

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**CONIDIOBOLOMICOSE RINOFARÍNGEA OVINA NO ESTADO DO MATO GROSSO:
DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO, HISTOPATOLÓGICO E MOLECULAR.**

Daphine Ariadne Jesus De Paula

Cuiabá - MT

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**CONIDIOBOLOMICOSE RINOFARÍNGEA OVINA NO ESTADO DO MATO GROSSO:
DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO, HISTOPATOLÓGICO E MOLECULAR.**

Autora: Daphine Ariadne Jesus de Paula

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Valéria Dutra

Co-Orientador: Prof. Dr. Luciano Nakazato.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração: Sanidade de animais domésticos e selvagens, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Cuiabá - MT

2010

FOLHA DE APROVAÇÃO

ALUNO (A): DAPHINE ARIADNE JESUS DE PAULA

TÍTULO: Conidiobolomicose rinofaríngea ovina no Estado do Mato Grosso: diagnóstico microbiológico, histopatológico e molecular.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Mato Grosso para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Aprovada em 23 de Fevereiro de 2010.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Valéria Dutra
(Departamento de Clínica Médica Veterinária/FAMEV/UFMT)

Prof. Dr. Edson Moleta Colodel
(Departamento de Clínica Médica Veterinária/FAMEV/UFMT)

Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa
(Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF)

AGRADECIMENTOS

À professora Valéria Dutra, pela orientação, confiança, apoio e o incentivo à pesquisa.

Ao professor Luciano Nakazato, pela atenção, colaboração e sugestões durante todo o experimento.

Ao prof. Edson Moleta Colodel pelo auxílio durante as coletas e toda a colaboração durante o experimento.

Aos companheiros de laboratório Givago, Maria Fernanda, Isabela, Danny, Ramirie, Suen, Seu Zé, Cristiane, Laila, Gustavo, Maria Cristina, Matheus, Ana Carolina e Letícia pela convivência de trabalho.

Aos meus queridos amigos João e Arleana, pessoas muito especiais e que estarão sempre presentes em meu coração.

Aos amigos do mestrado, José Nivaldo, Andréia Tirloni, Tatiana, Magyda e Nívea pelo carinho.

Ao Rafael e a minha família por todo amor, paciência, carinho e incentivo aos meus estudos.

Aos professores e funcionários do Hospital Veterinário da UFMT.

Aos Professores Augusto Schrank e Marilene Vainstein do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por cederem o laboratório para a realização de uma parte do experimento e ao Paulo e o Broetto pela ajuda nas análises.

A CAPES pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

RESUMO

Conidiobolomicose rinofaríngea ovina no Estado Do Mato Grosso: diagnóstico microbiológico, histopatológico e molecular.

A conidiobolomicose é uma doença granulomatosa que acomete humanos e animais, principalmente ovinos em regiões tropicais, causada pelo fungo *Conidiobolus* spp.. O objetivo do presente estudo foi determinar molecularmente a espécie de *Conidiobolus* envolvida na rinossinusite ovina no Estado do Mato Grosso. Nove ovinos foram encaminhados e necropsiados no Laboratório de Patologia Veterinária - HOVET/UFMT. Amostras das lesões nasais foram enviadas ao Laboratório de Microbiologia Veterinária/UFMT e semeadas em Ágar Sabouraud Dextrose acrescido de 0,05g/litro de cloranfenicol, incubadas à 30° C durante 7 dias. Os isolados foram macerados em nitrogênio líquido e submetidos à extração do DNA genômico de acordo com o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987). Posteriormente, foi realizada a técnica de PCR com iniciadores sintéticos universais para fungos que codificam a sequência parcial do gene 18S rRNA. Os produtos de amplificação foram purificados e o DNA sequenciado. Dos nove casos estudados, em 5 animais foram isoladas cepas de *Conidiobolus* sp. em Ágar Sabouraud dextrose, morfologicamente as colônias apresentaram-se planas e glabras, de coloração creme e rodeadas por colônias satélites, microscopicamente o fungo apresentou hifas cenocíticas, com paredes finas e a presença de conídios esféricos, com papilas basais de bordas arredondadas. Através da técnica de PCR, todas as amostras amplificaram um fragmento de aproximadamente 549 pb e após sequenciamento apresentaram 97% de identidade ao gene 18S rRNA do fungo *C. lamprauges*. Este trabalho descreve *C. lamprauges* como o agente da zigomicose ovina no estado, porém mais estudos devem ser realizados para o desenvolvimento de um novo e rápido teste diagnóstico, tratamento e prevenção desta patologia.

Palavras Chave: Infecção nasal, PCR, zigomicetos.

ABSTRACT

Rhinopharyngeal conidiobolomycosis in sheeps in the State of Mato Grosso: microbiological diagnostic, pathological and molecular.

The conidiobolomycosis is a granulomatous disease that affects humans and animals, especially sheep in tropical regions, caused by *Conidiobolus* spp.. The aim of this study was to determine the molecular species of *Conidiobolus* involved in rhinosinusitis sheep in the state of Mato Grosso. Nine sheep were necropsied and directed the Laboratory of Veterinary Pathology - Veterinary Hospital/ UFMT. Samples of nasal lesions were sent to the Laboratory of Veterinary Microbiology/UFMT and plated on Sabouraud dextrose agar plus 0.05 g / liter of chloramphenicol, incubated at 30 ° C for 7 days Isolates were macerated in liquid nitrogen and subjected to genomic DNA extraction according to the protocol described by Doyle and Doyle (1987). This was followed by a PCR with synthetic universal primers for fungi that encode partial sequence of 18S rRNA gene. The amplification products were purified and DNA sequenced. Of the nine cases studied, in 5 animals were isolated strains of *Conidiobolus* sp. on Sabouraud dextrose agar, the colony morphology is flat and smooth, pale cream and surrounded by satellite colonies, microscopically the fungus presented coenocyte hyphae with thin walls and the presence of conidia spherical, with basal buds rounded edges. By PCR, all samples amplified a fragment of approximately 549 bp and after sequencing showed 97% identity to the 18S rRNA gene of the fungus *C. lamprauges*. This paper describes *C. lamprauges* as the agent of zygomycosis in sheeps in the state, but more studies should be conducted to develop a new rapid diagnostic test, treatment and prevention of this disease.

Key words: Nasal infection, PCR, zygomycetes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1:** OVINOS COM CONIDIOBOLOMICOSE APRESENTANDO MARCADA DIFICULDADE RESPIRATÓRIA.....29
- FIGURA 2:** CABEÇA DE OVINO COM CONIDIOBOLOMICOSE SECCIONADA LONGITUDINALMENTE E CARACTERÍSTICA DA LESÃO MICROSCÓPICA VISUALIZADA PELA COLORAÇÃO DE PRATA-METANAMINA (GROCOTT).....30
- FIGURA 3:** COLÔNA DE *C. lamprauges* CULTIVADA EM ÁGAR SABOURAUD DEXTROSE A 37°C30
- FIGURA 4:** DENDOGRAMA DOS ISOLADOS DE *Conidiobolus* spp. DE OVINOS COM ZIGOMICOSE RINOFARÍNGEA31

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1: SINAIS CLÍNICOS OBSERVADOS NOS CINCO OVINOS COM CONDIOBOLOMICOSE RINOFARÍNGEA PROCEDENTES DE TRÊS MUNICÍPIOS DO ESTADO DO MATO GROSSO..... | 28 |
|---|----|

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------|---|
| % | por cento |
| ° | grau |
| ° C | grau Celsius |
| AST | aspartato aminotransferase |
| CTAB | cetyl trimethyl ammonium bromide |
| DNA | ácido desoxirribonucléico |
| dNTP | desoxirribonucleosídeo(s) trifosfato(s) |
| EDTA | ácido etileno-diamino-tetra-acético |
| FA | fosfatase alcalina |
| g | grama |
| GGT | gama glutamil transpeptidase ou transferase |
| HCl | ácido clorídrico |
| KCl | cloreto de potássio |
| M | molar |
| mg | miligrama |
| MgCl ₂ | cloreto de magnésio |
| ml | mililitro |
| mM | milimolar |

| | |
|-----------------|---|
| NaCl | cloreto de sódio |
| pb | pares de bases |
| PCR | Reação em cadeia pela polimerase – <i>polymerase chain reaction</i> |
| pH | potencial hidrogeniônico |
| μmol | picomol |
| qsp | quantidade suficiente para |
| rDNA | DNA ribossômico |
| TE | Tris-EDTA |
| Tris | 2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol |
| U | unidade de atividade enzimática |
| UV | ultra-violeta |
| V | volt |
| μg | micrograma |
| μl | microlitro |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 12 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 14 |
| 2.1. Etiologia da conidiobolomicose | 14 |
| 2.2. Epidemiologia..... | 16 |
| 2.3. Aspectos clínicos | 17 |
| 2.4. Conidiobolomicose em ovinos..... | 20 |
| 2.5. Diagnóstico | 21 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 24 |
| 3.1. Coleta das amostras | 24 |
| 3.2. Isolamento | 24 |
| 3.3. Extração de DNA dos isolados do <i>Conidiobolus</i> | 25 |
| 3.4. Caracterização molecular dos isolados pela técnica de PCR | 26 |
| 3.5. Sequenciamento e análise taxonômica..... | 26 |
| 4. RESULTADOS | 28 |
| 5. DISCUSSÃO | 32 |
| 6. CONCLUSÃO | 36 |
| REFERÊNCIAS | 37 |
| APÊNDICE A – ARTIGO CIENTÍFICO | 50 |

INTRODUÇÃO

As micoses são um grupo de doenças com uma grande variedade de manifestações clínicas (BLANCO e GARCIA, 2008). Até poucos anos atrás, os fungos patogênicos eram um grupo bem definido, limitados a regiões geográficas e conhecidos pelos clínicos, entretanto, a situação tem mudado consideravelmente, e novos agentes estão continuamente aparecendo (GUARRO *et al.*, 1999). Tais patógenos oportunistas têm incentivado a pesquisas voltadas a descoberta de fatores de virulência abrindo novas perspectivas para elucidação da interação patógeno-hospedeiro.

Entomophthorales é uma importante ordem da classe dos *Zigomicetos*, pois são responsáveis por produzir micoses subcutâneas e mucocutâneas. As zigomicoses são conhecidas também como ficomicoses, referindo-se a um grande grupo de fungos dessa classe que podem causar infecções fúngicas (BAUER *et al.*, 1997) principalmente por espécies dos gêneros *Basidiobolus* e *Conidiobolus*.

