



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

**"DESCRIPCIÓN DE UN CASO DE PITIOSIS CUTÁNEA EQUINA EN EL LITORAL
OESTE DEL URUGUAY Y SU DIAGNÓSTICO"**

por

María Pía PEREIRA MERLO

TESIS DE GRADO presentada como uno de los requisitos para obtener el título de Doctor en Ciencias Veterinarias.
Orientación: Producción animal.

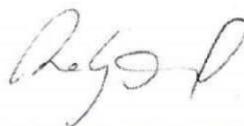
MODALIDAD: ESTUDIO DE CASO.

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2021**

PÁGINA DE APROBACIÓN

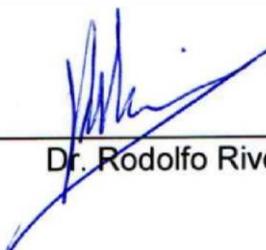
Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:



Dr. Rodrigo Puentes

Segundo miembro (Tutor):



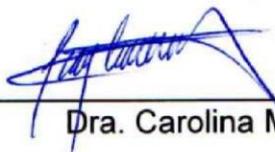
Dr. Rodolfo Rivero

Tercer miembro:



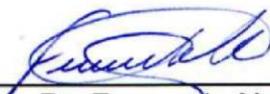
Dr. Dietrich Pizzigatti

Cuarto miembro:



Dra. Carolina Matto

Quinto miembro:



Dr. Fernando Nan

Fecha:

09/12/2021

Autor:



Br. María Pía Pereira Merlo

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer profundamente a mi tutor, el Dr. Rodolfo Rivero, por la oportunidad, la dedicación, la confianza, el apoyo y la enseñanza que me brindó en cada una de las etapas de esta tesis de grado y en otros asuntos relacionados a la profesión. También quiero agradecer a mis cotutores, la Dra. Carolina Matto y el Dr. Fernando Nan por la disponibilidad y el respaldo que me brindaron en todo momento.

A Marcos Schanzembach, por su espíritu científico y su dedicación, que hicieron posible llevar a cabo diferentes estudios que se plasmaron en esta tesis de grado.

A mis padres, hermanos, abuelos, tíos y primos que creyeron en mí y me apoyaron incondicionalmente en todo el transcurso de la carrera.

A mis amigos de Paysandú y a todos aquellos que pude cosechar en el transcurso de la carrera, haciendo de ellos parte importante de mi vida.

A la Facultad de Veterinaria que supe disfrutar de cada rincón de la misma y a los profesores y veterinarios que brindaron sus conocimientos y herramientas para poder lograr el cometido.

A los funcionarios del DILAVE “Miguel C. Rubino” y a la Dra. Deborah Cesar por la oportunidad, el respaldo y el apoyo que me brindaron durante todo este tiempo.

Y por último quiero dedicar esta tesis de grado a mis abuelos que siempre me acompañaron, apoyaron y guiaron en cada etapa de mi vida.

¡A todos ellos muchas gracias!

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	6
1. RESUMEN	9
2. SUMMARY	10
3. INTRODUCCIÓN	11
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	13
4.1. El sector ecuestre en Uruguay	13
4.2. Generalidades de la pitiosis	13
4.3. Antecedentes	15
4.4. Impacto económico	16
4.5. Etiología	16
4.6. Epidemiología	17
4.7. Patogenia	20
4.8. Comportamiento del <i>Pythium insidiosum</i> en diferentes especies	23
4.8.1. Equinos	23
4.8.2. Burros	26
4.8.3. Bovinos	26
4.8.4. Ovinos	28
4.8.5. Caninos	30
4.8.6. Felinos	31
4.8.7. Humanos	33
4.9. Diagnóstico de laboratorio	35
4.9.1. Patología clínica	36
4.9.2. Frotis directo en montaje húmedo	36
4.9.3. Cultivo	37
4.9.4. Histopatología	39
4.9.5. Inmunohistoquímica (IQ)	41
4.9.6. Inmunofluorescencia (IF)	42
4.9.7. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	43
4.9.8. ELISA	43
4.9.9. Inmuno-Difusión en Gel Agar (IDGA)	43
4.9.10. Fijación del Complemento (FC)	45
4.9.11. Inmunocromatografía (ICT)	45
4.9.12. Western Blot (WB)	46

4.10. Diagnóstico diferencial	47
4.11. Tratamiento	48
4.11.1. Cirugía	49
4.11.2. Quimioterapia/ Antimicóticos	49
4.11.3. Inmunoterapia	49
4.12. Control	51
5. OBJETIVOS	52
5.1. Objetivo general	52
5.2. Objetivos específicos	52
6. MATERIALES Y MÉTODOS	53
6.1. Datos del establecimiento	53
6.2. Descripción del caso	53
6.3. Datos climáticos	55
6.4. Histopatología e inmunohistoquímica	55
6.5. Aislamiento e identificación del agente	55
6.6. Caracterización molecular	56
7. RESULTADOS	57
7.1. Datos del establecimiento y condiciones ambientales	57
7.2. Datos clínicos	58
7.3. Datos climáticos	60
7.4. Hallazgos macroscópicos	62
7.5. Histopatología e inmunohistoquímica	63
7.6. Aislamiento e identificación	64
7.7. Caracterización molecular	65
8. DISCUSIÓN	66
9. CONCLUSIONES	68
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Figura 1. Mapa mundial que muestra la distribución de la pitiosis en zonas tropicales, subtropicales y templadas. (Mendoza, 2010).	19
Figura 2. Animales pastando en zonas inundadas. (Cardona, 2013b).	19
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Pythium insidiosum</i> en la naturaleza. (Mendoza, 1996)..	22
Figura 4. Equino. Lesión ulcerativa granulomatosa con descarga viscosa serosanguinolenta en abdomen ventral correspondiente a pitiosis cutánea. (Scott y Miller, 2011).	23
Figura 5. Equino. Lesión granulomatosa con secreción fibrinosanguinolenta (flechas) en la zona del mentón por debajo de labio inferior. (Cardona et al., 2013b).	24
Figura 6. Equino. Presentación clínica de pitiosis en miembro posterior. (Acero-Mondragón, 2013).	24
Figura 7. Burra de 78 meses de edad. Se observa en miembro posterior derecho y miembro anterior izquierdo una lesión ulcerativa granulomatosa y sobresaliente a nivel de piel. (Cardona et al., 2013a).	26
Figura 8. Bovino. Presencia de lesión ulcerativa granulomatosa irregular, con presencia de material necrótico y exudado fibrino-sanguinolento en extremidades (flechas). (Cardona et al., 2012).	27
Figura 9. Ovino. Deformación en más de la región nasal. (do Carmo et al., 2020). ..	29
Figura 10. Pitiosis intestinal en perro labrador. (Pereira et al., 2010).	31
Figura 11. Pitiosis cutánea en perro labrador. (Pereira et al., 2010).	31
Figura 12. Gato. Tomografía computarizada de la cavidad nasal que ilustra la destrucción ósea (flecha) asociada con masas retrobulbares bilaterales (puntas de flecha) que son continuas con la masa en la cavidad nasal. (Bissonnette et al., 1991).	32
Figura 13. Pitiosis sublingual en Gato. (Fortin et al., 2017).	32
Figura 14. Humano. Aspecto clínico de lesión cutánea en extremidad izquierda. (Bosco et al., 2005).	34
Figura 15. Humano. Pitiosis ocular en un niño sano. (Mendoza, 2010).	35
Figura 16. Frotis húmedo con KOH al 10% de un “kunker” proveniente de un equino con pitiosis. (Gaastra et al., 2010).	37
Figura 17. Cultivo de <i>Pythium insidiosum</i> a los 5 días pos incubación a 37°C en un medio Sabouraud dextrosa agar al 2%. (Gaastra et al., 2010).	38

Figura 18. Hifas de <i>Pythium insidiosum</i> escasamente septadas en azul de lactofenol (20 X), obtenidas de cultivo en placa. (Gaastra et al., 2010).	38
Figura 19. A: Vesículas con zoosporas que se desarrollaron después de 3 h de incubación. B: primer plano de una vesícula antes de la liberación de zoosporas. Debajo de la vesícula se ve el tubo de descarga vacío. (Gaastra et al., 2010).	39
Figura 20. Equino. Dermis. Hematoxilina y Eosina. 40X. Fenómeno de Splendore-Hoeppli (flecha). (Márquez et al., 2010).	40
Figura 21. Equino. Dermis. Hematoxilina y Eosina. 40X. Se observa una lesión con alta vascularización, fibrosis e infiltrado de eosinófilos difuso intenso, seguidos por macrófagos y neutrófilos. (Márquez et al., 2010).	41
Figura 22. Equino. Dermis. A: Hifa con ramificación en ángulo recto en coloración de PAS a 100X (flecha) B: Hifa con región delgada alternada de región gruesa en coloración de Gomori a 100X (flecha). (Acero- Mondragón et al., 2013).	41
Figura 23. Equino. Dermis. Inmunohistoquímica 100X. Marcación positiva en rojo para <i>Pythium insidiosum</i> (flecha). (Pedroso et al., 2009).	42
Figura 24. Inmuno-Difusión en Gel Agar (IDGA). Se puede observar la reactividad de <i>Pythium spp.</i> en un filtrado de cultivo y en antígenos tripsinizados al enfrentarse con suero de un caballo con pitiosis. (Mendoza et al., 1986).	45
Figura 25. Inmunocromatografía (ICT). Diagrama esquemático de la técnica de inmunocromatografía (ICT) basada en las proteínas A/G para la detección de anti- <i>Pythium insidiosum</i> IgGs. (Intaramat et al., 2016).	46
Figura 26. Western Blot (WB). Análisis de antígenos filtrados de cultivos de diferentes cepas de <i>Pythium insidiosum</i> (líneas 1- 5) y antígenos (CFA) de <i>Conidiobolus coronatus</i> (línea 6) tras la reacción con sueros de animales con pitiosis. (Mendoza et al., 1996).	47
Figura 27. Figura ilustrativa representando en la sección derecha la respuesta inflamatoria de un huésped naturalmente expuesto a <i>Pythium insidiosum</i> y del lado izquierdo la respuesta putativa a los inmunógenos de <i>P. insidiosum</i> después de la inmunoterapia. (Gaastra et al., 2010).	51
Figura 28. Equino. Lesión a nivel de abdomen ventral.	53
Figura 29. Equino. Lesión a nivel de abdomen ventral. Se observa continua secreción fibrinosanguinolenta.	54
Figura 30. Mapa del predio con división de potreros y curvas de nivel.	58
Figura 31. Equino. Estado de emaciación con presencia de lesión a nivel de abdomen ventral.	59
Figura 32. Equino. Lesión a nivel de abdomen ventral exudando líquido viscoso serosanguinolento.	59

Figura 33. Gráfico de temperaturas máximas, temperaturas medias y temperaturas mínimas del período comprendido entre diciembre del año 2016 y junio del año 2017 (EEMAC).....	60
Figura 34. Gráfico de precipitaciones mensuales totales del período comprendido entre diciembre del año 2016 y junio del año 2017 (EEMAC).....	60
Figura 35. Gráfico de precipitaciones totales registradas en los meses de enero y febrero en el período comprendido entre los años 1987 a 2017 (Inumet).....	61
Figura 36. Gráfico de temperaturas máximas, medias y mínimas registradas en los meses de enero y febrero en el período comprendido entre los años 1987 a 2017 (Inumet).....	61
Figura 37. Equino. A: Tejido extirpado en su cara adyacente a la pared abdominal. Se observa abundante tejido de granulación, extensas áreas de fibrosis y focos amarillentos de textura caseosa (“kunkers”). B: Tejido extirpado, cara superficial....	62
Figura 38. Equino. A, B y C: Cortes transversales del tejido extirpado. Tejido de granulación, áreas multifocales de necrosis con contenido supurativo hemorrágico y concreciones blanco-amarillentas (“kunkers”) (flechas).....	62
Figura 39. Equino. Piel. A: Hematoxilina y eosina (H-E) 100X. Foco de necrosis rodeada por polimorfonucleares y macrófagos. Se observan también en el tejido conjuntivo un infiltrado difuso de eosinófilos. B: Grocott, 400X. Presencia de hifas (flechas) en lesión de subcutáneo. (Schanzembach et al., 2019).....	63
Figura 40. Equino. Piel. Inmunohistoquímica. DAB, 100X. Marcación positiva a <i>P. insidiosum</i> (flechas). (Schanzembach et al., 2019).	63
Figura 41. Zoosporogénesis in vitro de <i>P. insidiosum</i> , 3 horas de incubación a 37°C. (Schanzembach et al., 2019).....	64
Figura 42. PCR-anidado en gel agarosa. (Schanzembach et al., 2019).	65

1. RESUMEN

La pitiosis es una enfermedad causada por el oomiceto *Pythium insidiosum*. Esta patología está presente en zonas de clima templado, tropical y subtropical a lo largo del mundo. Los animales generalmente se infectan cuando presentan algún tipo de lesión y permanecen durante largos períodos de tiempo en cuerpos de agua estancada donde están presentes las zoosporas móviles. Este trabajo tiene como objetivo describir el primer caso de pitiosis cutánea en un equino en la región litoral oeste de Uruguay y su confirmación mediante estudios microbiológicos, histopatológicos, inmunohistoquímicos y moleculares. En 2017, en el departamento de Paysandú, un equino hembra raza Criolla de 24 años de edad presentó una lesión a nivel de piel de color amarillento, circular, ulcerada en la zona ventral del abdomen. La lesión fue aumentando significativamente de tamaño en 30 días y exudaba permanentemente un líquido viscoso de color amarillo. Se realizó biopsia y posteriormente extirpación quirúrgica de la lesión y necropsia. A la histopatología destacaba en dermis superficial y profunda neovascularización, gran cantidad de tejido conjuntivo y áreas multifocales de necrosis, rodeada principalmente por abundantes eosinófilos y macrófagos (“kunkers”). Con la coloración argéntica de Grocott se observó hifas dentro de las áreas de necrosis. A la inmunohistoquímica se obtuvo inmunomarcación positiva para *P. insidiosum*. En el cultivo microbiológico de lesiones refrigeradas se observaron colonias blanquecinas de crecimiento radial con desarrollo de micelio aéreo, además, se realizó la inducción de la zoosporogénesis y la caracterización de las zoosporas. Por último se realizó PCR- anidado donde se amplificó la región ITS (ITS1, 5.8S, ITS2) y una segunda reacción que amplificó el gen de la región ITS1. La secuencia obtenida en ambos amplicones tuvo una homología del 100% con *P. insidiosum* (GenBank número de acceso MF767408). Tomando en cuenta que se han registrado casos de pitiosis en equinos en diferentes áreas del país, sería necesario incluirla en el diagnóstico diferencial de lesiones proliferativas y de evolución crónica en equinos en Uruguay.

2. SUMMARY

Pythiosis is a disease caused by the oomycete *Pythium insidiosum*. It is reported in temperate, tropical and subtropical areas of the world. Animals become infected when they present a previous skin lesion, and remain for long periods of time in stagnant bodies of water where motile zoospores are present. The aim of this work is to describe the first case of cutaneous pythiosis in a horse in the western littoral region of Uruguay and, its confirmation through microbiological, histopathological, immunohistochemical and molecular studies. In 2017, in Paysandú county, a 24-year-old Criolla mare presented a yellowish, circular, ulcerated skin lesion in the ventral area of the abdomen. The lesion increased in size significantly in 30 days and was permanently exuding a viscous yellow liquid. A biopsy of the lesion was performed and later, surgical removal and necropsy was done. Histopathology revealed neovascularization in superficial and deep dermis, a large amount of connective tissue and multifocal areas of necrosis, mainly surrounded by abundant eosinophils and macrophages (“kunkers”). Through Grocott's silver staining, hyphae were observed in the areas of necrosis. The immunohistochemistry was positive for *P. insidiosum*. In the microbiological culture of refrigerated lesions, whitish colonies of radial growth with development of aerial mycelium were observed. Additionally, the induction of zoosporogenesis and the characterization of the zoospores were carried out. Finally, a nested PCR was performed, where first the ITS region (ITS1, 5.8S, ITS2) was amplified and second a reaction that amplified the gene from the ITS1 region was developed. The sequence obtained in both amplicons had 100% homology with *P. insidiosum* (GenBank accession number MF767408). Considering that cases of pythiosis have been registered in horses in different areas of Uruguay, it would be necessary to include this disease in the differential diagnosis of proliferative and chronically evolving skin lesions.

3. INTRODUCCIÓN

La pitiosis es una enfermedad causada por el oomiceto *Pythium insidiosum*, que forma parte del reino *Stramenopila*, clase *Oomicetos*. Son organismos saprófitos del suelo y patógenos de plantas. *P. insidiosum* es patógeno para animales, afectando a equinos, burros, bovinos, ovinos, caninos, felinos y al hombre (Cardona Álvarez, Vargas Viloría y Perdomo Ayola, 2013a; do Carmo, Uzal y Riet-Correa, 2020; Gaastra et al., 2010; Mendoza, 2010; Mendoza, Ajello y McGinnis, 1996).

Pythium insidiosum normalmente se encuentra en regiones tropicales y subtropicales; en cuerpos de agua estancados, pasturas y suelos. El estadio de zoospora biflagelada es la forma infectante y normalmente se encuentra en el agua. Estas requieren de temperaturas mayores a 30°C por al menos un día en períodos de precipitación constantes para su formación. Son atraídas hacia las lesiones de la piel de los animales o tejido vegetal dañado, donde se alojan e infectan al huésped. En los equinos el período de incubación para la aparición de los primeros signos clínicos de pitiosis es de 3 semanas (Gaastra et al., 2010; Marcolongo et al., 2012; Presser y Goss, 2015).

La pitiosis cutánea en equinos provoca lesiones que se caracterizan por la presencia de concreciones de aspecto granulomatoso de color amarillento a nivel de la piel llamados “kunkers”. Estas concreciones están limitadas al área de la lesión por donde ingresó el patógeno. Los “kunkers” son lesiones específicas para la pitiosis equina que no se manifiestan en otras especies afectadas por el agente. Comúnmente estas lesiones se hallan en la zona distal de las extremidades, ventral del abdomen y tórax (Gaastra et al., 2010; Luis-León y Pérez, 2011; Mendoza y Alfaro, 1986; Mendoza et al., 1996; Mendoza y Newton, 2005; Scott y Miller, 2011).

Histológicamente en las lesiones destaca la presencia de abundante tejido conectivo dispuesto de forma irregular, una alta vascularización dada por numerosas arteriolas, abundantes eosinófilos seguidos de macrófagos y en menor medida neutrófilos generando un infiltrado difuso, gran cantidad de fibroblastos, zonas de necrosis multifocal y el fenómeno de Splendore-Hoeppli (dermatitis granulomatosa eosinofílica difusa). Además, al emplear la tinción de Grocott se colorean positivamente las hifas de *Pythium insidiosum* (Márquez, Salas, Canelón, Perazzo, y Colmenárez, 2010).

Se trata de una patología de curso crónico que progresa rápidamente, pudiendo llevar a la muerte si no es tratada a tiempo. Es por ello que para la cura de la pitiosis cutánea equina se utilizan tres tipos de tratamientos: la remoción quirúrgica de las lesiones, el uso de antimicóticos y el uso de inmunoterápicos (Mendoza et al., 1996; Santurio, Alves, Pereira, y Argenta, 2006; Scott, y Miller, 2011).

