

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Atividade *in vitro*, individual ou em combinação, de voriconazol, itraconazol
e terbinafina contra isolados brasileiros de *Pythium insidiosum***

JULIANA SIQUEIRA ARGENTA

PORTO ALEGRE

2008

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Atividade *in vitro*, individual ou em combinação, de voriconazol, itraconazol e terbinafina contra isolados brasileiros de *Pythium insidiosum*

Autor: JULIANA SIQUEIRA ARGENTA

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Subárea: Microbiologia.

Especialidade: Micologia.

Orientador: PROF. DR. LAERTE FERREIRO

PORTO ALEGRE

2008

“Só é útil o conhecimento que nos torna melhores”.

-Sócrates-

Dedico a meus avós:

Abílio (in memorian) e Maria Helena Siqueira

Pela incansável dedicação, amor e incentivo para que eu aqui chegasse.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a:

Meus pais, *Nilia e Jânio Argenta*, e meu irmão, *Miguel Argenta*: pelo carinho, apoio constante e especialmente por serem parte fundamental da minha vida.

Igor Carlotto: pela dedicação, paciência e, sobretudo por ser alguém que torna a minha vida muito melhor.

Professor *Laerte Ferreiro*, pela confiança, amizade e oportunidade de desenvolver este trabalho.

Professor *Janio M. Santurio*, pela oportunidade, pelos exemplos, por ter me apresentado à micologia e me fazer acreditar que com esforço e dedicação atingimos nossos objetivos.

Professor *Sydney Hartz Alves*, pelos ensinamentos, pela incansável ajuda para a realização deste trabalho e por ser alguém que admiro muito.

Daniela Pereira, pelo companheirismo, amizade e auxílio indispensáveis.

Marina Copetti, por tudo que me ensinou principalmente o valor da amizade.

Ayrton Cavalheiro, Stela Schwendler, Deise Santurio, Maria Isabel Azevedo, João Eckhardt Jr, Flávio Silveira, Ricardo Dotto, Régis Zanette, Patrique Pereira, Vanessa Laviniki, Franciele Bess, Patrícia Pozzati, Liliane Scheid, Érico Loretto, Paulo Guilherme Lopes. Muito obrigada a cada um dos citados, e aqueles que não citados, que estão ou passaram pelo LAPEMI, por todo apoio para a conclusão deste trabalho.

Leticia Saccol, Naíme Trevisan, Alexandre da Silva, Andréia Henzel, Marcelo Weiss, Caroline Zielinski, Luiz Felipe Borges, Gisane Lanes, Osvaldo Jardim, pela amizade e por todas as palavras de incentivo.

Professores e Funcionários do PPGCV da UFRGS, por possibilitarem e facilitarem a realização do mestrado.

CNPq, pelo apoio financeiro.

“A glória da amizade não é somente a mão estendida, o sorriso carinhoso ou a prazerosa companhia. É a inspiração que vem quando você descobre que alguém acredita e confia em você”.

RESUMO

Pythium insidiosum, classificado no Reino *Stramenopila* e Classe *Oomycetes*, é o agente etiológico da pitiose, uma doença diagnosticada principalmente em equinos, caninos e humanos. As atividades *in vitro* do voriconazol, itraconazol e terbinafina, sozinhos ou em combinação, foram estudadas empregando uma metodologia de macrodiluição baseada na técnica M 38-A (CLSI, 2002) contra 30 isolados clínicos de *Pythium insidiosum*, com o objetivo de avaliar novas medidas para tratar infecções causadas por este agente utilizando quimioterapia. As combinações (terbinafina e voriconazol; terbinafina e itraconazol) tiveram suas interações avaliadas utilizando a técnica de checkerboard seguindo o modelo da macrodiluição em caldo. Terbinafina foi ativa quando testada sozinha, mostrando uma concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima $\leq 8,0$ mg/L para todos os isolados. Voriconazol e itraconazol foram inativos contra os isolados testados quando usados sozinhos. A combinação de voriconazol com terbinafina foi sinérgica contra 17% das amostras e indiferente em 25 (83%) amostras. O uso concomitante de terbinafina e itraconazol foi sinérgico contra 17% e indiferente contra 83% das amostras. As interpretações de ambas as interações foram equivalentes para 26 isolados (87%): vinte e três foram indiferentes e três mostraram efeito sinérgico. Antagonismo não foi observado. A terapia combinada é uma alternativa à monoterapia, especialmente para pacientes com infecções invasivas que são difíceis de tratar. Estes resultados precisam ser correlacionados com relatos clínicos; e ensaios *in vivo*, usando modelos animais, podem preencher a lacuna entre avaliações clínicas e avaliações *in vitro* das drogas.

Palavras-chave: *Pythium insidiosum*, voriconazol, itraconazol, terbinafina, teste de suscetibilidade.

ABSTRACT

Pythium insidiosum is classified in the kingdom Stramenopila, class Oomycetes. It causes pythiosis, a disease mainly diagnosed in horses, dogs, and humans. In order to evaluate new approaches to treat infections caused by *Pythium insidiosum* using chemotherapy, the *in vitro* activities of voriconazole, itraconazole and terbinafine, alone or in combination, against 30 clinical isolates were studied employing a macrodilution methodology based on the M 38-A technique (CLSI, 2002). The combinations (terbinafine plus voriconazole and terbinafine plus itraconazole) had their interactions evaluated using the checkerboard technique following the broth macrodilution design. Terbinafine was active when used as a single drug, showing minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal fungicidal concentration $\leq 8,0$ mg/L for all the isolates. Voriconazole and itraconazole were inactive against the isolates tested when used alone. The combination of voriconazole with terbinafine was synergic against 17% of the strains and indifferent on 25 (83%) strains. The concomitant use of terbinafine and itraconazole was synergic against 17% and indifferent against 83% of the strains. The interpretations of both interactions were equivalent for 26 isolates (87%): twenty three were indifferent and three showed synergistic effect. Antagonism was not observed. Combination therapy provides an alternative to monotherapy, especially for patients with invasive infections that are difficult to treat. These results need to be correlated with clinical outcomes, and *in vivo* assays using experimental animal models could bridge the gap between *in vitro* and clinical evaluation of drugs.

Keywords: *Pythium insidiosum*, voriconazole, itraconazole, terbinafine, susceptibility test.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rota de biossíntese do ergosterol. Etapas onde vários agentes antifúngicos exercem suas atividades inibitórias estão mostradas. TERB, terbinafina; FLU, fluconazol; ITRA, itraconazol; VOR, voriconazol. (GHANNOUM & RICE, 1999)	27
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Identificação e origem dos isolados de <i>Pythium insidiosum</i> estudados.....	37
Tabela 2: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) e Concentrações Fungicidas Mínimas (CFMs) de <i>Pythium insidiosum</i> (n = 30) a terbinafina.	38
Tabela 3: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) de <i>Pythium insidiosum</i> (n = 30) ao itraconazol e voriconazol.	38

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	<i>Pythium insidiosum</i> e Pitiose	13
2.2	Zoosporogênese.....	22
2.3	Antifúngicos: itraconazol, voriconazol e terbinafina.....	24
2.4	Combinações antifúngicas e testes de suscetibilidade <i>in vitro</i>	27
3	ARTIGO CIENTÍFICO	33
4	DISCUSSÃO	39
5	CONCLUSÕES	44
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

1 INTRODUÇÃO

Pythium insidiosum é um organismo aquático cosmopolita classificado no Reino Stramenopila, Classe Oomycetes (DE COCK *et al.*, 1987). É o agente etiológico da pitiose em mamíferos, o qual está intimamente relacionado ao contato de animais e humanos com águas contaminadas onde o agente produz sua forma infectante, o zoósporo móvel (SANTURIO *et al.*, 2006a).

A pitiose é mais frequentemente diagnosticada em eqüinos, provocando quadro infeccioso na pele e região subcutânea; em caninos com apresentação gastrointestinal e cutânea; e em humanos nas formas subcutânea, vascular e ocular (SANTURIO *et al.*, 2003b). Acomete ainda bovinos (MILLER *et al.*, 1985; SANTURIO *et al.*, 1998; PÉREZ *et al.*, 2005), felinos (BISSONETE *et al.*, 1991; RAKISH *et al.*, 2005), ovinos (TABOSA *et al.*, 2004; SANTURIO *et al.*, 2008) e, recentemente, foi descrito em um camelo (WELLEHAN *et al.*, 2004), um jaguar da América Central (CAMUS *et al.*, 2004) e um tigre (BUERGELT *et al.*, 2006).

O tratamento da pitiose em animais e humanos é complicado pelas características do agente, sobretudo sua composição de parede celular (LEAL *et al.*, 2001b). A maioria das drogas disponíveis atua primariamente inibindo a síntese do ergosterol, o qual não é o principal esterol na membrana do *Pythium insidiosum* (DYKSTRA *et al.*, 1999), o que restringe o número de drogas que podem ser utilizadas para o tratamento dessa enfermidade. Vários tratamentos têm sido utilizados, principalmente em eqüinos, incluindo tratamento químico, cirúrgico e imunoterápico, encontrando sucesso variável (SANTURIO *et al.*, 2003b). A antifungoterapia tem utilizado anfotericina B, cetoconazol, miconazol, fluconazol e itraconazol, além dos compostos iodínicos como iodeto de potássio e sódio (SANTURIO *et al.*, 2003b). No entanto, os resultados obtidos com as drogas antifúngicas são controversos, tanto no

tratamento clínico como nos testes de suscetibilidade *in vitro*.

Dentro dos métodos de referência para testes de suscetibilidade, destaca-se o documento M 38-A recomendado e padronizado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (NCCLS, 2002). Este método padrão descreve técnicas de macro e microdiluição para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de antifúngicos frente a fungos filamentosos.

Até o presente, nenhuma das terapias antifúngicas propostas para a pitiose apresentaram resultados satisfatórios. Por outro lado, Shenep *et al.* (1998) demonstraram efeito sinérgico da terbinafina associada ao itraconazol no tratamento clínico da pitiose humana e em ensaios laboratoriais. No entanto, estudos com voriconazol ainda não foram realizados para *Pythium insidiosum*. Embora estes antifúngicos atuem na síntese do ergosterol, o uso dos mesmos nessa pesquisa justifica-se pelos relatos de cura obtidos com a associação de itraconazol e terbinafina, quando utilizados no tratamento de pitiose humana e canina.

As associações antifúngicas têm sido pouco estudadas em micologia médica, e suas atividades contra *Pythium insidiosum* são quase desconhecidas (SHENEP *et al.*, 1998). As combinações de drogas de diferentes grupos pode ser uma estratégia de tratamento útil quando a monoterapia não encontra resultados satisfatórios.

Com base nesta problemática, os **objetivos do presente estudo foram:**

- Verificar a atividade *in vitro* de voriconazol, itraconazol e terbinafina contra 30 isolados de *Pythium insidiosum* de animais, empregando uma metodologia de macrodiluição baseada na técnica M 38-A (NCCLS, 2002) adaptada.

- Avaliar as interações *in vitro* da terbinafina combinada com voriconazol, e da terbinafina combinada com itraconazol usando a técnica de checkerboard seguindo o modelo de macrodiluição (NCCLS, 2002).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Pythium insidiosum* e Pitiose

Pythium insidiosum, agente etiológico da pitiose em mamíferos (PEREIRA *et al.*, 2007), pertence ao Reino *Stramenopila*, Classe *Oomycetes*, Ordem *Pythiales*, Família *Pythiaceae*, Gênero *Pythium* e espécie *P. insidiosum* (DE COCK *et al.*, 1987). Esta classificação foi fundamentada em estudos detalhados sobre a classificação dos fungos, baseados em sistemática filogenética e análises moleculares, entre outros, que dividiram os organismos anteriormente classificados como fungos em três reinos: *Fungi*, *Stramenopila* e *Protista* (ALEXOPOULUS *et al.*, 1996). No entanto, Schurko *et al.* (2003) compararam espécies de *Pythium insidiosum* originárias das Américas, Ásia e Austrália, através de técnica molecular, evidenciando diferenças entre os isolados de *Pythium insidiosum* das três regiões estudadas, o que possibilita uma reclassificação como sub-espécies ou, talvez, novas espécies.