O gênero *Conidiobolus* é um patógeno oportunista pertencente à classe dos *Zigomicetos*, ordem *Entomophthorales*, causador da conidiobolomicose em humanos e animais (TAYLOR *et al.*, 1987; HUMBER *et al.*, 1989; JAFFEY *et al.*, 1990; CARRIGAN *et al.*, 1992; GUGNANI, 1992; KETTERER *et al.*, 1992; WALSH *et al.*, 1994; KRISHNAN *et al.*, 1998; AYDOGDU *et al.*, 2001; MORRIS *et al.*, 2001; VALLE *et al.*, 2001; SHARMA *et al.*, 2003; TADANO *et al.*, 2005; BITTENCOURT *et al.*, 2006; THOMAS *et al.*, 2006; DIWAKAR *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2007a; BOABAID *et al.*, 2008; FISCHER *et al.*, 2008; MADSON *et al.*, 2009; MICHAEL *et al.*, 2009; RADHAKRISHNAN *et al.*, 2009). São organismos encontrados principalmente em regiões de clima tropical e subtropical, em solos e vegetais em decomposição (EMMONS e BRIDGES, 1961; AJELLO, 1988; CARRIGAN *et al.*, 1992; GUGNANI, 1992) com um elevado grau de adaptabilidade expresso por suas características patológicas, biológicas e ecológicas (SÁNCHEZ *et al.*, 2001).

No Brasil a doença é frequente em rebanhos ovinos do Estado do Piauí (SILVA *et al.*, 2007a), Paraíba (RIET-CORREA *et al.*, 2008), Santa Catarina (FURLAN *et al.*, 2007), Rio Grande do Sul (PEDROSO *et al.*, 2009) e também com relatos no Mato Grosso (BOABAID *et al.*, 2008) causando lesões subcutâneas graves e morte dos animais.

A ovinocultura é uma atividade econômica com crescimento no plantel, conseqüente a ampliação do mercado para a carne e pele desses animais. Segundo dados fornecidos pelo IBGE (2010), em 2007 o efetivo de ovinos no país é de 16.239 milhões de animais, apresentando aumento de 1,4% com relação ao ano anterior, a região Centro-Oeste deteve 5% do plantel. O estado do Mato Grosso aponta um rebanho de 469 mil cabeças. No entanto, o controle sanitário e dados relacionados às patologias que vem acometendo esses animais nessa região ainda é escasso. O aumento de casos de conidiobolomicose no estado tem aumentado (BOABAID *et al.*, 2008), e isso contribuiu para o interesse em identificar a espécie de *Conidiobolus* sp. envolvida na rinossinusite ovina na região.

Sabe-se que o *Conidiobolus* sp. causa perdas econômicas consideráveis em rebanhos, relacionadas ao aumento do custo com medicamentos para o tratamento dos animais e a perda de animais por diagnóstico tardio, fazendo do *Conidiobolus* sp. um fungo de importância veterinária. Com isso, objetivou-se estudar as características moleculares deste patógeno no Estado do Mato Grosso, na tentativa de minimizar as perdas econômicas geradas por este fungo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ETIOLOGIA DA CONIDIOBOLOMICOSE

Os fungos da ordem *Entomophthorales*, são capazes de causar micoses cutâneas e subcutâneas em humanos e animais (TAYLOR *et al.*, 1987; HUMBER *et al.*, 1989; JAFFEY *et al.*, 1990; CARRIGAN *et al.*, 1992; GUGNANI, 1992; KETTERER *et al.*, 1992; WALSH *et al.*, 1994; KRISHNAN *et al.*, 1998; AYDOGDU *et al.*, 2001; MORRIS *et al.*, 2001; VALLE *et al.*, 2001; SHARMA *et al.*, 2003; TADANO *et al.*, 2005; BITTENCOURT *et al.*, 2006; THOMAS *et al.*, 2006; DIWAKAR *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2007a; BOABAID *et al.*, 2008; FISCHER *et al.*, 2008; MADSON *et al.*, 2009; MICHAEL *et al.*, 2009; RADHAKRISHNAN *et al.*, 2009). A palavra *Entomophthorales* tem sua origem na palavra grega “*Entomon*,” que significa inseto, refletindo sua identificação original como entomopatógeno. Os organismos dessa ordem são capazes de expelir ativamente esporos assexuais e possuem ainda sua morfologia micelial compacta e glabra. Todas estas características definem esta ordem como pertencente a classe dos Zigomicetos (KWONG-CHUNG e BENNETT, 1992; ALEXOPOULOS *et al.*, 1996).

Conidiobolus spp. são também termofílicos, crescem em Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) e Ágar Batata Dextrose (BDA) a temperatura de 22 a 37°C. No SDA as colônias apresentam-se esbranquiçadas ou pigmentadas com aspecto enrugado e formação de colônias satélites. Seu crescimento rápido a 37°C, principalmente em amostras clínicas quando comparadas com outras obtidas de fontes ambientais, sugerem que este pode ser um fator de virulência deste organismo (KWONG-CHUNG e BENNETT, 1992). King e Jong (1976) sugerem que o rápido crescimento a 37°C pode indicar uma adaptação do fungo ao crescimento em mamíferos. Microscopicamente o fungo caracteriza-se pela presença de inúmeras hifas, com poucos septos, ramificações irregulares, conídios arredondados com diâmetro de 14-22 µm, paredes finas e papilas proeminentes (MORRIS *et al.*, 2001).

In vitro o fungo é capaz de produzir elastases, esterases, colagenases, lipases e quitinases, que são enzimas que envolvidas na patogênese da conidiobolomicose

(ISHIKAWA *et al.*, 1979). Acredita-se que algumas proteases desempenham o papel de descarga dos conídios de *C. coronatus* (PHADATARE *et al.*, 1992).

Segundo Gugnani (1992), as proteases são rapidamente secretadas no tecido infectado no início da infecção podendo degradar proteínas que disponibilizam aminoácidos para o crescimento do fungo. Algumas lipases, que são secretadas posteriormente, podem hidrolisar ácidos graxos presentes em tecidos subcutâneos. Estudos sugerem que a atividade das collagenases seja importante na invasão do tecido muscular (GUGNANI, 1992; RIBES *et al.*, 2000). O papel destas enzimas no processo de infecção tem sido estudado principalmente em cutículas de insetos (FREIMOSER *et al.*, 2003; WIELOCH *et al.*, 2004; KEDRA e BOGUŚ, 2006; BOGUŚ *et al.*, 2007; GOŁEBIOWSKI *et al.*, 2008), pois se acredita que estas enzimas são componentes importantes na eficiência da infecção.

Uma vez a infecção estabelecida, os neutrófilos desempenham papel crucial em combater a infecção fúngica no hospedeiro. Apesar de um grande tamanho dos elementos das hifas e na inabilidade destas serem ingeridas por células inflamatórias, os neutrófilos ainda são capazes de mediar a resposta imunológica no hospedeiro, eliminando o fungo. Estes são atraídos quimiotaticamente pelas hifas e usando o seu sistema citotóxico oxidativo, causam danos nas estruturas fúngicas (RIBES *et al.*, 2000).

A reação aguda é caracterizada pela presença de neutrófilos, linfócitos, plasmócitos além dos eosinófilos, no local da infecção. Já a reação crônica é composta de macrófagos, células epitelióides, células gigantes e também eosinófilos e linfócitos (CHANDLER E WATTS, 1987; GUGNANI, 1992). Os fragmentos das hifas podem ser fagocitados dentro das células gigantes, que estão dispersas no tecido, e cada fragmento é envolto por uma bainha eosinofílica.

2.2 EPIDEMIOLOGIA

A conidiobolomicose é causada principalmente pelas seguintes espécies, *Conidiobolus coronatus*, *C. incongruus* e *C. lamprauges*. O *C. coronatus* é o principal patógeno humano, causando tanto infecções localizadas como disseminadas (MORAES *et al.*, 1994; VALLE *et al.*, 2001; TADANO *et al.*, 2005; TAN *et al.*, 2005; BITTENCOURT *et al.*, 2006; HOOGENDIJK *et al.*, 2006; THOMAS *et al.*, 2006; FISCHER *et al.*, 2008; MICHAEL *et al.*, 2009; RADHAKRISHNAN *et al.*, 2009), *C. incongruus* é responsável por várias infecções invasivas em humanos e animais (BUSAPAKUM *et al.*, 1983; WALSH *et al.*, 1994; STEPHENS e GIBSON, 1997; SHARMA *et al.*, 2003; MADSON *et al.*, 2009) e o *C. lamprauges* é patogênico para cavalos e causador da conidiobolomicose na forma rinofaríngea em ovinos (HUMBER *et al.*, 1989; VILELA *et al.*, 2009). Esses fungos são saprofíticos, comumente encontrados no solo, folhas secas e insetos em regiões de clima tropical e subtropical (EMMONS *et al.*, 1977; KWONG-CHUNG e BENNETT, 1992; GUGNANI, 1999).

O modo de transmissão do *Conidiobolus* não está bem esclarecido, mas acredita-se que seja via inalação dos esporos presentes no ambiente, que são implantados na mucosa nasal, outro meio provável de infecção ocorre através da implantação traumática dos esporos por picada de insetos (CLARK, 1968; GOODMAN, 1991; GUGNANI, 1992; AINSWORTH e AUSTWICK, 1955; CARRIGAN *et al.*, 1992; KETTERER *et al.*, 1992). A presença do fungo no ambiente pode ser aumentada pela intensa concentração de chuvas, e a germinação do fungo não ocorre em níveis de umidade abaixo de 95% e é máximo em umidade relativa próxima a 100% (YENDOL, 1968).

A zigomicose humana causada por espécies dos gêneros *Basidiobolus* e *Conidiobolus* são registradas em várias partes do mundo, principalmente no Brasil, predominando as formas subcutâneas com localização rinofacial (CASTRO E SOUZA FILHO *et al.*, 1992). Aproximadamente 35 casos de rinoentomofotoromicoses em humanos foram relatados no Brasil até o ano de 2006 (BITTENCOURT *et al.*, 2006),

com uma frequência elevada na região Nordeste (CASTRO E SOUZA FILHO *et al.*, 1992; COSTA *et al.*, 1991; MORAES *et al.*, 1994; VALLE *et al.*, 2001; BITTENCOURT *et al.*, 2006). A enfermidade já foi relatada também em humano no Estado do Mato Grosso (TADANO *et al.*, 2005).

No Brasil, a enfermidade em animais tem ocorrido comumente em rebanhos ovinos da região Nordeste e Centro-Oeste (SILVA *et al.*, 2007a; SILVA *et al.*, 2007b; BOABAID *et al.*, 2008; RIET-CORREA *et al.*, 2008), e esporadicamente em rebanhos do Rio Grande do sul (PEDROSO *et al.*, 2009) e Santa Catarina (FURLAN *et al.*, 2007). Um estudo epidemiológico da zigomicose foi realizado no estado do Piauí por SILVA *et al.*, (2007b), este estudo demonstrou uma incidência anual média da doença de 2,80% e uma taxa de letalidade de 100%. A conidiobolomicose ovina em outros países e descrita como uma doença geralmente fatal, com morbidade variando de 0,01 a 1% e atinge animais de todas as idades (CARRIGAN *et al.*, 1992; KETTERER *et al.*, 1992; MORRIS *et al.*, 2001).

