

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MEDICINA VETERINÁRIA**

**SOROPREVALÊNCIA DA PITIOSE EQUINA NO RIO
GRANDE DO SUL, DIAGNÓSTICO E CONTROLE DA
PITIOSE EM MODELO EXPERIMENTAL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Carla Weiblen

Santa Maria, RS, Brasil

2015

**SOROPREVALÊNCIA DA PITIOSE EQUINA NO RIO
GRANDE DO SUL, DIAGNÓSTICO E CONTROLE DA
PITIOSE EM MODELO EXPERIMENTAL**

Por

Carla Weiblen

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Sanidade Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Orientadora: Prof. Dra. Sônia de Avila Botton

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Weiblen, Carla
SOROPREVALÊNCIA DA PITIOSE EQUINA NO RIO GRANDE DO
SUL, DIAGNÓSTICO E CONTROLE DA PITIOSE EM MODELO
EXPERIMENTAL / Carla Weiblen.-2015.
66 p.; 30cm

Orientadora: Sônia de Avila Botton
Coorientador: Janio Morais Santurio
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2015

1. P. insidiosum 2. sorologia 3. teste intradérmico
4. tratamento 5. O. cuniculus I. de Avila Botton, Sônia
II. Morais Santurio, Janio III. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado.

**SOROPREVALÊNCIA DA PITIOSE EQUINA NO RIO
GRANDE DO SUL, DIAGNÓSTICO E CONTROLE DA
PITIOSE EM MODELO EXPERIMENTAL**

Elaborada por
Carla Weiblen

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

Comissão Examinadora

Sônia de Avila Botton, Dra.
(Orientador)

Daniela Isabel Brayer Pereira, Dra. (UFPel)

Régis Adriel Zanette, Dr. (UFRGS)

Santa Maria, 2015

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que de uma forma ou de outra tornaram possível a execução deste trabalho, especialmente:

A minha família:

Aos meus pais, Ana Maria Weiblen e Rudi Weiblen, pelo exemplo que são para mim, pelo apoio e incentivo durante estes dois anos de mestrado. Além disso, pela dedicação e amor incondicional com toda nossa família.

Ao Carlos A. Löbler por sempre estar ao meu lado e ser meu companheiro, inclusive nas atividades acadêmicas. Obrigada pela paciência e pelo carinho que tem comigo. Te amo.

Aos meus irmãos, Bruno Weiblen e Adriane W. Cardoso por serem meus exemplos e pelo incentivo dado a minha vida acadêmica.

Aos meus orientadores: Prof. Janio Morais Santurio por ter aberto as portas do LAPEMI já na graduação. Obrigada por sempre acreditar em mim, pela amizade e também pela orientação durante a execução deste trabalho. Prof^a. Sônia de Avila Botton pela amizade e disponibilidade durante todos os dias do ano. Muito obrigada por ter me ensinado as muitas coisas que aprendi nestes dois anos e pela orientação durante a realização do mestrado. Prof. Sydney Hartz Alves pela amizade e conselhos da vida acadêmica.

Aos colegas e amigos minha segunda família do LAPEMI e Labiopar, especialmente:

- Daniela I. B. Pereira, Francielle P. K. Jesus e Régis A. Zanette pelo auxílio e conselhos durante a realização dos trabalhos realizados nesta dissertação.

-Danieli U. Monteiro, Maria I. Azevedo, Marcela Zart Arend e Tatiana C. Ribeiro pelo apoio incondicional, amizade consolidada neste período e companheirismo.

- Aline Ludwig, Charlise Bolson, Douglas M. Lorensetti, Fernanda Marks, Julia Birnie, Helena F. Oliveira, Jéssica Emmanouilidis, Maiara Ben Pilotto, sou agradecida pela alegria, amizade, risadas e companheirismo.

A Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária (PPGMV), extensivo também aos professores do PPGMV.

Muito obrigada, pois como todos sabem ninguém é feliz sozinho e devo minha felicidade e conquista a todos vocês!!!

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.” *José de Alencar*

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

SOROPREVALÊNCIA DA PITIOSE EQUINA NO RIO GRANDE DO SUL, DIAGNÓSTICO E CONTROLE DA PITIOSE EM MODELO EXPERIMENTAL

Autor: Carla Weiblen

Orientador: Sônia de Avila Botton

Data da defesa: 13 de fevereiro de 2015.

A pitiose é uma doença granulomatosa de humanos e animais, causada pelo oomiceto aquático *Pythium insidiosum*. A maior ocorrência da enfermidade no Brasil é na espécie equina, especialmente no Pantanal Mato-Grossense, porém no Rio Grande do Sul (RS) observa-se um aumento dos casos da doença. Todavia, não há dados de soroprevalência da pitiose no Brasil. O diagnóstico precoce da enfermidade é fundamental para sucesso no controle da pitiose. Atualmente, a imunoterapia com antígenos proteicos vem sendo estudada como uma alternativa promissora de tratamento. A via intradérmica (ID) é uma opção a ser avaliada tanto para um diagnóstico precoce quanto para o tratamento da pitiose empregando antígenos proteicos de *P. insidiosum*. Neste estudo investigou-se: a soroprevalência da pitiose equina no estado do RS, bem como avaliou-se e comparou-se o uso de antígenos proteicos de *P. insidiosum* pela via ID no diagnóstico e controle da pitiose em modelo experimental. Para determinar a soroprevalência da pitiose equina no RS foram utilizadas 1002 amostras de soro equino avaliadas pelo método de ELISA indireto. Do total das amostras testadas, 11,07% (111/1002) foram soropositivas para a pitiose equina. Para o diagnóstico aplicou-se 0,1 mL (1,7mg) de antígeno proteico pela via ID, em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) (n=15) separados em três grupos: controle negativo (n=5), com pitiose experimental (n=5) e animais previamente imunizados com antígeno proteico (n=5). A fim de verificar e comparar a aplicação do antígeno proteico pela via ID como opção de tratamento utilizaram-se dez coelhos com pitiose. Cinco animais foram tratados com 0,1mL de antígeno proteico aplicado via ID e outros cinco coelhos foram tratados pela via subcutânea (SC) com 2mL (34mg) do antígeno. O teste ID foi capaz de detectar reações cutâneas em 24h e 72h nos animais previamente expostos ao agente, demonstrando sensibilidade e especificidade comparáveis ao teste padrão de diagnóstico da pitiose (ELISA indireto). No tratamento com antígeno proteico pelas vias ID e SC, embora não tenha sido observada diferença (P>0,05) no tamanho das lesões, a cura clínica em 40% dos coelhos de ambos os grupos demonstrou que a via ID pode ser utilizada em protocolos terapêuticos da pitiose em modelo experimental, pois também apresenta outras vantagens como menor concentração e volume de antígeno proteico para o controle da pitiose. No entanto, são necessárias pesquisas para o emprego da via ID no diagnóstico e controle da pitiose nas espécies naturalmente acometidas.

Palavras-chave: *P. insidiosum*, sorologia, teste intradérmico, tratamento, *O.cuniculus*.

ABSTRACT

Master's Dissertation

Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

SEROPREVALENCE OF EQUINE PYTHIOSIS IN THE STATE OF RIO GRANDE DO SUL, DIAGNOSIS AND CONTROL OF PYTHIOSIS IN EXPERIMENTAL MODEL

Author: Carla Weiblen

Adviser: Sônia de Avila Botton

Santa Maria February, 13th, 2015

Pythiosis is a granulomatous disease of humans and animals caused by an aquatic oomycete named *Pythium insidiosum*. In Brazil, equine species is the most affected and the highest occurrence of pythiosis is observed in Brazilian Pantanal. Nowadays, in Rio Grande do Sul (RS), in South of Brazil, there has seen an increase in the number of equine pythiosis. Nevertheless, there is no information about seroprevalence in Brazil. Early diagnosis is the key to success in controlling this infection. Currently, immunotherapy with proteic antigens has been studied as a promising alternative of treatment. The intradermal (ID) route to apply proteic antigen is an option to be evaluated, for both early diagnosis and pythiosis treatment, by using proteic antigens of *P. insidiosum*. In this study it was investigated the seroprevalence of equine pythiosis in the RS State and also it was evaluated and compared the use of proteic antigens of *P. insidiosum* by the ID route in the diagnosis and control of pythiosis in an experimental model (*Oryctolagus cuniculus*). To determine the prevalence of equine pythiosis in RS it was used 1002 equine serum samples evaluated by indirect ELISA test. Of the total samples tested, 11.1% (111/1002) were seropositive for equine pythiosis. For the diagnosis it was applied 0.1mL (1.7mg) of proteic antigen by ID route in rabbits (*O. cuniculus*) (n = 15) divided into three groups: negative control (n = 5), with experimental pythiosis (n = 5) and animals previously immunized with the proteic antigen (n = 5). In order to verify and compare the use of proteic antigen of *P. insidiosum* by ID as an option of treatment it was used ten rabbits with pythiosis. Five rabbits with pythiosis were treated with 0.1mL proteic antigen applied through ID and other five rabbits by subcutaneous (SC) route with 2mL (34mg) (n = 5). The ID test was able to detect cutaneous reactions in 24h and 72h in all animals exposed to *P. insidiosum*, as well as it demonstrated sensitivity and specificity comparable with the pattern of diagnosis of pythiosis (indirect ELISA). The treatment proteic antigen of *P. insidiosum*, by ID and SC route, did not observed difference (P > 0.05) in the size of the lesions. However, the clinical cure affect as 40% of rabbits in both groups. Thus, protein antigen of *P. insidiosum* by ID may be used in therapeutic protocols of pythiosis in rabbits, also this route as a protocol of pythiosis has other advantages such as lower protein concentration and volume of antigen to control pythiosis. However, research is needed for evaluation of ID route for diagnosis and control of pythiosis in naturally affected species.

Key words: *P. insidiosum*, serology, intradermal test, treatment, *O. cuniculus*.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

Figura 1 - A: Frequência das amostras coletadas de rebanhos de equinos amostrados nas mesorregiões do Rio Grande do Sul. As porcentagens indicam o número de amostras de soro equino obtidas de cada mesorregião. B: Soroprevalência da pitiose equina nas mesorregiões do Rio Grande do Sul. No mapa é possível identificar a frequência relativa de anticorpos anti-*P. insidiosum* nos rebanhos de equinos amostrados em cada mesorregião. Entre parênteses estão demonstradas o número absoluto de amostras positivas em relação ao número total de amostras coletadas em cada mesorregião.....37

ARTIGO 2

Figura 1 - Tamanho das reações cutâneas (mm) após a aplicação do antígeno proteico de *P. insidiosum* pela via ID para diagnóstico da pitiose em modelo experimental. Controle: grupo 1, coelhos não inoculados com zoósporos; Pitiose: grupo 3, coelhos inoculados com zoósporos de *P. insidiosum*; Imunizado: grupo 2, coelhos imunizados com o antígeno proteico (2mL, SC, duas aplicações). A) Leitura em 24h. B) Leitura em 72h. Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os grupos.....51

Figura 2- Crescimento médio das lesões subcutâneas em coelhos inoculados com zoósporos de *P. insidiosum* e tratados com antígeno proteico via intradérmica (ID) e subcutânea (SC).
.....52

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1 - Variáveis analisadas para a pitiose no estado do Rio Grande do Sul..... 36

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3 REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 O agente <i>Pythium insidiosum</i>	15
3.2 Epidemiologia e Patogenia	16
3.3 Pitiose.....	17
3.4 Diagnóstico	19
3.5 Controle da pitiose	20
4 ARTIGO 1- SOROPREVALÊNCIA DA PITIOSE EQUINA NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL	22
RESUMO.....	22
ABSTRACT.....	23
INTRODUÇÃO	24
MATERIAL E MÉTODOS	25
RESULTADOS	27
DISCUSSÃO	28
CONCLUSÃO	30
AGRADECIMENTOS	31
REFERÊNCIAS.....	31
5 ARTIGO 2- USO INTRADÉRMICO DE ANTÍGENO PROTEICO DE <i>Pythium insidiosum</i> PARA DIAGNÓSTICO E CONTROLE DA PITIOSE EM MODELO EXPERIMENTAL	38
RESUMO.....	38
ABSTRACT.....	39
INTRODUÇÃO	40
MATERIAL E MÉTODOS	41
RESULTADOS	43
DISCUSSÃO	44
CONCLUSÃO	47
AGRADECIMENTOS	47
REFERÊNCIAS.....	47
5 DISCUSSÃO	53
6 CONCLUSÕES	56
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXO 1	68

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está composta por dois manuscritos científicos os quais se encontram na seção **ARTIGOS** (Itens 4 e 5). As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio artigo e representam a íntegra deste estudo.

Os itens **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES**, encontrados no final desta dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre os artigos científicos contidos nesta pesquisa. As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se às citações contidas nos itens **INTRODUÇÃO**, **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** e **DISCUSSÃO** desta dissertação.

1 INTRODUÇÃO

A pitiose é uma enfermidade granulomatosa crônica, causada por *Pythium insidiosum* um oomiceto aquático que acomete o homem e os animais. *P. insidiosum* pertence ao Reino Stramenopila, Classe Oomycota, Ordem Pythiales, Família Pythiaceae (DE COCK et al., 1987).

A pitiose é descrita em regiões tropicais, subtropicais e temperadas, tendo sido relatada nas Américas, Europa, Ásia, Oceania e África (CHAFFIN et al., 1995; MENDOZA et al., 1996; GAASTRA et al., 2010; MOSBAH et al., 2012). No Brasil, o Pantanal Mato-Grossense é o local de maior ocorrência da pitiose equina (SANTOS et al., 2014). Contudo, no Rio Grande do Sul (RS) observa-se um aumento no número de casos de pitiose, principalmente em equinos (MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2014).

