.W., Goss, E.M., 2015. Environmental sampling reveals that *Pythium*  
19 *insidiosum* is ubiquitous and genetically diverse in North Central Florida 674–683.  
20 doi:10.1093/mmy/myv054
- 21 Ribeiro, T.C., Weiblen, C., Azevedo, M.I., Botton, S. de A., Robe, L.J., Pereira, D.I.B.,  
22 Monteiro, D.U., Lorensetti, D.M., Santurio, J.M., 2017. Microevolutionary analyses  
23 of *Pythium insidiosum* isolates of Brazil and Thailand based on *exo-1*, 3- $\beta$ -glucanase

- 1 gene. *Infect. Genet. Evol.* 48, 58–63. doi:10.1016/j.meegid.2016.11.020
- 2 Santos, C.E.P., Santurio, J.M., Marques, L.C., 2011. Pitiose em animais de produção no  
3 Pantanal Matogrossense. *Pesqui. Veterinária Bras.* 31, 1083–1089.  
4 doi:10.1590/S0100-736X2011001200008
- 5 Schurko, A.M., Mendoza, L., Lévesque, C.A., Désaulniers, N.L., De Cock, A.W.A.M.,  
6 Klassen, G.R., 2003. A molecular phylogeny of *Pythium insidiosum*. *Mycologia*  
7 107, 537–544. doi:10.1017/S0953756203007718
- 8 Supabandhu, J., Fisher, M.C., Mendoza, L., Vanittanakom, N., 2008. Isolation and  
9 identification of the human pathogen *Pythium insidiosum* from environmental  
10 samples collected in Thai agricultural areas. *Med. Mycol.* 46, 41–52.  
11 doi:10.1080/13693780701513840
- 12 Tabosa, I.M., Riet-Correa, F., Nobre, V.M.T., Azevedo, E.O., Reis-Júnior, J.L.,  
13 Medeiros, R.M.T., 2004. Outbreaks of pythiosis in two flocks of sheep in  
14 Northeastern Brazil. *Vet. Pathol.* 41, 412–415. doi:10.1354/vp.41-4-412
- 15 Tamura, K., 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are  
16 strong transition-transversion and G+C-content biases. *Mol. Biol. Evol.* 9, 678–687.  
17 doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040752
- 18 Thanathanee, O., Enkvetchakul, O., Rangsin, R., Warasawapati, S., Samerpitak, K.,  
19 Suwan-Apichon, O., 2013. Outbreak of *Pythium* keratitis during rainy season: A  
20 case series. *Cornea* 32, 199–204. doi:10.1097/ICO.0b013e3182535841
- 21 Van Burik, J.A.H., Schreckhise, R.W., White, T.C., Bowden, R.A., Myerson, D., 1998.  
22 Comparison of six extraction techniques for isolation of DNA from filamentous  
23 fungi. *Med. Mycol.* 36, 299–303. doi:10.1046/j.1365-280X.1998.00161.x

- 1 Vanittanakom, N., Szekely, J., Khanthawong, S., 2014. Molecular detection of *Pythium*  
2 *insidiosum* from soil in Thai agricultural areas. Int. J. Med. Microbiol. 304, 321–  
3 326. doi:10.1016/j.ijmm.2013.11.016
- 4 Villa, N.O., Kageyama, K., Asano, T., Suga, H., 2006. Phylogenetic relationships of  
5 *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and  
6  $\beta$ -tubulin gene sequences. Mycologia 98, 410–422. doi:10.3852/mycologia.98.3.410
- 7 Watanabe, M.J., De Moura Alonso, J., Alves, A.L.G., Yamada, A.L.M., De Moraes  
8 Gimenes Bosco, S., Rodrigues, C.A., Hussni, C.A., 2015. Equine pythiosis: Report  
9 of 28 cases from São Paulo State, Brazil. Semin. Agrar. 36, 909–916.  
10 doi:10.5433/1679-0359.2015v36n2p909
- 11 Weiblen, C., Machado, G., Jesus, F.P.K. de, Santurio, J.M., Zanette, R.A., Pereira,  
12 D.S.B., Diehl, G.N., Santos, L.C. dos, Corbellini, L.G., Botton, S. de A., 2015.  
13 Seroprevalence of *Pythium insidiosum* infection in equine in Rio Grande do Sul,  
14 Brazil. Ciência Rural 46, 126–131. doi:10.1590/0103-8478cr20150056
- 15 White, T., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. Amplification and direct sequencing of  
16 fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, in: PCR Protocols: A Guide to  
17 Methods and Applications. Academic Press, San Diego, pp. 315–322.
- 18 Zambrano, C.G., Fonseca, A.O.S., Valente, J.S.S., Braga, C.Q., Sallis, E.S.V., Azevedo,  
19 M.I., Weiblen, C., Santurio, J.M., Botton, S.A., Pereira, D.I.B., 2017. Isolamento e  
20 caracterização de espécies de *Pythium* de ambientes aquáticos no Estado do Rio  
21 Grande do Sul e avaliação da patogenicidade em modelo experimental. Pesqui. Vet.  
22 Bras. 37, 459–464. doi:10.1590/S0100-736X2017000500006
- 23 Zeng, J., Lu, J., 2018. Mechanisms of action involved in ozone-therapy in skin diseases.  
24 Int. Immunopharmacol. 56, 235–241. doi:10.1016/j.intimp.2018.01.040

1 **TABLE**

2 **Table 1.** Description of characteristics of equines with pythiosis during outbreak in  
 3 Botucatu and São Manuel, SP, Brazil.

<b>Case</b>	<b>Date</b>	<b>Gender</b>	<b>City</b>	<b>Site of lesion</b>	<b>Diagnostic</b>	<b>Treatment</b>	<b>Outcome</b>
1	05/03/18	Female	Botucatu	Chest	Culture and nested-PCR	ozone-therapy	Remission
2	05/03/18	Female	Botucatu	Left thoracic limb	Culture and nested-PCR	ozone-therapy and surgery	Death
3	05/03/18	Female	Botucatu	Right pelvic limb	Culture e nested-PCR	ozone-therapy	Remission
4	05/05/18	Male	São Manuel	Scrotum	Culture and nested-PCR	Surgery and potassium iodide	Remission
5	05/12/18	Female	Botucatu	Abdômen	Nested-PCR	Unknown	Unknown

4

5

6

7

8

9

10

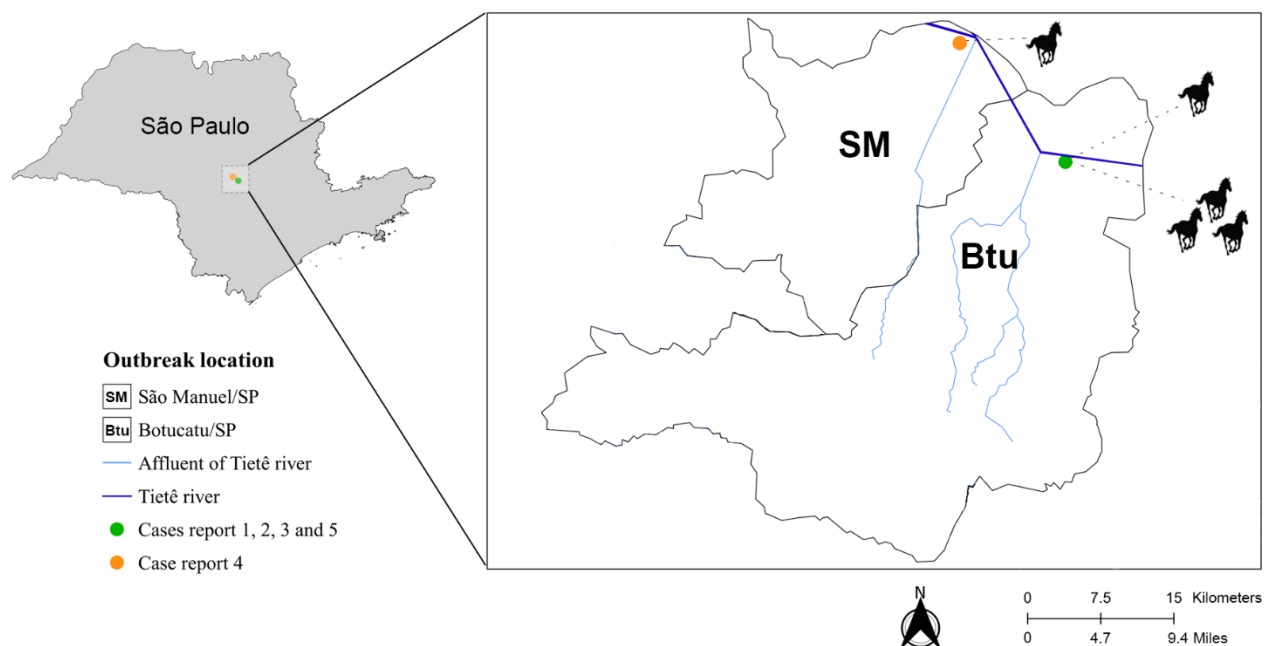
11

12

13

14

## 1 FIGURES



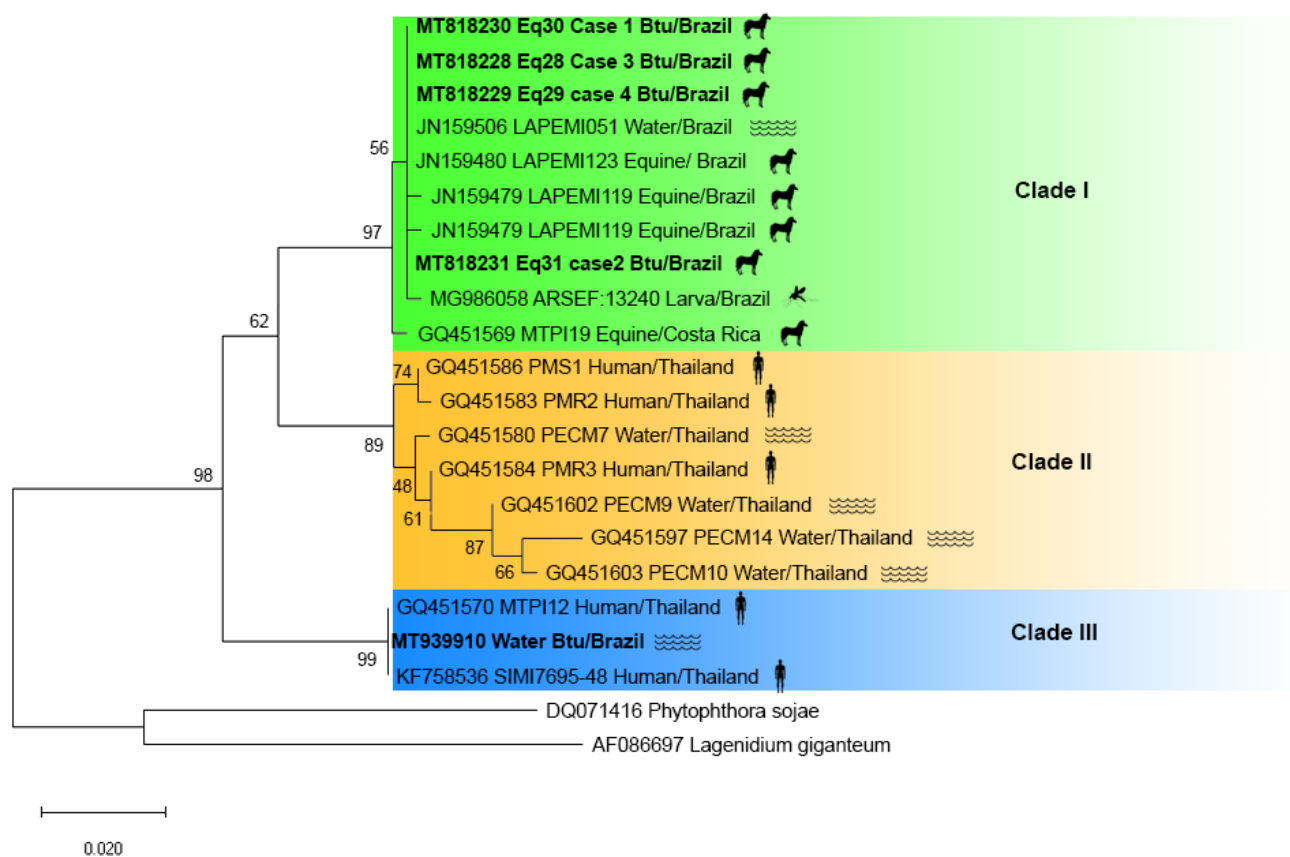
;

- 3 **Figure 1.** Distribution of the five cases of equine pythiosis outbreaks at the margins of the
- 4 Tietê River from Botucatu and São Manuel counties, São Paulo state, Brazil.



1

2 **Figure 2.** Granulomatous lesions caused by *P. insidiosum* in the left forelimb (A, case 2)  
3 and right hindlimb (B, case 3), scrotum (C, case 4), and abdominal region (D, case 5) of  
4 affected equines during the outbreak associated with the Tietê River.



2 **Figure 3.** Phylogenetic analysis of clinical and environmental isolates of *P. insidiosum*  
3 based on partial sequences of the mitochondrial DNA cytochrome oxidase II (COXII)  
4 gene. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method  
5 and Tamura 3-parameter model (Tamura, 1992). The tree with the highest log likelihood  
6 (-1183.95) is shown. The percentage of trees in which the associated taxa clustered  
7 together is shown next to the branches. Initial tree(s) for the heuristic search were obtained  
8 automatically by applying the Maximum Parsimony method. A discrete Gamma  
9 distribution was used to model evolutionary rate differences among sites (2 categories  
10 (+G, parameter = 0.0500). The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in  
11 the number of substitutions per site. This analysis involved 22 nucleotide sequences.  
12 There were a total of 427 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were  
13 conducted in MEGA X (Kumar et al., 2018).



## CAPÍTULO 3 – TRABALHO CIENTÍFICO

“Trabalho a ser enviado para a revista “Journal of Clinical Microbiology”

As normas de submissão encontram-se disponíveis em:

<https://jcm.asm.org/content/organization-and-format>

### **qPCR targeting the ELI025 gene to detect *Pythium insidiosum* in tissues**

#### **Detect the *P. insidiosum* in tissues by qPCR**

Giselle Souza da Paz<sup>a</sup>, Hans Garcia Garces<sup>b</sup>, Camila Dantas Malossi<sup>c</sup>, Jessica Luana Chechi<sup>2</sup>, Gabriel Gasparini Camargo<sup>b</sup>, Ana Carolina do Prado<sup>b</sup>, Eduardo Bagagli<sup>b</sup>, João Pessoa Araújo Jr.<sup>a,b,c</sup>, Sandra de Moraes Gimenes Bosco<sup>a,b#</sup>

a. *UNESP* Univ Estadual Paulista, School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Brazil

b. *UNESP* Univ Estadual Paulista, Institute of Biosciences, Brazil

c. *UNESP* Univ Estadual Paulista, Institute of Biotechnology, Brazil

# Corresponding author: [sandra.bosco@unesp.br](mailto:sandra.bosco@unesp.br)

## 1 ABSTRACT

2           Pythiosis is a severe granulomatous disease caused by the oomycete *Pythium*  
3 *insidiosum*. This disease is difficult and time-consuming to diagnose, and is frequently  
4 fatal to horses, dogs, and humans. We propose a quantitative polymerase chain reaction  
5 (qPCR) assay based on detection of the partial sequence of *ELI025*, a gene that encodes  
6 a glycoprotein secreted during pathogen infection and is unique to *P. insidiosum*. The  
7 method was standardized using 23 isolates of *P. insidiosum*, 18 fungi, 3 oomycetes no *P.*  
8 *insidiosum* and 2 bacteria. We evaluated 10 samples extracted from kunkers of the  
9 equines (n = 9) and tissue of the canine (n = 1) positive for pythiosis and thee tissues  
10 positives for others microorganisms. The qPCR limit of detection of up to 17 genome  
11 copies in 1 pg/μL. The sensitivity and specificity and accuracy by qPCR were 100%  
12 compared nested-PCR. ELI025 is a sensitive and specific molecular target for qPCR  
13 assay and can enable the early diagnosis of pythiosis in clinical samples.

14

## 15 INTRODUCTION

16           *Pythium insidiosum* is an oomycete belonging to the kingdom Stramenophila, which  
17 causes pythiosis, a granulomatous disease that affects humans and other animals, mainly  
18 horses and dogs (1, 2). Transmission occurs in aquatic environments via the penetration  
19 of *P. insidiosum* biflagellate zoospores into injured tissue of the mammals and birds (3–  
20 8).

21           In horses, pythiosis occurs mainly in cutaneous and subcutaneous forms, affecting  
22 the limbs, thorax, abdomen, neck, shoulders, genitalia, and head (9). Lesions are  
23 granulomatous and circular, presenting characteristic bloody exudation; symptoms of  
24 infection include intense itching, progressive weight loss, and death (4). Hard necrotic

1 masses known as kunkers, which are accumulations of hyphae and inflammatory cells,  
2 form inside the lesions (3, 10).

3 Classic methods for diagnosing this infection, such as culture and histopathological  
4 assessment, show some limitations, such as long time periods of days or weeks to perform  
5 the assays as well as low specificity, because of the morphological similarities of *P.*  
6 *insidiosum* with fungal hyphae (11–13). Although used for molecular diagnosis in clinical  
7 samples (14, 15), nested-polymerase chain reaction (PCR) presents disadvantages related  
8 to contamination introduced during manipulation of the amplified products and the need  
9 to perform agarose gel electrophoresis, which increases the assay time.

10 *Recently, genetic analyses* identified the small elicitor-like glycoprotein ELI025,  
11 which was unique to *P. insidiosum* (16) and an effective target for immunohistochemical  
12 diagnosis (17). This study was conducted to standardize a quantitative PCR (qPCR)  
13 technique for the early diagnosis of *P. insidiosum* using the ELI025 gene as a molecular  
14 target in clinical samples.