2.3 ASPECTOS CLÍNICOS

O primeiro caso de infecção causada por *Conidiobolus* sp. foi descrito no Texas em 1961, causando lesões granulomatosas nasais em um equino, (EMMONS e BRIDGES, 1961). Em humanos o primeiro caso foi reportado na Jamaica em 1963 (BRAS *et al.*, 1963). A maioria dos indivíduos afetados são agricultores residentes em países de regiões tropicais e subtropicais, como a África (BRAS *et al.*, 1963; MARTINSON, 1972; OKAFOR e GUGNANI, 1983; GUGNANI, 1992; KHALIL *et al.*, 1999), Índia (THAMMAYYA *et al.*, 1995; SHARMA *et al.*, 2003; MAITI *et al.*, 2004; THOMAS *et al.*, 2006; DIWAKAR *et al.*, 2007; PUJARY *et al.*, 2008; MICHAEL *et al.*, 2009; RADHAKRISHNAN *et al.*, 2009) e América do Sul (CASTRO E SOUZA FILHO *et al.*, 1992; SEGURA *et al.*, 1981; VALLE *et al.*, 2001; PÉREZ *et al.*, 2004; BITTENCOURT *et al.*, 2006), mas existem relatos em países como Turquia (AYDOGDU *et al.*, 2001) e

China (YANG *et al.*, 2009). TADANO *et al.*, (2005) relataram o primeiro caso humano de zigomicose nasofacial causada pelo *Conidiobolus coronatus*, no Estado do Mato Grosso, Brasil.

Os casos ocorrem frequentemente em adultos e crianças, raramente envolvendo adolescentes (CLARK, 1968; MARTINSON, 1972; GUGNANI, 1992; MORAES *et al.*, 1994; VALLE *et al.*, 2001; TAN *et al.*, 2005; HOOGENDIJK *et al.*, 2006; THOMAS *et al.*, 2006; FISCHER *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2009). As infecções ocorrem em pacientes saudáveis, porém indivíduos imunocomprometidos podem também ser infectados (JAFFEY *et al.*, 1990; WALSH *et al.*, 1994). Em humanos a doença começa com uma tumefação na mucosa do turbinado inferior e se espalha para outras partes da cavidade nasal, seios paranasais e tecido subcutâneo do nariz atingindo os lábios. A tumefação é seguida de eritema e espessamento da pele da região nasal, o que leva a uma deformação monstruosa em casos crônicos (BITTENCOURT *et al.*, 2006). A conidiobolomicose humana é causada principalmente pelo *C. coronatus* e esporadicamente por *C. incongruus* (BUSAPAKUM *et al.*, 1983; SHARMA *et al.*, 2003).

Nos animais a doença foi descrita em equinos (MILLER e CAMPBELL, 1982; MILLER, 1983; MENDONZA e ALFARO, 1985; HUMBER *et al.*, 1989; STEIGER e WILLIAMS, 2000), cães (BAUER *et al.*, 1997; GROOTERS, 2003), ovinos (CARRIGAN *et al.*, 1992; KETTERER *et al.*, 1992; MORRIS *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2007a; BOABAID *et al.*, 2008; RIET-CORREA *et al.*, 2008; PEDROSO *et al.*, 2009; VILELA *et al.*, 2009), muares (JOHNSTON *et al.*, 1967) golfinhos (MEDWAY, 1980), macacos (ROY e CAMERON, 1972), lhamas (MOLL *et al.*, 1992; FRENCH e ASHWORTH, 1994) e cervos (STEPHENS e GIBSON, 1997; MADSON *et al.*, 2009).

Os achados clínicos em animais podem variar de acordo com a localização das lesões na cavidade nasal (CARRIGAN *et al.*, 1992; STEPHENS e GIBSON, 1997; SILVA *et al.*, 2007a). Em ovinos os sinais clínicos da conidiobolomicose dependem da forma da doença. Na forma rinofaríngea caracterizaram-se por anorexia, febre, apatia, depressão, inapetência, secreção nasal serosanguinolenta, serosa, mucosa e/ou hemorrágica, dificuldade respiratória, respiração ruidosa. Observa-se também assimetria crânio-facial e exoftalmia com ou sem perda da visão. Podem ocorrer sinais

nervosos incluindo depressão, cabeça baixa e pressão da cabeça contra objetos, incoordenação motora e morte dos animais (KETTERER *et al.*, 1992; MORRIS *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2007b; BOABAID *et al.*, 2008; RIET-CORREA *et al.*, 2008; PEDROSO *et al.*, 2009). O curso clínico agudo ou subagudo e a morte do animal relacionam-se a variações na virulência do agente, susceptibilidade do ovino e ausência de tratamento antifúngico (SILVA *et al.*, 2007b).

HUMBER *et al.*, (1989) descreveram um caso de conidiobolomicose causada por *Conidiobolus lamprauges* em um equino que apresentava epistaxe, perda de peso, presença de uma massa protuberante contendo numerosas concreções cilíndricas de coloração amarela visualizadas na porção caudal da nasofaringe.

Em cães e gatos o trato digestório é o mais afetado e a letalidade é muito alta, as lesões podem aparecer como massas grandes e ulceradas no palato (BAUER *et al.*, 1997).

Drogas antifúngicas como o iodeto de potássio, clotrimazol, anfotericina B, cetoconazol, itraconazol, miconazol, voriconazol, fluconazol e terbinafina são utilizadas no tratamento das infecções por *Conidiobolus* spp. Em ovinos com conidiobolomicose rinofaríngea o iodeto de potássio foi usado, porém sem melhora clínica (BOABAID *et al.*, 2008). Estudos em humanos acometidos pela zigomicose quando tratados com drogas antifúngicas mostram um grau variado de sucesso (MORAES *et al.*, 1994; FOSS *et al.*, 1996; GUGNANI, 1999; SHARMA *et al.*, 2003; BITTENCOURT *et al.*, 2006; THOMAS *et al.*, 2006; DIWAKAR *et al.*, 2007; FISCHER *et al.*, 2008; MICHAEL *et al.*, 2009). Procedimentos cirúrgicos podem ser realizados também para remover nódulos e permitir a reconstrução facial (VALLE *et al.*, 2001; RADHAKRISHNAN *et al.*, 2009).

2.4 CONIDIOBOLOMICOSE EM OVINOS

Em ovinos a conidiobolomicose é uma doença geralmente fatal, atingindo animais de todas as idades (CARRIGAN *et al.*, 1992; KETTERER *et al.*, 1992; MORRIS *et al.*, 2001). Na região nordeste a doença foi por muito tempo diagnosticada como Tumor Intranasal Enzoótico, mas estudos histopatológicos e microbiológicos realizados por Silva *et al.*, (2007a) constataram tratar-se de uma infecção por *Conidiobolus* spp.

Nestes ovinos, duas formas clínicas da enfermidade são diagnosticadas: uma rinofacial, afetando o vestíbulo nasal, união muco-cutânea do nariz, lábio superior, pele do focinho, região proximal da face e palato duro (SILVA *et al.*, 2007a; RIET-CORREA *et al.*, 2008); e outra forma é a rinofaríngea, afetando a região etmoidal, conchas nasais, seios paranasais, palato mole e duro, órbita, faringe, músculos e linfonodos regionais. Nesta última, a extensão da lesão para a órbita causa exoftalmia e lesões oculares, que geralmente são unilaterais (SILVA *et al.*, 2007b). É comum os animais apresentarem nódulos granulomatosos nos pulmões e, mais raramente nos rins, linfonodos, coração, fígado e vesícula biliar (CARRIGAN *et al.*, 1992; SILVA *et al.*, 2007b). Na forma rinofaríngea pode ocorrer a infiltração rinocerebral caracterizada pela infiltração inflamatória nos ossos da caixa craniana e sistema nervoso central, principalmente a partir da lâmina cribiforme (CARRIGAN *et al.*, 1992; KETTERER *et al.*, 1992). Estudos realizados por Silva *et al.*, (2007b) descrevem o curso clínico da doença de uma a cinco semanas, no entanto as alterações patológicas sugerem que os sinais clínicos aparecem algum tempo depois do início das lesões, sendo que estes são associados principalmente com a alterações obstrutivas nas vias nasais superiores relacionadas com a proliferação celular inflamatória relativa ao *Conidiobolus* sp. (RIET-CORREA *et al.*, 2008).

Infecções por *Conidiobolus* spp. ocorrem em rebanhos ovinos brasileiros. No Nordeste, ambas as formas da enfermidade ocorrem, frequentemente isoladas. No Estado do Rio Grande do sul, Pedroso *et al.*, (2009) relataram um caso de rinite micótica rinofaríngea causada por *Conidiobolus* spp. em um ovino da raça Texel. Na

Austrália a enfermidade em ovinos é causada por *C. incongruus* e ambas as formas, rinofacial e rinofaríngea ocorrem simultaneamente (KETTERER *et al.*, 1992), enquanto que Morris *et al.*, (2001), em Trinidad Tobago, observaram a forma rinocerebral.

2.5 DIAGNÓSTICO

Observações do ambiente, em áreas onde a infecção é endêmica, associada às lesões nos animais, principalmente a presença de rinite granulomatosa são características importantes para o diagnóstico da infecção (RIBES *et al.*, 2000) que tem como padrão ouro o isolamento e a identificação do agente etiológico a partir do tecido lesionado e/ou por histopatologia (KAUFMAN *et al.*, 1990). As colônias de *Conidiobolus* crescem rapidamente em SDA a temperatura de 37°C. As colônias são brancas na superfície podendo com o tempo tornar-se de coloração bege para marrom e apresentam um aspecto rugoso. Microscopicamente sua morfologia compreende hifas largas (EMMONS e BRIDGES, 1961), que podem ser muito ou pouco septadas, sendo que o grau de septação aumenta com o tempo do cultivo.

Histologicamente há inflamação granulomatosa caracterizada pela presença de centro necrótico contendo hifas largas circundadas por material Splendori-Hoepli. Ao redor da área de necrose há proliferação de tecido fibroso com infiltrado de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, células epitelióides, com numerosas células gigantes multinucleadas (MORRIS *et al.*, 2001). É importante ressaltar que nem todas as espécies de *Conidiobolus* apresentam o fenômeno de Splendori-Hoepli e este também não é uma característica específica das espécies *Conidiobolus* (RIBES *et al.*, 2000).

Dados encontrados na literatura acerca dos achados laboratoriais desta enfermidade são raros. Em cães, foi relatado um aumento nos teores de AST, porém as mensurações foram procedidas após o início do tratamento com itraconazole e essa alteração foi atribuída aos efeitos da terapia (BAUER *et al.*, 1997). Estudos realizados

por Batista *et al.*, (2009) através de testes laboratoriais como hemograma, proteinograma, parâmetros bioquímicos e enzimáticos revelaram que os ovinos com conidiobolomycose apresentam anemia arregenerativa normocítica normocrômica, leucocitose com neutrofilia e discreto desvio à esquerda regenerativo, com elevação da relação neutrófilo:linfócito, monocitose moderada, trombocitose, hipoproteinemia (hipoglobulinemia), hipomagnesemia, hipocalcemia e elevação dos teores de fósforo. As atividades séricas de AST e GGT estavam aumentadas e as de FA diminuídas. Não houve alteração nos níveis de uréia e creatinina, mas ocorreu hipoglicemia e hiperbilirrubinemia. Os autores ainda sugerem a utilização destes dados para estudos experimentais da doença, em ensaios com tratamentos e para identificar casos precoces da enfermidade que não apresentem sinais clínicos.