Esta enfermedad es reportada comúnmente en Brasil en la zona de Río Grande del Sur y también en el norte de Argentina, afectando principalmente equinos, caninos, felinos y en menor medida rumiantes. En Uruguay ha sido descrita solo en equinos en la región este, asociada a zonas bajas o campos arroceros, donde se forman cuerpos de agua estancada (Allassia et al., 2016; Cardozo et al., 2016; Dutra, 2012; Gabriel et al., 2008; Galiza et al., 2014; García, Balestí, Romero, Quinteros y Dutra, 2018; Marcolongo et al., 2012; Sallis, Pereira, y Raffi, 2003;).

El objetivo de este trabajo de tesis es describir un caso de pitiosis equina en la región litoral oeste de Uruguay, su evolución y la confirmación del diagnóstico utilizando diferentes técnicas de laboratorio.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1. El sector ecuestre en Uruguay

Según el informe realizado sobre “Caracterización y potencialidades del sector ecuestre en Uruguay” a cargo del Ing. Agr. Alejandro Ferrari, Uruguay ocupa el segundo puesto mundial en relación a habitantes por caballo (Ferrari, 2012).

Uruguay cuenta con aproximadamente 425.000 cabezas de equinos. El 87% de los animales corresponden a las categorías agro y servicios; entre un 7 y un 8% a razas funcionales; entre un 4 y un 5% a deportes ecuestres y entre un 1 y 2% a turismo y enseñanza. Dentro de los deportes ecuestres el 39% corresponde a la Hípica, el 22% al Enduro, el 11% al Raid y el 5% al Polo (Ferrari, 2012).

El aporte económico del sector ecuestre en su conjunto ronda entre los U\$S 335 millones anuales. Aproximadamente unos U\$S 224 millones (67% del total) corresponden al aporte realizado por los propietarios particulares; unos U\$S 76 millones (23%) al aporte del público a través de apuestas y turismo de eventos; unos U\$S 29 millones (9%) corresponden a las exportaciones totales (incluyendo las realizadas por los frigoríficos) y por último, se posicionan los aportes de jinetes no propietarios y sponsors que representan menos del 2% (Ferrari, 2012).

Siguiendo con lo anteriormente mencionado, las exportaciones uruguayas referentes al sector ecuestre representan aproximadamente unos U\$S 29 millones anuales. La carne y los subproductos de la faena alcanzan unos U\$S 23 millones anuales, siendo el principal rubro de exportación (Ferrari, 2012).

4.2. Generalidades de la pitiosis

La pitiosis es una enfermedad que afecta tanto a los animales como a los seres humanos y es causada por *Pythium insidiosum*, el único oomiceto perteneciente a la familia *Pythium* spp. capaz de generar esta patología (Acero- Mondragón et al., 2013).

Los organismos del género *Pythium* spp. tienen una distribución mundial y se ubican tanto en el suelo como en ambientes acuáticos. Por lo general son organismos saprófitos o patógenos de las plantas que generan múltiples daños que se pueden ver como marchitamientos o pudrición en las distintas partes de las mismas. Otras especies de *Pythium* son parásitos de insectos, peces y algas (Adhikari et al., 2013; Mendoza et al., 1996; Mendoza, Hernandez y Ajello, 1993; Presser y Goss, 2015; Van der Plaats-Niterink, 1981).

El *Pythium insidiosum* en particular es la especie que infecta a humanos y mamíferos. Si bien es un microorganismo similar a un hongo, está filogenéticamente distante del reino de los hongos y más cercano al de las algas (Cardona Álvarez, Vargas Viloria y Perdomo, 2012; Presser y Goss, 2015).

Esta enfermedad se manifiesta mayoritariamente en la especie equina en su forma cutánea y subcutánea. No se trata de una patología contagiosa ni de una zoonosis, es decir, no se transmite ni de animal a animal, ni de animal a humano (Brayer et al., 2008; Gaastra et al., 2010).

Tanto el agua como el suelo son parte del hábitat natural del *Pythium insidiosum*. Lagos y estanques situados en suelos negros, con barro y con una gran cantidad de materia orgánica en descomposición favorecen la presencia y proliferación del mismo. También está la hipótesis de que el agua tibia estancada en estos lugares crearía un ambiente acogedor para *P. insidiosum*. En lugares donde esta enfermedad es endémica, la exposición a estos reservorios puede ser un factor de riesgo importante (Presser y Goss, 2015; Vanittanakom et al., 2013).

Pythium insidiosum produce zoosporas móviles responsables de la infección. Para que estas zoosporas esporulen requieren de agua libre, de un ambiente específico y de un bajo nivel de nutrientes. Las zoosporas tienen quimiotaxis por tejidos dañados tanto de plantas como de animales; ellas producen una sustancia que les permite un contacto estrecho con el huésped en las etapas iniciales de la infección. Los animales generalmente son infectados cuando al presentar lesiones periféricas tienen contacto con agua estancada. De esta forma las zoosporas ingresan por la herida e infectan al huésped. Luego pierden el flagelo que les permitía su movilización, se enquistan y comienzan a generar tubos germinativos e hifas filamentosas que penetran los tejidos y son quienes le dan la posibilidad de expandirse e ir afectando los alrededores de la lesión. Distintas especies de plantas que se encuentran en ambientes acuáticos o húmedos juegan un rol fundamental para completar el ciclo de vida y la propagación del *Pythium* spp. en el ambiente (Mendoza et al., 1993; Presser y Goss, 2015; Scott y Miller, 2011).

La pitiosis es una dermatitis piogranulomatosa exudativa de distribución difusa y multifocal que progresa rápidamente. Es de curso crónico y puede llevar a la muerte. Conocida en Brasil como “cáncer del pantano”, “mal de los pantanos”, “herida brava” y “herida de moda”. En Colombia la llaman “espundia equina”. Y en otros lugares la conocen como “bursitis”, “dermatitis granular”, “llaga de verano”, “kunker”, “sanguijuelas de Florida”, “hongos de la Costa del Golfo”, “ficomicosis”, “hifomicosis” y “oomicosis” (Cardona Álvarez, Vargas Vilorio y Perdomo, 2013b; Cardona et al., 2012; Mendoza et al., 1993; Scott y Miller, 2011).

Se desarrolla en climas templados, tropicales y subtropicales a lo largo del mundo. Se la relaciona con estaciones del año en donde llueve mucho. Tal es el ejemplo de India en donde la patología es comúnmente llamada “bursitis” y el término “burus” significa lluvia (Mendoza et al., 1993; Mendoza et al., 1996; Simeone et al., 2003).

Utilizando datos de secuencias de la región ITS (internal transcriber spacer) y el gen mitocondrial cox II, se pueden identificar al menos tres líneas genéticas evolutivas de *Pythium insidiosum*. El Clúster I está compuesto por aislamientos clínicos de América del Norte, Central y Sur. El Clúster II contiene aislamientos clínicos de Australia, América y el Sureste Asiático, además de aislamientos ambientales provenientes de Tailandia. Y el Clúster III contiene aislamientos clínicos y ambientales procedentes de América y de Tailandia. El Clúster III aparece separado de los Clúster I y II aparentando ser una especie diferente (Presser y Goss, 2015).

La pitiosis se ha ido expandiendo a nivel geográfico con el correr de los años. Esto probablemente se deba a factores ambientales que el hombre ha ido modificando, tales como cultivos de arroz y sistemas de riego que generan un ambiente propenso para el desarrollo de *Pythium insidiosum*. La mayoría de los casos clínicos de esta enfermedad se han reportado en las estaciones de otoño e invierno en áreas tropicales

y subtropicales de Australia, India, Tailandia, Brasil y Costa Rica (Berryessa et al., 2008; Scott y Miller, 2011).

Normalmente los casos clínicos se observan en equinos, ovinos y bovinos. En estos casos las lesiones se localizan en zonas ventrales del tórax, abdomen y en las extremidades. También se han observado casos en caninos con presentaciones gastrointestinales y en felinos con presentaciones respiratorias. En humanos la patología generalmente se restringe a presentaciones cutáneas y subcutáneas en las extremidades y se ven lesiones de tipo nodular que se ulceran y secretan un líquido serosanguinolento (Acero- Mondragón et al., 2013).

4.3. Antecedentes

A mediados del siglo XIX en la India, un grupo de veterinarios que estudiaban granulomas cutáneos en equinos reportaron por primera vez esta enfermedad pero no lograron llegar a su etiología. Fue precisamente entre los años 1884 y 1896 cuando aparecieron las primeras publicaciones de los autores Smith, Fish y Drouin, donde se cuestionó que la pitiosis podría ser causada por un agente similar a un hongo (Mendoza, 2010).

Haan and Hoogkamer (1901) en Indonesia, la nombraron como “*hypomycosis destruens*” y luego, Haan (1902) lo modifica al de “*hypomycosis destruens equi*” (Gaastra et al., 2010).

Witkamp (1924), científico holandés, fue quien logró aislar el agente. Un agente que no esporulaba en el medio. Escribió varios trabajos en donde habló de sus signos clínicos, patología, microbiología, diagnóstico, inoculación en animales, tratamiento e inmunología. Por desgracia estas publicaciones fueron dejadas de lado por mucho tiempo, en parte debido al idioma y por otro lado debido a que otros investigadores de la época planteaban la hipótesis de que los granulomas cutáneos en equinos eran causados por parásitos nematodos del género *Habronema* (Mendoza, 2010).

Bridges y Emmons (1961), llamaron ficomicosis a la patología tras aislar un microorganismo que a su entender se trataba de una especie de *Mortierella*, un zigomiceto. Como era un aislamiento similar a aquellos que habían sido estudiados por Haan, Hoogkmer y Witkamp, fue nombrado como *Hypomyces destruens* basándose en el nombre acuñado anteriormente por Haan and Hoogkamer. (Gaastra et al., 2010).

Austwick y Copland (1974), dieron a conocer que el organismo aislado de lesiones patológicas de “cáncer de pantano” en equinos que provenían de Papúa, Nueva Guinea, formaba zoosporas biflageladas y lo clasificaron como un oomiceto dentro del género *Pythium* sin asignarle un nombre científico por no saber si se trataba de una nueva especie o una especie ya reconocida. Fue en ese entonces que se empezó a sospechar de la existencia de un *Pythium* spp. patógeno para mamíferos (Austwick y Copland, 1974).

Más adelante, Ichitani y Amemiya (1980), aislaron de una dermatitis granular de un caballo proveniente de Japón, un microorganismo filamentoso al cual identificaron como *Pythium gracile* por su producción de oogonias lisas y zoosporas apleróticas (Mendoza, 2010).

Fueron de Cock, et al. (1987), los que introdujeron el nombre de *Pythium insidiosum* cuando al realizar múltiples aislamientos notaron que se trataba de una especie de *Pythium* nunca antes descrita. Ellos también reportaron que otros aislamientos provenientes de equinos, caninos y bovinos también pertenecían a esa especie y concluyeron que *Pythium gracile* e *hypomycosis destruens* eran sinónimos de *Pythium insidiosum*. Por otro lado y precisamente en ese mismo año, Shipton aislaba una nueva especie de *Pythium* extraída de caballos Australianos y le asignaba el nombre de *Pythium destruens* (de Cock, Mendoza, Padhye, Ajello y Kaufman, 1987; Shipton, 1987).

Los estudios que realizaron Mendoza y Marin (1989), revelaron que *Pythium destruens* tenía la misma estructura antigénica que *Pythium insidiosum* y que las otras cepas encontradas en animales y humanos a lo largo del mundo. Por lo tanto el único agente que causaba la pitiosis era *Pythium insidiosum* (Mendoza y Marin 1989).

Schurko et al. (2003), mediante técnicas moleculares confirmaron que *Pythium insidiosum* era la única especie de *Pythium* capaz de generar pitiosis en mamíferos, y que existían variantes geográficas (Schurko, Mendoza, de Cock y Klassen, 2003).

Si bien seguimos la evolución cronológicamente, es importante mencionar que fué desde el año 1961 que se reportaron casos de pitiosis en equinos, gatos, bovinos, perros, humanos e inclusive en osos y camellos de zoológicos del Sur de Carolina y Florida respectivamente. (Mendoza, 2010).

Si nos referimos a los antecedentes en Uruguay, el primer caso diagnosticado y confirmado de pitiosis cutánea se trató de una yegua raza criolla con una lesión en el labio inferior. Ocurrió en mayo del año 2012 en un predio arrocero y ganadero próximo a la Laguna Merín en el departamento de Treinta y Tres, paraje Costas de Tacuarí (Dutra, 2012).

Entre los años 2012 y 2017 se describieron seis casos más de pitiosis cutánea equina en la región este del país. Todos ellos ocurridos entre los meses de marzo y junio en campos bajos con poco drenaje (García et al., 2018).

Hernandorena y Jackson (2018) describen un caso en el departamento de Treinta y Tres de un equino sexo hembra con una lesión en región ventral de abdomen. (Hernandorena M.A. y Jackson E., 2018).

4.4. Impacto económico

La enfermedad objeto de este desarrollo genera pérdidas económicas. Pérdidas que son atribuidas al costo y complicaciones que implican los tratamientos (con posibilidad de futuras recidivas) además de las muertes e incapacidades que se generan en estos animales (Becegatto, Zanutto, Cardoso y Sampaio, 2017; Tomich et al., 2010).

4.5. Etiología

Pythium insidiosum es un microorganismo clasificado dentro del Reino *Stramenopila*, Phylum *Pseudofungi*, Clase *Oomicetos*, Orden *Pythiales*, Familia *Pythiaceae*, Género *Pythium* y especie *P. Insidiosum* (Mendoza, 2010; Mendoza et al., 1996).

Antiguamente se lo clasificaba dentro del Reino *Fungi* porque se comportaba de manera muy similar a los hongos. Hoy en día se sabe que eso no es correcto y que los organismos pertenecientes a la clase *Oomicetos* están filogenéticamente relacionados con las algas, esto según estudios taxonómicos que se basaron en el análisis de secuenciación de genes de ARN ribosomal de *P. Insidiosum* (Mendoza, 2010; Mendoza et al., 1996; Kwon-Chung, 1994).

Es importante señalar que la pared celular de los hongos contiene quitina como componente esencial. Los oomicetos carecen de quitina; tienen a la celulosa y al β -glucano como componentes predominantes. Además, en la membrana celular de los hongos el principal esteroide es el ergosterol mientras que el *Pythium* spp. contiene esteroides auxotróficos incorporados del ambiente y que no son producidos por el mismo, como ocurre con los hongos. Por esta razón *Pythium* spp. no responde a los antifúngicos ya que la mayoría de estos actúan sobre el ergosterol (Grooters, 2003; Vicarivento, Puzzi, Alves y Zappa, 2008).

Por otra parte, los oomicetos se caracterizan por producir zoosporas biflageladas en la reproducción asexual; presentar una reproducción sexual de tipo oogámica; tener una pared compuesta de celulosa, β -glucano e hidroxiprolina; poseer un tallo diploide; tener mitocondrias con cresta tubular; y por presentar características bioquímicas y moleculares particulares como una vía alternativa para la síntesis de lisina (Santurio, Alves et al., 2006).

Dentro de los oomicetos, se encuentra el género *Pythium*. Éste está compuesto por más de 120 especies distribuidas a lo largo del mundo. Su gran mayoría son patógenos de las plantas, siendo los principales responsables de la podredumbre de raíz. Algunas especies también son utilizadas como control biológico de hongos patógenos y de larvas de mosquitos. Específicamente el *Pythium insidiosum* es conocido por ser el único patógeno para los mamíferos (Santurio, Alves et al., 2006).

Utilizando la técnica molecular RFLP (restriction fragment- length polymorfism) y comparando el espacio ribosomal intergénico de 28 aislamientos de *Pythium insidiosum* provenientes de América, Asia y Australia, se describen al menos 3 cepas de *Pythium insidiosum*. Es por ello que se plantea realizar una reclasificación en subespecies ya que cada Clúster representa una población distinta genéticamente (Schurko, Mendoza, de Cock et al., 2003).

4.6. Epidemiología

Introduciéndonos en la epidemiología, *Pythium* spp. están presentes en todo tipo de suelos y ambientes húmedos. Son importantes patógenos de plantas, pudiendo afectar una gran cantidad de cultivos y generar grandes pérdidas económicas (Miller y Campbell, 1982a).

El agente en análisis, por lo general se localiza en áreas tropicales y subtropicales alrededor del mundo. En América del Norte, precisamente en EE.UU., la enfermedad ha sido reportada a lo largo del Golfo de México, en los Estados de Alabama, Florida, Louisiana, Mississippi y Texas. También se han reportados casos en Georgia, Missouri, Carolina del Norte, Carolina del Sur, Tennessee e Illinois. En América Central el país con más casos reportados ha sido Costa Rica. En Guatemala, Nicaragua y Panamá han aparecido casos aunque no exista literatura sobre ellos. En

el Caribe precisamente en Haití, se diagnosticó un caso de pitiosis en Humanos. Por último, en América del Sur se reportaron casos de pitiosis en equinos en Argentina, Brasil, Colombia, Venezuela y Uruguay (Mendoza et al., 1996; Reis et al., 2018; Santurio, Alves et al., 2006) (Figura 1).

En la región del Pantanal en Brasil (el pantano de agua dulce más grande del mundo) situado en el Estado de Mato Grosso del Sur, probablemente sea el lugar del planeta con mayor incidencia y prevalencia de la pitiosis cutánea equina. De todas las patologías causadas por hongos y oomicetos, la pitiosis es la enfermedad más prevalente y se considera endémica en el sudeste de Río Grande del Sur. También se han descrito casos en los Estados de San Pablo, Pará, Paraíba, Paraná y Rio de Janeiro (Mendoza et al., 1996; Reis et al., 2018; Santurio, Alves et al., 2006) (Figura 1).

En Uruguay, en el este del país, se diagnosticaron entre los años 2012 y 2017 siete casos de pitiosis cutánea equina en zonas pantanosas de la Laguna Merín. Cinco de ellos fueron reportados en el departamento de Treinta y tres y uno en Rocha. También se reportó un caso individual en las costas del Río Negro, en el departamento de Durazno (Romero et al., 2019; Weiblen et al., 2019)

En Europa todavía no han sido reportado casos de esta enfermedad, pero se publicó un caso clínico de un equino en Francia con granulomas cutáneos con características clínicas de pitiosis (Mendoza et al., 1996) (Figura 1).

En África, si bien uno pensaría que por sus características climáticas sería un ambiente ideal para el desarrollo del agente, se ha reportado únicamente un caso de pitiosis en un perro en Mali (Mendoza et al., 1996; Rivierre et al., 2005) (Figura 1).

En Oceanía se han reportado casos en Nueva Zelanda, Papúa Nueva Guinea y en Australia, donde la patología se encuentra principalmente en la costa tropical este. (Mendoza et al., 1996) (Figura 1).

Con respecto a Asia, la patología se ha hecho conocer en Indonesia, en las islas de Borneo, Java y Sumatra. En las costas sur de Japón la pitiosis se ha manifestado en Kyushu y Ryuki. También han aparecido casos en Corea del Norte, Birmania, y si bien antiguamente se reportaron casos en India no se han notificado nuevamente. Es al norte y sureste de Tailandia que se han reportado casos en humanos (Luis-León y Pérez, 2011; Mendoza et al., 1996) (Figura 1).