15

## 16 MATERIAL AND METHODS

### 17 Microorganisms

18 Twenty-three isolates of *P. insidiosum* belonging to the culture collection of the  
19 Laboratory of Medical Mycology, Department of Chemical and Biological Sciences,  
20 Institute of Biosciences of Botucatu/UNESP were used, the identities of which had  
21 previously been confirmed by genetic sequencing of the ITS-5.8S region (Table 1). In  
22 addition, 23 other microorganisms were used; they were previously identified based on

1 their morphological characteristics and genetic sequencing of the ITS-5.8S region for  
2 fungal and oomycete isolates, and the 18S region for bacteria.

3 We also evaluated 10 clinical samples (9 kunkers and 1 tissue; Table 1) from animals  
4 with a previously confirmed diagnosis of pythiosis by culture or nested-PCR and three  
5 samples (tissues) positives para others microorganisms (*Habronema muscae*, *Curvularia*  
6 spp. in tissue equine and *Cryptococcus* spp. in tissue canine). The samples were stored  
7 frozen at -20°C (10 samples) and in ethyl alcohol 95% at room temperature (3 samples  
8 for up to 2 years). All procedures were approved by the Ethics Committee on the use of  
9 Animals (*Comitê de Ética no Uso de Animais* - CEUA) of FMVZ/UNESP - Botucatu  
10 Campus, under Protocol 0189/2017, and followed the guidelines described by Bustin et  
11 al. (2009).

## 12 DNA extraction

13 Genomic DNA of the cultured microorganisms was extracted using the Puregene®  
14 Yeast/Bact Kit B (Qiagen, Hilden, Germany). Two colony fragments were collected and  
15 macerated in a crucible with liquid nitrogen; 1 mL of sterile saline solution (0.85%) was  
16 added and the mixture was transferred to a 2-mL microtube containing glass beads (425–  
17 600 microns, acid washed, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), followed by stirring in  
18 a Precellys 24 Tissue Homogenizer (Bertin Instruments, Montigny-le-Bretonneux,  
19 France). The supernatant was used for DNA extraction according to the manufacturer's  
20 instructions. DNA was eluted in 100 µL of Tris-HCl EDTA buffer and stored at -20°C.

21 The NucleoSpin® Tissue kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) was used for DNA  
22 extraction from the kunkers and tissue samples. Sample fragment (25 mg) were cut and  
23 fragmented using a scalpel blade, macerated in a crucible with liquid nitrogen, and  
24 transferred to a 1.5-mL microtube. DNA extraction was performed according to the

1 manufacturer's instructions. DNA was eluted in 50  $\mu$ L of Tris-HCl EDTA buffer and  
2 stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

3 DNA concentration and quality were analyzed with a NanoVue spectrophotometer  
4 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) at wavelengths of 260 and 280 nm. Only samples  
5 with 260/280 spectrophotometric ratios between 1.5 and 2.0 were further evaluated.  
6

### 7 Nested-PCR

8 To confirm the presence of amplifiable DNA from *P. insidiosum* in the samples,  
9 nested PCR was performed. The samples were previously amplified using the outer  
10 primers ITS1 and ITS2p, and then amplified again with the inner primers *Pi1* and *Pi2*  
11 which are specific for *P. insidiosum* (14). The reactions were performed in 0.2-mL  
12 microtubes in a volume of 25  $\mu$ L containing 10 ng genomic DNA, 1  $\mu$ L of each primer  
13 (10 pmol/ $\mu$ L), 7.5  $\mu$ L of ultrapure water, and 12.5  $\mu$ L GoTaq<sup>®</sup> Green Master Mix  
14 (Promega, Madison, WI, USA) in a Mastercycler gradient thermocycler (Eppendorf,  
15 Hamburg, Germany).

16 The amplified material was evaluated by electrophoresis on a 1.5% agarose gel. The  
17 amplified products (5  $\mu$ L) and 5  $\mu$ L of 100-base pair molecular weight marker  
18 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) were added to the wells of gel. Electrophoresis was  
19 performed in a horizontal tank containing 1X TBE (89 mM Tris-HCl, 89 mM boric acid,  
20 and 20 mM EDTA) at 100 V for 40 min. The gel was visualized with a UV light  
21 transilluminator and images were captured with a digital documentation system  
22 (VisionWorks<sup>®</sup> LS Analysis Software, Analytik, Jena, Germany).

23

24

## 1 Development of qPCR of the ELI025 target gene

### 2 Primer design

3 Were aligned 12 DNA sequences of the gene encoding elicitor-type proteins  
4 deposited in GenBank™: a sequence of 1425 base pair (bp) of *Phytophthora sojae*  
5 elicitor (SOL2C) (XM009531764.1), two sequences of the 673 bp and 654 bp de *Pythium*  
6 *oligandrum* elicitor-like (AB217820.1; AB217821.1) and ten ELI025 sequences of *P.*  
7 *insidiosum* with size between 354 a 1142 pb (Figure 1) using Mega software version  
8 7.0.26. After optimizing the best consensus region, sense (5'-TAC AAC GAG ACC AAG  
9 (C/G)CG TGC-3') and anti-sense (5'-GAG ACA CTG GTT CTT GC-3') oligonucleotides  
10 were designed. The Primer-BLAST™ online program  
11 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) was used to verify the specificity of the  
12 primer pair using the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database  
13 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) by comparing the nucleotide sequences and genomes of all  
14 available organisms. The presence of hairpins and formation of homodimers or  
15 heterodimers were evaluated using Oligoanalyzer software ([www.idtdna.com](http://www.idtdna.com)).

### 16 qPCR

17 qPCR was performed in duplicate in a thermocycler model 7300 PCR System  
18 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) after determining the best reaction  
19 conditions: 10 µL Gotaq qPCR Master Mix [2x] (Promega, Madison, WI, USA ), 0.6 µL  
20 each forward and reverse primers [300 nM], 0.18 µL of 30 µM Rox, 4 µL DNA template,  
21 and nuclease-free water (q.s.p). to a final volume of 20 µL. The reaction conditions were  
22 as follows: initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 40 cycles of 95°C for 30 s  
23 and 60°C for 30 s. A melting curve was generated with the following ramp conditions:

1 60–95°C to 0.1°C/s. Two negative controls (DNA/RNA-free water and a template-free  
2 reaction) were included in each run.

3

#### 4 Detection and specificity limit

5 The limit of detection of the qPCR assay was determined by testing eight 10-fold  
6 successive dilutions, based on the number of copies of *P. insidiosum* in 10 ng/μL of  
7 genomic DNA in five independent reactions. The number of copies of the genome was  
8 determined using the equation: Genome copy number = (m/GS) × (NA/Mbp) where **m**:  
9 mass of the model genomic DNA (1 × 10<sup>-8</sup> g); **GS**: *P. insidiosum* genome size (53 240  
10 000 base pair); **NA**: Avogadro's number (6,022 × 10<sup>23</sup> bp mol<sup>-1</sup>); **Mbp**: mass of a base  
11 pair (660 g mol<sup>-1</sup>) (19, 20). The limit of detection of the assays was defined as the lowest  
12 concentration at which all replicas were positive. A standard curve was generated from  
13 the Cq values and genomic DNA amounts of *P. insidiosum* (10<sup>1</sup> – 10<sup>-6</sup> ng/μL) to determine  
14 the R<sup>2</sup> of the test.

15 The specificity of the qPCR assay was determined by testing duplicate DNA samples  
16 from the following microorganisms: *Pythium monospermun* (n = 1), *P. aphanidermatum*  
17 (n = 1), *Pythium* spp. (n = 1), *Mucor fragilis* (n = 1), *Mucor circenelloides* (n = 3), *Mucor*  
18 *fuscus* (n = 1), *Rhizomucor irregulares* (n = 1), *Histoplasma suramericanum* (n = 1),  
19 *Curvularia havaianensis* (n = 1), *Trichosporon* spp. (n = 2), *Paracoccidioides brasiliensis*  
20 (n = 1), *Cryptococcus neoformans* (n = 1), and *Cryptococcus laurentii* (n = 2), *Candida*  
21 *albicans* (n = 1), *Candida krusei* (n = 1), *Candida parapsilosis* (n = 1), *Cyberlindnera*  
22 *rhodanensis*, *Sporothrix brasiliensis* (n = 1), *Sporothrix schenckii* (n = 1), *Trichophyton*  
23 *rubrum* (n = 1), *Microsporum canis* (n = 1), *Salmonella enterica* (n = 1), and  
24 *Micobacterium abcessus* (n = 1).

1           The mean C<sub>q</sub> values and standard deviation were used to calculate the intra-assay  
2 coefficients of variation using four dilutions (10–10<sup>-3</sup> ng/μL) in triplicate of same isolate  
3 and inter-assay using four isolates in duplicate of *P. insidiosum* every 3 alternating days.  
4 The sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive values  
5 (NPV), accuracy, mean standard deviation and kappa coefficient were calculated using  
6 the Microsoft EXCEL 2010 program and Minitab Statistical Software.

7

### 8           Nucleotide sequence analysis

9           The products were amplified using *ELI025* primers and purified using a  
10 commercial Illustra™ kit (GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions.  
11 Sequencing reactions were performed in both directions using an ABI 3500 Genetic  
12 Analyzer (Applied Biosystems). The nucleotide sequences obtained were compared to  
13 information in the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

14

## 15       RESULTS

16           All cultures and clinical samples showed positive results in nested PCR (data not  
17 shown). Primers used in qPCR were designed with a degeneration (S) for the nitrogenous  
18 bases guanine and cytosine located at oligonucleotide 16 of the sense primer (Figure 1),  
19 generating a 171-base pair product according to the 2% agarose gel (data not shown). The  
20 sequences obtained by sequencing (Sanger type) of the qPCR amplified products showed  
21 95–100% homology between *ELI025* of *P. insidiosum*. Posteriorly the sequences were  
22 submitted to GenBank (Table 1).



1           The analytical sensitivity of the qPCR assay was determined using five isolates of *P.*  
2 *insidiosum*, with assay positivity up to 1 pg/ $\mu$ L DNA detecting 17 copies of the genome  
3 in an average of 35.3 cycles (Table 2). The positive threshold cycle in relation to the  
4 logarithmic DNA concentrations showed a linear response with a high coefficient of  
5 determination ( $R^2$ ) of 0.994, slope of -3.66, and Y-intercept of 34.705 (Figure 2A). The  
6 melting curves of the amplified *P. insidiosum* product showed an average value of 88.7°C  
7 (Table 2; Figure 2B).

8           Clinical sensitivity was evaluated using 10 samples (9 kunkers and 1 tissue) showing  
9 positive results for *P. insidiosum* in nested-PCR. All samples had a Cq between 25.4°C  
10 and 32.9°C and Tm between 87.8°C and 88.8°C, presenting a clinical sensitivity of 100%.  
11 The amplified products were sequenced and showed 99% homology with *ELI025* in *P.*  
12 *insidiosum*. The negative controls showed no detectable amplification.

13           The specificity of qPCR was demonstrated as the lack of amplification using samples  
14 with DNA from other microorganisms or Cq above 28, with peaks of the fusion curve  
15 between 74°C and 84.0°C, which are below the cut-off limit for *P. insidiosum*. These  
16 amplicons showed no defined nucleotide sequences after genetic sequencing. The mean  
17 intra- and inter-assay coefficients of variation were 2.12% and 2.11%, respectively. The  
18 values of the sensitivity, specificity, PPV, NPV and accuracy were 100%, and Kappa = 1  
19 with a 95% confidence interval.

20

## 21 DISCUSSION

22           Standardizing techniques for rapidly diagnosing equine pythiosis is essential given  
23 that skin and subcutaneous lesions caused by *P. insidiosum* are often confused with other  
24 non-fatal diseases that develop similar lesions in equines (9, 21–24).

1 Molecular methods show the highest sensitivity, accuracy, and speed for diagnosing  
2 infectious diseases (25). The qPCR method optimized in this study was developed using  
3 *ELI025*, which is unique to *P. insidiosum*, as a target. *ELI025* is a small glycoprotein (112  
4 amino acids) that is abundantly secreted both during *in vitro* growth and during host tissue  
5 infection, and is highly expressed by oomycetes (16).

6 *ELI025* has already been used for to develop a specific immunohistochemistry  
7 technique for evaluating *P. insidiosum* using an anti-*ELI025* rabbit antibody, which  
8 shows excellent sensitivity and specificity (17). Our qPCR method, which uses the  
9 *ELI025* gene as a molecular target, displayed good analytical sensitivity (limit of  
10 detection) with detection of up to 17 copies of the *P. insidiosum* genome and good  
11 specificity for detecting *P. insidiosum* at low quantification cycles. These results were  
12 easily observed by the melting curve, demonstrating that this technique can be used to  
13 specifically detect *P. insidiosum*.

14 Because of its high lethality rates and rapid evolution of equine pythiosis symptoms  
15 (26), it is important to develop faster and more optimized diagnostic techniques for  
16 detecting *P. insidiosum* infection. To date, two qPCR methods have been standardized  
17 for detecting *P. insidiosum* involve only the use of microbiological cultures (20, 27). Our  
18 qPCR assay showed a clinical sensitivity of 100% (10/10) for samples extracted directly  
19 from kunkers and tissue.

20 Molecular diagnosis based on nested PCR shows good sensitivity and specificity (14,  
21 15). However, this method is time-consuming, as the time from which laboratory  
22 personnel receive the clinical samples for DNA extraction until obtaining results is at  
23 least two days. On the first day, DNA extraction can be performed, which takes 4–20 h  
24 depending on the method used, followed by the first round of PCR. On the following day,

1 the second PCR and electrophoresis can be performed. Additionally, environmental  
2 laboratory contamination of the samples may occur.

3 Using qPCR following direct extraction of the clinical sample, results can be  
4 obtained in less than 10 h (approximately 7 h). Another advantage is that there is no need  
5 to handle the amplicons in a step additional. The results may be available within one day,  
6 assisting veterinarians in implementing the most appropriate treatment and with a greater  
7 likelihood of curing the animal.

8 Samples of kunkers or injured tissue suspected of being affected by pythiosis should  
9 be transported in 9 % ethyl alcohol as routine practice in veterinary field, as it is a low-  
10 cost method and preserves the DNA for long periods without the requirement for  
11 refrigerated transport. This method leads to good yield in DNA extraction and  
12 amplification of *P. insidiosum* DNA using the qPCR technique described in the present  
13 study.

14 Despite the low number of clinical samples evaluated, our qPCR technique showed  
15 excellent sensitivity and specificity and can be used to rapidly diagnose *P. insidiosum* in  
16 clinical samples in a single reaction without the need for microbiological cultivation.

17

## 18 ACKNOWLEDGMENTS

19 To São Paulo State Research Foundation - FAPESP (Grants 2018/08009-0) for  
20 financial supported. This study was financed in part by the Coordenação de  
21 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

22

## 23 REFERENCES

- 1 1. Krajaejun T, Sathapatayavongs B, Prachartam R, Nitiyanant P, Leelachaikul P,  
2 Wanachiwanawin W, Chaiprasert A, Assanasen P, Saipetch M. 2006. Clinical and  
3 epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. *Clin Infect Dis* 43:569–  
4 576.
- 5 2. Gaastra W, Lipman LJA, De Cock AWAM, Exel TK, Pegge RBG, Scheurwater J,  
6 Vilela R, Mendoza L. 2010. *Pythium insidiosum*: An overview. *Vet Microbiol*  
7 146:1–16.
- 8 3. Mendoza L, Hernandez F, Ajello L. 1993. Life cycle of the human and animal  
9 oomycete pathogen *Pythium insidiosum*. *J Clin Microbiol* 31:2967–2973.
- 10 4. Mendoza L, Ajello L, McGinnis MR. 1996. Infections caused by the oomycetous  
11 pathogen *Pythium insidiosum*. *J Mycol Med* 6:151–164.
- 12 5. Pesavento PA, Barr B, Riggs SM, Eigenheer AL, Pamma R, Walker RL. 2008.  
13 Cutaneous pythiosis in a nestling white-faced ibis. *Vet Pathol* 45:538–541.
- 14 6. Souto EPF, Pessoa CRM, Pessoa AFA, Trost ME, Kommers GD, Correa FR,  
15 Dantas AFM. 2019. Esophageal pythiosis in an ostrich (*Struthio camelus*). *Arq*  
16 *Bras Med Vet e Zootec* 71:1081–1084.
- 17 7. Fortin JS, Calcutt MJ, Kim DY. 2017. Sublingual pythiosis in a cat. *Acta Vet Scand*  
18 59:1–5.
- 19 8. Heck LC, Bianchi MV., Pereira PR, Lorenzetti MP, Lorenzo C, Pavarini SP,  
20 Driemeier D, Sonne L. 2018. Gastric pythiosis in a bactrian camel (*Bactrianus*  
21 *Camelus*). *J Zoo Wildl Med* 49:784–787.
- 22 9. Chaffin MK, Schumacher J, McMullan WC. 1995. Cutaneous pythiosis in the  
23 horse. *Vet Clin North Am Equine Pract* 11:91–103.