O diagnóstico precoce é muito importante para se estabelecer a terapia apropriada. Os métodos clássicos de diagnóstico como a cultura e a histopatologia requerem tempo e às vezes apresentam uma baixa sensibilidade e/ou especificidade (GOTTFREDSSON *et al.*, 1998; RIBES *et al.*, 2000; IMHOF *et al.*, 2003). A cultura fúngica além de requerer tempo, muitas vezes é dificultada por agentes contaminantes secundários e resultado falso negativo. Há também dificuldade de diferenciação das hifas entre a classe de zigomicetos em exames histopatológicos. A dificuldade no diagnóstico possibilita o rápido curso da doença podendo contribuir para um aumento na letalidade (SILVA *et al.*, 2007b). Entretanto, estudos têm sido realizados para se desenvolver um teste rápido e sensível a partir de estratégias não relacionadas ao cultivo do agente. A Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) tem sido empregada como teste diagnóstico para a detecção do DNA de fungos das mais variadas espécies, a partir da amplificação de regiões altamente conservadas e específicas de fungos como a região 18S rRNA (IMHOF *et al.*, 2003).

As técnicas moleculares atualmente usadas para o diagnóstico das zigomicoses que estão disponíveis ainda são experimentais (VOIGT *et al.*, 1999; RIBES *et al.*, 2000; IMHOF *et al.*, 2003; DEEPAK *et al.*, 2007; HATA *et al.*, 2008). A PCR de sequências que codificam o gene 18S rDNA são muito usadas na diferenciação de infecções causadas por outros fungos patogênicos e são úteis em estudos epidemiológicos de

surtos da zigomicose, entretanto, não são utilizadas como forma de diagnóstico primário, sendo mais amplamente empregadas para a determinação taxonômica (SUTTON *et al.*, 1998; VOIGT *et al.*, 1999; VOIGT e WÖSTEMEYER, 2001). Estudos recentes realizados na Universidade de Michigan utilizaram as ferramentas micológicas clássicas e metodologias moleculares para descrever taxonomicamente e filogeneticamente isolados de *C. lamprauges* de ovinos com a forma rinofaríngea da doença (VILELA *et al.*, 2009).

Testes sorológicos são capazes de detectar a conidiobolomicose (RIBES *et al.*, 2000), estes são de simples execução, e possibilitam a detecção de infecções precoces ou ainda subclínicas (MENDONZA e ALFARO, 1985; KAUFMAN *et al.*, 1990). A eficiência do teste de imunodifusão para o soro-diagnóstico das zigomicoses causadas por *Basidiobolus ranarum* e *C. coronatus* em humanos e animais, assim como para pitiose foi demonstrada, o que comprovou que este teste é eficiente para o diagnóstico diferencial destas três micoses em humanos e animais (KAUFMAN *et al.*, 1990). Entretanto, nenhuma rotina de procedimentos sorológicos tem sido descrita para infecções causadas pelo *Conidiobolus* sp.

Nos casos suspeitos da conidiobolomicose ovina é muito importante realizar o diagnóstico diferencial de Tumor Etmoidal Enzoótico (TEE) e da Pitiose. O TEE apresenta um curso clínico mais prolongado e diferentes lesões macroscópicas e microscópicas (FERNANDES, 2007). Os achados clínico na pitiose são semelhantes os da conidiobolomicose, porém provocam as alterações morfológicas são diferentes, a reação de Splendore-Hoepli mais discreta, as hifas são mais finas e com paredes mais espessas (RIET-CORREA *et al.*, 2008) e a intensidade de necrose e inflamação granulomatosa difere nas patologias..

Apesar da frequência de casos e o isolamento do *Conidiobolus* spp. em regiões tropicais, pouco se sabe sobre a epidemiologia e dados moleculares sobre esta espécie em animais. Sabemos também que a casuística de ovinos com suspeita de conidiobolomicose tem aumentado em algumas regiões do país. Portanto, este estudo tem como objetivo descrever a caracterização molecular da zigomicose ovina associada ao *Conidiobolus lamprauges* no Estado do Mato Grosso.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta das amostras

Nove ovinos, raça Santa Inês, adultos, com suspeita de conidiobolomicose após a morte espontânea foram encaminhados para necropsia no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso durante o período de janeiro de 2007 à novembro de 2009. Dos 09 animais encaminhados, 06 eram provindos do município Nobres, 02 do município Alto Paraguai e 01 do município Poconé, todos localizados no Estado do Mato Grosso. Durante a necropsia as cabeças dos animais foram abertas longitudinalmente sobre a linha mediana e foram coletadas amostras de linfonodos submandibulares, massas da região da nasofaringe e do osso etmoidal. As amostras foram enviadas ao Laboratório de Microbiologia Veterinária / UFMT para a cultura fúngica. Os fragmentos dos tecidos foram também fixados em solução formalina a 10%, processados rotineiramente para estudos histológicos, corados pela hematoxilina-eosina (HE) e método de prata-metanamina (GMS) (GROCOTT, 1955) no Laboratório de Patologia Veterinária/UFMT.

3.2 Isolamento

Os fragmentos coletados dos linfonodos submandibulares, massas da região da nasofaringe e do osso etmoidal foram lavados em solução salina estéril acrescida de antibiótico (ampicilina 50mg/L), macerados, semeados em Agar Sabouraud Dextrose 2% (glicose 20 g; peptona 10 g; ágar 18 g; água destilada qsp 1000 ml; pH 5,0), Agar Sabouraud Dextrose acrescido de cloranfenicol (0,05g/L) e incubadas a 30°C por até 7

dias. A caracterização morfológica foi realizada através do exame direto em lâminas pela coloração com Lactofenol-Azul de Algodão (LPCB).

3.3 Extração de DNA dos isolados do *Conidiobolus* sp.

Para a extração de DNA dos isolados do *Conidiobolus* sp., utilizou-se o protocolo descrito por Doyle e Doyle, (1987). Os isolados foram semeados em SDA e incubadas por 3 dias em estufa à 30°C. Os micélios foram coletados com alça (0,5g a 1g), macerados em nitrogênio líquido e transferidos rapidamente em microtubo previamente preenchido com 0,5 mL de tampão de lise (100 mM Tris-Cl pH 8.0, 25 mM EDTA, 1.5M NaCl, 2.5% CTAB e 0.2% β-mercaptoethanol). O material foi levemente agitado e incubado a 65°C por 1 hora e posteriormente centrifugado por 10 minutos a 10.000 g em microcentrífuga. A fase aquosa foi extraída com 0,5V de fenol tamponado e clorofórmio:álcool isoamílico (24:1v/v) e agitados levemente por 10 minutos. Centrifugou-se (6.000 x g por 20 minutos) e o conteúdo de ácidos nucléicos presentes na fase superior foi coletado e precipitado em presença de 0,2M de NaCl 5M pH 5,2 e 0,75 mL de isopropanol, por um período de 16 horas à – 20°C, posteriormente centrifugados (10.000 x g por 10 minutos), lavados com etanol 70% e secos. O sedimento com ácidos nucléicos foi suspenso em 1mL de água contendo RNase na concentração de 50 µg/mL e incubado a 37°C por 15 minutos. Seguiu-se extração com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1 v/v), centrifugação (12.000x g, por 20 minutos), e o DNA presente na fase superior foi precipitado pela adição de 0,8 mL de isopropanol e posterior centrifugação (12.000x g, por 20 minutos), lavagem com etanol 70% e secagem. O DNA foi então suspenso em 0,03 mL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.4). A qualidade e integridade do DNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,0% à 100 V por cm, com o auxílio do transiluminador.

3.4 Caracterização molecular dos isolados pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR).

Na PCR foram utilizados os pares de oligonucleotídeos iniciadores universais para fungos que codificam a sequência parcial do gene 18S rRNA (senso: 5'-ATT GGA GGG CAA GTC TGG TG-3'; anti senso: 5'-CCG ATC CCT AGT CGGCAT AG-3') utilizado em estudos conduzidos por Imhof *et al.*, (2003). A PCR foi realizada em um volume final de 25 µl, sendo que cada reação conteve 10ng DNA, 50mM MgCl₂, 10X *Taq* Buffer com 50 mM KCl, 1 mM dNTP, 20 pmol de cada oligonucleotídeo e 1 U de *Taq*DNA polymerase. A PCR foi realizada em 40 ciclos em um termociclador (TECHNE TC-312), com desnaturação inicial por 4 minutos à 94°C, 30 segundos para desnaturação à 94°C, 60 segundos de anelamento à 56°C e 90 segundos de extensão à 72°C, seguidos por um ciclo de extensão final por 5 minutos à 72°C. Os produtos de amplificação foram analisados em eletroforese em gel agarose 1,0% à 100 V por cm. Como marcador de massa molecular utilizou-se o padrão 100pb DNA Ladder (Fermentas). Os produtos amplificados foram purificados com Kit comercial (GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kit – GE Healthcare).

3.5 Sequenciamento e análise taxonômica

As amostras de DNA purificadas foram encaminhadas para o seqüenciamento no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Para o sequenciamento das amostras foi utilizado o MegaBACE 500 (GE Healthcare). As sequências obtidas foram analisadas pelo programa Sequence Analyzer do próprio MegaBACE 500, editadas no programa BioEdit version 7.0.5.3 (Hall, 1999). As sequências de no mínimo 100 nucleotídeos, com PHRED >30, serão utilizadas para a

montagem e analisadas no programa Blastn (*Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL *et al.*, 1997) do *National Center for Biotechnology Information-NCBI*. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Somente as sequências com valores de E menor ou igual a 1×10^{-5} serão consideradas.

As análises taxonômicas foram a partir da sequência parcial do gene 18S rDNA para caracterizar a espécie de *Conidiobolus*. O alinhamento de sequências múltiplas foi obtido com *C. coronatus* (EF392543; AF113417; AF113418; 849042), *C. lamprauges* (AF113420) e *C. incongruus* (AF113419) pelo Programa ClustalX (LARKIN *et al.*, 2007).

O perfil filogenético das cepas foi realizado por meio do método de agrupamento de vizinhos (Neighbor-Joining - NJ), com o auxílio do programa MEGA - *Molecular Evolutionary Genetics Analysis versão 4.0.*(TAMURA *et al.*, 2007), e *Saccharomyces cerevisiae* como outgroup.

4 RESULTADOS

Dos nove casos suspeitos de conidiobolomicose, em cinco foram isolados *Conidiobolus* sp. Três amostras foram obtidas da mesma propriedade localizada no município de Nobres, 1 amostra isolada de um ovino pertencente a uma propriedade do município Alto Paraguai e 1 amostra proveniente de ovino de uma propriedade do município Poconé. Os sinais clínicos apresentados pelos animais foram de maneira geral depressão, anorexia dificuldade respiratória e emagrecimento progressivo (Figura 1). Havia dificuldade respiratória com presença de ruídos intensos, respiração oral e dispnéia, também foi observado corrimento nasal seroso ou muco-sanguinolento. A maioria dos ovinos apresentou marcada exoftalmia unilateral em alguns o globo ocular estava entumecido com opacidade ou úlcera de córnea, conjuntivite e aparente cegueira unilateral. Observou-se também desvio lateral de cabeça em um ovino. Intenso timpanismo ruminal ocorreu em um ovino 12 horas antes da morte (Tabela 1).