Até o presente momento os estudos referentes à ocorrência da pitiose em equinos no Brasil baseiam-se em aspectos epidemiológicos oriundos de estudos retrospectivos (PIEREZAN et al., 2009; SOUZA et al., 2011, MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012) e análises de casos clínicos diagnosticados em regiões endêmicas (LEAL et al., 2001a; SANTOS et al., 2014). Destaca-se a grande importância da realização de pesquisas em relação à soroprevalência da pitiose equina, pois afeta um importante setor do agronegócio brasileiro.

Embora a pitiose seja comumente descrita em equinos, também há relatos em cães e humanos. Casos esporádicos já foram descritos em bovinos (PÉREZ et al., 2005; GRECCO et al., 2009), asininos (TABOSA et al., 1999; ÁLVAREZ et al., 2013; SANTOS et al., 2014), caprinos (CARMO et al., 2014), ovinos (TABOSA et al., 2004; SANTURIO et al., 2008; PESSOA et al., 2013) e felinos (BISSONNETE et al., 1991; GROOTERS, 2003; RAKICH et al., 2005). Adicionalmente, a pitiose é descrita em algumas espécies selvagens (GAASTRA et al., 2010).

A reprodução experimental da pitiose clínica somente é possível em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), pois não é possível reproduzir a enfermidade nas espécies naturalmente infectadas (GAASTRA et al., 2010). Portanto, coelhos são os animais utilizados como modelos experimentais utilizados para pesquisas relacionadas à fisiopatologia (ZANETTE et al., 2013), imunologia (BACH et al., 2010), diagnóstico (SANTURIO et al., 2006a) e tratamento (SANTURIO et al., 2003).

As técnicas utilizadas no diagnóstico da pitiose incluem: técnicas microbiológicas, sorológicas e moleculares (GAASTRA et al., 2010; CHAREONSIRISUTHIGUL et al., 2013; MENDOZA e VILELA, 2013; THORNTON e WILLS, 2013; TONDOLO et al., 2013). Contudo, estas metodologias de diagnóstico requerem uma estrutura laboratorial complexa e pessoal especializado (CHAREONSIRISUTHIGUL et al., 2013)

Ainda não há um método específico, sensível e rápido para o diagnóstico da pitiose a campo. Todavia, Witkamp (1924) empregou um teste intradérmico para pitiose em equinos na Indonésia. Posteriormente, Miller e Campbell (1982) utilizaram o teste intradérmico para avaliar a imunidade celular frente à infecção por *P. insidiosum* em equinos na Austrália. Entretanto, há necessidade de mais pesquisas em relação ao teste intradérmico com antígeno proteico de *P. insidiosum*, uma vez que este teste pode ser uma alternativa precoce e com aplicabilidade na rotina de diagnóstico da pitiose a campo.

As alternativas terapêuticas empregadas para o controle da pitiose que apresentam relativo sucesso no tratamento da enfermidade são: remoção cirúrgica da área afetada, quimioterapia e imunoterapia (GAASTRA et al., 2010). No entanto, ressalta-se a importância do diagnóstico correto e precoce da enfermidade para sucesso no tratamento da pitiose. A imunoterapia é uma eficaz alternativa para o tratamento da pitiose, uma vez que são relatados casos de cura em humanos (THYTITHANYANOT et al., 1998; WANASCHIWANAWIN et al., 2004; KRAJAEJUN et al., 2006) e em animais (SANTURIO et al., 2003; SANTOS et al., 2011a; PEREIRA et al., 2013).

Os protocolos terapêuticos instituídos para a realização dos tratamentos com imunoterapia para pitiose, especialmente em equinos e na infecção experimental em coelhos, envolvem o uso de antígeno proteico na dose de 2mL pela via subcutânea (SC) (CHAFFIN et al., 1995; SANTURIO et al., 2003; BACH et al., 2010; SANTOS et al., 2011a,b). A utilização de vias alternativas para tratamento com antígeno proteico foi relatada por Mendoza et al. (2003) e Wanachiwanawin et al. (2004). No entanto, ainda são escassas as pesquisas relacionadas ao antígeno proteico que utilizem vias e doses distintas da usualmente empregada no tratamento da pitiose nas diversas espécies.

Portanto, diante do exposto, pesquisas relacionadas à epidemiologia da pitiose nas diversas espécies, especialmente na equina, são fundamentais para conhecimento da situação epidemiológica da enfermidade nas diversas regiões do Brasil. Uma vez que o sucesso no tratamento da pitiose requer diagnóstico e intervenção terapêutica precoce, há necessidade do desenvolvimento de pesquisas envolvendo uma alternativa de diagnóstico rápido e novas metodologias e protocolos terapêuticos para o controle da pitiose.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a soroprevalência da pitiose equina no estado do Rio Grande do Sul, bem como avaliar protocolos de diagnóstico e de controle da pitiose em modelo experimental.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar a soroprevalência da pitiose equina no estado do RS;
- Avaliar o uso do antígeno proteico de *P. insidiosum* pela via intradérmica para o diagnóstico da pitiose em modelo experimental;
- Avaliar e comparar o uso do antígeno proteico de *P. insidiosum* pela via intradérmica e subcutânea no controle das infecções por *P. insidiosum* no modelo experimental.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O agente *Pythium insidiosum*

Pythium insidiosum é um oomiceto aquático e agente etiológico da pitiose. A enfermidade foi descrita pela primeira vez em equinos na Índia recebendo diferentes denominações até 1987 quando De Cock et al. (1987) caracterizaram o agente como *P. insidiosum*.

Estudos filogenéticos demonstraram que oomicetos estão filogeneticamente mais próximos a diatomáceas e algas, do que a fungos verdadeiros (KWON-CHUNG, 1994). A distância taxonômica entre os oomicetos e os fungos está retratada ao nível celular através de diferenças na parede e composição da membrana. A quitina, um componente essencial da parede celular fúngica, está geralmente ausente na parede celular dos oomicetos, a qual contém como componentes predominantes celulose e β -glucanas (HENDRIX, 1964). Também, os oomicetos e *P. insidiosum* diferem dos fungos quanto ao papel do ergosterol, pois este não é o principal esteroide de membrana (MENDOZA e NEWTON, 2005).

Pythium spp. foi classificado por Mendoza et al. (1996) como pertencente ao reino Cromista, filo Pseudofungi, classe Oomiceto, ordem Pythiales e família Pythiaceae. Posteriormente a essa classificação, Dick (2001) considerou *P. insidiosum* pertencente ao reino Stramenopila, classe Peronosporomycetes (Oomiceto), ordem Pythiales e família Pythiaceae. No entanto, esta classificação ainda está sujeita a alterações futuras visto que não foi baseada na análise de sequências de DNA (GAASTRA et al., 2010).

O gênero *Pythium* possui mais de 120 espécies distribuídas em todo planeta, sendo a maioria delas habitantes do solo e patógenos de plantas. A espécie *P. insidiosum* era a única dentro desse gênero a causar doença, denominada de pitiose, nos animais e humanos. No entanto, Calvano et al. (2011) relatam o isolamento de *P. aphanidermatum* do ferimento de um combatente de guerra causado por um explosivo. Esta constatação gerou dúvidas em relação às espécies capazes de causar pitiose.

3.2 Epidemiologia e Patogenia

A pitiose ocorre, principalmente, em regiões tropicais, subtropicais e temperadas, tendo sido relatada nas Américas, alguns países europeus, sudeste asiático, Oceania e África (CHAFFIN et al., 1995; MENDOZA et al., 1996; GAASTRA et al., 2010; MOSBAH et al., 2012).

P. insidiosum apresenta células nucleadas denominadas de zoósporos e apresentam dois flagelos que manifestam quimiotaxia e encistam-se quando entram em contato com qualquer tecido (GAASTRA et al., 2010). A fonte de infecção da pitiose são os zoósporos que estão presentes no meio ambiente, podendo infectar humanos e animais saudáveis. Uma vez que os zoósporos entram em contato com os mamíferos ou com as plantas, estes encistam-se e secretam uma glicoproteína que permite a aderência aos tecidos. O tropismo do agente está diretamente relacionado com a parte do corpo do animal que está em contato com a água atraindo os zoósporos (DE COCK et al., 1987; MENDOZA et al., 1993).

Na pitiose não há predisposição por sexo, idade ou raça. A enfermidade é comumente descrita em equinos, caninos e humanos. Alguns casos esporádicos já foram descritos em bovinos (PÉREZ et al., 2005, GRECCO et al., 2009), asininos (TABOSA et al., 1999; ÁLVAREZ et al., 2013; SANTOS et al., 2014), caprinos (CARMO et al., 2014), ovinos (TABOSA et al., 2004; SANTURIO et al., 2008; PESSOA et al., 2013) e felinos (BISSONNETE et al., 1991; GROOTERS, 2003; RAKICH et al., 2005).

O primeiro relato da enfermidade no Brasil ocorreu no RS (SANTOS e LONDERO, 1974). No entanto, a pitiose já foi descrita em vários estados do País: Mato Grosso do Sul (LEAL et al., 2001a), Mato Grosso, (SANTOS et al., 2011a), Paraná (LUVIZARI et al., 2002), Pernambuco e Bahia (CARRERA et al., 2013), Rio de Janeiro (SANAVRIA et al., 2000), entre outros. O Pantanal Mato-Grossense é o local de maior ocorrência da pitiose equina no mundo (SANTOS et al., 2014). Contudo, também se observa o aumento no número de casos da enfermidade no RS, principalmente em equinos (MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2014).

Os trabalhos disponíveis sobre dados de prevalência e incidência da pitiose em equinos até o presente momento baseiam-se nos aspectos epidemiológicos oriundos de estudos retrospectivos (PIEREZAN et al., 2009; SOUZA et al., 2011, MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012) e análises de casos clínicos diagnosticados em regiões endêmicas (LEAL et al., 2001a; SANTOS et al., 2014). Embora não exista um levantamento preciso da incidência no Brasil, a pitiose equina representa um problema à equideocultura, especialmente

no Pantanal Mato-Grossense e no RS. Ao considerar que somente o Pantanal Mato-Grossense, apresenta cerca de 120.000 equídeos (IBGE, 2007), e utilizando os dados de estimativa dos custos associados com a pitiose equina relativos ao ano de 2011, verificou-se que com uma incidência média anual da doença de 12,5% (cerca de 15.000 animais) encontrada para equídeos por Santos (2012) no Pantanal, os custos de perda de equídeos e de tratamento dos animais, poderiam atingir aproximadamente R\$ 15.500.000,00 e R\$ 420.000,00, respectivamente (MORAES et al., 2013).

3.3 Pitiose

A enfermidade é conhecida também pelos nomes hifomicose, zigomicose, dermatite granular, “bursattee”, “Florida leeches”, granuloma fomicótico, “swamp cancer” e “ferida da moda” (GAASTRA et al., 2010; SANTOS et al., 2014).

A espécie equina é a mais acometida, principalmente nas formas cutânea e subcutânea (MENDOZA et al., 1996). As lesões cutâneas são as mais frequentes e atingem principalmente as extremidades distais dos membros e porção ventral da parede tóraco-abdominal, provavelmente devido ao maior tempo de contato com águas contaminadas com zoósporos (MENDOZA et al., 1993; KWONCHUNG, 1994; SANTURIO et al., 2006b; SANTOS et al., 2014). Os sinais clínicos caracterizam-se por lesões ulcerativas, granulomatosas, formando grandes massas teciduais (5 a 500 milímetros) (mm)), com bordas irregulares, de aparência tumoral e com hifas recobertas por células necróticas, que formam massas branco-amareladas semelhantes a corais, denominadas de “kunkers” (MENDOZA e ALFARO, 1986; GAASTRA et al., 2010).

Em equinos também se destaca a forma intestinal, que se caracteriza por massas teciduais localizadas na parede do intestino. A cólica é um sinal clínico bastante frequente, pois a presença de massas teciduais causa a diminuição e obstrução do lúmen intestinal. A ocorrência de casos de metástases via sistema linfático para pulmões e linfonodos regionais é rara e restringe-se a poucos casos (CHAFFIN et al., 1995; REIS et al., 2003).

Dentre as espécies domésticas acometidas pela pitiose destacam-se os relatos em caninos, sendo as formas cutâneas e gastrintestinais as mais frequentes (PEREIRA et al., 2013). As lesões gastrintestinais caracterizam-se pela formação de grandes massas nas paredes do estômago e intestino que são compostas por inflamação granulomatosa e piogranulomatosa com áreas de necrose, intenso infiltrado eosinofílico e presença de hifas

(MILLER et al., 1985; BENTINCK-SMITH et al., 1989; FISCHER et al., 1994; TROST et al., 2009). As lesões cutâneas apresentam-se como dermatite piogranulomatosa ulcerativa, contendo áreas de necrose infiltrada por neutrófilos e macrófagos e granulomas eosinofílicos (FOIL et al., 1984; DYKSTRA et al., 1999; MARTINS et al., 2012).

Há poucos relatos da pitiose nas demais espécies domésticas. No entanto, a enfermidade foi relatada em: gatos (BISSONNETE et al., 1991; GROOTERS, 2003; RAKICH et al., 2005), bovinos (PÉREZ et al., 2005, GRECCO et al., 2009), asininos (TABOSA et al., 1999; ÁLVAREZ et al., 2013; SANTOS et al., 2014), caprinos (CARMO et al., 2014) e ovinos (TABOSA et al., 2004; SANTURIO et al., 2008; PESSOA et al., 2013). Adicionalmente, a pitiose foi relatada em animais selvagens (GAASTRA et al., 2010).

A Tailândia é o local de maior ocorrência da pitiose em humanos, sendo comumente relacionada aos pacientes com talassemia (KRAJAEJUN et al., 2006). A enfermidade apresenta-se em três formas: lesões granulomatosas no tecido subcutâneo de pacientes talassêmicos; na forma sistêmica, caracterizada por desenvolvimento de arterite crônica, trombose arterial e gangrena, atingindo geralmente a extremidade dos membros inferiores de pacientes talassêmicos; e ceratite; podendo ou não estar associada à talassemia (IMWIDTHAYA, 1994; LAOHAPENSANG et al., 2009).