- 1 10. Mendoza L, Newton JC. 2005. Immunology and immunotherapy of the infections  
2 caused by *Pythium insidiosum*. *Med Mycol* 43:477–486.
- 3 11. Grooters AM, Whittington A, Lopez MK, Boroughs MN, Roy AF. 2002.  
4 Evaluation of microbial culture techniques for the isolation of *Pythium insidiosum*  
5 from equine tissues. *J Vet Diagnostic Investig* 14:288–294.
- 6 12. Grooters AM. 2003. Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals.  
7 *Vet Clin Small Anim Pract* 33:695–720.
- 8 13. Kaufman L. 1998. *Penicilliosis marneffei* and pythiosis: emerging tropical  
9 diseases. *Mycopathologia* 143:3–7.
- 10 14. Grooters AM, Gee MK. 2002. Development of a nested polymerase chain reaction  
11 assay for the detection and identification of *Pythium insidiosum*. *J Vet Intern Med*  
12 16:147–152.
- 13 15. Botton SA, Pereira DIB, Costa MM, Azevedo MI, Argenta JS, Jesus FPK, Alves  
14 SH, Santurio JM. 2011. Identification of *Pythium insidiosum* by nested PCR in  
15 cutaneous lesions of brazilian horses and rabbits. *Curr Microbiol* 62:1225–1229.
- 16 16. Lerksuthirat T, Lohnoo T, Inkomlue R, Rujirawat T, Yingyong W, Khositnithikul  
17 R, Phaonakrop N, Roytrakul S, Sullivan TD. 2015. The Elicitin-like glycoprotein,  
18 ELI025, is secreted by the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum* and evades  
19 host antibody responses. *PLoS One* 10:e0118547.
- 20 17. Inkomlue R, Larbcharoensub N, Karnsombut P, Lerksuthirat T, Aroonroch R,  
21 Lohnoo T, Yingyon W, Santanirand P, Sansopha L. 2016. Development of an anti-  
22 Elicitin antibody-based immunohistochemical assay for diagnosis of pythiosis. *J*  
23 *Clin Microbiol* 54:43–48.

- 1 18. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R,  
2 Nolan T, Pfaffl MW. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for  
3 publication of Quantitative Real-Time PCR experiments. *Clin Chem* 55:611–622.
- 4 19. Wilhelm J, Pingoud A, Hahn M. 2003. Real-time PCR-based method for the  
5 estimation of genome sizes. *Nucleic Acids Res* 31:e56.
- 6 20. Keeratijarut A, Lohnoo T, Yingyong W, Rujirawat T, Srichunrusami C, Onpeaw  
7 P, Chongtrakool P, Brandhorst TT, Krajaejun T. 2015. Detection of the oomycete  
8 *Pythium insidiosum* by real-time PCR targeting the gene coding for exo-1, 3-b-  
9 glucanase. *J Med Microbiol* 64:971–977.
- 10 21. Maciel ICF, Silveira JT, Maia CA, Sousa RM, Oliveira NJF, Duarte ER. 2008.  
11 Pitiose fatal em equino tratado inicialmente para habronemose cutânea. *Acta Sci*  
12 *Vet* 36:293–297.
- 13 22. Axon JE, Robinson P, Lucas J. 2004. Generalised granulomatous disease in a  
14 horse. *Aust Vet J* 82:48–51.
- 15 23. López-Sanromán J, Payá MJ, Cutuli MT, González JL. 2000. Case report  
16 cutaneous mucormycosis caused by *Absidia corymbifera* in a horse. *Vet Dermatol*  
17 11:151–155.
- 18 24. Mendoza L, Alfaro AA. 1985. Equine subcutaneous zygomycosis in Costa Rica.  
19 *Mykosen* 28:545–549.
- 20 25. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JDC,  
21 Wengenack NL, Rosenblatt JE. 2006. Real-Time PCR in clinical microbiology:  
22 applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* 19:165–256.
- 23 26. Santos CEP, Santurio JM, Marques LC. 2011. Pitiose em animais de produção no

- 1           Pantanal Matogrossense. *Pesqui Veterinária Bras* 31:1083–1089.
- 2    27.    Worasilchai N, Permpalung N, Chindamporn A. 2018. High-resolution melting  
3           analysis: a novel approach for clade differentiation in *Pythium insidiosum* and  
4           pythiosis. *Med Mycol* 56:868–876.
- 5

## TABLES AND FIGURES

1

**Table 1.** Isolates and clinical samples employed for standardization by qPCR of ELIO-25 gene of *Pythium insidiosum*.

<b>Samples</b> <i>P. insidiosum</i>	<b>Source</b>	<b>Specie</b>	<b>City/State</b>	<b>accession number</b> <b>ITS sequence</b>	<b>accession number of the</b> <b>amplicon of qPCR gene</b> <b>ELI025</b>
Cão	Culture	Canine	Boituva-SP	KP842851	MW021046
Eq-02	Culture	Equine	Jaú-SP	KP842833	MW070590
Eq-04	Culture	Equine	Itápolis-SP	KP842835	MW070589
Eq-05	Culture	Equine	Porto Feliz-SP	KP842836	MW021047
Eq-06	Culture	Equine	Piracicaba-SP	KP842837	MW021048
Eq-09	Culture	Equine	Piracicaba-SP	KP842840	MW070591
Eq-10	Culture	Equine	Paranapanema-SP	KP842841	MW070592
Eq-11	Culture	Equine	Piracicaba-SP	KP842842	MW070593
Eq-13	Culture	Equine	Piracicaba-SP	KP842844	MW070594



---

Eq-15	Culture	Equine	Igaraçu do Tietê-SP	KP842845	MW070595
Eq-16	Culture	Equine	Pereiras-SP	KP842846	MW070596
Eq-21	Culture	Equine	Botucatu-SP	KP842848	MW070597
Eq-22	Culture	Equine	Araçatuba-SP	KP842849	MW070598
Eq-24	Culture	Equine	São Pedro-SP	KP842850	MW070599
Eq-25	Culture	Equine	Piracicaba-SP	MT237220	MW070600 <sup>*1</sup>
Eq-26	Culture	Equine	Piracicaba-SP	MT237290	MW070601 <sup>*2</sup>
Eq-27	Culture	Equine	Piracicaba-SP	MT672705	MW070602
Eq-28	Culture	Equine	Botucatu-SP	MT672706	MW070603 <sup>*3</sup>
Eq-29	Culture	Equine	Botucatu-SP	MT237312	MW070604 <sup>*4</sup>
Eq-30	Culture	Equine	Botucatu-SP	MT237436	MW070605 <sup>*5</sup>
Eq-31	Culture	Equine	Botucatu-SP	MT672701	MW070606
Eq-32	Culture	Equine	Botucatu-SP	MT672702	MW070607 <sup>*6</sup>
Eq-25	<i>Kunker</i>	Equine	Piracicaba-SP	ND	MW070600 <sup>*1</sup>
Eq-26	<i>Kunker</i>	Equine	Piracicaba-SP	ND	MW070601 <sup>*2</sup>

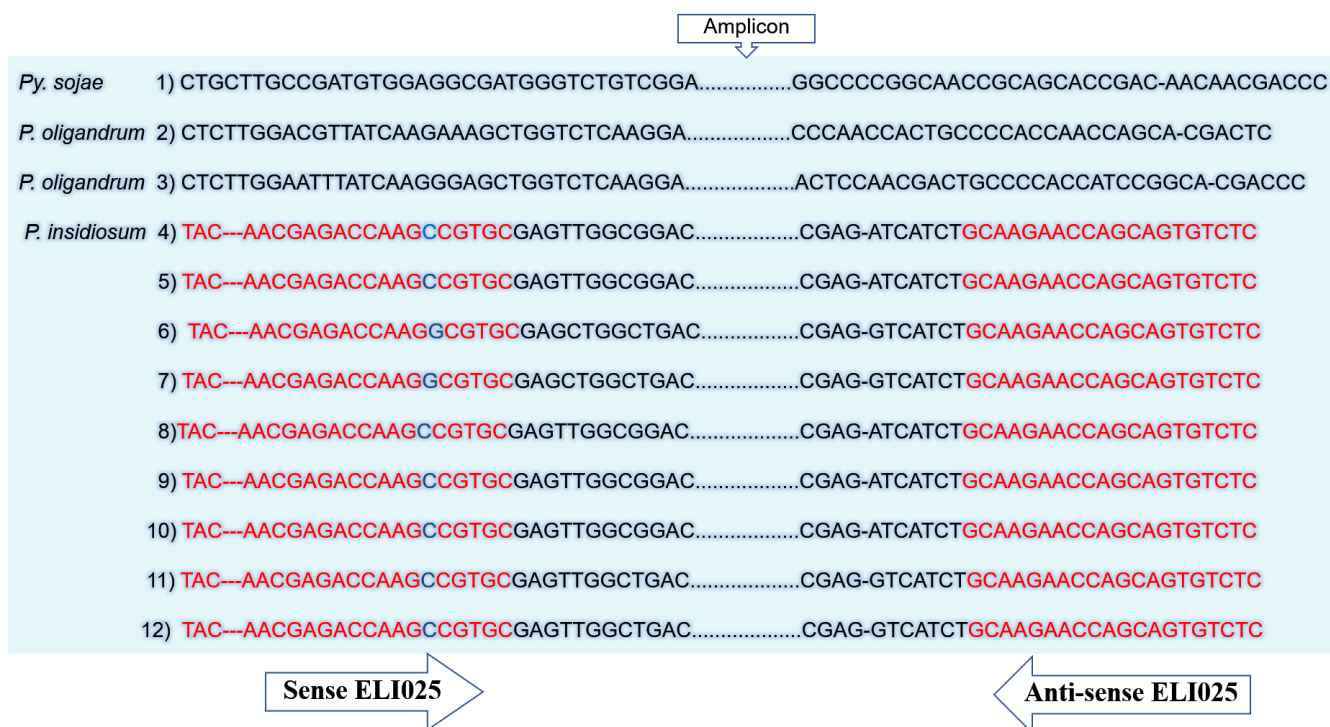
---

Eq-28	<i>Kunker</i>	Equine	Botucatu-SP	ND	MW070603 <sup>*3</sup>
Eq-29	<i>Kunker</i>	Equine	Botucatu-SP	ND	MW070604 <sup>*4</sup>
Eq-30	<i>Kunker</i>	Equine	Botucatu-SP	ND	MW070605 <sup>*5</sup>
Eq-32	<i>Kunker</i>	Equine	Botucatu-SP	ND	MW070607 <sup>*6</sup>
S1	<i>Kunker</i>	Equine	Jaboticabal/SP	ND	MW079026
745	<i>Kunker</i>	Equine	Irituia-PA	ND	MW070608
747	<i>Kunker</i>	Equine	Castanhal-PA	ND	MW070609
MJ1	Tissue	Canine	Cuiabá-MT	ND	MW079027

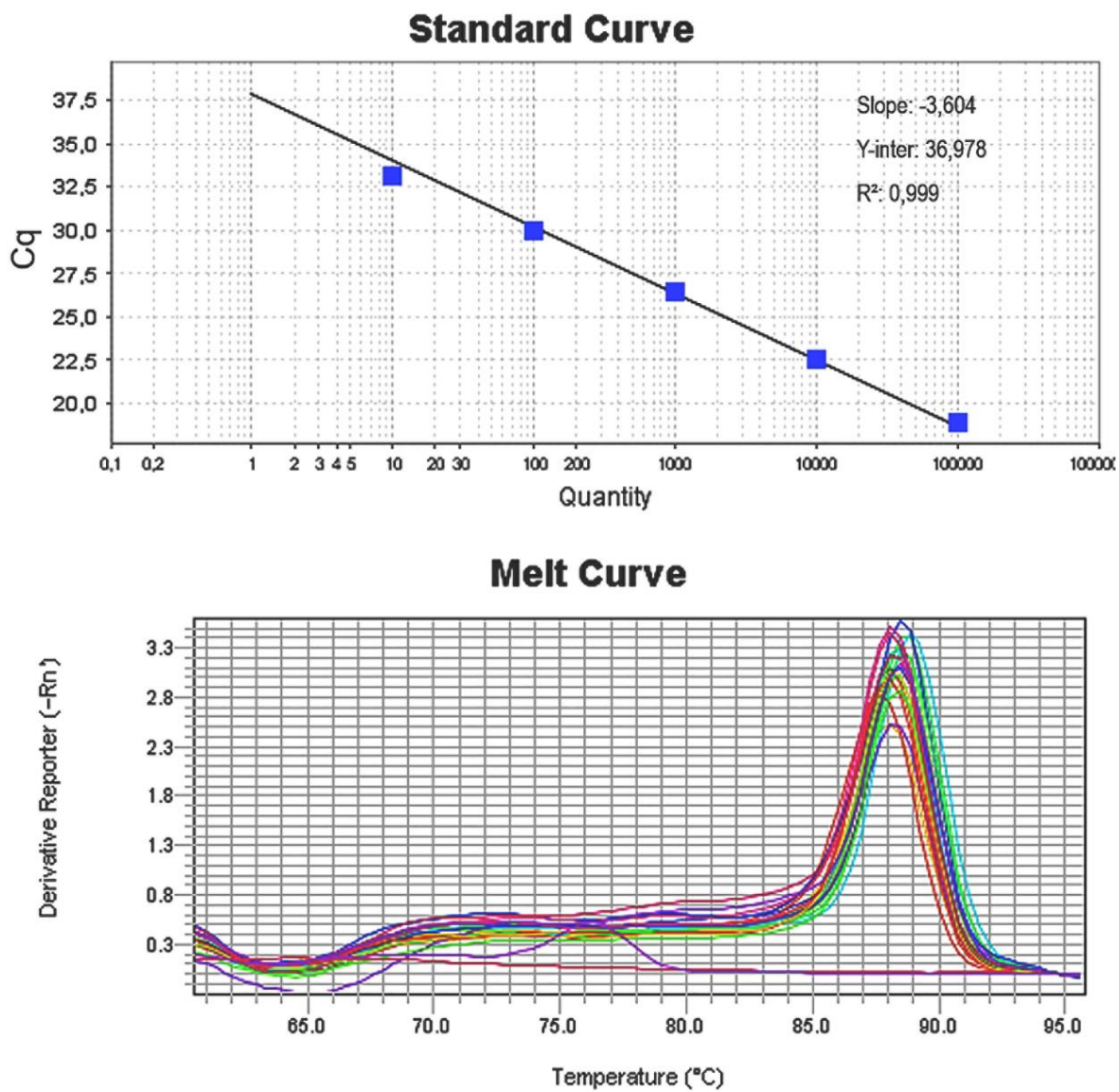
\*1-6: Culture and kunker of the same animal, with identical qPCR products, were submitted with the same access number on GenBank.  
 ND = not done

**Table 2.** Description of the analytical values of five *P. insidiosum* isolates submitted to qPCR and their respective cycles of quantification (Cq), and melting temperature (Tm) with analysis of the mean and standard deviation per cycle.

Concentration (ng/μL)	N° copies	Cq/Tm (°C)					Cq	Tm (°C)
		Eq 2	Eq 5	Eq6	Eq 10	Eq11	Mean Standard deviation	Mean Standard deviation
1 x 10 <sup>1</sup>	170.000	18.8/88.2	18.9/88.4	19.6/88.6	20.9/88.4	17.6/88.2	19.16±1.082	88.36±0.150
1 x 10 <sup>0</sup>	17.000	23.4/88.4	22.5/88.6	23.7/88.8	24.7/88.6	21.0/88.4	23.06±1.247	88.56±0.150
1 x 10 <sup>-1</sup>	1.700	26.5/88.8	26.4/88.8	28.1/89.0	28.3/88.8	24.7/88.6	26.80±1.311	88.80±0.126
1 x 10 <sup>-2</sup>	170	30.3/88.9	29.9/88.9	32.3/89.0	32.6/88.8	29.3/88.8	30.88±1.324	88.88±0.075
1 x 10 <sup>-3</sup>	17	36.0/88.8	33.2/89.1	36.5/89.1	36.9/89.0	33.7/89.0	35.26±1.513	89.00±0.110
1 x 10 <sup>-4</sup>	1.7	-	-	-	-	-	-	-



**Figure 1.** Alignment of the sequences used for the design of the primers (red) specific to the *P. insidiosum* ELI025 gene. Sequences 1 and 2) *Pythium oligandrum* GenBank: AB217820.1 and AB217821.1, respectively; sequence 3) *Phytophthora sojae* Genbank: XM009531764.1; sequences 4 to 12 of *P. insidiosum*, Genbank: 4) strain Pi35, AB971191.1; 5) strain Pi20, AB971192.1; 6) strain Pi11, AB971193.1; 7) strain CBS101555 contig: 044905; 8) isolate CBS573.85 contig: 009256; 9) isolate Pi19 contig: 008992; 10) isolated Pi-s contig: PINS000045; 11) isolate Pi-s contig: PINS000703; 12) isolate CDC B5653 contig00435, respectively.



**Figure 2.** A) Standard qPCR curve for ELI025 gen generated from serial 10-fold dilutions of gDNA of *P. insidiosum*; and B) melting curve (T<sub>m</sub>) with temperature mean of 88,7°C.

## 1 DISCUSSÃO GERAL

2 Os hábitos comportamentais dos cavalos de pastarem em ambientes alagadiços  
3 favorece a contaminação por microrganismos aquáticos como *P. insidiosum*  
4 (MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012; SANTOS et al., 2011). No presente estudo  
5 descrevemos um surto de pitiose envolvendo cinco cavalos de três propriedades dos  
6 municípios de Botucatu e São Manuel, SP, descrevendo o Rio Tietê como reservatório do  
7 agente. No Estado de São Paulo, já foram relatados casos de pitiose em equinos  
8 (WATANABE et al., 2015), cães (TORRES-NETO et al., 2009), e até um caso em  
9 humano (BOSCO et al., 2005; MARQUES et al., 2006), mas sem descrição de surtos ou  
10 da fonte de infecção. Apesar da pitiose ser relatada em todas as regiões brasileiras  
11 (BANDEIRA et al., 2009; BOSCO et al., 2008; BURNS et al., 2013; HEADLEY e  
12 ARRUDA-JUNIOR, 2004; MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012; SALLIS et al.,  
13 2003; SANTOS et al., 2011; WATANABE et al., 2015) e apresentar-se de forma  
14 endêmica no Pantanal brasileiro (LEAL et al., 2001; SANTOS et al., 2014), surtos de  
15 pitiose forma relatados até o momento apenas em bovinos (GABRIEL et al., 2008;  
16 GRECCO et al., 2009; KONRADT et al., 2016), e ovinos no Brasil (TABOSA et al.,  
17 2004) e em humanos na Tailândia (THANATHANEE et al., 2013).