O gênero *Pythium* caracteriza-se por: produção de zoósporos biflagelados durante a reprodução assexuada; reprodução sexuada oogâmica; parede celular composta de β -glucanas, celulose e hidroxiprolina; talo diplóide; mitocôndria com crista tubular; características moleculares e bioquímicas peculiares, como uma rota alternativa para síntese do aminoácido lisina (MOORE-LANDECKER, 1996). Os oomicetos também diferem dos fungos quanto ao papel do ergosterol na membrana celular, ou seja, nos primeiros ele não é o principal esteróide (SANTURIO *et al.*, 2006a). De acordo com Hendrix (1970), espécies do gênero *Pythium* incorporam esteróides a partir do meio ao invés de produzi-los. Os esteróides são importantes para produção de estruturas sexuais *in vitro*, mas não são necessários para o crescimento da hifa vegetativa (GROOTERS, 2003).

A pitiose é uma enfermidade piogranulomatosa que atinge equinos, provocando quadro infeccioso na pele e tecido subcutâneo; caninos e felinos com apresentação gastrintestinal e cutânea; bovinos com doença cutânea; e humanos apresentando quadro clínico de arterite, queratite e celulite periorbital (SANTURIO *et al.*, 2006a). Epidemiologicamente a pitiose está intimamente relacionada com o contato dos animais e humanos com águas contaminadas pelo agente, onde o mesmo produz zoósporos móveis que se constituem na forma infectante do *Pythium insidiosum* (MENDOZA *et al.*, 1996). Em 1983, Miller propôs um ciclo biológico para esse organismo, que se baseia na colonização de plantas aquáticas, que servem de substrato para o desenvolvimento e reprodução do organismo, formando os zoosporângios. Os zoósporos livres na água, movimentam-se até encontrar outra planta ou animal, onde se encistam e emitem tubo germinativo, dando origem a um novo micélio e completando seu ciclo. Essas observações sustentaram a teoria de infecção, sugerindo que os cavalos em contato com águas contaminadas poderiam atrair os zoósporos, os quais germinariam a partir de uma pequena lesão cutânea (MENDOZA *et al.*, 1993).

A pitiose ocorre em regiões de clima tropical, subtropical e temperado (MEIRELES *et al.*, 1993; SANTURIO *et al.*, 1998; GROOTERS, 2003), e tem sido relatada nas Américas, alguns países europeus, sudeste asiático, Oceania e África (CHAFFIN *et al.*, 1995; FOIL, 1996; MENDOZA *et al.*, 1996; RIVIERRE *et al.*, 2005). As condições ambientais são determinantes para o desenvolvimento do organismo em seu ecossistema. Segundo Miller & Campbell (1982), para a produção de zoósporos são necessárias temperaturas entre 30 e 40°C e o acúmulo de água em banhados e lagoas. A pitiose equina é uma doença que ocorre em todas as regiões do Brasil, principalmente no Pantanal, onde há relação direta com o período das chuvas (outubro-março) e acarreta prejuízos significativos, direta ou indiretamente (LEAL *et al.*, 2001a). Não há

predisposição por sexo, idade ou raça e a fonte de infecção são os zoósporos ambientais, não havendo relatos de transmissão direta entre animais e entre animais e o homem (MENDOZA *et al.*, 1996). A doença é progressiva, levando o animal ao emagrecimento e morte na maioria dos casos.

No Brasil, a pitiose foi descrita em eqüinos, bovinos, ovinos, caninos e humanos, porém a maioria dos casos relatados corresponde a lesões cutâneas em eqüinos. Pitiose nos eqüinos caracteriza-se pela formação de granulomas eosinofílicos, com a presença de massas necróticas denominadas de “kunkers” (MENDOZA & ALFARO, 1986; MEIRELES *et al.*, 1993; SANTURIO *et al.*, 2003a). A doença nos eqüinos é conhecida por outros nomes como hifomicose, zigomicose, dermatite granular, “bursattee”, “Florida leeches”, granuloma ficomicótico, “swamp cancer” (CHAFFIN *et al.*, 1995; FOIL, 1996) e “ferida da moda” (LEAL *et al.*, 2001a). As lesões cutâneas são as mais freqüentes e atingem principalmente as extremidades distais dos membros e porção ventral da parede toraco-abdominal, provavelmente devido ao maior tempo de contato com águas contaminadas com zoósporos (MILLER & CAMPBELL, 1982; CHAFFIN *et al.*, 1995). Os sinais clínicos caracterizam-se por lesões ulcerativas granulomatosas, formando grandes massas teciduais (5 a 500 mm), com bordas irregulares, de aparência tumoral e com hifas recobertas por células necróticas, que formam massas branco-amareladas semelhantes a corais, chamadas internacionalmente de “kunkers” (SANTURIO *et al.*, 2006a). Conforme estes autores, os “kunkers” variam de 2 a 10 mm de diâmetro, tem forma irregular, ramificada, com aspecto arenoso e penetram no tecido granular, dentro de *sinus* formados ao longo do seu trajeto. Os animais apresentam intenso prurido e normalmente mutilam a lesão na tentativa de aliviar o desconforto (LEAL, 1999).

A segunda forma mais freqüente de infecção em eqüinos é a intestinal, caracterizando-se por massas teciduais localizadas na parede do intestino, levando a diminuição e obstrução do lúmen (SANTURIO *et al.*, 2003a). A maioria dos casos descritos relata apenas uma lesão em cada animal, porém podem existir lesões cutâneas multifocais (MENDOZA & ALFARO, 1986; CHAFFIN *et al.*, 1992). Além disso, pode ocorrer disseminação para órgãos internos a partir de infecções subcutâneas (REIS *et al.*, 2003), como nos casos descritos de lesões ósseas (MENDOZA *et al.*, 1988; ALFARO & MENDOZA, 1990; EATON, 1993). Estes estudos referem-se a eqüinos com lesões cutâneas crônicas, localizadas nos membros e com grande proliferação do tecido granulomatoso, onde as lesões ósseas ficaram limitadas aos ossos adjacentes às lesões cutâneas.

Os caninos são a segunda espécie mais atingida pela pitiose, também nas formas cutânea e gastrintestinal (SANTURIO *et al.*, 2006a). A forma gastrintestinal é a mais comum e manifesta-se com distúrbios digestivos como vômito, anorexia crônica, perda de peso, diarreia (às vezes sanguinolenta) e presença de massas nodulares, quando submetidos à palpação abdominal (FISCHER *et al.*, 1994; DYKSTRA *et al.*, 1999; GROOTERS, 2003). Os cães afetados são normalmente oriundos de regiões rurais ou estiveram, esporadicamente, em locais alagados como açudes e banhados (FOIL *et al.*, 1984; FISCHER *et al.*, 1994; DYKSTRA *et al.*, 1999). As lesões cutâneas apresentam-se como dermatites piogranulomatosas ulcerativas, contendo áreas de necrose infiltradas por neutrófilos e macrófagos e granulomas eosinofílicos (ENGLISH & FROST, 1984; FOIL *et al.*, 1984; DYKSTRA *et al.*, 1999).

Pitiose em felinos é rara, havendo poucos relatos na literatura. Um deles refere-se a uma infecção nasal e retrobulbar, sem envolvimento de órgãos internos, cujo diagnóstico baseou-se em imunohistoquímica, sorologia através de imunodifusão e

isolamento do agente (BISSONNETTE *et al.*, 1991). No outro relato foram dois casos de pitiose gastrintestinal em gatos nos EUA (RAKICH *et al.*, 2005). Recentemente, foram descritos os primeiros casos de pitiose em mamíferos não domésticos: pitiose cutânea e gastrintestinal em ursos (GROOTERS, 2003), pitiose pulmonar em um jaguar da América Central (CAMUS *et al.*, 2004) e um tigre com lesão intestinal por *Pythium insidiosum* (BUERGELT *et al.*, 2006).

A pitiose bovina também é pouco freqüente, havendo apenas três relatos na literatura, onde os autores descreveram lesões cutâneas, geralmente nos membros e caracterizadas por ulcerações, espessamento da derme e edema na região afetada. O primeiro na região de Louisiana, EUA (MILLER *et al.*, 1985), o segundo na região do Pantanal, Brasil (SANTURIO *et al.*, 1998) e o terceiro, recentemente, na Venezuela (PÉREZ *et al.*, 2005). Os casos observados no Brasil apresentaram cura espontânea das lesões (SANTURIO *et al.*, 1998). Já em ovinos essa doença é rara, tendo seu primeiro surto descrito no Brasil (TABOSA *et al.*, 2004), onde os animais afetados apresentaram feridas com lesões ulcerativas nas patas e também nas regiões pré-escapular e abdominal. O segundo relato de pitiose em ovinos também foi reportado no Brasil, e foi o primeiro caso de rinite granulomatosa por *Pythium insidiosum* descrito nesta espécie (SANTURIO *et al.*, 2008). A enfermidade ocorreu em quatro ovinos da raça Santa Inês e foi caracterizada por nodulações e necrose nasal, dificuldade respiratória e epistaxe intermitente (SANTURIO *et al.*, 2008).

Pitiose humana foi documentada pela primeira vez em 1985 (DE COCK *et al.*, 1987). Desde então, muitos casos têm sido relatados, com altas taxas de morbidade e mortalidade (PUPAIBOOL *et al.*, 2006). É comum no sudeste da Ásia, principalmente na Tailândia, e dois fatores contribuem para a importância da pitiose nesse país: a prevalência de β -talassemia e presença de grandes áreas alagadas usadas para

agricultura (TRISCOTT *et al.*, 1993). As infecções por *Pythium insidiosum* em humanos podem apresentar-se de três formas: lesões granulomatosas no tecido subcutâneo de pacientes talassêmicos; forma sistêmica, caracterizada por desenvolvimento de arterite crônica, trombose arterial e gangrena, atingindo geralmente a extremidade dos membros inferiores de pacientes talassêmicos; e queratite, podendo ou não estar associada à talassemia (IMWIDHAYA, 1994). No Brasil a pitiose teve seu primeiro relato em humanos no ano de 2005, na forma cutânea (BOSCO *et al.*, 2005).

O diagnóstico da pitiose, tradicionalmente, é feito pelos aspectos clínicos, histopatológicos e pelo isolamento e identificação do agente através de suas características culturais, morfológicas e reprodutivas. O exame histopatológico é auxiliar no diagnóstico e necessita de outras provas para confirmação (SANTURIO *et al.*, 2006b). A identificação precoce da doença, no entanto, torna-se difícil através desses métodos (SANTURIO *et al.*, 2006a). Atualmente, métodos como imunohistoquímica e técnicas sorológicas auxiliam e suportam um diagnóstico precoce e correto (MENDOZA *et al.*, 1996). O sucesso no isolamento de *P. insidiosum* é alto quando amostras de biópsias forem armazenadas ou transportadas à temperatura ambiente, com o acréscimo de antibióticos, entre um e três dias antes de seu processamento no laboratório (SANTURIO *et al.*, 2006a). O diagnóstico imunológico, pela técnica de ensaio imunoenzimático indireto (ELISA), possibilita a detecção de infecções precoces ou ainda subclínicas (MENDOZA *et al.*, 1997). Além de constituir-se numa poderosa ferramenta para o diagnóstico específico, também pode ser útil no monitoramento da resposta à terapia (GROOTERS, 2003). Testes de ELISA para detecção de pitiose em eqüinos, caninos, felinos, humanos e bovinos já foram desenvolvidos para diagnóstico precoce (GROOTERS *et al.*, 2002a; PÉREZ *et al.*,

2005; SANTURIO *et al.*, 2006b). Existem ainda as técnicas moleculares constituindo importante ferramenta para o diagnóstico e identificação de *Pythium insidiosum*, principalmente através de PCR (reação de polimerase em cadeia) (JAEGER *et al.*, 2002; GROOTERS & GEE, 2002b; REIS *et al.*, 2003; RIVIERRE *et al.*, 2005; BOSCO *et al.*, 2005; MENDONZA & NEWTON, 2005).