Tabela 1 – Sinais clínicos observados nos cinco ovinos com conidiobolomicose rinofaríngea procedentes de três municípios do Estado do Mato Grosso.

| Sinais clínicos | Frequência | % |
|---------------------------------|------------|-----|
| Apatia | 05 | 100 |
| Anorexia | 03 | 60 |
| Assimetria crânio-facial | 02 | 40 |
| Cegueira | 01 | 20 |
| Dificuldade respiratória | 04 | 80 |
| Descarga nasal | 04 | 80 |
| Desvio lateral da cabeça | 01 | 20 |
| Exoftalmia | 02 | 40 |
| Opacidade de córnea | 01 | 20 |
| Prostração | 02 | 40 |
| Respiração ruidosa | 04 | 80 |
| Timpanismo | 01 | 20 |

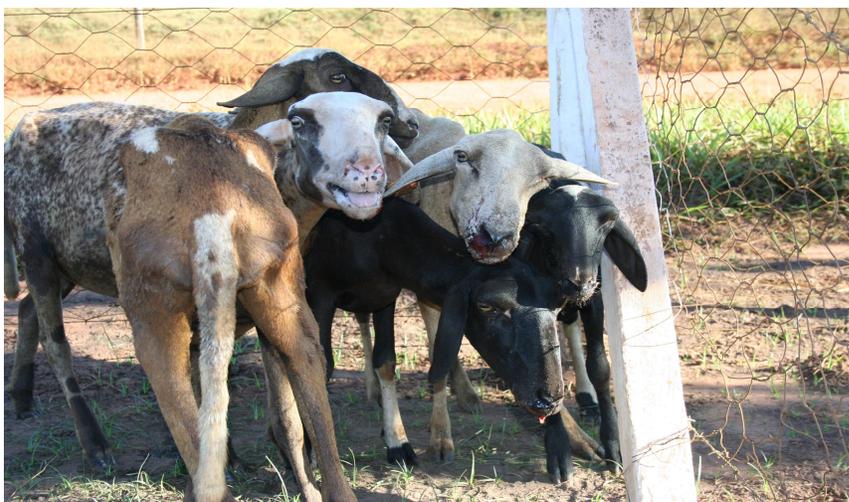


Figura 1- Ovinos com conidiobolomicose apresentando marcada dificuldade respiratória.

De acordo com os dados das lesões macroscópicas fornecidas pelo Laboratório de Patologia Veterinária/UFMT, as principais alterações foram crescimento de tecido brancacento na região rinofaríngea que substituíu os ossos turbinados e se infiltrava nos seios nasais e órbita ocular. Frequentemente havia proliferação obstrutiva nodular brancacenta nas coanas. Em 3 dos 9 casos notou-se infiltração em placa cribriforme, e presença de tecido inflamatório nos bulbos olfatórios (Figura 2A). Microscopicamente, as áreas da região rinofaríngea afetada, havia inflamação granulomatosa caracterizada por intensa proliferação de tecido conjuntivo, acentuado infiltrado mononuclear com células epitelióides e células gigantes circundando áreas com material Splendore-Hoeppli. Através da coloração de prata-metanamina (método de Gomori-grocott) (GROCOTT, 1955) visualizaram-se hifas largas irregulares (8-30 μ m de largura), com bordas bem marcadas, raramente septadas e frequentemente com dilatação balonosa na extremidade (Figura 2B).

Nos cultivos em DAS, foi observado crescimento de colônias planas e glabras de coloração creme, lisas nos primeiros dias, tornando-se rugosas e firmemente aderidas ao ágar (Figura 3A). As colônias cresceram após 48 horas de incubação e no quinto dia espalharam-se por toda placa de petri (100-mm). No exame direto em lâminas coradas com Lactofenol-Azul de Algodão observaram-se hifas finas e largas, cenocíticas, com

ramificações irregulares e conídios esféricos com papilas basais de bordas arredondadas (Figura 3B).

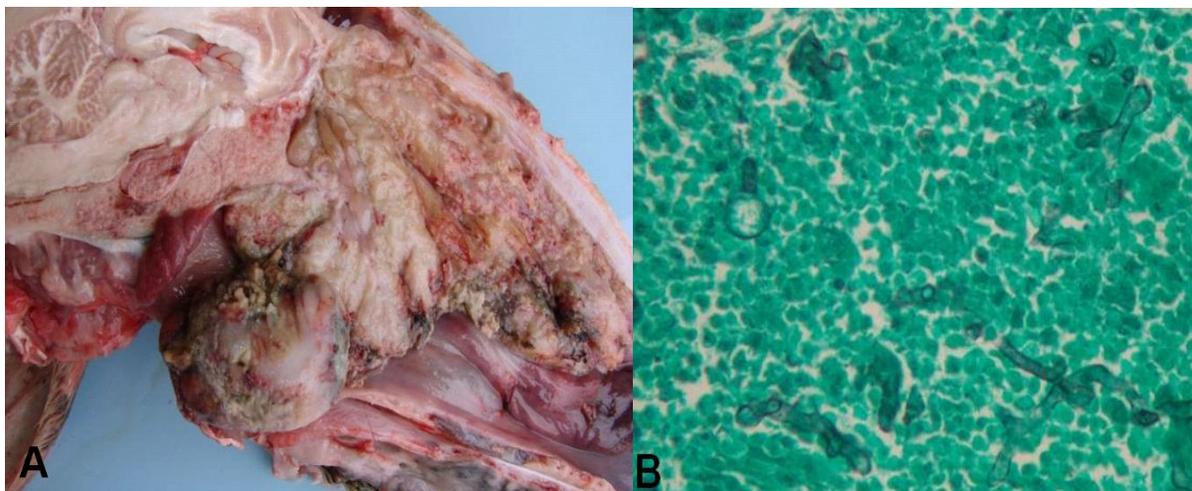


Figura 2- Cabeça de ovino com conidiobolomicose seccionada longitudinalmente e característica da lesão microscópica visualizada pela coloração de prata-metanamina (grocott). **A** - Presença de massa de coloração branco-amarelada na região etmoidal e nasofaringe infiltrando-se sobre a placa cribriforme, bulbo olfatório e encéfalo. **B** - Presença de hifas largas, com parede fina, dilatação balonosa na extremidade e raramente septadas, em tecido coletado de ovino com conidiobolomicose (100X).

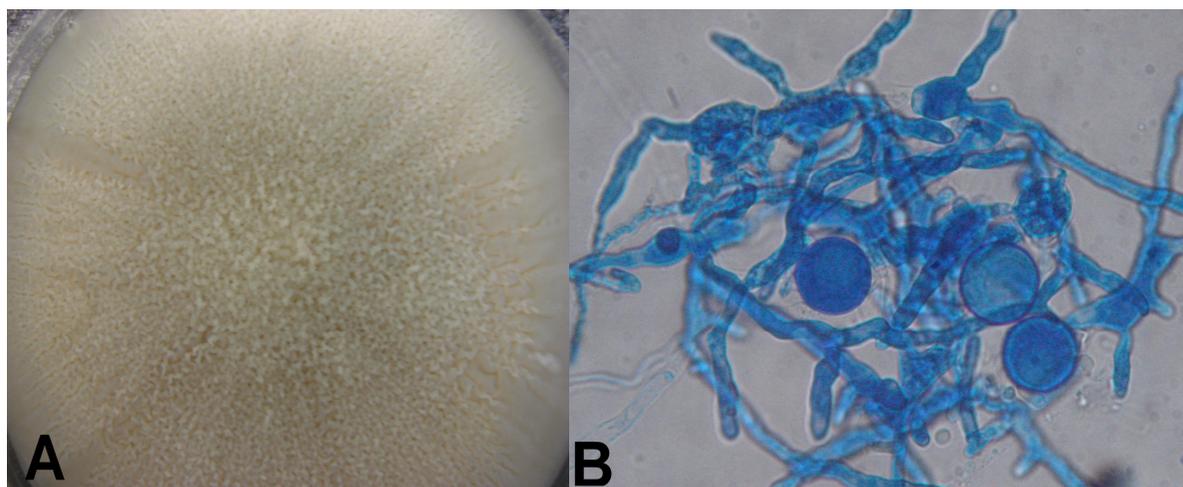


Figura 3- Colônia de *C. lamprauges* cultivada em ágar Sabouraud Dextrose à 37°C. **A**- Amostra isolada de um ovino do presente estudo. Colônia de aspecto plano e glabro, de tonalidade creme. **B**- Presença de hifas cenocíticas, largas e conídios esféricos (400X).

Com base nos aspectos morfológicos os isolados foram classificados no gênero *Conidiobolus* sp..

Na técnica de PCR, os isolados amplificaram um fragmento de aproximadamente 540 pb e após sequenciamento apresentaram 97% de identidade ao gene 18S rRNA do fungo *C. lamprauges* (GenBank GQ221848, GQ221849, GQ21749). Utilizou-se 3 gêneros de *Conidiobolus* e 3 isolados do Estado do Mato Grosso (MT303, 290, 273), e através das análises baseadas na seqüência parcial da região ribossomal 18SrDNA, todos os isolados do presente estudo pertenceram ao mesmo grupo do *C. lamprauges* (cluster A) (FIGURA 4). *Saccharomyces cerevisiae* foi usado como outgroup.

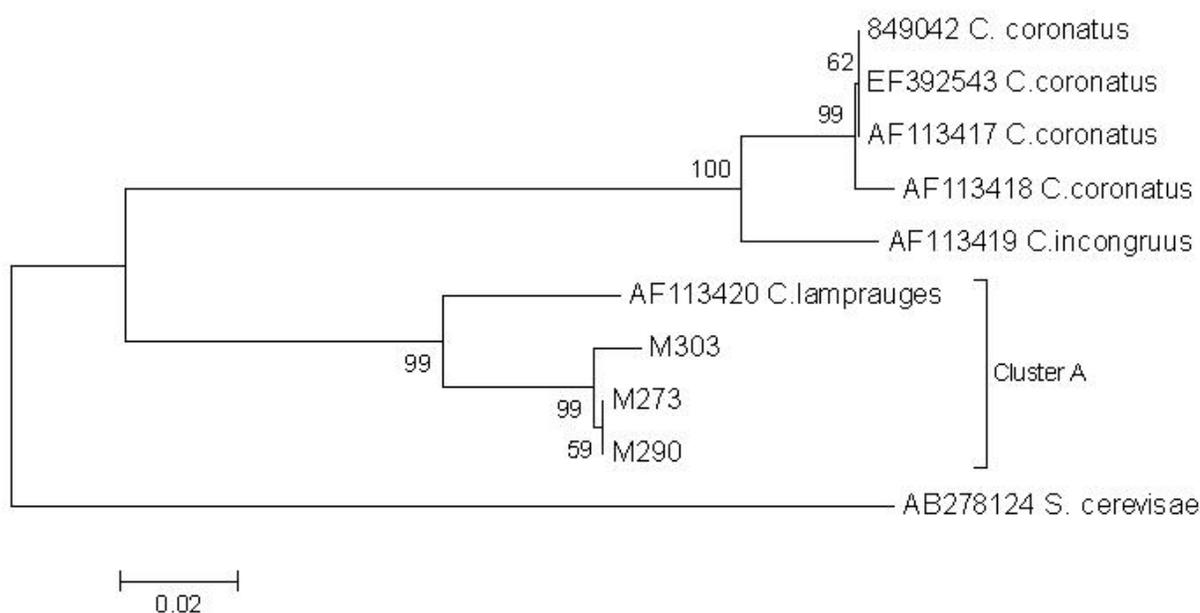


Figura 4– Dendrograma dos isolados de *Conidiobolus* spp. de ovinos com conidiobolomicose rinofaríngea. O perfil filogenético das cepas foi realizado por meio do método de agrupamento de vizinhos (Neighbor-Joining - NJ), usando 1.000 réplicas do banco de dados (bootstrap) através do programa MEGA.