18 O fato das propriedades se localizarem as margens do Rio Tietê com acesso dos  
19 equinos as áreas alagadiças, despertou a necessidade de investigar o rio como possível  
20 reservatório, pois apresentava-se como ambiente propício para a manutenção de *P.*  
21 *insidiosum*, com solo inundado e abundância de vegetação aquática (SANTOS et al.,  
22 2014). Após análises microbiológicas de amostras de água coletada as margens do rio,  
23 isolamos colônias que se assemelhavam morfológicamente a *P. insidiosum*, confirmadas  
24 posteriormente por biologia molecular. Poucos estudos mencionam ou caracterizam os  
25 possíveis reservatórios do agente (BOSCO et al., 2005; GABRIEL et al., 2008; GRECCO  
26 et al., 2009; KONRADT et al., 2016; TABOSA et al., 2004). No presente, podemos inferir  
27 um rio de grande importância no Estado de São Paulo como reservatório de *P. insidiosum*  
28 para animais, e possivelmente humanos, pois ao longo do trajeto do rio Tietê em Botucatu  
29 e São Manuel, há vilas de pescadores, comércio, e residências destinadas a recreação  
30 familiar, conhecidos como 'ranchos'.

31 Ressaltamos que estudos ambientais sobre *P. insidiosum* ainda são escassos na  
32 literatura (PRESSER e GOSS, 2015; SUPABANDHU et al., 2008; VANITTANAKOM

1 et al., 2014). No Brasil há apenas dois, um estudo que demonstra o isolamento *P.*  
2 *insidiosum* de ambiente aquático (ZAMBRANO et al., 2017) e outro que analisa as  
3 características ambientais de áreas com ocorrência de pitiose no Brasil (MACHADO et  
4 al., 2018), ambos realizado na região sul. Desta forma, descrevemos o segundo isolado  
5 de *P. insidiosum* no Brasil, e o primeiro da região Sudeste, e ressaltamos a importância  
6 de mais estudos sobre *P. insidiosum* em amostras ambientais.

7 A análise filogenética dos isolados descritos no presente estudo permitiu inferir a  
8 ocorrência de mais de um clado de *P. insidiosum* no Brasil, com agrupamento dos  
9 isolados dos equinos no clado I, e o isolado ambiental no clado III. Até o momento todos  
10 isolados brasileiros haviam sido caracterizados como pertencentes ao clado I utilizando a  
11 as regiões gênicas COXII, rDNA e o gene *exo-1,3-β-glucanase* como alvos moleculares  
12 (AZEVEDO et al., 2012; BOSCO et al., 2008; WEIBLEN et al., 2015).

13 O fato de haver apenas um isolado ambiental caracterizado filogeneticamente no  
14 Brasil (AZEVEDO et al., 2012), dificulta a possibilidade de conclusões sobre a dispersão  
15 ambiental dos clados de *P. insidiosum* no país. A ocorrência de diferentes clados em  
16 isolados americanos já foi relatada após estudo realizado em lagos da Flórida, EUA com  
17 relatos prévios de pitiose, demonstrando o agrupamento de isolados nos clados  
18 filogenéticos I, III e IV de *P. insidiosum* utilizando a região ITS do rDNA (PRESSER e  
19 GOSS, 2015), corroborando com os achados em nosso estudo e demonstrando a  
20 importância da realização de mais estudos sobre a dispersão de *P. insidiosum* no  
21 ambiente.

22 O tratamento da pitiose equina é um desafio para os veterinários, pois varia conforme  
23 o tamanho e localização da lesão, estado nutricional do animal e poder aquisitivo do  
24 proprietário, com duração terapêutica de dias (VIANA, I et al., 2020) a anos (LEAL et  
25 al., 2001), e resultados variáveis (MOSBAH et al., 2012; WATANABE et al., 2015). No  
26 presente estudo, a associação da cirurgia com administração de iodeto de potássio por 12  
27 dias, apresentou resultados satisfatórios no caso 4 sem recidiva após dois anos, reforçando  
28 a importância do diagnóstico e tratamento precoce.

29 Em três animais, devido à falta de resultado com a imunoterapia e as lesões  
30 impossibilitarem a cirurgia, foi implementado um tratamento alternativo com  
31 ozonioterapia. Os resultados foram satisfatórios em dois equinos, com remissão completa  
32 das lesões em um a quatro meses. Os efeitos curativos da ozonioterapia já haviam sido

1 relatados em estudos *in vivo* para o tratamento de microrganismos bacterianos,  
2 apresentando efeitos colaterais mínimos e baixo custo (SONG et al., 2018). O ozônio (O<sub>3</sub>)  
3 é uma molécula composta por três átomos de oxigênio em uma estrutura dinamicamente  
4 instável devido à presença de estados mesoméricos, com meia-vida de 40 min a 20°C e  
5 cerca de 140 min a 0°C na forma gasosa (ELVIS e EKTA, 2011). Por apresentar efeitos  
6 antioxidantes, antiinflamatórios, imunoestimulante e microbicida, a ozonioterapia  
7 demonstrou bons resultados em pacientes humanos e animais tratados para diversas  
8 doenças, incluído as dermatológicas (BORGES et al., 2017; DURIČIĆ et al., 2015;  
9 SCIORSCI et al., 2020; SONG et al., 2018; ZENG e LU, 2018). Os efeitos benéficos da  
10 ozonioterapia ocorrem devido a) ao aumento da entrega de oxigênio, glicose e ATP nos  
11 tecidos isquêmicos, b) aumento da neoangiogênese que possivelmente facilitam a  
12 implantação de células-tronco da medula óssea, que podem fornecer neovascularização e  
13 regeneração de tecidos, c) induzir os fenômenos de pré-condicionamento ao regular  
14 positivamente a expressão de enzimas antioxidantes e heme oxigenase I e d) desencadear  
15 uma resposta neuro-humoral para melhorar a qualidade de vida (BOCCI, 2006; SONG et  
16 al., 2018). Considerando que a ozonioterapia proporciona o aumento da tensão de O<sub>2</sub> no  
17 local da ferida, e potencializa a formação do tecido de granulação, acelerando o  
18 fechamento da lesão (TRAVAGLI et al., 2010), seu uso como tratamento alternativo ou  
19 complementar para a pitiose equina deveria ser investigado.

20 Por apresentarem lesões granulomatosas, ulceradas e serosanguinolentas, as infecções  
21 causadas por *P. insidiosum* são frequentemente confundidas com outras enfermidades que  
22 desenvolvem curso semelhante na clínica veterinária equina (AXON et al., 2004;  
23 CHAFFIN et al., 1995; LÓPEZ-SANROMÁN et al., 2000; MACIEL et al., 2008;  
24 MENDOZA e ALFARO, 1985). O diagnóstico exato e rápido, é fundamental para o bom  
25 prognóstico de animais com suspeita de pitiose. No entanto, as formas de diagnósticos  
26 clássicos, como cultura e histopatologia, apresentam limitações, geralmente demorando  
27 dias a semanas para conclusão do resultado, ou em muitos casos são confundidos com  
28 fungos (GROOTERS, 2003; GROOTERS et al., 2002b). Além disso, assim como as  
29 doenças fúngicas, as doenças oomicóticas são frequentemente negligenciadas por  
30 profissionais de saúde da área veterinária e humana (BROWN et al., 2012; KWON-  
31 CHUNG, 1994).

32 Dentre os métodos disponíveis para o diagnóstico de doenças infecciosas, os  
33 moleculares são sem dúvida o que apresentam melhor desempenho em relação a



1 sensibilidade, precisão e rapidez (ESPY et al., 2006). A nested-PCR foi a primeira técnica  
2 específica para aplicadas em muitos estudos sobre *P. insidiosum* (BERRYESSA et al.,  
3 2008; BOTTON et al., 2011; CAMUS et al., 2004; GROOTERS e GEE, 2002;  
4 OLDENHOFF et al., 2014; ZNAJDA et al., 2002). No entanto, quando comparada à  
5 qPCR, a nested-PCR apresenta desvantagens relacionadas a contaminação, devido a  
6 necessidade de manipular produto amplificado, maior tempo de execução da técnica por  
7 realizar duas PCRs e a leitura por eletroforese em gel de agarose, além da sensibilidade  
8 ser menor, como verificado no presente estudo (dados não mostrados).

9 A qPCR otimizada neste estudo foi desenvolvida como alvo no gene tradutor da  
10 proteína ELI025 exclusiva de *P. insidiosum*. ELI025 é uma pequena glicoproteína (112  
11 aminoácidos), abundantemente secretada tanto durante o crescimento *in vitro* quanto  
12 durante a infecção do tecido do hospedeiro, apresentando alta expressão pelo oomiceto  
13 (LERKSUTHIRAT et al., 2015).

14 As elicinas são importantes alvos tanto para diagnóstico como para fins  
15 terapêuticos, pois são encontradas em oomicetos, mas ausentes em todos os outros  
16 microrganismos, inclusive nos fungos (LERKSUTHIRAT et al., 2015). O papel da  
17 elicina secretada por *P. insidiosum* em humanos e animais ainda é desconhecido, mas  
18 acredita-se que assim como as elicinas dos oomicetos patogênicos para as plantas,  
19 ELI025 de *P. insidiosum* possa atuar no transporte de esterol no tecido do hospedeiro,  
20 visto que ele é um esteróide auxotrófico (DEREVNINA et al., 2016a;  
21 LATIJNHOUWERS et al., 2003; LERKSUTHIRAT et al., 2015).

22 A qPCR padronizada no presente estudo com alvo molecular o gene ELI025,  
23 apresentou resultados promissores após teste em 23 isolados de *P. insidiosum* com boa  
24 sensibilidade analítica, detectando até 17 cópias do genoma de *P. insidiosum*, em até 1  
25 pmol/ $\mu$ L, com excelente linearidade na curva padrão ( $R^2=0,99$ ). A especificidade foi  
26 testada avaliando 23 microrganismos diferentes de *P. insidiosum*, e apesar de  
27 verificarmos algumas amplificações durante a qPCR, os Cq's foram altos, entre 28 e 39  
28 ciclos. Além disso, ao analisarmos a curva de dissociação (*melting curve*) os mesmos  
29 apresentaram Tm abaixo de 84°C sendo facilmente diferenciados de *P. insidiosum* (Tm  
30 88,7°C). Para sanar nossas dúvidas, realizamos sequenciamento genético das  
31 amplificações inespecíficas e nenhuma das sequências recuperadas foi compatível com

1 ELI025 de *P. insidiosum* depositadas no GenBank, comprovando a boa especificidade da  
2 técnica aqui proposta.

3 A qPCR apresenta maior rapidez de execução comparada a outras técnicas de  
4 diagnóstico molecular, no entanto as duas técnicas de qPCR padronizadas para *P.*  
5 *insidiosum* foram testadas apenas cultivos microbiológicos obtidas de isolados clínicos  
6 (KEERATIJARUT et al., 2015; WORASILCHAI et al., 2018) que demoram dias para  
7 serem obtidos, além da possibilidade de contaminação por fungos ou bactérias. O  
8 diferencial da qPCR desenvolvida no presente estudo é a sensibilidade de 100% em  
9 amostras clínicas, amplificando DNA de *P. insidiosum* obtido da extração direta de  
10 *kunkers* e tecido oriundos de animais diagnosticados previamente com pitiose.  
11 Considerando o tempo de execução e a extração de DNA utilizando kits de extração  
12 comerciais, os resultados dos testes podem ser obtidos em menos de sete horas (dados  
13 não mostrados), melhorando consideravelmente o prognóstico do animal, devido  
14 diagnóstico precoce e a rápida instauração do tratamento mais adequado.

## CONCLUSÕES GERAIS

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32

Considerando a rápida evolução da pitiose e a elevada taxa de mortalidade em equinos e cães, a confirmação precoce do agente etiológico é de extrema importância. Desta forma, a qPCR com amplificação de sequências parciais do gene ELI025 realizada a partir de *kunkers* ou tecidos apresenta-se como uma técnica com resultados quase imediatos, alta sensibilidade e especificidade, auxiliando os veterinários na instauração segura da melhor abordagem terapêutica.

Além disso, a busca por alternativas para o tratamento da pitiose ainda se faz necessária na clínica veterinária, pois trata-se de uma doença fatal, sem definição de um tratamento padrão para todos os pacientes. A partir da cura clínica em dois animais do presente estudo, consideramos a ozonioterapia como uma terapia alternativa de baixo custo e efeitos colaterais mínimos para o tratamento da pitiose equina em casos de difícil resolução, devido a extensão ou localização da lesão. No entanto, ensaios *in vitro* e estudos clínicos randomizados devem ser realizados para avaliar a eficácia e repetibilidade dos resultados e esclarecer os mecanismos de ação do ozônio medicinal.

Concluimos que as investigações sobre *P. insidiosum* devem ser incentivadas, visto que ainda há muitas lacunas obscuras sobre o comportamento, biologia, epidemiologia, e filogenia deste oomiceto que necessitam serem sanadas. Também verificamos a necessidade de georreferenciamento dos reservatórios ambientais de *P. insidiosum* em áreas com alto relato de casos como o Brasil, e importância da disseminação destas informações para profissionais das áreas de saúde humana e veterinária.

## BIBLIOGRAFIA

- 1
- 2 ALFARO, A. A.; MENDOZA, L. Four cases of equine bone lesions caused by *Pythium*  
3 *insidiosum*. *Equine Veterinary Journal*, v. 22, n. 4, p. 295–297, 1990. DOI:  
4 10.1111/j.2042-3306.1990.tb04273.x.
- 5 ALLISON, N.; GILLIS, P. J. Enteric pythiosis in a horse. *Journal of the American*  
6 *Veterinary Medical Association*, v. 196, n. 3, p. 462–464, 1990.
- 7 APPAVU, S. P.; PRAJNA, L.; RAJAPANDIAN, S. G. K. Genotyping and phylogenetic  
8 analysis of *Pythium insidiosum* causing human corneal ulcer. *Medical mycology*, v. 58,  
9 n. 2, p. 211–218, 2020. DOI: 10.1093/mmy/myz044.
- 10 AXON, J. E.; ROBINSON, P.; LUCAS, J. Generalised granulomatous disease in a horse.  
11 *Australian Veterinary Journal*, v. 82, n. 1–2, p. 48–51, 2004.
- 12 AZEVEDO, M. I.; BOTTON, S. A.; PEREIRA, D. I. B.; ROBE, L. J.; JESUS, F. P. K.;  
13 MAHL, C. D.; COSTA, M. M.; ALVES, S. H.; SANTURIO, J. M. Phylogenetic  
14 relationships of Brazilian isolates of *Pythium insidiosum* based on ITS rDNA and  
15 cytochrome oxidase II gene sequences. *Veterinary Microbiology*, v. 159, n. 1–2, p. 141–  
16 148, 2012. DOI: 10.1016/j.vetmic.2012.03.030.
- 17 BANDEIRA, A. M. P.; SANTOS, J. C. A.; MELO, C. B.; ANDRADE, V. G.; DANTAS,  
18 A. F. M.; ARAÚJO, J. A. S. Pitiose equina no estado de Sergipe, Brasil. *Ciência*  
19 *Veterinária nos Trópicos*, v. 12, n. 1/2/3, p. 46–54, 2009.
- 20 BARRANTES-MURILLO, D.; COEN-ALFARO, J.; CALDERÓN, A.; RODRÍGUEZ-  
21 GONZÁLEZ, A.; ALFARO-ALARCÓN, A. Rinitis piogranulomatosa asociada a  
22 *Conidiobolus coronatus* en un caballo: reporte de caso. *Revista Ciencias Veterinarias*, v.  
23 34, n. 2, p. 115–127, 2016. DOI: 10.15359/rcv.34-2.5.
- 24 BERNHEIM, D.; DUPONT, D.; APTEL, F.; DARD, C.; CHIQUET, C.; NORMAND,  
25 A. C.; PIARROUX, R.; CORNET, M.; MAUBON, D. Pythiosis: case report leading to  
26 new features in clinical and diagnostic management of this fungal-like infection.  
27 *International Journal of Infectious Diseases*, v. 86, p. 40–43, 2019. DOI:  
28 10.1016/j.ijid.2019.06.011.
- 29 BERRYESSA, N. A.; MARKS, S. L.; PESAVENTO, P. A.; KRASNANSKY, T.;  
30 YOSHIMOTO, S. K.; JOHNSON, E. G.; GROOTERS, A. M. Gastrointestinal pythiosis

- 1 in 10 dogs from California. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 22, p. 1065–  
2 1069, 2008. DOI: 10.1017/CBO9781107415324.004.
- 3 BISSONNETTE, K. W.; SHARP, N. J. H.; DYKSTRA, M. H.; ROBERTSON, I. R.;  
4 DAVIS, B.; PADHYE, A. A.; KAUFMAN, L. Nasal and retrobulbar mass in a cat caused  
5 by *Pythium insidiosum*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, v. 29, p. 39–44,  
6 1991.
- 7 BOCCI, V. A. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Archives*  
8 *of Medical Research*, v. 37, p. 425–435, 2006. DOI: 10.1016/j.arcmed.2005.08.006.
- 9 BORGES, G. A.; ELIAS, S. T.; SILVA, S. M. M.; MAGALHÃES, P. O.; MACEDO, S.  
10 B.; RIBEIRO, A. P. D.; GUERRA, E. N. S. In vitro evaluation of wound healing and  
11 antimicrobial potential of ozone therapy. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, v.  
12 45, n. 3, p. 364–370, 2017. DOI: 10.1016/j.jcms.2017.01.005.
- 13 BOSCO, S. M. G.; BAGAGLI, E.; ARAUJO-JÚNIOR, J. P.; CANDEIAS, J. M. G.;  
14 FRANCO, M. F.; MARQUES, M. E. A.; MENDOZA, L.; CAMARGO, R. P.;  
15 MARQUES, S. A. Human Pythiosis, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v. 11, n. 5,  
16 p. 715–718, 2005. DOI: 10.3201/eid1105.040943.
- 17 BOSCO, S. M. G.; CHECHI, J. L.; PAZ, G. S.; KRAJAEJUN, T. Pythiosis. In: SINGH,  
18 K.; SRIVASTAVA, N. (org.). *Recent Trends in Human and Animal Mycology*. 1. ed.  
19 Singapore: Springer Nature Singapore, 2019. p. 3–26. DOI: 10.1007/978-981-13-9435-  
20 5.
- 21 BOSCO, S. M. G.; REIS, G. M.; THEODORO, R. C.; MACORIS, S. A. G.; MARQUES,  
22 S. A.; MACORIS, D. G.; BAGAGLI, E. Morphological and molecular characterization  
23 of an equine isolate of *Pythium insidiosum* and comparison with the first human isolate  
24 from the same geographic region. *Medical Mycology*, v. 46, p. 557–565, 2008. DOI:  
25 10.1080/13693780801975014.
- 26 BOTTON, S. A.; PEREIRA, D. I. B.; COSTA, M. M.; AZEVEDO, M. I.; ARGENTA,  
27 J. S.; JESUS, F. P. K.; ALVES, S. H.; SANTURIO, J. M. Identification of *Pythium*  
28 *insidiosum* by nested PCR in cutaneous lesions of brazilian horses and rabbits. *Curr*  
29 *Microbiol*, v. 62, p. 1225–1229, 2011. DOI: 10.1007/s00284-010-9781-4.
- 30 BROWN, C. C.; ROBERTS, E. D. Intestinal pythiosis in a horse. *Australian veterinary*  
31 *journal*, v. 65, n. 3, p. 88–89, 1988. DOI: 10.1111/j.1751-0813.1988.tb07369.x.