O tratamento da pitiose é influenciado principalmente pelo tamanho e evolução clínica da lesão, idade e estado nutricional do animal (MONTEIRO, 1999), tornando variável o sucesso das diferentes formas de tratamento. De acordo com Miller (1981) e Rochette *et al.* (2003), o tradicional tratamento da pitiose eqüina é cirúrgico, sendo o procedimento mais utilizado. A intervenção cirúrgica é complicada devido às estruturas anatômicas envolvidas, pois a partir da permanência de fragmentos do agente podem ocorrer recidivas (MILLER, 1981; CHAFFIN *et al.*, 1995). O tratamento cirúrgico apresenta bons resultados apenas em lesões pequenas e superficiais, onde seja possível a retirada de toda área afetada (SANTURIO *et al.*, 2006a).

No tratamento da pitiose eqüina as drogas mais utilizadas até o momento foram a anfotericina B e os compostos iodínicos, como iodeto de potássio e sódio (McMULLAN *et al.*, 1977; GONZALES *et al.*, 1979; MEIRELES *et al.*, 1993). McMullan *et al.* (1977) obtiveram 50% de eficiência associando remoção cirúrgica e anfotericina B; 30% apenas com anfotericina B e 20% não responderam aos tratamentos. Segundo Gonzales *et al.* (1979), os animais respondem ao iodeto de potássio associado à cirurgia ou isolado, porém o iodeto de potássio é mais eficiente quando usado após a extirpação cirúrgica do granuloma. Little & Kabay (1984) e Chaffin *et al.* (1992) também relataram o sucesso do tratamento cirúrgico seguido de iodeto de sódio em potros com pitiose cutânea. Entretanto, Meireles *et al.* (1993) não obtiveram sucesso em dois eqüinos tratados com iodeto de potássio endovenoso, até

mesmo quando associado à cirurgia. Utilizando outras tentativas de tratamento, Sedrish *et al.* (1997), obtiveram sucesso no uso de raio laser vermelho de alumínio, neodímio e ítrio como terapia suplementar após a remoção cirúrgica de lesões de pitiose equina. Porém, alguns autores afirmam que a ressecção cirúrgica total do granuloma combinada com imunoterapia específica para *Pythium insidiosum* é o tratamento mais indicado para cura de pitiose clínica em eqüinos (HUBERT & GROOTERS, 2002).

O tratamento da pitiose através da imunoterapia foi inicialmente proposto por MILLER (1981), que desenvolveu um imunobiológico a partir de culturas do próprio agente. Neste estudo o índice de eficiência foi de 53%; e 75% quando associado à cirurgia (MILLER & CAMPBELL, 1982). No decorrer das décadas de oitenta e noventa vários autores utilizaram a imunoterapia, principalmente em eqüinos, cujos índices de cura não foram maiores que 70% (MENDOZA *et al.*, 1992) e 83,3% (MONTEIRO, 1999). Thitithanyanont *et al.* (1998) descreveram a utilização com sucesso de um imunoterápico no tratamento de pitiose em um menino talassêmico. Dykstra *et al.* (1999) relataram o fracasso de uma vacina autógena utilizada em um cão com pitiose cutânea. Recentemente, Mendoza *et al.* (2003) testaram uma nova formulação de vacina para *Pythium insidiosum* em eqüinos e caninos e obteve cura em, respectivamente, 72% e 33% dos animais. Em contraste aos resultados obtidos em eqüinos e bovinos, a imunoterapia em felinos e caninos tem sido desapontadora (MENDOZA & NEWTON, 2005).

Até o presente momento, nenhuma das terapias antifúngicas propostas para a pitiose canina apresentaram resultados satisfatórios. Entre as drogas testadas destacam-se a anfotericina, fluconazol, cetoconazol e itraconazol (FOIL *et al.*, 1984; ENGLISH & FROST, 1984; DYKSTRA *et al.*, 1999; JAEGER *et al.*, 2002; RIVIERRE *et al.*, 2005). Segundo alguns autores, a cirurgia continua como opção mais segura para o tratamento

da pitiose canina (HNILICA, 1998, THOMAS & LEWIS, 1998; GROOTERS, 2003), embora as recidivas pós-operatórias sejam freqüentes (GROOTERS, 2003). Por esta razão, Grooters (2003) indica a terapia com itraconazol (10mg/Kg/24 horas) associado a terbinafina (5-10 mg/Kg/ 24 horas) por dois a três meses após cirurgia. Este mesmo autor relata que aproximadamente 15% dos cães com pitiose gastrintestinal responderam ao tratamento com itraconazol ou anfotericina B lipídica. Entretanto, Dykstra *et al.* (1999) utilizaram itraconazol (5 mg/kg/60 dias) em um cão não obtendo melhora. Grooters (2003) também observou melhora ou cura clínica e sorológica em alguns casos de pitiose cutânea canina e felina, quando os animais administraram terbinafina associada ao itraconazol. E afirma que, embora o número de animais que responderam a este protocolo de tratamento tenha sido baixo, a combinação antifúngica pareceu superior à terapia isolada.

O tratamento da pitiose felina também apresenta resultados variados. Bissonnette *et al.* (1991) ao realizarem o tratamento de um felino com pitiose nasal e retrobulbar com cetoconazol, observaram que houve melhora clínica, porém a lesão recidivou após o término do tratamento. Já Rakich *et al.* (2005) encontraram resultados diferentes ao tratar dois felinos com pitiose gastrintestinal. O animal tratado com a associação terbinafina/itraconazol, durante dois meses depois da retirada cirúrgica da lesão, apresentou cura clínica sem recidivas. Porém, morreu subitamente quatro meses após a cirurgia. O outro felino, que recebeu terapia com itraconazol, também por dois meses depois da retirada cirúrgica da lesão, demonstrou sorologia negativa, detectada por meio de um teste de ELISA, realizado cinco meses após tratamento. Este animal permaneceu em observação por nove meses, não apresentando recidiva da lesão durante esse período.

De forma similar aos resultados clínicos, os testes de suscetibilidade *in vitro*

com drogas antifúngicas, realizados com *Pythium insidiosum*, também tem demonstrado resultados contraditórios. Em um estudo de Sekhon *et al.* (1992) os poliênicos anfotericina B, hamycin e seus análogos não apresentaram atividade satisfatória, enquanto os azólicos fluconazol, cetoconazol e miconazol inibiram os isolados de *Pythium insidiosum* testados *in vitro*, com o miconazol apresentando os melhores resultados, seguido do cetoconazol. Entretanto, Triscott *et al.* (1993), relatando pitiose subcutânea na região periorbital de dois jovens, constataram a boa resposta ao tratamento com anfotericina B, contrariando os resultados obtidos nos testes de sensibilidade. Em outro estudo, as drogas anfotericina B, flucitosina, miconazol e griseofulvina não inibiram o crescimento deste oomiceto, enquanto o itraconazol apresentou atividade moderada e a terbinafina foi ativa contra o *Pythium insidiosum* testado (SHENEP *et al.*, 1998). De acordo com Shenep *et al.* (1998), a associação de terbinafina e itraconazol apresentou efeito sinérgico e foi utilizada, com sucesso, no tratamento de um menino com infecção facial.

A tendência ao tratamento da pitiose atualmente está voltada para os chamados inibidores de síntese de glucanas, como a caspofungina (KRAJAEJUN *et al.*, 2006). Acredita-se que esta droga seja eficiente contra este agente devido a grande quantidade de β -glucana presente na parede celular deste oomiceto (GROOTERS, 2003). Recentemente, Pereira *et al.* (2007) avaliaram a suscetibilidade *in vitro* de 27 isolados de *P. insidiosum* frente à caspofungina e ainda relacionaram estes achados com a resposta da terapia *in vivo* em coelhos com pitiose experimental. Entretanto, este estudo sugeriu que *Pythium insidiosum* é pouco suscetível à caspofungina *in vitro* e *in vivo*.

2.2 Zoosporogênese

A zoosporogênese *in vitro* é uma ferramenta fundamental, tanto para a

identificação do *Pythium insidiosum*, como para a obtenção de zoósporos, em quantidades suficientes, para desenvolvimento de testes de suscetibilidade *in vitro* e para inoculação em animais experimentais (PEREIRA *et al.*, 2008). Para obtenção de inóculo para testes de suscetibilidade *in vitro* com *Pythium insidiosum* e para reprodução experimental da pitiose em coelhos estima-se que o número ideal de zoósporos seja em torno de 20.000 zoósporos/mL (SANTURIO *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 2007).

A produção de zoósporos inicia com a formação de zoosporângios, os quais se desenvolvem a partir de hifas que colonizaram certos tipos de plantas (GROOTERS, 2003). A obtenção de zoosporângios *in vitro* é realizada através da indução da zoosporogênese em meio líquido (SHIPTON, 1985; CHAIPRASERT *et al.*, 1990). Neste contexto foram desenvolvidos protocolos para indução da zoosporogênese em laboratório (MENDOZA & PRENDAS, 1988), os quais vêm sendo aprimorados e adaptados (PEREIRA *et al.*, 2008).

O protocolo para indução da zoosporogênese, recentemente notificado, baseia-se no parasitismo de fragmentos de grama por hifas de *Pythium insidiosum* em um meio pobre em nutrientes e, a seguir, na incubação dessas gramas parasitadas em Meio de Indução rico em sais, e com temperatura e pH adequados (PEREIRA *et al.*, 2008). Este protocolo mostra que os zoósporos podem ser produzidos a partir do cultivo de *P. insidiosum* em fragmentos de grama (*Paspalum notatum*) sobre Corn Meal Agar (CMA), após 5 dias de incubação a temperatura de 37⁰C. E, após esse período de cultivo, os fragmentos de grama parasitados pelo *Pythium insidiosum* são transferidos para uma placa de Petri contendo Meio de Indução, composto pela solução A [K₂HPO₄, KH₂PO₄, (NH₄)₂HPO₄] e solução B [MgCl₂6H₂O, CaCl₂]. O Meio de Indução é obtido pela mistura de 0,5 ml da solução A e 0,1 ml da solução B em 1000 ml de água

destilada estéril. As placas de Petri contendo o Meio de Indução juntamente com a grama infectada são incubadas a 37⁰C por 24 horas (PEREIRA *et al.*, 2008). Pereira *et al.* (2008) concluíram que após este período de indução, o número máximo de zoósporos obtidos foram entre 6 e 8 horas de incubação, onde aproximadamente 87% dos isolados produziram mais de 20.000 zoósporos/mL.

2.3 Antifúngicos: itraconazol, voriconazol e terbinafina

Os derivados triazólicos mais recentes, como itraconazol e voriconazol, devem suas atividades antifúngicas, pelo menos em parte, à inibição da 14 α -esterol desmetilase dependente do citocromo P-450, responsável pela conversão do lanosterol em ergosterol (figura 1) (GHANNOUM & RICE, 1999). Por isso, comprometem a biossíntese do ergosterol na membrana citoplasmática e levam ao acúmulo de esteróis, os quais podem desagregar o arranjo compacto das cadeias acíclicas dos fosfolipídios, comprometendo as funções de determinados sistemas enzimáticos ligados a membrana, como ATPase e as enzimas de transporte de elétrons (GEORGOPAPADAKOU & WALSH, 1996), inibindo assim, o crescimento dos fungos.

O ergosterol é um componente essencial da membrana plasmática fúngica, onde regula a permeabilidade da membrana e tem um papel importante na respiração mitocondrial e fosforilação oxidativa (BOSSCHE *et al.*, 2003). A inibição da síntese de ergosterol afeta o citocromo c oxidase nas mitocôndrias; e aumenta a síntese de quitina, resultando em uma distribuição irregular da mesma (BOSSCHE, 1985). Portanto, é esperado que mudanças nos níveis de ergosterol e nas estruturas de esteróis influenciem a atividade de várias rotas metabólicas.

O itraconazol é um triazólico que apresenta atividade antifúngica contra espécies de *Candida* sp., *Malassezia* sp., *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*,

Histoplasma capsulatum, *Coccidioidis immitis* e dermatófitos (BOSSCHE *et al.*, 2003).

O itraconazol é administrado por via oral e, após absorção, sofre extenso metabolismo hepático. Sobre a farmacocinética, estudos mostraram que níveis terapêuticos ativos de itraconazol em humanos são mantidos por muito mais tempo em alguns tecidos infectados do que no plasma (BOSSCHE *et al.*, 2003). É altamente lipossolúvel, com meia vida de 36 horas, sendo excretado na urina (BENNET, 2003).

