

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

Sabrina Rosa Itaqui

**AVALIAÇÃO DE MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL
E DA SUSCETIBILIDADE DE *Pythium insidiosum* FRENTE A
ANTIMICROBIANOS DE USO TÓPICO E SISTÊMICO**

Santa Maria, RS
2016

Sabrina Rosa Itaquí

**AVALIAÇÃO DE MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL E DA
SUSCETIBILIDADE DE *Pythium insidiosum* FRENTE A ANTIMICROBIANOS DE
USO TÓPICO E SISTÊMICO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Farmacologia**.

Orientador: Prof. Dr. Érico Silva de Loreto

Santa Maria, RS
2016

ESPAÇO RESERVADO PARA FICHA CATALOGRAFICA

Sabrina Rosa Itaquí

**AVALIAÇÃO DE MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL E DA
SUSCETIBILIDADE DE *Pythium insidiosum* FRENTE A ANTIMICROBIANOS DE
USO TÓPICO E SISTÊMICO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Farmacologia**.

Aprovado em 18 de março de 2016:

Érico Silva de Loreto, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Sydney Hartz Alves, Dr. (UFSM)

Régis Adriel Zanette, Dr. (UFRGS)

Santa Maria, RS
2016

Agradecimentos

Ao Professor Érico Silva de Loreto pela oportunidade, orientação, paciência e amizade meu muito obrigada.

Ao Professor Jânio Morais Santurio e o professor Sydney Hartz Alves agradeço a oportunidade de fazer parte do grupo de pesquisas LAPEMI.

Ao meu marido, Leandro, pelo companheirismo, amor e compreensão.

Aos colegas e amigos do LAPEMI em especial, Juliana, Fran, Thaisa, Camila, Pauline...

A todos os demais amigos e familiares que durante este estudo, foram importantes para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

AVALIAÇÃO DE MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL E DA SUSCETIBILIDADE DE *Pythium insidiosum* FRENTE A ANTIMICROBIANOS DE USO TÓPICO E SISTÊMICO

AUTORA: Sabrina Rosa Itaquí
ORIENTADOR: Érico Silva de Loreto

A pitiose é uma infecção causada pelo oomiceto *Pythium insidiosum* que carece de estudos voltados para a sua rápida identificação e para a determinação de uma terapia antimicrobiana eficaz. Neste contexto, esta dissertação teve como objetivos a) avaliar as propriedades antimicrobianas *in vitro* dos antimicrobianos tópicos benzalcônio, cetrimida, cetilpiridínio, mupirocina e triclosan contra *P. insidiosum*, bem como o potencial de sinergismo destes compostos com azitromicina ou terbinafina e; b) determinar o potencial de identificação presuntiva das culturas de *P. insidiosum* baseado na inibição miceliana causada por discos contendo antibacterianos reconhecidos por suas propriedades antimicrobianas contra *P. insidiosum*. Através de testes de suscetibilidade realizados de acordo com o protocolo M38-A2 do CLSI, com inóculo constituído de zoósporos de *P. insidiosum*, observou-se que os todos os antimicrobianos tópicos, com exceção do permanganato de potássio (CIM > 64 µg/mL), inibiram o crescimento *in vitro* dos isolados clínicos de *P. insidiosum* em concentrações variando de 0,5 a 32 µg/mL. A maioria das interações observadas através da técnica de *checkerboard* foi indiferente quando a terbinafina (60% de interações indiferentes) ou azitromicina (80% de interações indiferentes) foram associadas com os antimicrobianos tópicos. Apenas a combinação cetilpiridínio + terbinafina obteve interações sinérgicas relevantes (71,4%). A avaliação da identificação presuntiva de *P. insidiosum* com antibacterianos utilizou cultivos de *P. insidiosum* nos ágar Sabouraud dextrose e Muller Hinton na presença de discos contendo antibacterianos dispostos a 1,5 cm de distância do crescimento miceliano. Estes testes demonstraram que a identificação presuntiva de *P. insidiosum* é dependente do meio de cultura utilizado. No ágar Sabouraud dextrose os antimicrobianos azitromicina e claritromicina permitiram a identificação de 100% dos isolados, o mesmo observado para o uso da mupirocina no ágar Muller Hinton. A minociclina foi o único antibacteriano que permitiu a identificação de 100% dos isolados em ambos os meios de cultura avaliados. Os resultados descritos nesta dissertação sugerem novas opções terapêuticas tópicas e novas abordagens diagnósticas que podem suportar futuros trabalhos *in vitro* e *in vivo* utilizando um número maior e diverso de isolados clínicos de *P. insidiosum*.

Palavras-chave: Pitiose, suscetibilidade, tratamento tópico, identificação laboratorial

ABSTRACT

EVALUATION OF DIAGNOSTIC DIFFERENTIAL AND SUSCEPTIBILITY *Pythium insidiosum* FRONT USE OF ANTIMICROBIAL TOPICAL AND SYSTEMIC

AUTORA: Sabrina Rosa Itaquí
ORIENTADOR: Érico Silva de Loreto

Pythiosis is an infection caused by the oomycete *Pythium insidiosum* that lacks studies aimed at their rapid identification and determination of effective antimicrobial therapy. In this context, this work aimed a) to evaluate the *in vitro* antimicrobial properties of the topical antimicrobials benzalkonium, cetrimide, cetylpyridinium, mupirocin and triclosan against *P. insidiosum* and the potential synergism of these compounds with azithromycin or terbinafine and; b) to determine the potential of the presumptive identification of *P. insidiosum* cultures based on mycelial inhibition caused by disks containing antibacterial drugs recognized for its antimicrobial properties against *P. insidiosum*. Through the susceptibility tests performed according to the M38-A2 protocol from CLSI with inoculum consisting of zoospores of *P. insidiosum*, it was observed that all topical antimicrobials, except potassium permanganate (MIC > 64 µg/mL) inhibited the *in vitro* growth of clinical isolates of *P. insidiosum* in concentrations ranging from 0.5 to 32 µg/mL. Most interactions observed through the checkerboard technique were indifferent when terbinafine (60% indifferent interactions) or azithromycin (80% indifferent interactions) were associated with topical antimicrobials. Only the combination cetylpyridinium + terbinafine resulted in relevant synergistic interactions (71.4%). The evaluation of the presumptive identification of *P. insidiosum* with antibacterial drugs used cultures *P. insidiosum* in Sabouraud dextrose agars and Muller Hinton in the presence of disks containing antibacterial placed at 1.5 cm away from the mycelial growth. These tests showed that the presumptive identification of *P. insidiosum* is dependent on the culture media used. On Sabouraud dextrose agar, azithromycin and clarithromycin allowed the identification of 100% of the isolates, and the same was observed for the use of mupirocin in Muller Hinton agar. The minocycline was the only antibacterial agent that allowed the identification of 100% of the strains in both culture media. The results described in this work suggest new topical therapies and new diagnostic approaches that can support future *in vitro* and *in vivo* works using a larger and diverse number of clinical isolates of *P. insidiosum*.

Palavras-chave: Pythiosis, susceptibility, topical treatment, laboratory identification

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Artigo 1

Figure 1 *Pythium insidiosum* growth on Sabouraud dextrose agar after 72 at 35°C.
Left, control plate; right, a 5 µg mupirocin disk affects the growth of *P. insidiosum*.....44

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Table 1 *In vitro* activities of azithromycin and terbinafine, alone or in combination with select topical antimicrobial drugs, against 21 *Pythium insidiosum* isolates..... 32

Artigo 2

Table 1. *Pythium insidiosum* (n=24) hyphal growth inhibition in the presence of antibacterial drugs.....43

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| APRESENTAÇÃO | 11 |
| 1 INTRODUÇÃO | 12 |
| 2 OBJETIVOS | 13 |
| 2.1 Objetivo geral | 13 |
| 2.2. Objetivos específicos | 13 |
| 3 REFERENCIAL TEÓRICO | 14 |
| 3.1 Epidemiologia..... | 14 |
| 3.2 Manifestações clínicas | 15 |
| 3.3 Métodos diagnósticos | 17 |
| 3.4 Tratamento e suscetibilidade aos antimicrobianos | 19 |
| 4 ARTIGOS CIENTÍFICOS..... | 21 |
| 4.1 ARTIGO 1 - <i>In vitro</i> synergism between azithromycin or terbinafine and topic antimicrobial agents against <i>Pythium insidiosum</i> | 22 |
| 4.2 ARTIGO 2 - Efficacy of presumptive identification of <i>Pythium insidiosum</i> by a modified disk diffusion method with antibacterial drugs | 33 |
| 5 DISCUSSÃO | 45 |
| 6 CONCLUSÃO | 47 |
| 7 REFERÊNCIAS..... | 48 |

APRESENTAÇÃO

O desenvolvimento desta dissertação foi realizado de acordo com as normas do *Manual de Dissertações e teses da UFSM* publicado em 2015 e está organizado para uma apresentação de *artigos científicos integrados*.

Quanto à estrutura do trabalho, dividiu-se o texto nas seções **Introdução, Objetivos, Referencial teórico, Artigos Científicos, Discussão, Conclusão e Referências Bibliográficas**.

Os referenciais teóricos dos manuscritos estão listados nas respectivas seções dos artigos e não foram duplicados na lista de referências final do trabalho.

1 INTRODUÇÃO

As alterações da epidemiologia das infecções fúngicas nas últimas décadas mostram notáveis alterações com relação as espécies associadas como agentes de micose. Espécimes de *Aspegillus não-fumigatus*, *Candida não-albicans*, *Fusarium*, mucormicetos e agentes de feohifomicoses destacam-se atualmente como infecções oportunistas emergentes e muitas vezes associadas com altas taxas de mortalidade, dependendo da população de pacientes acometida (Idemyor, 2003; Sifuentes-Osornio *et al.*, 2012). *Pythium insidiosum* é o agente da pitiose e, embora não seja classificado como um fungo destaca-se na micologia por apresentar similaridades fisiológicas e morfológicas com fungos verdadeiros e por causar uma série de manifestações clínicas severas (Gaastra *et al.*, 2010).

O tratamento da pitiose continua a ser um desafio porque este microrganismo produz hifas hialinas semelhantes aos dos verdadeiros fungos, mas é incapaz de sintetizar ergosterol, que é o alvo principal direta ou indiretamente da maioria dos fármacos antifúngicos. Consequentemente, não há protocolos de tratamento definitivo para esta doença (Gaastra *et al.*, 2010; Mendoza e Vilela, 2013). O manejo clínico eficaz mais comumente usado na pitiose é a ressecção cirúrgica agressiva, como a amputação ou o desbridamento cirúrgico de lesões cutâneas. Infelizmente, as intervenções cirúrgicas nem sempre são possíveis, e podem-se observar grandes índices de recorrência. Além disso, a quimioterapia com agentes antimicrobianos e imunoterapia foram usadas com sucesso em alguns casos (Gaastra *et al.*, 2010; Mendoza e Vilela, 2013). Independentemente da utilização de terapias antimicrobianas isoladas ou em combinação, as melhores taxas de cura estão associadas com o diagnóstico rápido e tratamento precoce. No entanto, pouca atenção tem sido dada para o tratamento tópico de lesões cutâneas específicas de pitiose, o que é preocupante pois os tratamentos tópicos com antimicrobianos convencionais foram considerados ineficazes para pitiose ocular e subcutânea (Krajaejun *et al.*, 2006; Gaastra *et al.*, 2010).

