6° CONGRESSO INTERNACIONAL EM SAÚDE CISaúde
Vigilância em Saúde: Ações de Promoção, Prevenção, Diagnóstico e Tratamento

Tipo de trabalho: TRABALHO COMPLETO (MÍNIMO 08 PÁGINAS, MÁXIMO 15 PÁGINAS)

USO DE TESTES BIOQUÍMICOS COMO MÉTODO AUXILIAR NA IDENTIFICAÇÃO DE PYTHIUM INSIDIOSUM[1]

Paula Cristina Stibbe[2], Lara Baccarin Ianiski[3], Carla Weiblen[4], Andrelise Pappis[5], Maria Isabel De Azevedo[6], Sônia De Avila Botton[7]

[1] Trabalho de conclusão de curso de graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Santa Maria
[2] Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI)/Biologia Molecular; Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF)
[3] Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI)/Biologia Molecular; Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF)
[4] Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Centro de Ciências Rurais (CCR), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP)
[5] Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI)/Biologia Molecular
[6] Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG); Laboratório de Micologia e Micotoxinas (LAMICO), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
[7] Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF); Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (PPGMV); Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP)

RESUMO

Introdução: A pitiose é uma doença granulomatosa crônica, amplamente distribuída no mundo, acometendo humanos e animais, sendo causada pelo oomiceto *Pythium insidiosum*. Esta doença tem semelhança clínica com outras enfermidades, especialmente infecciosas, dificultando o diagnóstico, que é bastante fastidioso e de alto custo. Diante disso, é de grande relevância a pesquisa de novos métodos que auxiliem eficientemente na identificação de *P.insidiosum*. **Objetivo:** Avaliar a triagem bioquímica como ferramenta auxiliar no diagnóstico laboratorial da pitiose. Para isso, foram utilizados isolados clínicos de *P.insidiosum* (n=4), *Conidiobolus lamprauges* (n=4), bem como cepas padrão de *P.insidiosum* (n=4) e de *Pythium aphanidermatum* (n=1). **Resultado:** Testes de triagem bioquímica, em especial a hidrólise de ureia, auxiliam na diferenciação dos agentes etiológicos de infecções granulomatosas. Entretanto, a diferenciação interespécies não demonstrou eficácia. **Conclusão:** A triagem bioquímica demonstrou ser um método simples, rápido, custo-efetiva e que pode auxiliar no diagnóstico diferencial da pitiose de outras enfermidades granulomatosas.

Tipo de trabalho: TRABALHO COMPLETO (MÍNIMO 08 PÁGINAS, MÁXIMO 15 PÁGINAS)

INTRODUÇÃO

A pitiose é uma doença granulomatosa crônica que acomete humanos e animais e ocorre em áreas tropicais, subtropicais ou temperadas (MENDOZA et al., 1996). O agente causador da pitiose é o oomiceto aquático *Pythium insidiosum*, pertencente ao Reino Stramenopila, Classe Oomycota, Ordem Pythiales, Família Pythiaceae, gênero *Pythium* (DE COCK et al., 1987; DICK et al., 2001).

A doença, em geral, caracteriza-se pela presença de lesões granulomatosas em tecido cutâneo e subcutâneo e tende a apresentar evolução rápida. As principais espécies afetadas são a equina, canina e humana. Na espécie humana, a doença apresenta-se, principalmente, nas formas oftálmica, subcutânea e sistêmica, sendo as duas últimas associadas a α e β-talassemias, comuns no Sudeste da Ásia (IMWIDTHAYA, 1994). Nos indivíduos acometidos, não há predisposição por sexo, idade ou raça, e a forma de infecção ocorre por meio de zoósporos ambientais, não havendo relatos de transmissão direta entre animais e entre animais e o homem (MENDOZA et al., 1996).

A Tailândia é o país com maior ocorrência de pitiose humana devido a diversos fatores associados à doença, como a prevalência de α e β-talassemias, o clima tropical úmido e principalmente a exposição devido ao trabalho nas plantações inundativas de arroz, ambiente propício ao desenvolvimento do patógeno (TRISCOTT et al., 1993).

No Brasil, é observado um aumento nos casos da enfermidade em animais, sendo que o Pantanal Mato-Grossense é considerado o local de maior ocorrência da pitiose equina no mundo (SANTOS et al., 2014). Contudo, a pitiose é amplamente encontrada em todo o País. Há relatos no Rio de Janeiro (SANAVRIA et al., 2000), Paraíba (TABOSA et al., 1999), Mato Grosso (CARVALHO et al., 1984), Rio Grande do Sul (WEIBLEN et al., 2016).