O voriconazol é o primeiro antifúngico da segunda geração dos triazólicos, de amplo espectro (RADFORD *et al.*, 1997), e sua atividade inclui a maioria das leveduras e dos fungos filamentosos (GEORGOPAPADAKOU & WALSH, 1996). É ativo em ambas as formulações, oral e parenteral, e tem sido usado para avaliar ensaios clínicos para grande variedade de patógenos fúngicos. Voriconazol tem excelente atividade *in vitro* contra *Aspergillus* spp., e variável atividade contra outros fungos filamentosos (DIEKEMA *et al.*, 2003; SCHWARTZ *et al.*, 1997). Estudos realizados com patógenos fúngicos emergentes, como *Scedosporium* (RADFORD *et al.*, 1997; CUENCA-ESTRELLA *et al.*, 1999; GOSBELL *et al.*, 2003) e *Fusarium* (RADFORD *et al.*, 1997; DIEKEMA *et al.*, 2003), demonstraram a eficácia do voriconazol *in vitro* e *in vivo*.

A terbinafina é um antifúngico oral ou tópico usado para tratar dermatófitos e onicomicose, e tem sido avaliado também em combinações com outros agentes (VAZQUEZ, 2003). Terbinafina é um composto fungicida ceratinofílico, altamente lipofílico, pertencente ao grupo das alilaminas (COSTA & GÓRNIK, 2002). É altamente efetiva contra dermatófitos *in vitro* e *in vivo* (GHANNOUM & RICE, 1999; DAVIS & BALFOUR, 1995), bem como contra fungos filamentosos, dimórficos e dematiáceos, e algumas espécies de leveduras (BALFOUR & FAULDS, 1992). Atua especificamente numa etapa precoce da biossíntese do ergosterol (GHANNOUM *et al.*, 1999), inibindo a enzima esqualeno-epoxidase (figura 1), resultando em deficiência de

esterol na membrana celular fúngica e acúmulo intracelular tóxico de esqualeno (N'DIAYE *et al.*, 2006), resultando em morte celular. Também é metabolizada no fígado pelo sistema citocromo P-450 e os metabólitos são excretados na urina (BENNET, 2003). Esta droga tem sido há muito tempo usado contra dermatófitos, mas estudos recentes indicaram uma atividade elevada de terbinafina *in vitro* contra uma grande variedade de fungos invasivos, tais como espécies de *Candida*, espécies de *Aspergillus* ou *Penicillium marneffe* (MOORE *et al.*, 2001; RYDER *et al.*, 1998).

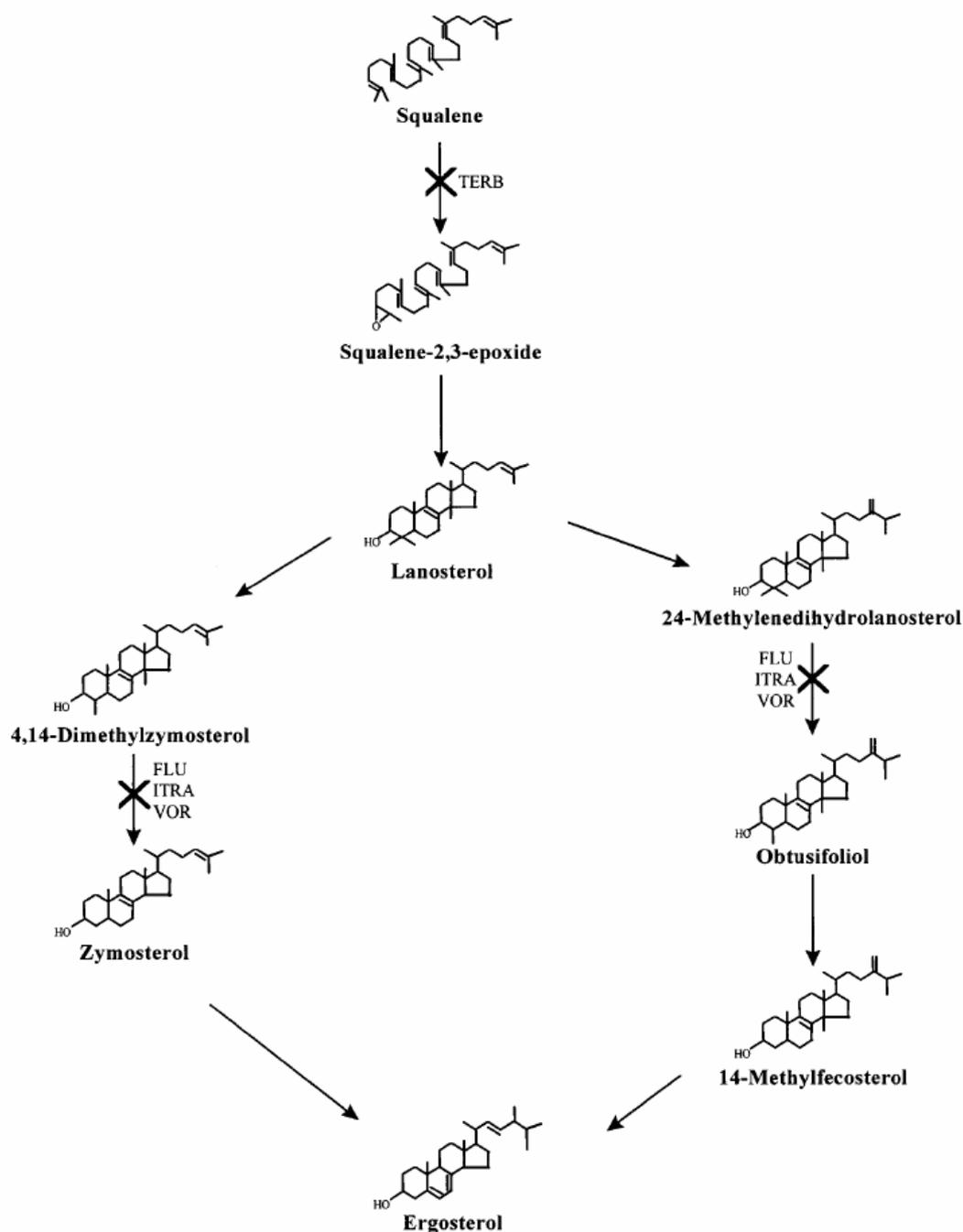


Figura 1. Rota de biossíntese do ergosterol. Etapas onde vários agentes antifúngicos exercem suas atividades inibitórias estão mostradas. TERB, terbinafina; FLU, fluconazol; ITRA, itraconazol; VOR, voriconazol. (GHANNOUM & RICE, 1999)

2.4 Combinações antifúngicas e testes de suscetibilidade *in vitro*

Voriconazol, itraconazol e outros azólicos, atuam reduzindo a síntese de ergosterol via inibição do citocromo P450 (GOSBELL *et al.*, 2003). Terbinafina

pertence ao grupo das alilaminas e atua especificamente em um estágio precursor de biossíntese do ergosterol, inibindo a enzima esqualeno-epoxidase (GOSBELL *et al.*, 2003). Ambas as enzimas estão envolvidas na rota de biossíntese do ergosterol na membrana celular fúngica (figura 1), então, teoricamente a combinação de terbinafina e azólicos poderia proporcionar sinergismo contra patógenos fúngicos pelo bloqueio seqüencial desta rota (KOWALSKY & DIXON, 1991, MELETIADIS *et al.*, 2003).

No estudo de Gosbell *et al.* (2003), a associação de voriconazol à terbinafina demonstrou sinergismo *in vitro* e foi utilizada para tratar uma infecção ortopédica causada por *Scedosporium prolificans*. O teste de suscetibilidade revelou CIMs individuais de 8 mg/L para terbinafina e 1 mg/L para voriconazol. As CIMs de voriconazol foram reduzidas a 0.03-0.25 mg/L quando terbinafina foi adicionada, e a adição de voriconazol reduziu a CIM de terbinafina a 2 mg/L (GOSBELL *et al.*, 2003).

Terbinafina associada com azólicos mostrou efeito sinérgico contra espécies de *Candida*, espécies de *Aspergillus*, *Pseudallescheria boydii*, *Scedosporium prolificans* e *Scopulariopsis brevicaulis*, algumas das quais não responderam a qualquer medicamento utilizado isoladamente (RYDER, 1999). Outros estudos ainda relatam que combinações de terbinafina com miconazol, voriconazol ou itraconazol mostraram sinergismo *in vitro* contra espécies de *Scedosporium prolificans* resistentes a diversas drogas (MELETIADIS *et al.*, 2000; MELETIADIS *et al.*, 2003). Entretanto, a significância *in vivo* dessas combinações não foi avaliada em animais. A única informação disponível provém dos relatos de caso que documentam o sucesso do uso de itraconazol ou voriconazol combinado com terbinafina em pacientes com infecções invasivas causadas por *Scedosporium prolificans*, *Pythium insidiosum* ou cromoblastomicose causada por *Fonsecaea pedrosoi* (HOWDEN *et al.*, 2003; GUPTA *et al.*, 2002; SHENEP *et al.*, 1998).

Tendo em vista a quantidade de agentes antifúngicos sistêmicos disponíveis, uma opção para o tratamento é a terapêutica combinada. A combinação ideal de drogas é aquela em que a interação entre elas é sinérgica. No entanto, mesmo na ausência de sinergismo, pode haver outros possíveis benefícios de combinações terapêuticas. Por exemplo, a combinação de duas drogas pode aumentar a taxa de homicídio microbiano e encurtar a duração do tratamento (ZHU *et al.*, 2004). Como também, a combinação de dois medicamentos diferentes, que exercem seus efeitos através de dois mecanismos diferentes, poderia evitar o aparecimento de resistência medicamentosa e ampliar o espectro da atividade da associação. Além disso, com as combinações antifúngicas, que permitem o uso de doses mais baixas de cada composto, o risco de efeitos tóxicos das drogas pode ser reduzido (ZHU *et al.*, 2004).

Segundo Johnson (2004), as vantagens dos testes de associações antifúngicas *in vitro* são: a facilidade de se avaliar grande número de concentrações; facilidade de aplicar testes estatísticos; facilidade para variar fatores técnicos; facilidade para testar múltiplos isolados; facilidade para testar cepas com tipo de resistência definido. E entre as desvantagens o autor cita que a relevância dos métodos nem sempre é clara, e que fatores do hospedeiro e a farmacocinética são ignorados (JOHNSON, 2004).

Uma das formas mais conhecidas e mais simples para avaliar efeitos de combinações *in vitro* é através da técnica de checkerboard. O termo checkerboard se refere a um modelo, utilizando tubos ou placas de microtitulação, formado para testar dois agentes antifúngicos em concentrações várias diluições acima e abaixo da CIM para o fungo a ser testado (CUENCA-ESTRELLA, 2004). O Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF) é a forma mais comum em micologia médica para relatar resultados de estudos com o método checkerboard, e é a concentração mais baixa de cada droga capaz de inibir o crescimento do microrganismo (CUENCA-ESTRELLA,

2004). O método checkerboard utiliza o ICIF para demonstrar quantitativamente que combinações de dois agentes podem apresentar efeitos inibitórios que são maiores (sinergismo) ou menores (antagonismo) que a soma dos seus efeitos individuais (ODDS, 2003). As interações são interpretadas como sinérgicas ($ICIF \leq 0,5$), indiferentes ($0,5 < ICIF \leq 4$) ou antagônicas ($ICIF > 4$) e calculadas de acordo com a fórmula: $ICIF = (CIM\ A\ em\ combinação / CIM\ A) + (CIM\ B\ em\ combinação / CIM\ B)$ (JOHNSON, 2004).

Conforme Cuenca-Estrella (2004), indiferença sugere que o efeito combinado é simplesmente o efeito da droga mais ativa quando testada separadamente. Sinergismo é uma interação positiva entre dois compostos, possuindo como principais mecanismos: 1) inibição de diferentes estágios da mesma via bioquímica; 2) melhor penetração de um antifúngico como resultado da ação de outro antifúngico na parede celular ou membrana citoplasmática; 3) interação de transporte; 4) inibição simultânea de diferentes alvos na célula fúngica; 5) atividade fungicida rápida (JOHNSON, 2004). E o antagonismo, por outro lado, é uma interação negativa, onde os mecanismos de antagonismo são: 1) ações de dois antifúngicos no mesmo sítio de ação podem resultar em baixa da habilidade do outro agente exercer sua atividade no mesmo local, ou num sítio alterado; 2) a adsorção de um agente na superfície do fungo inibe a ligação de outro agente antifúngico no sítio de ação; 3) modificação de um alvo após a prévia exposição a outro agente (JOHNSON, 2004).