Neste contexto, o presente trabalho avaliou: a) o uso da técnica de disco difusão utilizando discos de antibacterianos reconhecidos por inibir o crescimento miceliano de *P. insidiosum* com o objetivo de desenvolver teste auxiliar para a identificação laboratorial desta espécie; b) a atividade *in vitro* dos antimicrobianos tópicos benzalcônio, cetrimida, cetilpiridínio, mupirocina, permanganato de potássio e triclosan contra *P. insidiosum*, bem como sua associação com azitromicina ou terbinafina.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial de antibacterianos como ferramenta diagnóstica e terapêutica tópica da pitiose.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o perfil de suscetibilidade *in vitro* de *Pythium insidiosum* frente aos antimicrobianos tópicos benzalcônio, cetrimida, cetilpiridínio, mupirocina, permanganato de potássio e triclosan;

- Avaliar a interação *in vitro* destes antimicrobianos tópicos com a azitromicina ou terbinafina através da determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionária;

- Investigar o uso de antibacterianos, reconhecidos pela inibição da síntese proteica bacteriana, em técnica de disco difusão modificada para a identificação presuntiva de *Pythium insidiosum*;

- Determinar o(s) antibacteriano(s) com melhor acurácia para a identificação presuntiva de *Pythium insidiosum* através da disco difusão;

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 EPIDEMIOLOGIA

P. insidiosum foi relatado pela primeira vez há mais de cem anos, em equinos da Indonésia, mas o isolamento deste organismo filamentosos em cultura pura só ocorreu em 1901 por Haan & Hoogkamer, como descrito e revisado por De Cock *et al.* (1987) e Gaastra *et al.* (2010). Haan & Hoogkamer isolaram este microrganismo a partir de granulomas subcutâneos em equinos, denominando a doença de “hyphomycoses destruens”, porém não conseguiram classificar o agente. Apenas em 1961 o agente foi identificado, e o nome *Hyphomyces destruens* foi introduzido (Mendoza *et al.*, 1996). A constatação de que uma cepa da Nova Guiné (Austwick e Copland, 1974) desenvolveu zoósporos biflagelados sugeriu que este patógeno era um organismo que poderia ser classificado como um fungo da família Pythiaceae, ordem Peronosporales, e que deveria ser incluído no gênero *Pythium*. Entretanto, a denominação *Hyphomyces destruens* continuou sendo utilizada nas descrições da doença (Mcmullan *et al.*, 1977; Murray *et al.*, 1978). De Cock *et al.* (1987) introduziu o binômio *P. insidiosum*, colocando este patógeno dentro do reino protista Stramenopila, classe Ascomycota, ordem Pythiales e família Pythiaceae. O gênero *Pythium* apresenta mais de 200 espécies, sendo a maioria habitante do solo e patógenos de plantas (Alexopoulos *et al.*, 1996; Kamoun *et al.*, 2015).

Os estudos de relação filogenética, comparando sequências de ácidos nucleicos da subunidade do RNA ribossomal (rRNA), constataram que os microrganismos do filo Oomycota encontravam-se filogeneticamente afastados dos membros do Reino Fungi e mais proximamente relacionados às algas (Kwonchung, 1994). Diferentemente dos fungos verdadeiros, os oomicetos caracterizam-se por: a) apresentar reprodução assexuada com produção de zoósporos biflagelados; b) reprodução sexuada oogâmica com formação de oósporos; c) parede celular constituída por glucanas, celulose e aminoácido hidroxiprolina; d) talo diploide; e) mitocôndria com crista tubular e características moleculares e bioquímicas próprias, como uma rota alternativa para síntese de lisina (Alexopoulos *et al.*, 1996). Dentre essas particularidades dos oomicetos, a composição da parede celular é a característica mais comumente utilizada na diferenciação desses microrganismos, uma vez que é composta predominantemente de β (1,3) e β (1,6) glucanas e celulose em vez de quitina, como é o caso dos fungos. Notáveis diferenças são também observadas quanto à presença do ergosterol na membrana citoplasmática, o qual está ausente nos microrganismos incluídos no filo Oomycota, e em vários aspectos do metabolismo dos esteróis. Na verdade, os oomicetos

constituem-se de dois grupos básicos de microrganismos: aqueles que são capazes de sintetizar esteróis a partir do mevalonato e aqueles que não podem sintetizar esteróis, como é o caso da maioria das espécies patogênicas para plantas, incluindo *P. insidiosum* (Alexopoulos *et al.*, 1996).

As infecções causadas por *P. insidiosum* foram registradas em áreas tropicais, subtropicais e algumas temperadas do mundo. Nas Américas, a maior incidência da pitiose ocorre nas zonas tropicais da América Central, Norte e América do Sul, com a maioria dos casos relatados no Brasil, Colômbia, Costa Rica, Estados Unidos e Venezuela (De Cock *et al.*, 1987; Mendoza *et al.*, 1993; Gaastra *et al.*, 2010). Na Ásia, a pitiose foi relatada no Japão, Índia, Indonésia, ilhas do Pacífico, Coreia do Sul e Tailândia e também em áreas, como Austrália, Nova Guiné e Nova Zelândia. Embora a África Tropical possa ser considerada um ambiente ideal para pitiose, apenas um caso em um cão com a forma cutânea foi relatado no noroeste de Mali (Rivierre *et al.*, 2005).

As infecções causadas por *P. insidiosum* eram pouco conhecidas. Acreditava-se que a infecção era restrita apenas a animais presentes em regiões tropicais, com poucos casos relatados em outras áreas geográficas. Interessante notar que, nos últimos anos, o número de casos de pitiose aumentou em todos os continentes. A constatação de que os seres humanos (Sathapatayavongs *et al.*, 1989; Thianprasit *et al.*, 1996; Vanittanakom *et al.*, 2004; Wanachiwanawin *et al.*, 2004; Krajaejun *et al.*, 2006), cães (Thomas e Lewis, 1998; Grooters *et al.*, 2002; Oldenhoff *et al.*, 2014; Dycus *et al.*, 2015) e outros animais podem ser infectados indica que anteriormente a pitiose possa ter sido erroneamente diagnosticada como uma infecção fúngica. A maioria dos casos de pitiose ocorre em seres humanos e animais aparentemente saudáveis. Na Tailândia, no entanto, a doença no ser humano está associada com a talassemia ou outras desordens sanguíneas semelhantes (Sathapatayavongs *et al.*, 1989).

3.2 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A pitiose é adquirida depois que propágulos de *P. insidiosum* (zoósporos) presentes em ambientes aquáticos penetram na pele com algum grau de lesão ou através do trato intestinal pela ingestão do microrganismo (Mendoza *et al.*, 1993; Thomas e Lewis, 1998). Supabandhu *et al.* (2008) cultivaram e identificaram *P. insidiosum* a partir de amostras ambientais, o que confirmou a presença desse oomiceto em ambientes agrícolas úmidos na Tailândia. A transmissão de *P. insidiosum* de um indivíduo para outro (humana ou animal) não foi registrada. Até o momento somente coelhos parecem ser naturalmente suscetíveis à inoculação experimental (Miller e Campbell, 1983; Santurio *et al.*, 2003). No entanto, estudos

recentes com *Drosophila* constatam que novos modelos experimentais podem ser desenvolvidos em organismos diferentes (Zanette *et al.*, 2013).

As manifestações clínicas da pitiose variam de acordo com o local de infecção. As lesões provocadas por *P. insidiosum* no ser humano podem ser classificadas em infecções superficiais (ceratite); formas cutâneas e subcutâneas, incluindo pitiose orbital; e formas vasculares que podem evoluir para uma forma de infecção sistêmica, a qual é fatal. A ceratite causada por *P. insidiosum* é semelhante à causada por fungos e outros agentes etiológicos (Virgile *et al.*, 1993; Murdoch e Parr, 1997; Badenoch *et al.*, 2001). Inicia com trauma nas camadas superficiais do olho, seguido pelo desenvolvimento de conjuntivite, fotofobia e úlceras na córnea. A infecção cutânea e subcutânea é caracterizada pela formação de placas ulceradas e/ou granulomas que permanecem localizados. Uma vez que o patógeno atinge os tecidos subcutâneos, pápulas pruriginosas podem se desenvolver. A forma orbitária de pitiose subcutânea é rara e tem sido observada principalmente em crianças na Austrália e nos Estados Unidos (Triscott *et al.*, 1993; Mendoza e Vilela, 2013). A pitiose vascular começa com uma lesão traumática, geralmente nos membros inferiores, seguido de disseminação do patógeno para as artérias próximas (Mendoza *et al.*, 1992; Murdoch e Parr, 1997; Laohapensang *et al.*, 2009). Inicialmente, a pele infectada mostra sinais de gangrena seca, e a formação de úlceras necróticas dolorosas em alguns pacientes também tem sido relatada (Thianprasit *et al.*, 1996). Os sintomas clínicos são claudicação do membro afetado, isquemia local, inchaço, dor, e a ausência do pulso dorsal do pé. À medida que a infecção progride, uma arterite ascendente, com a formação de trombos e aneurismas das grandes artérias, é a principal característica. Se não for tratada, o microrganismo pode se espalhar através das artérias, causando pitiose disseminada. Esta forma de pitiose é mais comum na Tailândia entre os pacientes com talassemia, e é geralmente fatal (Thianprasit *et al.*, 1996; Vanittanakom *et al.*, 2004; Wanachiwanawin *et al.*, 2004).

Nos animais a pitiose apresenta-se produzindo lesões ulcerativas e piogranulomatosas ou profundas, com uma frequência destacada em equinos (Poole e Brashier, 2003; Dos Santos *et al.*, 2011; Dos Santos *et al.*, 2014). A pitiose também é reportada em outros animais, com apresentações clínicas normalmente envolvendo lesões subcutâneas ou infecções gastrintestinais em cães (Dykstra *et al.*, 1999; Berryessa *et al.*, 2008; Oldenhoff *et al.*, 2014), bovinos (Santurio *et al.*, 1998; Gabriel *et al.*, 2008; Grecco *et al.*, 2009), felinos (Rakich *et al.*, 2005), ovinos (Santurio *et al.*, 2008; Pessoa *et al.*, 2012; Carrera *et al.*, 2013; Bernardo *et al.*, 2015) e ocasionalmente em animais mantidos em zoológicos (Camus *et al.*, 2004; Wellehan *et al.*, 2004; Videla *et al.*, 2012).

As lesões nos equinos normalmente apresentam-se granulomatosas, muco sanguinolentas e ulcerativas; aparência tumoral e formação de grandes massas teciduais geralmente nas extremidades distais dos membros, porção ventral e face. Associa-se a maior incidência das lesões nestas áreas anatômicas, pois são as áreas de maior contato com as águas contaminadas com o microrganismo. O comprometimento gastrointestinal nos cães e gatos está associado com a ingestão de água contendo zoósporos e normalmente manifesta-se com distúrbios digestivos (anorexia, diarreia, vômito). Em bovinos, lesões cutâneas granulomatosas são observadas nas extremidades distais dos membros (Santurio *et al.*, 1998) e em ovinos, rinite granulomatosa é uma das principais manifestações clínicas (Santurio *et al.*, 2008; Carrera *et al.*, 2013; Bernardo *et al.*, 2015).

3.3 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

Os espécimes clínicos necessários para o diagnóstico de pitiose variam de acordo com o hospedeiro e a forma clínica (Thianprasit *et al.*, 1996; Gaastra *et al.*, 2010). Uma pequena porção das amostras de tecido utilizada para a microscopia também pode ser empregada para inocular placas de ágar Sabouraud dextrose. As amostras têm de ser inoculadas no ágar e incubadas a 37 °C durante 24 a 48 horas. Amostras de biópsia ou necropsia são normalmente recolhidos em água destilada estéril ou salina e transportados à temperatura ambiente para o laboratório, pois há relatos de redução considerável no número de culturas positivas a partir de amostras armazenadas a 4 °C (Mendoza *et al.*, 1993).

As amostras clínicas de *P. insidiosum* em 10% KOH caracteristicamente mostram a presença de estruturas sob forma de hifas hialinas esparsamente septadas com comprimento (4,0 a 9,0 µm de diâmetro). Algumas hifas podem chegar a mais de 15 microns com ramificações laterais em um ângulo de 90°, uma característica típica deste oomiceto.