Figura 1. Mapa mundial que muestra la distribución de la pitiosis en zonas tropicales, subtropicales y templadas. (Mendoza, 2010).

También se la conoce en otros lugares del mundo como “cáncer del pantano”. Estas denominaciones hacen referencia al ambiente en el cual se desenvuelve la enfermedad; un ambiente húmedo (Miller y Campbell, 1982a) (Figura 2).



Figura 2. Animales pastando en zonas inundadas. Un ambiente óptimo para la reproducción y supervivencia de *Pythium insidiosum*. (Cardona, 2013b).

En lo que respecta a la existencia del agente, *P. insidiosum* requiere de temperaturas entre 30 y 40°C para su proliferación y es endémico en ambientes acuáticos como lagos y pantanos. (Miller y Campbell, 1982a).

Distintas especies de plantas presentes en ambientes acuáticos o húmedos forman parte del ciclo de vida de este agente porque brindan el sustrato y colaboran en la propagación del mismo formando los zoosporangios (Mendoza et al., 1993).

Estudios demostraron que la utilización de medios carentes de nutrientes previo a la inducción no solo aumenta el número de esporangios y posteriormente el de zoosporas, sino que también reduce el tiempo de incubación y esporulación del agente (Mendoza y Prendas, 1988).

Además, otros estudios de laboratorio donde analizaron la quimiotaxis de las zoosporas de *Pythium insidiosum* mostraron una fuerte atracción de éstas por pelos de animales y tejidos vegetales (Miller, 1983).

Por lo anterior mencionado, vemos en equinos que las lesiones generalmente se ubican en las partes bajas como las extremidades, abdomen, tórax y glándula mamaria. Estas partes son las que tienen contacto con el medio en donde se encuentra el agente. A esto se agrega que no existe una predisposición por sexo, edad o raza (Mendoza y Alfaro, 1986)

Continuando con el análisis, es momento de señalar que la única fuente de infección son las zoosporas presentes en el ambiente. No es posible la transmisión directa entre animales y tampoco se comporta como zoonosis (Santurio, Alves et al., 2006).

Se cuestiona que la penetración del agente no necesariamente se genera a partir de una herida o erosión cutánea, sino que también existe la posibilidad de que las zoosporas ingresen a partir de folículos pilosos. También se discute que pueda ingresar a través de picaduras de insectos ya que se logró aislar el agente de una larva de *Culex quinquefasciatus*, un mosquito que se extiende por la zona tropical de India (Santurio et al., 1998; Schurko, Mendoza, de Cock et al., 2003).

Hubieron además otros reportes de aislamientos del *Pythium insidiosum* en larvas de *Aedes aegypti* en Tocantins, Brasil. Se demostró que el agente podía causar una patología en larvas de mosquitos quizás por invadir sus órganos luego de penetrar sus exoesqueletos. También se confirmó que tienen afinidad por hospederos invertebrados y que probablemente use a las larvas de los mosquitos y a los nematodos para completar su ciclo biológico en la naturaleza y expandir su nicho (Vilela, Montalva, Luz, Humber y Mendoza, 2018).

4.7. Patogenia

Se realizaron diferentes estudios in vitro que demostraron el tropismo de *Pythium insidiosum* por la piel y por el pelo de animales y humanos; también por distintas especies de plantas, como las acuáticas, pastos, entre otras (Mendoza et al., 1993; Miller, 1983).

Para mantener su ciclo de vida en la naturaleza, *Pythium insidiosum* coloniza plantas y forma inicialmente en ellas un número importante de hifas. En la madurez el protoplasma de las hifas se transforma en un tubo que forma en su interior un esporangio hialino de aspecto globuloso de unas 20 a 60 micras de diámetro. Luego dentro de este esporangio se formarán las zoosporas que van a romper la vesícula y

salir al agua donde nadarán por aproximadamente unos 20 minutos y se enquistarán (Mendoza, 2010; Mendoza et al., 1996) (Figura 3).

Cabe aclarar que estos esporangios son producidos cuando se los somete a temperaturas entre 28 y 37°C en ambientes acuáticos. El contacto con hojas de plantas y la baja cantidad de iones en el agua favorecen a que estos esporangios aumenten en número (Mendoza, 2010; Mendoza et al., 1996).

Asimismo, *Pythium insidiosum* tiene un ciclo biológico en el cual el pH óptimo para el crecimiento es de 6,5 y la mayor cantidad de zoosporas se producen en colonias que crecen a pH de 6,7 a 6,8 (Shipton, 1983).

Las zoosporas son células nucleadas que carecen de pared celular y contienen dos flagelos de distintas longitudes que nacen de un punto en común en la profundidad de una hendidura lateral. El flagelo anterior direcciona a la zoospora, es de menor longitud y está cubierto por mastigonemata, que son estructuras similares a la apariencia de un pelo. El flagelo posterior es el responsable del movimiento helicoidal o espiralado y no está cubierto por estas estructuras. Es importante destacar que las zoosporas no son capaces de dividirse ni de multiplicarse (Mendoza, 2010; Mendoza et al., 1996; Walker y van West, 2007).

Cuando un animal o un humano ingresa a un medio acuático endémico o campo contaminado con *Pythium insidiosum*, las zoosporas allí presentes, empiezan a nadar en espiral mientras van girando a lo largo de su propio eje; direccionándose hacia heridas presentes en la piel, mucosa gastrointestinal u otros sitios que son químicamente atraídas. Cuando estas zoosporas se encuentran en las cercanías del hospedador pierden sus flagelos; se tornan globulosas e inmóviles. La fuerte atracción que se evidencia tanto en las plantas como en los animales por estas zoosporas se la atribuye a sustancias quimiotácticas presentes en los tejidos. A su vez, estas sustancias quimiotácticas presentes en los tejidos del hospedador, actúan como señal para que las zoosporas secreten una sustancia amorfa que les permita adherirse a la superficie del mismo y mantenerse en estrecho contacto en las primeras etapas de la infección. Esta segunda sustancia actúa como un posible factor de virulencia para que se establezca la infección y probablemente sea una glicoproteína. Luego las zoosporas se enquistan y emiten un tubo germinativo, que por acción mecánica penetra el tejido dañado y comienzan a formar una gran cantidad de hifas filamentosas que pueden colonizar tejidos cutáneos y subcutáneos, produciendo lesiones en los intestinos, vasos sanguíneos y huesos (Becegatto et al., 2017; Mendoza, 2010; Mendoza et al., 1993; Mendoza et al., 1996) (Figura 3).

Las hifas del *Pythium insidiosum* por si solas no pueden penetrar la epidermis. Lo hacen gracias a la secreción de proteasas, que generan una reducción de la resistencia de los tejidos. Para finalizar, estas hifas se van a diferenciar en esporangios que posteriormente liberan zoosporas, que colonizarán nuevamente otras plantas y así expandirán su nicho ecológico (Cardona et al., 2013b; Mendoza et al., 1996; Mendoza y Alfaro, 1986;).

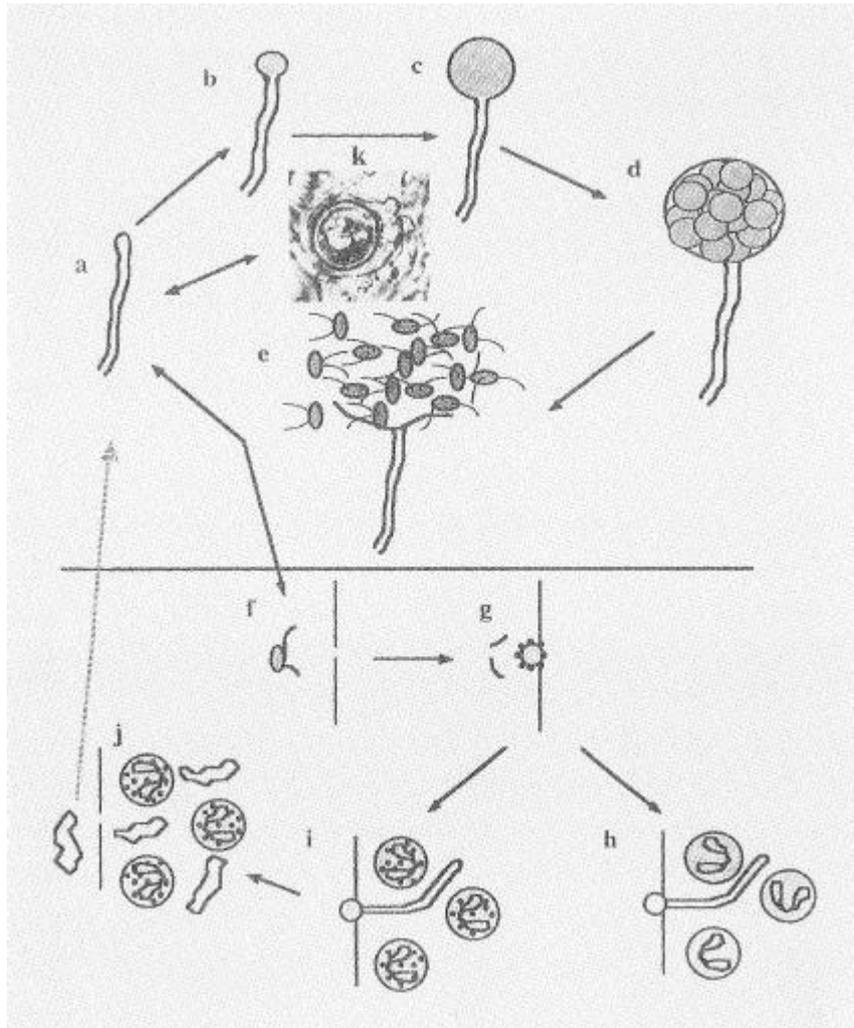


Figura 3. Ciclo de vida de *Pythium insidiosum* en la naturaleza (a-k). a: Una hifa de *Pythium insidiosum* coloniza el tejido de una planta. b, c y d: Diferenciación del esporangio en sus etapas maduras. e: Liberación de las zoosporas. f: Las zoosporas móviles nadan en busca de otra planta o son atraídas por las heridas de un tejido animal. g: La zoospora enquistada es atraída al tejido por una sustancia pegajosa. h (humanos y otros animales) e i (equinos): Las zoosporas germinan invaden los hospederos y causan pitiosis. j: La formación de masas, llamadas "kunkers", ocurre únicamente en los equinos. k: En la naturaleza ocurre la producción de oosporas y estas probablemente actúen como esporas resistentes. (Mendoza, 1996).

Antiguamente se creía que las zoosporas eran la única forma infectante responsable del inicio de esta enfermedad hasta que se reportaron casos en animales que no habían tenido contacto con medios acuáticos. Es ahí cuando comenzaron las sospechas sobre la posibilidad de infección a través de otros medios como hifas, oogonias o esporas. Las zoosporas serían las únicas capaces de producir la sustancia que les permite adherirse a los tejidos. Por esta razón es probable que las zoosporas actúen como agente de infección más eficiente que los otros medios de propagación. (Mendoza et al., 1993; Mendoza et al., 1996).

Solo algunas cepas de *Pythium insidiosum* producen oogonias. Cuando estas se han desarrollado in vitro son intercalares, suaves, subglobosas y tienen un tubo de

fertilización rígido por oogonia. La morfología de la oogonia madura es lo que permite diferenciar a las distintas especies de *Pythium* spp. (de Cock et al., 1987; Shipton, 1987).

A nivel inmunitario lo que ocurre es que luego de que las zoosporas móviles de *Pythium insidiosum* toman contacto con los tejidos del hospedero, producen un tubo germinativo que penetra los tejidos y forman las hifas. Las hifas comienzan a producir exo-antígenos (exo-Ags) que serán enseñados a las células presentadoras de antígenos (CPAs). A su vez, secretan interleucina 4 (IL-4) que conduce el pasaje de linfocitos T helper (Th0) a T helper 2 (Th2) para que estos últimos sigan produciendo aún más IL-4 e IL-5. La constante producción de exo-Ags hace que la respuesta inmune se bloquee de alguna manera en Th2 (Cardona et al., 2013b).

Se cree que tanto la reacción de Splendore-Hoeppli, que corresponde a la gran cantidad de eosinófilos degranulados alrededor de las hifas de *Pythium insidiosum* y la secreción de exo-Ags, por parte del agente, son estrategias evolutivas que el mismo desarrolla para asegurar su proliferación y sobrevivencia (Cardona et al., 2013b).

4.8. Comportamiento del *Pythium insidiosum* en diferentes especies

4.8.1. Equinos

En equinos la pitiosis puede manifestarse de forma cutánea, subcutánea, intestinal, vascular y también, aunque de manera menos frecuente, en los huesos y pulmones. Es una enfermedad que progresa rápidamente, y si no es tratada a tiempo, puede culminar con la muerte de estos animales (Mendoza et al., 1996).

Comenzando con las formas de manifestarse, la forma cutánea es la presentación más prevalente. En ella, las lesiones pueden encontrarse en cualquier parte del cuerpo como cabeza, cara, labios, fosas nasales, cuello, hombros, tórax, abdomen, genitales externos, tronco y línea dorsal. Pero las zonas comúnmente más afectadas son aquellas que tienen contacto directo con aguas en donde el *Pythium insidiosum* está presente. Estos lugares corresponden a los miembros anteriores y posteriores (por debajo del carpo y corvejón), junto con la parte ventral del abdomen y tórax. Por lo general son lesiones únicas, pero han sido reportado casos con múltiples granulomas (Brown y Roberts, 1988; Mendoza et al., 1996; Morton, Morton, Baker y Gelberg, 1991; Scott y Miller, 2011) (Figura 4, 5 y 6).



Figura 4. Equino. Lesión ulcerativa granulomatosa con descarga viscosa serosanguinolenta en abdomen ventral correspondiente a pitiosis cutánea. (Scott y Miller, 2011).



Figura 5. Equino. Lesión granulomatosa con secreción fibrinosanguinolenta (flechas) en la zona del mentón por debajo de labio inferior. (Cardona et al., 2013b).



Figura 6. Equino. Presentación clínica de pitiosis en miembro posterior. (Acero- Mondragón, 2013).

Estas lesiones se inician con un proceso inflamatorio local, acompañado de prurito intenso como uno de los signos clínicos más importantes. Muchas veces puede llevar a la automutilación, donde se observa a los animales morderse o rascarse las heridas contra las paredes de los establos donde se encuentran (Gaastra et al., 2010; Mendoza et al., 1996).

Las lesiones se caracterizan por ser circulares, granulomatosas y nodulares que varían en tamaño según su localización y duración de la infección. Son de aproximadamente unos 5 a 500 mm de diámetro. Los tejidos, de carácter necrótico, presentan fístulas que están continuamente drenando contenido sanguinolento, serosanguinolento o en algunos casos mucopurulento. Estas secreciones cubren la superficie de la lesión y cuelgan desde el cuerpo en forma de hilos gruesos (Gaastra et al., 2010; Mendoza et al., 1996; Mendoza y Alfaro, 1986).

La ulceración está asociada a lesiones grandes. Las lesiones más chicas usualmente contienen unas pocas úlceras pero de menor tamaño (Mendoza et al., 1996).

Continuando con el análisis de las lesiones, se muestran que son capaces de crecer en tamaño rápidamente llegando a involucrar el subcutáneo. A medida que la enfermedad progresa, aparecen en la superficie de estos tejidos pequeñas masas de color amarillo grisáceo, arenosas y de aspecto similar a un coral, llamadas “kunkers”. Estas masas varían en tamaño de 2 a 10 mm de diámetro y contienen hifas de *Pythium insidiosum*. Pueden ser encontradas y observadas al retirar algún tipo vendaje. Cabe resaltar que estos “kunkers” son específicos de la pitiosis en equinos, no siendo encontrados en otras especies con esta patología (Gaastra et al., 2010; Luis-León y Pérez, 2011; Mendoza et al., 1996; Mendoza y Alfaro, 1986; Scott y Miller, 2011).

Como otro de los signos clínicos, muchas veces se puede notar un olor desagradable que emana de estas lesiones (Gaastra, et al. 2010).

Cuando las lesiones se desarrollan en los miembros (por lo general en las articulaciones) la claudicación es un signo clínico hallado frecuentemente. También se pueden presentar casos con linfangitis, edema, aumento de tamaño de nódulos linfáticos regionales, anemia e hipoproteïnemia. En los casos crónicos tanto la emaciación como las infecciones secundarias son comúnmente encontradas (Gaastra et al., 2010; Mendoza et al., 1996; Scott y Miller, 2011).

El tiempo de evolución de la enfermedad es un factor importante a tener en cuenta para el desarrollo de la pitiosis a nivel óseo. En aquellos casos de pitiosis cutánea crónica con más de 2 meses de evolución y con una gran proliferación de tejido granulomatoso, *Pythium insidiosum* puede llegar a invadir el hueso subyacente. Los casos descritos reportan involucrar al tercer metatarsiano, los metacarpianos, los sesamoideos proximales y las tres falanges. Equinos con esta patología desarrollan claudicación y exostosis; osteólisis y osteomielitis, siendo estas dos últimas visibles por examen radiológico. No es común encontrar casos donde el hueso esté involucrado con lesiones que daten de menos de 4 meses de evolución (Santurio, Alves et al., 2006; Scott y Miller, 2011).

Lo que resulta común es hallar casos de metástasis debido a que la infección es capaz de diseminarse tanto en los planos faciales como a través de los vasos linfáticos. Se han hallado casos de metástasis en nódulos linfáticos regionales, tracto intestinal, pulmones y huesos (Alfaro y Mendoza, 1990; Connole, 1973; Goad, 1984; Mendoza, Alfaro y Villalobos 1988; Scott y Miller, 2011).

En los casos en que la metástasis compromete los nódulos linfáticos, se evidencian en ellos la presencia de “kunkers”, donde es posible el aislamiento del agente. Muchas veces, en casos de pitiosis cutánea los linfonódulos regionales se ven aumentados de tamaño, lo que no significa que ya estemos ante un caso de metástasis. Por otro lado, reportes de metástasis en nódulos linfáticos han sido descritos en los linfonódulos cervicales inferiores, inguinales y submandibulares (Connole, 1973; Santurio, Alves et al., 2006).

La presentación intestinal es la segunda forma más frecuente en equinos, generada por la invasión directa del agente en las membranas mucosas. En ellos suelen observarse episodios de cólicos por obstrucción y disminución del lumen intestinal debido a la formación de masas en estos tejidos (Brown y Roberts, 1988; Luis-León y Pérez, 2011; Morton et al., 1991; Santurio, Alves et al., 2006).

Si se tuviera que ahondar en los hallazgos de necropsia, en la forma cutánea las lesiones son circulares con bordes irregulares, ulcerativas, granulomatosas y de apariencia tumoral de coloración negruzca. Presentan exudado que va de sanguinolento a serosanguinolento y desencadenan un proceso inflamatorio. Son profundas y generalmente involucran el tejido subcutáneo (Becegatto et al., 2017; Mendoza y Alfaro, 1986; Scott y Miller, 2011).