Da mesma forma que nos animais, os humanos se infectam através de soluções de continuidade na pele ao entrar em contato com zoósporos móveis. Atividades relacionadas à agricultura, como por exemplo, plantio de mudas de arroz em áreas irrigadas, ou atividades de recreação em água parada são os fatores predisponentes à infecção (KRAJAEJUN et al., 2006).

Até o momento, não foi possível reproduzir a enfermidade através de infecção experimental nas espécies infectadas naturalmente. Desta forma, a infecção experimental é realizada em coelhos, considerados os modelos animais para infecção experimental da pitiose. A inoculação em coelhos consiste da aplicação subcutânea de zoósporos que formam nódulos e posteriormente evoluem para fibrogranulomas eosinofílicos (MILLER e CAMPBELL, 1983).

3.4 Diagnóstico

O diagnóstico da pitiose, tradicionalmente, é realizado através dos aspectos clínicos, histopatológicos e pelo isolamento e identificação do agente através das características da cultura, morfologia e estruturas reprodutivas (zoósporos) (LEAL et al., 2001b; SANTURIO et al., 2006b). Entretanto, por esses métodos o diagnóstico precoce é difícil (CHAFFIN et al., 1992; LEAL et al., 2001b).

Os métodos laboratoriais comumente empregados para diagnóstico da pitiose consistem de: imunohistoquímica (BROWN et al., 2008), imunodifusão (MILLER e CAMPBELL 1982; KAUFMAN et al., 1990), ensaio imunoenzimático ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) (MENDOZA et al., 1997) e, os métodos moleculares (BOTTON et al., 2011).

A técnica de ELISA, primeiramente descrita por Mendoza et al. (1997), é capaz de detectar infecções precoces ou subclínicas (MENDOZA et al., 1997). Atualmente, o ELISA é considerado como prova padrão para diagnóstico sorológico de pitiose. No teste desenvolvido por Santurio et al. (2006a) se observa a sensibilidade e a especificidade de 97,72% e 90,27%, respectivamente. O ELISA tem sido empregado como um método seguro e eficaz para o diagnóstico precoce em humanos e animais (VANITTANAKOM et al., 2004; SANTURIO et al., 2006a).

Observa-se em equinos infectados com *P. insidiosum* anticorpos relacionados com a resposta imune ligada a células T helper 2 (Th2) (MENDOZA et al., 2003). A resposta oriunda deste estímulo não desencadeia anticorpos protetivos, no entanto, estes são muito úteis para o diagnóstico sorológico da enfermidade (GAASTRA et al., 2010).

Até o presente momento, não existe um método específico, sensível e rápido para a pitiose a campo. Witkamp (1924) empregou um teste intradérmico para pitiose em equinos na Indonésia. Posteriormente, Miller e Campbell (1982) utilizaram o teste intradérmico para avaliar a imunidade celular frente à infecção por *P. insidiosum* em equinos clinicamente infectados, recuperados e em contato com outros animais infectados em áreas endêmicas do norte da Austrália. Estes autores apontaram como vantagens do teste intradérmico: a rapidez, sensibilidade e reprodutibilidade.

Destaca-se ainda como vantagem o fato do teste intradérmico ser bom método para avaliação da resposta celular *in vivo* (MILLER e CAMPBELL, 1982). Tendo em vista que o sucesso terapêutico da infecção está correlacionado diretamente ao diagnóstico precoce da

infecção, destaca-se a importância de estabelecer uma alternativa para o diagnóstico rápido da pitiose a campo.

3.5 Controle da pitiose

As medidas de controle da pitiose baseiam-se em alternativas terapêuticas, uma vez que não existem medidas imunoproláticas para a prevenção da enfermidade. As alternativas terapêuticas que apresentam relativo sucesso no tratamento da enfermidade são: remoção cirúrgica da área afetada, quimioterapia e imunoterapia (GAASTRA et al., 2010).

O tratamento cirúrgico é o procedimento comumente adotado e apresenta bons resultados em lesões pequenas e superficiais. No entanto, a intervenção cirúrgica requer a retirada de toda área afetada, com margem de segurança para evitar as recidivas. (SANTURIO et al., 2006b).

A terapia química utilizada para o tratamento da pitiose em animais e humanos é limitado quando utilizado isoladamente, devido às características do agente anteriormente descritas (Item 2.1), e principalmente pela ausência de ergosterol na membrana plasmática, componente alvo da maioria dos antifúngicos. Com isso os agentes antifúngicos comercialmente disponíveis apresentam baixa eficiência e a maioria dos animais acometidos pela enfermidade não sobrevivem à infecção (FOIL, 1996; GROOTERS, 2003). Em humanos, um caso na forma ocular e outro na forma de pleuropericardite foi tratado com sucesso utilizando-se uma combinação de antifúngicos (SHENEP et al., 1998; HEATH et al., 2002). No entanto, combinações de antifúngicos também foram descritas como ineficazes no tratamento da forma vascular e disseminada em humanos (KRAJAEJUN et al., 2006).

Em animais a quimioterapia é realizada principalmente com os antifúngicos: anfotericina B, cetoconazole, miconazole, fluconazole e itraconazole, além dos compostos iodínicos como iodeto de potássio e sódio no local da lesão (SANTURIO et al., 2006b). A anfotericina B também foi utilizada localmente na lesão de equinos tratados (DÓRIA et al., 2012). O tratamento com caspofungina, um fármaco de custo elevado, reduziu significativamente o tamanho das lesões de coelhos infectados experimentalmente (PEREIRA et al., 2007).

Jesus et al. (2014) avaliaram a combinação *in vitro* de antifúngicos com os antibióticos claritromicina, minociclina e tigeciclina e concluíram que estas associações podem ser uma alternativa ao tratamento da pitiose, pois resultam em interações sinérgicas. Miller (1981)

desenvolveu um imunoterápico a partir de culturas do próprio agente contendo hifas sonicadas, no entanto, uma nova metodologia foi utilizada para aprimorar o imunoterápico existente.

No Brasil, o imunoterápico desenvolvido por Santurio et al. (2003), para o tratamento da pitiose equina, incluíram na metodologia anteriormente descrita por Miller (1981), a liofilização do imunoterápico que possibilitou uma maior validade do produto e também a liberação gradual de antígenos a partir de massa micelial macerada. Monteiro (1999) realizou um teste de eficiência deste imunoterápico produzido no Brasil, o qual demonstrou índice de cura de 50 a 83,3% entre os grupos tratados com a imunoterapia.

A imunoterapia foi utilizada pela primeira vez com sucesso em um menino da Tailândia que apresentava a forma vascular da enfermidade. Neste caso, a cirurgia e a terapia química não foram eficazes na cura do paciente, assim iniciou-se a imunoterapia e após um ano utilizando o imunoterápico o paciente obteve cura (THYTITHANYANOT et al., 1998). Wanaschiwanawin et al. (2004) utilizaram a imunoterapia em pacientes humanos e 50% destes responderam positivamente ao tratamento imunoterapêutico.

No Brasil a imunoterapia vem sendo amplamente utilizada no tratamento da pitiose em equinos e seu mecanismo de ação contra *P. insidiosum* baseia-se na alteração da resposta imune do hospedeiro, pois esta expõe os antígenos de *P. insidiosum* de forma distinta às células apresentadoras de antígenos, induzindo a diferenciação de células Th0 em células Th1 que liberam INF- γ e IL-2, ampliando a resposta mediada por células, e ativando células T citotóxicas capazes de combater a infecção (MENDOZA et al., 2003).

Contudo, existem casos não responsivos à imunoterapia. Acredita-se que alguns animais não respondem aos antígenos presentes no imunoterápico devido a particularidades individuais até o presente momento desconhecidas. Ainda, fatores como o tempo de lesão e idade do indivíduo contribuem para o prognóstico reservado a desfavorável (MENDOZA e NEWTON, 2005).

O diagnóstico precoce da enfermidade está diretamente relacionado ao sucesso da terapia (MENDOZA e NEWTON, 2005). Portanto, pesquisas que envolvam o aprimoramento das técnicas diagnósticas e alternativas terapêuticas existentes, bem como novos fármacos são imprescindíveis para o controle da pitiose (GAASTRA et al., 2010).

4 ARTIGO 1- SOROPREVALÊNCIA DA PITIOSE EQUINA NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

Artigo submetido à Ciência Rural (ANEXO)

Soroprevalência da pitiose equina no estado do Rio Grande do Sul, Brasil

Seroprevalence of equine pythiosis in the state of Rio Grande do Sul, Brazil

Carla Weiblen^I, Gustavo Machado^{II}, Francielli Pantella Kunz de Jesus^{III}, Janio Morais Santurio^{III}, Régis Adriel Zanette^{III}, Daniela Isabel Brayer Pereira^{IV}, Gustavo Nogueira Diehl^V, Lucila Carboneiro dos Santos^V, Luis Gustavo Corbellini^{II}, Sônia de Avila Botton^{I*}

RESUMO

Um levantamento soroepidemiológico foi realizado através do teste de ELISA indireto para determinar a soroprevalência da pitiose equina no estado do Rio Grande do Sul (RS). As amostras utilizadas eram provenientes do cadastro das propriedades do Serviço Veterinário Oficial (SVO), da Secretaria da Agricultura, Pecuária e Agronegócio do RS (SEAPA-RS) coletadas para o inquérito da anemia infecciosa equina de 2014. As coletas foram realizadas durante os meses de setembro e outubro de 2013, abrangendo as sete mesorregiões geográficas do RS, e totalizaram 1002 amostras de soro. Do total das amostras testadas, 11,07% (111/1002) foram soropositivas para a pitiose equina. Constatou-se o risco relativo

^IPrograma de Pós-graduação em Medicina Veterinária (PPGMV), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima, 1000, Prédio 44, Sala 5007, Bairro Camobi, Santa Maria-RS 97105-900, Brazil.

^{II}Laboratório de Epidemiologia Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 95320-000. ^{III}Laboratório de Pesquisas Micológicas, Departamento de Microbiologia e Parasitologia (UFSM), Av. Roraima, 1000. Prédio 20, Sala 4139, Bairro Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil.

^{IV}Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

^VDepartamento de Defesa Animal, Secretária de Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Rio Grande do Sul (SEAPA/RS), Av. Getúlio Vargas 1384, Porto Alegre, RS 90150-000. *Autor para correspondência: sabott20@gmail.com.

(RR) da presença de anticorpos anti-*Pythium insidiosum* nas regiões Sudeste 11,17 (IC_{95%}, 4,65-26,8), metropolitana de Porto Alegre 4,62 (IC_{95%}, 1,70-12,55), Sudoeste 11,17 (IC_{95%}, 4,65-26,8) e Noroeste 3,72 (IC_{95%}, 1,52-9,09). Observou-se a maior soroprevalência 69,1% em fêmeas com RR de 1,59 (IC_{95%}, 1,11-2,27). Quanto à presença de açudes, evidenciou-se soropositividade em 74,4% das propriedades apresentando fator de risco de 2,13 (IC_{95%}, 1,16-3,91) em comparação com propriedades sem açude. Em propriedades com assistência veterinária foi verificada a frequência de 72,7% e RR de 3,04 (IC_{95%}, 1,85- 4,98). Diante da relevância da pitiose em rebanhos equinos, destaca-se a presença de anticorpos anti-*P. insidiosum* em equinos no estado do RS.

Palavras-chave: *Pythium insidiosum*, anticorpo, ocorrência, equinos.

ABSTRACT

An epidemiological survey was carried out by performing an ELISA test to determine the seroprevalence of equine pythiosis in Rio Grande do Sul (RS) state, Brazil. The serological study covered seven geographical regions of RS, classified according to the IBGE. The samples were obtained from Serviço Veterinário Oficial (SVO) linked to Secretaria da Agricultura, Pecuária e Agronegócio do RS (SEAPA-RS) collected to proceed the investigation of equine infectious anemia in 2014. Samples were collected during the months of September and October of 2013, covering the seven geographical regions of RS, and totalized 1002 serum samples. The prevalence for equine pythiosis in RS was 11.07% (111/1002). The relative risk (RR) of the presence of antibodies anti-*Pythium insidiosum* was significantly in the regions Southeast 11.17 (IC_{95%}, 4.65 to 26.8), metropolitan of Porto Alegre 4.62 (IC_{95%}, 1.70 12.55), Southwest 11.17 (IC_{95%}, 4.65 to 26.8) and Northwestern 3.72 (IC_{95%}, 1.52 to 9.09). The highest prevalence (69.1%) was observed in females with RR of 1.59 (IC_{95%}, 1.11 to 2.27). When the presence of ponds was evaluated, the seropositivity was

evident in 74.4%, presenting a risk factor of 2.13 (IC_{95%}, 1.16 to 3.91) compared to properties without ponds. In properties with veterinary care, the frequency of 72.7% and RR of 3.04 (IC_{95%}, 1.85- 4.98) of seropositivity were observed. Given the importance of pythiosis in horse herds, this study highlights the presence of anti-*P. insidiosum* antibodies in horses in the state of RS.

Key words: *Pythium insidiosum*, antibody, occurrence, horses.

INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho de equinos da América Latina e o terceiro mundial (MAPA, 2014). No estado do Rio Grande do Sul (RS) a população equina está estimada em 468.691 cabeças (IBGE, 2014). Os equinos geram mais de R\$ 7,3 bilhões em atividade econômica anualmente. A indústria de equinos no Brasil e RS é uma importante atividade agrícola que combina negócios, esporte e lazer em um programa de impacto econômico envolvendo milhões de pessoas (ALMEIDA & SILVA, 2010). O conhecimento das enfermidades que ocorrem na espécie equina é fundamental para a determinação de sua importância econômica e o estabelecimento de medidas de controle (MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2014).

A pitiose é uma enfermidade granulomatosa crônica causada pelo oomiceto aquático *Pythium insidiosum* que acomete o homem e animais domésticos e silvestres. Dentre as espécies mais acometidas está a equina. A doença possui distribuição mundial, ocorrendo em regiões de clima tropical e subtropical (MENDOZA et al., 1996). No Brasil destacam-se as regiões do Pantanal Mato-Grossense (LEAL et al., 2001; SANTOS et al., 2014) e RS (MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012) como endêmicas para a pitiose equina.