Em preparações histopatológicas coradas com H & E, *P. insidiosum* aparece como hifas hialinas cenocíticas (sem septos) curtas ou longas, podendo variar de 6 a 10 µm de diâmetro. No entanto, características histopatológicas similares podem ser observadas por fungos membros da ordem Entomophthorales (*Basidiobolus* e *Conidiobolus*). Em tecidos infectados o *P. insidiosum* desencadeia granuloma eosinofílico com células gigantes, mastócitos e outras células inflamatórias. Os elementos de hifas de *P. insidiosum* são encontrados no centro de microabcessos com numerosos eosinófilos que geralmente degranulam ao longo das hifas (fenômeno de Splendore-Hoeppli). A ativação de uma resposta inflamatória eosinofílica com o fenômeno de Splendore-Hoeppli também é uma característica em comum com a ordem das Entomophthorales, a partir do qual deve ser diferenciada

(Mendoza *et al.*, 1993; Gaastra *et al.*, 2010). As hifas de *P. insidiosum* são bem coradas por metodologias histopatológicas que utilizam a prata (com o GMS) e aparecem como estruturas tubulares escuras, curtas ou longas e septadas esparsamente. Hifas seccionadas transversalmente, mal coradas (com GMS) também podem ser encontradas como corpos em forma de anel.

Os ensaios de imuno-histológicos mais importantes para a identificação específica dos elementos de hifas de *P. insidiosum* em tecidos infectados têm sido a peroxidase e os testes de imunofluorescência (Brown *et al.*, 1988). Uma vez que as estruturas das hifas de *P. insidiosum* são difíceis de diferenciar dos fungos, especialmente dos mucorales, estes ensaios têm sido de fundamental importância para a identificação precisa deste oomiceto na falta de cultura (Martins *et al.*, 2012).

Os meios de cultura mais comuns utilizados para o isolamento de *P. insidiosum* são o ágar Sabouraud dextrose 2%, ágar sangue, ágar fubá e ágar batata. Biópsia ou tecidos de necrópsia e “kunkers” (massas duras pedregosas encontradas em equinos com pitiose) são normalmente os materiais de escolha para a cultura. Os pequenos fragmentos são semeados no ágar e as placas são incubadas a 37 ° C durante 24 a 48 horas ou mais. As amostras que foram transportadas durante mais de 24 h também podem ser inoculadas em tubos contendo caldo e, em seguida, incubadas a 37 ° C. Normalmente, as colônias das amostras clínicas são detectáveis após 24 a 48 h de incubação (Gaastra *et al.*, 2010). Em meio sólido, *P. insidiosum* desenvolve hifas septadas esparsas.

As colônias brancas apresentam-se submersas com um padrão radiado característico e poucas ou nenhuma hifas aéreas, muito semelhantes ao crescimento de outros oomicetos. As hifas têm ramos laterais perpendiculares que medem 4 a 10 µm de diâmetro e possuem poucos septos. A zoosporogênese só é possível em culturas que contenha água com diversos íons, como o Ca^{2+} (De Cock *et al.*, 1987; Chaiprasert *et al.*, 1990; Mendoza *et al.*, 1993) e é uma das formas de caracterizar laboratorialmente a suspeita de pitiose.

Os primeiros testes sorológicos mostraram que anticorpos anti-*P. insidiosum* poderiam ser detectados nos soros de hospedeiros infectados e, assim, uma forma de diagnóstico de pitiose. Os ensaios mais comuns para pitiose são aglutinação, ensaio de imunoabsorção ligado a enzima (ELISA), imunodifusão e Western Blotting. A imunodifusão tem provado ser um teste muito específico, com várias bandas de precipitação, mas é insensível e produz muitos falsos negativos, especialmente quando realizado com soros de seres humanos e cães com pitiose (Mendoza *et al.*, 1992; Grooters *et al.*, 2002; Krajaejun *et al.*, 2002; Vanittanakom *et al.*, 2004). Testes de imunocromatografia recentemente foram descritos como método de

diagnóstico sorológico rápido da pitiose (Higashi *et al.*, 2012; Chareonsirisuthigul *et al.*, 2013).

A primeira abordagem molecular para o diagnóstico de *P. insidiosum* a partir de espécimes clínicos foi realizado em um paciente com ceratite (Badenoch *et al.*, 2001). Os elementos das hifas presentes na amostra foram identificados por sequenciamento utilizando parte da região de DNA ribossomal 18S. Esta abordagem tem sido bem-sucedida em espécimes clínicos (Badenoch *et al.*, 2001; Vanittanakom *et al.*, 2004). Grooters e Gee (2002) descreveram uma técnica de PCR para a identificação de *P. insidiosum* de culturas e a partir de amostras clínicas enquanto outros ensaios moleculares têm sido sugeridos, mas eles têm disponibilidade limitada.

3.4 TRATAMENTO E SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Pythium insidiosum, como os outros oomicetos, não possui ergosterol em sua membrana citoplasmática. Apesar deste contrassenso óbvio, a anfotericina B e outros fármacos antifúngicos que têm como alvo o ergosterol têm sido utilizados com resultados variáveis (Sathapatayavongs *et al.*, 1989; Triscott *et al.*, 1993; Shenep *et al.*, 1998; Mendoza *et al.*, 2004; Wanachiwanawin *et al.*, 2004; Krajaejun *et al.*, 2006).

Nos seres humanos, a remoção cirúrgica das lesões, a amputação dos membros afetados ou a enucleação do olho afetado representam a última opção terapêutica de tratamento. No entanto, taxas de recorrências de até 40% já foram descritas, o que demonstra o desafio terapêutico desta doença. Em animais, a remoção cirúrgica das lesões está associada com bons resultados terapêuticos em lesões pequenas e superficiais. A associação de remoção cirúrgica com fármacos antifúngicos ou iodeto de potássio foi descrito em alguns casos de cura clínica (Mendoza, 2009; Mendoza e Vilela, 2009).

Os resultados inconsistentes com a maioria dos fármacos antifúngicos para o tratamento de pitiose levaram à utilização de tratamentos não convencionais, tais como a imunoterapia (Wanachiwanawin *et al.*, 2004). A imunoterapia foi desenvolvida a partir de extratos proteicos obtidos de culturas de *P. insidiosum* e representa uma opção não invasiva na terapia da pitiose em animais e humanos. Em humanos já foram descritas taxas de cura de até 55% e em equinos, respostas favoráveis já foram observadas em mais de 70% dos casos, sendo que os melhores resultados foram observados quando a doença encontrava-se nos estágios iniciais (Mendoza e Newton, 2005; Gaastra *et al.*, 2010). O sucesso da imunoterapia está associada com uma mudança da resposta celular. A resposta imunológica na pitiose

envolve uma expressão de linfócitos T auxiliares tipo 2 (Th2) e inflamação eosinofílica enquanto que a imunoterapia induz uma resposta Th1, produção de interleucina 2 e interferon- γ , com mobilização de linfócitos T e macrófagos que destroem as células de *P. insidiosum* (Mendoza e Newton, 2005).

In vitro, os isolados de *P. insidiosum* apresentam perfil de suscetibilidade variável aos antifúngicos (Brown *et al.*, 1988; Brown *et al.*, 2008; Cavalheiro *et al.*, 2009a; Cavalheiro *et al.*, 2009b). Na maioria destes estudos a terbinafina representa, sozinha ou associada com outros antifúngicos, um dos antifúngicos mais promissores (Cavalheiro *et al.*, 2009a; Cavalheiro *et al.*, 2009b), reduzindo o crescimento *in vitro* de *P. insidiosum*. Nos últimos anos, alguns fármacos antibacterianos que agem sobre a inibição da síntese proteica bacteriana tais como aqueles dos grupos dos macrolídeos, tetraciclina e gliciliclinas, tem demonstrado inibir o crescimento *in vitro* de *P. insidiosum* sozinhos (Loreto *et al.*, 2011; Mahl *et al.*, 2012; Loreto *et al.*, 2014) ou associados com fármacos antifúngicos (Jesus *et al.*, 2014). *In vivo*, a azitromicina sozinha ou associada com minociclina demonstrou eficácia curativa contra a pitiose subcutânea em modelo de pitiose experimental utilizando coelhos (Jesus *et al.*, 2015).

4 ARTIGOS CIENTÍFICOS

4.1 ARTIGO 1 - *IN VITRO* SYNERGISM BETWEEN AZITHROMYCIN OR
TERBINAFINE AND TOPIC ANTIMICROBIAL AGENTS AGAINST *PYTHIUM*
INSIDIOSUM

Title: *In vitro* synergism between azithromycin or terbinafine and topic antimicrobial agents against *Pythium insidiosum*

Authors: Sabrina R. Itaquí¹, Camila M. Verdi¹, Juliana S. M. Tondolo¹, Thaisa S. da Luz¹, Sydney H. Alves², Janio M. Santurio¹, Érico S. Loreto^{1*}

Affiliation:

¹Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS, Brazil.

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS, Brazil

Running title: *In vitro* synergism between azithromycin or terbinafine

Keywords: pythiosis; susceptibility testing; topical treatment

Address for correspondence:

Érico S. Loreto

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Av. Roraima nº 1000, Prédio 20, sala 4139, Santa Maria - CEP 97105-900, RS, Brazil. Tel./fax: +55 55 3220-8906. e-mail: erico.loreto@gmail.com

Abstract

We describe the *in vitro* activity for the combination of azithromycin or terbinafine and benzalkonium, cetrimide, cetylpyridinium, mupirocin, triclosan or potassium permanganate. With the exception of potassium permanganate, the remaining antimicrobial drugs were active and had MICs between 2 and 32 µg/ml. The greatest synergism was observed for the combination of terbinafine and cetrimide (71.4%). *In vivo* experimental evaluations will clarify the potential of these drugs for topical treatment of lesions caused by *P. insidiosum*.

Keywords: pythiosis; susceptibility testing; topical treatment

Pythium insidiosum is the main oomycete pathogen associated with severe diseases in humans and other animals, particularly horses and dogs. In humans, clinical presentations include ocular, cutaneous/subcutaneous, vascular and disseminated pythiosis. While underlying diseases like thalassemia and hemoglobinopathy syndrome were observed in cutaneous, vascular and disseminated forms of disease, the ocular pythiosis can affect otherwise healthy individuals. Also, no underlying diseases were observed in subcutaneous pythiosis in animals, for which most cases are associated with pyogranulomatous disease in subcutaneous tissue or a gastrointestinal form (1, 2).

Treating pythiosis remains a challenge because this microorganism produces hyaline hyphae similar to those of true fungi but is unable to synthesize ergosterol, which is the direct or indirect main target of most antifungal drugs. Consequently, there are no definitive treatment protocols for this disease (2-4). The most commonly used effective clinical management of pythiosis is aggressive surgical resection, such as amputation, and surgical debridement of skin lesions. Unfortunately, surgical interventions are not always possible, and a high rate of recurrence can be observed. Additionally, chemotherapy with antimicrobial agents and immunotherapy were used successfully in some cases (2, 3). Independently of the use of single or combination therapies, the best cure rates are associated with rapid diagnosis and early treatment. Regardless of the therapy choice, little attention has been given to the specific topical treatment of pythiosis cutaneous lesions, and topical conventional antimicrobial treatments were considered ineffective for ocular and subcutaneous pythiosis (1, 2).

Considering the high tissue concentrations achieved by azithromycin and terbinafine and the above context, this study aimed to assess the *in vitro* activity for combinations of azithromycin or terbinafine (systemic therapeutic options) and benzalkonium, cetrimide, cetylpyridinium, mupirocin, triclosan or potassium permanganate (topical therapeutic option).

We evaluated the susceptibility of twenty isolates of *P. insidiosum* from equine pythiosis cases and the ATCC 58637 reference strain. Clinical isolates were previously identified by a nested

PCR assay (5). The drugs (final concentrations tested in the wells) azithromycin (32 - 0.06 µg/ml), benzalkonium chloride (32 - 0.25 µg/ml), alkyltrimethylammonium bromide (cetrimide) (32 - 0.5 µg/ml), cetylpyridinium chloride (64 - 1 µg/ml), mupirocin (32 - 0.5 µg/ml), potassium permanganate (64 - 1 µg/ml), terbinafine hydrochloride (64 - 1 µg/ml) and triclosan (8 - 0.125 µg/ml) were purchased as standard powders from Sigma-Aldrich® (St. Louis, USA). The broth microdilution susceptibility tests were performed following the CLSI M38-A2 protocol (6) as previously described (7, 8). The minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined by visual observation and represented the inhibition of 100% of mycelium growth after 48 h of incubation at 37°C.