- 1 BROWN, G. D.; DENNING, D. W.; GOW, N. A. R.; LEVITZ, S. M.; NETEA, M. G.;  
2 WHITE, T. C. Hidden killers: Human fungal infections. *Science Translational Medicine*,  
3 v. 4, n. 165, p. 1–10, 2012. DOI: 10.1126/scitranslmed.3004404.
- 4 BRUM, J. S.; SOUZA, T. M.; BARROS, C. S. L. Aspectos epidemiológicos e  
5 distribuição anatômica das diferentes formas clínicas do sarcoide equino no Rio Grande  
6 do Sul: 40 casos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 30, n. 10, p. 839–843, 2010.
- 7 BRUNS, T. D.; WHITE, T. J.; TAYLOR, J. W. Fungal molecular systematics. *Annual*  
8 *Review of Ecology and Systematics*, v. 22, p. 525–564, 1991. DOI:  
9 10.1146/annurev.es.22.110191.002521.
- 10 BUERGELT, C.; POWE, J.; WHITE, T. Abdominal pythiosis in a bengal tiger (*Panthera*  
11 *Tigris Tigris*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 37, n. 2, p. 186–189, 2006. DOI:  
12 10.1638/05-003.1.
- 13 BURNS, L. V.; HELAYEL, M. A.; SILVA, M. A. G.; MARUO, V. M.; CÓRDOVA, F.  
14 M.; SILVA, S. L.; BARROS, C. S. L.; RAMOS, A. T. Doenças de animais de produção  
15 na região centro-norte do Estado de Tocantins: 85 casos. *Arquivos de Pesquisa Animal*,  
16 v. 2, n. 1, p. 1–6, 2013.
- 17 BUSTIN, S. A.; BENES, V.; GARSON, J. A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.;  
18 KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M. W.; SHIPLEY, G. L.;  
19 VANDESOMPELE, J.; WITTEWER, C. T. The MIQE guidelines: minimum information  
20 for publication of Quantitative Real-Time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, v. 55,  
21 n. 4, p. 611–622, 2009. DOI: 10.1373/clinchem.2008.112797.
- 22 CALVANO, T. P.; BLATZ, P. J.; VENTO, T. J.; WICKES, B. L.; SUTTON, D. A.;  
23 THOMPSON, E. H.; WHITE, C. E.; RENZ, E. M.; HOSPENTHAL, D. R. *Pythium*  
24 *aphanidermatum* infection following combat trauma. *Journal of Clinical Microbiology*,  
25 v. 49, n. 10, p. 3710–3713, 2011. DOI: 10.1128/JCM.01209-11.
- 26 CAMUS, A. C.; GROOTERS, A. M.; AQUILAR, R. F. Granulomatous pneumonia  
27 caused by *Pythium insidiosum* in a Central American jaguar, *Panthera onca*. *Journal of*  
28 *Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 16, n. 6, p. 567–571, 2004. DOI:  
29 10.1177/104063870401600612.
- 30 CARDONA-ÁLVAREZ, J.; VARGAS-VILÓRIA, M.; PATARROYO-SALCEDO, J.  
31 Cutaneous pythiosis in horses treated with triamcinolone acetonide. Part 1. Clinical

- 1 characterization. *Revista MVZ Córdoba*, v. 21, n. 3, p. 5511–5524, 2016. DOI:  
2 10.21897/rmvz.825.
- 3 CARMO, P. M. S.; PORTELA, R. A.; SILVA, T. R.; OLIVERIA-FILHO, J. C.; RIET-  
4 CORREA, F. Cutaneous pythiosis in a goat. *Journal of Comparative Pathology*, v. 152,  
5 n. 2–3, p. 103–105, 2015. DOI: 10.1016/j.jcpa.2014.11.005.
- 6 CARRERA, M. V.; PEIXOTO, R. M.; GOUVEIA, G. V.; PESSOA, C. R. M.; JESUS,  
7 F. P. K.; SANTURIO, J. M.; BOTTON, S. A.; COSTA, M. M. Pitiose em ovinos nos  
8 estados de Pernambuco e Bahia. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 33, n. 4, p. 476–482,  
9 2013. DOI: 10.1590/S0100-736X2013000400011.
- 10 CHAFFIN, M. K.; SCHUMACHER, J.; MCMULLAN, W. C. Cutaneous pythiosis in the  
11 horse. *The Veterinary clinics of North America. Equine practice*, v. 11, n. 1, p. 91–103,  
12 1995. DOI: 10.1016/S0749-0739(17)30334-6.
- 13 CHAREONSIRISUTHIGUL, T.; KHOSITNITHIKUL, R.; INTARAMAT, A.;  
14 INKOMLUE, R.; SRIWANICHRAK, K.; PIROMSONTIKORN, S.;  
15 KITIWANWANICH, S.; LOWHNOO, T.; YINGYONG, W.; CHAIPRASERT, A;  
16 BANYONG, R.; RATANABANANGKOON, K; BRANDHORST, T. T.; KRAJAEJUN  
17 T. Performance comparison of immunodiffusion, enzyme-linked immunosorbent assay,  
18 immunochromatography and hemagglutination for serodiagnosis of human pythiosis.  
19 *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 76, n. 1, p. 42–45, 2013. DOI:  
20 10.1016/j.diagmicrobio.2013.02.025.
- 21 CHOI, Y.; BEAKES, G.; GLOCKLING, S.; KRUSE, J.; NAM, B.; NIGRELLE, L.;  
22 PLOCH, S.; SHIN, H.; SHIVAS, R. G. Towards a universal barcode of oomycetes – a  
23 comparison of the cox1 and cox2 loci. *Molecular Ecology Resources*, v. 15, n. 6, p. 1275–  
24 1288, 2017. DOI: 10.1111/1755-0998.12398.
- 25 DE COCK, A. W. A. M.; MENDOZA, L.; PADHYE, A. A.; AJELLO, L.; KAUFMAN,  
26 L. *Pythium insidiosum* sp. nov., the etiologic agent of pythiosis. *Journal of Clinical*  
27 *Microbiology*, v. 25, n. 2, p. 344–349, 1987. DOI: 0095-1137/87/020344-06\$02.00/0.
- 28 DEREVNINA, L.; DAGDAS, Y. F.; CONCEPCION, J. C.; BIALAS, A.; KELLNER,  
29 R.; PETRE, B.; DOMAZAKIS, E.; DU, J.; WU, C. H.; LIN, X.; GALVEZ, C. A.; CRUZ-  
30 MIRELES, N.; VLEESHOUWERS, V. G. A. A; KAMOUN, S. Nine things to know  
31 about elicitors. *New Phytologist*, v. 212, n. 4, p. 888–895, 2016.a. DOI:

- 1 10.1111/nph.14137.
- 2 DEREVNINA, L.; PETRE, B.; KELLNER, R.; DAGDAS, Y. F.; SAROWAR, M. N.;  
3 GIANNAKOPOULOU, A.; CONCEPCION, J. C.; CHAPARRO-GARCIA, A.;  
4 PENNINGTON, H. G.; WEST, P.; KAMOUN, S. Emerging oomycete threats to plants  
5 and animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, v. 371, n. 1709, p.  
6 20150459, 2016.b. DOI: 10.1098/rstb.2015.0459.
- 7 DÓRIA, R. G. S.; CARVALHO, M. B.; FREITAS, S. H.; LASKOSKI, L. M.;  
8 COLODEL, E. M.; MENDONÇA, F. S.; SILVA, M. A. G.; GRIGOLETTO, R.;  
9 FANTINATO-NETO, P. Evaluation of intravenous regional perfusion with amphotericin  
10 B and dimethylsulfoxide to treat horses for pythiosis of a limb. *BMC Veterinary*  
11 *Research*, v. 11, n. 152, p. 1–7, 2015. DOI: 10.1186/s12917-015-0472-z.
- 12 DÓRIA, R. G. S.; FREITAS, S. H.; LINARDI, R. L.; MENDONÇA, F. S.; ARRUDA,  
13 L. P.; BOABAID, F. M.; VALADÃO, C. A. A. Treatment of pythiosis in equine limbs  
14 using intravenous regional perfusion of amphotericin B. *Veterinary Surgery*, v. 41, n. 6,  
15 p. 759–765, 2012. DOI: 10.1111/j.1532-950X.2012.01019.x.
- 16 DOWST, M.; PAVUK, A.; VILELA, R.; VILELA, C.; MENDOZA, L. An unusual case  
17 of cutaneous feline pythiosis. *Medical Mycology Case Reports*, v. 26, p. 57–60, 2019.  
18 DOI: 10.1016/j.mmcr.2019.10.004.
- 19 DUNCAN, D.; HODGIN, C.; BAUER, R.; BRIGNAC, M. Cutaneous pythiosis in four  
20 cats. *Veterinary pathology*, v. 29, n. 5, p. 429, 1992. DOI:  
21 10.1177/030098587000700113.
- 22 DURIČIĆ, D.; VALPOTIĆ, H.; SAMARDŽIJA, M. Prophylaxis and therapeutic  
23 potential of ozone in buiatrics: current knowledge. *Animal Reproduction Science*, v. 159,  
24 p. 1–7, 2015. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2015.05.017.
- 25 ELVIS, A. M.; EKTA, J. S. Ozone therapy: A clinical review. *Journal of Natural Science,*  
26 *Biology and Medicine*, v. 2, n. 1, p. 66–70, 2011. DOI: 10.4103/0976-9668.82319.
- 27 ERALI, M.; VOELKERDING, K. V.; WITWER, C. T. High resolution melting  
28 applications for clinical laboratory medicine. *Experimental and Molecular Pathology*, v.  
29 85, n. 1, p. 50–58, 2008. DOI: 10.1016/j.yexmp.2008.03.012.High.
- 30 ESPY, M. J.; UHL, J. R.; SLOAN, L. M.; BUCKWALTER, S. P.; JONES, M. F.;



- 1 VETTER, E. A.; YAO, J. D. C.; WENGENACK, N. L.; ROSENBLATT, J. E.;  
2 COCKERILL III, F. R.; SMITH, T. F. Real-Time PCR in clinical microbiology:  
3 applications for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 19, n. 1, p.  
4 165–256, 2006. DOI: 10.1128/CMR.19.1.165.
- 5 FARMER, A. R.; MURRAY, C. K.; DRISCOLL, I. R.; WICKES, B. L.;  
6 WIEDERHOLD, N.; SUTTON, D. A.; SANDERS, C.; MENDE, K.; ENNISS, B.; FEIG,  
7 J.; GANESAN, A.; RINI, E. A.; VENTO, T. J. Combat-related *Pythium aphanidermatum*  
8 invasive wound infection: case report and discussion of utility of molecular diagnostics.  
9 *Journal of Clinical Microbiology*, v. 53, n. 6, p. 1968–1975, 2015. DOI:  
10 10.1128/JCM.00410-15.
- 11 FERNANDES, C. P. M.; GIORDANI, C.; GRECCO, F. B.; SALLIS, E. S. V.; STAINKI,  
12 D. R.; GASPAR, L. F. J.; RIBEIRO, L. C. G.; NOBRE, M. O. Gastric pythiosis in a dog.  
13 *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 29, n. 4, p. 235–237, 2012. DOI:  
14 10.1016/j.riam.2012.01.002.
- 15 FIRMINO, M. O.; ALVES, R. C.; OLINDA, R. G.; CARNEIRO-JÚNIOR, M. S.;  
16 MIRANDA-NETO, E. G.; RIET-CORREA, F.; DANTAS, A. F. M. Sarcoide associado  
17 à infecção por *Habronema* spp. em equinos no Brasil. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 44,  
18 n. Suppl 1, p. 160, 2016.
- 19 FÖRSTER, H.; COFFEY, M. O.; ELWOOD, H.; SOGIN, M. L. Sequence analysis of the  
20 small subunit ribosomal RNAs of three zoosporic fungi and implications for fungal  
21 evolution. *Mycologia*, v. 82, n. 3, p. 306–312, 1990. DOI:  
22 10.1080/00275514.1990.12025885.
- 23 FORTIN, J. S.; CALCUTT, M. J.; KIM, D. Y. Sublingual pythiosis in a cat. *Acta*  
24 *Veterinaria Scandinavica*, v. 59, n. 63, p. 1–5, 2017. DOI: 10.1186/s13028-017-0330-z.
- 25 FRENCH, D. D.; HAYNES, P. F.; MILLER, R. I. Surgical and medical management of  
26 rhinophycomycosis (conidiobolomycosis) in a horse. *Journal of the American Veterinary*  
27 *Medical Association*, v. 186, n. 10, p. 1105–1107, 1985.
- 28 FURLAN, F. H.; LUCIOLI, J.; VERONEZI, L. O.; FONTEQUE, J. H.; TRAVERSO, S.  
29 D.; NAKAZATO, L.; GAVA, A. Conidiobolomycose causada por *Conidiobolus*  
30 *lamprauges* em ovinos no Estado de Santa Catarina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.  
31 30, n. 7, p. 529–532, 2010. DOI: 10.1590/S0100-736X2010000700003.

- 1 GAASTRA, W.; LIPMAN, L. J. A.; DE COCK, A. W. A. M.; EXEL, T. K.; PEGGE, R.  
2 B. G.; SCHEURWATER, J.; VILELA, R.; MENDOZA, L. *Pythium insidiosum*: An  
3 overview. *Veterinary Microbiology*, v. 146, n. 1–2, p. 1–16, 2010. DOI:  
4 10.1016/j.vetmic.2010.07.019.
- 5 GABRIEL, A. L.; KOMMERS, G. D.; TROST, M. E.; BARROS, C. S. L.; PEREIRA,  
6 D. B.; SCHWENDLER, S. E.; SANTURIO, J. M. Surto de pitiose cutânea em bovinos.  
7 *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 28, n. 12, p. 583–587, 2008. DOI: 10.1590/S0100-  
8 736X2008001200003.
- 9 GALIZA, G. J. N.; TOCHETTO, C.; ROSA, F. B.; PANZIERA, W.; SILVA, T. M.;  
10 CAPRIOLI, R. A.; KOMMERS, G. D. Utilização de três métodos imuno-histoquímicos  
11 na detecção de aspergilose e zigomicose em animais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.  
12 34, n. 7, p. 637–642, 2014.
- 13 GOAD, M. E. P. Pulmonary pythiosis in a horse. *Veterinary pathology*, v. 21, n. 2, p.  
14 261–262, 1984. DOI: 10.1177/030098588402100224.
- 15 GRANT, D.; GLASS, R.; HANSEN, R.; VILELA, R.; MENDOZA, L. Cutaneous  
16 pythiosis in a Red Brangus beef calf cured by immunotherapy. *Medical Mycology Case*  
17 *Reports*, v. 14, p. 1–3, 2016. DOI: 10.1016/j.mmcr.2016.11.005.
- 18 GRECCO, F. B.; SCHILD, A. L.; QUEVEDO, P.; ASSIS-BRASIL, N. D.; KOMMERS,  
19 G. D.; MARCOLONGO-PEREIRA, C.; SOARES, M. P. Pitiose cutânea em bovinos na  
20 região Sul do Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 29, n. 11, p. 938–  
21 942, 2009. DOI: 10.1590/s0100-736x2009001100013.
- 22 GROOTERS, A. M. Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. *The*  
23 *Veterinary Clinics Small Animal Practice*, v. 33, p. 695–720, 2003. DOI: 10.1016/S0195-  
24 5616(03)00034-2.
- 25 GROOTERS, A. M.; GEE, M. K. Development of a nested polymerase chain reaction  
26 assay for the detection and identification of *Pythium insidiosum*. *Journal of Veterinary*  
27 *Internal Medicine*, v. 16, p. 147–152, 2002. DOI: 10.1892/0891-  
28 6640(2002)016<0147:doanpc>2.3.co;2.
- 29 GROOTERS, A. M.; HODGIN, E. C.; BAUER, R. W.; DETRISAC, C. J.; ZNAJDA, N.  
30 R.; THOMAS, R. C. Clinicopathologic findings associated with *Lagenidium* sp. infection  
31 in 6 dogs: Initial description of an emerging oomycosis. *Journal of Veterinary Internal*