As indicações para uso dos diferentes antifúngicos devem ser baseadas nos resultados obtidos com os estudos de suscetibilidade disponíveis, os quais podem oferecer informações para escolha do tratamento mais adequado (CUENCA-ESTRELLA & RODRÍGUEZ-TUDELA, 2002). Os padrões do CLSI constituem os métodos de referência mais difundidos e os que mais se tem utilizado para realizar

estudos de correlação com a clínica (CUENCA-ESTRELLA & RODRÍGUEZ-TUDELA, 2002). O documento M 38-A é um dos métodos de referência do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, formalmente National Committee for Clinical Laboratory Standards-NCCLS). M 38-A é uma norma global desenvolvida, mediante processo consensual do CLSI, para testes de diluição em caldo com a finalidade de determinar a suscetibilidade *in vitro* de fungos filamentosos à terapia antifúngica (NCCLS, 2002). Este documento apresenta a seleção de agentes antifúngicos; preparação de soluções antifúngicas padrão e diluições para a realização de testes; e os requisitos de controle de qualidade para testes de sensibilidade de fungos filamentosos que causam infecções fúngicas invasivas (NCCLS, 2002).

Este padrão descreve técnicas de macro e microdiluição, entre cujas principais características se incluem um método espectrofotométrico para a preparação do inóculo, RPMI a pH 7,0 como meio de cultivo, utilização de antifúngicos em forma de pó, leitura visual dos tubos ou placas, cálculo das CIMs por porcentagens de inibição e recomendações para controlar a qualidade dos resultados (CUENCA-ESTRELLA & RODRÍGUEZ-TUDELA, 2002). O documento focaliza ainda as condições de teste, incluindo a preparação e o tamanho do inóculo, o tempo e a temperatura de incubação, a formulação do meio e os critérios para a determinação da CIM.

Uma das limitações das técnicas recomendadas neste protocolo, M 38-A, é que as mesmas foram estabelecidas utilizando um número limitado de espécies fúngicas, portanto se têm dúvidas sobre sua aplicabilidade para outros fungos (GUARRO *et al.*, 1997). Do mesmo modo, se tem dúvidas sobre a confiabilidade e adequação de se empregar um método espectrofotométrico para preparação do inóculo (ESPINEL-INGROFF *et al.*, 1997). Por essa razão, tem sido proposto o emprego de técnicas de contagem microscópica de conídios, que permitam preparar um inóculo reproduzível

(PETRIKKOU *et al.*, 2001; PUJOL *et al.*, 2001). Contudo, recomenda-se sempre para realização de estudos de suscetibilidade seguir uma metodologia padronizada (NCCLS, 2002), em instituições sanitárias que os façam rotineiramente, utilizando um controle de qualidade estrito (CUENCA-ESTRELLA & RODRÍGUEZ-TUDELA, 2002).

3 ARTIGO CIENTÍFICO

In Vitro Activities of Voriconazole, Itraconazole, and Terbinafine Alone or in Combination against *Pythium insidiosum* Isolates from Brazil[∇]

Juliana S. Argenta,¹ Janio M. Santurio,^{2*} Sydney H. Alves,² Daniela I. B. Pereira,¹
 Ayrton S. Cavalheiro,² Andréia Spanemberg,¹ and Laerte Ferreira¹

Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Micologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil,¹ and Laboratório de Pesquisas Micológicas, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil²

Received 15 August 2007/Returned for modification 24 October 2007/Accepted 17 November 2007

We evaluated the in vitro activities of voriconazole, itraconazole, and terbinafine against 30 clinical isolates of *Pythium insidiosum* using a checkerboard macrodilution method. The combined activity of terbinafine plus itraconazole or plus voriconazole was synergic against 17% of the strains. Antagonism was not observed.

Pythium insidiosum is classified in the kingdom *Stramenopila*, class *Oomycetes* (3). It causes pythiosis, a disease mainly diagnosed in horses, dogs, and humans (14). Human pythiosis was first documented in 1985 (3). Since then, several cases have been reported, with high rates of morbidity and mortality (12). It is found mostly in Thailand, and two factors contribute to importance of pythiosis in that country: the prevalence of β -thalassemia and the presence of large flooded areas used for agriculture (18). Combinations of antifungal agents have been poorly studied in medical mycology, and their activities against *P. insidiosum* are almost unknown (17).

The aim of the present study was to investigate the in vitro activity of terbinafine (TRB) combined with itraconazole (ITC) and of TRB combined with voriconazole (VRC) against 30 isolates of *Pythium insidiosum* from animal pythiosis by using a macrodilution methodology based on the M38-A technique (10).

This study included 28 Brazilian *P. insidiosum* strains obtained from animal pythiosis (horses, dogs, and sheep) and two standard strains (ATCC 58637 and CBS 101555). The identities of the isolates were confirmed by a PCR-based assay (13). The inocula consisted of *P. insidiosum* zoospores obtained as previously described (11). These were counted in a hemacytometer and diluted in RPMI 1640 broth containing L-glutamine and buffered to pH 7.0 with 0.165 M morpholinepropanesulfonic acid, yielding a final concentration of 2×10^3 to 3×10^3 zoospores/ml. *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) and *Aspergillus flavus* (ATCC 204304) were used as quality control organisms (10).

The antifungal agents tested were TRB (Novartis) at 1 to 64 mg/liter, ITC (Sigma Pharma) at 0.125 to 32 mg/liter, and VRC (Pfizer) at 0.125 to 32 mg/liter. The interactions of the combinations (TRB-ITC and TRB-VRC) were evaluated by using the checkerboard technique according to the broth macrodilution design (2). The range of drug concentrations for use in

the checkerboard assay was the same used in individual tests. Aliquots (50 μ l) containing different concentrations of each antifungal agent (seven of TRB and nine of triazole agents) were placed in tubes to provide 63 drug combinations; 0.9 ml of inoculum was added to each tube. The interactions were interpreted as synergistic (fractional inhibitory concentration index [FICI] \leq 0.5), indifferent ($0.5 < \text{FICI} \leq 4$), or antagonistic (FICI > 4) based on the respective FICI (5), using the following formula: $\text{FICI} = (\text{MIC A in combination}/\text{MIC A}) + (\text{MIC B in combination}/\text{MIC B})$. Off-scale MICs were converted to the next higher dilution for calculation purposes.

MIC-1 and MIC-0 were used as the reading criteria for TRB and were determined as the lowest drug concentrations at which slight growth (25%) or no growth were evident compared to the positive control (hyphae under optimal growth conditions), respectively. Only MIC-0 was determined for VRC, ITC, and the combinations tested (TRB-VRC and TRB-ITC). The MIC readings were visual and assessed the presence (i.e., growth) or absence of hyphae after 24 h of incubation at 37°C. The tests were carried out in duplicate on the same day; whenever the values obtained were not coincident, the assay was repeated. Immediately after the MICs were determined, the minimal fungicidal concentrations (MFCs) were assayed by transferring 0.1 ml from each culture with a drug concentration equal to or greater than the established MIC-0 to tubes containing 0.9 ml of Sabouraud broth. The MFC was defined as the lowest drug concentration at which no growth could be observed after 24 h of incubation at 37°C.

The results revealed that TRB was the most effective drug, with MIC-0 and MFC values ranging from 0.5 to 8 mg/liter (Table 1). TRB's MIC-1 ranged between 1 and 4 mg/liter. The fungicidal activities for ITC and VRC were >16 mg/liter. The effects of both combinations, TRB-VRC and TRB-ITC, were synergistic on 17% and indifferent on 83% of the isolates. The interpretations of both interactions were equivalent for 26 isolates (87%); 23 were indifferent, and 3 showed synergistic effects (Table 2).

Regarding the methodology used, we emphasize that *P. insidiosum* zoospores can be counted, allowing for the obtainment of a standardized inoculum; furthermore, the growth in

* Corresponding author. Mailing address: Campus UFSM, Prédio 20, Sala 4139, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil. Phone and fax: 55 55 32208906. E-mail: santurio@smail.ufsm.br.

[∇] Published ahead of print on 3 December 2007.

TABLE 1. In vitro susceptibilities of *P. insidiosum* (n = 30) to ITC, VRC, and TRB

Antifungal agent	MIC (mg/liter)				MFC ₅₀ ^b (mg/liter)
	Range (MIC-0) ^a	Mode	MIC ₅₀	MIC ₉₀	
Itraconazole	16->32	>16	≥16	≥32	>16
Voriconazole	16->32	>16	≥16	≥32	>16
Terbinafine	0.5-8	4	4	4	4

^a That is, the range of the lowest drug concentration at which complete growth inhibition was observed.

^b That is, the minimal concentration exerting fungicidal effects on 50% of the isolates.

RPMI broth was excellent. Similar results were obtained by Pereira et al. (11). The disadvantages of the methodology used include the difficulty in obtaining the required amounts of zoospores and the fact that the zoospore is not a pathological form. Nevertheless, zoospores and hyphae have the same organelles and cell membrane composition (9).

In vitro susceptibility studies on *P. insidiosum* were previously performed by Sekhon et al. (16) and Shenep et al. (17), who did not describe the procedures used for inoculum preparation, the incubation time and temperature, or the reading

criteria. Shenep et al. (17) showed a pharmacological cure of pythiosis utilizing TRB plus ITC. In the present study, which describes the first results of the use of antifungal agent combinations against *P. insidiosum* in vitro, the two combinations tested displayed a synergistic effect on 17% of the 30 isolates studied and no synergism on 83% of them. We must emphasize that three isolates demonstrated synergism of both combinations, consistent with biochemical variability or inconstancy among *Pythium* strains (7). Conversely, Schurko et al. (15) showed that genotypic variability between American *P. insidiosum* strains does not exist.

Triazoles and TRB block different steps of the same fungal ergosterol biosynthesis pathway (8). It has been suggested that, when combined, one of them might increase the cell permeability to the other drug, providing support for a synergistic action. As pointed out by Dykstra et al. (4), *Pythium* is not a true fungus and does not utilize ergosterol as the main sterol in cellular membranes. Thus, it is not surprising that antifungal agents that interfere with ergosterol synthesis are ineffective against oomycetes. Moreover, the results obtained in the present study need to be correlated with in vivo assays. We believe that the MICs of the synergic combinations can be considered therapeutic because these concentrations are achievable in human and animal sera (1, 6, 17).