The interactions between azithromycin or terbinafine with benzalkonium, cetrimide, cetylpyridinium, mupirocin, potassium permanganate and triclosan were evaluated using a checkerboard test (9). The lowest fractional inhibitory concentration index (FICI) was determined from the non-turbid wells along with the turbidity/non-turbidity growth interface after 48 h of incubation at 37°C and interpreted as follows: $FICI \leq 0.5$, synergism; $FICI > 0.05$ to ≤ 4 , indifference; $FICI > 4$, antagonism.

Table 1 summarizes the *in vitro* susceptibility of the 21 *P. insidiosum* isolates determined using broth microdilution, MICs and FICIs determined by the checkerboard combination test. The growth of *P. insidiosum* isolates was not inhibited by potassium permanganate alone (MIC >64 µg/ml). MIC (geometric mean in µg/ml) values ranged from 2 to 16 (4.68) for azithromycin and 4 to 32 (14.56) µg/ml for terbinafine. Topical antimicrobial drug MICs ranged from 0.5 to 2 (1.25) for triclosan, 1 to 8 (2.49) for mupirocin, 2 to 8 (3.53) for cetylpyridinium, 4 to 8 (5.31) for benzalkonium and 4 to 16 (7.75) for cetrimide.

The combination of antimicrobial drugs showed a predominance of indifferent interactions (> 80%) when azithromycin was associated with topical antimicrobials. Similarly, when terbinafine was combined with topical antimicrobials, there was a predominance of indifference (> 60%), except for its combination with cetylpyridinium, for which 71.4% of synergistic interactions were

observed. The interaction of azithromycin or terbinafine with potassium permanganate resulted in 100% indifferent interactions (data not shown). Antagonistic interactions were not observed.

In this study, we described systemic and topical antimicrobial drugs that individually inhibit the *in vitro* growth of *P. insidiosum* at similar or lower MICs compared with the observed values for known antimicrobial drugs with *in vitro* activity against *P. insidiosum* (7). Previous studies demonstrated the *in vitro* and *in vivo* susceptibility of *P. insidiosum* to azithromycin, mupirocin and terbinafine (7, 10-16) with *in vitro* results similar to our study.

Antifungal agent preparations are the main topical treatments used in several cases of ocular or subcutaneous pythiosis (1, 17-19). Additionally, topical ammonium chloride, dimethyl sulfoxide, potassium iodide and povidone iodine with or without association to antifungal drugs (20-26), sodium iodine (20, 27), thioestrepton and triamcinolone acetonide (28), chlorhexidine and polyhexamethylene biguanide (29), copper sulfate (30) and essential oils (31) are also described in topical pythiosis therapy. However, there is no definitive evidence of improvement in disease progression through the use of these compounds, even when combined with other therapies, which are generally considered ineffective.

Triclosan (a derivative of hydroxydiphenyl ether), benzalkonium chloride, cetrimide and cetylpyridinium chloride (quaternary ammonium compounds), potassium permanganate and mupirocin are used for general disinfecting and antimicrobial purposes, including burns, wounds and preoperative cleaning and disinfection, bladder and urethra irrigation, treatment of superficial mouth, throat and skin infections, treatment of seborrhea capitis and seborrheic dermatitis, oral and pharyngeal antiseptic and as pharmaceutical and cosmetic preservatives at concentrations ranging from 0.001% to 3%. Benzalkonium chloride is also widely used in hard contact lens soaking (disinfecting) solutions (32, 33). Although all these compounds have a wide range of known antimicrobial activity against bacteria, some fungi and parasites, this study was the first to evaluate the antimicrobial activity of benzalkonium, cetrimide, cetylpyridinium, potassium permanganate

and triclosan against clinically isolated *P. insidiosum* based on a broth microdilution susceptibility test.

It is important to note that the treatment of pythiosis is complex and in most cases requires surgical interventions, immunotherapy and systemic antimicrobial chemotherapy. Therefore, the use of topical antimicrobials in lesions should be a complementary treatment to the main therapies. Larger *in vitro* and *in vivo* susceptibility studies are needed to elucidate the potential of the topical antimicrobials evaluated in this study on the treatment of pythiosis.

In conclusion, the *in vitro* susceptibility data reported in this study demonstrated that the growth of *P. insidiosum* clinical isolates was inhibited by all antimicrobials evaluated, with the exception of potassium permanganate. Although there was a predominance of indifferent interactions between the combinations of the evaluated antimicrobials, the absence of antagonism and the lack of information regarding the topical therapy of pythiosis suggests that the antimicrobials evaluated have potential as new topical supplementary therapeutic options for the treatment of pythiosis.

Acknowledgments

This work was supported by the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior*, Brazil (CAPES-AUX PE-PNPD 743/2012). E. S. L. is a PhD fellow of the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior*, Brazil (PNPD-CAPES).

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. **Krajaejun T, Sathapatayavongs B, Prachartam R, Nitiyanant P, Leelachaikul P, Wanachiwanawin W, Chaiprasert A, Assanasen P, Saipetch M, Mootsikapun P, Chetchotisakd P, Lekhakula A, Mitarnun W, Kalnauwakul S, Supparatpinyo K, Chaiwarith R, Chiewchanvit S, Tananuvat N, Srisiri S, Suankratay C, Kulwichit W, Wongsaisuwan M, Somkaew S.** 2006. Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. *Clinical Infectious Diseases* **43**:569-576.
2. **Gaastra W, Lipman LJA, De Cock AWAM, Exel TK, Pegge RBG, Scheurwater J, Vilela R, Mendoza L.** 2010. *Pythium insidiosum*: An overview. *Veterinary Microbiology* **146**:1-16.
3. **Mendoza L, Vilela R.** 2013. The mammalian pathogenic fungal-like oomycetes. *Current Fungal Infection Reports* **7**:198-208.
4. **Mendoza L, Prasla SH, Ajello L.** 2004. Orbital pythiosis: a non-fungal disease mimicking orbital mycotic infections, with a retrospective review of the literature. *Mycoses* **47**:14-23.
5. **Botton SA, Pereira DIB, Costa MM, Azevedo MI, Argenta JS, Jesus FPK, Alves SH, Santurio JM.** 2011. Identification of *Pythium insidiosum* by nested PCR in cutaneous lesions of Brazilian horses and rabbits. *Current Microbiology* **62**:1225-1229.
6. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard. CLSI document M38-A2, 2nd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
7. **Loreto ÉS, Tondolo JSM, Pilotto MB, Alves SA, Santurio JM.** 2014. New insights into the *in vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **58**:7534-7537.
8. **Pereira DIB, Santurio JM, Alves SH, Argenta JS, Potter L, Spanamberg A, Ferreira L.** 2007. Caspofungin *in vitro* and *in vivo* activity against Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **60**:1168-1171.
9. **Moody J.** 2007. Synergism Testing: Broth Microdilution Checkerboard and Broth Macrodilution Methods, p 1-23. *In* Garcia LS, Isenberg HD (ed), *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC.
10. **Argenta JS, Alves SH, Silveira F, Maboni G, Zanette RA, Cavalheiro AS, Pereira PL, Pereira DIB, Sallis ESV, Potter L, Santurio JM, Ferreira L.** 2012. *In vitro* and *in vivo* susceptibility of two-drug and three-drug combinations of terbinafine, itraconazole, caspofungin, ibuprofen and fluvastatin against *Pythium insidiosum*. *Veterinary Microbiology* **157**:137-142.
11. **Argenta JS, Santurio JM, Alves SH, Pereira DIB, Cavalheiro AS, Spanamberg A, Ferreira L.** 2008. *In vitro* activities of voriconazole, itraconazole, and terbinafine alone or in combination against *Pythium insidiosum* isolates from Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **52**:767-769.
12. **Brown TA, Grooters AM, Hosgood GL.** 2008. *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* and a *Lagenidium* sp to itraconazole, posaconazole, voriconazole, terbinafine, caspofungin, and mefenoxam. *American Journal of Veterinary Research* **69**:1463-1468.
13. **Cavalheiro AS, Maboni G, de Azevedo MI, Argenta JS, Pereira DIB, Spader TB, Alves SH, Santurio JM.** 2009. *In vitro* activity of terbinafine combined with

- casposfungin and azoles against *Pythium insidiosum*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **53**:2136-2138.
14. **Heath JA, Kiehn TE, Brown AE, LaQuaglia MP, Steinherz LJ, Bearman G, Wong M, Steinherz PG.** 2002. *Pythium insidiosum* pleuropericarditis complicating pneumonia in a child with leukemia. Clinical Infectious Diseases **35**:60-64.
 15. **Jesus FP, Loreto ES, Ferreira L, Alves SH, Driemeier D, Souza SO, Franca RT, Lopes ST, Pilotto MB, Ludwig A, Azevedo MI, Ribeiro TC, Tondolo JS, Santurio JM.** 2015. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activities of minocycline in combination with azithromycin, clarithromycin, or tigecycline against *Pythium insidiosum*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **60**:87-91.
 16. **Loreto ES, Mario DAN, Denardi LB, Alves SH, Santurio JM.** 2011. *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* to macrolides and tetracycline antibiotics. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **55**:3588-3590.
 17. **Permpalung N, Worasilchai N, Plongla R, Upala S, Sanguankeo A, Paitoonpong L, Mendoza L, Chindamporn A.** 2015. Treatment outcomes of surgery, antifungal therapy and immunotherapy in ocular and vascular human pythiosis: a retrospective study of 18 patients. Journal of Antimicrobial Chemotherapy **70**:1885-1892.
 18. **Sharma S, Balne PK, Motukupally SR, Das S, Garg P, Sahu SK, Arunasri K, Manjulatha K, Mishra DK, Shivaji S.** 2015. *Pythium insidiosum* keratitis: clinical profile and role of DNA sequencing and zoospore formation in diagnosis. Cornea **34**:438-442.
 19. **Thanathanee O, Enkvetchakul O, Rangsin R, Waraasawapati S, Samerpitak K, Suwan-apichon O.** 2013. Outbreak of *Pythium* keratitis during rainy season: a case series. Cornea **32**:199-204.
 20. **Bosco SDG, Reis GM, Theodoro RC, Macoris SAD, Marques SA, Macoris DD, Bagagli E.** 2008. Morphological and molecular characterization of an equine isolate of *Pythium insidiosum* and comparison with the first human isolate from the same geographic region. Medical Mycology **46**:557-565.
 21. **Dias DPM, Doria RGS, Pereira RN, Canola PA, Di Filippo PA.** 2012. Topical treatment using amphotericin B and DMSO for an atypically located equine cutaneous pythiosis. Acta Scientiae Veterinariae **40**:1088.
 22. **Doria RGS, Freitas SH, Linardi RL, Mendonca FD, Arruda LP, Boabaid FM, Valadao CAA.** 2012. Treatment of pythiosis in equine limbs using intravenous regional perfusion of amphotericin B. Veterinary Surgery **41**:759-765.
 23. **Dowling BA, Dart AJ, Kessell AE, Pascoe RR, Hodgson DR.** 1999. Cutaneous phycomycosis in two horses. Australian Veterinary Journal **77**:780-783.
 24. **Lelievre L, Borderie V, Garcia-Hermoso D, Brignier AC, Sterkers M, Chaumeil C, Lortholary O, Lanternier F.** 2014. Imported *Pythium insidiosum* keratitis after a swim in Thailand by a contact lens-wearing traveler. American journal of tropical medicine and hygiene **92**:270-273.
 25. **Mercer J, White A, Kennis B.** 2014. Successful management of cutaneous pythiosis in a dog with subsequent cutaneous vasculitis. Veterinary Record Case Reports **2**:e000143-e000143.
 26. **Worster AA, Lillich JD, Cox JH, Rush BR.** 2000. Pythiosis with bone lesions in a pregnant mare. Journal of the American Veterinary Medical Association **216**:1795-1798.
 27. **Videla R, van Amstel S, O'Neill S H, Frank LA, Newman SJ, Vilela R, Mendoza L.** 2012. Vulvar pythiosis in two captive camels (*Camelus dromedarius*). Medical mycology **50**:219-224.