No Brasil tem-se verificado um aumento de casos de pitiose clínica em animais de produção, especialmente na espécie equina (LEAL et al., 2001; SALLIS et al., 2003,

MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012; SANTOS et al., 2014). Aliado a isso, pesquisas referentes à prevalência e à incidência da pitiose equina ainda são escassas (LEAL et al., 2001; SALLIS et al., 2003; MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012). As técnicas sorológicas, como os testes imunoenzimáticos (ELISA), apresentam a melhor alternativa para realização de levantamentos sorológicos, pois apresentam além da rapidez, boa sensibilidade e especificidade e baixo custo (MENDOZA et al., 1997; GROOTERS et al., 2002; SANTURIO et al., 2006). Contudo, os trabalhos disponíveis baseiam-se nos aspectos epidemiológicos oriundos de estudos retrospectivos (PIEREZAN et al., 2009; SOUZA et al., 2011, MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012) e análises de casos clínicos diagnosticados em regiões endêmicas (LEAL et al., 2001; SANTOS et al., 2014). Portanto, diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a soroprevalência da pitiose equina no estado do RS.

MATERIAL E MÉTODOS

O levantamento soropidemiológico abrangeu as sete mesorregiões geográficas do estado do RS, classificadas de acordo com o IBGE. O Estado foi dividido em sete estratos (coincidindo com as sete mesorregiões do RS), divisão atribuída às análises realizadas previamente com relação à movimentação dos equídeos (majoritariamente intramesorregião), às aptidões para as quais os equídeos são utilizados no RS (diferentes nas mesorregiões), ao estoque animal (marcadamente diferentes nas mesorregiões), além das diferenças agroecológicas nas mesorregiões (Figura 1A).

As amostras de soro equino utilizadas neste estudo foram provenientes do Serviço Veterinário Oficial (SVO), da Secretaria da Agricultura, Pecuária e Agronegócio do Rio Grande do Sul (SEAPA-RS), coletadas para o inquérito da anemia infecciosa equina (AIE) de 2014. O tipo de amostra foi definido em dois estágios. No primeiro, foi sorteado aleatoriamente um número pré-determinado de propriedades que atendessem aos pré-

requisitos da população alvo do estudo (presença de pelo menos um equídeo acima de seis meses de idade). No segundo estágio foi sorteado, de forma sistemática, um número pré-estabelecido de equídeos acima de seis meses de idade. O cálculo do tamanho da amostra de propriedades foi determinado de acordo com THRUSFIELD (2007) e realizado no Ausvet (SERGEANT, 2013). Os parâmetros amostrais foram definidos a partir do número de propriedades que possuíam pelo menos um equídeo acima de seis meses de idade ($n=103.180$) cadastradas no Sistema de Defesa Agropecuária (SDA) do RS. Para o cálculo da amostra, tendo como unidade amostral a propriedade rural, assumiu-se um nível de confiança de 95% e uma precisão absoluta de 5%. Com base nos parâmetros descritos, o número de amostras definido foi 338 propriedades amostradas de forma proporcional ao número de propriedades cadastradas em cada mesorregião do RS. Para o segundo estágio, uma prevalência intrarrebanho de 25% foi assumida a priori, com isso simulou-se cenários com diferentes sensibilidade e especificidade até se chegar a 100%. Como resultado, em propriedades com menos de 10 animais, todos os animais foram amostrados; em propriedades com mais de 10, foram sistematicamente coletados 10 animais. As amostras foram obtidas durante os meses de setembro e outubro de 2013 e totalizaram 1002 soros, sendo 596 oriundos de fêmeas e 406 de machos.

Para o ELISA indireto empregou-se a metodologia descrita por SANTURIO et al. (2006). Cada amostra foi testada em triplicata e amostras controle positivo e negativo oriundas de animais soropositivos e negativos previamente testados foram empregadas em todos os testes realizados. O ponto de corte estabelecido foi baseado no valor da média da densidade óptica adicionado três vezes o desvio padrão das amostras negativas, com nível de confiança de 99,8%. As amostras com título acima do ponto de corte foram consideradas positivas para pitiose equina.

Os dados gerados do teste de ELISA indireto foram registrados e analisados no software estatístico R, versão 2.15.1. Foram realizadas a tabulação cruzada e a estatística descritiva. As variáveis foram primeiro rastreadas com base nos resultados das variáveis resposta do teste de ELISA (positivo ou negativo) e as variáveis com grandes quantidades de dados em falta (> 10%) e variabilidade limitado (< 20%) não foram incluídos na análise. As demais variáveis foram inseridas individualmente em um modelo de regressão logística univariada quando $P < 0,05$, sendo construídos dois modelos, um para nível animal onde a variável resposta foi a presença ou ausência de anticorpos anti- *P. insidiosum* nos 1002 equinos, e outro para nível de rebanho onde a variável resposta foi a presença de um animal positivo para *P. insidiosum* (338 propriedades). A prevalência de anticorpos anti-*P. insidiosum* a nível animal foi calculada com nível de confiança de 95% utilizando uma distribuição binomial exata (CLOPPER & PEARSON, 1934) As análises estatísticas descritivas foram realizadas através dos programas Microsoft Office Excel[®], @risk[®] e R v.2.15.2 (R development Core Team, 2012), e as análises espaciais, utilizando o programa ArcGis[®] 10.

RESULTADOS

Do total das amostras de soros equinos testados, 11,07% (IC_{95%} 9,23-13,22) foram soropositivas para a pitiose equina no RS. Neste estudo foi constatada a presença de anticorpos anti-*P. insidiosum* nas regiões sudeste, metropolitana de Porto Alegre, sudoeste e noroeste (Tabela 1, Figura 1B). Para a análise de regressão logística a nível animal foi indentificada maior probabilidade de infecção por *P. insidiosum* em fêmeas com RR de 1,59 (IC_{95%}, 1,11-2,27) em comparação com machos. Quanto à análise a nível rebanhos, avaliou-se a presença de fontes de água (açudes, lagos, rios e riachos), evidenciam-se como fator de risco a presença de açudes com RR de 2,13 (IC_{95%}, 1,16-3,91) em comparação com propriedades

sem açude. Além disso, foi evidenciada a relação de anticorpos anti-*P. insidiosum* em propriedades com assistência veterinária, com RR de 3,04 (IC_{95%}, 1,85- 4,98).

Em relação ao nível animal e à propriedade também foram avaliados: idade, raça, pelagem do animal, área total da propriedade e finalidade da criação dos equinos (trabalho ou esporte). No entanto, estas variáveis não foram significativas ($P \geq 0,05$) (dados não apresentados).

DISCUSSÃO

Neste estudo foi possível verificar uma soroprevalência da pitiose de 11,07% em rebanhos equinos no RS. Ressalta-se que esta pesquisa foi pautada em um delineamento amostral para a AIE a partir do número de equinos cadastrados no SVO do RS, sendo representativa do número de animais presentes no rebanho equino do estado, em cada mesorregião avaliada. Por este motivo, informações epidemiológicas referentes à pitiose, tais como presença de lesões cutâneas nos animais, utilização de possíveis alternativas para tratamento e índice de cura não foram coletados.

A pitiose é uma enfermidade importante do ponto de vista sanitário e econômico às criações de equinos. O RS é uma região considerada endêmica para a pitiose equina no Brasil, sendo a mesma diagnosticada principalmente nas regiões central e sul do RS. MARCOLONGO-PEREIRA et al. (2012) indicaram que em amostras de enfermidades de pele de equinos da região sul do RS, 14,5% foram diagnosticadas como pitiose. PIEREZAN et al. (2009) realizaram uma análise retrospectiva entre 1968 e 2007 de necropsias de equinos da região central do RS, no qual constataram que 3,58% estavam associadas ao oomiceto *P. insidiosum*. Na mesma região, entre 1999 e 2009, a pitiose equina representou 8,3% dos casos de tumores cutâneos diagnosticados em equinos (SOUZA et al., 2011). No presente trabalho

evidenciou-se um perfil sorológico da pitiose nas mesorregiões sudeste, Porto Alegre, sudoeste e noroeste do RS (Figura 1B).

A técnica sorológica empregada nesta pesquisa foi o ELISA indireto, considerado um método sensível e específico, utilizado para detecção de pitiose em humanos e em diversas espécies animais (MENDOZA et al., 1997; GROOTERS et al., 2002; VANITTANAKOM et al., 2004; PEREZ et al., 2005; SANTURIO et al., 2006). CHAREONSIRISUTHIGUL et al. (2013) realizaram um estudo comparativo entre as técnicas ELISA, imunodifusão, imunocromatografia e hemaglutinação, no qual concluíram que independentemente do tipo de antígeno utilizado, o ELISA demonstrou ser a técnica com melhor performance de diagnóstico. Adicionalmente, o teste de ELISA indireto para o diagnóstico da pitiose em equinos desenvolvido por SANTURIO et al. (2006) demonstrou uma sensibilidade de 97,72% e especificidade de 90,27%.

Nesta pesquisa constatou-se diferença significativa entre o sexo dos equinos, na qual as fêmeas apresentaram maior resposta sorológica de anticorpos anti-*P. insidiosum*. Ainda que o número de fêmeas tenha sido maior no estudo, maior prevalência em fêmeas também foi constatada por LEAL et al. (2001) e SANTOS et al. (2014) no Pantanal Mato-Grossense e por MOSBAH et al. (2012) no Egito.

O ciclo do oomiceto causador da pitiose está intimamente relacionado à presença de água e gramíneas. Nas propriedades com a presença de açudes evidenciou-se a maior frequência de animais soropositivos à pitiose. Outros autores também associaram a presença de água com a doença (CHAFFIN et al., 1995; MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012; SANTOS et al., 2014).

Outro fato relevante foi a associação da presença de anticorpos anti-*P. insidiosum* com a assistência veterinária às propriedades. Isto pode estar relacionado com o tratamento imunoterapêutico, visto que o ELISA não diferencia animais enfermos dos recentemente

inoculados com o antígeno. Em relação à imunidade humoral para a enfermidade, constata-se que é bastante sensível e específica. Entretanto, no presente estudo observou-se uma diferença na magnitude da resposta humoral, visto que os títulos de anticorpos evidenciados no ELISA foram, em sua maioria, baixos (dados não apresentados). Geralmente, evidenciam-se títulos altos de anticorpos anti-*P. insidiosum* em animais enfermos e recentemente vacinados (SANTOS et al., 2011). Desta forma, sugere-se que a grande parte dos rebanhos equinos avaliados apresentou resposta humoral posterior à cura ou ainda possa ser decorrente do resultado do estímulo antigênico oriundo da presença do agente no meio ambiente. Acredita-se que a maior parte dos mamíferos seja resistente à infecção por *P. insidiosum*, sendo que somente alguns acabam por desenvolver a doença, possivelmente por falha no reconhecimento inicial do antígeno (MENDOZA & VILELA, 2013; ZANETTE et al., 2013).

CONCLUSÃO

Diante da importância socioeconômica da equinocultura no Brasil, destaca-se a presença de anticorpos anti-*P. insidiosum* em equinos no RS nas mesorregiões sudeste, Porto Alegre, sudoeste e noroeste. A soroprevalência da pitiose no RS indica que o agente está presente nas diferentes regiões do estado e alerta para o diagnóstico clínico e tratamento precoces da pitiose equina. Ressalta-se que há necessidade de outros estudos envolvendo a epidemiologia e soroprevalência da doença em números representativos de rebanhos equinos no Brasil.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro durante a execução do trabalho e pelas bolsas de pesquisa. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), pelo suporte financeiro e pela concessão de bolsa de estudos do aluno de pós-graduação. Ao Serviço Veterinário Oficial (SVO) e à Secretaria da Agricultura, Pecuária e Agronegócio do RS (SEAPA-RS) pelo consentimento das amostras. À equipe do Laboratório de Epidemiologia Veterinária da Universidade Federal do RS – EPILAB/FAVET/UFRGS pela condução das análises estatísticas. Ao geógrafo Carlos Alberto Löbler pela confecção dos mapas das mesorregiões do Rio Grande do Sul.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, F.Q.; SILVA, V.P. Progresso científico em equideocultura na 1ª década do século XXI. **R. Bras. Zootec.** v.39, p.119-129. 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-35982010001300014>.

Acesso em: 29 nov. 2014. doi: 10.1590/S1516-35982010001300014

CHAFFIN, M.K. et al. Cutaneous pythiosis in the horse. **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.** v.11,n.1, p. 91-103. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7634168>>. Acesso em: 29 nov. 2014.

CHAREONSIRISUTHIGUL, T. et al. Performance comparison of immunodiffusion, enzyme-linked immunosorbent assay, immunochromatography and hemagglutination for serodiagnosis of human pythiosis. **Diagn. Micr. Infec. Dis.** v.76, n.1, p. 42–45. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23537786>>. Acesso em: 29 nov. 2014. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.02.025.

CLOPPER, C.J.; PEARSON, E.S. The use of confidence or fiducial limits illustrated in the case of the binomial. **Biometrika**. v.26, p. 404–413. 1934. Disponível em: <<http://www.jstor.org/discover/10.2307/2331986?uid=3737664&uid=2&uid=4&sid=21105329849283>>. Acesso em: 29 nov. 2014.

GROOTERS, A.M. et al. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of pythiosis in dogs. **J. Vet. Intern. Med.** v.16, n.2, p. 142–146. 2002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11899028>>. Acesso em: 29 nov. 2014.

IBGE 2014. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/default.shtm>>

LEAL, A.B.M. et al. Pitiose eqüina no pantanal brasileiro: Aspectos clínico-patológico de casos típicos e atípicos. **Pesq. Vet. Bras.** v. 21, n.4, p.151-156. 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pvb/v21n4/7481.pdf>>. Acesso: 29 nov. 2014.

MAPA 2014. Ministério da Agricultura Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/equideos>>.