No Brasil, em relação a espécie humana, há um único relato de caso proveniente do Estado de São Paulo, no qual o diagnóstico foi dificultoso, e somente a utilização de técnicas moleculares possibilitaram a correta identificação do agente *P. insidiosum* (BOSCO et al., 2005; MARQUES et al., 2006).

Até o ano de 2011, *P. insidiosum* era considerada a única espécie do gênero com capacidade patogênica em animais, incluindo o homem. Porém, foi relatado um caso de infecção em humano envolvendo a espécie *Pythium aphanidermatum* (CALVANO et al., 2011). Farmer et. al. (2015) também relataram o isolamento de *P. aphanidermatum* em um paciente com ferimento de guerra, o que levanta hipóteses sobre quais as espécies com potencial de infecção em hospedeiros mamíferos.

Há uma atenção especial na ocorrência da doença em equinos, pois resulta em perdas econômicas, além disso há um alto custo envolvido na identificação e no tratamento. Contudo, o diagnóstico da pitiose também é fundamental em outras espécies, incluindo animais de produção pecuária, como em ovinos, uma vez que Santurio et al. (2008) relataram quatro casos de rinite granulomatosa em ovelhas da raça Santa Inês, em que dois animais morreram subitamente após 28 dias da doença e os outros dois foram submetidos a eutanásia após 50 dias de evolução da doença devido ao intenso comprometimento respiratório superior. O diagnóstico definitivo desse

relato foi realizado através da utilização de técnicas de biologia molecular, confirmando *P. insidiosum*. A identificação correta e precoce é imprescindível, uma vez que fungos do gênero *Conidiobolus* também são causadores de rinite granulomatosa em ovinos, tornando difícil a diferenciação clínica dessas doenças infecciosas, de caráter granulomatoso (UBIALI et al., 2013).

A pitiose, tanto no homem quanto nos animais é de difícil diagnóstico clínico, pois manifesta-se clinicamente de variadas formas. O diagnóstico laboratorial é realizado através do exame histopatológico e isolamento para identificação do agente. O isolamento é feito através da cultura em meio adequado, onde posteriormente observam-se estruturas morfológicas e reprodutivas para identificação. Porém, o diagnóstico por esses métodos é difícil, lento e de baixa sensibilidade (GROOTERS, 2003; FARMER et. al., 2015).

Outros métodos laboratoriais com maior especificidade e sensibilidade incluem a imunohistoquímica (BROWN et al., 2008), a sorologia através da técnica de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) (MENDOZA et al., 1997; SANTURIO et al., 2006), a imunodifusão (MILLER & CAMPBELL 1982; KAUFMAN et al., 1990), e técnicas de biologia molecular como a Nested-PCR e o sequenciamento gênico a partir da amplificação do DNA ribossomal (BOTTON et al., 2011). Destaca-se a importância do diagnóstico precoce da pitiose, que está intimamente relacionado com o sucesso do tratamento do indivíduo acometido (GAASTRA et al., 2010).

A resposta terapêutica é variável em humanos e animais, devido as características singulares de *P. insidiosum*, que o difere dos fungos na composição da parede celular, além da produção de zoósporos móveis, não havendo assim, uma terapia padrão para a pitiose. Todavia, no tratamento emprega-se uma combinação de terapias, que incluem uso de substâncias químicas, técnicas cirúrgicas e a imunoterapia (SANTURIO et al., 2006).

Diante do aumento de casos de pitiose no Brasil e da semelhança clínica com outras infecções, especialmente granulomatosas, há a necessidade de novos métodos que auxiliem no diagnóstico laboratorial e diferencial da enfermidade, uma vez que os métodos convencionais para a identificação de *P. insidiosum* são demorados e de alto custo. Dessa forma, a triagem bioquímica pode ser uma ferramenta para um diagnóstico mais rápido e acessível, podendo ser inserida na rotina laboratorial.

Com base em estudos recentes, este trabalho teve como objetivo aplicar testes de triagem bioquímica utilizando-se cepas padrão e isolados clínicos de *P. insidiosum, P. aphanidermatum* e *Conidiobolus lamprauges*, buscando verificar a efetividade e possível aplicação destes testes para diferenciação entre fungos de doenças granulomatosas e, também, a diferenciação interespécie entre *P. insidiosum* e *P. aphanidermatum*.