28. **Thieman KM, Kirkby KA, Flynn-Lurie A, Grooters AM, Bacon NJ.** 2011. Diagnosis and treatment of truncal cutaneous pythiosis in a dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **239**:1232-1235.
29. **Tanhehco TY, Stacy RC, Mendoza L, Durand ML, Jakobiec FA, Colby KA.** 2011. *Pythium insidiosum* keratitis in Israel. *Eye Contact Lens* **37**:96-98.
30. **Meireles MCA, Rietcorrea F, Fischman O, Zambrano AFH, Zambrano MS, Ribeiro GA.** 1993. Cutaneous pythiosis in horses from Brazil. *Mycoses* **36**:139-142.
31. **Fonseca AO, Pereira DI, Botton SA, Potter L, Sallis ES, Junior SF, Filho FS, Zambrano CG, Maroneze BP, Valente JS, Baptista CT, Braga CQ, Ben VD, Meireles MC.** 2015. Treatment of experimental pythiosis with essential oils of *Origanum vulgare* and *Mentha piperita* singly, in association and in combination with immunotherapy. *Veterinary Microbiology* **178**:265-269.
32. **Al-Adham I, Haddadin R, Collier P.** 2013. Types of microbicidal and microbistatic agents, p 5-70. *In* Fraise AP, Maillard JY, Sattar S (ed), *Principles and practice of disinfection, preservation, and sterilization*, 5th ed. John Wiley & Sons, Chichester, West Sussex.
33. **Porrás-Luque JI.** 2007. Topical antimicrobial agents in dermatology. *Actas Dermo-Sifiliográficas* **98**:29-39.

Table 1 *In vitro* activities of azithromycin and terbinafine, alone or in combination with select topical antimicrobial drugs, against 21 *Pythium insidiosum* isolates

| Antimicrobial agent | Individual MICs | | Drug Combination | | | | |
|-------------------------------------|-------------------|----------------|------------------|--------------------------------|----------------------|--------------------|------|
| | MIC ₉₀ | MIC range (GM) | Drugs | MIC associated range (GM) | FICI mean range (GM) | Interpretation (%) | |
| | | | | | | Syn | Ind |
| Systemic drugs | | | | | | | |
| Azithromycin (AZT) | 8 | 2-16 (4.68) | AZT + BAC | 0.25-4 (1.07) + 2-4 (2.57) | 0.38-1 (0.75) | 4.8 | 95.2 |
| Terbinafine (TRB) | 32 | 4-32 (14.56) | AZT + CET | 0.25-8 (1.25) + 1-4 (1.66) | 0.50-1 (0.91) | 10 | 90 |
| | | | AZT + CPC | 0.25-8 (1.25) + 1-4 (1.66) | 0.50-1 (0.76) | 14.3 | 85.7 |
| Topic drugs | | | AZT + MUP | 1-4 (2.06) + 0.25-2 (1.10) | 0.50-1.5 (0.91) | 19 | 81 |
| Benzalkonium (BAC) | 8 | 4-8 (5.31) | AZT + TCS | 0.06-8 (0.60) + 0.25-1 (0.53) | 0.38-1 (0.62) | 19 | 81 |
| Cetrimide (CET) | 16 | 4-16 (7.75) | TRB + BAC | 0.25-8 (2.34) + 0.5-4 (1.82) | 0.19-1 (0.52) | 38.1 | 61.9 |
| Cetylpyridinium (CPC) | 8 | 2-8 (3.53) | TRB + CET | 0.125-8 (1.76) + 0.5-4 (1.94) | 0.19-1 (0.38) | 4.8 | 95.2 |
| Mupirocin (MUP) | 4 | 1-8 (2.49) | TRB + CPC | 1-8 (2.27) + 1-4 (1.71) | 0.5-1 (0.67) | 71.4 | 28.6 |
| Potassium permanganate ^a | >64 | >64 | TRB + MUP | 0.06-8 (3.01) + 0.5-4 (1.0) | 0.38-1 (0.64) | 33.3 | 66.7 |
| Triclosan (TCS) | 2 | 0.5-2 (1.25) | TRB + TCS | 0.25-16 (4.13) + 0.25-1 (0.55) | 0.50-1 (0.77) | 19 | 81 |

MIC ($\mu\text{g/ml}$), minimal inhibitory concentrations; MIC₉₀, minimum inhibitory concentrations where 90% of isolates are inhibited; GM, geometric mean; ^a, 100% of indifferent interactions when combined with azithromycin or terbinafine.

4.2 ARTIGO 2 - EFFICACY OF PRESUMPTIVE IDENTIFICATION OF *PYTHIUM INSIDIOSUM* BY A MODIFIED DISK DIFFUSION METHOD WITH ANTIBACTERIAL DRUGS

Title: Efficacy of presumptive identification of *Pythium insidiosum* with a modified disk diffusion method using antibacterial drugs

Authors: Sabrina R. Itaquí^a, Juliana S. M. Tondolo^a, Camila M. Verdi^{le}, Leandro Fernandes Vianna^a, Sydney H. Alves^b, Janio M. Santurio^a, Érico S. Loreto^{a*}

Affiliations

^a Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima nº 1000, Prédio 20, sala 4139, Santa Maria - CEP 97105-900, RS, Brazil. Tel./fax: +55 55 3220-8906; e-mail: SRI (sabrinitaqui@yahoo.com.br); JSMT (jutondolo@yahoo.com.br); CMV (milaverdi@hotmail.com); LV (leandrofernandesvianna@yahoo.com.br); JMS (janio.santurio@gmail.com); ESL (erico.loreto@gmail.com)

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), e-mail: SHA (sydneyalves.ufsm@gmail.com).

Address for correspondence:

*Érico S. Loreto

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima nº 1000, Prédio 20, sala 4139, Santa Maria - CEP 97105-900, RS, Brazil. Tel./fax: +55 55 3220-8906. e-mail: erico.loreto@gmail.com

Abstract

This study evaluated a modified disk diffusion technique as a simple and rapid method for presumptive identification of *Pythium insidiosum*. This oomycete species has morphological similarities with true filamentous fungi and can be initially misidentified during primary observations of microbiological cultures. Growth of *P. insidiosum* mycelia ceased between colonies located 1.5 cm from disks containing 5 µg of mupirocin, 15 µg of azithromycin or clarithromycin and 30 µg of minocycline for all isolates evaluated in culture media-dependent manner. Whereas this concentration of antibacterial drugs does not inhibit the growth of true fungi, indicating that this modified disk diffusion technique can be used as an additional test for the presumptive identification of *P. insidiosum*.

(These results were partially presented in poster form at the 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases in May 2014).

Introduction

Fungi, like all living organisms, adapt to their environment through the use of many different metabolic strategies, and these behaviors represent the key to its survival. Additionally, some molds can learn and adapt their growth stream in anticipation of the next environmental stimulus that will be presented. Previously, several authors demonstrated that some fungi can grow constructive networks to maximize nutrient uptake in a complex spatial phenomenon, similar to what is demonstrated in labyrinth-solving behavior studies (Nakagaki et al., 2004; Nakagaki et al., 2000, 2001; Tero et al., 2007). Furthermore, the use of an externalized spatial “memory” (Reid et al., 2012) and chemical sensors (Pershin et al., 2009; Whiting et al., 2014) suggest that these organisms use simple heuristics to make sophisticated foraging decisions (Latty and Beekman, 2015).

Pythium insidiosum is the main oomycete pathogen associated with infectious disease in humans and other mammals (Mendoza and Vilela, 2013; Schurko et al., 2003). Pythiosis is an aggressive and life-threatening disease that should be diagnosed and treated as quickly as possible (Gaastra et al., 2010). However, *P. insidiosum* grows quickly on commonly used traditional culture media, such as Sabouraud dextrose agar, and forms colonies composed of hyaline hyphae, similar to true fungi, but without fruiting bodies. Additionally, the observation of broad and sparsely septate hyphae in histopathological and microbiological culture analysis may initially suggest a fungal infection caused by pathogens from the orders Entomophthorales and Mucorales (Kaufman, 1998; Mendoza et al., 2004), resulting in delayed identification of a pythiosis case.

A recent evaluation for *in vitro* susceptibility of antibacterial and antifungal drugs against *P. insidiosum* suggests that this species is more susceptible to antibacterial drugs, which act by inhibiting protein synthesis, compared with antifungal agents (Loreto et al., 2014a). Interestingly, Tondolo et al. (2013) described that the probable presence of *P. insidiosum* mycelia can be identified by observing a sensory profile for escape and inhibition of its growth after adding a disk containing 30 µg of minocycline to the culture media. Based on this information, the objective of

our study was to evaluate the sensorial growth patterns of *P. insidiosum* in the presence of several antibacterial drugs in a modified disk diffusion analysis to determine the potential of these drugs as new screening methods for presumptive identification of this species.

Material and methods

Twenty-three clinical *P. insidiosum* isolates from equine pythiosis cases previously identified by a PCR method according to Botton et al. (2011) were tested. *P. insidiosum* ATCC 58.637, *Pythium aphanidermatum* CBS 128995, *Saprolegnia parasitica* CBS 223.65 and six clinical *Conidiobolus lamprauges* from ovine entomophthoromycosis previously identified (de Paula et al., 2010) were included as control strains. Initially, the isolates were grown on Mueller-Hinton agar (MHA, Himedia[®], pH 7.3) and on Sabouraud dextrose glucose (SDA, Himedia[®], pH 7.0) and incubated at 35°C for 48-96 h.

Disks (Sensifar[®], São Paulo, Brazil) containing 2 µg of clindamycin; 5 µg of mupirocin; 15 µg each of azithromycin, clarithromycin, erythromycin, roxithromycin and tilmicosin; and 30 µg each of chloramphenicol, doxycycline, florfenicol, linezolid, minocycline and tetracycline were placed 1.5 cm from the edge of 2 x 2 cm agar blocks containing actively growing *P. insidiosum* cultures as previously described by Tondolo et al. (2013). A control plate without disks was included for each tested isolate. Plates were examined after 48-72 h of incubation at 35°C and the presence of a growth inhibition zone between the disks and the *P. insidiosum* colonies were considered a positive sensorial result, i.e., the ability of the micelia to escape from the disk drug trap.

Results

Within 48-72 h of inoculation, hyphal growth ceased between the *P. insidiosum* colonies and the azithromycin and clarithromycin (only on MHA), minocycline (MHA and SDA) and mupirocin (only on SDA) for all 24 isolates (100%). The remaining inhibition rates ranged from 4.17% to

83.33% of isolates (Table 1) and were culture media-dependent. *P. aphanidermatum* showed growth inhibition in the presence of florfenicol, minocycline and linezolid on MHA and in the presence of doxycycline, mupirocin, tetracycline and minocycline on SDA; however, *Saprolegnia parasitica* growth inhibition was observed in the presence of all disks, except clindamycin, chloramphenicol and tetracycline on MHA while only minocycline was able to inhibit the micelial growth on SDA. *C. lamprauges* growth was not inhibited.

Discussion

In this study, we observed that impregnated disks routinely used in antimicrobial susceptibility testing can be used as a simple method for presumptive differentiation of *P. insidiosum* from true fungi, particularly when disks containing azithromycin, clarithromycin, minocycline and mupirocin were added to Muller Hinton agar or Sabouraud dextrose agar in the presence of the organism. The influence of the antibacterial drugs evaluated on the growth of *P. insidiosum* was culture media-dependent. Interestingly, the growth of *P. insidiosum* mycelium was in the opposite direction of the trap with the antibiotic disc, even after prolonged incubation (Figure 1). This result may suggest that these microorganisms have mechanisms to identify the presence of an aggressive antimicrobial agent and the ability to guide their growth in the opposite direction of the threat.