- 1 *Medicine*, v. 17, n. 5, p. 637–646, 2003. DOI: 10.1892/0891-  
2 6640(2003)017<0637:CFAWSI>2.3.CO;2.
- 3 GROOTERS, A. M.; LEISE, B. S.; LOPEZ, M. K.; GEE, M. K.; O'REILLY, K. L.  
4 Development and evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the  
5 serodiagnosis of pythiosis in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 16, p.  
6 142–146, 2002.a. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2002.tb02345.x>.
- 7 GROOTERS, A. M.; WHITTINGTON, A.; LOPEZ, M. K.; BOROUGHS, M. N.; ROY,  
8 A. F. Evaluation of microbial culture techniques for the isolation of *Pythium insidiosum*  
9 from equine tissues. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 14, p. 288–294,  
10 2002.b. DOI: 10.1177/104063870201400403.
- 11 GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A. M. Developments in fungal taxonomy. *Clinical*  
12 *Microbiology Reviews*, v. 12, n. 3, p. 454–500, 1999. DOI: 10.1128/cmr.12.3.454.
- 13 GUILLOT, J.; COLLOBERT, C.; JENSEN, H. E.; HUERRE, M.; CHERMETTE, R.  
14 Two cases of equine mucormycosis caused by *Absidia corymbifera*. *Equine Veterinary*  
15 *Journal*, v. 32, n. 5, p. 453–456, 2000.
- 16 HASIKA, R.; LALITHA, P.; RADHAKRISHNAN, N.; RAMESHKUMAR, G.;  
17 PRAJNA, N. V.; SRINIVASAN, M. *Pythium* keratitis in South India: incidence, clinical  
18 profile, management, and treatment recommendation. *Indian Journal of Ophthalmology*,  
19 v. 67, p. 42–47, 2019. DOI: 10.4103/ijo.IJO\_445\_18.
- 20 HEADLEY, S. A.; ARRUDA-JUNIOR, H. N. Equine cutaneous pythiosis: a report of  
21 four cases. *Ciência Rural*, v. 34, n. 1, p. 289–292, 2004. DOI: 10.1590/s0103-  
22 84782004000100047.
- 23 HECK, L. C.; BIANCHI, M. V.; PEREIRA, P. R.; LORENZETT, M. P.; LORENZO, C.;  
24 PAVARINI, S. P.; DRIEMEIER, D.; SONNE, L. Gastric pythiosis in a bactrian camel  
25 (*Bactrianus Camelus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 49, n. 3, p. 784–787,  
26 2018. DOI: 10.1638/2017-0195.1.
- 27 HILTON, R. E.; TEPEDINO, K.; GLENN, C. J.; MERKEL, K. L. Swamp cancer: a case  
28 of human pythiosis and review of the literature. *British Journal of Dermatology*, v. 175,  
29 n. 2, p. 394–397, 2016. DOI: 10.1111/bjd.14520.
- 30 HUMBER, R. A. Entomophthoromycota: a new phylum and reclassification for

- 1 entomophthoroid fungi. *Mycotaxon*, v. 120, p. 477–492, 2012. DOI: 10.5248/120.477.
- 2 HUMBER, R. A.; BROWN, C. C.; KORNEGAY, R. W. Equine zygomycosis caused by  
3 *Conidiobolus lamprauges*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 27, n. 3, p. 573–576,  
4 1989.
- 5 HUMMEL, J.; GROOTERS, A.; DAVIDSON, G.; JENNINGS, S.; NICKLAS, J.;  
6 BIRKENHEUER, A. Successful management of gastrointestinal pythiosis in a dog using  
7 itraconazole, terbinafine, and mefenoxam. *Medical Mycology*, v. 49, p. 539–542, 2011.  
8 DOI: 10.3109/13693786.2010.543705.
- 9 IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa da Pecuária Municipal:  
10 Tabela 3939 - Efetivo dos rebanhos, por tipo de rebanho, 2018. Disponível em:  
11 <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#resultado>
- 12 IBRAHIM, A. S. Host cell invasion in Mucormycosis: role of iron. *Current Opinion in*  
13 *Microbiology*, v. 14, n. 4, p. 406–411, 2011. DOI: 10.1038/jid.2014.371.
- 14 INKOMLUE, R.; LARBCHAROENSUB, N.; KARNSEMBUT, P.; LERKSUTHIRAT,  
15 T.; AROONROCH, R.; LOHNOO, T.; YINGYON, W.; SANTANIRAND, P.;  
16 SANSOPHA, L.; KRAJAEJUN, T. Development of an anti-Elicitin antibody-based  
17 immunohistochemical assay for diagnosis of pythiosis. *Journal of Clinical Microbiology*,  
18 v. 54, n. 1, p. 43–48, 2016. DOI: 10.1128/JCM.02113-15.
- 19 INTARAMAT, A.; SORNPRACHUM, T.; CHANTRATHONKUL, B.; CHAISURIYA,  
20 P.; LOHNOO, T.; YINGYONG, W.; JONGRUJA, N.; KUMSANG, Y.; SANDEE, A.;  
21 CHAIPRASERT, A.; BANYONG, R.; SANTURIO, J. M.; GROOTERS, A. M.;  
22 RATANABANANGKON, K.; KRAJAEJUN, T. Protein A/G-Based  
23 immunochromatographic test for serodiagnosis of pythiosis in human and animal subjects  
24 from Asia and Americas. *Medical Mycology*, v. 54, n. 6, p. 641–647, 2016. DOI:  
25 10.1093/mmy/myw018.
- 26 JAEGER, G. H.; ROTSTEIN, D. S.; LAW, J. M. Prostatic pythiosis in a dog. *Journal of*  
27 *Veterinary Internal Medicine*, v. 16, p. 598–602, 2002.
- 28 KAMMARNJESADAKUL, P.; PALAGA, T.; SRITUNYALUCKSANA, K.;  
29 MENDOZA, L.; KRAJAEJUN, T.; VANITTANAKOM, N.; TONGCHUSAK, S.;  
30 DENDUANGBORIPANT, J.; CHINDAMPORN, A. Phylogenetic analysis of *Pythium*  
31 *insidiosum* Thai strains using cytochrome oxidase II (COX II) DNA coding sequences

- 1 and internal transcribed spacer regions (ITS). *Medical Mycology*, v. 49, p. 289–295,  
2 2011. DOI: 10.3109/13693786.2010.511282.
- 3 KAMOUN, S. Molecular genetics of pathogenic Oomycetes. *Eukaryotic Cell*, v. 2, n. 2,  
4 p. 191–199, 2003. DOI: 10.1128/EC.2.2.191–199.2003.
- 5 KAUFMAN, L. *Penicilliosis marneffei* and pythiosis: emerging tropical diseases.  
6 *Mycopathologia*, v. 143, p. 3–7, 1998.
- 7 KEERATIJARUT, A.; LOHNOO, T.; YINGYONG, W.; RUJIRAWAT, T.;  
8 SRICHUNRUSAMI, C.; ONPEAW, P.; CHONGTRAKOOL, P.; BRANDHORST, T.  
9 T.; KRAJAEJUN, T. Detection of the oomycete *Pythium insidiosum* by real-time PCR  
10 targeting the gene coding for exo-1, 3-b-glucanase. *Journal of Medical Microbiology*, v.  
11 64, p. 971–977, 2015. DOI: 10.1099/jmm.0.000117.
- 12 KNOTTENBELT, D. C. A suggested clinical classification for the equine sarcoid.  
13 *Clinical Techniques in Equine Practice*, v. 4, n. 4, p. 278–295, 2005. DOI:  
14 10.1053/j.ctep.2005.10.008.
- 15 KNOTTENBELT, D. C.; PASCOE, R. R. *Afecções e distúrbios do cavalo*. 1. ed. São  
16 Paulo: Manole, 1998.
- 17 KONRADT, G.; BASSUINO, D. M.; BIANCHI, M. V.; CASTRO, L.; CAPRIOLI, R.  
18 A.; PAVARINI, S. P.; SANTURIO, J. M.; AZEVEDO, M. I.; JESUS, F. P.;  
19 DRIEMEIER, D. Pythiosis in calves: an epidemiologic, pathologic, serologic and  
20 molecular characterization. *Medical Mycology Case Reports*, v. 14, p. 24–26, 2016. DOI:  
21 10.1016/j.mmcr.2016.11.004.
- 22 KORENEK, N. L.; LEGENDRE, A. M.; ANDREWS, F. M.; BLACKFORD, J. T.;  
23 WAN, P. Y.; BREIDER, M. A.; RINALDI, M. G. Treatment of mycotic rhinitis with  
24 itraconazole in three horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 8, n. 3, p. 224–  
25 227, 1994. DOI: 10.1111/j.1939-1676.1994.tb03221.x.
- 26 KRAJAEJUN, T.; LERKSUTHIRAT, T.; GARG, G.; LOWHNOO, T.; YINGYONG,  
27 W.; KHOSITNITHIKUL, R.; TANGPHATSORNRUANG, S.; SURIYAPHOL, P.;  
28 RANGANATHAN, S.; SULLIVAN, T. D. Transcriptome analysis reveals pathogenicity  
29 and evolutionary history of the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum*. *Fungal*  
30 *Biology*, p. 1–14, 2014. DOI: 10.1016/j.funbio.2014.01.009.

- 1 KRAJAEJUN, T.; SATHAPATAYAVONGS, B.; PRACHARKTAM, R.;  
2 NITIYANANT, P.; LEELACHAIKUL, P.; WANACHIWANAWIN, W.;  
3 CHAIPRASERT, A.; ASSANASEN, P.; SAIPETCH, M.; MOOTSIKAPUN, P.;  
4 CHETCHOTISAKD, P.; LEKHAKULA, A.; MITARNUN, W.; KALNAUWAKUL, S.;  
5 SUPPARATPINYO, K.; CHAIWARITH, R.; CHIEWCHANVIT, S.; TANANUVAT,  
6 N.; SRISIRI, S.; SUANKRATAY, C.; KULWICHIT, W.; WONGSAISUWAN, M.;  
7 SOMKAEW, S. Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand.  
8 *Clinical Infectious Diseases*, v. 43, n. 5, p. 569–576, 2006.
- 9 KWON-CHUNG, K. J. Phylogenetic spectrum of fungi that are pathogenic to humans.  
10 *Clinical Infectious Diseases*, v. 19, n. Suppl 1, p. S1–S7, 1994. DOI:  
11 10.1093/clinids/19.Supplement\_1.S1.
- 12 KWON-CHUNG, K. J. Taxonomy of fungi causing mucormycosis and  
13 entomophthoromycosis (zygomycosis) and nomenclature of the disease: Molecular  
14 mycologic perspectives. *Clinical Infectious Diseases*, v. 54, n. Suppl 1, p. S8–S15, 2012.  
15 DOI: 10.1093/cid/cir864.
- 16 LATIJNHOUWERS, M.; DE WIT, P. J. G. M.; GOVERS, F. Oomycetes and fungi:  
17 Similar weaponry to attack plants. *Trends in Microbiology*, v. 11, n. 10, p. 462–469,  
18 2003. DOI: 10.1016/j.tim.2003.08.002.
- 19 LEAL, A. B. M.; LEAL, A. T.; SANTURIO, J. M.; KOMMERS, G. D.; CATTO, J. B.  
20 Pitiose equina no pantanal brasileiro: aspectos clínico-patológicos de casos típicos e  
21 atípicos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 21, n. 4, p. 151–156, 2001. DOI:  
22 10.1590/S0100-736X2001000400005.
- 23 LERKSUTHIRAT, T.; LOHNOO, T.; INKOMLUE, R.; RUJIRAWAT, T.;  
24 YINGYONG, W.; KHOSITNITHIKUL, R.; PHAONAKROP, N.; ROYTRAKUL, S.;  
25 SULLIVAN, T. D.; KRAJAEJUN, T. The Elicitin-like glycoprotein, ELI025, is secreted  
26 by the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum* and evades host antibody responses.  
27 *PLoS ONE*, v. 10, n. 3, p. e0118547, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0118547.
- 28 LÉVESQUE, C. A.; DE COCK, A. W. A. M. Molecular phylogeny and taxonomy of the  
29 genus *Pythium*. *Mycological Research*, v. 108, n. 12, p. 1363–1383, 2004. DOI:  
30 10.1017/S0953756204001431.
- 31 LOHNOO, T.; YINGYONG, W.; KUMSANG, Y.; PAYATTIKUL, P.;

- 1 JATURAPAKTRARAK, C.; LAOR, C.; AEKPLAKORN, W.; KRAJAEJUN, T.  
2 Seroprevalence of anti-*Pythium insidiosum* antibodies in the Thai population. *Medical*  
3 *Mycology*, v. 57, n. 3, p. 284–290, 2019. DOI: 10.1093/mmy/myy030.
- 4 LÓPEZ-SANROMÁN, J.; PAYÁ, M. J.; CUTULI, M. T.; GONZÁLEZ, J. L. Case report  
5 cutaneous mucormycosis caused by *Absidia corymbifera* in a horse. *Veterinary*  
6 *Dermatology*, v. 11, p. 151–155, 2000.
- 7 LUNARDI, M.; ALCÂNTARA, B. K.; OTONEL, R. A. A.; RODRIGUES, W. B.;  
8 ALFIERI, A. F.; ALFIERI, A. A. Bovine Papillomavirus type 13 DNA in equine sarcoids.  
9 *Journal of Clinical Microbiology*, v. 51, n. 7, p. 2167–2171, 2013. DOI:  
10 10.1128/JCM.00371-13.
- 11 MACHADO, G.; WEIBLEN, C.; ESCOBAR, L. E. Potential distribution of *Pythium*  
12 *insidiosum* in Rio Grande do Sul, Brazil, and projections to neighbour countries.  
13 *Transboundary Emerging Diseases*, v. 65, n. 6, p. 1–9, 2018. DOI: 10.1111/tbed.12925.
- 14 MACIEL, I. C. F.; SILVEIRA, J. T.; MAIA, C. A.; SOUSA, R. M.; OLIVEIRA, N. J. F.;  
15 DUARTE, E. R. Pitiose fatal em equino tratado inicialmente para habronemose cutânea.  
16 *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 36, n. 3, p. 293–297, 2008.
- 17 MACKAY, I. M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clinical Microbiology*  
18 *and Infection*, v. 10, n. 3, p. 190–212, 2004. DOI: 10.1111/j.1198-743X.2004.00722.x.
- 19 MARCOLONGO-PEREIRA, C.; SALLIS, E. S. V.; RAFFI, M. B.; PEREIRA, D. I. B.;  
20 HINNAH, F. L.; COELHO, A. C. B.; SCHILD, A. L. Epidemiologia da pitiose equina na  
21 região sul do Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 32, n. 9, p. 865–  
22 868, 2012. DOI: 10.1590/S0100-736X2012000900009.
- 23 MARQUES, S. A.; BAGAGLI, E.; BOSCO, S. M. G.; CAMARGO, R. M. P.;  
24 MARQUES, M. E. A. *Pythium insidiosum*: relato do primeiro caso de infecção humana  
25 no Brasil. *Anais Brasileiro de Dermatologia*, v. 81, n. 5, p. 483–485, 2006. DOI:  
26 10.1590/S0365-05962006000500012.
- 27 MARTIN, F. N.; LOPER, J. E. Soilborne plant diseases caused by *Pythium* spp.: ecology,  
28 epidemiology, and prospects for biological control. *Critical Reviews in Plant Sciences*,  
29 v. 18, n. 2, p. 111–181, 1999. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/07352689991309216>.
- 30 MCGOWAN, J.; FITZPATRICK, D. A. Genomic, network, and phylogenetic analysis of

- 1 the oomycete effector arsenal. *mSphere*, v. 2, n. 6, p. e00408-17, 2017. DOI:  
2 10.1128/mSphere.
- 3 MEIRELES, M. C. A.; RIET-CORREA, F.; FISCHMAN, O.; ZAMBRANO, A. F. H.;  
4 ZAMBRANO, M. S.; RIBEIRO, G. A. Cutaneous pythiosis in horses from Brazil.  
5 *Mycoses*, v. 36, n. 3–4, p. 139–142, 1993. DOI: 10.1111/j.1439-0507.1993.tb00702.x.
- 6 MENDOZA, L.; AJELLO, L.; MCGINNIS, M. R. Infections caused by the oomycetous  
7 pathogen *Pythium insidiosum*. *Journal de Mycologie Medicale*, v. 6, n. 4, p. 151–164,  
8 1996.
- 9 MENDOZA, L.; ALFARO, A. A. Equine subcutaneous zygomycosis in Costa Rica.  
10 *Mykosen*, v. 28, n. 11, p. 545–549, 1985.
- 11 MENDOZA, L.; ALFARO, A. A. Equine pythiosis in Costa Rica: Report of 39 cases.  
12 *Mycopathologia*, v. 94, n. 2, p. 123–129, 1986. DOI: 10.1007/BF00437377.
- 13 MENDOZA, L.; HERNANDEZ, F.; AJELLO, L. Life cycle of the human and animal  
14 oomycete pathogen *Pythium insidiosum*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 31, n. 11,  
15 p. 2967–2973, 1993.
- 16 MENDOZA, L.; MANDY, W.; GLASS, R. An improved *Pythium insidiosum*-vaccine  
17 formulation with enhanced immunotherapeutic properties in horses and dogs with  
18 pythiosis. *Vaccine*, v. 21, p. 2797–2804, 2003. DOI: 10.1016/S0264-410X(03)00225-1.
- 19 MENDOZA, L.; NEWTON, J. C. Immunology and immunotherapy of the infections  
20 caused by *Pythium insidiosum*. *Medical Mycology*, v. 43, p. 477–486, 2005. DOI:  
21 10.1080/13693780500279882.
- 22 MENDOZA, L.; PRASLA, S. H.; AJELLO, L. Orbital pythiosis: a non-fungal disease  
23 mimicking orbital mycotic infections, with a retrospective review of the literature.  
24 *Mycoses*, v. 47, p. 14–23, 2004. DOI: 10.1046/j.1439-0507.2003.00950.x.
- 25 MENDOZA, L.; VILELA, R.; VOELZ, K.; IBRAHIM, A. S.; VOIGT, K.; LEE, S. C.  
26 Human fungal pathogens of Mucorales and Entomophthorales. *Cold Spring Harb*  
27 *Perspect Med*, v. 5, n. a019562, p. 1–33, 2015.
- 28 MENDOZA, L.; VILLALOBOS, J.; CALLEJA, C. E.; SOLIS, A. Evaluation of two  
29 vaccines for the treatment of pythiosis insidiosum in horses. *Mycopathologia*, v. 119, n. 2,  
30 p. 89–95, 1992. DOI: 10.1007/BF00443939.