METODOLOGIA

Foram utilizadas para a realização dos testes bioquímicos, isolados clínicos de *P. insidiosum* (n=4) e de *C. lamprauges* (n=4), cepas padrão de *P. insidiosum* (n=4) e *P. aphanidermatum* (n=1), previamente identificados através de amplificação da região intergênica ITS (Internal Transcribed Spacer) utilizando os *primers* ITS1 (5'GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') e ITS4 (5'CTTCCGTCAATTCCTTTAAG-3' (WHITE et al., 1990) e sequenciamento (Tabela 1).

Tabela 1 - Isolados clínicos e cepas padrão dos micro-organismos utilizados nos testes.

Espécie	Isolado/Cepa	Origem
P. insidiosum	118	Equino, Brasil
P. insidiosum	137	Equino, Brasil
P. insidiosum	156	Equino, Brasil
P. insidiosum	292	Equino, Brasil
P. insidiosum	PC3	Humano, Tailândia
P. insidiosum	CBS 119454	Humano, Tailândia
P. insidiosum	CBS 57585	Equino, Costa Rica
P. insidiosum	CBS 70283	Equino, Japão
P. aphanidermatum	P36-3	Ambiental, Coreia
C. lamprauges	260	Ovino, Brasil
C. lamprauges	303	Ovino, Brasil
C. lamprauges	446	Ovino, Brasil
C. lamprauges	614	Ovino, Brasil

Fonte: Autor.

As amostras utilizadas são provenientes da micoteca do Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI) e estavam em cultivo em ágar meio-mínimo. A partir desses cultivos, foram re-isoladas em placas de Ágar Farinha de Milho (Corn Meal Agar - CMA, Biolog®). Após crescimento em estufa a 37ºC durante 48h, esses cultivos foram utilizados para realizar os testes de triagem bioquímica.

A triagem bioquímica foi realizada conforme metodologia de Vilela et al. (2015), com algumas modificações (foram utilizados tubos tipo Eppendorf® para centrifugação, pois foi observado maior praticidade em relação aos tubos tipo Falcon® utilizados no estudo. Adicionalmente foi observado que houve bom crescimento das hifas no caldo Sabouraud, sem necessidade de incubar uma segunda vez em novo caldo). Porções de 3,0mm foram retiradas do cultivo e esses foram incubados em frascos tipo Erlenmeyer contendo 150mL de caldo Sabouraud Dextrose 2% (SDB) a 37ºC sob agitação por 72h.

Após 72h de incubação e crescimento das hifas, o micélio foi distribuído em tubos tipo Eppendorf®, cerca de 0,5 gramas por tubo. Esses tubos foram centrifugados durante 15min a 13500rpm e, após, o sobrenadante foi descartado. As hifas presentes no precipitado foram lavadas três vezes com 500µL de água destilada estéril e centrifugadas, como descrito anteriormente, a fim de eliminar qualquer vestígio de açúcar. A massa fúngica resultante foi usada imediatamente para a realização dos testes bioquímicos.

A triagem bioquímica foi composta pelos testes:

1. Avaliação do uso de citrato como fonte de carbono pelo micro-organismo, através de placas de ágar Simmons' citrato (Kasvi®);

2. Avaliação da hidrólise de ureia através de placas de ágar ureia de Christiansen (Himedia®);

3. Avaliação da hidrólise dos seguintes açúcares: arabinose, celobiose, dulcitol, galactose, glicose, lactose, maltose, manitol, rafinose, ramnose, sacarose, xilose e trealose (Vetec®);

4. Teste de catalase, avaliando a produção ou não de bolhas, utilizando reagente de H2O2 3% (Farmax®).

Os meios de cultura foram preparados conforme indicação dos fabricantes e distribuídos em placas de Petri estéreis para a realização dos testes.

Para o teste do citrato, o teste de ureia e os testes dos açúcares, foi inoculado 0,5g de hifas. Após, as placas foram incubadas em estufa a 37ºC por 48h. Foram feitas duas leituras, uma após 24h de incubação e outra após 48h de incubação.

Para as placas de ágar púrpura de bromocresol contendo os açúcares, foi considerado reação positiva quando houve a mudança de cor do meio originalmente roxo, para amarelo, no local de crescimento das hifas. Isto indicou que houve a hidrólise do açúcar presente no meio. Mudança de cor apenas no local do inóculo, foi considerada reação negativa.