This proposed technique is a simple and inexpensive screening method that can assist initial suspicion of an infection caused by *P. insidiosum*. However, it was observed that *Pythium aphanidermatum* and *Saprolegnia parasitica* strains, which were used as controls, also had their growth inhibited, for example by minocycline. Thus, it is possible that the inhibition of microbial growth by the antibacterial drugs evaluated in this study occur in other genera of oomycetes.

Our results are consistent with the data described by Tondolo et al. (2013), in which minocycline disks were successfully used for the preliminary characterization of *P. insidiosum*. Evaluating the use of other antibacterial drugs that act on the inhibition of protein synthesis, in

addition to minocycline, for presumptive identification of *P. insidiosum* is justified because several of these antibacterial drugs inhibited the growth of *P. insidiosum in vitro* (Loreto et al., 2014a). Moreover, Jesus et al. (2015) showed that azithromycin was a potential cure when used as a treatment for rabbits experimentally infected by *P. insidiosum*.

P. insidiosum is not a frequently isolated microorganism in microbiology laboratories; its culture and its characteristics in histopathological analyses can be preliminarily misidentified as fungal pathogens, such as agents of entomophthoramyces and mucormycosis. Unlike true fungi, oomycetes do not contain the metabolic pathways for ergosterol synthesis, which is one of the reasons for treatment failure in pythiosis cases treated with antifungals (Gaastra et al., 2010; Krajaejun et al., 2006) because ergosterol is one of the main targets for currently used antifungal agents. Because pythiosis is an aggressive disease that progresses rapidly, using the disk diffusion technique described in this study is an additional option for presumptive diagnosis of this disease.

Further studies are needed to better understand and expand the results presented in this study, including the evaluation of a larger number of clinical isolates of *P. insidiosum* and other genera of oomycetes. Although *P. insidiosum* is the main species associated with oomycete infections in mammals, many of the pathogenesis mechanisms for pythiosis are not fully understood, and data on the virulence factors and pathogenicity of this species have only recently been better evaluated (Krajaejun et al., 2011; Krajaejun et al., 2014). Moreover, it is worth noting the pathogenic potential of other species, such as *Pythium aphanidermatum* (Calvano et al., 2011) and other genera such as *Saprolegnia*, *Aphanomyces* (Phillips et al., 2008) and *Lagenidium* species (Mendoza and Vilela, 2013), as agents of infections in animals. In addition, antimicrobial evaluation of the antibacterial drugs presented in this study on oomycetes that cause serious infections in plants (Kamoun et al., 2015) is an unexplored field of research.

In conclusion, the *in vitro* data reported in this study suggest that disks containing antibacterial drugs, particularly azithromycin, clarithromycin, minocycline and mupirocin, are candidates for a disk diffusion technique used to identify *P. insidiosum*. However, it is important to

note that the final identification of pythiosis requires immunohistochemical assessment of the affected tissues and/or genotypic characterization of the isolates recovered from the culture. Furthermore, the detection of antibodies in serological tests and the morphological and physiological characteristics of their reproductive structures (zoospores) (Garcia et al., 2007; Loreto et al., 2014b; Mendoza and Prendas, 1988) are other tools that should be used in laboratory diagnosis of pythiosis.

Acknowledgements

We thank the Brazilian agency *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) for their support. Érico Silva Loreto was the recipient of a PNPd-CAPES fellowship. We thank Prof^a. Valéria Dutra for providing *Conidiobolus lamprauges* strains.

References

- Botton, SA, Pereira, DIB, Costa, MM, Azevedo, MI, Argenta, JS, Jesus, FPK, Alves, SH, Santurio, JM, 2011. Identification of *Pythium insidiosum* by nested PCR in cutaneous lesions of Brazilian horses and rabbits. *Current Microbiology* **62**: 1225-1229.
- Calvano, TP, Blatz, PJ, Vento, TJ, Wickes, BL, Sutton, DA, Thompson, EH, White, CE, Renz, EM, Hospenthal, DR, 2011. *Pythium aphanidermatum* infection following combat trauma. *Journal of Clinical Microbiology* **49**: 3710-3713.
- de Paula, DA, de Oliveira Filho, JX, da Silva, MC, Colodel, EM, Broetto, L, Pinto, PM, Schrank, A, akazato, L, Dutra, V, 2010. Molecular characterization of ovine zygomycosis in central western Brazil. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **22**: 274-277.
- Gaastra, W, Lipman, LJA, De Cock, AWAM, Exel, TK, Pegge, RBG, Scheurwater, J, Vilela, R, Mendoza, L, 2010. *Pythium insidiosum*: An overview. *Veterinary Microbiology* **146**: 1-16.
- Garcia, RB, Pastor, A, Mendoza, L, 2007. Mapping of *Pythium insidiosum* hyphal antigens and ultrastructural features using TEM. *Mycological Research* **111**: 1352-1360.
- Jesus, FP, Loreto, ES, Ferreira, L, Alves, SH, Driemeier, D, Souza, SO, Franca, RT, Lopes, ST, Pilotto, MB, Ludwig, A, Azevedo, MI, Ribeiro, TC, Tondolo, JS, Santurio, JM, 2015. In Vitro and In Vivo Antimicrobial Activities of Minocycline in Combination with Azithromycin, Clarithromycin, or Tigecycline against *Pythium insidiosum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **60**: 87-91.
- Kamoun, S, Furzer, O, Jones, JD, Judelson, HS, Ali, GS, Dalio, RJ, Roy, SG, Schena, L, Zambounis, A, Panabieres, F, Cahill, D, Ruocco, M, Figueiredo, A, Chen, XR, Hulvey, J, Stam, R, Lamour, K, Gijzen, M, Tyler, BM, Grunwald, NJ, Mukhtar, MS, Tome, DF, Tor, M, Van Den Ackerveken, G, McDowell, J, Daayf, F, Fry, WE, Lindqvist-Kreuzer, H, Meijer, HJ, Petre, B, Ristaino, J, Yoshida, K, Birch, PR, Govers, F, 2015. The Top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* **16**: 413-434.
- Kaufman, L, 1998. *Penicilliosis marneffei* and pythiosis: Emerging tropical diseases. *Mycopathologia* **143**: 3-7.
- Krajaejun, T, Khositnithikul, R, Lerksuthirat, T, Lowhnoo, T, Rujirawat, T, Petchthong, T, Yingyong, W, Suriyaphol, P, Smittipat, N, Juthayothin, T, Phuntumart, V, Sullivan, TD, 2011. Expressed sequence tags reveal genetic diversity and putative virulence factors of the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum*. *Fungal Biology* **115**: 683-696.
- Krajaejun, T, Lerksuthirat, T, Garg, G, Lowhnoo, T, Yingyong, W, Khositnithikul, R, Tangphatsornruang, S, Suriyaphol, P, Ranganathan, S, Sullivan, TD, 2014. Transcriptome analysis reveals pathogenicity and evolutionary history of the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum*. *Fungal Biology Reviews* **118**: 640-653.
- Krajaejun, T, Sathapatayavongs, B, Prachartam, R, Nitiyanant, P, Leelachaikul, P, Wanachiwanawin, W, Chairprasert, A, Assanasen, P, Saipetch, M, Mootsikapun, P, Chetchotisakd, P, Lekhakula, A, Mitarnun, W, Kalnauwakul, S, Supparatpinyo, K, Chaiwarith, R, Chiewchanvit, S, Tananuvat, N, Srisiri, S, Suankratay, C, Kulwichit, W, Wongsaisuwan, M, Somkaew, S, 2006. Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. *Clinical Infectious Diseases* **43**: 569-576.
- Latty, T, Beekman, M, 2015. Slime moulds use heuristics based on within-patch experience to decide when to leave. *Journal of Experimental Biology* **218**: 1175-1179.
- Loreto, ÉS, Tondolo, JSM, Pilotto, MB, Alves, SA, Santurio, JM, 2014a. New insights into the *in vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **58**: 7534-7537.
- Loreto, ÉS, Tondolo, JSM, Zanette, RA, Alves, SA, Santurio, JM, 2014b. Update on pythiosis immunobiology and immunotherapy. *World Journal of Immunology* **4**: 88-97.

- Mendoza, L, Prasla, SH, Ajello, L, 2004. Orbital pythiosis: a non-fungal disease mimicking orbital mycotic infections, with a retrospective review of the literature. *Mycoses* **47**: 14-23.
- Mendoza, L, Prendas, J, 1988. A method to obtain rapid zoosporogenesis of *Pythium insidiosum*. *Mycopathologia* **104**: 59-62.
- Mendoza, L, Vilela, R, 2013. The mammalian pathogenic oomycetes. *Current Fungal Infection Reports* **7**: 198-208.
- Nakagaki, T, Yamada, H, Hara, M, 2004. Smart network solutions in an amoeboid organism. *Biophysical Chemistry* **107**: 1-5.
- Nakagaki, T, Yamada, H, Toth, A, 2000. Maze-solving by an amoeboid organism. *Nature* **407**: 470.
- Nakagaki, T, Yamada, H, Toth, A, 2001. Path finding by tube morphogenesis in an amoeboid organism. *Biophysical Chemistry* **92**: 47-52.
- Pershin, YV, La Fontaine, S, Di Ventra, M, 2009. Memristive model of amoeba learning. *Physical Review E* **80**: 1-6.
- Phillips, AJ, Anderson, VL, Robertson, EJ, Secombes, CJ, van West, P, 2008. New insights into animal pathogenic oomycetes. *Trends in Microbiology* **16**: 13-19.
- Reid, CR, Latty, T, Dussutour, A, Beekman, M, 2012. Slime mold uses an externalized spatial "memory" to navigate in complex environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 17490-17494.
- Schurko, AM, Mendoza, L, Levesque, CA, Desaulniers, NL, De Cock, WAM, Klassen, GR, 2003. A molecular phylogeny of *Pythium insidiosum*. *Mycological Research* **107**: 537-544.
- Tero, A, Kobayashi, R, Nakagaki, T, 2007. A mathematical model for adaptive transport network in path finding by true slime mold. *Journal of Theoretical Biology* **244**: 553-564.
- Tondolo, JSM, Loreto, ES, Denardi, LB, Mario, DAN, Alves, SH, Santurio, JM, 2013. A simple, rapid and inexpensive screening method for the identification of *Pythium insidiosum*. *Journal of Microbiological Methods* **93**: 52-54.
- Whiting, JGH, Costello, BPJD, Adamatzky, A, 2014. Towards slime mould chemical sensor: Mapping chemical inputs onto electrical potential dynamics of *Physarum Polycephalum*. *Sensors and Actuators B-Chemical* **191**: 844-853.

Table 1. *Pythium insidiosum* (n=24) hyphal growth inhibition in the presence of antibacterial drugs

| Antibacterials | Positive sensorial result (%)* | |
|---------------------------|--------------------------------|-----------------------|
| | Sabouraud dextrose agar | Muller Hinton agar |
| Lincosamides | | |
| Clindamycin | 0 | 0 |
| Macrolides | | |
| Azithromycin | 4.17 | 100 |
| Clarithromycin | 66.67 | 100 |
| Erythromycin | 4.17 | 66.67 |
| Roxithromycin | 16.67 | 75 |
| Tilmicosin | 0 | 66.67 |
| Oxazolidinones | | |
| Linezolid | 79.17 | 70.83 |
| Phenicol | | |
| Chloramphenicol | 29.17 | 33.33 |
| Florfenicol | 54.17 | 66.67 |
| Pseudomonic acid A | | |
| Mupirocin | 100 | 66.67 |
| Tetracyclines | | |
| Doxycycline | 75 | 75 |
| Minocycline | 100 | 100 |
| Tetracycline | 83.33 | 33.33 |

* growth inhibition zone between the disks and the *P. insidiosum* colonies after 72h of incubation at 35°C.