TABLE 2. In vitro activity of ITC plus TRB and of VRC plus TRB against *P. insidiosum* (n = 30)

Isolate ^a	ITC and TRB			TRB and VRC		
	MIC of combination (mg/liter)		FICI (interpretation) ^b	MIC of combination (mg/liter)		FICI (interpretation)
	ITC	TRB		TRB	VRC	
ATCC 58637*	0.5	2	0.5 (S)	2	0.25	0.5 (S)
CBS 101555	0.5	4	1.0 (I)	2	0.5	0.5 (S)
LAPEMI 123*	0.5	4	2.0 (I)	2	2	1.0 (I)
LAPEMI 124*	2	2	0.3 (S)	2	0.5	0.2 (S)
LAPEMI 125*	0.5	4	1.0 (I)	4	0.5	1.0 (I)
LAPEMI 126*	0.5	4	1.0 (I)	4	0.25	1.0 (I)
LAPEMI 127*	0.5	4	2.0 (I)	4	0.5	2.0 (I)
LAPEMI 128	0.5	4	1.0 (I)	2	0.5	0.5 (S)
LAPEMI 129*	1	2	1.0 (I)	4	16	2.2 (I)
LAPEMI 134	0.5	2	0.5 (S)	4	0.5	1.0 (I)
LAPEMI 135*	0.5	4	1.0 (I)	4	0.5	1.0 (I)
LAPEMI 136*	2	4	1.0 (I)	4	0.5	1.0 (I)
LAPEMI 137*	0.5	4	2.0 (I)	4	0.5	2.0 (I)
LAPEMI 138*	0.5	2	1.0 (I)	4	0.5	2.0 (I)
LAPEMI 141*	0.5	2	4.0 (I)	2	0.5	4.0 (I)
LAPEMI 142*	0.5	2	1.0 (I)	2	0.5	1.0 (I)
LAPEMI 143*	0.5	4	1.0 (I)	4	0.5	1.0 (I)
LAPEMI 144*	0.5	4	2.0 (I)	8	0.5	4.0 (I)
LAPEMI 145*	0.5	4	1.0 (I)	4	0.5	1.0 (I)
LAPEMI 147*	0.5	4	1.0 (I)	4	8	1.2 (I)
LAPEMI 148*	0.5	4	1.0 (I)	4	0.5	1.0 (I)
LAPEMI 152*	0.5	4	1.0 (I)	4	0.5	1.0 (I)
LAPEMI 156	0.5	2	0.5 (S)	4	0.25	1.0 (I)
LAPEMI 167*	0.5	4	1.0 (I)	4	0.5	1.0 (I)
LAPEMI 175*	0.5	4	2.0 (I)	4	2	2.0 (I)
LAPEMI 177*	0.5	4	2.0 (I)	4	0.25	2.0 (I)
LAPEMI 178*	0.5	4	1.0 (I)	4	0.5	1.0 (I)
LAPEMI 179*	0.5	4	2.0 (I)	4	0.5	2.0 (I)
LAPEMI 187*	0.5	1	0.1 (S)	4	0.5	0.5 (S)
LAPEMI 198*	0.5	4	2.0 (I)	4	0.5	2.0 (I)

^a *, Isolates with similar fractional inhibitory concentration index interpretations in both assays. ATCC, American Type Culture Collection; CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures; LAPEMI, Laboratory of Mycological Research.

^b Interpretations: S, synergistic; I, indifferent.

In conclusion, the findings of the present study are very encouraging because the drugs tested showed synergistic or indifferent effects but never antagonistic interactions. Combination therapy provides an alternative to monotherapy, especially for patients with invasive infections that are difficult to treat.

This study was supported by CNPq (the National Council for Scientific and Technological Development of Brazil) and by the Laboratório de Pesquisas Micológicas de Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.

REFERENCES

- Bossche, H. V., M. Engelen, and F. Rochette. 2003. Antifungal agents of use in animal health: chemical, biochemical, and pharmacological aspects. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 26:5–29.
- Cuenca-Estrella, M. 2004. Combinations of antifungal agents in therapy: what value are they? *J. Antimicrob. Chemother.* 54:854–869.
- De Cock, A. W. A. M., L. Mendoza, A. A. Padhye, L. Ajello, and L. Kaufman. 1987. *Pythium insidiosum* sp. nov. the etiologic agent of pythiosis. *J. Clin. Microbiol.* 25:344–349.
- Dykstra, M. J., N. J. H. Sharp, T. Olivry, A. Hillier, K. M. Murphy, L. Kaufman, G. A. Kunkle, and C. Puchen-Hastón. 1999. A description of cutaneous-subcutaneous pythiosis in fifteen dogs. *Med. Mycol.* 37:427–433.
- Johnson, M. D., C. MacDongall, L. Ostrosky-Zeichner, J. R. Perfect, and J. H. Rex. 2004. Combination antifungal therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:693–715.
- Martinez, R. 2006. An update on the use of antifungal agents. *J. Bras. Pneumol.* 32:449–460.
- McMeekin, D., and L. Mendoza. 2000. In vitro effect of streptomycin on clinical isolates of *Pythium insidiosum*. *Mycologia* 92:371–373.
- Meletiadis, J., J. W. Monton, J. L. Rodriguez-Tudela, J. F. G. M. Meis, and P. E. Verweij. 2000. In vitro interaction of terbinafine with itraconazole against clinical isolates of *Scedosporium prolificans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:470–472.
- Moore-Landecker, E. 1996. Zoospore fungi, p. 33–81. *In* Fundamentals of the fungi, 4th ed. Prentice Hall, Totowa, NJ.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard. CLSI document M38-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Pereira, D. I. B., J. M. Santurio, S. H. Alves, J. S. Argenta, L. Pötter, A. Spanemberg, and L. Ferreiro. 2007. Caspofungin in vitro and in vivo activity against Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals. *J. Antimicrob. Chemother.* 60:1168–1171.
- Pupaibool, J., A. Chindamporn, K. Patarakul, C. Suankratay, W. Sindhuphak, and W. Kulwicht. 2006. Human pythiosis. *Emerg. Infect. Dis.* 12: 517–518.
- Rodrigues, A., D. L. Graça, C. Fontoura, A. S. Cavalheiro, A. Henzel, S. E. Schwendler, S. H. Alves, and J. M. Santurio. 2006. Intestinal dog pythiosis in Brazil. *J. Mycol. Med.* 16:37–41.
- Santurio, J. M., A. T. Leal, A. B. M. Leal, R. Festuggato, I. Lubeck, E. S. V. Sallis, M. V. Copetti, S. H. Alves, and L. Ferreiro. 2003. Three types of immunotherapies against pythiosis insidiosum developed and evaluated. *Vaccine* 21:2535–2540.
- Schurko, A. M., L. Mendoza, C. A. Levesque, N. L. Desautels, A. W. de Cock, and G. R. Klaussen. 2003. A molecular phylogeny of *Pythium insidiosum*. *Mycol. Res.* 107:537–544.
- Sekhon, A. S., A. A. Padhye, and A. K. Garg. 1992. In vitro sensitivity of *Penicillium marneffei* and *Pythium insidiosum* to various antifungal agents. *Eur. J. Epidemiol.* 8:427–432.
- Shenep, J. L., B. K. English, L. Kaufman, T. A. Pearson, J. W. Thompson, R. A. Kaufman, G. Frisch, and M. G. Rinaldi. 1998. Successful medical therapy for deeply invasive facial infection due to *Pythium insidiosum* in a child. *Clin. Infect. Dis.* 27:1388–1393.
- Triscott, J. A., D. Weedon, and E. Cabana. 1993. Human subcutaneous pythiosis. *J. Cutan. Pathol.* 20:267–271.

TABELAS SUPLEMENTARES DO ARTIGO (NÃO PUBLICADAS)

Tabela 1: Identificação e origem dos isolados de *Pythium insidiosum* estudados.

Identificação do Isolado^a	Espécie	Origem	
ATCC 58637	Eqüino	Costa Rica	
CBS 101555	Eqüino	Rio Grande do Sul	Brasil
LAPEMI 123	Eqüino	Rio Grande do Sul	Brasil
LAPEMI 124	Eqüino	Mato Grosso do Sul	Brasil
LAPEMI 125	Eqüino	Mato Grosso do Sul	Brasil
LAPEMI 126	Eqüino	Mato Grosso do Sul	Brasil
LAPEMI 127	Eqüino	Mato Grosso do Sul	Brasil
LAPEMI 128	Eqüino	Mato Grosso do Sul	Brasil
LAPEMI 129	Eqüino	Mato Grosso do Sul	Brasil
LAPEMI 134	Eqüino	Mato Grosso do Sul	Brasil
LAPEMI 135	Eqüino	Mato Grosso do Sul	Brasil
LAPEMI 136	Eqüino	Mato Grosso do Sul	Brasil
LAPEMI 137	Eqüino	Mato Grosso do Sul	Brasil
LAPEMI 138	Eqüino	Mato Grosso do Sul	Brasil
LAPEMI 141	Eqüino	Mato Grosso do Sul	Brasil
LAPEMI 142	Eqüino	Mato Grosso do Sul	Brasil
LAPEMI 143	Eqüino	Mato Grosso do Sul	Brasil
LAPEMI 144	Eqüino	Mato Grosso do Sul	Brasil
LAPEMI 145	Eqüino	Mato Grosso do Sul	Brasil
LAPEMI 147	Eqüino	São Paulo	Brasil
LAPEMI 148	Eqüino	Rio Grande do Sul	Brasil
LAPEMI 152	Eqüino	Rio Grande do Sul	Brasil
LAPEMI 156	Eqüino	Rio Grande do Sul	Brasil
LAPEMI 167	Canino	Rio Grande do Sul	Brasil
LAPEMI 175	Eqüino	Rio Grande do Sul	Brasil
LAPEMI 177	Eqüino	Rio Grande do Sul	Brasil
LAPEMI 178	Eqüino	Mato Grosso do Sul	Brasil
LAPEMI 179	Ovino	Mato Grosso	Brasil
LAPEMI 187	Eqüino	Rio Grande do Sul	Brasil
LAPEMI 198	Eqüino	Rio Grande do Sul	Brasil

^a ATCC, American Type Culture Collection; CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures; LAPEMI, Laboratório de Pesquisas Micológicas.

Tabela 2: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) e Concentrações Fungicidas Mínimas (CFMs) de *Pythium insidiosum* (n = 30) a terbinafina.

Parâmetros de suscetibilidade	Número (%) de isolados de <i>Pythium insidiosum</i> sensíveis a terbinafina na concentração ($\mu\text{g/mL}$) de:							
	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0	16	32	64
CIM-0^a	1 (3,3%)	0	11 (36,7%)	16 (53,3%)	2 (6,7%)	0	0	0
CIM-1^b	0	1 (3,3%)	9 (30%)	2 (6,7%)	0	0	0	0
CFM	1 (3,3%)	0	7 (23,3%)	17 (56,7%)	5 (16,7%)	0	0	0

^a Concentração mais baixa da droga para inibição completa do crescimento.

^b Concentração mais baixa da droga para inibição parcial do crescimento (25%).

Tabela 3: Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) de *Pythium insidiosum* (n = 30) ao itraconazol e voriconazol.

Antifúngicos	Número (%) de isolados de <i>Pythium insidiosum</i> sensíveis ao itraconazol e voriconazol na concentração ($\mu\text{g/mL}$) \geq a:									
	0,125	0,25	0,5	1,0	2,0	4,0	8,0	16	32	
Itraconazol	0	0	0	0	0	0	0	21 (70%)	9 (30%)	
Voriconazol	0	0	0	0	0	0	0	21 (70%)	9 (30%)	

4 DISCUSSÃO

Pythium insidiosum difere dos fungos verdadeiros principalmente na composição da parede celular e da membrana plasmática. A membrana plasmática não contém esteróides, como o ergosterol, que é o componente-alvo de ação da maioria dos antifúngicos (FOIL, 1996). Devido a essas características nenhum antifúngico demonstrou eficácia clínica contra este oomiceto (FOIL, 1996), e os estudos *in vitro* foram pouco esclarecedores.

Estudos de suscetibilidade *in vitro* com *Pythium insidiosum* foram previamente desenvolvidos por Sekhon *et al.* (1992) e Shenep *et al.* (1998), porém estes autores não descreveram os procedimentos empregados para preparação do inóculo, o tempo e temperatura de incubação, nem os critérios de leitura. Este trabalho descreve o primeiro estudo sobre suscetibilidade de isolados brasileiros de *Pythium insidiosum* a combinações de agentes antifúngicos, seguindo parâmetros recomendados pelo protocolo M 38-A (NCCLS, 2002). Esse documento foi padronizado para fungos filamentosos; no entanto, *Pythium insidiosum* é um oomiceto. Desta forma, para realização dos testes, foi necessário padronizar um inóculo, o qual foi obtido por contagem de zoósporos de *Pythium insidiosum*. Segundo Pereira *et al.* (2007), este procedimento constitui-se na metodologia mais confiável para testes de suscetibilidade com este oomiceto; uma vez que zoósporos de *Pythium insidiosum* não produzem turbidez no meio e, portanto o inóculo não pode ser ajustado por espectrofotometria.

Sekhon *et al.* (1992) utilizaram suspensões de hifas de *P. insidiosum* ajustadas em espectrofotômetro como inóculo. Entretanto, Espinel-Ingroff *et al.* (1997) citam que, quando se usa suspensões de hifas como inóculo, há uma discrepância entre as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) em valores de até três vezes maiores quando as mesmas são comparadas com suspensões de conídios. Contudo, as desvantagens do

inóculo usado no presente estudo incluem a dificuldade em obter a quantidade requerida de zoósporos (PEREIRA *et al.*, 2008), e o fato que zoósporos não são a forma patológica. No entanto, zoósporos e hifas têm as mesmas organelas e composição de membrana celular (MOORE-LANDECKER, 1996). Enfatizamos ainda que a utilização do inóculo na concentração de $2-3 \times 10^3$ proporcionou excelente crescimento do *Pythium insidiosum* em caldo RPMI. Resultados similares foram obtidos por Pereira *et al.* (2007).