5 DISCUSSÃO

Os fungos do gênero *Conidiobolus* são frequentemente associados à rinite granulomatosa crônica no homem e nos animais (AYDOGDU *et al.*, 2001; PRABHU e PATEL, 2004; HOOGENDIJK *et al.*, 2006; THOMAS *et al.*, 2006). Fungos do gênero *Conidiobolus* sp. são saprofíticos e ocorrem principalmente em regiões de clima tropical e subtropical, em áreas de alta umidade, parasitando insetos, vegetais em decomposição e o solo (EMMONS e BRIDGES, 1961; AJELLO, 1988; CARRIGAN *et al.*, 1992; GUGNANI, 1992).

Neste estudo, os sinais clínicos observados como dificuldade respiratória, corrimento nasal seroso às vezes hemorrágico, exoftalmia unilateral são sinais clínicos semelhantes aos descritos em ovinos com conidobolomicose rinofaríngea (KETTERER *et al.*, 1992; MORRIS *et al.*, 2001; RIET-CORREA *et al.*, 2008). A enfermidade é frequentemente relatada afetando rebanhos ovinos no Brasil e em outros países como na Austrália (CARRIGAN *et al.*, 1992; KETTERER *et al.*, 1992) e Trinidad Tobago (MORRIS *et al.*, 2001). Na região Nordeste do Brasil a doença afeta diversas propriedades principalmente nos Estados do Piauí e na Paraíba, onde a ovinocultura é mais numerosa e desenvolvida, sendo considerada uma importante causa de perdas econômicas na região (SILVA S. *et al.*, 2007b; RIET-CORREA *et al.*, 2008). No Estado do Mato Grosso, a doença foi diagnosticada em ovinos a campo, e a etiologia da enfermidade foi associada ao fungo do gênero *Conidiobolus* sp (BOABAID *et al.*, 2008). Acredita-se que a conidobolomicose no estado seja um problema relativamente recente em algumas criações. Entretanto cada vez mais, a enfermidade está afetando um maior número de rebanhos. O que se justifica, visto que como descrito neste trabalho rebanhos ovinos de três municípios (Poconé, Alto Paraguai e Nobres) foram afetados pela enfermidade.

A maioria dos isolados deste trabalho foram coletados de animais afetados no período de janeiro a junho, similar ao encontrado nos estudos da enfermidade em ovinos no Estado de Mato Grosso realizados por BOABAID *et al.*, (2008). Neste período há altos índices pluviométricos, elevada temperatura, alta umidade e maior

quantidade de matéria vegetal em decomposição, fatores que contribuem para o crescimento fúngico (PRABHU e PATEL, 2004). De acordo com estudos epidemiológicos da conidiobolomicose conduzidos por SILVA *et al.*, (2007b) no estado do Piauí essas condições de altas temperaturas e umidade elevada devido a alta frequência de chuvas também foram observadas. Desta forma ocorreriam três fatores importantes para o desenvolvimento do fungo: umidade; temperatura; e presença de matéria vegetal morta. Sendo assim, na época das chuvas há um maior crescimento do pasto, com maior quantidade de material decomposto, propiciando condições compatíveis com as exigidas para o crescimento do *Conidiobolus* spp. (CLARK, 1968; KING e JONG, 1976; SEGURA *et al.*, 1981; CARRIGAN *et al.*, 1992; KWONG-CHUNG e BENNETT, 1992).

Um isolado foi obtido de um ovino no mês de agosto, isso pode ser explicado pela cronicidade da doença em ovinos e pelas lesões histológicas, o que sugere que ao aparecerem os sinais clínicos o animal já está doente há algum tempo, sem manifestação de sinais clínicos (RIET-CORREA *et al.*, 2008). Em humanos o período de incubação da doença pode ter um curso de vários anos (FISCHER *et al.*, 2008). De acordo com Silva *et al.*, (2007b) a doença pode ser aguda ou subaguda, com evolução invariavelmente fatal. Variações no tipo da enfermidade e na sua manifestação e evolução podem estar relacionadas a variações na virulência do agente, susceptibilidade do ovino e ausência de tratamento antifúngico. O diagnóstico tardio e possivelmente o rápido curso da doença podem contribuir para essa letalidade.

As características morfológicas observadas em meio de cultivo e microscopia em lâminas coradas com lactofenol-azul de algodão, como hifas largas de escassos septos, contornos não paralelos e dilatações globosas na extremidade semelhantes ao micélio reprodutivo (conidióforos), são estruturas características do gênero *Conidiobolus* sp. semelhantes às descritas por Larone, (1995). Essa morfologia foi também descrita em rebanhos ovinos brasileiros e outras espécies de animais afetados por *Conidiobolus* (HUMBER *et al.*, 1989; BOABAID *et al.*, 2008; RIET-CORREA *et al.*, 2008).

Para a determinação da espécie envolvida na rinosinusite, foi utilizada a PCR associada ao sequenciamento da região parcial do gene 18S rRNA. A Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) tem sido empregada como teste diagnóstico para a detecção do DNA de fungos das mais variadas espécies, a partir da amplificação de regiões altamente conservadas e específicas de fungos como gene 18S rDNA (IMHOF *et al.*, 2003) ou para a diferenciação de infecções causadas por outros fungos patogênicos filogeneticamente próximos, útil em estudos epidemiológicos de surtos da zigomicose.

O presente estudo ainda utilizou a região 18S rRNA para classificar taxonomicamente os isolados de *Conidiobolus* sp., e observou-se que todos os isolados pertenceram ao mesmo grupo do *C. lamprauges*, demonstrando que esta região gênica pode ser amplamente empregada para estudos taxonômicos. As técnicas moleculares são utilizadas, pois são ferramentas rápidas e sensíveis não necessitando muitas vezes do cultivo do agente.

Madson *et al.*, (2009) relataram um caso de conidiobolomicose sistêmica causada por *C. incongruus* em cervo (*Odocoileus virginianus*), o diagnóstico foi realizado através de exames histológicos, pela técnica de PCR e o sequenciamento da região 18S rRNA. No estudo a sequência de DNA do isolado obteve 99% de identidade com a espécie *C. incongruus*. No estudo citado coletou-se material para isolamento do fungo, porém sem sucesso demonstrando que a cultura além de requerer tempo, muitas vezes pode gerar um resultado falso negativo. Imhof *et al.*, (2003) utilizaram a PCR quantitativa (qPCR) para detecção de infecções fúngicas em amostras de tecidos humanos. Os autores utilizaram iniciadores universais para fungos, com sequências que codificam a região 18S rRNA. No estudo através da cultura foi isolado o *Conidiobolus* sp., e pela técnica de qPCR e sequenciamento chegou-se a identificação em nível de espécie, *C. coronatus*.

Supõe-se que as infecções ocorrem pelo contato dos animais com esporos presentes no solo, por inalação de insetos parasitados pelo fungo que são depositados nas narinas dos animais (MILLER e CAMPBELL, 1982; MILLER, 1983; HUMBER *et al.*, 1989), ou, ainda, através de plantas pontiagudas contendo estes conídios

(KETTERER *et al.*, 1992). Sabe-se que caprinos e bovinos fazem a apreensão das pastagens a maior altura do chão que os ovinos, nestes animais o modo de apreensão, provavelmente, favorece a contaminação destes, pois *Conidiobolus* spp. é um fungo comumente encontrado no solo e em folhas decompostas (KWONG-CHUNG e BENNETT, 1992). Esta infecção poderia ocorrer pela inalação de esporos do solo durante o pastejo (CARRIGAN *et al.*, 1992; KETTERER *et al.*, 1992) ou no pernoite, visto que os conídios são ejetados a uma altura de mais de 2 cm do solo e assim poderiam atingir a mucosa nasal (HUMBER *et al.*, 1989).

Em geral a infecção apresenta grande dificuldade diagnóstica, por não apresentar sinais clínicos em sua fase inicial. Em humanos, a maior parte dos casos é diagnosticada nos estágios avançados da doença (TADANO *et al.*, 2005). Durante muito tempo a conidiobolomicose ovina foi confundida com o Tumor Etmoidal Enzoótico, ou mesmo com outras infecções fúngicas como as causadas por *Pythium insidiosum*, contudo o diagnóstico diferencial ocorre por estudos histopatológicos e microbiológicos (SILVA *et al.*, 2007). O tumor etmoidal enzoótico apresenta um curso clínico mais prolongado com diferentes lesões macroscópicas e microscópicas (FERNANDES, 2007). Acredita-se que na forma rinofacial o *Conidiobolus* sp. esteja associado ao *P. insidiosum*, como encontrado em estudos realizado por Souza *et al.*, (2008), porém Pedroso *et al.*, (2009) relataram rinite micótica ovina na forma rinofaríngea compatível com *Conidiobolus* spp., e um resultado negativo para *Pythium insidiosum* pela técnica de imuno-histoquímica.

As espécies de *Conidiobolus* descritas como causadoras da conidiobolomicose em ovinos são *C. coronatus* e *C. incongruus*, tanto em formas rinofacial quanto rinofaríngea. No presente estudo a rinosinusite ovina foi ocasionada pelo *C. lamprauges* no Estado do Mato Grosso, uma espécie aparentemente rara que ocorre primariamente em detritos de plantas ou solo, foi também relatada como causadora da zigomicose em equino (HUMBER *et al.*, 1989) e de forma semelhante em ovinos em sua forma rinofaríngea (VILELA *et al.*, 2009).

6 CONCLUSÃO

De acordo com os dados obtidos no presente trabalho conclui-se que:

- 1- O *Conidiobolus lamprauges* foi o agente causador da conidiobolomicose rinofaríngea em 3 propriedades localizadas em municípios distintos do Estado do Mato Grosso.
- 2- Os achados clínicos e patológicos deste estudo foram semelhantes aos encontrados em outros casos da enfermidade conidiobolomicose rinofaríngea em ovinos relatados no Brasil.
- 3- A enfermidade apresentou uma sazonalidade coincidindo com o aumento dos índices pluviométricos e da umidade relativa do ar.

REFERÊNCIAS

ADER, P. **Phycomycosis in fifteen dogs and two cats.** J Am Vet Med Assoc, 174: 1216-1223, 1979.

AINSWORTH, G.; AUSTWICK, P. **A survey of animal mycoses in Britain: mycological aspects.** Trans Br Mycol Soc, 38: 369-386, 1955.

AJELLO, K. **Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases.** Springer-Verlag, New York: 171, 1988.