MARCOLONGO-PEREIRA, C. et al. Epidemiologia da pitiose equina na Região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesq. Vet. Bras.** v.32, n.9, p. 865-868. 2012. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2012000900009>.

Acesso em: 29 nov. 2014. doi: 10.1590/S0100-736X2012000900009

MARCOLONGO-PEREIRA, C. et al. Doenças de equinos na região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesq. Vet. Bras.** v.34, n.3, p. 205-210. 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2014000300002&script=sci_arttext>.

Acesso em: 29 nov. 2014. doi: 10.1590/S0100-736X2014000300002.

MENDOZA L. et al. Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. **J. Med. Mycol.** v.6, n.4, p. 151-164. 1996. Acesso em: 29 nov. 2014.

MENDOZA, L. et al. Serodiagnosis of human and animal pythiosis using an enzyme-linked immunosorbent assay. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** v.4, n.6, p. 715-718. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC170646/>>. Acesso em: 29 nov. 2014.

MENDOZA, E; VILELA, R. The Mammalian Pathogenic Oomycetes. **Curr. Fungal Infect. Rep.** v. 7, n.3, p. 198-208. 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12281-013-0144-z>>. Acesso em: 29 nov. 2014. doi: 10.1007/s12281-013-0144-z

MOSBAH, E. et al. Diagnosis and surgical management of pythiosis in draft horses: report of 33 cases in Egypt. **J. Equine. Vet. Sci.** v.32, n.3, p.164–169. 2012. Disponível em: <[http://www.j-evs.com/article/S0737-0806\(11\)00503-X/abstract](http://www.j-evs.com/article/S0737-0806(11)00503-X/abstract)>. Acesso em: 29 nov. 2014. doi: 10.1016/j.jevs.2011.08.014.

PEREZ, R.C. et al. Epizootic cutaneous pythiosis in beef calves. **Vet. Microbiol.** v.109, n. 1-2, p. 121-128. 2005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15961262>>. Acesso em: 29 nov. 2014. doi: 10.1016/j.vetmic.2005.04.020.

PIEREZAN, F. et al. Achados de necropsia relacionados com a morte de 335 equinos: 1968-2007. **Pesq. Vet. Bras.** v.29, n.3, p. 275-280. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2009000300015>. Acesso em: 29 nov. 2014. doi: 10.1590/S0100-736X2009000300015.

SALLIS, E.S.V. et al. Cutaneous pythiosis in horses: 14 cases. **Cienc. Rural.** v.33, n.5, p. 899–903. 2003. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782003000500017>. Acesso em: 29 nov. 2014. doi: 10.1590/S0103-84782003000500017.

SANTOS, C.E.P. et al. Does immunotherapy protect equines from reinfection by the oomycete *Pythium insidiosum*? **Clin. Vaccine Immunol.** v.18, n.8, p. 1397-1399. 2011.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3147340/>>. Acesso em: 29 nov. 2014. doi: 10.1128/CVI.05150-11.

SANTOS, C.E.P. et al. Epidemiological survey of equine pythiosis in the Brazilian Pantanal and nearby areas: results of 76 cases. **J. Equine. Vet. Sci.** v.34, n.2, p.270–274. 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080613004152>>. Acesso em: 29 nov. 2014. doi:10.1016/j.jevs.2013.06.003.

SANTURIO, J.M. et al. Teste de ELISA indireto para o diagnóstico sorológico de pitiose. **Pesq. Vet. Bras.** v.26, n.1, p. 47-50. 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2006000100010>. Acesso em: 29 nov. 2014. doi: 10.1590/S0100-736X2006000100010.

SERGEANT, E.S.G. 2013. Epitools epidemiological calculators. AusVet Animal Health Services and Australian Biosecurity Cooperative Research Centre for Emerging Infectious Disease. Disponível em: <<http://epitools.ausvet.com.au>>.

SOUZA, T.M. et al. Prevalência dos tumores cutâneos de equinos diagnosticados no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria. **Pesq. Vet. Bras.** v.31, n.5, p. 379-382. 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2011000500003&script=sci_arttext>. Acesso em: 29 nov. 2014. doi: 10.1590/S0100-736X2011000500003.

THRUSFIELD, M. 2007. Veterinary Epidemiology. Wiley-Blackwell, 610 p.

VANITTANAKOM, N. et al. Identification of emerging human-pathogenic *Pythium insidiosum* by serological and molecular assay-based methods. **J. Clin. Microbiol.** v.42, n.9, p. 3970-3974. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC516349/>>. Acesso em: 29 nov. 2014. doi: 10.1128/JCM.42.9.3970-3974.2004.

ZANETTE, R.A. et al. Toll-deficient *Drosophila* is susceptible to *Pythium insidiosum* infection. **Microbiol. Immunol.** v.57, n. 10, p. 732-735. Disponível em:

<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1348-0421.12082/abstract>>. Acesso em: 29 nov. 2014. doi: 10.1111/1348-0421.12082.

Tabela 1 - Variáveis analisadas para a pitiose no estado do Rio Grande do Sul.

Variável	Frequência (%) ou mediana	Valor de <i>P</i>	RR ² (IC ³ 95%)
<u>Animais</u> (n=1002)			
Sexo			
Fêmea	69,1	0,031	1,59 (1,11-2,27)
Macho	30,9	-	-
Idade	9	0,6	1 (0,98-1,03)
<u>Propriedade</u> (n=338)			
Mesorregião			
Centro ocidental	2,96	-	-
Centro oriental	4,46	0,51	1,56 (0,50-4,79)
Nordeste	3,66	0,74	1,28 (0,35-4,58)
Noroeste	9,48	0,036	3,50(1,31-9,34)
Porto Alegre	12,04	0,012	4,62(1,70-12,55)
Sudeste	25,39	<0,001	11,17(4,65-26,8)
Sudoeste	10,32	0,016	3,72(1,52-9,09)
Assistência Veterinária			
Presente	51,8	<0,001	3,04 (1,85- 4,98)
Ausente	48,2		-
Açudes			
Presente	74,8	0,03	2,13 (1,16-3,91)
Ausente	25,2		-

¹Desvio padrão. ²Risco relativo. ³Intervalo de confiança (0,05).

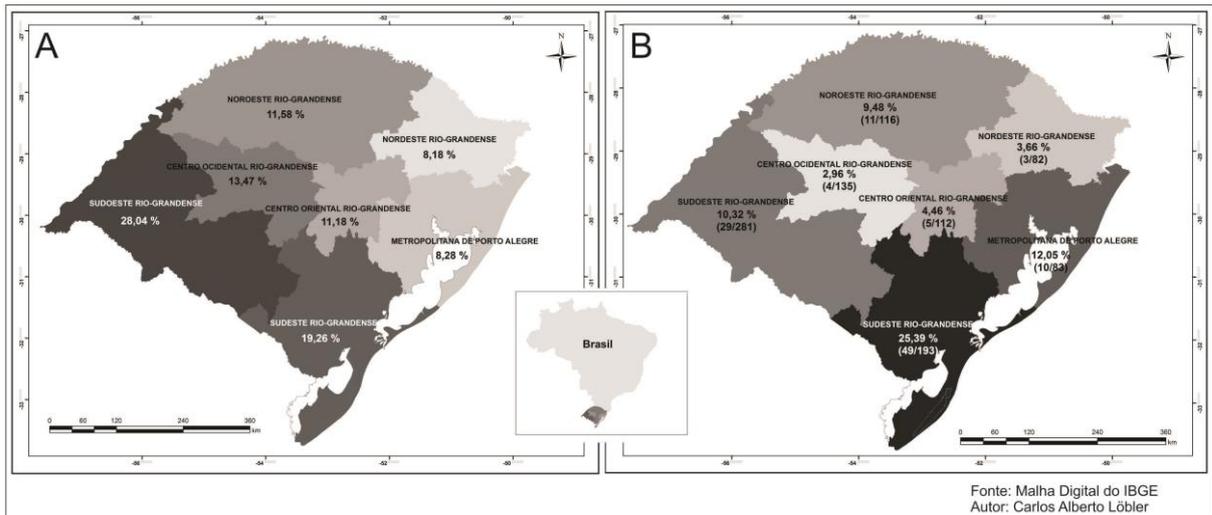


Figura 1 - A: Frequência das amostras coletadas de rebanhos de equinos amostrados nas mesorregiões do Rio Grande do Sul. As porcentagens indicam o número de amostras de soro equino obtidas de cada mesorregião. B: Soroprevalência da pitiose equina nas mesorregiões do Rio Grande do Sul. No mapa é possível identificar a frequência relativa de anticorpos anti-*P. insidiosum* nos rebanhos de equinos amostrados em cada mesorregião. Entre parênteses estão demonstradas o número absoluto de amostras positivas em relação ao número total de amostras coletadas em cada mesorregião.

5 ARTIGO 2- USO INTRADÉRMICO DE ANTÍGENO PROTEICO DE *Pythium insidiosum* PARA DIAGNÓSTICO E CONTROLE DA PITIOSE EM MODELO EXPERIMENTAL

Artigo em construção, a ser traduzido para o inglês e submetido à Ciência Rural

Uso intradérmico de antígeno proteico de *Pythium insidiosum* para diagnóstico e controle da pitiose em modelo experimental

Intradermal use of a proteic antigen of *Pythium insidiosum* for diagnosis and control of pythiosis in experimental model

Carla Weiblen^{Ia}, Régis Adriel Zanette^{II}, Tatiana Correa Ribeiro^{Ib}, Carlos Eduardo Pereira dos Santos^{III}, Daniela Isabel Brayer Pereira^{IV}, Janio Morais Santurio^{Ib}, Sônia de Avila Botton^{Ia*}

RESUMO

O diagnóstico precoce da pitiose determina o sucesso do tratamento. Contudo, as técnicas de diagnóstico apresentam limitações, incluindo estrutura laboratorial e pessoal especializado. O uso de antígenos proteicos é uma alternativa terapêutica promissora. Nesta pesquisa avaliou-se a aplicação intradérmica de antígenos proteicos de *Pythium insidiosum* para o diagnóstico e controle da pitiose em coelhos. Aplicou-se 0,1mL(1,7mg) do antígeno proteico pela via intradérmica (ID), para diagnóstico da pitiose, em coelhos (n=15) nos seguintes grupos: controle negativo (n=5), com pitiose experimental (n=5) e animais imunizados com antígeno

^I Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).^aDepartamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP)/Centro de Ciências Rurais (CCR). ^bDepartamento de Microbiologia e Parasitologia (Demip)/Centro de Ciências da Saúde (CCS). *Endereço para correspondência: Av. Roraima 1000, Prédio 44, sala 5007. Campus Universitário. Camobi. Santa Maria – RS. CEP 97105-900. E-mail:sabott20@gmail.com

^{II} Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

^{III} Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT).

^{IV} Universidade Federal de Pelotas (UFPeL). Instituto de Biologia (IB), Departamento de Microbiologia e Parasitologia.

proteico (n=5). Cinco coelhos com pitiose foram tratados com 0,1mL do antígeno proteico, aplicado via ID, e cinco coelhos tratados via subcutânea (SC) com 2mL (34mg) do antígeno. As leituras das reações cutâneas mostraram-se diferentes às 24h(P<0,01) e 72h(P<0,01) quando comparadas ao grupo controle. O teste intradérmico apresentou 100% de sensibilidade às 24h e 80% às 72h e especificidade de 100% em ambas as leituras. No tratamento com antígeno proteico de *P. insidiosum* pelas vias ID e SC, não foi observada diferença (P>0,05) no tamanho das lesões. Contudo, houve regressão total das lesões em 40% dos coelhos de ambos os grupos. Isto indica que o antígeno proteico via ID pode ser utilizado em protocolos terapêuticos da pitiose em coelhos, apresentando como vantagens a rapidez, menor concentração e volume de antígeno. Neste estudo, demonstra-se a aplicabilidade do antígeno proteico de *P. insidiosum* via ID tanto para o diagnóstico quanto para o tratamento da pitiose em modelo experimental. No entanto, novos estudos são requeridos para averiguar o uso destes protocolos em animais naturalmente infectados por *P.insidiosum*.

Palavras-chave: Pitiose, coelhos, via intradérmica, diagnóstico, tratamento.

ABSTRACT

The early diagnosis determines the success of pythiosis' treatment. However, diagnostic methods have limitations, including specialized laboratory and personnel. The use of protein antigens is a promising therapeutic alternative. The aim of this study it was to evaluate the intradermal injection of protein antigens of *P. insidiosum* (PAPi) for the diagnosis and control of pythiosis in rabbits. PAPi were applied (1.7mg) by intradermal route (ID)(0.1mL) in rabbits (n = 15) in the following groups: negative control (n = 5), pythiosis experimental (n = 5), animals immunized with PAPi (n = 5). Five rabbits with pythiosis were treated with 0.1mL of PAPi, administered through ID and five rabbits were treated subcutaneously (SC) (2mL; 34mg) of PAPi. Cutaneous reactions readings were different to 24h (P <0.01) and 72h

($P < 0.01$) when compared to the control group. Intradermal testing showed 100% sensitivity at 24h and 80% at 72h, and 100% specificity in both readings. Treatment with *PAPi* in both, ID and SC, did not demonstrated difference ($P > 0.05$) in the size of the lesions. However, the total regression of lesions was in 40% of rabbits in both groups. Thus, *PAPi* by ID may be used in therapeutic protocols of pythiosis in rabbits. Additionally, advantages of ID including: quickness, lower concentration, and volume of *PAPi*. This study demonstrates the applicability of *PAPi* by ID for diagnosis and treatment of pythiosis in the experimental model. Moreover, further studies are required to establish these protocols in *P. insidiosum* natural hosts.

Key words: Pythiosis, rabbits, intradermal route, diagnosis, treatment.

INTRODUÇÃO

Pythium insidiosum é um oomiceto aquático pertencente ao reino Straminipila, agente causador da pitiose, uma importante enfermidade de caráter granulomatoso que acomete humanos e animais, especialmente equinos (DE COCK et al., 1987; SANTOS et al., 2014).