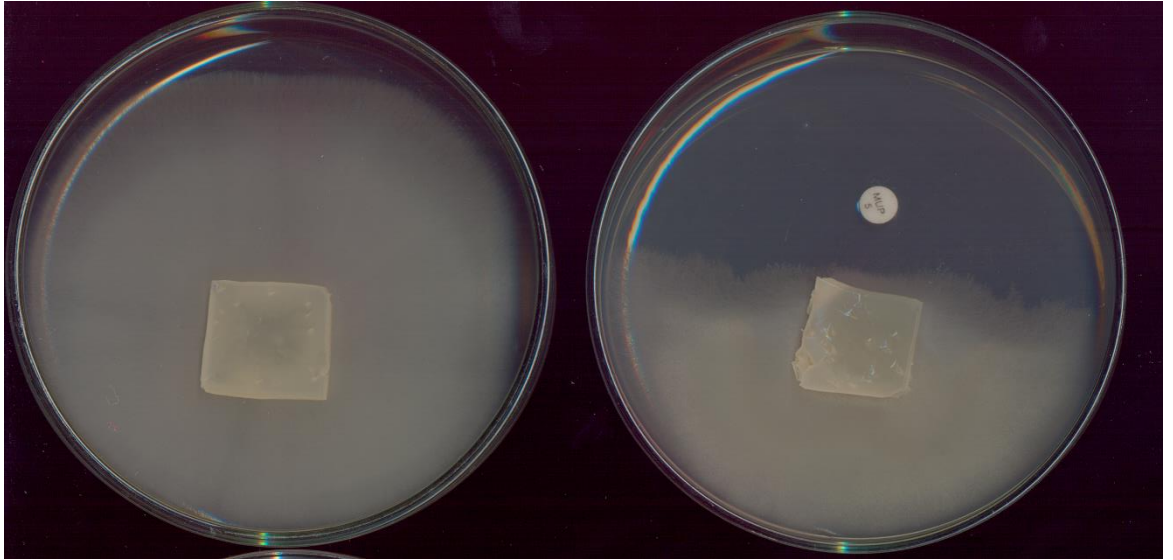


Figure 1 *Pythium insidiosum* growth on Sabouraud dextrose agar after 72 at 35°C. Left, control plate; right, a 5 µg mupirocin disk affects the growth of *P. insidiosum*

5 DISCUSSÃO

A pitiose é uma doença infecciosa crônica que afeta os seres humanos e outros mamíferos. Embora as características microscópicas dos organismos oomicetos sejam semelhantes aos fungos verdadeiros, análises filogenéticas indica que *Pythium* spp. estejam mais intimamente relacionadas com algas diatomáceas do que com os fungos verdadeiros (Kwonchung, 1994). Neste contexto, o tratamento da pitiose em animais e humanos é dificultado pelas particularidades do agente, especialmente pelas peculiaridades da composição de sua parede celular. *Pythium insidiosum* contém celulose e β -glucanas em sua parede, enquanto os fungos verdadeiros possuem quitina. A composição da parede celular e a falta de ergosterol na membrana citoplasmática do *P. insidiosum* estão associados com as dificuldades do tratamento com fármacos antifúngicos da pitiose, visto que é o ergosterol o alvo de ação para a maioria dos fármacos antifúngicos disponíveis.

Várias tentativas para tratar animais, assim como seres humanos com fármacos antifúngicos apresentaram resultados variáveis e, por vezes, contraditórias. No entanto, segundo Shenep *et al.* (1998), a cura farmacológica para pitiose é possível, devendo ser guiado por testes de suscetibilidade *in vitro*. Portanto, estudos de suscetibilidade *in vitro* e são necessários para esclarecer a possível utilidade dos agentes antimicrobianos no tratamento da pitiose.

O manuscrito 1 desta dissertação avaliou a suscetibilidade de *P. insidiosum* frente ao antifúngico terbinafina, ao antibacteriano azitromicina e aos antimicrobianos tópicos benzalcônio, cetrimida, cetilpiridínio, mupirocina, triclosan e permanganato de potássio. Os fármacos antifúngicos são as principais preparações farmacêuticas descritas no tratamento quimioterápico da pitiose ocular e subcutânea (Krajaejun *et al.*, 2006; Thanathanee *et al.*, 2013; Permpalung *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2015).

Dado a ineficiência destes compostos, vários autores utilizaram direta ou indiretamente outras opções para o tratamento tópico desta doença, tais como cloreto de amônio, dimetilsulfóxido, iodeto de potássio e iodopovidona com ou sem associação com fármacos antifúngicos (Dowling *et al.*, 1999; Worster *et al.*, 2000; Bosco *et al.*, 2008; Dias *et al.*, 2012; Doria *et al.*, 2012; Mercer *et al.*, 2014; Lelievre *et al.*, 2015), iodeto de sódio (Bosco *et al.*, 2008; Videla *et al.*, 2012), tiostreptona e triancinolona (Thieman *et al.*, 2011), clorexidina e polihexametileno biguanida (Tanhehco *et al.*, 2011), sulfato de cobre (Maireles *et al.*, 1993) e óleos essenciais (Fonseca *et al.*, 2015). No entanto, não há evidências clínicas

suficientes que estes compostos tenham efeito benéfico na progressão da doença, sendo genericamente considerados inefetivos.

Os dados do manuscrito 1 demonstram que o crescimento *in vitro* dos isolados clínicos de *P. insidiosum* foi inibido por todos os antimicrobianos avaliados, com exceção do permanganato de potássio. Embora tenha ocorrido um predomínio de interações indiferentes entre azitromicina ou terbinafina quando associados com os outros antimicrobianos tópicos, a distribuição das concentrações inibitórias mínimas individuais destes compostos (0,5 µg/mL a 32 µg/mL) os torna candidatos para futuros trabalhos *in vitro* e *in vivo* para a terapia suplementar do tratamento tópico da pitiose.

O manuscrito 2 desta dissertação avaliou a o uso de uma técnica de disco difusão modificada descrita por Tondolo *et al.* (2013) para a determinação do potencial de diversos antibacterianos reconhecidos por inibir o crescimento *in vitro* de *P. insidiosum* (Loreto et al., 2014). Os resultados deste trabalho demonstraram que a maioria dos antibacterianos tem potencial de identificação presuntiva de *P. insidiosum*, mas que o meio de cultura utilizado influencia diretamente a escolha do melhor antimicrobiano.

Considerando que ainda não há protocolos de tratamentos aprovados para a terapia da pitiose, a identificação laboratorial rápida é um dos fatores que contribuem para o sucesso terapêutico. Baseado nos resultados do manuscrito 2, os discos de 30 µg de minociclina utilizados em ambos os meios Sabouraud dextrose ágar e Muller Hinton ágar, os discos de 15 µg de azitromicina ou claritromicina utilizados no meio Muller Hinton e os discos de 5 µg de mupirocina utilizados no meio Sabouraud são as melhores escolhas para *screening* laboratorial das culturas suspeitas de casos de pitiose.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos nesta dissertação conclui-se:

- Os antimicrobianos tópicos benzalcônio, cetrimida, cetilpiridínio, mupirocina e triclosan inibiram o crescimento *in vitro* dos isolados clínicos de *Pythium insidiosum* em concentrações variando de 0,5 a 32 µg/mL;

- O permanganato de potássio não inibiu o crescimento *in vitro* de *P. insidiosum* na maior concentração avaliada (64 µg/mL);

- Interações indiferentes superiores a 60 e 80% para as combinações terbinafina+antimicrobianos tópicos e azitromicina+antimicrobianos tópicos, respectivamente, foram observadas, exceto para a combinação cetilpiridínio+terbinafina, para o qual 71,4% de interações sinérgicas foram observadas;

- Todos os antibacterianos avaliados na técnica da disco difusão modificada, com exceção da clindamicina, mostraram capacidade de inibir o crescimento miceliano do *P. insidiosum* em taxas que variaram de 4,17% a 100% dos isolados.

- A técnica de disco difusão utilizada para identificação presuntiva do *P. insidiosum* demonstrou que os resultados são dependentes do meio de cultura utilizado, sendo que a minociclina foi o único antibacteriano que inibiu 100% dos isolados em ambos os meios Sabouraud dextrose ágar e Muller Hinton ágar.

- Os discos de azitromicina e claritromicina permitiram a identificação presuntiva de todas os isolados de *P. insidiosum* apenas no ágar Muller Hinton enquanto que a mupirocina atingiu taxa de 100% de identificação somente quando o ágar Sabouraud foi utilizado.

7 REFERÊNCIAS

- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4th ed. New York: Wiley, 1996. 868 p
- AUSTWICK, P. K.; COPLAND, J. W. Swamp cancer. **Nature**, v. 250, n. 461, p. 84, 1974.
- BADENOCH, P. R. et al. *Pythium insidiosum* keratitis confirmed by DNA sequence analysis. **Br. J. Ophthalmol.**, v. 85, n. 4, p. 502-503, 2001.
- BERNARDO, F. D. et al. Pythiosis in sheep from Parana, southern Brazil. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 35, n. 6, p. 513-517, 2015.
- BERRYESSA, N. A. et al. Gastrointestinal pythiosis in 10 dogs from California. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 22, n. 4, p. 1065-1069, 2008.
- BOSCO, S. D. G. et al. Morphological and molecular characterization of an equine isolate of *Pythium insidiosum* and comparison with the first human isolate from the same geographic region. **Med. Mycol.**, v. 46, n. 6, p. 557-565, 2008.
- BROWN, C. C. et al. Use of immunohistochemical methods for diagnosis of equine pythiosis. **Am. J. Vet. Res.**, v. 49, n. 11, p. 1866-1868, 1988.
- BROWN, T. A.; GROOTERS, A. M.; HOSGOOD, G. L. *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* and a *Lagenidium* sp to itraconazole, posaconazole, voriconazole, terbinafine, caspofungin, and mefenoxam. **Am. J. Vet. Res.**, v. 69, n. 11, p. 1463-1468, 2008.
- CAMUS, A. C.; GROOTERS, A. M.; AQUILAR, R. F. Granulomatous pneumonia caused by *Pythium insidiosum* in a central American jaguar, *Panthera onca*. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 16, n. 6, p. 567-571, 2004.
- CARRERA, M. V. et al. Pythiosis in sheep from Pernambuco and Bahia States, Brazil. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 33, n. 4, p. 476-482, 2013.
- CAVALHEIRO, A. S. et al. *In vitro* activity of terbinafine combined with caspofungin and azoles against *Pythium insidiosum*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 53, n. 5, p. 2136-2138, 2009a.
- CAVALHEIRO, A. S. et al. *In vitro* activity of terbinafine associated to amphotericin B, fluvastatin, rifampicin, metronidazole and ibuprofen against *Pythium insidiosum*. **Vet. Microbiol.**, v. 137, n. 3-4, p. 408-411, 2009b.
- CHAIPRASERT, A. et al. Induction of zoospore formation in Thai isolates of *Pythium insidiosum*. **Mycoses**, v. 33, n. 6, p. 317-323, 1990.
- CHAREONSIRISUTHIGUL, T. et al. Performance comparison of immunodiffusion, enzyme-linked immunosorbent assay, immunochromatography and hemagglutination for serodiagnosis of human pythiosis. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 76, n. 1, p. 42-45, 2013.
- DE COCK, A. W. et al. *Pythium insidiosum* sp. nov., the etiologic agent of pythiosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 25, n. 2, p. 344-349, 1987.