- 1 MILLER, R. I. Treatment of equine phycomycosis by immunotherapy and surgery.  
2 *Australian Veterinary Journal*, v. 57, p. 377–382, 1981. DOI: 10.1111/j.1751-  
3 0813.1981.tb00526.x.
- 4 MILLER, R. I. Investigations into the biology of three “phycomycotic” agents pathogenic  
5 for horses in Australia. *Mycopathologia*, v. 81, p. 23–28, 1983.
- 6 MILLER, R. I.; CAMPBELL, R. S. F. Clinical observations on equine phycomycosis.  
7 *Australian Veterinary Journal*, v. 58, n. June, p. 221–226, 1982.
- 8 MILLER, R.; POTT, B. Phycomycosis of the horse caused by *Basidiobolus haptosporus*.  
9 *Australian Veterinary Journal*, v. 56, p. 224–227, 1980. DOI: 10.1111/j.1751-  
10 0813.1980.tb15978.x.
- 11 MORAES, A. S.; SANTURIO, J. M.; TOMICH, T. R.; ABREU, U. G. P.; JULIANO, R.  
12 S.; FERNANDES, F. A. *Impactos econômicos, sociais e ambientais de tecnologias da*  
13 *Embrapa Pantanal: Pitium-Vac® – imunoterápico contra pitiose equina*. Embrapa  
14 Pantanal, Corumbá, 2013. Disponível em:  
15 <http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/DOC123.pdf>.
- 16 MOSBAH, E.; KARROUF, G. I. A.; YOUNIS, E. A.; SAAD, H. S.; AHDY, A.;  
17 ZAGHLOUL, A. E. Diagnosis and surgical management of pythiosis in draft horses:  
18 report of 33 cases in Egypt. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 32, n. 3, p. 164–  
19 169, 2012. DOI: 10.1016/j.jevs.2011.08.014.
- 20 OLDENHOFF, W.; GROOTERS, A.; PINKERTON, M. E.; KNORR, J.; TREPANIER,  
21 L. Cutaneous pythiosis in two dogs from Wisconsin, USA. *Veterinary Dermatology*, v.  
22 25, p. 52–e21, 2014. DOI: 10.1111/vde.12101.
- 23 OTTEN, N.; TSEHARNER, C.; LAZARY, S.; ANTCZAK, D. F.; GERBER, H. DNA of  
24 bovine papillomavirus type 1 and 2 in equine sarcoids: PCR detection and direct  
25 sequencing. *Archives of Virology*, v. 132, p. 121–131, 1993.
- 26 OWENS, W. R.; MILLER, R. I.; HAYNES, P. F.; SNIDER, T. G. Phycomycosis caused  
27 by *Basidiobolus haptosporus* in two horses. *Journal of the American Veterinary Medical*  
28 *Association*, v. 186, n. 7, p. 703–705, 1985.
- 29 PAULA, D. A. J.; OLIVEIRA-FILHO, J. X.; SILVA, M. C.; COLODEL, E. M.;  
30 BROETTO, L.; PINTO, P. M.; SCHRANK, A.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.

- 1 Molecular characterization of ovine zygomycosis in central western Brazil. *Journal of*  
2 *Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 22, p. 274–277, 2010. DOI:  
3 10.1177/104063871002200220.
- 4 PEIXOTO, T. C.; LIMA, E. B.; FARIAS, S. S.; FERREIRA, M. M.; MACÊDO, A. G.  
5 C.; NAKAZATO, L.; PESCADOR, C. A.; D’AVILA, M. S.; CARVALHO, V. A. N.;  
6 MADUREIRA, K. M. Outbreaks of conidiobolomycosis caused by *Conidiobolus*  
7 *lamprauges* in sheep in the State of Bahia, Northeastern of Brazil. *Brazilian Journal of*  
8 *Veterinary Medicine*, v. 39, n. 4, p. 252–263, 2017. DOI: 10.29374/2527-  
9 2179.bjvm018017.
- 10 PEREIRA, D. I. B.; BOTTON, S. A.; AZEVEDO, M. I.; MOTTA, M. A. A.; LOBO, R.  
11 R.; SOARES, M. P.; FONSECA, A. O. S.; JESUS, F. P. K.; ALVES, S. H.; SANTURIO,  
12 J. M. Canine gastrointestinal pythiosis treatment by combined antifungal and  
13 immunotherapy and review of published studies. *Mycopathologia*, v. 176, p. 309–315,  
14 2013. DOI: 10.1007/s11046-013-9683-7.
- 15 PEREIRA, D. I. B.; SCHILD, A. L.; MOTTA, M. A.; FIGHERA, R. A.; SALLIS, E. S.  
16 V.; MARCOLONGO-PEREIRA, C. Cutaneous and gastrointestinal pythiosis in a dog in  
17 Brazil. *Veterinary Research Communications*, v. 34, p. 301–306, 2010. DOI:  
18 10.1007/s11259-010-9354-9.
- 19 PERMPALUNG, N.; WORASILCHAI, N.; CHINDAMPORN, A. Human Pythiosis:  
20 emergence of fungal-like organism. *Mycopathologia*, p. 1–12, 2019. DOI:  
21 10.1007/s11046-019-00412-0.
- 22 PESAVENTO, P. A.; BARR, B.; RIGGS, S. M.; EIGENHEER, A. L.; PAMMA, R.;  
23 WALKER, R. L. Cutaneous pythiosis in a nestling white-faced ibis. *Veterinary*  
24 *Pathology*, v. 45, n. 4, p. 538–541, 2008. DOI: 10.1354/vp.45-4-538.
- 25 PESSOA, A. F. A.; PESSOA, C. R. M.; MIRANDA-NETO, E. G.; DANTAS, A. F. M.;  
26 RIET-CORREA, F. Doenças de pele em equídeos no semiárido brasileiro. *Pesquisa*  
27 *Veterinária Brasileira*, v. 34, n. 8, p. 743–748, 2014.
- 28 PESSOA, C. R. M.; RIET-CORREA, F.; PIMENTEL, L. A.; GARINO, F.; DANTAS,  
29 A. F. M.; KOMMERS, G. D.; TABOSA, I. M.; REIS-JÚNIOR, J. L. Pythiosis of the  
30 digestive tract in sheep. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 24, n. 6, p.  
31 1133–1136, 2012. DOI: 10.1177/1040638712462026.

- 1 PIRES, L.; BOSCO, S. M. Gi.; BAPTISTA, M. S.; KURACHI, C. Photodynamic therapy  
2 in *Pythium insidiosum* - An in vitro study of the correlation of sensitizer localization and  
3 cell death. *PLoS ONE*, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0085431.
- 4 PRESSER, J. W.; GOSS, E. M. Environmental sampling reveals that *Pythium insidiosum*  
5 is ubiquitous and genetically diverse in North Central Florida. *Medical Mycology*, v. 53,  
6 p. 674–683, 2015. DOI: 10.1093/mmy/myv054.
- 7 PUGH, D. G.; HU, X. P.; BLAGBURN, B. Habronemiasis: biology, signs, and diagnosis,  
8 and treatment and prevention of the Nematodes and vector flies. *Journal of Equine*  
9 *Veterinary Science*, v. 34, n. 2, p. 241–248, 2014. DOI: 10.1016/j.jevs.2013.06.004.
- 10 PUPAIBOOL, J.; CHINDAMPORN, A.; PATARAKUL, K.; SUANKRATAY, C.;  
11 SINDHUPHAK, W.; KULWICHIT, W. Human pythiosis. *Emerging Infectious Diseases*,  
12 v. 12, n. 3, p. 517–518, 2006.
- 13 PUSTERLA, N.; WATSON, J. L.; WILSON, W. D.; AFFOLTER, V. K.; SPIER, S. J.  
14 Cutaneous and ocular habronemiasis in horses: 63 cases (1988-2002). *JAVMA*, v. 222, n.  
15 7, p. 978–982, 2003.
- 16 RAKICH, P. M.; GROOTERS, A. M.; TANG, K. N. Gastrointestinal pythiosis in two  
17 cats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 17, p. 262–269, 2005. DOI:  
18 10.1177/104063870501700310.
- 19 REAGAN, K. L.; MARKS, S. L.; PESAVENTO, P. A.; MAGGIORE, A. D.; ZHU, B.  
20 Y.; GROOTERS, A. M. Successful management of 3 dogs with colonic pythiosis using  
21 itraconazole, terbinafine, and prednisone. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 33,  
22 n. 3, p. 1434–1439, 2019. DOI: 10.1111/jvim.15506.
- 23 REED, G. H.; WITTEWER, C. T. Sensitivity and specificity of Single-Nucleotide  
24 Polymorphism Scanning by High-Resolution Melting Analysis. *Clinical Chemistry*, v.  
25 50, n. 10, p. 1748–1754, 2004. DOI: 10.1373/clinchem.2003.029751.
- 26 REINPRAYOON, U.; PERMPALUNG, N.; KASETSUWAN, N.; PLONGLA, R.;  
27 MENDOZA, L.; CHINDAMPORN, A. *Lagenidium* sp. ocular infection mimicking  
28 ocular pythiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 51, n. 8, p. 2778–2780, 2013. DOI:  
29 10.1128/JCM.00783-13.
- 30 REIS JR., J. L.; CARVALHO, E. C. Q.; NOGUEIRA, R. H. G.; LUCIANA S. L.;

- 1 MENDOZA, L. Disseminated pythiosis in three horses. *Veterinary Microbiology*, v. 96,  
2 p. 289–295, 2003. DOI: 10.1016/j.vetmic.2003.07.005.
- 3 RIBEIRO, T. C.; WEIBLEN, C.; AZEVEDO, M. I.; BOTTON, S. A.; ROBE, L. J.;  
4 PEREIRA, D. I. B.; MONTEIRO, D. U.; LORENSETTI, D. M.; SANTURIO, J. M.  
5 Microevolutionary analyses of *Pythium insidiosum* isolates of Brazil and Thailand based  
6 on exo-1,3- $\beta$ -glucanase gene. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 48, p. 58–63, 2017.  
7 DOI: 10.1016/j.meegid.2016.11.020.
- 8 RISTAINO, J. B. Tracking historic migrations of the Irish potato famine pathogen,  
9 *Phytophthora infestans*. *Microbes and Infection*, v. 4, n. 13, p. 1369–1377, 2002. DOI:  
10 10.1016/S1286-4579(02)00010-2.
- 11 RIVIERRE, C.; LAPRIE, C.; GUIARD-MARIGNY, O.; BERGEAUD, P.;  
12 BERTHELEMY, M.; GUILLOT, J. Pythiosis in Africa. *Emerging Infectious Diseases*,  
13 v. 11, n. 3, p. 479–481, 2005.
- 14 ROBINSON, C. S.; ROBERTSON, J. T.; REED, S. M.; PINCHBECK, L. R. Treatment  
15 of a mare for *Conidiobolus coronatus* infection. *Equine Veterinary Education*, v. 19, n.  
16 8, p. 396–403, 2007. DOI: 10.2746/095777307X220452.
- 17 RODRIGUES, A.; GRAÇA, D. L.; FONTOURA, C.; CAVALHEIRO, A. S.; HENZEL,  
18 A.; SCHWENDLER, S. E.; ALVES, S. H.; SANTURIO, J. M. Intestinal dog pythiosis in  
19 Brazil. *Journal de Mycologie Médicale*, v. 16, p. 37–41, 2006. DOI:  
20 10.1016/j.mycmed.2005.10.006.
- 21 RODRIGUES, C. A.; LUVIZOTTO, M. C. R. Zigomicose e pitiose cutânea em equinos:  
22 diagnóstico e tratamento. *Revista de Educação continuada CRMV-SP*, v. 3, n. 3, p. 3–  
23 11, 2000.
- 24 ROMERO, A.; GARCÍA, J.; BALESTIÉ, S.; MALFATTO, F.; VICENTINO, A.;  
25 SALLIS, E. S. V.; SCHILD, A. L.; DUTRA, F. Equine pythiosis in the eastern wetlands  
26 of Uruguay. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 39, n. 7, p. 469–475, 2019. DOI:  
27 10.1590/1678-5150-PVB-6256.
- 28 RUJIRAWAT, T.; SRIDAPAN, T.; LOHNOO, T.; YINGYONG, W.; KUMSANG, Y.;  
29 SAE-CHEW, P.; TONPITAK, W.; KRAJAEJUN, T. Single nucleotide polymorphism-  
30 based multiplex PCR for identification and genotyping of the oomycete *Pythium*  
31 *insidiosum* from humans, animals and the environment. *Infection, Genetics and*

- 1 *Evolution*, v. 54, p. 429–436, 2017. DOI: 10.1016/j.meegid.2017.08.004. Disponível em:  
2 <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2017.08.004>.
- 3 SALAS, Y.; MÁRQUEZ, A.; CANELÓN, J.; PERAZZO, Y.; COLMENÁREZ, V.;  
4 LÓPEZ, J. A. Equine Pythiosis :report in crossed cred (Criole Venezuelan) horses.  
5 *Mycopathologia*, v. 174, p. 511–517, 2012. DOI: 10.1007/s11046-012-9562-7.
- 6 SALLIS, E. S. V.; PEREIRA, D. I. B.; RAFFI, M. B. Pitiose cutânea em equinos: 14  
7 casos. *Ciência Rural*, v. 33, n. 5, p. 899–903, 2003.
- 8 SALOMÃO-NASCIMENTO, R. B.; FRAZÃO-TEIXEIRA, E.; OLIVEIRA, F. C. R.  
9 Avaliação hepática e renal em equinos com pitiose tratados com iodeto de potássio,  
10 através da determinação das proteínas, substâncias nitrogenadas e enzimas séricas.  
11 *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 32, n. 2, p. 105–110, 2010.
- 12 SAMPAIO, A. J. S. A.; GOMES, R. G.; COSENZA, M. Utilização de imunoterápico no  
13 tratamento da pitiose equina. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*,  
14 v. 19, n. 3, p. 165–169, 2016. DOI: 10.25110/arqvet.v19i3.2016.6090.
- 15 SANTOS, C. E. P.; JULIANO, R. S.; SANTURIO, J. M.; MARQUES, L. C. Eficácia da  
16 imunoterapia no tratamento de pitiose facial em equino. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.  
17 39, n. 1, p. 1–5, 2011. a.
- 18 SANTOS, C. E. P.; MARQUES, L. C.; ZANETTE, R. A.; JESUS, F. P. K.; SANTURIO,  
19 J. M. Does immunotherapy protect equines from reinfection by the oomycete *Pythium*  
20 *insidiosum*? *Clinical and Vaccine Immunology*, v. 18, n. 8, p. 1397–1399, 2011. b. DOI:  
21 10.1128/CVI.05150-11.
- 22 SANTOS, C. E. P.; SANTURIO, J. M.; MARQUES, L. C. Pitiose em animais de  
23 produção no Pantanal Matogrossense. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 31, n. 12, p.  
24 1083–1089, 2011. DOI: 10.1590/S0100-736X2011001200008.
- 25 SANTOS, C. E. P.; UBIALI, D. G.; PESCADOR, C. A.; ZANETTE, R. A.; SANTURIO,  
26 J. M.; MARQUES, L. C. Epidemiological survey of equine pythiosis in the Brazilian  
27 pantanal and nearby areas: results of 76 cases. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.  
28 34, n. 2, p. 270–274, 2014. DOI: 10.1016/j.jevs.2013.06.003.
- 29 SANTOS, M. N.; LONDERO, A. T. Zicombose subcutânea em cavalos. *Pesquisa*  
30 *Agropecuária Brasileira*, v. 9, p. 7–8, 1974.