ALEXOPOULOS, C.; MIMS, C.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**, 4 edn. New York, NY: John Wiley & Sons, Inc, 1996.

ALTSCHUL, S.; MADDEN, T.; SCHÄFFER, A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.** Nucl Ac Res, 25: 3389-3402, 1997.

AYDOGDU, I.; SARI, R.; MIZRAK, B. **Case report. Rhinocerebral zygomycosis.** Mycosis, 44: 59-60, 2001.

BATISTA, M.; CASTRO, R.; REGO, E.; CARVALHO, F.; SILVA, S.; CARVAHO, C.; RIET-CORREA, F. **Hemograma, proteinograma, ionograma e dosagens bioquímicas e enzimáticas de ovinos acometidos por conidiobolomicose no Nordeste do Brasil.** Pesq Vet Bras, 29: 17-24, 2009.

BAUER, R. W.; LEMARIÉ, S. L.; ROY, A. F. **Oral conidiobolomycosis in a dog.** Vet Dermat, 8: 115-120, 1997.

BITTENCOURT, A.; MARBACK, R.; NOSSA, L. **Mucocutaneous entomophthoromycosis acquired by conjunctival inoculation of the fungus.** Am J Trop Med Hyg, 75: 936-938, 2006.

BLANCO, J.; GARCIA, M. **Immune response to fungal infections.** Vet Immunol Immunopathol, 125: 47-70, 2008.

BOABAID, F. M.; FERREIRA, E. V.; ARRUDA, L. P.; GASPARETTO, N. D.; SOUZA, R. L.; SILVA, M. C.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; COLODEL, E. M. **Conidiobolomycose em ovinos no Estado de Mato Grosso.** Pesq Vet Bras, 28: 77-81, 2008.

BOGUŚ, M.; KEDRA, E.; BANIA, J.; SZCZEPANIK, M.; CZYGIER, M.; JABŁOŃSKI, P.; PASZTALENIEC, A.; SAMBORSKI, J.; MAZGAJSKA, J.; POLANOWSKI, A. **Different defense strategies of *Dendrolimus pini*, *Galleria mellonella*, and *Calliphora vicina* against fungal infection.** J Insect Physiol, 53: 909-922, 2007.

BRAS, G.; GORDON, C.; EMMONS, K.; PRENDEGAST, M.; SUGAR, M. **A case of phycomycosis observed in Jamaica.** Am J Trop Med Hyg, 14: 141-145, 1963.

BUSAPAKUM, R.; YOUNGCHAIYUD, U.; SRIUMPAI, S.; SEGRETAİN, G.; FROMENTIN, H. **Disseminated infection with *Conidiobolus incongruus*.** Sabouraudia, 21: 323-330, 1983.

CARRIGAN, M.; SMALL, A.; PERRY, G. **Ovine nasal zygomycosis caused by *Conidiobolus incongruus*.** Aust Vet J, 69: 237-240, 1992.

CASTRO E SOUZA FILHO, L.; NICO, M.; SALEBIAN, A.; HEINS-VACCARI, E.; DE CASTRO, L.; SOTTO, M.; LACAZ, C. S.; MARTINS, J.; WU, S.; CUCÉ, L. **Rhinofacial entomophthoromycosis due to *Conidiobolus coronatus*. A report of a case**

treated successfully with fluconazole. Rev Inst Med Trop S Paulo, 34: 483-487, 1992.

CHANDLER, F. W.; WATTS, J. C. **Pathologic diagnosis of fungal infections**, p. 85–95. ASCP Press, Chicago, Ill, 1987.

CLARK, B. M. **Epidemiology of phycomycosis.** In Systemic mycoses, E. W. Wolstenhome and R. Porter (ed), Little, Brown & Co. Boston, Mass. 179–192, 1968.

COSTA, A.; PORTO, E.; PEGAS, J.; DOS REIS, V.; PIRES, M.; LACAZ, C. S.; RODRIGUES, M.; MÜLLER, H.; CUCÉ, L. **Rhinofacial zygomycosis caused by *Conidiobolus coronatus*. A case report.** Mycopathologia, 115: 1-8, 1991.

DEEPAK. S.; KOTTAPALLI, K.; RAKWAL, R.; OROS, G.; RANGAPPA, K.; IWAHASHI, H.; MASUO, Y.; AGRAWAL, G. **Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes.** Curr Genomics, 8: 234-251, 2007.

DIWAKAR, A.; DEWAN, R.; CHOWDHARY, A.; RANDHAWA, H.; KHANNA, G.; GAUR, S. **Zygomycosis - A case report and overview of the disease in India.** Mycoses, 50: 247-254, 2007.

DOYLE, J.; DOYLE, J. **A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue.** Phytochemical Bulletin, 19: 11-15, 1987.

EMMONS, C.; BRIDGES, C. ***Entomophthora coronata*, the etiologic agent of a phycomycosis of horses.** Mycologia, 53: 307-312, 1961.

EMMONS, C. W.; BINFORD, C. H.; UTZ, J. P.; KWON-CHUNG, K. J. **Medical Mycology.** Lea and Febiger (ed), Philadelphia: 254, 1977.

FERNANDES, C. **Tumor enzoótico nasal**. Santa Maria: Pallotti (ed), 2007.

FISCHER, N.; RUEF, C.; EBNÖTHER, C.; BÄCHLI, E. **Rhinofacial *Conidiobolus coronatus* infection presenting with nasal enlargement**. Infection, 36: 594-596, 2008.

FOSS, N.; ROCHA, M.; LIMA, V.; VELLUDO, M.; ROSELINO, A. **Entomophthoramyces: therapeutic success by using amphotericin B and terbinafine**. Dermatology, 193: 258-260, 1996.

FREIMOSER, F.; SCREEN, S.; HU, G.; LEGER, R. **EST analysis of genes expressed by the zygomycete pathogen *Conidiobolus coronatus* during growth on insect cuticle**. Microbiology, 149: 1893-1900, 2003.

FRENCH, R.; ASHWORTH, C. **Zygomycosis caused by *Conidiobolus coronatus* in a llama (*Lama glama*)**. Vet Pathol, 31: 120-122, 1994.

FURLAN, F.; BORELLI, V.; LUCIOLLI, J.; FONTEQUE, J.; GAVA, A. **Granuloma fúngico nasal em ovinos no Estado de Santa Catarina**. In XIII Encontro Nacional de Patologia Veterinária (Enapave). Campo Grande, MS, 2007.

GOODMAN, N. L.; RINALDI, M. G. **Agents of zygomycosis**. In Manual of clinical microbiology, A. Balows WJH, K. L. Herrmann, H. D. Isenberg, and H. J. Shadomy (ed), 5th ed, pp 674– 692. Washington, D.C, 1991.

GOTTFREDSSON, M.; COX, G.; PERFECT, J. **Molecular methods for epidemiological and diagnostic studies of fungal infections**. Pathology, 30: 405-418, 1998.

GOŁEBIOWSKI, M.; MALIŃSKI, E.; BOGUŚ, M.; KUMIRSKA, J.; STEPNOWSKI, P. **The cuticular fatty acids of *Calliphora vicina*, *Dendrolimus pini* and *Galleria mellonella* larvae and their role in resistance to fungal infection.** Insect Biochem Mol Biol, 38: 619-627, 2008.

GROCOTT, R. G. **A stain for fungi in tissue sections and smears: using Gomori's methenamine – silver nitrate technique.** Am J Clin Pathol, 25: 975-979, 1955.

GROOTERS, A. **Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals.** Vet Clin North Am Small Anim Pract, 33: 695-720, 2003.

GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A. **Developments in fungal taxonomy.** Clin Microbiol Rev, 12: 454-500, 1999.

GUGNANI, H. **Entomophthoromycosis due to *Conidiobolus*.** Eur J Epidemiol, 8: 391-396, 1992.

GUGNANI, H. **A review of zygomycosis due to *Basidiobolus ranarum*.** Eur J Epidemiol, 15: 923-929, 1999.

Hall, T. A. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** Nucl. Acids. Symp. Ser, 41:95-98, 1999.

HATA, D.; BUCKWALTER, S.; PRITT, B.; ROBERTS, G.; WENGENACK, N. **Real-time PCR method for detection of zygomycetes.** J Clin Microbiol, 46: 2353-2358, 2008.

HOOGENDIJK, C.; VAN HEERDEN, W.; PRETORIUS, E.; VISMER, H.; JACOBS, J. **Rhino-orbitocerebral entomophthoramycesis**. Int J Oral Maxillofac Surg, 35: 277-280, 2006.

HUMBER, R.; BROWN, C.; KORNEGAY, R. **Equine zygomycosis caused by *Conidiobolus lamprauges***. J Clin Microbiol, 27: 573-576, 1989.

IMHOF, A.; SCHAER, C.; SCHOEDON, G.; SCHAER, D.; WALTER, R.; SCHAFFNER, A.; SCHNEEMANN, M. **Rapid detection of pathogenic fungi from clinical specimens using LightCycler real-time fluorescence PCR**. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 22: 558-560, 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em 05 de janeiro de 2010.

ISHIKAWA, F.; OISHI, K.; AIDA, K. **Chitin-binding hemagglutinin produced by *Conidiobolus* strains**. Appl Environ Microbiol, 37: 1110-1112, 1979.

JAFFEY, P.; HAQUE, A.; EL-ZAATARI, M.; PASARELL, L.; MCGINNIS, M. **Disseminated *Conidiobolus* infection with endocarditis in a cocaine abuser**. Arch Pathol Lab Med, 114: 1276-1278, 1990.

JOHNSTON, M.; SOERENSEN, B.; SALIBA, A.; LACAZ, C.; BELA NETO, J.; CRUZ, J. **Ficomise em luar. Isolmento de *Entomophthora coronata***. Arq Inst Biol, 34: 51-58, 1967.

KAUFMAN, L.; MENDOZA, L.; STANDARD, P. **Immunodiffusion test for serodiagnosing subcutaneous zygomycosis**. J Clin Microbiol, 28: 1887-1890, 1990.

KEDRA, E.; BOGUŚ, M. **The influence of *Conidiobolus coronatus* on phagocytic activity of insect hemocytes.** J Invertebr Pathol, 91: 50-52, 2006.

KETTERER, P.; KELLY, M.; CONNOLE, M.; AJELLO, L. **Rhinocerebral and nasal zygomycosis in sheep caused by *Conidiobolus incongruus*.** Aust Vet J, 69: 85-87, 1992.

KHALIL, M.; EKANEM, I.; GUGNANI, H.; ATTAH, E. **Some deep mycoses diagnosed by histopathology in South Eastern Nigeria.** Rev Iberoam Micol, 16: 221-224, 1999.

KING, D.; JONG, S. **Identity of etiological agente of the first deep entomophthoraceous infection of man in the United States.** Mycologia, 68: 374-379, 1976.

KRISHNAN, S.; SENTAMILSELVI, G.; KAMALAM, A.; DAS, K.; JANAKI, C. **Entomophthoromycosis in India - a 4 year study.** Mycoses, 41: 55-58, 1998.

KWONG-CHUNG, K.; BENNETT, J. **Medical Mycology.** Philadelphia, Pa: Lea & Febiger, p. 524-559, 1992.