Al corte se observa un tejido conjuntivo fibroso, con presencia de trayectos fistulosos y tejido necrótico blanco amarillento, seco, friable, de aspecto coralino y de olor desagradable, que se desprende fácilmente del tejido fibrovascular circundante. Estas formaciones de distintos tamaños pueden ir de 2 a 10 mm y corresponden a los ya mencionados “kunkers”, observados en la especie equina. Los “kunkers” se forman debido a la degranulación de los eosinófilos sobre las hifas del *Pythium insidiosum*, a

su vez nuevos eosinófilos degranulan sobre los viejos, generando un aumento de tamaño. En casos crónicos de pitiosis, el único lugar donde se pueden hallar las hifas de *Pythium insidiosum* es en los “kunkers” (Acero et al., 2013; Becegatto et al., 2017; Gaastra et al., 2010; Luis-León y Pérez, 2011; Sallis et al., 2003; Santurio, Alves et al., 2006).

En la presentación intestinal, la necropsia evidencia presencia de masas de aspecto nodular y úlceras en la pared del yeyuno que pueden llegar a medir hasta 20 centímetros de diámetro (Luis-León y Pérez, 2011).

4.8.2. Burros

En los burros el agente se comporta de manera similar que en los equinos. Como signos clínicos de la pitiosis en esta especie se pueden observar lesiones cutáneas en forma de cráter, con bordes irregulares, granulomatosas, con presencia de úlceras, material necrótico y de aspecto tumoral exuberante. Al igual que en los equinos, las lesiones se localizan frecuentemente en las extremidades, ventral del abdomen y pecho. También en ellas se forman trayectos fistulosos que cuando se los comprime se observa la salida de un material caseoso amarillento que corresponde a los “kunkers” mencionados anteriormente. Este tipo de lesiones son acompañadas en la mayoría de los casos con pérdida de estado corporal (Cardona et al., 2013a) (Figura 7).

Si se pone énfasis en el estudio histopatológico de las lesiones, se debe señalar la presencia de numerosos eosinófilos degranulados y mastocitos rodeando la hifas de *Pythium insidiosum*. Hallazgos que se corresponden con los reportados en casos de pitiosis cutánea equina (Cardona et al., 2013a).



Figura 7. Burra de 78 meses de edad. Se observa en miembro posterior derecho y miembro anterior izquierdo una lesión ulcerativa granulomatosa y sobresaliente a nivel de piel. (Cardona et al., 2013a).

4.8.3. Bovinos

En bovinos la pitiosis es una patología poco frecuente, considerada una enfermedad esporádica, aunque también enzoótica en aquellos establecimientos que se presenta

en varios individuos y los mismos se ubican en zonas endémicas. Los bovinos son la tercer especie más afectada por la patología. En Venezuela es también conocida por el nombre de Granulomatosis Enzoótica Bovina (Luis-León, Pérez, Vivas, Mendoza y Alonso, 2008; Luis-León y Pérez, 2011; Pérez, Luis-León, Vivas y Mendoza, 2005; Santurio, Alves et al., 2006).

Se han reportado casos en Estados Unidos (Louisiana); Venezuela (Apuré); Brasil (Campina Grande, Rio Grande del Sur, Matogrosso del Sur y Santa María) y en Colombia (Córdoba) (Cardona et al., 2012; dos Santos, Morais Santurio y Marques, 2011; Grecco et al., 2009; Luis-León y Pérez, 2011).

Los casos reportados en esta especie se manifiestan de forma cutánea con lesiones en los miembros, ventral del cuello, esternón, abdomen, cara y cola. Estas lesiones se presentan inicialmente con edema en la región, engrosamiento de la dermis, presencia de úlceras y fístulas (Cardona et al., 2012; Grecco et al., 2009; Luis-León y Pérez, 2011; Santurio, Alves et al., 2006) (Figura 8).



Figura 8. Bovino. Presencia de lesión ulcerativa granulomatosa irregular, con presencia de material necrótico y exudado fibrino-sanguinolento en extremidades (flechas). (Cardona et al., 2012).

Son lesiones muy dolorosas que generan prurito y claudicación. En algunos casos los animales no pueden reincorporarse, esto deviene en pérdida de peso, deshidratación e inanición; pudiendo ocasionar la muerte del animal. Comúnmente se observa contaminación bacteriana secundaria. Tal es el ejemplo de la pododermatitis infecciosa, una patología causada por una bacteria anaerobia, en la cual se cree que el *Pythium insidiosum* actuaría como una puerta de entrada para que la misma se desarrolle como una infección secundaria (Luis-León y Pérez, 2011; Pérez et al., 2005; Santurio, Alves et al., 2006).

Es importante detenerse sobre los hallazgos histopatológicos de esta especie. Éstos tienen como característica la presencia de granulomas dérmicos multifocales que se encuentran rodeados por tejido conjuntivo fibroso. En el centro de los granulomas se

pueden observar unas pocas hifas ramificadas rodeadas de gránulos, que se corresponden con la deposición de complejos antígeno- anticuerpo o con el fenómeno Splendore- Heoppli. No se observa formación de “kunkers” (Santurio, Alves et al., 2006).

A diferencia de los equinos, los bovinos por lo general curan espontáneamente entre la segunda semana y el tercer mes después de aparecer los signos clínicos. Tanto la cura espontánea como la respuesta rápida a los tratamientos son atribuidas al tipo de respuesta inflamatoria dada por las células mononucleares que conforman y predominan en los granulomas. Éstas serían quienes destruyen las hifas de *Pythium insidiosum* y colaboran en la cura de las lesiones. En cambio, en los equinos, los eosinófilos predominan en la reacción inflamatoria, forman los kunkers alrededor de las hifas haciendo difícil la eliminación del agente y la cura de las lesiones (Santurio, Alves et al., 2006; Silva do Carmo y Riet- Correa, 2014).

4.8.4. Ovinos

En ovinos, todos los casos de pitiosis han sido diagnosticados en Brasil. Es probable que ocurra en otros países, pero de forma menos frecuente y no viene siendo diagnosticada. Se han descrito tres formas de presentación de esta enfermedad en esta especie: la cutánea, la rinofacial y la digestiva (do Carmo et al., 2020).

En la forma cutánea el animal se infecta al entrar en contacto con agua contaminada con *Pythium insidiosum*, ingresando a través de heridas presentes en la piel o, en su defecto, en pieles sanas, a través de los folículos pilosos. Las lesiones generalmente se observan en las extremidades, en el abdomen y en la región pre-escapular. Son lesiones que inicialmente se manifiestan con inflamación y edema local; progresando hacia una dermatitis ulcerativa con abundante tejido necrótico o de color rojo, que se asemeja a tejido de granulación (do Carmo et al., 2020; Santurio et al., 1998; Tabosa et al., 2004; Tabosa, Riet-Correa, Medeiros y Azevedo, 2002).

El animal cursa la patología con anorexia, dolor y claudicación. Las lesiones pueden expandirse a tejidos vecinos afectando ligamentos, tendones, nervios y huesos. También pueden hacer metástasis y afectar pulmones, particularmente los lóbulos caudales y linfonódulos regionales, principalmente el pre-escapular (do Carmo et al., 2020; Tabosa et al., 2002; Tabosa et al., 2004).

Cabe mencionar que en el estudio histopatológico de esta especie, se observan lesiones eosinofílicas granulomatosas con abundantes células gigantes y material, que se corresponde al fenómeno Splendore-Hoepli, rodeando las hifas de *Pythium insidiosum* (Santurio et al., 2008).

La morbilidad en la presentación cutánea ronda entre los 7 y 33%. La letalidad alcanza aproximadamente un 100%. El único caso reportado en donde el tratamiento fue exitoso fue en un ovino tratado con 7 mg/kg de potasio iodado oral durante 7 días (do Carmo et al., 2020).

Cuando refiere a la pitiosis rinofacial (también conocida como “hocico de toro”), puede ocurrir ésta de forma esporádica o de manera epizootica, siendo una considerable causa de muerte y de pérdidas económicas (do Carmo et al., 2020; Ubiali et al., 2013; Santurio et al., 2008) (Figura 9).

En esta pitiosis rinofacial, los animales cursan la enfermedad durante 15 a 90 días. Aquí se podrá observar deformación de la región nasal, inflamación de las fosas nasales y piel de la cara; hemorragias nasales y dificultad respiratoria. Se podrán apreciar también úlceras en el paladar duro, fístulas oronasales y rostrales acompañados de un aumento de tamaño de los nódulos linfáticos retrofaríngeos y parotídeos (do Carmo et al., 2020; Gaastra et al., 2010; Santurio et al., 2008; Ubiali et al., 2013) (Figura 9).

Las lesiones son amarillas, caseosas, con presencia de exudado fétido y necrosis. En algunos casos también se pueden encontrar granulomas en los pulmones. Y por último, esta presentación tiene una morbilidad de un 0,6 a 20% y una letalidad del 100% (do Carmo et al., 2020; Gaastra et al., 2010; Santurio et al., 2008; Ubiali et al., 2013) (Figura 9).



Figura 9. Ovino. Deformación en más de la región nasal. Boca con presencia de exudado purulento como resultado de lesión ulcerativa a nivel de paladar duro. (do Carmo et al., 2020).

En la presentación digestiva resultan involucrados principalmente los preestómagos, pero también se han visto lesiones que afectan el abomaso, el esófago, el diafragma y el hígado. Como síntomas clínicos se puede presentar regurgitación, letargia y anorexia (do Carmo et al., 2020; Pessoa et al., 2012).

Las lesiones en esta manifestación, se caracterizan por revelar úlceras cubiertas por una pseudomembrana de fibrina que muchas veces afecta toda la pared del órgano, resultando en la perforación del mismo seguida de peritonitis y de adherencias a otros órganos de la cavidad abdominal. No se han presentado casos de cura en esta presentación (do Carmo et al., 2020; Pessoa et al., 2012).

Por último, es importante destacar en lo concerniente a la producción ovina, que el agua es un factor indispensable para la cría de este ganado y debido a la falta de aguadas en muchos establecimientos, los productores han optado por realizar nuevos

tajamares. Los tajamares en territorios semiáridos de Brasil son un ejemplo de alteración ambiental que resultó en la expansión del nicho biológico de *Pythium insidiosum*. En épocas de sequía, los animales comienzan a pastar sobre los alrededores de esos tajamares tratando de aprovechar el pasto allí presente, lo que contribuye a que los mismos permanezcan largos períodos de tiempo en potenciales fuentes de infección. Tal es el caso de zonas áridas de California y Arizona, un clima poco favorable para el desarrollo de *Pythium insidiosum* hasta que comenzaron a inundar e irrigar campos para la producción de arroz y posteriormente se describieron casos de pitiosis emergente (Pessoa et al., 2012; Tabosa et al., 2004).

4.8.5. Caninos

Los perros son la segunda especie más afectada por la pitiosis. En ellos se han observado la forma cutánea y gastrointestinal, siendo esta última la más prevalente. Por lo general ambas formas se presentan en perros jóvenes, menores de 2 años y de razas grandes. Los perros afectados generalmente viven o tienen contacto esporádico con regiones rurales con presencia de bañados, tajamares o que son inundados de forma natural o artificial. Sorpresivamente han aparecido casos extraños donde perros que viven estrictamente en el interior, sin acceso a cuerpos de agua, se han infectado (Berryessa et al., 2008; Dykstra et al., 1999; Santurio, Alves et al., 2006).

Los primeros casos de pitiosis gastrointestinal y cutánea en perros fueron reportados en EE.UU en Missouri (1994) y en otras zonas cercanas al Golfo de México (Fischer et al., 1994; Mendoza et al., 1996).

En la presentación gastrointestinal se manifiestan síntomas digestivos como vómitos, diarrea (que en ocasiones puede ser sanguinolenta), anorexia crónica y también pérdida de peso. Conjuntamente, se pueden palpar masas nodulares en el abdomen y es común hallar áreas de la pared afinada y úlceras en la mucosa. Las lesiones se caracterizan por la formación de grandes masas en las paredes del estómago e intestino compuestas por inflamación granulomatosa y piogranulomatosa con presencia de necrosis, abundantes eosinófilos e hifas. Probablemente la infección en esta forma se deba a la ingesta de agua o pastos contaminados con el agente (Berryessa et al., 2008; Fischer et al., 1994; Luis-León y Pérez, 2011; Santurio, Alves et al., 2006) (Figura 10).

También se han presentado casos en donde se afecta el tracto digestivo superior. Dos casos reportados mostraron una esofagitis crónica con disfagia, sialorrea y pérdida de peso. En otro se observó una masa en la orofaringe que afectaba tanto la laringe como el esófago craneal generándole disfagia (Helman y Oliver, 1999; Patton, Hake, Newton y Toal, 1996).

Asimismo, casos con extensión de la infección a otros órganos también han sido reportados. Uno de ellos se trataba de un perro con lesiones en el colon que posteriormente se diseminó a la próstata generando una prostatomegalia y un consecuente tenesmo. También se han reportado casos con diseminación al páncreas, al útero, a los nódulos linfáticos mesentéricos y al conducto biliar (Fischer et al., 1994; Gaastra et al., 2006; Grooters, 2003; Jaeger, Rotstein y Law, 2002).

En la forma cutánea en caninos, las lesiones se observan en las extremidades, en la zona torácica, abdominal y perineal, también en la grupa y en la cola. Se exhiben

lesiones únicas o múltiples, crónicas, alopécicas, ulceradas y nodulares con trayectos fistulosos que drenan exudado serosanguinolento (Dykstra et al., 1999; Mendoza et al., 1996) (Figura 11).

En los hallazgos histopatológicos se observa dermatitis piogranulomatosa ulcerativa con áreas de necrosis infiltradas por macrófagos, neutrófilos y granulomas con material eosinofílico rodeado de eosinófilos. Podemos observar también hifas y en casos crónicos células gigantes (Dykstra et al., 1999; Mendoza et al., 1996; Santurio, Alves et al., 2006).

Aunque es raro encontrar la presentación gastrointestinal y cutánea simultáneamente en el mismo animal, se reportó un caso de un perro en Brasil con estas características. El animal presentaba inicialmente una lesión ulcerativa, alopécica, bien demarcada en el lado derecho del tórax. Luego de 10 meses aproximadamente comenzó con signos de anorexia, vómitos y heces con sangre; síntomas que correspondían a la presencia de dos masas en el intestino grueso que generaban estrechamiento de la luz del mismo (Grooters, 2003; Pereira et al., 2010) (Figura 10 y 11).

También han sido reportados casos con lesiones subcutáneas en las extremidades, cola y cara (Mendoza et al., 1996).

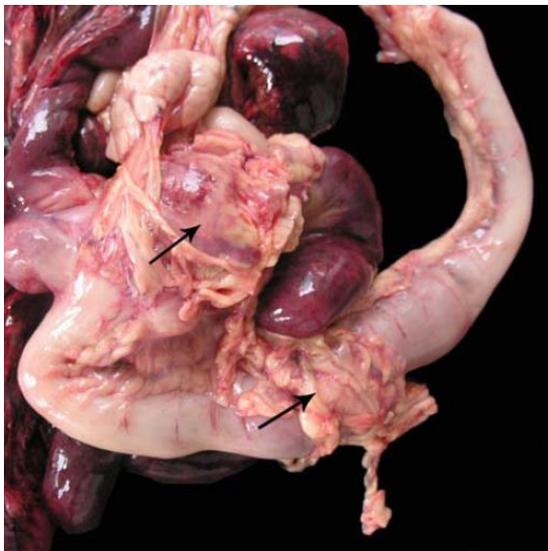


Figura 10. Pitiosis intestinal en perro labrador. Se observan dos masas en pared de intestino (flechas). (Pereira et al., 2010).



Figura 11. Pitiosis cutánea en perro labrador. Se observa una lesión alopécica, bien delimitada, ulcerada en la región torácica derecha. (Pereira et al., 2010).

4.8.6. Felinos

En gatos domésticos la pitiosis es una patología que raramente se presenta. Ésto probablemente se deba al rechazo que estos animales tienen con el agua. Disminuyendo de esa forma las probabilidades de contacto con el *Pythium insidiosum* dado que el mismo habita en ambientes acuáticos. En esta especie, se han reportado casos que se caracterizan por lesiones en la piel y en el tejido subcutáneo. Se han observado también infecciones gastrointestinales (Grooters, 2003; Rakich, Grooters y Tang, 2005; Souto et al., 2020).

El primer caso de pitiosis en gatos fue reportado en el año 1991 en EE.UU., precisamente en Carolina del Norte, donde se observó una tumoración de tejido blando, de apariencia lisa, amarillenta y lobulada que se ubicaba dentro de la cavidad nasal y nasofaringe, extendiéndose hacia las cavidades orbitarias con daño óseo del paladar duro (Bissonnette et al., 1991) (Figura 12).



Figura 12. Gato. Tomografía computarizada de la cavidad nasal que ilustra la destrucción ósea (flecha) asociada con masas retrobulbares bilaterales (puntas de flecha) que son continuas con la masa en la cavidad nasal. (Bissonnette et al., 1991).

En otras ocasiones se publicaron casos con lesiones nasales y retrobulbares, inguinales, periorbitales, digitoplantares, sublinguales, en la cola, en las extremidades y en zona cráneo-ventral del tórax. Dependiendo de dónde se sitúa el agente y sus lesiones, los signos clínicos que se presentan (Bissonnette et al., 1991; Fortin, Calcutt y Kim, 2017; Grooters, 2003; Souto et al., 2020) (Figura 13).



Figura 13. Pitiosis sublingual en Gato. Macho de 2 años de edad, con una masa sublingual multilobulada con 3 meses de evolución. (Fortin et al., 2017).

En cuanto a la pitiosis gastrointestinal en gatos, únicamente cuatro casos han sido descritos. Uno de ellos, cuyo diagnóstico fue llevado a cabo en Santa María, Brasil, presentaba lesiones en el intestino delgado, hígado, páncreas y nódulos linfáticos mesentéricos. Otro, diagnosticado en Paraíba, Brasil, presentaba una masa multinodular amarillenta en la pared del segmento proximal del yeyuno, con un trayecto fistuloso que recorría todo el espesor de la pared intestinal volcando contenido de ese órgano en la cavidad peritoneal generando una peritonitis fibrino-supurativa con aumento de tamaño de los linfonódulos mesentéricos. Los otros dos casos fueron reportados en EE.UU., uno en Georgia y otro en Texas. Ambos presentaban masas palpables. La primera se trataba de una masa extraluminal que involucraba tanto íleon como mesenterio. La segunda se ubicaba en el segmento distal del duodeno. Estos dos gatos manifestaban vómitos y pérdida de peso y fueron sometidos a cirugía con la posterior extracción de esas masas. Además se han registrado casos de pitiosis en la cavidad oral en donde se aprecian masas irregulares y firmes en dicha cavidad (Fortin et al., 2017; Galiza et al., 2014; Rakich et al., 2005; Souto et al., 2020).

Por último, la pitiosis cutánea genera en los gatos una dermatitis nodular ulcerativa o en otros casos, masas dérmicas y subcutáneas no ulcerativas (paniculitis). Por esta razón es conveniente a la hora de coleccionar material para análisis de laboratorio sacar muestras profundas de tejido y no superficiales (Grooters, 2003; Souto et al., 2020).

Cuando se trata de hallazgos histopatológicos, éstos revelan áreas multifocales de inflamación granulomatosa eosinofílica que se caracterizan por la presencia de áreas centrales multifocales de necrosis, con presencia de hifas y eosinófilos degenerados. Estos últimos, se encuentran rodeados de un gran número de macrófagos, macrófagos epitelioides, linfocitos, células plasmáticas y en algunos casos células multinucleadas (Fortin et al., 2017).