Tradicionalmente, o diagnóstico da pitiose baseia-se em aspectos clínicos, histopatológicos, isolamento e identificação do agente. No entanto, estes métodos apresentam limitações sendo necessário o emprego de outras técnicas com melhor sensibilidade e especificidade (GAASTRA et al., 2010). Neste sentido, os métodos moleculares e sorológicos são alternativas para um diagnóstico correto e precoce da enfermidade (MENDOZA et al., 1996; CHAREONSIRISUTHIGUL et al., 2013). Contudo, estes métodos exigem uma estrutura laboratorial complexa e pessoal especializado (CHAREONSIRISUTHIGUL et al., 2013). Estes fatores dificultam o sucesso no tratamento, o qual requer diagnóstico e intervenção terapêutica precoces (SUDJARITRUK & SIRISANTHANA, 2011).

As alternativas terapêuticas que apresentam maiores chances de sucesso para o controle da pitiose consistem na associação das opções que incluem: remoção cirúrgica, drogas antimicrobianas e imunoterapia (GAASTRA et al., 2010). Os antígenos proteicos presentes na imunoterapia vêm sendo utilizados principalmente no tratamento da enfermidade em equinos, uma vez que desencadeiam uma mudança na resposta imune do hospedeiro e apresentam índices de cura entre 50% a 83% (SANTURIO et al., 2010).

O desenvolvimento de uma ferramenta de diagnóstico rápida que associe sensibilidade, especificidade e aplicabilidade a campo são desejáveis para o controle da pitiose. O presente trabalho objetivou avaliar o uso intradérmico de antígenos proteicos de *P. insidiosum* para o diagnóstico e controle da pitiose em modelo experimental.

MATERIAL E MÉTODOS

O antígeno proteico foi preparado segundo SANTURIO et al. (2003). Resumidamente, *P. insidiosum* foi cultivado em 150mL de caldo Sabouraud e incubado a 37°C, sob rotação de 130 rpm durante 8 dias. Após o crescimento, as hifas foram coletadas e submetidas a um processo de maceração para liberação das proteínas. Posteriormente, utilizou-se éter para a precipitação das mesmas. As amostras foram aliquotadas, quantificadas, liofilizadas e mantidas em temperatura ambiente até o uso.

No experimento 1 a fim de verificar o uso de antígenos proteicos de *P. insidiosum* pela via intradérmica (ID) como protocolo de diagnóstico, utilizou-se 15 coelhos sadios, da raça Nova Zelândia, machos e fêmeas, de 3 meses de idade. Os animais foram aleatoriamente distribuídos em três grupos (n=5), sendo: grupo 1: controle negativo (não inoculados com zoósporos), grupo 2: imunizados com o antígeno proteico e não inoculados com zoósporos, e grupo 3: inoculados com zoósporos a fim de produzir a infecção experimental. Os animais do grupo 2 foram previamente imunizados com 2mL (34mg) do antígeno proteico, via SC, com

duas aplicações no intervalo de 14 dias, antes do início do teste intradérmico. A indução da zoosporogênese para inoculação dos animais dos grupos 3 seguiu a metodologia descrita por PEREIRA et al. (2008). Os animais foram inoculados com 1mL de meio de indução contendo aproximadamente 20.000 zoósporos viáveis de *P. insidiosum*, cepa CBS 101555. A inoculação foi realizada por via subcutânea (SC) no lado direito da região costal da parede torácica. Após o desenvolvimento das lesões de pitiose do grupo 3 (28 dias), procedeu-se a realização do teste intradérmico com o antígeno proteico de *P. insidiosum*. Para tal, os animais dos grupos 1, 2 e 3 foram previamente tricotomizados na região costal da parede torácica no lado esquerdo e aplicou-se intradermicamente 0,1mL (1,7mg) de antígeno proteico, ressuspenso em 2mL de água destilada estéril. As reações cutâneas foram avaliadas em 24h e 72h. A leitura do diâmetro da reação produzida no local da aplicação ID foi medida com o auxílio de um paquímetro e ambas as leituras foram realizadas pelo mesmo avaliador. A interpretação das reações intradérmicas foi realizada através da diferença da leitura da reação cutânea dos animais que receberam o antígeno proteico via ID em relação à dobra cutânea de cada animal antes do início do teste. Adicionalmente, a sensibilidade e especificidade do diagnóstico intradérmico foram realizadas de acordo com SOARES (2001).

No experimento 2, com objetivo de propor e comparar protocolos de tratamentos da pitiose em modelo experimental, utilizou-se os animais do grupo 3 (experimento 1) e outros 5 animais (grupo 4) igualmente inoculados com zoósporos a fim de produzir a infecção experimental (grupo 4), conforme descrito no experimento 1. Após a inoculação, os animais foram diariamente inspecionados para avaliação da infecção experimental. Quando todos os animais evidenciaram lesões visíveis, 28 dias após as inoculações, formaram-se os grupos para ambos os experimentos. Os coelhos do grupo 3 receberam 0,1mL (1,7mg) de antígeno proteico pela via ID e os coelhos do grupo 4, 2mL (34mg) por via SC, nos dias: 28, 42, 56 e 70, totalizando quatro doses do antígeno proteico para cada animal de ambos os grupos. As

lesões subcutâneas foram semanalmente mensuradas, com o auxílio de paquímetro, até o final do experimento.

Para o acompanhamento da infecção experimental nos animais dos experimentos 1 e 2 foram coletadas amostras de soro de todos os animais anteriormente à inoculação, pós-inoculação e em tratamento para realização da técnica de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) indireto específico para detecção de anticorpos anti-*P. insidiosum*, executada de acordo com o descrito por SANTURIO et al. (2006), sendo considerado o ponto de corte $\geq 0,0906$.

Os dados do experimento 1 foram submetidos à análise de variância, seguido pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%. Para o experimento 2, as áreas das lesões foram transformadas em percentagem e submetidas à análise de variância e teste F com um nível de significância de 5%. Além disso, foi determinada a análise de regressão para medidas de crescimento das lesões utilizando-se análises de 1ª, 2ª e 3ª ordem.

Ambos os experimentos utilizando os animais experimentais foram aprovados pela CEUA/UFSM, sob nº de protocolo 075/2014.

RESULTADOS

As leituras obtidas durante a realização do teste intradérmico para diagnóstico da pitiose em modelo experimental foram apresentadas na figura 1. As leituras das reações cutâneas dos animais previamente imunizados e infectados com *P. insidiosum* (grupos 2 e 3, respectivamente) mostraram-se diferentes em 24h ($P < 0,01$) (Figura 1A) e 72h ($P < 0,01$) (Figura 1B) em relação aos animais do grupo controle (grupo 1). A sensibilidade e especificidade do diagnóstico intradérmico foram avaliadas e a técnica apresentou 100% de sensibilidade às 24h e 80% às 72h e especificidade de 100% em ambas as leituras (24h e 72h).

No diagnóstico sorológico foi possível verificar que todos os animais do grupo 1 eram soronegativos até a inoculação do antígeno proteico, enquanto que os animais inoculados experimentalmente e os imunizados apresentaram anticorpos anti-*P. insidiosum* com valores acima do ponto de corte estabelecido pela técnica de ELISA com nível de confiança de 99,8%. Nos animais do experimento 2, observou-se que após a administração da segunda dose do antígeno proteico por via ID e SC, as médias das OD (densidade óptica) foram similares (0,627 e 0,620, respectivamente).

Após 28 dias da inoculação experimental os coelhos dos grupos 3 e 4 desenvolveram nódulos subcutâneos compatíveis com pitiose em modelo experimental. Em 30 dias de tratamento pela via ID e SC observou-se a cura clínica das lesões em 40% (2/5) dos animais de ambos os grupos. A percentagem média das áreas das lesões não diferiu entre os grupos ($P > 0,05$) e a análise de regressão demonstrou um comportamento de crescimento linear das lesões em ambos os grupos (Figura 2).

DISCUSSÃO

O uso da via ID para a aplicação do antígeno proteico de *P. insidiosum* pode ser uma alternativa para o diagnóstico da pitiose em modelo experimental, uma vez que foi possível detectar os animais experimentalmente infectados e os imunizados com antígeno proteico deste oomiceto. Verificou-se que a sensibilidade e a especificidade deste teste intradérmico foram similares ao ELISA indireto, considerada a prova padrão para diagnóstico sorológico de pitiose, o qual apresentou a sensibilidade e a especificidade de 97,72% e 90,27%, respectivamente (SANTURIO et al., 2006).

Neste trabalho, optou-se por realizar as leituras das reações cutâneas em 24h e 72h, e observou-se que não houve diferença nas leituras das reações cutâneas em ambos os momentos dos grupos 2 e 3. MILLER & CAMPBELL (1982) realizaram um teste

intradérmico em equinos, em três momentos (24, 48 e 72h), e constataram que as reações evidenciadas em 24h foram leves e as reações das leituras nas 48 e 72h não apresentaram diferença. Diferentemente dos resultados obtidos no presente estudo, as reações cutâneas leves em 24h relatadas por MILLER & CAMPBELL (1982) podem ser devido as diferenças na confecção do antígeno proteico empregado no teste. Estes autores utilizaram as proteínas solubilizadas a partir do crescimento do oomiceto em caldo, precipitadas e centrifugadas. No entanto, o antígeno proteico utilizado no presente estudo foi produzido a partir do crescimento de *P. insidiosum*, maceração das hifas e posterior precipitação de proteínas (SANTURIO et al., 2003). Este protocolo produziu um antígeno de melhor qualidade, com maior concentração e biodisponibilidade de proteínas, conseqüentemente desencadeando uma melhor resposta imunológica para diagnóstico e tratamento da pitiose.

A vantagem deste teste ID foi a rapidez, uma vez que foi capaz de detectar reações cutâneas às 24h após a aplicação do antígeno proteico nos coelhos dos grupos expostos ao agente. Similarmente MILLER & CAMPBELL (1982) relataram como vantagens do teste intradérmico: a rapidez, a sensibilidade e a reprodutibilidade ao avaliaram a imunidade celular a *P. insidiosum* pelo teste intradérmico em equinos infectados, recuperados e em contato com cavalos infectados em áreas endêmicas do norte da Austrália.

Observou-se que os coelhos dos grupos 2 e 3, os quais foram, respectivamente, imunizados com antígeno proteico de *P. insidiosum* e infectados com zoósporos deste oomiceto, apresentaram reações cutâneas significativas em relação ao grupo controle em ambas as leituras das reações cutâneas sendo em 24h ($P<0,01$) e 72h ($P<0,001$). A resposta cutânea evidenciada pelos animais dos grupos 2 e 3 indicou que o teste intradérmico empregado neste estudo foi capaz de detectar com segurança os animais que foram previamente expostos ao agente. Similarmente, isto foi demonstrado por MILLER & CAMPBELL (1982) em equinos.

Os protocolos terapêuticos correntemente utilizados no tratamento da pitiose, especialmente em equinos e em infecção experimental com coelhos, envolvem o uso de antígeno proteico na dose de 2mL pela via SC (CHAFFIN et al., 1995; SANTURIO et al., 2003; PEREIRA et al., 2008; BACH et al., 2010; SANTOS et al., 2011). O presente trabalho comparou a utilização de antígenos proteicos de *P. insidiosum* pela via ID na dose de 0,1 mL (1,7mg) com o protocolo correntemente utilizado para o tratamento da pitiose em modelo experimental (SANTURIO et al., 2003; PEREIRA et al., 2008; BACH et al., 2010). Ressalta-se que estudos anteriores não avaliaram o emprego isolado da via ID para terapia da pitiose (MENDOZA et al., 2003; WANACHIWANAWIN et al., 2004). Apenas, MENDOZA et al. (2003) e WANACHIWANAWIN et al. (2004) utilizaram para aplicação do antígeno proteico a via ID associada a via SC para avaliação da resposta imune e tratamento da pitiose animal e humana, respectivamente. Em ambos os trabalhos a via ID foi empregada em uma única dose do antígeno proteico para uma estimulação prévia do sistema imunológico do hospedeiro e após o tratamento foi continuado utilizando-se a via SC.

Embora não tenha havido diferença na resposta imunológica dos animais tratados pela via ID e via SC (Figura 2), a regressão total das lesões em 40% dos coelhos que receberam antígeno proteico através da via ID (grupo 3), foi similar ao grupo 4. Isto demonstrou que a via ID pode ser uma alternativa para o emprego de antígeno proteico de *P. insidiosum* em substituição à via SC, comumente empregada para a aplicação de imunoterápico para o tratamento da pitiose em equinos (CHAFFIN et al., 1995; SANTURIO et al., 2003), em coelhos (SANTURIO et al., 2003; PEREIRA et al., 2008; BACH et al., 2010) e em cães (PEREIRA et al., 2013). Destaca-se que a vantagem do protocolo utilizando a via ID pode reduzir os custos do tratamento, uma vez que o antígeno proteico pode ser utilizado em menor concentração (1,7mg) e volume. Adicionalmente, com este protocolo verificou-se menor reação inflamatória no local da aplicação.

CONCLUSÃO

Este trabalho revelou a aplicabilidade do antígeno proteico de *P. insidiosum* via ID para o diagnóstico e tratamento da pitiose em coelhos. No entanto, o uso desta metodologia deverá ser avaliada em animais naturalmente infectados. Adicionalmente, este estudo gera perspectivas para novas pesquisas envolvendo as relações hospedeiro-*P. insidiosum*.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro durante a execução do trabalho e pelas bolsas de pesquisa. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), pelo suporte financeiro e pela concessão de bolsa de estudos do aluno de pós-graduação.