Quanto ao teste de catalase, foi utilizado a mesma quantidade de hifas (0,5g), que foram depositadas em uma placa de Petri estéril e sobre a massa de hifas, gotejadas duas gotas de H_{22} a 3%. A leitura foi realizada imediatamente, onde a produção de bolhas foi considerada reação positiva, enquanto a não produção foi considerada reação negativa.

Durante a triagem bioquímica, todos os testes foram realizados em triplicata.

RESULTADOS

No teste de hidrólise de açúcares, todas as cepas e isolados tanto do gênero *Pythium* spp. quanto do gênero *Conidiobolus* sp. tiveram resultado negativo para os açúcares arabinose, celobiose, dulcitol, galactose, lactose, manitol, rafinose, ramnose e xilose. Alguns isolados de ambos os gêneros produziram alteração de cor no local do inóculo, contudo após 24h a placa retornou a cor roxa original, não sofrendo alteração do meio roxo no crescimento das hifas, sendo assim, considerados resultados negativos.

A hidrólise de ureia, maltose, sacarose e trealose mostraram-se os testes mais eficientes na diferenciação dos gêneros *Pythium* spp. e *Conidiobolus* sp., onde destaca-se o teste da ureia, que demonstra resultados evidentes e de fácil observação. Todas as cepas do gênero *Pythium* spp. hidrolisaram a ureia, a maltose, a sacarose e a trealose e todas as cepas do gênero *Conidiobolus* sp. apresentaram reação negativa para a hidrólise de ureia, bem como para a maltose, a sacarose e a trealose.

Além disso, o teste do citrato teve reação positiva para todas os isolados de *Conidiobolus* sp. e reação negativa para todos os isolados de *Pythium* spp.

O teste da catalase não teve resultados eficientes para diferenciar os gêneros nem espécies avaliados, uma vez que todas os isolados apresentaram reação positiva ao teste, observado pela produção de bolhas em todos os micélios pesquisados.

Os resultados de todos os testes realizados, estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Resultados para os testes de triagem bioquímica.

Teste	C260	C303	C446	C614	P.APH.	P.H.	P118	P137	P156	P292	P8H	P4H	P6H
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarose	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trealose	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9 outros açúcares*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*Arabinose, Celobiose, Dulcitol, Galactose, Lactose, Manitol, Rafinose, Ramnose e Xilose.
Cepas: C260, C303, C446, C614 - *C. lamprauges*; P.APH. - *P. aphanidermatum*; P.H., P118, P137, 156, P292, P8H, P4H, P6H – *P. insidiosum*.
Fonte: Autor.

Tipo de trabalho: TRABALHO COMPLETO (MÍNIMO 08 PÁGINAS, MÁXIMO 15 PÁGINAS)

DISCUSSÃO

Diante da dificuldade para diagnosticar a pitiose e dos altos custos para identificação laboratorial do agente *P. insidiosum*, assim como a semelhança clínica a outras enfermidades causadas por outros agentes, especialmente, infecciosos, incluindo os oomicetos (GROOTERS et al., 2003; MENDOZA & VILELA, 2013; VILELA et al., 2015), têm-se a necessidade da busca por novas metodologias e ferramentas que auxiliem na identificação desse relevante oomiceto patógeno de humanos e animais.

Assim, este estudo demonstra sua importância da triagem bioquímica como técnica auxiliar ao diagnóstico, uma vez que esta metodologia pode direcionar com rapidez o tratamento; uma vez que este é de suma importância a implementação da terapêutica o mais breve possível, a fim de evitar complicações da doença (GAASTRA et al., 2010). Os resultados da triagem bioquímica, neste estudo, foram realizados em até 48h demonstrando ser uma ferramenta útil, rápida e custo-eficaz para identificar o agente etiológico, comparada as outras técnicas laboratoriais disponíveis. Desta forma, a metodologia da triagem bioquímica é uma ferramenta auxiliar no diagnóstico precoce da pitiose.

O teste do citrato de Simmons indica a capacidade de certos micro-organismos utilizarem o citrato como única fonte de carbono para o seu metabolismo. O ágar citrato de Simmons contém citrato de sódio como única fonte de carbono, fosfato de amônia como única fonte de nitrogênio e o azul de bromotimol como indicador de pH. Quando o citrato é utilizado, este é removido do meio e CO_2 é liberado. O CO_2 combina-se com o sódio do citrato de sódio e água para formar carbonato de sódio, um produto alcalino, que aumenta o pH, mudando a cor do meio de verde (negativo) para azul (positivo).