4.8.7. Humanos

La pitiosis en humanos fue reportada por primera vez en el año 1985 en Tailandia. Tailandia es el país con mayor número de casos, alcanzando un 80% de ellos. En otros países como Estados Unidos, Australia, Haití, Brasil, Malasia y Nueva Zelanda han sido reportado casos pero de manera menos frecuente (Gaastra et al., 2010; Luis-León y Pérez, 2011; Santurio, Alves et al., 2006).

En humanos también existen distintas presentaciones de esta patología. Si los ordenáramos de manera decreciente, según su frecuencia de aparición, se posicionaría en primer lugar, la forma vascular; luego la ocular u oftálmica; posteriormente la cutánea o subcutánea y por último la que se presenta en localizaciones anatómicas inusuales (Luis-León y Pérez, 2011).

En América Latina el primer caso reportado fue en el año 2005. Se trataba de un hombre de sexo masculino, de 49 años de edad; cuya profesión era la de oficial de policía que en sus tiempos libres se dedicaba a realizar actividades acuáticas porque era un aficionado por la pesca. El mismo presentó una lesión cutánea en su extremidad izquierda (Bosco et al., 2005) (Figura 14).

La pitiosis vascular se localiza frecuentemente en los miembros inferiores con signos de claudicación, parestesia, prurito, edema, vesículas y úlceras en la piel, celulitis,

fascitis necrotizante, fiebre, ausencia de pulso arterial, y aneurisma aórtico (que puede verse como bultos en el abdomen o zona inguinal). Todos estos signos se deben al desarrollo de un síndrome de insuficiencia arterial crónica y pueden tardar meses en manifestarse luego del contacto con aguas estancadas como se han reportado en la mayoría de los casos. Probablemente la vía de infección en esta presentación sea por invasión directa a través de la piel dirigiéndose luego a un tejido arterial cercano. Esta presentación puede verse afectando una o ambas piernas e incluso puede llevar a la muerte si se produce una ruptura del aneurisma aórtico (Krajaejun, Sathapatayavongs, Chaiprasert y Srimuang, 2008; Luis-León y Pérez, 2011).

La forma cutánea o subcutánea se presenta como granulomas subcutáneos acompañados de una inflamación crónica e intenso dolor, o como un tejido granulomatoso con presencia de úlceras. Estas lesiones generalmente se observan en una de las extremidades, pero se han reportado casos de infecciones agudas que se presentan en ambos miembros inferiores como una celulitis necrotizante. En lo que concierne a estudios histopatológicos, éstos revelan una inflamación granulomatosa supurativa y presencia de hifas no septadas, gruesas (Krajaejun et al., 2008; Luis-León y Pérez, 2011) (Figura 14).

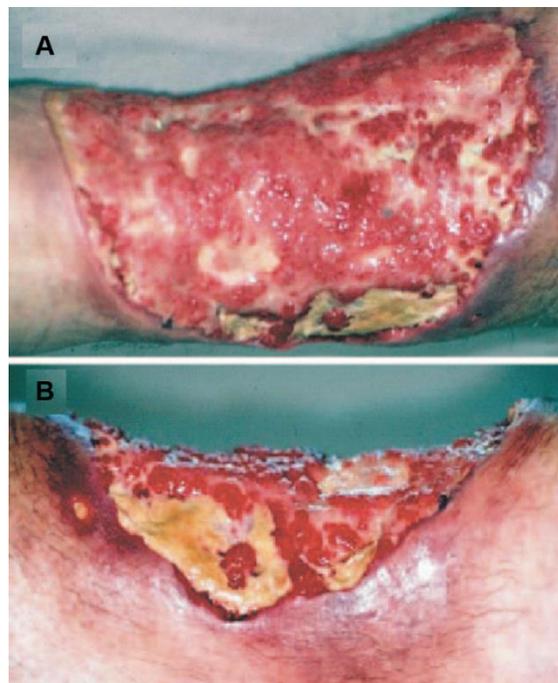


Figura 14. Humano. Aspecto clínico de lesión cutánea en extremidad izquierda. A: Extensión de la lesión en un plano frontal. B: Extensión en profundidad de la lesión en un plano medial. (Bosco et al., 2005).

En la presentación ocular u oftálmica suele verse una úlcera corneal o queratitis, acompañada en algunos casos de dolor, irritación, inflamación palpebral, enrojecimiento de la conjuntiva, infiltración o perforación de la córnea con acúmulo de contenido purulento en la cámara anterior del ojo, disminución de la visión y en casos graves puede verse endoftalmitis. En la mayoría de los casos los pacientes notifican haber presentado un trauma corneal previo. Curiosamente se reportó un caso de una niña de 3 años de edad que manifestaba características de esta presentación luego de haber concurrido a piscinas públicas. Como también otro caso de una infección por

contaminación a través de los lentes de contacto. En ninguno de los casos de pitiosis oftálmica primaria se ha reportado diseminación a otros órganos (Badenoch et al., 2009; Lekhanont, Chuckpaiwong, Chongtrakool, Aroonroch y Vongthongsri, 2009; Luis-León y Pérez, 2011) (Figura 15).



Figura 15. Humano. Pitiosis ocular en un niño sano. Se observa severa inflamación orbitaria. (Mendoza, 2010).

Cuando la pitiosis en humanos se localiza de forma anatómica inusual, se presentan en el cerebro, en los senos paranasales y en el tracto gastrointestinal, donde se reflejan las diferentes posibles vías de infección que podrá utilizar el agente. Por lo general se observa en personas que padecen otra patología previa de base como son la talasemia, leucemia linfoblástica y hemofilia (Krajaejun et al., 2008; Krajaejun, Sathapatayavongs et al., 2006; Luis-León y Pérez, 2011).

La enfermedad en humanos se presenta con predominio en el sexo masculino. La mayoría trabajadores agrícolas en zonas inundables. Gran cantidad de pacientes en Tailandia que cursan con pitiosis vascular, cutánea/subcutánea o en localizaciones inusuales, presentan diferentes patologías sanguíneas previas tales como Talasemia o hemoglobinuria paroxística nocturna. Se desconoce por qué estas patologías predisponen a los seres humanos a contraer pitiosis. En contraposición a lo anteriormente señalado, la forma ocular generalmente se presenta en personas aparentemente sanas (Krajaejun, Sathapatayavongs et al., 2006; Luis-León y Pérez, 2011).

4.9. Diagnóstico de laboratorio

El diagnóstico temprano de esta patología es muy importante para obtener éxito con el tratamiento (Gaastra et al., 2010).

4.9.1. Patología clínica

Sumado a los signos clínicos mencionados anteriormente, se han reportado casos de equinos que presentaron alteraciones sanguíneas tales como anemia (hematocrito disminuido) e hipoproteinemia. Esto debido a la constante pérdida de sangre y exudados a través de las lesiones cutáneas de carácter ulcerativo. La pitiosis genera una anemia de tipo hipocrómica microcítica, no regenerativa y se desarrolla posteriormente a una pérdida crónica de sangre resultando a su vez en una deficiencia de hierro (Gaastra et al., 2010; Miller y Campbell, 1983).

En un estudio realizado en ratones, donde se reprodujo la pitiosis, se observó una disminución del hematocrito sin la presencia de heridas cutáneas. Esto llevó a suponer que la pérdida de sangre a través de las heridas no es la única causa de anemia en esta patología. Otro estudio in vivo realizado en ratones, catalogó a la deficiencia de hierro como contribuyente o como causa primaria en el desarrollo de la anemia hipocrómica microcítica en infecciones causadas por *Pythium insidiosum*. Esto se vió fortalecido cuando se descubrió que *Pythium insidiosum* expresa un gen que codifica a la ferroquelatasa, una enzima que participa en la biosíntesis final del grupo hemo (Krajaejun et al.; 2011; Loreto, Alves, Santurio, Nogueira y Zeni, 2012; Zanette et al., 2013).

Cambios en los glóbulos blancos se manifiesta como otra alteración sanguínea en esta patología. Los glóbulos blancos se limitan a una moderada leucocitosis, junto con una neutrofilia regenerativa y eosinofilia absoluta. Estas últimas están relacionadas a la intensa reacción que generan las mismas, en el interior de los granulomas alrededor de los “kunkers” (Miller y Campbell, 1983).

4.9.2. Frotis directo en montaje húmedo

A través de una técnica rápida con hidróxido de potasio (KOH) al 10% y tinta Parker, se puede realizar un examen directo sobre las muestras de tejido. De esta forma se exhibirán microscópicamente sus hifas. Muestras homogéneas de los “kunkers” deben colocarse directamente sobre 10 a 20% de KOH. Las hifas se mostrarán de forma gruesa, de 3 a 10 mm de diámetro, ligeramente septadas y ramificadas. En algunas ocasiones pueden apreciarse vesículas lipídicas en el citoplasma; algunas de ellas posicionadas en la periferia rodeadas de escamas, dando así un aspecto de corona radiada y formando el fenómeno de Splendore-Hoeppli (Cardona et al., 2013b; Gaastra et al., 2010; Mendoza et al., 1996) (Figura 16).

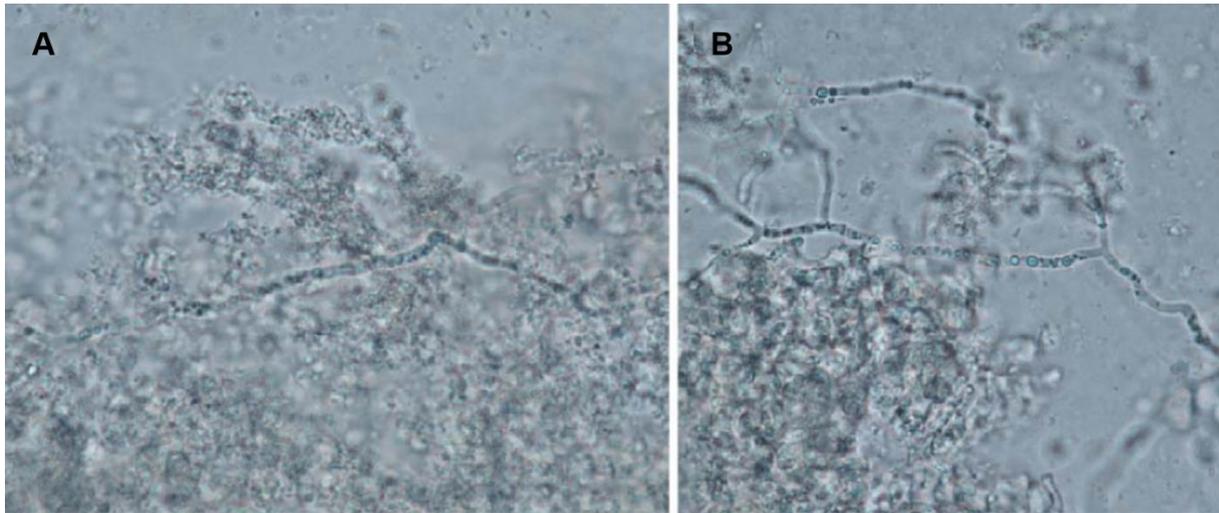


Figura 16. Frotis húmedo con KOH al 10% de un “kunker” proveniente de un equino con pitiosis. A y B: son el campo microscópico continuo de la muestra clínica. Se observan hifas hialinas largas y escasamente septadas de *Pythium insidiosum*. Usualmente también se ve la presencia de numerosas vesículas dentro de las hifas. (Gaastra et al., 2010).

4.9.3. Cultivo

Pythium insidiosum es un oomiceto que crece fácilmente en distintos medios de cultivo como Sabouraud glucosa agar al 2% (SGA), agar extracto de malta al 2%, agar V8, agar infusión cerebro- corazón (BHIA), agar de harina de maíz (CMA), agar dextrosa de papa, agar sangre (AS) y agar de extractos vegetales (Chaffin, Schumscher y McMullan, 1995; Luis-León y Pérez, 2011; Santurio, Alves et al., 2006) (Figura 17).

Previo al cultivo es importante realizar una correcta colecta de muestras. Conviene extraerse de las lesiones los anteriormente mencionados “kunkers” que deben ser enviados a un laboratorio especializado en el cultivo e identificación de *P. Insidiosum* a temperatura ambiente en el menor tiempo posible. En caso de que las muestras deban trasladarse durante 2 días o más, se recomienda que éstas sean acondicionadas en un recipiente con una solución salina con cloranfenicol o tetraciclina (Chaffin et al., 1995; Gaastra et al., 2010).

Cuando llegan al laboratorio son lavadas tres veces con una solución salina estéril e incubadas durante varias horas en una solución salina con un agregado de 100 µg/ml de ampicilina, con la función de inhibir el crecimiento bacteriano secundario (Chaffin et al., 1995).

Posteriormente los “kunkers” son cortados de 5 a 10 mm de diámetro e incubados a 37°C en el medio de cultivo a elección. Se recomienda colocar el material en un matraz de vidrio con agua destilada para aumentar de esa forma la humedad del ambiente durante la incubación. Transcurridas entre 24 a 48 horas pueden observarse las colonias que pueden ser identificadas por sus características morfológicas y por sus hifas. Además, se caracterizan por ser blancas-amarillentas, hialinas, planas, de distribución radial y de 20 mm de diámetro. Microscópicamente las hifas miden entre 2 a 10 µm de diámetro, son hialinas, cenocíticas y sus ramificaciones laterales tienen

un ángulo de 90° (Gaastra et al., 2010; Luis-León y Pérez, 2011; Mendoza et al., 1996; Mendoza y Alfaro, 1986; Santurio, Alves et al., 2006) (Figura 17 y 18).

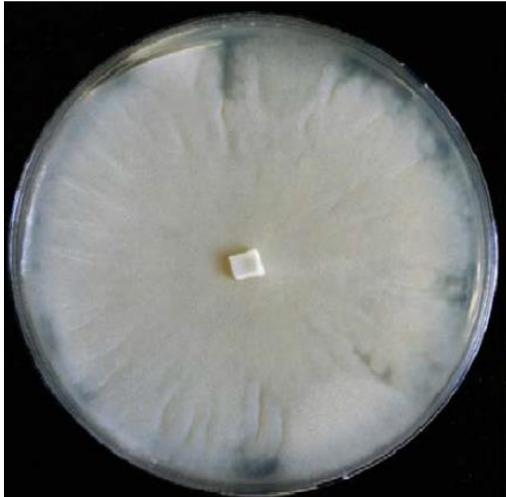


Figura 17. Cultivo de *Pythium insidiosum* a los 5 días pos incubación a 37°C en un medio Sabouraud dextrosa agar al 2%. (Gaastra et al., 2010).

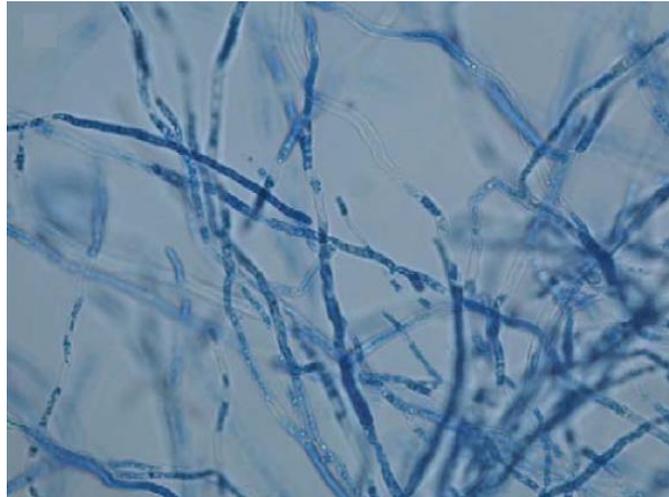


Figura 18. Hifas de *Pythium insidiosum* escasamente septadas en azul de lactofenol (20 X), obtenidas de cultivo en placa. (Gaastra et al., 2010).

Antiguamente *Pythium insidiosum* era considerado como el único oomiceto patógeno para mamíferos. Para confirmar el diagnóstico de *Pythium insidiosum* era suficiente y necesario inducir la zoosporogénesis y observar sus zoosporas biflageladas. Como éstas no se conseguían ver en el medio de cultivo, los aislamientos eran colocados en agua estancada estéril para inducir así la reproducción asexual del agente, el desarrollo de esporangios y posteriormente las zoosporas. La observación de las zoosporas requiere varias horas de trabajo de una persona familiarizada en su diagnóstico (Acero- Mondragón et al., 2013; Chaffin et al., 1995; Gaastra et al., 2010; Grooters, 2003; Grooters, Whittington, Lopez, Boroughs y Roy, 2002).

Otra forma para inducir la esporogénesis y la posterior producción de zoosporas, es transferir pequeños fragmentos de colonias de *P. insidiosum* hacia una caja de Petri que contenga hojas de gramíneas (*Paspalum notatum* o *Axonopus compressus*) previamente hervidas (para lograr su esterilización) e incubarlas durante 24 horas a 37°C. Posteriormente estas hojas son transferidas a un medio de inducción y nuevamente incubadas a 37°C pero en un ambiente oscuro. Luego de 24 horas se pueden observar fácilmente en un microscopio esporangios conteniendo zoosporas móviles en los bordes de las hojas (Chaiprasert, Samerpitak, Wanachiwanawin y Thasnakorn, 1990; Mendoza y Prendas, 1988) (Figura 19).



Figura 19. A: Vesículas con zoosporas que se desarrollaron después de 3 h de incubación. B: primer plano de una vesícula antes de la liberación de zoosporas. Debajo de la vesícula se ve el tubo de descarga vacío. (Gaastra et al., 2010).

4.9.4. Histopatología

En las secciones anteriores se señalaron las principales características histopatológicas para cada especie que la enfermedad en estudio puede afectar. Es momento ahora de profundizar la histopatología específicamente en equinos, que como lo saben, es objeto de análisis directo de esta tesis.

En primer lugar se debe realizar una correcta colecta de muestras. Para ello se tiene que realizar una previa limpieza y asepsia de las lesiones que luego deberán ser enviadas en formol bufferado al 10% a un laboratorio especializado (Becegatto et al., 2017).

Tras ser fijadas las muestras de tejido en formol al 10% y procesadas mediante técnicas convencionales con parafina; al examen histopatológico de las lesiones se podrá apreciar una infiltración piogranulomatosa inflamatoria con una gran cantidad de granulocitos eosinófilos que corresponden a los “kunkers” (concreciones características de la pitiosis en equinos) (Acero- Mondragón et al., 2013; Gaastra et al., 2010)

Esta reacción granulomatosa eosinófila es desencadenada por el mismo *P. Insidiosum* y conduce al desarrollo del fenómeno Splendore-Hoeppli; explicado por la formación de un material necrótico producto de la degranulación de eosinófilos y mastocitos alrededor de las hifas del agente. Las hifas se encuentran en el centro de estos pequeños granulomas multifocales o microabscesos. Hacia la periferia de los “kunkers”, pueden apreciarse gránulos con mayor claridad. En los bordes es usual encontrar también eosinófilos intactos (Mendoza y Newton, 2005; Santurio, Alves et al., 2006) (Figura 20).