REFERÊNCIAS

- BACH, B.C. et al. Immunotherapy for pythiosis: Effect on NTPDase activity in lymphocytes of an experimental model. **Biomedicine and Pharmacotherapy**. v. 64, p. 718-722, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20970953>>. Acesso em: 16 jan.2015. doi: 10.1016/j.biopha.2010.09.016.
- CHAFFIN, M.K.; SCHUMACHER, J.; MCMULLAN, W.J. Cutaneous pythiosis in the horse. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**. v.11, p. 91–103, 1995.
- CHAREONSIRISUTHIGUL, T. et al. Performance comparison of immunodiffusion, enzyme-linked immunosorbent assay, immunochromatography and hemagglutination for serodiagnosis of human pythiosis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 76, p. 42-45, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23537786>>. Acesso em: 16 jan.2015. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.02.025.

- DE COCK, A.W. *Pythium insidiosum* sp. the etiologic agent of pythiosis. **Journal of Clinical Microbiology.** v.25, p. 344–349, 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC265897>>. Acesso em: 16 jan.2015.
- GAASTRA, W.et al. *Pythium insidiosum*: An overview. **Veterinary Microbiology.**; v.146, p.1–16. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20800978>>. Acesso em: 16 jan.2015. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.07.019.
- MENDOZA, L.; AJELLO, L.; MCGINNIS, M.R. Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. **Journal de Mycologie Médicale.** v.6, p. 151–164, 1996.
- MENDOZA, L.; MANDY W.; GLASS R. An improved *Pythium insidiosum*-vaccine formulation with enhanced immunotherapeutic properties in horses and dogs with pythiosis. **Vaccine.** v.21, p.2797–2804. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12798620>>. Acesso em: 16 jan.2015.
- MENDOZA, L. & NEWTON, J.C. Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum*. **Medical Mycology.** v. 43, p. 477-486, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16320491>>. Acesso em: 16 jan. 2015.
- MILLER, R.I.; CAMPBELL, R.S.F. Clinical observations on equine phycomycosis. **Australian Veterinary Journal.** v.58, p. 221-226, 1982.
- PEREIRA, D.I.B. et al. Comparison between the immunotherapeutic and caspofungin as agents to treat experimental pythiosis in rabbits. **Journal de Mycologie Médicale.** v.18, n.3, p.129-133, 2008.
- PEREIRA, D.I.B. Canine gastrointestinal pythiosis treatment by combined antifungal and immunotherapy and review of published studies. **Mycopathologia.** v. 176, p. 309-315, 2013. doi: 10.1007/s11046-013-9683-7.
- SANTOS, C.E.P. et al. Does immunotherapy protect equines from reinfection by the oomycete *Pythium insidiosum*? **Clinical and Vaccine Immunology.** v. 18, 1397-1399, 2011.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3147340/>>. Acesso em: 16 jan. 2015. doi: 10.1128/CVI.05150-11.

SANTOS, C.E.P. et al. Epidemiological survey of equine pythiosis in the Brazilian pantanal and nearby areas: results of 76 cases. **Journal of Equine Veterinary Science**. v. 34, p. 270-274, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0737080613004152>>. Acesso em: 16 jan. 2015. doi: 10.1016/j.jevs.2013.06.003

SANTURIO, J.M. et al. Three types of immunotherapies against pythiosis insidiosus developed and evaluated. **Vaccine**. v.21, p. 2535-2540, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12744888>>. Acesso em: 16 jan. 2015.

SANTURIO, J.M. et al. Teste de ELISA indireto para o diagnóstico sorológico de pitiose. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 26, p. 47-50, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2006000100010>. Acesso em: 16 jan. 2015. doi: 10.1590/S0100-736X2006000100010.

SANTURIO, J.M. et al. Infectious and parasitic diseases of livestock, vol. 2. France: Lavoisier; 2010. p. 1403–16.

SUDJARITRUK, T.; SIRISANTHANA, V. Successful treatment of a child with vascular pythiosis. **BMC Infectious Diseases**. v.11, n.33. 2011. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2334/11/33>>. Acesso em: 16 jan. 2015. doi: 10.1186/1471-2334-11-33.

SOARES C.O. Princípios, padronização e validação de provas sorológicas, p.145-178. In: Madruga C.R., Araújo F.R., & Soares C.O. Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS. 2001.

WANACHIWANAWIN, W. et al. Efficacy of immunotherapy using antigens of *Pythium insidiosum* in the treatment of vascular pythiosis in humans. **Vaccine**. v, 22, p. 3613–3621,

2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15315840>>. Acesso em: 16 jan. 2015.

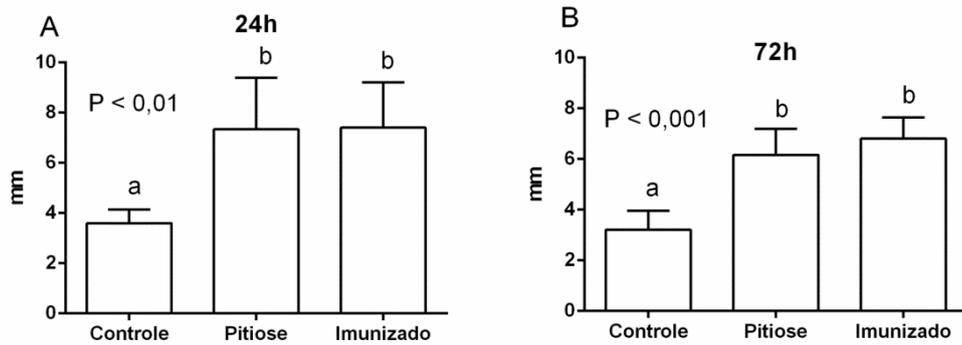


Figura 1 - Tamanho das reações cutâneas (mm) após a aplicação do antígeno proteico de *P. insidiosum* pela via ID para diagnóstico da pitiose em modelo experimental. Controle: grupo 1, coelhos não inoculados com zoósporos; Pitiose: grupo 3, coelhos inoculados com zoósporos de *P. insidiosum*; Imunizado: grupo 2, coelhos imunizados com o antígeno proteico (2mL, SC, duas aplicações). A) Leitura em 24h. B) Leitura em 72h. Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os grupos.

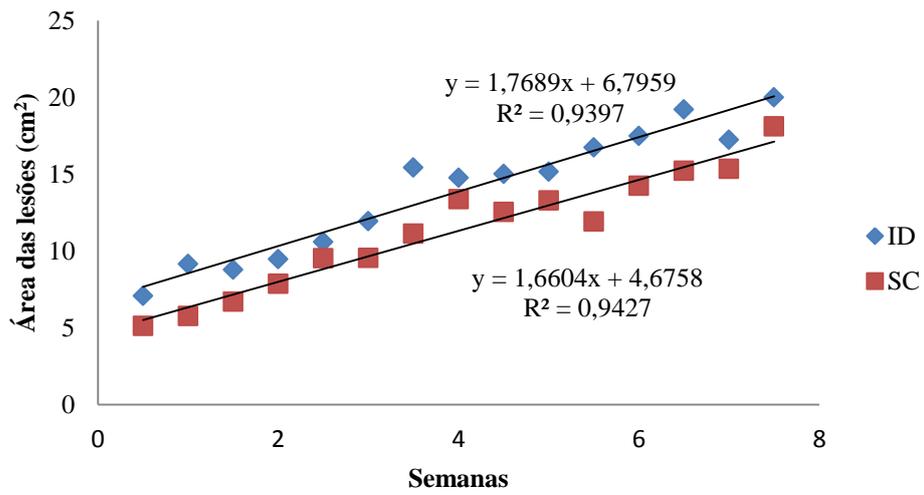


Figura 2- Crescimento médio das lesões subcutâneas em coelhos inoculados com zoósporos de *P. insidiosum* e tratados com antígeno proteico via intradérmica (ID) e subcutânea (SC).

5 DISCUSSÃO

P. insidiosum é um micro-organismo fascinante do ponto de vista da pesquisa, pois ainda existem muitos aspectos a serem abordados pelos pesquisadores dedicados ao estudo da pitiose. No Brasil é uma enfermidade importante do ponto de vista sanitário e econômico às criações de equinos (MORAES et al., 2013; SANTOS et al., 2014). Nos últimos anos houve um aumento no número de pesquisas científicas contribuindo com diversas informações a cerca da pitiose (SANTURIO et al., 2003; KRAJAEJUN et al., 2006; SANTURIO et al., 2006a; PEREIRA et al., 2008; BACH et al., 2010; GAASTA et al., 2010; BOTTON et al., 2011; SANTOS et al., 2011b; AZEVEDO et al., 2012a; AZEVEDO et al., 2012b; TONDOLO et al., 2013; ZANETTE et al., 2013; JESUS et al., 2014). No entanto, vários aspectos ainda necessitam serem elucidados envolvendo as relações hospedeiro-agente-meio ambiente.

O capítulo 1 desta dissertação apresentou a soroprevalência da pitiose equina no estado do RS. Os estudos epidemiológicos envolvendo a ocorrência da doença no Brasil foram pautados em estudos retrospectivos (PIEREZAN et al., 2009; SOUZA et al., 2011, MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012) e análises de casos clínicos diagnosticados em regiões endêmicas (LEAL et al., 2001a; SANTOS et al., 2014).

Marcolongo-Pereira et al. (2012) evidenciaram 14,5% de pitiose em amostras de lesões de pele de equinos da região sul do RS. Pierezan et al. (2009) analisaram retrospectivamente, entre 1968 e 2007, casos de necropsias de equinos na região central do RS, associando 3,58% a pitiose. Em outro estudo, na mesma região, entre 1999 e 2009, a pitiose equina representou 8,3% dos casos de tumores cutâneos diagnosticados em equinos por Souza et al. (2011). No entanto, neste estudo constatou-se uma soroprevalência da pitiose em rebanhos equinos no RS de 11,07%. As mesorregiões soropositivas para a pitiose equina incluíram: sudeste, metropolitana de Porto Alegre, sudoeste e noroeste.

Esta pesquisa foi pautada em um delineamento amostral para a anemia infecciosa equina (AIE). Por este motivo, informações epidemiológicas como a presença de lesões cutâneas nos animais e histórico de tratamento para pitiose não foram coletados. Todavia, este estudo possibilitou a realização da análise sorológica dos anticorpos anti-*P. insidiosum* em um número representativo de animais do rebanho equino nas diferentes mesorregiões do RS.

Além disso, neste trabalho verificou-se uma maior frequência de anticorpos anti-*P. insidiosum* em propriedades com assistência veterinária. Possivelmente esta constatação deve-

se a utilização do tratamento imunoterapêutico, associado ou não à pitiose. A falta de um diagnóstico diferencial a campo pode levar ao uso indiscriminado do imunoterápico nas propriedades. Conseqüentemente, isto pode acarretar o desenvolvimento de anticorpos anti-*P. insidiosum* detectados por testes sorológicos.

Adicionalmente, foi constatada uma diferença significativa entre o sexo dos equinos, na qual as fêmeas apresentaram maior resposta sorológica de anticorpos anti-*P. insidiosum*. Apesar do número de fêmeas ter sido maior, outros trabalhos também constataram que as fêmeas foram mais acometidas pela infecção (LEAL et al., 2001a; MOSBAH et al., 2012; SANTOS et al., 2014).

Nas propriedades com a presença de açudes evidenciou-se a maior ocorrência de equinos soropositivos à pitiose. Sabe-se que o agente causador da pitiose está no meio ambiente, e seu ciclo biológico está intimamente relacionado à presença de água, gramíneas e hospedeiro. Portanto, a presença de anticorpos anti-*P. insidiosum* nestes animais também pode estar associada ao estímulo antigênico oriundo do ambiente (CHAFFIN et al. 1995; MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012; SANTOS et al., 2014).

Observa-se um crescente número de relatos de casos de pitiose em humanos e animais, demonstrando variadas formas de diagnóstico, bem como diferentes alternativas terapêuticas para o controle da enfermidade (SANTURIO et al., 2003; MORAES et al., 2013; PEREIRA et al., 2013). No entanto, ainda, não existe uma ferramenta de diagnóstico rápida e aplicável a campo, bem como um protocolo terapêutico padrão para a maioria das espécies naturalmente infectadas. Até o presente momento, o protocolo terapêutico estabelecido com imunoterapia é para a espécie equina.

As medidas correntes de controle da pitiose fundamentam-se em alternativas terapêuticas, uma vez que não existem medidas imunoproláticas para a prevenção da enfermidade. As alternativas terapêuticas que apresentam relativa eficácia no tratamento da enfermidade incluem: remoção cirúrgica da área afetada, quimioterapia e imunoterapia empregadas associadas ou isoladamente (GAASTRA et al., 2010).

O sucesso no tratamento da pitiose está diretamente relacionado ao diagnóstico e a intervenção terapêutica precoces (BOTTON et al., 2011; SUDJARITRUK et al., 2011; CHAREONSIRISUTHIGUL et al., 2013). Portanto, o desenvolvimento de uma ferramenta de diagnóstico rápida que associe sensibilidade, especificidade e aplicabilidade a campo são desejáveis para o controle da pitiose.

No capítulo 2 avaliou-se a aplicação ID de antígenos proteicos para o diagnóstico e controle da pitiose em modelo experimental.

A via ID utilizada para aplicação de antígenos proteicos como diagnóstico da pitiose em coelhos apresentou como vantagem a rapidez, pois o teste intradérmico foi capaz de detectar reação cutânea 24h após a aplicação ID do antígeno nos coelhos de todos os grupos previamente expostos ao antígeno de *P. insidiosum*. Além disso, a via ID apresentou sensibilidade e especificidade comparáveis ao teste de ELISA indireto, técnica considerada padrão para diagnóstico da enfermidade (SANTURIO et al., 2006a). Miller e Campbell (1982) avaliaram o teste intradérmico para diagnóstico da pitiose em equinos e também apontaram como vantagens do teste ID a rapidez, sensibilidade e reprodutibilidade.

O antígeno proteico de *P. insidiosum* quando utilizado pela via ID no tratamento da pitiose em coelhos apresentou resultados similares quando comparado aos animais em que foi aplicado o antígeno proteico de *P. insidiosum* pela via e dose usual (SC) preconizada no tratamento de coelhos e equinos. Entretanto, observou-se menor reação inflamatória no local da aplicação nos animais tratados pela via ID.