Método de análise por microdiluição em caldo está padronizado para bactérias, e a relação entre CIMs de antibióticos e resposta ao tratamento (interpretação dos pontos de corte) está bem definida contra estes microrganismos. Entretanto, este não é o caso para as CIMs de antifúngicos. Pontos de corte interpretados contra fungos têm sido definidos somente para alguns antifúngicos atuando contra poucas espécies fúngicas. A padronização desse método e a definição de pontos de corte estão sujeitas a um número de dificuldades, tais como a pobre reprodutibilidade inter e intra-laboratório e a dependência dos resultados sobre pH, tipo de inóculo, condições de crescimento ou meio e tempo de incubação (GIL-LAMAIGNERE & MILLER, 2004).

Neste estudo, o ponto de corte para itraconazol e voriconazol foi estabelecido de acordo com NCCLS (2002), entretanto para terbinafina foram empregados dois critérios de avaliação (inibição de 100% e de 75%). Gómez-López *et al.* (2003) adotaram o critério de inibição total do crescimento ao testar terbinafina contra espécies de zigomicetos, assim como Gil-Lamaignere & Miller (2004) utilizaram o mesmo critério de leitura ao testar a mesma droga frente *Candida albicans*, *C. dubliniensis* e *C. kefyr*. Entretanto, Garg *et al.* (2006) definiram o ponto final em 80% de inibição para terbinafina frente a espécies de *Candida*. A ausência de dados de padronização para

testes *in vitro* com oomicetos e a inexistência de CIMs definidas para esta droga justificam os diferentes critérios de leitura para terbinafina adotados neste estudo.

O primeiro estudo de suscetibilidade *in vitro* com *Pythium insidiosum* foi descrito por Sekhon *et al.* (1992), que testaram alguns antifúngicos individualmente e mostraram que os oito isolados de *P. insidiosum* testados foram mais suscetíveis ao miconazol, cetoconazol e fluconazol do que ao itraconazol, anfotericina B e 5-fluorocitosina. Shenep *et al.* (1998) utilizaram a técnica de macrodiluição em caldo RPMI para testar a suscetibilidade de um isolado humano de *P. insidiosum* frente a agentes antifúngicos *in vitro*, e mostraram a cura farmacológica de um paciente usando terbinafina associada ao itraconazol.

Sekhon *et al.* (1992) testaram itraconazol e encontraram a CIM entre 25 e 50 mg/L, enquanto Shenep *et al.* (1998) obtiveram uma CIM de 0,125 mg/L para o mesmo antifúngico. Entretanto, neste estudo, as CIMs variaram de 16 a >32 mg/L para itraconazol e voriconazol. Provavelmente estas variações de CIMs devem-se às diferentes metodologias usadas por esses autores. No sinergismo das combinações das drogas utilizadas neste estudo observou-se que a adição de terbinafina reduziu as CIMs de voriconazol a 0,25 mg/L e as de itraconazol a 0,5 mg/L, na maior parte dos ensaios. Da mesma forma, a adição dos triazóis reduziu a CIM de terbinafina de 4,0 mg/L para 1,0 ou 2,0 mg/L, na maioria dos isolados avaliados. Quando Shenep *et al.* (1998) associaram terbinafina a itraconazol a CIM de itraconazol foi reduzida para 0,015 mg/L; e demonstraram que a terbinafina na forma individual foi ativa com a CIM igual a 0,5 mg/L, e quando foi associada ao itraconazol a CIM da mesma foi de 0,008 mg/L.

Os dados sobre tratamentos clínicos para pitiose com drogas antifúngicas bem como os obtidos com testes de suscetibilidade *in vitro* são controversos. No presente estudo foram testados trinta isolados de *P. insidiosum*, obtidos de casos clínicos de

animais, utilizando a técnica de checkerboard (CUENCA-ESTRELLA, 2004). Observou-se que as associações itraconazol e terbinafina e voriconazol e terbinafina atuaram sinergicamente contra cinco isolados, evidenciando que ambas as combinações testadas exibiram um efeito sinérgico em 17% dos trinta isolados estudados. Já em 83% não houve interação. Enfatiza-se que três dos isolados indicaram sinergismo em ambas as combinações testadas, o que pode estar relacionado à variabilidade ou inconstância bioquímica entre amostras de *Pythium* (KRAJAEJUN *et al.*, 2006; McMEEKIN & MENDOZA, 2000). Embora, contrariamente, Schurko *et al.* (2003) não tenham demonstrado variabilidade genotípica entre isolados americanos de *Pythium insidiosum*.

Triazólicos e terbinafina bloqueiam diferentes etapas da mesma rota de biossíntese de ergosterol nas células fúngicas (MELETIADIS *et al.*, 2000). Desta forma, quando combinados, um dos antifúngicos deve aumentar a permeabilidade celular para o outro, o que suporta uma ação sinérgica. Como estes antifúngicos atuam primariamente inibindo a síntese de ergosterol (KOWALSKY & DIXON, 1991), ausente na membrana citoplasmática do *Pythium insidiosum* (FOIL, 1996), possivelmente outros mecanismos estão envolvidos na inibição ou morte do *Pythium insidiosum*. Isto poderia explicar os relatos de cura e suscetibilidade *in vitro* de alguns isolados. De acordo com Dykstra *et al.* (1999), *Pythium* não é um fungo verdadeiro e não utiliza ergosterol como o principal esterol nas membranas celulares. Não é surpresa que agentes antifúngicos que interferem na síntese de ergosterol não sejam efetivos contra oomicetos. Krajaejun *et al.* (2006) ao estudarem 102 casos de pitiose em humanos registrados na Tailândia relataram o sucesso no tratamento de um menino com pitiose cutânea utilizando iodeto de potássio combinado com itraconazol e terbinafina após debridamento cirúrgico. Estes autores ainda mencionam a caspofungina, entre outras drogas que inibem a síntese de glucanas, como uma alternativa para o tratamento

de pitiose. No entanto, recentemente, caspofungina foi testada contra isolados brasileiros de *Pythium insidiosum*, evidenciando baixa suscetibilidade *in vitro* e *in vivo* (PEREIRA *et al.*, 2007).

Os valores das CIMs das combinações das drogas testadas neste estudo estão dentro dos limites séricos. Segundo Kovarik *et al.* (1995), a concentração máxima encontrada de terbinafina foi de aproximadamente 1,7 mg/L, após administração oral de 500 mg. Similarmente, Bossche *et al.* (2003) encontraram concentrações séricas entre 1,7 e 2,0 mg/L após uso da mesma dosagem. Embora, Shenep *et al.* (1998) tenham encontrado concentrações de 1,0 a 2,1 mg/L de itraconazol no soro de um paciente após uso de 8 mg/kg/dia; níveis séricos acima de 3 mg/L já foram encontrados com esta droga (PATTERSON *et al.*, 1996). Martinez (2006) obteve a concentração sérica de 4,0 a 6,0 mg/L de voriconazol em um paciente humano após administração de 400 mg/dia da droga. Portanto, as CIMs obtidas nas combinações sinérgicas (variação de 0,25 a 4 mg/L) podem ser consideradas terapêuticas, uma vez que estas concentrações já foram encontradas em soro humano. Estes achados também podem justificar a atividade da terbinafina, onde 90% dos isolados testados mostraram CIM igual a 4 mg/L, o que é muito próximo as concentrações séricas encontradas por Bossche *et al.* (2003).

O sinergismo *in vitro* da terbinafina e voriconazol ou itraconazol pode ser considerado efetivo para o tratamento desta enfermidade. Entretanto é preciso seguir este estudo *in vivo*, e se possível comparar com novos relatos de uso clínico destas interações medicamentosas, em animais e/ou humanos atingidos pela pitiose, para elucidar o potencial destas drogas combinadas. Este estudo foi o primeiro passo a frente nas combinações de diferentes drogas antifúngicas, e deverá servir para investigações futuras deste oomiceto com outras drogas, combinadas ou não, seguindo este protocolo.

5 CONCLUSÕES

- 1- Zoósporos de *Pythium insidiosum* devem ser utilizados para confecção de um inóculo padrão, permitindo que todos os ensaios tenham um inóculo contendo a mesma quantidade de zoósporos.
- 2- Testes *in vitro* com *Pythium insidiosum* devem seguir o protocolo M 38-A (NCCLS, 2002) desde que se utilize um inóculo padronizado.
- 3- Terbinafina foi a droga mais efetiva, com CIM-0 e CFM variando de 0,5 a 8 mg/L; e com 90% dos isolados apresentando CIM-0 = 4 mg/L.
- 4- Voriconazol e itraconazol não mostraram eficácia e as atividades fungicidas destas drogas foram > 16 mg/L.
- 5- Ambas as combinações, terbinafina + voriconazol e terbinafina + itraconazol, apresentaram efeito sinérgico em 17% e indiferença em 83% dos isolados.
- 6- As interpretações de ambas as interações foram equivalentes para 87% dos isolados.
- 7- Antagonismo nas interações nunca foi observado.
- 8- CIMs obtidas nas combinações sinérgicas (0,25 a 4 mg/L) podem ser consideradas terapêuticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. Phylum Oomycota. In: _____. **Introductory Mycology**. 4.ed. New York: John Wiley & Sons, 1996. Chap. 23, p. 683-737.

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

BALFOUR, J.A. & FAULDS, D. Terbinafine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in superficial mycoses. **Drugs**. v. 43, p. 259-284, 1992.

BENNET, J.E. Antimicrobianos (continuação) – Agentes antifúngicos. In: GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10th ed, Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill, 2003, p. 971-983.

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

BOSCO, S.M.G. et al. Human pythiosis, Brasil. **Emerging Infectious Diseases**. v. 11, n. 5, p. 715-718, 2005.

BOSSCHE, H.V. Biochemical targets for antifungal azole derivatives: hypothesis on the mode of action. **Current Topics in Medical Mycology**. v. 1, p. 313-351, 1985.

BOSSCHE, H.V.; ENGELLEN, M.; ROCHETTE, F. Antifungal agents of use in animal health – chemical, biochemical and pharmacological aspects. **J. Vet. Pharmacol. Therap.** v. 26, p. 5-29, 2003.

BUERGELT, C. et al. Abdominal pythiosis in a bengal tiger. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**. v. 37, n. 2, p. 186-189, 2006.

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

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

CHAFFIN, M.K.; SCHUMACHER, J.; MCMULLAN, W.C. Cutaneous pythiosis in the horse. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**. v. 11, n. 1, p. 91-103, 1995.

CHAIPRASERT, A. et al. Induction of zoospore formation in Thai isolates of *Pythium insidiosum*. **Mycoses**. v. 33, n. 6, p. 317-323, 1990.

COSTA, E.O. & GÓRNIK, S.L. Agentes Antifúngicos e Antivirais. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 3ª ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, p. 430-442.

CUENCA-ESTRELLA, M. et al. Comparative in-vitro activity of voriconazole (UK-109,496) and six other antifungal agents against clinical isolates of *Scedosporium prolificans* and *Scedosporium apiospermum*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 43, p. 149-151, 1999.

CUENCA-ESTRELLA, M. & RODRÍGUEZ-TUDELA, J.L. ¿Pueden basarse las indicaciones de los antifúngicos en los estudios de sensibilidad? **Rev. Iberoam. Micol.** v. 19, p. 133-138, 2002.

CUENCA-ESTRELLA, M. Combinations of antifungal agents in therapy—what value are they? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 54, p. 854–869, 2004.

DAVIS, R. & BALFOUR, J.A. Terbinafine. A pharmacoeconomic evaluation of its use in superficial fungal infections. **Pharmacoeconomics**. v. 8, n. 3, p. 253-269, 1995.

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

DIEKEMA, D.J. et al. Activities of Caspofungin, Itraconazole, Pozaconazole, Ravuconazole, Voriconazole, and Amphotericin B against 488 Recent Clinical Isolates of Filamentous Fungi. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 41, n. 8, p. 3623-3626, 2003.