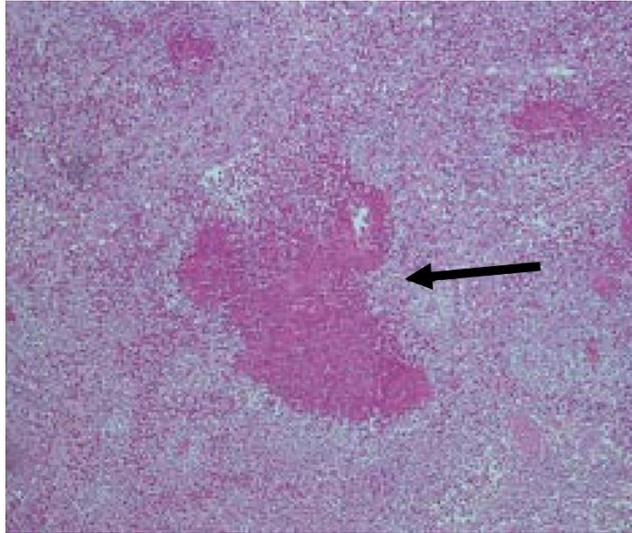


Figura 20. Equino. Dermis. Hematoxilina y Eosina. 40X. Fenómeno de Splendore-Hoeppli (flecha). (Márquez et al., 2010).

Las lesiones causadas por *Pythium insidiosum*, están formadas por largas masas eosinófilas e hifas. Contienen además arteriolas que generan una alta vascularización, abundante tejido conectivo dispuesto irregularmente, colágeno, células plasmáticas, células inflamatorias (especialmente eosinófilos necróticos) y algunos linfocitos. Los “kunkers” característicos de estas lesiones, están rodeados por un exudado inflamatorio compuesto por neutrófilos y eosinófilos. El tejido ubicado entre los “kunkers” se caracteriza por una inflamación granulomatosa y granulocítica. En casos crónicos pueden observarse células gigantes y macrófagos (Acero-Mondragón et al., 2013; Chaffin et al., 1995; Márquez et al., 2010; Miller y Campbell, 1984; Santurio, Alves et al., 2006).

Las hifas de *Pythium insidiosum* no serán correctamente coloreadas cuando se emplee la tinción con Hematoxilina y Eosina (H&E). Pero de todas formas se podrá observar una dermatitis con tejido fibroso e infiltración de neutrófilos, eosinófilos y macrófagos (Becegatto et al., 2017; Gaastra et al., 2010) (Figura 21).

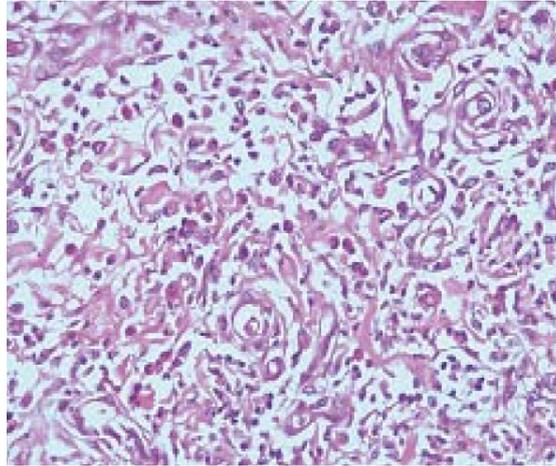


Figura 21. Equino. Dermis. Hematoxilina y Eosina. 40X. Se observa una lesión con alta vascularización, fibrosis e infiltrado de eosinófilos difuso intenso, seguidos por macrófagos y neutrófilos. (Márquez et al., 2010).

Con tinciones como Gridley, Periodic acid- Schiff (PAS), o las argénticas Grocott y Gomori, las hifas se observan fácilmente en la periferia de los “kunkers”. Miden entre 2 a 6 μm de diámetro llegando en algunas ocasiones alcanzar los 10 μm . Sus paredes son gruesas, con ramificaciones en 90°, hialinas irregulares y en algunas ocasiones septadas (Chaffin et al., 1995; Gaastra et al., 2010; Márquez et al., 2010) (Figura 22).

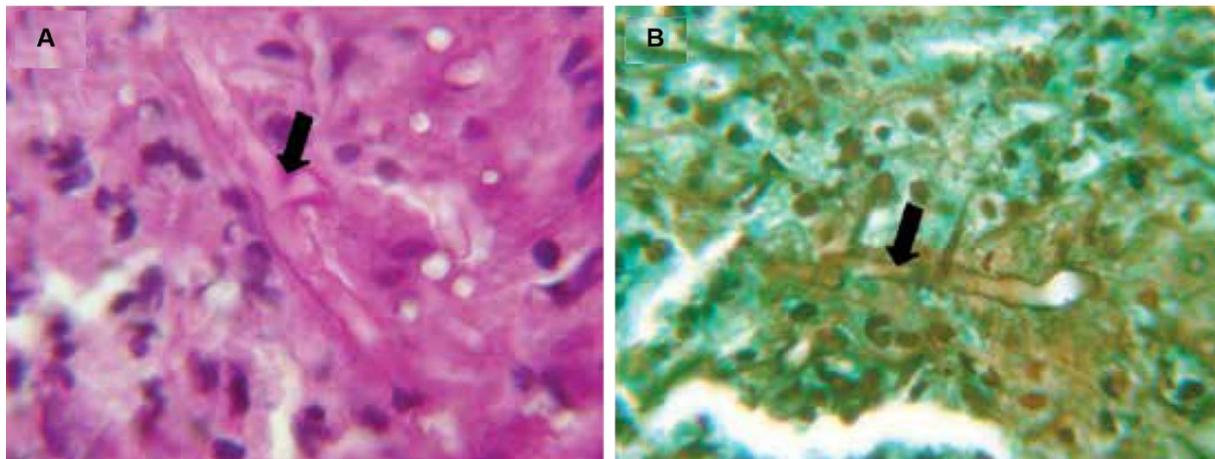


Figura 22. Equino. Dermis. A: Hifa con ramificación en ángulo recto en coloración de PAS a 100X (flecha) B: Hifa con región delgada alternada de región gruesa en coloración de Gomori a 100X (flecha). (Acero- Mondragón et al., 2013).

El estudio histopatológico de las lesiones no es utilizado como diagnóstico definitivo en esta enfermedad. Su resultado puede ser similar, en cuanto a la presencia de granulomas necróticos eosinofílicos, al obtenido en patologías como basidiobolomycosis, conidiobolomycosis y en parasitosis cutáneas como la habronemiasis (Chaffin et al., 1995; Gaastra et al., 2010).

4.9.5. Inmunohistoquímica (IQ)

La inmunohistoquímica es una técnica altamente específica en el diagnóstico de *P. insidiosum*. Tiene como ventaja que en ella se pueden utilizar muestras de tejidos que

ya han sido fijadas en formol al 10%. El objetivo de esta técnica es identificar el agente etiológico de las hifas presentes en los tejidos afectados. Para ello se utiliza la prueba de inmunoperoxidasa, técnica sensible y específica (Cardona et al., 2013b; Luis-León y Pérez, 2011; Mendoza et al., 1996).

Para la prueba de inmunoperoxidasa se utiliza a la streptavidina-biotina peroxidasa marcada (LSAB) como anticuerpo policlonal primario anti *Pythium insidiosum*. En esta técnica es utilizado como buffer una dilución de 1:1000 de fosfato salino (Phosphate Buffered Saline: PBS), que es incubado con un crómogeno rojo en estufa a 37°C durante 1 hora. Transcurrido ese lapso de tiempo, se procede a la confirmación de la técnica mediante la marcación de las estructuras semejantes a hifas ocasionalmente septadas con el anticuerpo anti *Pythium insidiosum* utilizado en las muestras control (Pedroso et al., 2009) (Figura 23).

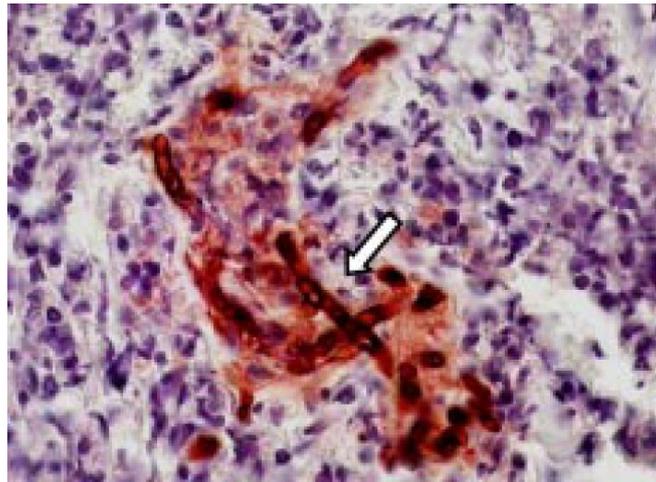


Figura 23. Equino. Dermis. Inmunohistoquímica 100X. Marcación positiva en rojo para *Pythium insidiosum* (flecha). (Pedroso et al., 2009).

Dado que las hifas de *Pythium insidiosum* presentan moléculas antigénicas con epítomos específicos del Reino *Chromista* que no son encontradas en las hifas de otros zigomicetos, hay pocas posibilidades de falsos positivos. Esta prueba también es útil para descartar patologías que establecen un diagnóstico diferencial con la pitiosis. Como por ejemplo la habronemiasis; distintas neoplasias como carcinomas de células escamosas; la conidiobolomicosis y la basidiobolomicosis (Cardona et al., 2013b; Luis-León y Pérez, 2011).

4.9.6. Inmunofluorescencia (IF)

Si bien la prueba de inmunofluorescencia directa es completamente específica para detectar *Pythium insidiosum* en perros, gatos y en humanos, la utilización en equinos puede tornarse un tanto confusa. Al emplear la técnica en estos últimos, se observa una fluorescencia uniforme en toda la superficie del “kunker” que es atribuida a la presencia de antígenos solubles liberados por las hifas presentes en él. De todas formas la inmunofluorescencia ha sido utilizada para diferenciar a *Pythium insidiosum* de otros *Pythium* spp. (Mendoza et al., 1996; Mendoza, Kaufman y Standard, 1987).

4.9.7. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para efectuar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se parte de la extracción de ADN de cultivos realizados previamente con muestras de las lesiones. Luego de obtener el ADN y que estas concentraciones sean medidas con un espectrofotómetro, se realiza un PCR anidado (Grooters y Gee, 2002; Schurko, Mendoza, Lévesque et al., 2003).

En el PCR anidado se realiza una primera ronda donde se utilizaran los primers fúngicos universales ITS1 e ITS2 (que se basan en las regiones conservadas de los genes de ARNr 18s, 5.8s) para amplificar una región estructural específica de eucariotas. Esta región se utiliza para determinar únicamente la presencia o ausencia de ADN fúngico en la muestra (Grooters y Gee, 2002; Química.es, 2021).

Posteriormente, se realiza una segunda ronda de PCR donde se amplifica un segmento de 105 pares de bases (pb) de la región ITS1, con los cebadores PI-1 y PI-2 específicos de especie para determinar si la muestra contiene o no ADN de *Pythium insidiosum*, comparando su tamaño con un ADN standard (Botton et al., 2011; Grooters y Gee, 2002).

4.9.8. ELISA

ELISA es una prueba altamente específica y sensible en aquellos equinos que están cursando esta patología. Se basa en la detección de anticuerpos específicos para *Pythium insidiosum*. Es capaz de detectar infecciones precoces y subclínicas (con bajos títulos de anticuerpos) de manera fácil y rápida. Uno de los puntos claves en el diagnóstico de pitiosis es detectarla en su fase inicial, favoreciendo así el pronóstico de la enfermedad. Esto se logra si se utiliza esta técnica (Mendoza et al., 1996; Santurio, Leal et al., 2006).

El procedimiento de esta técnica consiste, en primer lugar, en sensibilizar las placas con una dilución de antígeno soluble de hifas sonicadas. Tras ser incubadas, son bloqueadas con una solución de albumina de origen bovino. Luego se distribuyen sobre ellas los sueros diluidos de los animales a testear y se los incuban a 37°C durante una hora. Se deben realizar dos incubaciones. La primera con anticuerpos primarios que se lavan cuatro veces. La segunda se realiza con anticuerpos específicos de especie anti-IgG conjugados con peroxidasa. Se los lava nuevamente y se coloca en ellos una solución diluida de un sustrato cromogénico. La reacción es nuevamente bloqueada y finalmente se procede a realizar la lectura en un espectrofotómetro (Santurio, Alves et al., 2006; Santurio, Leal et al., 2006).

4.9.9. Inmuno-Difusión en Gel Agar (IDGA)

Para diagnosticar *Pythium insidiosum* a partir de esta técnica pueden ser utilizados dos antígenos. Uno preparado a partir de micelios de *Pythium insidiosum* digeridos con tripsina y otro a partir de antígenos filtrados de colonias puras (CFA) (Mendoza et al., 1996).

La IDGA es una prueba específica para *Pythium insidiosum*. No se han reportado reacciones cruzadas con otras enfermedades que se comportan de manera similar, como son las causadas por *B. ranarum* y *C. coronatus*; así como tampoco con otras

patologías bacterianas y micóticas. Esta técnica es capaz de detectar la patología a los 3 días de iniciada la infección, es decir, en sus etapas tempranas. Lo que demuestra que los anticuerpos contra la pitiosis son desarrollados rápidamente en etapas iniciales (Mendoza et al., 1996; Mendoza, Mendoza, Kaufman y Standard, 1986).

IDGA se basa en la detección de precipitinas presentes en sueros de equinos que padecen la patología. Animales sanos y aquellos que la están cursando crónicamente (considerados como anérgicos), no muestran ninguna banda en esta prueba; resultando así negativos a la misma. Asimismo, aquellos animales que se recuperaron luego de al menos dos meses de un exitoso tratamiento tampoco muestran bandas al realizar esta prueba. (Mendoza et al., 1996).

Si comparamos los antígenos que pueden ser utilizados en esta técnica, podemos señalar que el preparado a partir de la digestión de la tripsina tiene una vida corta. Actividad que empieza a perderse a partir de las dos semanas; perdiéndola por completo transcurrido un mes. Por el contrario, CFA mantiene su actividad por al menos un año. Esto último hace posible que no se esté creando continuamente nuevo antígeno. El antígeno de tripsina es capaz de detectar únicamente una banda de precipitado en aquellos animales infectados, mientras que CFA detecta entre tres y seis bandas. Esto indica que el primero tiene una menor capacidad para detectar precipitinas, comparado con el segundo, que tiene una alta capacidad para su detección. CFA probó ser más estable y sensible para el diagnóstico de pitiosis y para el monitoreo de animales tratados (Mendoza et al., 1986; Mendoza et al., 1996) (Figura 24).

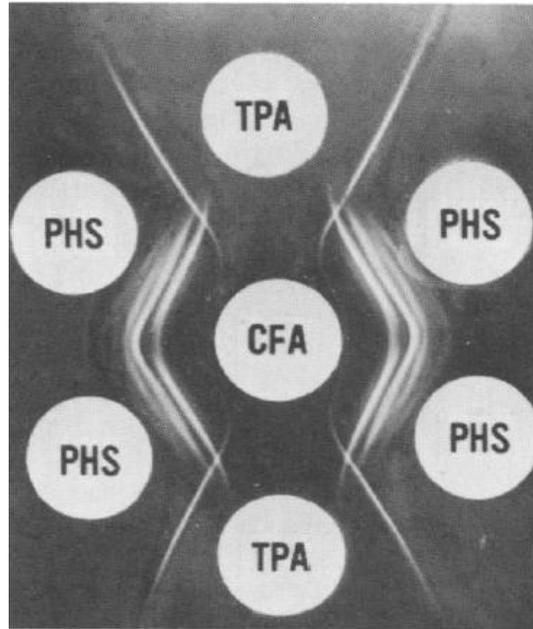


Figura 24. Inmuno-Difusión en Gel Agar (IDGA). Se puede observar la reactividad de *Pythium spp.* en un filtrado de cultivo y en antígenos tripsinizados al enfrentarse con suero de un caballo con pitiosis. Abreviaturas: TPA, antígeno tripsinizado recién preparado (<24 h); PHS, suero de caballo con pitiosis. El suero de caballo produjo mayor número de precipitinas, seis con el CFA, mientras que una sola precipitina, también detectable con el CFA, fue evidente con el TPA. (Mendoza et al., 1986).

4.9.10. Fijación del Complemento (FC)

La fijación del complemento es un test serológico que detecta anticuerpos IgG e IgM, presentes en etapas tempranas de la pitiosis. Esta prueba utiliza un antígeno preparado a partir de un líquido que proviene de cultivos de *Pythium insidiosum*. Es una prueba considerada poco sensible y poco específica si se la compara con la IDGA. Detectando un 82% de los casos clínicos en esta patología. A esto se le suma que su realización requiere tiempo y una persona capacitada que la pueda llevar a cabo. Probablemente estas sean las razones por las cuales la misma no ha sido implementada en la mayoría de los países en donde está presente la enfermedad (Mendoza et al., 1996; Miller y Campbell, 1982b).

4.9.11. Inmuncromatografía (ICT)

La inmuncromatografía es una técnica que se basa en la detección de anticuerpos IgG anti- *Pythium insidiosum* en sueros de animales infectados. Si comparamos esta técnica con IDGA y ELISA, la inmuncromatografía presenta una mayor sensibilidad que IDGA (ICT 88%, IDGA 66%) pero una sensibilidad ligeramente más baja que la técnica de ELISA (ICT 91%, ELISA 99%). De todas formas, la sensibilidad de la ICT es considerada alta. Por otra parte, la ICT no presenta reacción cruzada con otros patógenos, proporcionando una alta especificidad (100%), que se agrega a su alta

precisión (97%) (Intaramat et al., 2016; Krajaejun, Imkhieo, Intaramat, y Ratanabanankoon, 2009) (Figura 25).

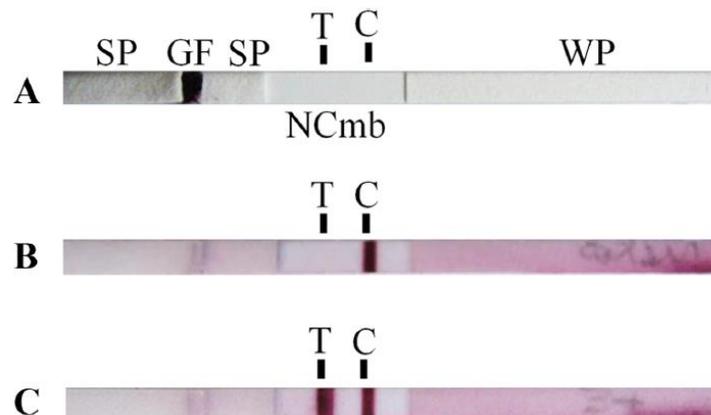


Figura 25. Inmunocromatografía (ICT). Diagrama esquemático de la técnica de inmunocromatografía (ICT) basada en las proteínas A/G para la detección de anti-*Pythium insidiosum* IgGs. Panel A: (Tira real de ICT) muestra una ICT que no fue probada (no se generó ni la línea de prueba ni la línea de control). Panel B: Arroja un resultado negativo (solo se hace visible la línea control). Panel C: Arroja un resultado positivo (tanto la línea de prueba como la línea control se hizo visible). Abreviaturas: SP, almohadilla de ejemplo; GF, fibra de vidrio; WP, almohadilla absorbente; NCmb, membrana de nitrocelulosa; T, línea de prueba; y C, línea de control. (Intaramat et al., 2016).