Neste experimento, também foi possível constatar que o antígeno proteico de *P. insidiosum* aplicado via ID foi utilizado em menor dose (concentração e volume). Desta forma, a terapia com antígenos proteicos via ID deve ser avaliada nas espécies naturalmente infectadas, uma vez que este trabalho sugeriu um novo protocolo terapêutico a ser testado, bem como uma avaliação do custo-benefício do tratamento pela via ID.

As informações obtidas neste trabalho possibilitaram responder os objetivos inicialmente propostos contribuindo com os estudos de epidemiologia da pitiose equina, bem como no diagnóstico e no controle da pitiose no modelo experimental. Além disso, gera perspectivas para estudos futuros que envolvam as relações hospedeiro (natural e experimentalmente infectados)-*P. insidiosum*-meio ambiente.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nesta dissertação conclui-se que:

- A soroprevalência indica a presença de anticorpos anti-*P. insidiosum* em equinos no RS, destacando-se a ocorrência nas mesorregiões: sudeste, Porto Alegre, sudoeste e noroeste do estado. Entretanto, há necessidade de novas investigações epidemiológicas, envolvendo especialmente a sorologia e informações relativas à pitiose em números representativos de rebanhos equinos no Brasil.
- O antígeno proteico de *P. insidiosum* aplicado pela via ID é uma alternativa promissora para o diagnóstico e o tratamento da pitiose em modelo experimental. No entanto, é necessário testar o antígeno proteico na via ID tanto para diagnóstico como controle da pitiose em animais naturalmente infectados.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ÁLVAREZ, J. A. C.; VILORIA, M. I. V.; AYOLA, S. C. P. Evaluación clínica e histopatológica de la pitiosis cutánea en burros (*Equus asinus*). **Revista de Medicina Veterinaria**. v. 0, p. 9-19, 2013.

AZEVEDO M. I. et al. *Pythium insidiosum*: morphological and molecular identification of Brazilian isolates. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 32, p. 619–622, 2012a.

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

BACH, B. C. et al. Immunotherapy for pythiosis: Effect on NTPDase activity in lymphocytes of an experimental model. **Biomedicine and Pharmacotherapy**. v. 64, p. 718-722, 2010.

BENTINCK-SMITH, J. et al. Canine pythiosis-isolation and identification of *Pythium insidiosum*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 1, p. 295-298, 1989.

BISSONNETTE, K. W. et al. Nasal and retrobulbar mass in a cat caused by *Pythium insidiosum*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**. v. 29, p. 39–44, 1991.

BOTTON, S. A. et al. Identification of *Pythium insidiosum* by Nested PCR in cutaneous lesions of Brazilian horses and rabbits. **Current Microbiology**. v. 62, p. 1225-1229, 2011.

BROWN, T. A et al. In vitro susceptibility of *Pythium insidiosum* and a *Lagenidium* sp to itraconazole, posaconazole, voriconazole, terbinafine, caspofungin, and mefenoxam. **American Journal of Veterinary Research**. v. 69, p. 1463–1468, 2008.

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

CARMO, P.M.S. et al. Cutaneous Pythiosis in a Goat. **Journal of Comparative Pathology**. n.1-3, p. 2014. No prelo.

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

CHAFFIN, M. K.; SCHUMACHER, J.; HOOPER, N. Multicentric cutaneous pythiosis in a foal. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 201, n. 2, p. 310-312, 1992.

CHAFFIN, M. K.; SCHUMACHER, J.; MCMULLAN, W. J. Cutaneous pythiosis in the horse. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**. v. 11, p. 91–103, 1995.

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

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

DICK, M. W. **Straminipilous Fungi: Systematics of the Peronosporomycetes Including Accounts of the Marine Straminipilous Protist, the Plasmodiophorids and Similar Organisms**. Kluwer Academic Publishers, London, England, p. 67, 2001.

DÓRIA, R. G. S. et al. Treatment of pythiosis in equine limbs using intravenous regional perfusion of amphotericin B. **Veterinary Surgery**. v. 41, p. 759-765, 2012.

DYKSTRA, M. J. et al. A description of cutaneous-subcutaneous pythiosis in fifteen dogs. **Medical Mycology**. v. 37, p. 427-433, 1999.

FISCHER, J. R. et al.. Gastrointestinal pythiosis in Missouri dogs: eleven cases. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 6, p. 380–382, 1994.

FOIL, C. S. O. et al. A report of subcutaneous pythiosis in five dogs and a review of the etiologic agent *Pythium* spp. **Journal of the American Animal Hospital Association**. v. 20, n. 6, p. 959-966, 1984.

FOIL, C. S. O. Update on Pythiosis (Oomycosis). **The North American Veterinary Conference**. p. 57-63, 1996.

GAASTRA, W. et al. *Pythium insidiosum*: an overview. **Veterinary Microbiology**. v. 146, p. 1-16, 2010.

GRECCO, F. B. et al. Pitiose cutânea em bovinos na região sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 29, p. 938-942, 2009.

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

HEATH, J. A. et al. *Pythium insidiosum* pleuropericarditis complicating pneumonia in a child with leukemia. **Clinical Infectious Diseases**. v. 35, p. 60–64, 2002.

HENDRIX, J. W., Sterol induction of reproduction and stimulation of growth of *Pythium* and *Phytophthora*. **Science**. v. 144, p. 1028–1029, 1964.

IBGE. Censo Agropecuário 2006 (Resultados Preliminares). Rio de Janeiro: IBGE, 2007. 142 p.

IMWIDTHAYA, P. Human pythiosis in Thailand. **Postgraduate Medical Journal**. v. 70, p. 558–560, 1994.

JESUS, F. P. et al. *In vitro* synergism observed with azithromycin, clarithromycin, minocycline, or tigecycline in association with antifungal agents against *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 58, n.v9, p. 5621-5625, 2014.

KAUFMAN L., MENDOZA L., STANDARD P. G. Immunodiffusion test for serodiagnosing subcutaneous zygomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**. v.28, p. 1887-1890, 1990.

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

KWON-CHUNG, K. J. Phylogenetic spectrum of fungi that are pathogenic to humans. **Clinical Infectious Disease**. v. 19, S1–7, 1994.

LAOHAPENSANG, K. et al. Vascular pythiosis in a thalassemic patient. **Vascular**. v. 17, p. 234–238, 2009.

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

LEAL, A. T. et al. Pitiose. **Ciência Rural**. v. 31, n. 4, p. 735-743, 2001b.

LUVIZARI, F. H.; LEHMKUHL, R. C.; SANTOS, I.W. PITIOSE EQUINA NO ESTADO DO PARANÁ – Primeiro Relato de Caso. **Archives of Veterinary Science** v. 7, n. 2, p. 99-102, 2002.

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

MARCOLONGO-PEREIRA, C. et al. Doenças de equinos na região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 34, n. 3, p. 205-210, 2014.

MARTINS, T. B. et al. A comparative study of the histopathology and immunohistochemistry of pythiosis in horses, dogs and cattle. **Journal of Comparative Pathology**. v. 146, p. 122-131, 2012.

MENDOZA, L.; ALFARO, A. A. Equine pythiosis in Costa Rica: report of 39 cases. **Mycopathologia**. v. 94, p. 123–129, 1986.

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

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

MENDOZA, L. et al. Serodiagnosis of human and animal pythiosis using an enzyme-linked immunosorbent assay. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. v. 4, p. 715–718, 1997.

MENDOZA, L.; MANDY, W.; GLASS, R. An improved *Pythium insidiosum*-vaccine formulation with enhanced therapeutic properties in immune horses and dogs with pythiosis. **Vaccine**. v. 21, p. 2797–2804, 2003.

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

MENDOZA, L.; VILELA, R. The Mammalian Pathogenic Oomycetes. **Current Fungal Infection Reports**. v. 7, p. 98–208, 2013.

MILLER, R. I. Treatment of equine phycomycosis by immunotherapy and surgery. **Australian Veterinary Journal**. v. 57, p. 377–382, 1981.

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

MILLER, R. I.; CAMPBELL, R. S. F. Haematology of horses with phycomycosis. **Australian Veterinary Journal**. v. 60, p. 28-29, 1983.

MILLER, R. I.; OLCOTT, B.M.; ARCHER, M. Cutaneous pythiosis in beef calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 186, p. 984–986, 1985.

MONTEIRO, A. B. **Imunoterapia da pitiose equina: teste de eficácia de um imunobiológico e avaliação leucocitária em animais infectados naturalmente pelo *Pythium insidiosum***. 1999. 52 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 1999.

MORAES, A. S. et al. **Impactos econômicos, sociais e ambientais de tecnologias da Embrapa Pantanal: 2. Pitium-Vac® - imunoterápico contra pitiose equina**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2013. 37 p. Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/DOC123.pdf>>. Acesso em: 06 jan. 2015.

MOSBAH, E. et al. Diagnosis and surgical management of pythiosis in draft horses: report of 33 cases in Egypt. **Journal of Equine Veterinary Science**. v. 32, p. 164-169, 2012.

PEREIRA, D. I. B. et al. Caspofungin *in vitro* and *in vivo* activity against Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 60, p. 1168-1171, 2007.

PEREIRA, D. I. B. et al. Comparison between the immunotherapeutic and caspofungin as agents to treat experimental pythiosis in rabbits. **Journal de Mycologie Médicale**. v. 18, n. 3, p. 129-133, 2008

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

PÉREZ, R. C. et al. Epizootic cutaneous pythiosis in beef calves. **Veterinary Microbiology**. v. 109, p. 121–128, 2005.

PESSOA, C. R. M. et al. Pythiosis of the digestive tract in sheep. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 24, p. 1133-1136, 2013.

PIEREZAN, F. et al. Achados de necropsia relacionados com a morte de 335 equinos: 1968-2007. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 29, n. 3, p. 275-280, 2009.

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

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

SANAVRIA, A. et al. Pitiose em equinos: Relato de cinco casos no Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v. 22, n. 4, p. 170-172, 2000.

SANTOS, M. N; LONDERO, A. T. Zigomicose subcutânea em cavalos. **Pesquisas Agropecuárias Brasileiras-Série Veterinária**. v. 9, n. 7, p. 7-8, 1974.

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

SANTOS, C. E. P. et al. Does immunotherapy protect equines from reinfection by the oomycete *Pythium insidiosum*? **Clinical and Vaccine Immunology**. v. 18, p. 1397-1399, 2011b.

SANTOS, C. E. P. **A pitiose em equídeos e bovinos no Pantanal Matogrossense**. 2012. 131 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2012.

SANTOS, C. E. P. et al. Epidemiological survey of equine pythiosis in the Brazilian pantanal and nearby areas: results of 76 cases. **Journal of Equine Veterinary Science**. v. 34, p. 270-274, 2014.

SANTURIO, J. M. et al. Three types of immune therapy against pythiosis insidiososi developed and evaluated. **Vaccine**. v. 21, p. 2535–2540, 2003.

SANTURIO, J. M. et al. Teste de ELISA indireto para o diagnóstico sorológico de pitiose. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 26, p. 47-50, 2006a.

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

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

SOUZA, T. M. et al. Prevalência dos tumores cutâneos de equinos diagnosticados no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 31, n. 5, p. 379-382. 2011.

SHENEP, J. L. et al. Successful medical therapy for deeply invasive facial infection due to *Pythium insidiosum* in a child. **Clinical Infectious Disease**. v.27, p. 1388–1393, 1998.

SUDJARITRUK, T., SIRISANTHANA, V. Successful treatment of a child with vascular pythiosis. **BMC Infectious Diseases**. v. 11, n. 33, 2011.

TABOSA, I. M. et al. Pitiose cutânea em equídeos no semi-árido da Paraíba. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 51, p. 27-30, 1999.

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

THORNTON, C. R. & WILLS, O. E. Immunodetection of fungal and oomycete pathogens: Established and emerging threats to human health, animal welfare and global food security. **Critical Reviews in Microbiology**, Ahead of Print. p. 1-25, 2013.

THYTITHANYANOT, A. et al. Use of an immunotherapeutic vaccine to treat a life-threatening human arteritic infection caused by *Pythium insidiosum*. **Clinical Infectious Diseases**. v. 27, n. 6, p. 1394-1400, 1998.

TONDOLO, J. S. et al. A simple, rapid and inexpensive screening method for the identification of *Pythium insidiosum*. **Journal of Microbiological Methods**. v. 93, p. 52-54, 2013.

TROST, M. E. et al. Aspectos clínicos, morfológicos e imuno-histoquímicos da pitiose gastrointestinal canina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 29, p. 673-679, 2009.

VANITTANAKOM, N. et al. Identification of emerging human-pathogenic *Pythium insidiosum* by serological and molecular assay based methods. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, p. 3970–3974, 2004.

ZANETTE, R. A. et al. Insights into the pathophysiology of iron metabolism in *Pythium insidiosum* infections. **Veterinary Microbiology**. v. 162, p. 826-830, 2013.

WANASCHIWANAWIN, W. et al. Efficacy of immunotherapy using antigens of *Pythium insidiosum* in the treatment of vascular pythiosis in humans. **Vaccine**. v. 22, n. 27-28, p. 3613-3621, 2004.

WITKAMP, J. Bijdrage tot de kennis van de Hyphomycosis destruens. **Ned. Ind. Blad voor Diergeneesk. en Dierenteelt**. v. 36, p. 229–245, 1924.

ANEXO 1

(Comprovante de submissão do manscrito 1)

19/01/2015

ScholarOne Manuscripts

 Ciência Rural

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Ciência Rural*.

Manuscript ID: CR-2015-0056

Title: Soroprevalência da pitiose equina no estado do Rio Grande do Sul, Brasil

Authors: Weiblen, Carla
Machado, Gustavo
de Jesus, Francielli
Santurio, Janio
Zanette, Régis
Pereira, Daniela
Diehl, Gustavo
dos Santos, Lucila
Corbellini, Luís
Botton, Sônia

Date Submitted: 19-Jan-2015

 Print  Return to Dashboard