A atividade da urease é detectada pelo crescimento em meio ágar ureia de Christiansen, onde há um indicador de pH. Quando a ureia é hidrolisada, a amônia se acumula no meio e o torna alcalino. Ocorre aumento no pH, causando a mudança de cor no indicador de amarelo palha para rosa *pink*, indicando uma reação positiva. A ausência de mudança na coloração indica um teste negativo.

Os testes bioquímicos são amplamente utilizados para triagem de bactérias, demonstrando ser uma ferramenta de grande valia para auxiliar no diagnóstico do agente infeccioso. Vilela et al. (2015) investigaram a importância de estudos envolvendo a triagem bioquímica para oomicetos, constatando que o desenvolvimento de zoósporos em meio de indução (MENDOZA & PRENDAS, 1988) aliado a uma triagem bioquímica poderia identificar *P. insidiosum.*

Mesmo com a necessidade de confirmação molecular, estes testes apresentam uma maior facilidade de realização pelos laboratórios, com maior rapidez na obtenção dos resultados, podendo sugerir uma linha de triagem de oomicetos e indicando para um tratamento rápido, que é essencial na terapêutica da pitiose (GAASTRA et al., 2010).

O teste do citrato e a hidrólise de ureia, maltose, scarose, trealose mostraram-se relevantes para a triagem entre os gêneros *Pythium* spp. e *Conidiobolus* sp. nas cepas testadas, permitindo uma

diferenciação rápida entre gêneros. Todavia a diferenciação entre *P. insidiosum* e *P. aphanidermatum* não foi possível através de nenhum dos testes avaliados neste estudo, demonstrando que a diferenciação interespécies requer maior atenção.

Krajaejun et al. (2018) publicaram um estudo onde demonstraram que pode haver diferenças de resposta na hidrólise de açúcares e de ureia para algumas cepas de *P. insidiosum*, indicando que este método requer maiores estudos e padronização. Krajaejun et al. (2018) observaram que as cepas que não hidrolisaram dextrose, maltose, sacarose e trealose foram, em sua maioria, cepas de crescimento lento. Enquanto para a hidrólise de ureia, esse aspecto não foi observado, podendo estar envolvido na discrepância de resultados.

Assim, fica claro que apesar de ser um método exequível, rápido e de fácil acesso, devem ser feitos novos estudos, ampliando o número de isolados, a fim de padronizar essa metodologia para futuro uso na rotina laboratorial.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos e a metodologia utilizada neste trabalho, a triagem bioquímica mostra-se útil como uma ferramenta auxiliar no diagnóstico laboratorial da pitiose, com menores custos e mais rapidez que a maioria dos métodos comumente empregados. Há necessidade de maiores estudos e padronização da metodologia, uma vez que outras pesquisas demonstram discrepância de resultados em relação a hidrólise de açúcares e ureia. Também se sabe da necessidade de confirmação do agente *Pythium* através de biologia molecular, assegurando e garantindo os resultados. Como objetivo de auxiliar no diagnóstico para prover um tratamento precoce da doença e diferenciar a pitiose de outras patogenias de semelhança clínica, bem como o gênero *Pythium* de outros agentes infecciosos, especialmente, os causadores de enfermidades granulomatosas, a triagem bioquímica pode ser considerada uma ferramenta bastante promissora.

PALAVRAS-CHAVE: Pitiose; Triagem; Oomiceto; Doenças granulomatosas.

AGRADECIMENTOS

O grupo de pesquisa agradece às agências de fomento CNPq: projeto 442020/2014-7, FAPERGS/PqG: 27293.414.15435.20062017 e CAPES (código 001) pelo apoio científico e financeiro.