Cabe destacar que la ICT también es una prueba más práctica de utilizar al compararla con IDGA. Esto se debe a que la ICT viene pronta para ser utilizada, arroja el resultado en tan solo 30 minutos, tiene una vida media de al menos 2 años y se puede distribuir a lo largo del mundo sin alterar su correcto funcionamiento. Por el contrario, IDGA, requiere una preparación previa del gel de difusión y 24 horas para obtener el resultado (Intaramat et al., 2016; Krajaejun et al.; 2009).

En conclusión la ICT es una técnica altamente sensible, específica y precisa; fácil de usar, rápida y eficiente en el diagnóstico serológico de pitiosis (Krajaejun et al.; 2009).

4.9.12. Western Blot (WB)

Western Blot es una prueba que se introdujo en el diagnóstico de la pitiosis con el objetivo de determinar cuál de los antígenos de *Pythium insidiosum* eran relevantes en la infección del agente. Así, se descubrió que las proteínas antigénicas 28K, 30K y 32K eran inmunodominantes y que los anticuerpos IgG eran capaces de reconocer cualquier proteína citoplasmática de *Pythium insidiosum*. Además, se probó que en sueros provenientes de animales en etapas crónicas de la enfermedad no era posible detectar los antígenos citoplasmáticos, afirmando así la teoría de que estos animales en etapas crónicas de la patología se volvían anérgicos (Mendoza et al., 1996) (Figura 26).

Esta es una prueba de gran utilidad para el diagnóstico de la pitiosis. Es específica para *Pythium insidiosum* y evidencia las distintas clases de anticuerpos que pueden observarse durante la patología. Se cree que podría colaborar con el desarrollo y/o creación de nuevas pruebas rápidas de análisis serológico para alcanzar un

diagnóstico precoz y un tratamiento adecuado. Por otra parte, como las inmunoglobulinas G anti proteínas antigénicas 28K, 30K y 32K persisten por al menos un año en aquellos animales recuperados y se considera además que podrían generar cierta inmunidad en ellos; podría ser útil para la creación de vacunas más eficaces logrando resultados favorables en pacientes con pitiosis (Krajaejun, Kunakorn et al., 2006; Mendoza et al., 1996).

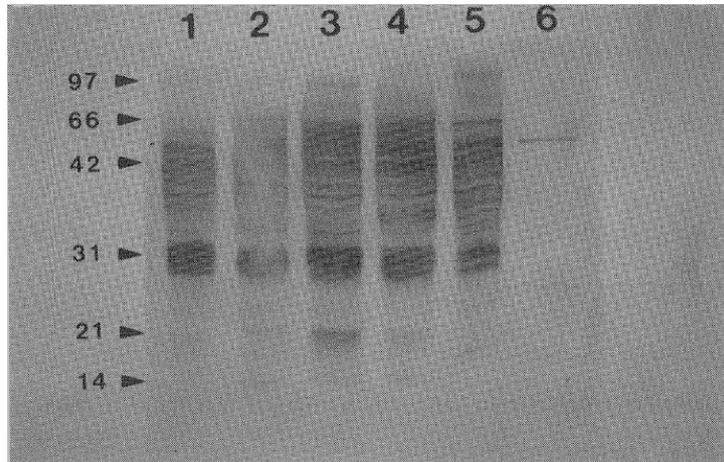


Figura 26. Western Blot (WB). Análisis de antígenos filtrados de cultivos de diferentes cepas de *Pythium insidiosum* (líneas 1- 5) y antígenos (CFA) de *Conidiobolus coronatus* (línea 6) tras la reacción con sueros de animales con pitiosis. Los antígenos 28K, 30K y 32K fueron indicados por las bandas prominentes. Se observó una banda de reacción cruzada de contra *Conidiobolus coronatus*. (Mendoza et al., 1996).

4.10. Diagnóstico diferencial

El diagnóstico diferencial de la pitiosis cutánea equina en primer lugar debe realizarse con aquellas micosis cutáneas granulomatosas causadas por *Basidiobolus ranarum* y *Conidiobolus coronatus*. La basidiobolomicosis clínicamente se asemeja más a la pitiosis dado que coincide con los sitios donde se producen normalmente las lesiones. En contraposición, las que se producen en la conidiobolomicosis se restringen exclusivamente a la región nasal y cavidad oral. A su vez, si observamos microscópicamente esas lesiones podemos ver que las producidas en la basidiobolomicosis tienden a ser más edematosas mientras que las de pitiosis suelen ser más fibrosas. Histológicamente, la basidiobolomicosis y la conidiobolomicosis son lesiones piogranulomatosas; limitadas por una banda ondulante característica de tejido granulomatoso amarillo, compuesto por eosinófilos e hifas, no presentes en lesiones de pitiosis (Chaffin et al., 1995; Headley y Arruda, 2004).

A lo anterior se agrega que para diferenciarla de estas patologías, es útil llevar a cabo un diagnóstico histopatológico que mida el tamaño de las hifas que se encuentren allí presentes. Las hifas de *Pythium insidiosum* son relativamente pequeñas. Cuentan con un diámetro de 2,6 a 6,4 μm . Las de *Conidiobolus coronatus* presentan un diámetro intermedio de 5,1 a 12,8 μm . Por último las hifas de *Basidiobolus ranarum* poseen un diámetro mucho mayor de 5,1 a 20,5 μm . La presencia de ramificaciones formando un ángulo de 90° también es considerado parte del diagnóstico de *Pythium insidiosum* (Headley y Arruda, 2004).

La pitiosis también debe ser diferenciada de la habronemiasis cutánea equina. Una patología causada por la deposición de larvas de nematodos espirurídeos por parte de la *Musca doméstica* y la *Stomoxys calcitrans* en los meses de verano. Aparecerán entonces lesiones en regiones del cuerpo donde normalmente se posan las moscas. Esas heridas generalmente se aprecian en extremidades, pene/prepucio y en zona medial de los ojos. Son lesiones pruriginosas, circulares, ulceradas, de aproximadamente 5 a 15 cm de diámetro, con presencia de larvas de *Habronema (majus) microstoma*, *Habronema muscae* y *Draschia megastoma*. Desaparecerán espontáneamente en aquellos meses del año donde las temperaturas son bajas. Al corte puede apreciarse un tejido blanquecino con áreas focales blanco amarillentas y zonas de mineralización que pueden confundirse con los “kunkers” característicos de la pitiosis. Además, si observamos estas lesiones microscópicamente se visualiza un infiltrado inflamatorio de eosinófilos, linfocitos, macrófagos, células gigantes y células epitelioides con presencia de un tejido conjuntivo fibroso y vascular, presentes en áreas multifocales de necrosis mineralizada donde se muestran las larvas o sus restos. En la superficie de estas lesiones se puede observar un exudado fibrinonecrótico que cuando se tornan crónicas, el tejido de granulación se hace presente. Para diferenciar a la habronemiasis de la pitiosis es necesario realizar un estudio histopatológico donde se descarte la presencia de hifas de *Pythium insidiosum* (Chaffin et al., 1995; Sallis et al., 2003).

Los sarcoides son otra patología que se debe tener en cuenta a la hora de realizar un diagnóstico diferencial. Pueden ser confundidos debido a que muchas veces los encontramos en aquellos lugares donde normalmente se encuentra a la pitiosis. Estos lugares por lo general son las extremidades, ventral de tórax-abdomen y en la cabeza. Se presentan los sarcoides de cuatro formas distintas. La forma verrugosa, la forma fibroblástica, la forma nodular y la forma oculta; siendo la forma fibroblástica la más frecuente. En la forma verrugosa podemos encontrar lesiones de aspecto similar a un coliflor, pedunculadas y pequeñas. En la fibroblástica se las observa como nódulos bien delimitados en la dermis, con una epidermis ulcerada que puede predisponer a contaminación secundaria y hemorragias. En la nodular se aprecian masas de consistencia firme debajo de una piel de aspecto normal. Por último, la forma oculta se manifiesta con lesiones alopecias, ásperas y circulares. En lo que respecta al examen histológico de los sarcoides, se observa una hiperplasia pseudoepiteliomatosa con proliferación de colágeno y tejido conjuntivo fibroso en la dermis. En base a este estudio los mismos pueden ser diagnosticados fácilmente (Sallis et al., 2003).

Por otro lado, debe tenerse en cuenta a la hora de realizar un diagnóstico diferencial a los granulomas bacterianos o fúngicos, reacciones de cuerpos extraños, tejidos de granulación exuberantes y otras neoplasias como los carcinomas de células escamosas (Cardona et al., 2013b; Chaffin et al., 1995; Sallis et al., 2003).

4.11. Tratamiento

El éxito en el tratamiento no solo depende de su correcta elección y aplicación. Va a estar influenciado también por el tiempo y por el tamaño de la lesión así como por la edad y el estado nutricional y fisiológico del animal. Existen tres formas de tratamientos que se han utilizado de manera aislada o en conjunto para la cura de la pitiosis cutánea equina. Serán desarrollados los tres a continuación en la siguiente sección (Mendoza et al., 1996; Santurio, Alves et al., 2006).

4.11.1. Cirugía

La cirugía consiste en la completa remoción quirúrgica de las lesiones. Esto puede resultar un tanto difícil en aquellos lugares donde se ven comprometidas estructuras anatómicas delicadas, como muchas veces ocurre con las extremidades. Es importante resaltar que se extirpen completamente las lesiones para evitar futuras recidivas. Si no se extirpa, el agente etiológico seguirá presente. De todas formas realizarlo puede implicar la amputación de un miembro (Gaastra et al., 2010; Mendoza et al., 1996).

El éxito de la cirugía va depender del tamaño de las lesiones, del lugar donde se encuentren y del tiempo que llevan presente. *Pythium insidiosum* tiende a expandirse rápidamente. Se sugiere realizar la intervención quirúrgica lo antes posible, dejando un margen de 2 cm para asegurarnos que el agente haya sido removido completamente (Chaffin et al., 1995).

4.11.2. Quimioterapia/ Antimicóticos

Para el tratamiento químico de la pitiosis se utiliza yodo y anfotericina B. La anfotericina B es la droga de elección para el tratamiento de enfermedades micóticas. Al igual que la mayoría de los antifúngicos, esta droga actúa sobre el ergosterol presente en las membranas citoplasmáticas. Teóricamente la anfotericina B no es útil para el tratamiento de la pitiosis debido a que *Pythium insidiosum* tiene como característica la carencia de ergosterol (Mendoza et al., 1996).

De todas formas la anfotericina B ha sido utilizada con éxito en algunas ocasiones. Se puede implementar vía sistémica intravenosa o en menor medida de forma tópica. Por vía intravenosa se aplica durante 30 días. Comenzando con una dosis inicial de 0,30 mg/kg de peso vivo de anfotericina B en 1 litro de dextrosa al 5%, que va ir aumentando cada tres días 0,1 mg/kg de anfotericina B hasta llegar a 0,8 o 0,9 mg/kg por día. Este tratamiento debe ir acompañado de un monitoreo cercano del animal, teniendo en cuenta el consumo de agua y la producción de orina, dado que un aumento de los mismos puede indicar nefrotoxicosis temprana (Chaffin et al., 1995; Mendoza et al., 1996).

Por otro lado en lo referente al yodo, autores reportan haber logrado la cura con la utilización de yoduro de potasio y yoduro de sodio vía sistémica intravenosa. Tanto la aplicación de 67 mg/kg de PV vía oral de yoduro de potasio o yoduro de sodio a una dosis de 1g cada 15 kg PV intravenoso cada 2 semanas, como terapia adjunta y no como tratamiento primario pueden resultar benéficos (Cardona et al., 2013b; Chaffin et al., 1995; Mendoza et al., 1996).

4.11.3. Inmunoterapia

Existen dos vacunas creadas a partir de antígenos distintos. La primera fue creada por Miller (1981) a partir de antígenos de hifas ultrasonicadas. Este tratamiento consiste en la inyección vía subcutánea de 2 ml por dosis semanal durante 3 semanas por encima de los músculos pectorales. La segunda, creada por Mendoza, utiliza antígenos solubles de *Pythium insidiosum* obtenidos a partir de cultivos previamente precipitados. Si bien ambas vacunas demostraron resultados similares, con un porcentaje de 53% de cura, que a su vez se ve aumentado si se las combina con la

remoción quirúrgica de las lesiones; la creada por Mendoza continúa siendo efectiva transcurridos los 18 meses de su fabricación, mientras que la de Miller resulta más inestable. A esto se le puede agregar que la vacuna de Miller, a diferencia de la de Mendoza, genera inflamación en el sitio de aplicación (Chaffin et al., 1995; Gaastra et al., 2010; Mendoza et al., 1996).

Los efectos positivos de la vacunación, comienzan a visualizarse entre los 7 - 14 días. A los 30 días aproximadamente se podrá observar la regresión de las lesiones. Equinos con lesiones crónicas de más de dos meses de evolución no responden al tratamiento con estas vacunas (Gaastra et al., 2010; Mendoza et al., 1996).

El efecto de las vacunas sobre la cura de la pitiosis está explicado por un cambio en la respuesta inmune del huésped. Pasa de una respuesta inmune Th2 durante la infección natural, a una Th1 luego de la vacunación. Se cree que la respuesta Th2 es desencadenada como estrategia evolutiva del agente con el sistema inmune (Gaastra et al., 2010) (Figura 27).

Cuando se trata de una infección natural, *Pythium insidiosum* ingresa a los tejidos del huésped y sus hifas comienzan a liberar exoantígenos que son presentados al sistema inmune. En él, las células presentadoras de antígenos (CPA) empiezan a liberar interleucina 4 (IL4) que estimula a los Th0 a diferenciarse en Th2. Este último a su vez induce a que se libere aún más IL4 e IL5 que a su vez estimulan a las células B para que produzcan IgE, IgM e IgG. La IL5 y la IgE desencadenan la migración de eosinófilos y mastocitos al lugar de infección, donde degranulan provocando el fenómeno Splendore-Heoppli que culmina con la formación de los "kunkers". En el interior de ellos, las hifas aumentan en número y producen cada vez más exoantígenos que terminan bloqueando la respuesta inmune Th2 (Gaastra et al., 2010; Santurio, Alves et al., 2006) (Figura 27).

Cuando se utilizan inmunoterápicos, los inmunógenos son presentados ante una CPA distinta de la que participaba en la infección natural. Éstas van a liberar interferón gamma (IFN γ) e IL2 estimulando así a las células mediadoras de inmunidad (CMI) compuestas por linfocitos T y macrófagos que se encargarán de eliminar las hifas de *Pythium insidiosum*. Esta estrategia podría proteger al huésped por aproximadamente un año estimulando a las células B a producir IgG (Gaastra et al., 2010; Santurio, Alves et al., 2006) (Figura 27).

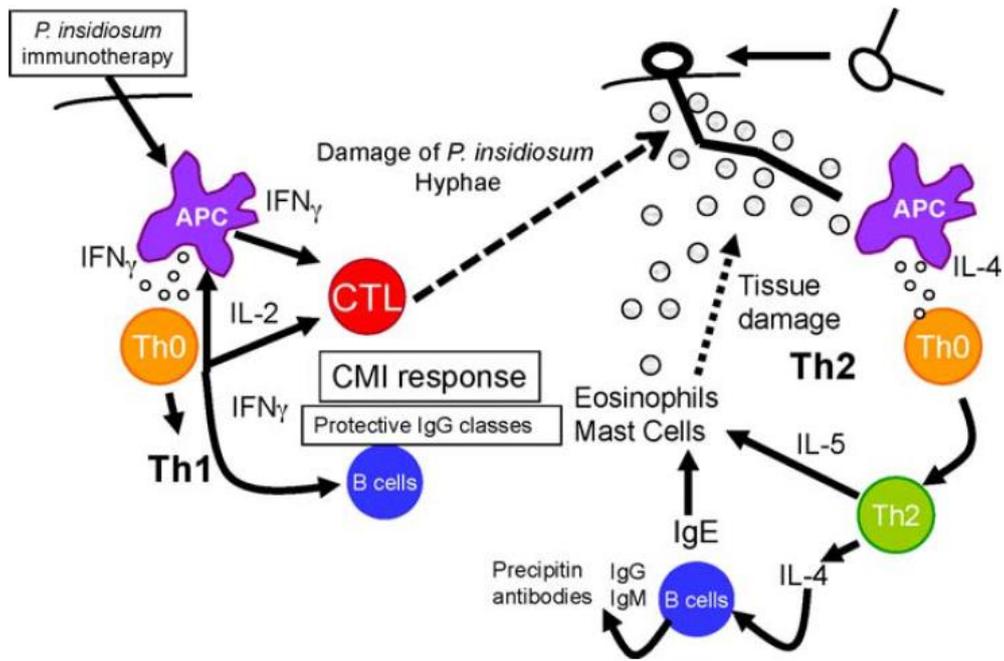


Figura 27. Figura ilustrativa representando en la sección derecha la respuesta inflamatoria de un huésped naturalmente expuesto a *Pythium insidiosum* y del lado izquierdo la respuesta putativa a los inmunógenos de *P. insidiosum* después de la inmunoterapia. (Gaastra et al., 2010).

Lograr un diagnóstico rápido y temprano de esta patología es fundamental para tener éxito con el tratamiento. Se cree que el mejor tratamiento contra *Pythium insidiosum* podría ser aquel que combine la vacunación con el tratamiento quirúrgico (75% eficacia) o la vacunación con antifúngicos (Mendoza y Newton, 2005; Santurio, Alves et al., 2006).

4.12. Control

Para el tratamiento y para la prevención de la patología tanto en animales como en el hombre es muy importante y de gran utilidad la implementación y divulgación de ciertas medidas de control sanitario. Tratamientos que pueden ser la completa remoción quirúrgica de las lesiones, la aplicación de quimioterápicos o antimicóticos y la vacunación (Salas, Colmenares, Márquez, Luis-León y Olivar, 2009).

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Describir un caso de pitiosis equina en la región litoral oeste de Uruguay, su evolución y la confirmación del diagnóstico utilizando diferentes técnicas de laboratorio.

5.2. Objetivos específicos

- 1) Describir las condiciones epidemiológicas que contribuyeron al caso.
- 2) Desarrollar la evolución clínica de un equino con diagnóstico presuntivo de pitiosis.
- 3) Señalar los hallazgos macroscópicos observados durante la necropsia y la colecta de muestras para el diagnóstico.
- 4) Utilizar diferentes técnicas a nivel de laboratorio para la confirmación del diagnóstico presuntivo:
 - Microbiología (aislamiento y caracterización morfológica de las hifas).
 - Histopatología (tinción Hematoxilina y Eosina y Grocott)
 - Inmunohistoquímica (IHQ).
 - Técnicas moleculares (PCR-anidado y secuenciación del gen ITS1 e ITS2).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Datos del establecimiento

Los datos del establecimiento se obtuvieron durante las sucesivas visitas al predio.

El establecimiento se encontraba ubicado en el departamento de Paysandú, paraje Costa del Sacra (32° 21' 23.5" S 58° 01' 52.9" O). Cuenta con una superficie de 18 hectáreas. El relieve corresponde a una ladera norte que finaliza en una planicie inundable contigua al arroyo Sacra.