- DIAS, D. P. M. et al. Topical treatment using amphotericin B and DMSO for an atypically located equine cutaneous pythiosis. **Acta Sci. Vet.**, v. 40, n. 4, p. 1088, 2012.
- DORIA, R. G. S. et al. Treatment of Pythiosis in Equine Limbs Using Intravenous Regional Perfusion of Amphotericin B. **Vet. Surg.**, v. 41, n. 6, p. 759-765, 2012.
- DOS SANTOS, C. E. P.; SANTURIO, J. M.; MARQUES, L. C. Pythiosis of livestock in the Pantanal, Mato Grosso, Brazil. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 31, n. 12, p. 1083-1089, 2011.
- DOS 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.
- DOWLING, B. A. et al. Cutaneous phycomycosis in two horses. **Aust. Vet. J.**, v. 77, n. 12, p. 780-783, 1999.
- DYCUS, D. L.; FISHER, C.; BUTLER, R. Surgical and medical treatment of pyloric and duodenal pythiosis in a dog. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v. 51, n. 6, p. 385-391, 2015.
- DYKSTRA, M. J. et al. A description of cutaneous-subcutaneous pythiosis in fifteen dogs. **Med. Mycol.**, v. 37, n. 6, p. 427-433, 1999.
- FONSECA, A. O. S. et al. Treatment of experimental pythiosis with essential oils of *Origanum vulgare* and *Mentha piperita* singly, in association and in combination with immunotherapy. **Vet. Microbiol.**, v. 178, n. 3-4, p. 265-269, 2015.
- GAASTRA, W. et al. *Pythium insidiosum*: an overview. **Vet. Microbiol.**, v. 146, n. 1-2, p. 1-16, 2010.
- GABRIEL, A. L. et al. Outbreak of cutaneous pythiosis in cattle. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 28, n. 12, p. 583-587, 2008.
- GRECCO, F. B. et al. Cutaneous pythiosis in cattle in the Southern region of Rio Grande do Sul, Brazil. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 29, n. 11, p. 938-942, 2009.
- GROOTERS, A. M.; GEE, M. K. Development of a nested polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Pythium insidiosum*. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 16, n. 2, p. 147-152, 2002.
- 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.
- HIGASHI, Y. et al. Evaluation of a newly-developed immunochromatography strip test for diagnosing dermatophytosis. **Int. J. Dermatol.**, v. 51, n. 4, p. 406-409, 2012.
- IDEMYOR, V. Emerging opportunistic fungal infections: where are we heading? **J. Natl. Med. Assoc.**, v. 95, n. 12, p. 1211-1215, 2003.

- JESUS, F. P. et al. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activities of minocycline in combination with azithromycin, clarithromycin or tigecycline against *Pythium insidiosum*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, p. AAC. 01480-01415 (manuscripto aceito), 2015.
- JESUS, F. P. K. et al. *In vitro* synergism observed with azithromycin, clarithromycin, minocycline, or tigecycline in association with antifungal agents against *Pythium insidiosum*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 58, n. 9, p. 5621-5625, 2014.
- KAMOUN, S. et al. The Top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. **Mol. Plant Pathol.**, v. 16, n. 4, p. 413-434, 2015.
- KRAJAEJUN, T. et al. Development and evaluation of an in-house enzyme-linked Immunosorbent assay for early diagnosis and monitoring of human pythiosis. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, v. 9, n. 2, p. 378-382, 2002.
- KRAJAEJUN, T. et al. Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. **Clin. Infect. Dis.**, v. 43, n. 5, p. 569-576, 2006.
- KWONCHUNG, K. J. Phylogenetic spectrum of fungi that are pathogenic to humans. **Clin. Infect. Dis.**, v. 19, n. Supplement 1, p. S1-S7, 1994.
- LAOHAPENSANG, K. et al. Vascular pythiosis in a thalassemic patient. **Vascular**, v. 17, n. 4, p. 234-238, 2009.
- LELIEVRE, L. et al. Imported *Pythium insidiosum* keratitis after a swim in Thailand by a contact lens-wearing traveler. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 92, n. 2, p. 270-273, 2015.
- LORETO, E. S. et al. *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* to macrolides and tetracycline antibiotics. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 55, n. 7, p. 3588-3590, 2011.
- LORETO, E. S. et al. New insights into the *in vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 58, n. 12, p. 7534-7537, 2014.
- MAHL, D. L. et al. *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* isolates to aminoglycoside antibiotics and tigecycline. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 56, n. 7, p. 4021-4023, 2012.
- MARTINS, T. B. et al. A comparative study of the histopathology and immunohistochemistry of pythiosis in horses, dogs and cattle. **J. Comp. Pathol.**, v. 146, n. 2-3, p. 122-131, 2012.
- MCMULLAN, W. C. et al. Amphotericin B for the treatment of localized subcutaneous phycomycosis in the horse. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 170, n. 11, p. 1293-1298, 1977.
- MEIRELES, M. C. A. et al. Cutaneous Pythiosis in Horses from Brazil. **Mycoses**, v. 36, n. 3-4, p. 139-142, 1993.
- MENDOZA, L. *Pythium insidiosum* and mammalian hosts. In: LAMOUR, K. e KAMOUN, S. (Ed.). **Oomycete genetics and genomics : diversity, interactions, and research tools**. Hoboken, N.J.: Wiley-Blackwell, 2009. p.xvii, 574 p., 578 p. of plates.

- MENDOZA, L.; AJELLO, L.; MCGINNIS, M. R. Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. **J. Mycol. Med.**, v. 6, n. 4, p. 151-164, 1996.
- MENDOZA, L.; HERNANDEZ, F.; AJELLO, L. Life cycle of the human and animal oomycete pathogen *Pythium insidiosum*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 31, n. 11, p. 2967-2973, 1993.
- MENDOZA, L.; NEWTON, J. C. Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum*. **Med. Mycol.**, v. 43, n. 6, p. 477-486, 2005.
- MENDOZA, L.; NICHOLSON, V.; PRESCOTT, J. F. Immunoblot analysis of the humoral immune response to *Pythium insidiosum* in horses with pythiosis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 30, n. 11, p. 2980-2983, 1992.
- MENDOZA, L.; PRASLA, S. H.; AJELLO, L. Orbital pythiosis: a non-fungal disease mimicking orbital mycotic infections, with a retrospective review of the literature. **Mycoses**, v. 47, n. 1-2, p. 14-23, 2004.
- MENDOZA, L.; VILELA, R. Anomalous fungal and fungal-like infections: lacaziosis, pythiosis, and rhinosporidiosis. In: ANAISSIE, E. J.; MCGINNIS, M. R., *et al* (Ed.). **Clinical mycology**. 2 ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2009.
- MENDOZA, L.; VILELA, R. The mammalian pathogenic Oomycetes. **Curr. Fungal Infect. Rep.**, v. 7, n. 3, p. 198-208, 2013.
- MERCER, J.; WHITE, A.; KENNIS, B. Successful management of cutaneous pythiosis in a dog with subsequent cutaneous vasculitis. **Vet. Rec. Case Reports**, v. 2, n. 1, p. e000143, 2014.
- MILLER, R. I.; CAMPBELL, R. S. F. Experimental pythiosis in rabbits. **Sabouraudia**, v. 21, n. 4, p. 331-341, 1983.
- MURDOCH, D.; PARR, D. *Pythium insidiosum* keratitis. **Aust. N. Z. J. Ophthalmol.**, v. 25, n. 2, p. 177-179, 1997.
- MURRAY, D. R. *et al*. Metastatic phycomycosis in a horse. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 172, n. 7, p. 834-836, 1978.
- OLDENHOFF, W. *et al*. Cutaneous pythiosis in two dogs from Wisconsin, USA. **Vet. Dermatol.**, v. 25, n. 1, p. 52-e21, 2014.
- PERMPALUNG, N. *et al*. Treatment outcomes of surgery, antifungal therapy and immunotherapy in ocular and vascular human pythiosis: a retrospective study of 18 patients. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 70, n. 6, p. 1885-1892, 2015.
- PESSOA, C. R. M. *et al*. Pythiosis of the digestive tract in sheep. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 24, n. 6, p. 1133-1136, 2012.

- POOLE, H. M.; BRASHIER, M. K. Equine cutaneous pythiosis. **Comp. Cont. Educ. Pract.**, v. 25, n. 3, p. 229-235, 2003.
- RAKICH, P. M.; GROOTERS, A. M.; TANG, K. N. Gastrointestinal pythiosis in two cats. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 17, n. 3, p. 262-269, 2005.
- RIVIERRE, C. et al. Pythiosis in Africa. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 11, n. 3, p. 479-481, 2005.
- SANTURIO, J. M. et al. Granulomatous rhinitis associated with *Pythium insidiosum* infection in sheep. **Vet. Rec.**, v. 163, n. 9, p. 276-277, 2008.
- SANTURIO, J. M. et al. Three types of immunotherapies against pythiosis insidiosum developed and evaluated. **Vaccine**, v. 21, n. 19-20, p. 2535-2540, 2003.
- SANTURIO, J. M. et al. Cutaneous pythiosis insidiosum in calves from the Pantanal region of Brazil. **Mycopathologia**, v. 141, n. 3, p. 123-125, 1998.
- SATHAPATAYAVONGS, B. et al. Human pythiosis associated with thalassemia hemoglobinopathy syndrome. **J. Infect. Dis.**, v. 159, n. 2, p. 274-280, 1989.
- SHARMA, S. et al. *Pythium insidiosum* Keratitis: Clinical Profile and Role of DNA Sequencing and Zoospore Formation in Diagnosis. **Cornea**, v. 34, n. 4, p. 438-442, 2015.
- SHENEP, J. L. et al. Successful medical therapy for deeply invasive facial infection due to *Pythium insidiosum* in a child. **Clin. Infect. Dis.**, v. 27, n. 6, p. 1388-1393, 1998.
- SIFUENTES-OSORNIO, J.; CORZO-LEON, D. E.; PONCE-DE-LEON, L. A. Epidemiology of invasive fungal infections in Latin America. **Curr. Fungal Infect. Rep.**, v. 6, n. 1, p. 23-34, 2012.
- SUPABANDHU, J. et al. Isolation and identification of the human pathogen *Pythium insidiosum* from environmental samples collected in Thai agricultural areas. **Med. Mycol.**, v. 46, n. 1, p. 41-52, 2008.
- TANHEHCO, T. Y. et al. *Pythium insidiosum* keratitis in Israel. **Eye Contact Lens**, v. 37, n. 2, p. 96-98, 2011.
- THANATHANEE, O. et al. Outbreak of *Pythium* keratitis during rainy season: a case series. **Cornea**, v. 32, n. 2, p. 199-204, 2013.
- THIANPRASIT, M.; CHAIPRASERT, A.; IMWIDTHAYA, P. Human pythiosis. **Curr. Top. Med. Mycol.**, v. 7, n. 1, p. 43-54, 1996.
- THIEMAN, K. M. et al. Diagnosis and treatment of truncal cutaneous pythiosis in a dog. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 239, n. 9, p. 1232-1235, 2011.
- THOMAS, R. C.; LEWIS, D. T. Pythiosis in dogs and cats. **Comp. Cont. Educ. Pract.**, v. 20, n. 1, p. 63-67, 1998.

TONDOLO, J. S. M. et al. A simple, rapid and inexpensive screening method for the identification of *Pythium insidiosum*. **J. Microbiol. Methods**, v. 93, n. 1, p. 52-54, 2013.

TRISCOTT, J. A.; WEEDON, D.; CABANA, E. Human subcutaneous pythiosis. **J. Cutan. Pathol.**, v. 20, n. 3, p. 267-271, 1993.

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.

VIDELA, R. et al. Vulvar pythiosis in two captive camels (*Camelus dromedarius*). **Med. Mycol.**, v. 50, n. 2, p. 219-224, 2012.

VIRGILE, R. et al. Human infectious corneal ulcer caused by *Pythium insidiosum*. **Cornea**, v. 12, n. 1, p. 81-83, 1993.

WANACHIWANAWIN, 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.

WELLEHAN, J. F. X. et al. Pythiosis in a dromedary camel (*Camelus dromedarius*). **J. Zoo Wildl. Med.**, v. 35, n. 4, p. 564-568, 2004.

WORSTER, A. A. et al. Pythiosis with bone lesions in a pregnant mare. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 216, n. 11, p. 1795-1798, 2000.

ZANETTE, R. A. et al. Toll-deficient *Drosophila* is susceptible to *Pythium insidiosum* infection. **Microbiol. Immunol.**, v. 57, n. 10, p. 732-735, 2013.