DYKSTRA, M.J. et al. A description of cutaneous-subcutaneous pythiosis in fifteen dogs. **Medical Mycology**. v. 37, n. 6, p. 427-433, 1999.

EATON, S.A. Osseous involvement by *Pythium insidiosum*. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**. v. 15, p. 485-490, 1993.

ENGLISH, P.B. & FROST, A.J. Phycomycosis in a dog. **Australian Veterinary Journal**. v. 61, n. 9, p. 291-292, 1984.

ESPINEL-INGROFF, A. et al. Multicenter evaluation of proposed standardized procedure for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 35, n. 1, p. 139-143, 1997.

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

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

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

GARG, S. et al. In vitro activity of terbinafine against Indian clinical isolates of *Candida albicans* e non-*albicans* using a macrodilution method. **Journal de Mycologie Médicale**. v. 16, p. 119-125, 2006.

GEORGOPAPADAKOU, N.H. & WALSH, T.J. Antifungal Agents: Chemotherapeutic Targets and Immunologic Strategies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 40, n. 2, p. 279-291, 1996.

GHANNOUM, M.A. & RICE, L.B. Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 12, n. 4, p. 501-517, 1999.

GIL-LAMAIGNERE, C. & MILLER, F.-M.C. Differential effects of the combination of caspofungin and terbinafine against *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* and *Candida kefyr*. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 23, p. 520-523, 2004.

GÓMEZ-LÓPEZ, A. In vitro evaluation of combination of terbinafine with itraconazole or amphotericin B against *Zygomycota*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 45, p. 199-202, 2003.

GONZÁLES, H.E. et al. Tratamiento de la ficomicosis equina subcutanea empleando yoduro de potasio. **Revista ICA**. v. XIV, n. 2, p. 115-122, 1979.

GOSBELL, I.B. et al. Cure of orthopaedic infection with *Scedosporium prolificans*, using voriconazole plus terbinafine, without the need for radical surgery. **Mycoses**. v. 46, p. 233-236, 2003.

GROOTERS, A.M. et al. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of pythiosis in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 16, n. 2, p. 142-146, 2002a.

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

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

GUARRO, J. et al. Comparison of In Vitro Antifungal Susceptibilities of Conidia and Hyphae of Filamentous Fungi. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 41, n. 12, p. 2760-2762, 1997.

GUPTA, A.K.; TABORDA, P.R.; SANZOVO, A.D. Alternate week and combination itraconazole and terbinafine therapy for chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea pedrosoi* in Brazil. **Medical Mycology**. v. 40, p. 529-534, 2002.

HENDRIX, J.W. Sterols in growth and reproduction of fungi. **Annu Rev Phytopathol**. v. 8, p. 111-130, 1970.

HNILICA, K.A. Difficult dermatologic diagnosis. Pythiosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 212, n. 8, p. 1192-1193, 1998.

HOWDEN, B.P., et al. Successful control of disseminated *Scedosporium prolificans* infection with a combination of voriconazole and terbinafine. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. v. 22, p. 111-113, 2003.

HUBERT, J.D. & GROOTERS, A.M. Treatment of equine pythiosis. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**. v. 24, n. 10, p. 812-815, 2002.

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

IMWIDTHAYA, P. Mycotic keratitis in Thailand. **Journal of Medical & Veterinary Mycology**. v.33, p. 81-82, 1995.

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

JOHNSON, M.D. et al. Combination Antifungal Therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 48, n. 3, p. 693-715, 2004.

KOVARIKY, J.M. et al. Multiple-Dose Pharmacokinetics and Distribution in Tissue of Terbinafine and Metabolites. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 39, n. 12, p. 2738-2741, 1995.

KOWALSKY, S.F. & DIXON, D.M. Fluconazole: A new antifungal agent. **Clinical Pharmacy**. v. 10, p. 179-194, 1991.

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

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

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

LITTLE, C.B. & KABAY, M.J. Fungal granuloma in a horse. **Australian Veterinary Journal**. v. 61, n. 9, p. 298-300, 1984.

McMEEKIN, D. & MENDOZA, L. In vitro effect of streptomycin on clinical isolates of *Pythium insidiosum*. **Mycologia**. v. 92, n. 3, p. 371-373, 2000.

McMULLAN, W.C. et al. Amphotericin B for the treatment of localized subcutaneous phycomycosis in the horse. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 170, p. 1293-1297, 1977.

MEIRELES, M.C.A. et al. Cutaneous pythiosis in horses from Brazil. **Mycoses**. v. 36, p. 139-142, 1993.

MELETIADIS, J. et al. In vitro interaction of terbinafine with itraconazole against clinical isolates of *Scedosporium prolificans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 44, p. 470-472, 2000.

MELETIADIS, J. et al. In vitro drug interaction modelling of combinations of azoles with terbinafine against clinical *Scedosporium prolificans* isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 47, p. 106-117, 2003.

MENDOZA, L. & ALFARO, A.A. Equine pythiosis in Costa Rica: Report of 39 cases. **Mycopathologia**. v. 94, p. 123-129, 1986.

MENDOZA, L.; ALFARO, A.A.; VILLALOBOS, J. Bone lesions caused by *Pythium insidiosum* in a horse. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**. v. 26, p. 5-12, 1988.

MENDOZA, L. & PRENDAS, J. A method to obtain rapid zoosporogenesis of *Pythium insidiosum*. **Mycopathologia**. v. 104, p. 59-62, 1988.

MENDOZA, L. et al. Evaluation of two vaccines for the treatment of pythiosis insidiosum in horses. **Mycopathologia**. v. 119, p. 89-95, 1992.

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

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

MENDOZA, L. et al. Serodiagnosis of human and animal pythiosis using an enzyme-linked immunosorbent assay. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**. v. 4, n. 6, p. 715-718, 1997.

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

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

MENDOZA, L. et al. Intestinal canine pythiosis in Venezuela confirmed by serological and sequencing analysis. **Mycopathologia**. v. 159, p. 219-222, 2005.

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

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

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

MILLER, R.I.; OLCOTT, B.M.; ARCHER, M. Cutaneous pythiosis in beef calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 186, n. 9, p. 984-986, 1985.

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

MOORE, C.B.; WALLS, C.M.; DENNING, D.W. In vitro activities of terbinafine against *Aspergillus* species in comparison with those of itraconazole and amphotericin B. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 45, p. 1882–1885, 2001.

MOORE-LANDECKER, J. Zoospore Fungi. In: _____. **Fundamentals of the Fungi**. 4 ed. New Jersey: Prentice Hall, 1996. Cap. 3, p. 33-79.

NCCLS. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard. NCCLS document M38-A [ISBN 1-56238-

470-8]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suíte 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.

N'DIAYE, B. et al. Clinical efficacy and safety of oral terbinafina in fungal mycetoma. **International Journal of Dermatology**. v. 45, p. 154-157, 2006.

ODDS, F.C. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 52, p. 1, 2003.

PATTERSON, T.F. et al. Systemic Availability of Itraconazole in Lung Transplantation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 40, n. 9, p. 2217–2220, 1996.

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

PEREIRA, D.I.B. et al. Zoosporogênese *in vitro* entre isolados do oomiceto *Pythium insidiosum*. **Ciência Rural**. 2008. No prelo.

PÉREZ, R.C. et al. Epizootic cutaneous pythiosis in beef calves. **Veterinary Microbiology**. v. 109, n. (1-2), p. 121-128, 2005.

PETRIKKOU, E. et al. Inoculum Standardization for Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi Pathogenic for Humans. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 39, n. 4, p. 1345–1347, 2001.

PUJOL, I. et al. Comparison Study of Broth Macrodilution and Microdilution Antifungal Susceptibility Tests for the Filamentous Fungi. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 40, n. 9, p. 2106–2110, 1996.

PUPAIBOOL, J. et al. Human pythiosis. **Emerging Infectious Disease**. v. 12, n. 3, p. 517-518, 2006.

RADFORD, S.A.; JOHNSON, E.M.; WARNOCK, D.W. In Vitro Studies of Activity of Voriconazole (UK-109,496), a New Triazole Antifungal Agent, against Emerging and Less-Common Mold Pathogens. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 41, n. 4, p. 841-843, 1997.

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

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

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

ROCHETTE, F.; ENGELEN, M.; BOSSCHE, H.V. Antifungal agents of use in animal health – practical applications. **J. Vet. Pharmacol. Therap.** v. 26, p. 31-53, 2003.

RYDER, N.S.; WAGNER, S.; LEITNER, I. In vitro activities of terbinafine against cutaneous isolates of *Candida albicans* and other pathogenic yeasts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 42, p. 1057–1061, 1998.

RYDER, N.S. Activity of terbinafine against serious fungal pathogens. **Mycoses**. v. 42, Suppl. 2, p. 115–119, 1999.

SANTURIO, J.M. et al. Cutaneous Pythiosis insidiosus in calves from the Pantanal region of Brazil. **Mycopathologia**. v. 141, p. 123-125, 1998.

SANTURIO, J.M.; LEAL, A.T.; MONTEIRO, A.B. Pythiose. In: LEFÈRE, P.C.; BLANCOU, J.; CHERMETTE, R. **Principales Maladies Infectieuses et Parasitaires du Bétail – Europe et Régions Chaudes**. Paris: Editions TEC & DOC et Editions Médicales Internationales. v. 2, Cap.100, p. 1231-1241, 2003a.

SANTURIO, J.M. et al. Three types of immunotherapies against pythiosis insidiosus developed and evaluated. **Vaccine**. v. 21, p. 2535-2540, 2003b.

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

SANTURIO, J.M. et al. Teste de ELISA indireto para o diagnóstico sorológico de pitiose. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 26, n. 1, p. 47-50, 2006b.

SANTURIO, J.M. et al. Granulomatous rhinitis in sheep associated with *Pythium insidiosum* infection. **The Veterinary Record**. 2008. No prelo.

SCHURKO, A. et al. Evidence for geographic clusters: Molecular genetic differences among strains of *Pythium insidiosum* from Asia, Australia, and the Americas are explored. **Mycologia**. v. 95, n. 2, p. 200-208, 2003.

SCHWARTZ, S.; MILATOVIC, D.; THIEL, E. Successful treatment of cerebral aspergillosis with a novel triazole (voriconazole) in a patient with acute leukaemia. **Br. J. Haematol.** v. 97, n. 3, p. 663-665, 1997.

SEDRISH, S.A. et al. Adjunctive use of a neodymium:yttrium-aluminum garnet laser for treatment of pythiosis granulomas in two horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 211, n. 4, p. 464-465, 1997.

SEKHON, A.S.; PADHYE, A.A.; GARG, A.K. In vitro sensitivity of *Penicillium marneffeii* and *Pythium insidiosum* to various antifungal agents. **Eur. J. Epidemiol.** v. 8, n. 3, p. 427-432, 1992.

SHENEP, J.L. et al. Successful medical therapy for deeply invasive facial infection due to *Pythium insidiosum* in a child. **Clinical Infectious Disease**. v. 27, n. 6, p. 1388-1393, 1998.

SHIPTON, W.A. Zoospore induction and release in a *Pythium* causing equine phycomycosis. **Trans. Br. Mycol. Soc.** v. 84, n. 1, p. 147-155, 1985.

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

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

THOMAS, R & LEWIS, D. Pythiosis. **Selecciones Veterinarias**. v. 8, n. 3, p. 313-319, 1998.

TRISCOTT, J.A.; WEEDON, D.; CABANA, E. Human subcutaneous pythiosis. **Journal of Cutaneous Pathology**. v. 20, n. 3, p. 267-271, 1993.

VAZQUEZ, J.A. Combination antifungal therapy against *Candida* species: the new frontier – are we there yet? **Medical Mycology**. v. 41, p. 355-368, 2003.

WELLEHAN, J.F. et al. Pythiosis in a dromedary camel (*Camelus dromedarius*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**. v. 35, n. 4, p. 564-568, 2004.

ZHU, L.; GIL-LAMAIGNERE, C.; MÜLLER, F.C. Effects of several antifungal drug combinations against clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* from China. **Mycoses**. v. 47, p. 319–325, 2004.