REFERÊNCIAS

1. BOSCO, S.M.G. et al. Human phytiosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**. v. 11, n. 5, p. 715-718, 2005.
2. 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.
3. BROWN, T. A et al. In vitro susceptibility of *Pythium insidiosum* and a *Lagenidium* sp to itraconazole, posaconazole, voriconazole, terbinafine, caspofungin, and mefenoxam. **American Jounal of Veterinary Research**. v. 69, p. 1463–1468, 2008.
4. CALVANO, T. P. et al. *Pythium aphanidermatum* infection following combat trauma. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 49, p. 3710-3713, 2011.
5. CARVALHO, et al. “Hyphomyces destruens”: agente da “ferida brava” (hifomicose) em eqüinos do Pantanal de MT. **Anais XIX Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, Cuiabá, p. 311, 1984.
6. 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.
7. DICK, M.W. 2001. **Straminipilous Fungi: Systematics of the Peronosporomycetes including accounts of the marine straminipilous protists, the plasmodiophorids and similar organisms.** Kluwer Academic Publishers, London, England, p. 1-670, 2001.
8. FARMER, A.R. et al. Combat-Related *Pythium aphanidermatum* Invasive Wound Infection: Case Report and Discussion of Utility of Molecular Diagnostics. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 53, n. 6, p. 1968-1975, 2015.
9. GAASTRA, W. et al. *Pythium insidiosum*: an overview. **Veterinary Microbiology.** v. 146, p. 1-16, 2010.
10. GROOTERS, A.M. Pythiosis, lagenidiosis, and zygocmicosis in small animals. **The Veterinary Clinics Small Animal Practice**. v. 33, n. 4, p. 695-720, 2003.
11. IMWIDTHAYA, P. Human pythiosis in Thailand. **Postgraduate Medical Journal**. v. 70, p. 558–560, 1994.
12. KAUFMAN L., MENDOZA L., STANDARD P. G. Immunodiffusion test for serodiagnosing subcutaneous zygomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**. v.28, p. 1887-1890, 1990.
13. KRAJAEJUN, T. et al. Biochemical and genetic analyses of the oomycete

Pythium insidiosum provide new insights into clinical identification and urease-based evolution of metabolismrelated traits. **PeerJ**. v. 6, e. 4821. DOI 10.7717/peerj.4821, 2018.

14. MARQUES, A.S et al. *Pythium insidiosum*: relato do primeiro caso de infecção humana no Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v.81, n. 5, p. 483-5, 2006.
15. MENDOZA, L. et al. Serodiagnosis of human and animal pythiosis using an enzime-linked immunosorbent assay. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**. v. 4, n. 6, p. 715-718, 1997.
16. 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.
17. MILLER, R. I.; CAMPBELL, R. S. F. Haematology of horses with phycomycosis. **Australian Veterinary Journal**. v. 60, p. 28-29, 1983.
18. SANAVRIA A., F.V.E. et al. Pitiose em eqüinos: relato de cinco casos no estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v. 22, n. 4, p. 170-173, 2000.
19. 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.
20. SANTURIO, J.M. et al. Cutaneous Pythiosis insidiosi in calves from the Pantanal region of Brazil. **Mycopathologia**. v. 141, n. 13, p. 123-125, 1998.
21. SANTURIO, J. M. et al. Granulomatous rhinitis associated with *Pythium insidiosum* infection in sheep. **Veterinary Record**. v. 163, p. 276–277, 2008.
22. SANTURIO, J. M. et al. Teste de ELISA indireto para o diagnóstico sorológico de pitiose. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 26, p. 47-50, 2006a.
23. SANTURIO, J. M. et al. Pitiose: uma micose emergente. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 34, p. 1-14, 2006b.
24. TABOSA, I.M. et al. Outbreaks of pythiosis in two flocks of sheep in northeastern Brazil. **Veterinary Pathology**. v. 41, p. 412–415, 2004.
25. TRISCOTT, J.A. et al. Human subcutaneous phythiosis. **Journal of Cutaneous Pathology**. v. 20, n. 3, p. 267-271, 1993.
26. UBIALI, D.G., et al. Pathology of nasal infection caused by *Conidiobolus lamprauges* and *Pythium insidiosum* in sheep. **Journal of Comparative Pathology**. v. 149, p. 137-145, 2013.

27. VILELA, R. et al. Morphologic and phylogenetic characterization of *Conidiobolus lamprauges* recovered from infected sheep. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 48, p. 427–432, 2010.
28. VILELA, R.; VISWANATHAN, P.; MENDOZA, L. A. A biochemical screening approach to putatively differentiate mammalian pathogenic Oomycota species in the clinical laboratory. **Journal of Medical Microbiology**. v. 64, p. 862-868, 2015.
29. WEIBLEN, C. et al. Soroprevalência da pitiose equina no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**. v. 46, n. 1, p. 126-131, 2016.
30. WHITE, T.J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR protocols a guide to methods and applications**. London: Academic Press. p. 315-322, 1990.