- 1 SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H.; PEREIRA, D. B.; ARGENTA, J. S. Pitiose: uma  
2 micose emergente. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 34, n. 1, p. 1–14, 2006.
- 3 SANTURIO, J. M.; ARGENTA, J. S.; SCHWENDLER, S. E.; CAVALHEIRO, A. S.;  
4 PEREIRA, D. I. B.; ZANETTE, R. A.; ALVES, S. H.; DUTRA, V.; SILVA, M. C.;  
5 ARRUDA, L. P.; NAKAZATO, L.; COLODEL, E. M. Granulomatous rhinitis associated  
6 with *Pythium insidiosum* infection in sheep. *Veterinary Record*, v. 163, p. 276–277, 2008.  
7 DOI: 10.1136/vr.163.9.276.
- 8 SAVORY, F. R.; MILNER, D. S.; MILES, D. C.; RICHARDS, T. A. Ancestral function  
9 and diversification of a horizontally acquired oomycete carboxylic acid transporter.  
10 *Molecular Biology and Evolution*, v. 35, n. 8, p. 1887–1900, 2018. DOI:  
11 10.1093/molbev/msy082.
- 12 SCHURKO, A. M.; MENDOZA, L.; LÉVESQUE, C. A.; DÉSAULNIERS, N. L.; DE  
13 COCK, A. W. A. M.; KLASSEN, G. R. A molecular phylogeny of *Pythium insidiosum*.  
14 *Mycologia*, v. 107, n. 5, p. 537–544, 2003. a. DOI: 10.1017/S0953756203007718.
- 15 SCHURKO, A.; MENDOZA, L.; DE COCK, A. W. A. M.; KLASSEN, G. R. Evidence  
16 for geographic clusters: Molecular genetic differences among strains of *Pythium*  
17 *insidiosum* from Asia, Australia and the Americas are explored. *Mycologia*, v. 95, n. 2,  
18 p. 200–208, 2003. b. DOI: 10.1080/15572536.2004.11833105.
- 19 SCHWARZ, B.; BURFORD, J.; KNOTTENBELT, D. Cutaneous fungal granuloma in a  
20 horse. *Veterinary Dermatology*, v. 20, n. 2, p. 131–134, 2009. DOI: 10.1111/j.1365-  
21 3164.2008.00719.x.
- 22 SCIORSCI, R. L.; LILLO, E.; OCCHIOGROSSO, L.; RIZZO, A. Ozone therapy in  
23 veterinary medicine: A review. *Research in Veterinary Science*, v. 130, p. 240–246,  
24 2020. DOI: 10.1016/j.rvsc.2020.03.026.
- 25 SERMSATHANASAWADI, N.; PRADITSUKTAVORN, B.; HONGKU, K.;  
26 WONGWANIT, C.; CHINSAKCHAI, K.; RUANGSETAKIT, C.;  
27 HAHTAPORNSAWAN, S.; MUTIRANGURA, P. Outcomes and factors influencing  
28 prognosis in patients with vascular pythiosis. *Journal of Vascular Surgery*, v. 64, n. 2, p.  
29 411–417, 2015. DOI: 10.1016/j.jvs.2015.12.024.
- 30 SHARMA, S.; BALNE, P. K.; MOTUKUPALLY, S. R.; DAS, S.; GLASG, F.; GARG,  
31 P.; SAHU, S. K.; ARUNASRI, K. *Pythium insidiosum* keratitis: clinical profile and role

- 1 of DNA sequencing and zoospore formation in diagnosis. *Cornea*, v. 34, n. 4, p. 438–  
2 442, 2015.
- 3 SILVA, S. M. M. S.; CASTRO, R. S.; COSTA, F. A. L.; VASCONCELOS, A. C.;  
4 BATISTA, M. C. S.; RIET-CORREA, F.; CARVALHO, E. M. S.; LOPES, J. B.  
5 Epidemiologia e sinais clínicos da conidiobolomicose em ovinos no Estado do Piauí.  
6 *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 27, n. 4, p. 184–190, 2007. DOI: 10.1590/s0100-  
7 736x2007000400010.
- 8 SOARES, L. M. C.; SCHENKEL, D. M.; ROSA, J. M. A.; AZEVEDO, L. S.; TINELI,  
9 T. R.; DUTRA, V.; COLODEL, E. M.; PESCADOR, C. A. Feline subcutaneous  
10 pythiosis. *Ciência Rural*, v. 49, n. 3, p. e20180448, 2019. DOI: 10.1590/0103-  
11 8478cr20180448.
- 12 SONG, M.; ZENG, Q.; XIANG, Y.; GAO, L.; HUANG, J.; HUANG, J.; WU, K.; LU, J.  
13 The antibacterial effect of topical ozone on the treatment of MRSA skin infection.  
14 *Molecular Medicine Reports*, v. 17, p. 2449–2455, 2018. DOI: 10.3892/mmr.2017.8148.
- 15 SOUTO, E. P. F.; MAIA, L. A.; OLINDA, R. G.; GALIZA, G. J. N. Pythiosis in the nasal  
16 cavity of horses. *Journal of Comparative Pathology*, v. 155, n. 2–3, p. 126–129, 2016.  
17 DOI: 10.1016/j.jcpa.2016.06.005.
- 18 SOUTO, E. P. F.; PESSOA, C. R. M.; PESSOA, A. F. A.; TROST, M. E.; KOMMERS,  
19 G. D.; CORREA, F. R.; DANTAS, A. F. M. Esophageal pythiosis in an ostrich (*Struthio*  
20 *camelus*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 71, n. 3, p. 1081–  
21 1084, 2019. DOI: 10.1590/1678-4162-10666.
- 22 SUPABANDHU, J.; FISHER, M. C.; MENDOZA, L.; VANITTANAKOM, N. Isolation  
23 and identification of the human pathogen *Pythium insidiosum* from environmental  
24 samples collected in Thai agricultural areas. *Medical Mycology*, v. 46, p. 41–52, 2008.  
25 DOI: 10.1080/13693780701513840.
- 26 TABOSA, I. M.; RIET-CORREA, F.; NOBRE, V. M. T.; AZEVEDO, E. O.; REIS-  
27 JÚNIOR, J. L.; MEDEIROS, R. M. T. Outbreaks of pythiosis in two flocks of sheep in  
28 Northeastern Brazil. *Veterinary Pathology*, v. 41, n. 4, p. 412–415, 2004. DOI:  
29 10.1354/vp.41-4-412.
- 30 TAINTOR, J.; CROWE, C.; HANCOCK, S.; SCHUMACHER, J.; LIVESEY, L.  
31 Treatment of conidiobolomycosis with fluconazole in two pregnant mares. *Journal of*

- 1 *Veterinary Internal Medicine*, v. 18, p. 363–364, 2004. DOI: 10.1892/0891-  
2 6640(2004)18<363:TOCWFI>2.0.CO;2.
- 3 THANATHANEE, O.; ENKVETCHAKUL, O.; RANGSIN, R.; WARAASAWAPATI,  
4 S.; SAMERPITAK, K.; SUWAN-APICHON, O. Outbreak of *Pythium* keratitis during  
5 rainy season: A case series. *Cornea*, v. 32, n. 2, p. 199–204, 2013. DOI:  
6 10.1097/ICO.0b013e3182535841.
- 7 THITITHANYANONT, A.; MENDOZA, L.; CHUANSUMRIT, A.; PRACHARKTAM,  
8 R.; LAOTHAMATAS, J.; SATHAPATAYAVONGS, B.; LOLEKHA, S.; AJELLO, L.  
9 Use of an immunotherapeutic vaccine to treat a life-threatening human arteritic infection  
10 caused by *Pythium insidiosum*. *Clinical Infectious Diseases*, v. 27, n. 6, p. 1394–1400,  
11 1998. DOI: 10.1086/515043.
- 12 THONGSRI, Y.; WONGLAKORN, L.; CHAIPRASERT, A.; SVOBODOVA, L.;  
13 HAMAL, P.; PAKARASANG, M.; PRARIYACHATIGUL, C. Evaluation for the  
14 clinical diagnosis of *Pythium insidiosum* sing a single-tube nested PCR. *Mycopathologia*,  
15 v. 176, p. 369–376, 2013. DOI: 10.1007/s11046-013-9695-3.
- 16 TONDOLO, J. S. M.; LORETO, E. S.; JESUS, F. P. K.; LEDUR, P. C.; VERDI, C. M.;  
17 SANTURIO, J. M. Immunotherapy based on *Pythium insidiosum* mycelia drives a  
18 Th1/Th17 response in mice. *Medical Mycology*, p. 1–6, 2020. DOI:  
19 10.1093/mmy/myaa023.
- 20 TONPITAK, W.; PATHOMSAKULWONG, W.; SORNKLIEN, C.; KRAJAEJUN, T.  
21 First confirmed case of nasal pythiosis in a horse in Thailand. *JMM Case Reports*, v. 5,  
22 n. 1, p. 1–4, 2018. DOI: 10.1099/jmmcr.0.005136.
- 23 TORRES-NETO, R.; BOSCO, S. M. G.; AMORIM, L.; BRANDA, C. V. S.; FABRIS,  
24 V. E.; ESTANISLAU, C.; BAGAGLI, E. Cutaneous pythiosis in a dog from Brazil.  
25 *Veterinary Dermatology*, v. 21, p. 202–204, 2009. DOI: 10.1111/j.1365-  
26 3164.2009.00779.x.
- 27 TORRES, L. M.; DANTAS, A. K. F. P.; SILVA, J. K. C.; ARAÚJO, K. N.; JUNIOR, F.  
28 Garino; MENDES, R. S. Pitiose cutânea canina - Relato de caso. *ARS Veterinária*, v. 30,  
29 n. 2, p. 77–82, 2014.
- 30 TRAVAGLI, V.; ZANARDI, I.; VALACCHI, G.; BOCCI, V. Ozone and ozonated oils  
31 in skin diseases: A review. *Mediators of Inflammation*, v. 2010, n. 610418, p. 1–9, 2010.



- 1 DOI: 10.1155/2010/610418.
- 2 TROST, M. E.; GABRIEL, A. L.; MASUDA, E. K.; FIGHERA, R. A.; IRIGOYEN, L.  
3 F.; KOMMERS, G. D. Aspectos clínicos, morfológicos e imuno-histoquímicos da pitiose  
4 gastrintestinal canina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 29, n. 8, p. 673–679, 2009.  
5 DOI: 10.1590/S0100-736X2009000800012.
- 6 VALENTINE, B. A. Equine cutaneous non-neoplastic nodular and proliferative lesions  
7 in the Pacific Northwest. *Veterinary Dermatology*, v. 16, p. 425–428, 2005. DOI:  
8 10.1111/j.1365-3164.2005.00485.x.
- 9 VANITTANAKOM, N.; SUPABANDHU, J.; KHAMWAN, C.;  
10 PRAPARATTANAPAN, J.; THIRACH, S.; PRASERTWITAYAKIJ, N.;  
11 LOUTHRENOO, W.; CHIEWCHANVIT, S.; TANANUVAT, N. Identification of  
12 emerging human-pathogenic *Pythium insidiosum* by serological and molecular assay-  
13 based methods. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 9, p. 3970–3974, 2004. DOI:  
14 10.1128/JCM.42.9.3970.
- 15 VANITTANAKOM, N.; SZEKELY, J.; KHANTHAWONG, S. Molecular detection of  
16 *Pythium insidiosum* from soil in Thai agricultural areas. *International Journal of Medical*  
17 *Microbiology*, v. 304, n. 3–4, p. 321–326, 2014. DOI: 10.1016/j.ijmm.2013.11.016.
- 18 VIANA, I. S.; GOBBI, F. P.; MEIRELES, M. A. D.; LEMOS, G. B.; DI FILIPPO, P. A.  
19 Estudo clínico-epidemiológico de 41 casos de pitiose equina ocorridos na região Norte  
20 Fluminense do estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Acadêmica Ciência Animal*, v.  
21 18, n. e180001, p. 1–11, 2020. DOI: 10.7213/2596-2868.2020.18001.
- 22 VIDELA, R.; VAN AMSTEL, S.; O'NEILL, S. H.; FRANK, L. A.; NEWMAN, S. J.;  
23 VILELA, R.; MENDOZA, L. Vulvar pythiosis in two captive camels (*Camelus*  
24 *dromedarius*). *Medical Mycology*, v. 50, n. 2, p. 219–224, 2012. DOI:  
25 10.3109/13693786.2011.588970.
- 26 VILELA, R.; MENDOZA, L. Human pathogenic Entomophthorales. *Clinical*  
27 *microbiology reviews*, v. 31, n. 4, p. 1–40, 2018. DOI: 10.1128/CMR.00014-18.
- 28 VILELA, R.; TAYLOR, J. W.; WALKER, E. D.; MENDOZA, L. *Lagenidium giganteum*  
29 pathogenicity in mammals. *Emerging Infectious Diseases*, v. 21, n. 2, p. 290–297, 2015.  
30 DOI: 10.3201/eid2102.141091.

- 1 VILLA, N. O.; KAGEYAMA, K.; ASANO, T.; SUGA, H. Phylogenetic relationships of  
2 *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and  $\beta$ -  
3 tubulin gene sequences. *Mycologia*, v. 98, n. 3, p. 410–422, 2006. DOI:  
4 10.3852/mycologia.98.3.410.
- 5 WATANABE, M. J.; ALONSO, J. M.; ALVES, A. L. G.; YAMADA, A. L. M.; BOSCO,  
6 S. M. G.; RODRIGUES, C. A.; HUSSNI, C. A. Equine pythiosis: Report of 28 cases from  
7 São Paulo State, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 36, n. 2, p. 909–916, 2015. DOI:  
8 10.5433/1679-0359.2015v36n2p909.
- 9 WEIBLEN, C.; MACHADO, G.; JESUS, F. P. K.; SANTURIO, J. M.; ZANETTE, R.  
10 A.; PEREIRA, D. S. B.; DIEHL, G. N.; SANTOS, L. C.; CORBELLINI, L. G.;  
11 BOTTON, S. A. Seroprevalence of *Pythium insidiosum* infection in equine in Rio Grande  
12 do Sul, Brazil. *Ciência Rural*, v. 46, n. 1, p. 126–131, 2015. DOI: 10.1590/0103-  
13 8478cr20150056.
- 14 WELLEHAN, J. F. X. et al. Pythiosis in a Dromedary Camel (*Camelus Dromedarius*).  
15 *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 35, n. 4, p. 564–568, 2004. DOI: 10.1638/03-  
16 098.
- 17 WHITE, S. D.; GHODDUSI, M.; GROOTERS, A. M.; JONES, K. Cutaneous pythiosis  
18 in a nontravelled California horse. *Veterinary Dermatology*, v. 19, p. 391–394, 2008.  
19 DOI: 10.1111/j.1365-3164.2008.00690.x.
- 20 WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing  
21 of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to*  
22 *Methods and Applications*. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315–322. Disponível  
23 em: <https://nature.berkeley.edu/brunslab/papers/white1990.pdf>. Acesso em: 26 set. 2017.
- 24 WORASILCHAI, N.; CHAUMPLUK, P.; CHAKRABARTI, A.; CHINDAMPORN, A.  
25 Differential diagnosis for pythiosis using thermophilic helicase DNA amplification and  
26 restriction fragment length polymorphism (tHDA-RFLP). *Medical Mycology*, v. 56, p.  
27 216–224, 2018. DOI: 10.1093/mmy/myx033.
- 28 WORASILCHAI, N.; PERMPALUNG, N.; CHINDAMPORN, A. High-resolution  
29 melting analysis: a novel approach for clade differentiation in *Pythium insidiosum* and  
30 pythiosis. *Medical Mycology*, v. 56, n. 7, p. 868–876, 2018. DOI: 10.1093/mmy/myx123.
- 31 ZACHARY, J. F.; MCGAVIN, M. D. *Bases da patologia veterinária*. Rio de Janeiro:

- 1 Elsevier, 2013.
- 2 ZANETTE, R. A.; ALVES, S. H.; PILOTTO, M. B.; WEIBLEN, C.; FIGHERA, R. A.;  
3 WOLKMER, P.; FLORES, M. M.; SANTURIO, J. M. Iron chelation therapy as a  
4 treatment for *Pythium insidiosum* in an animal model. *Journal of Antimicrobial*  
5 *Chemotherapy*, v. 68, n. 5, p. 1144–1147, 2013. a. DOI: 10.1093/jac/dks534
- 6 ZANETTE, R. A.; BITENCOURT, P. E. R.; ALVES, S. H.; FIGHERA, R. A.; FLORES,  
7 M. M.; WOLKMER, P.; HECKTHEUER, P. A.; THOMAS, R.; PEREIRA, P. L.;  
8 LORETO, É. S.; SANTURIO, J. M. Insights into the pathophysiology of iron metabolism  
9 in *Pythium insidiosum* infections. *Veterinary Microbiology*, v. 162, n. 2-4, p. 826-830,  
10 2013. b. DOI: 10.1016/j.vetmic.2012.10.036
- 11 ZAMBRANO, C. G.; FONSECA, A. O. S.; VALENTE, J. S. S.; BRAGA, C. Q.;  
12 SALLIS, E. S. V.; AZEVEDO, M. I.; WEIBLEN, C.; SANTURIO, J. M.; BOTTON, S.  
13 A.; PEREIRA, D. I. B. Isolamento e caracterização de espécies de *Pythium* de ambientes  
14 aquáticos no Estado do Rio Grande do Sul e avaliação da patogenicidade em modelo  
15 experimental. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 37, n. 5, p. 459–464, 2017. DOI:  
16 10.1590/S0100-736X2017000500006.
- 17 ZAMOS, D. T.; SCHUMACHER, J.; LOY, J. K. Nasopharyngeal conidiobolomycosis in  
18 a horse. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 208, n. 1, p. 100–  
19 101, 1996.
- 20 ZARO, D.; REDIVO, C. B.; MORAES, B. A.; BUENO, F. U.; BECK, C. A. C.; ROCHA,  
21 A. L. A. *Pythium insidiosum* em equino: Relato de caso. *Pubvet*, v. 12, n. 12, p. 1–8,  
22 2018. DOI: 10.31533/pubvet.v12n12a223.1-8.
- 23 ZENG, J.; LU, J. Mechanisms of action involved in ozone-therapy in skin diseases.  
24 *International Immunopharmacology*, v. 56, p. 235–241, 2018. DOI:  
25 10.1016/j.intimp.2018.01.040.
- 26 ZNAJDA, N. R.; GROOTERS, A. M. Y. M.; MARSELLA, R. PCR-based detection of  
27 *Pythium* and *Lagenidium* DNA in frozen and ethanol-fixed animal tissues. *Veterinary*  
28 *Dermatology*, v. 13, p. 187–194, 2002.