LARKIN, M.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. M. C.; WILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J.; GIBSON, T.; HIGGINS, D. **Clustal W and Clustal X version 2.0.** Bioinformatics, 23: 2947-2948, 2007.

LARONE, D. **Medically important fungi: A guide to identification.** 3. ed. Whasinghton, DC: ASM Press, 1995.

MADSON, D.; LOYNACHAN, A.; KARIYAWASAM, S.; OPRIESSNIG, T. **Systemic *Conidiobolus incongruus* infection and hypertrophic osteopathy in a white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*)**. J Vet Diagn Invest, 21: 167-170, 2009.

MAITI, P.; BOSE, R.; BANDYOPADHYAY, S.; BHATTACHARYA, S.; DEY, J.; RAY, A. **Entomophthoromycosis in South Bengal (Eastern India): a 9 years study**. Indian J Pathol Microbiol, 47: 295-297, 2004.

MARTINSON, F. D. **Clinical epidemiological and therapeutic aspects of entomophthoromycosis**. Ann Soc Belg Med Trop, 52: 329-342, 1972.

MEDWAY, W. **Some bacterial and mycotic diseases of marine mammals**. J Am Vet Med Assoc, 177: 831-834, 1980.

MENDONZA, L.; ALFARO, A. A. **Equine subcutaneous zygomycosis in Costa Rica**. Mykosen, 28: 545-549, 1985.

MICHAEL, R.; MICHAEL, J.; MATHEWS, M.; RUPA, V. **Unusual presentation of entomophthoromycosis**. Indian J Med Microbiol, 27: 156-158, 2009.

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

MILLER, R.; CAMPBELL, R. **Clinical observations on equine phycomycosis**. Aust Vet J, 58: 221-226, 1982.

MOLL, H.; SCHUMACHER, J.; HOOVER, T. **Entomophthoramycosis conidiobolae in a llama**. J Am Vet Med Assoc, 200: 969-970, 1992.

MORAES, M.; ALMEIDA, M.; VEIGA, R.; SILVEIRA, S. **Zigomicose nasofacial. Relato de um caso do Estado do Pará, Brasil.** Rev Inst Med Trop S Paulo, 36: 171-174, 1994.

MORRIS, M.; NGELEKA, M.; ADOGWA, A. O.; LALLA, G.; ST-GERMAIN, G.; HIGGINS, R. **Rhinocerebral zygomycosis in a sheep.** Can Vet J, 42: 227-228, 2001, 2001.

MUKHOPADHYAY, D.; GHOSH, L.; THAMMAYYA, A.; SANYAL, M. **Entomophthoromycosis caused by *Conidiobolus coronatus*: clinicomycological study of a case.** Auris Nasus Larynx, 22: 139-142, 1995.

OKAFOR, B.; GUGNANI, H. **Nasal entomophthoromycosis in Nigerian Igbos.** Trop Geogr Med, 35: 53-57, 1983.

PEDROSO, P.; RAYMUNDO, D.; BEZERRA, J.; OLIVEIRA, E.; SONNE, L.; DALTO, A.; DRIEMEIER, D. **Rinite micótica rinofaríngea em um ovino Texel no Rio Grande do Sul.** Acta Sci Vet, 37: 181-185, 2009.

PÉREZ, J.; CORREA, A.; FUENTES, J.; MELÉNDEZ, E. **Conidiobolomycosis: a case report with histopathologic findings.** Biomedica, 24: 350-355, 2004.

PHADATARE, S.; SRINIVASAN, M.; DESHPANDE, V. **Evidence for controlled autoproteolysis of alkaline protease. A mechanism for physiological regulation of conidial discharge in *Conidiobolus coronatus*.** Eur J Biochem, 205: 679-686, 1992.

PRABHU, R.; PATEL, R. **Mucormycosis and entomophthoramycosis: a review of the clinical manifestations, diagnosis and treatment.** Clin Microbiol Infect, 1: 31-47, 2004.

PUJARY, P.; PUJARY, K.; MAHESH, S.; VALIATHAN, M. **Conidiobolus coronata granuloma of left inferior turbinate: a rare presentation.** J Laryngol Otol, 122: e15, 2008.

RADHAKRISHNAN, N.; SACHDEVA, A.; OBEROI, J.; YADAV, S. **Conidiobolomycosis in relapsed acute lymphoblastic leukemia.** Pediatr Blood Cancer, 53: 1321-1323, 2009.

RIBES, J.; VANOVER-SAMS, C.; BAKER, D. **Zygomycetes in human disease.** Clin Microbiol Rev, 13: 236-301, 2000.

RIET-CORREA, F.; DANTAS, A. F. M.; AZEVEDO, E. O.; SIMÕES, S. D. V.; SILVA, S. M. M. S.; VILELA, R.; MENDOZA, L. **Outbreaks of rhinofacial and rhinopharyngeal zygomycosis in sheep in Paraíba, northeastern Brazil.** Pesq Vet Bras, 28: 29-35, 2008.

ROY, A.; CAMERON, H. **Rhinophycomycosis entomophthorae occurring in a chimpanzee in the wild in East Africa.** Am J Trop Med Hyg, 21: 234-237, 1972.

SÁNCHEZ, S.; FREITAS, A.; ROBERTS, D. **Detección de hongos Entomophthorales patógenos a insectos fitófagos, al sur de Bahia, Brasil.** Entomotropica, 16: 203-206, 2001.

SEGURA, J.; GONZALEZ, K.; BERROCAL, J.; MARIN, G. **Rhinoentomophthoromycosis: report of the first two cases observed in Costa Rica (Central America), and review of the literature.** Am J Trop Med Hyg, 30: 1078-1084, 1981.

SHARMA, N.; MAHAJAN, V.; SINGH, P. **Orofacial conidiobolomycosis due to *Conidiobolus incongruus***. *Mycoses*, 46: 137-140, 2003.

SILVA, S. M. M. S.; CASTRO, R.; COSTA, F.; VASCONCELOS, A.; BATISTA, M.; RIET-CORREA, F.; CARVALHO, E. **Conidiobolomycosis in sheep in Brazil**. *Vet Pathol*, 44: 314-319, 2007a .

SILVA, S. M. M. S.; CASTRO, S.; COSTA, F.; VASCONCELOS, A.; BATISTA, M.; RIET-CORREA, F.; CARVALHO, E. LOPES J. **Epidemiologia e sinais clínicos da conidiobolomicose em ovinos no Estado do Piauí**. *Pesq Vet Bras*, 27: 184-190, 2007b.

SOUZA, F.; SOUZA, A.; JÚNIOR, A.; COSTA, F.; RIET-CORREA, F.; MENDONZA, L.; CARVALHO, E.; SILVA, S. M. M. S. **Pitiose em ovinos no estado do Piauí**. In 35° Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. Gramado-RS, 2005.

STEIGER, R.; WILLIAMS, M. **Granulomatous tracheitis caused by *Conidiobolus coronatus* in a horse**. *J Vet Intern Med*. 14: 311-314, 2000.

STEPHENS, C.; GIBSON, J. **Disseminated zygomycosis caused by *Conidiobolus incongruus* in a deer**. *Aust Vet J*, 75: 358-359, 1997.

SUTTON, D. A.; FOTHERGILL, A. W.; RINALDI, M. G. ***Conidiobolus coronatus* (Constantin) Batko; 1964**. In C W Mitchell (ed), *Guide to clinically significant fungi* The Williams & Wilkins Co, Baltimore, Md: 144–145, 1998.

TADANO, T.; PAIM, N.; HUEB, M.; FONTES, C. **Entomophthoramycosis (zygomycosis) caused by *Conidiobolus coronatus* in Mato Grosso (Brazil): case report**. *Rev Soc Bras Med Trop*, 38: 188-190, 2005.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. **MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0.** Mol Biol Evol, 24: 1596-1599, 2007.

TAN, D.; HSU, L.; KOH, L.; GOH, Y.; KOH, M. **Severe conidiobolomycosis complicating induction chemotherapy in a patient with acute lymphoblastic leukaemia.** Br J Haematol, 129: 447, 2005.

TAYLOR, G.; SEKHON, A.; TYRRELL, D.; GOLDSAND, G. **Rhinofacial zygomycosis caused by *Conidiobolus coronatus*: a case report including in vitro sensitivity to antimycotic agents.** Am J Trop Med Hyg, 36: 398-401, 1987.

THAMMAYYA, A . **Zygomycosis due to *Conidiobolus coronatus* in west Bengal.** Indian J Chest Dis Allied Sci, 42: 305-309, 1995.

THOMAS, M.; BAI, S.; JAYAPRAKASH, C.; JOSE, P.; EBENEZER, R. **Rhinoentomophthoromycosis.** Indian J Dermatol Venereol Leprol, 72: 296-299, 2006.

VALLE, A.; WANKE, B.; LAZÉRA, M.; MONTEIRO, P.; VIEGAS, M. **Entomophthoramycosis by *Conidiobolus coronatus*. Report of a case successfully treated with the combination of itraconazole and fluconazole.** Rev Inst Med Trop S Paulo, 43: 233-236, 2001.

VILELA, R.; SILVA, S. M. M. S.; RIET-CORREA, F.; DOMINGUEZ, E.; MENDOZA, L. **Morphologic and phylogenetic characterization of *Conidiobolus lamprauges* recovered from infected sheep.** J Clin Microbiol, 2009, DOI:10.1128/JCM.01589-09.

VOIGT, K.; CIGELNIK, E.; O'DONNELL, K. **Phylogeny and PCR identification of clinically important *Zygomycetes* based on nuclear ribosomal-DNA sequence data.** J Clin Microbiol, 37: 3957-3964, 1999.

VOIG, T. K.; WÖSTEMEYER, J. **Phylogeny and origin of 82 zygomycetes from all 54 genera of the *Mucorales* and *Mortierellales* based on combined analysis of actin and translation elongation factor EF-1alpha genes.** *Gene*, 270: 113-120, 2001.

WALSH, T.; RENSHAW, G.; ANDREWS, J.; KWON-CHUNG, J.; CUNNION, R.; PASS, H.; TAUBENBERGER, J.; WILSON, W.; PIZZO, P. **Invasive zygomycosis due to *Conidiobolus incongruus*.** *Clin Infect Dis*, 19: 423-430, 1994.

WIELOCH, W.; SACHARCZUK, M.; BOGUŚ, M.; JASZCZAK, K. **A study for minisatellitic markers of *Conidiobolus coronatus* pathogenicity to *Galleria mellonella* larvae.** *J Invertebr Pathol*, 85: 63-69, 2004.

YANG, X.; LI, Y.; ZHOU, X.; WANG, Y.; GENG, S.; LIU, H.; YANG, Q.; LU, X.; HIRUMA, M.; SUGITA, T.; IKEDA, S.; OGAWA, H. **Rhinofacial conidiobolomycosis caused by *Conidiobolus coronatus* in a Chinese rice farmer.** *Mycoses*, DOI: 10.1111/j.1439-0507.2009.01716.x

YENDOL, W. **Factors affecting the germination of *Entomophthora coronatus*.** *J Invertebr Pathol*, 10: 111, 1968.

APÊNDICE A – ARTIGO CIENTÍFICO

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)