6.2. Descripción del caso

El animal objeto de este estudio, se trató de un equino, sexo hembra, raza criolla, pelo gateado, de 24 años de edad, nacida en campos de basalto superficial, paraje Queguay Chico. Al mes de edad muere su madre y fue trasladada a campos de suelos bajos, profundos, húmedos y fértiles del litoral oeste, paraje Costas de Sacra donde permaneció el resto de su vida. El animal convivía con bovinos que se encontraban en buenas condiciones de salud pastoreando en un potrero con zona de bañados y con costa al arroyo Sacra.

El 3 de marzo del año 2017 se constató que la yegua presentaba en la zona ventral del abdomen, una lesión alopécica circular de unos 8 a 10 cm de diámetro y 3 cm de profundidad aproximadamente. A su vez, se observó presencia de miasis. Por decisión de los propietarios, se aplicó vía tópica en la lesión un antimiasico, repitiendo el procedimiento una vez por día durante 10 días seguidos (Figura 28).



Figura 28. Equino. Lesión a nivel de abdomen ventral.

El 10 de marzo del mismo año, al notar que no había mejoría, se realizó la consulta con un veterinario que concurrió al predio e indicó tratamientos convencionales con antimiásico y antibiótico.

El 5 de abril al ver que la lesión no solo no mejoraba, sino que había aumentado notoriamente de tamaño, se comenzó a realizar lavados en la herida con un antiséptico y desinfectante yodado, que se aplicó hasta el día de la cirugía.

Debido a que la lesión con el transcurso de los días no disminuía de tamaño, el 8 de abril, el veterinario volvió a concurrir al predio y decidió realizar una biopsia. Las muestras fueron acondicionadas en formol bufferado al 10% y enviadas al Laboratorio Regional Noroeste DILAVE "Miguel C. Rubino" para estudio de anatomía patológica. El día 18 del mismo mes se extrajo una muestra de sangre para hemograma. La muestra se procesó en el laboratorio C.E.B. ubicado en el departamento de Paysandú, utilizando el equipo hematológico SFRI H-18.

El animal desmejoró paulatinamente de estado. La lesión continuó aumentando progresiva y significativamente de tamaño. Alcanzó a medir aproximadamente unos 30 cm de diámetro, era pruriginosa con continua secreción fibrinosanguinolenta (Figura 29).



Figura 29. Equino. Lesión a nivel de abdomen ventral. Se observa continua secreción fibrinosanguinolenta.

Con un informe del laboratorio de que se trataba de un proceso inflamatorio proliferativo, crónico, compatible con pitiosis, el veterinario resolvió realizar cirugía para extraer el tejido afectado. En primer lugar, se realizó la tranquilización del animal utilizando Acepromacina (0,06 mg/kg de peso vivo intravenoso). Luego de 20 minutos se procedió a la sedación y relajación muscular con Xilacina al 10% (0,5 mg/kg de peso vivo intravenoso). Transcurridos cinco minutos, se administró vía intravenosa en bolo, Tiopental sódico (1 gr diluido en 9 cc de suero) como hipnótico para el derribo e

inducción del sueño. Por último, el mantenimiento de la anestesia se efectuó alternando cada 20 minutos Tiopental y Xilacina al 10% (0,25 mg/kg intravenoso) al notar movimientos musculares.

El animal murió luego de la cirugía, procediéndose a realizar la necropsia. Parte del material obtenido se acondicionó en formol bufferado al 10% y el resto de las muestras se enviaron refrigeradas dada la proximidad del predio con el laboratorio (2,3 km.).

6.3. Datos climáticos

Los datos climáticos locales fueron obtenidos de los registros de la Estación Meteorológica perteneciente a Estación Experimental Mario A. Cassinoni (EEMAC) de la Facultad de Agronomía de la Universidad de la República, ubicada a 4 km del predio.

Se solicitaron también al Instituto Uruguayo de Meteorología (Inumet) los registros históricos de temperaturas y precipitaciones del Departamento de Paysandú del período 1987 a 2017.

6.4. Histopatología e inmunohistoquímica

Los materiales fueron incluidos en parafina, seccionados a 5 μm y coloreados por la técnica de rutina, hematoxilina-eosina (H&E) (AFIP, 1995). Se realizó también una tinción argéntica (Grocott) para detección de morfologías fúngicas (AFIP, 1995).

Para la detección de *P. insidiosum* en los cortes histológicos de las lesiones se utilizó la técnica de inmunohistoquímica (IHQ). Esta técnica fue realizada en el Laboratorio de Patología de la Facultad de Veterinaria, Universidad Federal de Pelotas, Brasil. Se bloqueó la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3%, seguido por una recuperación antigénica con tripsina al 1% a 37°C por 10 min y buffer citrato (pH 6.0) por 2 min en microondas. El bloqueo de las reacciones inespecíficas fue realizado con solución de caseína al 5%, por 20 min. Las láminas se sometieron al anticuerpo primario monoclonal anti-*P. insidiosum* 1:100, durante 60 min a 37°C. Se utilizó el anticuerpo secundario biotinilado y el complejo estreptavidina-peroxidasa 5 (MACH4 Universal HRP-Polymer Detection System, BIOCARE, EU), incubados a temperatura ambiente por 30 min y marcados con tetracloruro de 3-3'diaminobenzidina 5 (DAB). Las secciones fueron contra coloreadas con hematoxilina de Harris.

6.5. Aislamiento e identificación del agente

El aislamiento se realizó en Laboratorio Regional Noroeste a partir del material refrigerado debido a la proximidad del predio con el laboratorio. Se lavaron fragmentos de "kunkers" y de tejido conjuntivo con una solución de benzilpenicilina y estreptomycin. Posteriormente fueron sembrados en SDA (Agar Sabouraud Dextrosa) (BIO-RAD, EU) y agar levadura al 0.1% e incubados a 37°C. Para la verificación del desarrollo de micelios los cultivos fueron observados a intervalos de 24 horas durante 5 días. Tras obtener el aislamiento se procedió a realizar la caracterización morfológica de las hifas, que se realizó en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad Federal de Pelotas, Brasil; para ello se empleó la técnica de zoosporogénesis descrita por Mendoza y Prendas (1988).

6.6. Caracterización molecular

La caracterización molecular se llevó a cabo en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Federal de Santa María, Brasil. Se cultivó el aislamiento en 150 mL de caldo Sabouraud (2% de glucosa - 1% de peptona) y se incubó bajo agitación (120 rpm) a 37°C. Transcurridos cinco días el micelio fue recogido por filtración, lavado con agua estéril y almacenado en ultra freezer a - 80°C. El ADN fue extraído de acuerdo con el protocolo descrito por Möller, et al. (1992) con modificaciones (Klassen, Balcerzak, de Cock, 1996). Los aislamientos congelados fueron macerados en buffer de lisis (2-β mercaptoetanol, SDS 2%), CTAB 10% y NaCl 5 N, seguido de la extracción fenólica. El ADN total fue resuspendido en TE estéril y almacenado a - 80°C. Las concentraciones de ADN total se determinaron utilizando espectrofotometría. Se llevaron a cabo dos reacciones de PCR-anidado realizadas empleando cebadores para las regiones ITS. En primera instancia, la amplificación de los segmentos génicos de la región ITS (ITS1, 5.8s rARN e ITS2 del rADN) fue realizada por PCR, utilizando los cebadores universales ITS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') e ITS4 (5'-CTCCGTCAATTCCTTTAAG-3') (White et al., 1990). Las reacciones se realizaron en un volumen total de 50 µL, conteniendo 20 pmol de cada cebador, 1,25 unidades de Taq DNA polimerasa (Invitrogen, USA), 200µM de deoxinucleotideos (dNTP), 1 X del buffer de enzima 10 X, 1,5 mM MgCl₂, y 200 ng de las muestras de ADN. Las amplificaciones se realizaron utilizando termociclador PTC-100 (Programable ThermalController, MJ Research, EU), con un perfil de ciclo: 94 °C por 5 min, y 30 ciclos de 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min y 72 °C por 2 min, finalizando con 72 °C por 10 min. Posteriormente, una segunda reacción de PCR fue realizada empleando los cebadores para la región ITS1, específicos para *P. insidiosum* (Grooters y Gee, 2002). En esta reacción se procedió como cita Botton, et al. (2011), empleando una alícuota (5 µL) de los productos de la reacción anterior (incluyendo controles positivos y negativos) que fueron empleados como molde para los iniciadores específicos de *P. insidiosum*: PI1 (5'-TTCGTCTGAAGCGGACTGCT-3') y PI2 (5'-GCCGTACAACCCGAGAGTCATA-3') (Grooters y Gee, 2002). Las reacciones de PCR se realizaron en las mismas condiciones descritas por Botton, et al. (2011) y en los siguientes parámetros de ciclo: desnaturalización inicial a 94°C durante extensión a 72°C durante 30 seg, extensión final a 72°C durante 10 min. Una alícuota de 10 µL de cada producto de ambas reacciones de PCR fue sometida a electroforesis en gel de agarosa al 2%, coloreadas con bromuro de etidio y visualizadas bajo luz ultravioleta. Después de la verificación, los productos fueron purificados por el kit 174 PureLink (Invitrogen, EU) y los productos de PCR generados fueron enviados a secuenciar empleando el secuenciador automático MegaBACE500 empleando el kit DYEnamic ET (Amersham, RU). Como control positivo de la reacción se utilizó la cepa estándar de *P. insidiosum* CBS101555 y como control negativo agua ultra pura.

7. RESULTADOS

7.1. Datos del establecimiento y condiciones ambientales

El establecimiento donde se registró el caso comprendía una superficie de 18 hectáreas y finalizaba en una planicie inundable contigua al arroyo Sacra. En la Figura 30 se representa un mapa del predio con su empotramiento y las curvas de nivel, que indican la posición topográfica correspondiente a una situación de bajo en donde se encontraba el animal.

De acuerdo a la clasificación de suelos del Uruguay (MGAP, 1976) cuenta con suelos 03.40 con un índice de productividad Coneat 96. Estos suelos se corresponden con las planicies de arroyos del litoral oeste comprendidas en las regiones de la formación Fray Bentos. Suelos que además de presentarse en el departamento de Paysandú, pueden encontrarse también en Río Negro, Soriano y Colonia. El material geológico está asociado a los cursos de agua y corresponde a sedimentos limo arcilloso y sedimentos aluviales de texturas variables y estratificadas. Las planicies presentan mesorrelieve, ocurriendo en los planos altos una asociación de Brunosoles Eutricos Lúvicos (Praderas Pardas máximas y planosólicas), de color pardo oscuro, textura franco limosa, fertilidad alta y drenaje imperfecto; y Solonetz Ocrico, de color pardo grisáceo claro, textura franco limosa, fertilidad muy baja y drenaje imperfecto. El uso es pastoril con vegetación de parque, con árboles de densidad variable (Universidad de la República, Facultad de Ciencias. (2021); Uruguay country information. (s.f.)).

Previo al año 1985 el establecimiento tuvo fuertes antecedentes agrícolas en su totalidad. A partir de ese año se abandona la agricultura y se comienza a implementar la ganadería bajo un régimen de pastoreo rotativo.

En cuanto a la caracterización florística, se corresponde con una sucesión vegetal constituida fundamentalmente por *Paspalum notatum*, *Schizachyrium microstachyum*, *Nassella neesiana*, *Piptochaetium stipoides*, *Piptochaetium montevidense*, *Lolium multiflorum*, *Lotus glaber*, *Cynodon dactylon* y *Paspalum dilatatum*. (Com. Pers. Ing. Ag. Marcelo Pereira Machín).

El área riparia está conformada por una franja de monte galería nativo que provee de sombra a los animales. Se recorrió dos veces todo el potrero donde se encontraba la yegua. Los recorridos se realizaron los días 28 de abril y 5 de mayo del año 2017. En ambas ocasiones se observó abundante presencia de plantas acuáticas del tipo nenúfares.

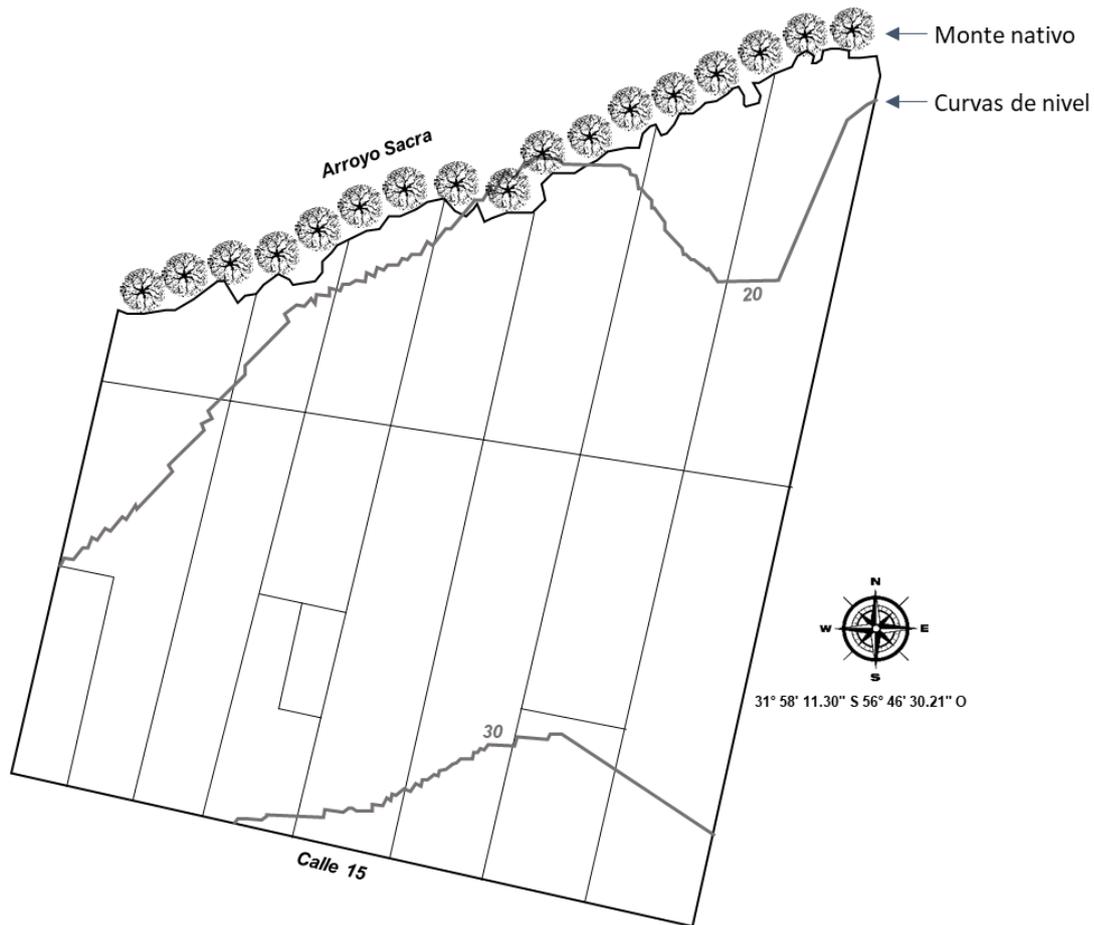


Figura 30. Mapa del predio con división de potreros y curvas de nivel.

7.2. Datos clínicos

Equino raza Criolla, pelo gateado, sexo hembra, de 24 años de edad. El 3 de marzo del año 2017 se le observó una lesión de color amarillento, circular, ulcerada en la piel de la zona ventral del abdomen, de 8 cm de diámetro y 3 cm de profundidad con presencia de miasis. A pesar de que el animal mantuvo el apetito y las grandes funciones normales (micción y defecación), comenzó a desmejorar y perder peso rápidamente manifestando prurito en la región afectada. A su vez, la masa de tejido empezó a aumentar de tamaño rápidamente, triplicando su tamaño en 30 días (Figura 31).



Figura 31. Equino. Estado de emaciación con presencia de lesión a nivel de abdomen ventral.

La biopsia fue realizada el 8 de abril. Arrojó un diagnóstico histopatológico de un proceso inflamatorio proliferativo, crónico, compatible con pitiosis. El día 18 del mismo mes, se efectuó un hemograma que destacó anemia macrocítica, leucocitosis moderada y neutrofilia con eosinofilia. La lesión ventral a nivel de piel había aumentado de tamaño significativamente (30 cm de diámetro y 8 cm de espesor), exudando permanentemente un líquido viscoso de color amarillo (Figura 32). Se resolvió entonces, el 28 de abril, que se llevara a cabo la extirpación quirúrgica. El 5 mayo se realizó la cirugía. El animal muere por paro respiratorio después del acto quirúrgico, como consecuencia del estado de debilidad y anemia



Figura 32. Equino. Lesión a nivel de abdomen ventral exudando líquido viscoso serosanguinolento.

7.3. Datos climáticos

En los meses de enero y febrero del año 2017 previos a la detección clínica de la infección, se registraron temperaturas mayores a 32°C durante 22 días y constantes precipitaciones en el departamento (Figura 33 y 34).

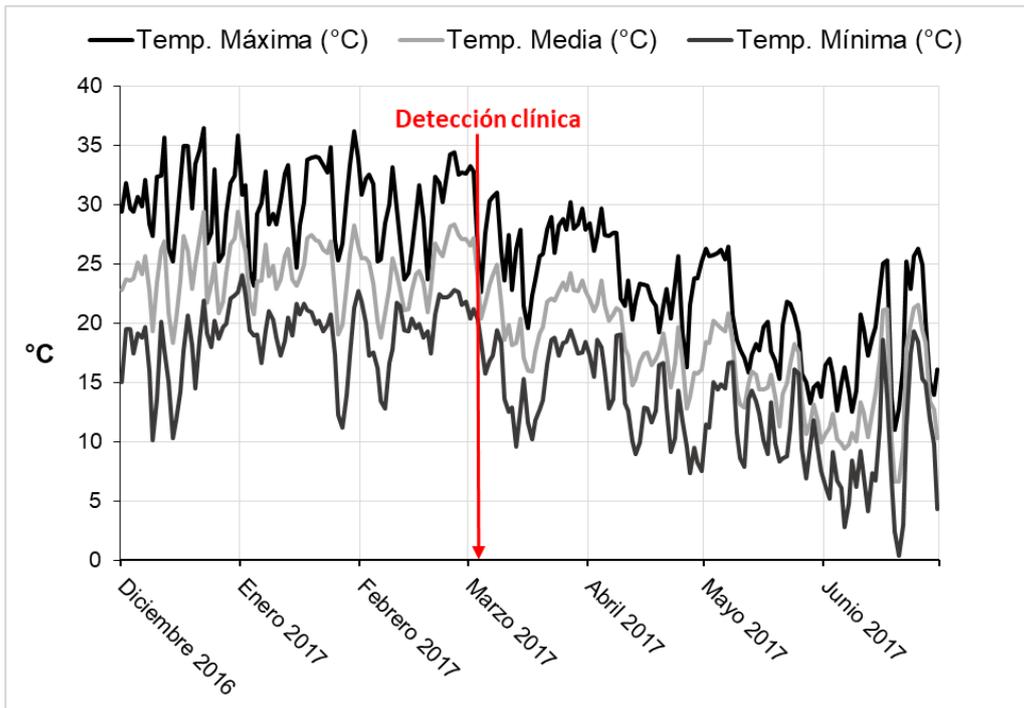


Figura 33. Gráfico de temperaturas máximas, temperaturas medias y temperaturas mínimas del período comprendido entre diciembre del año 2016 y junio del año 2017 (EEMAC).

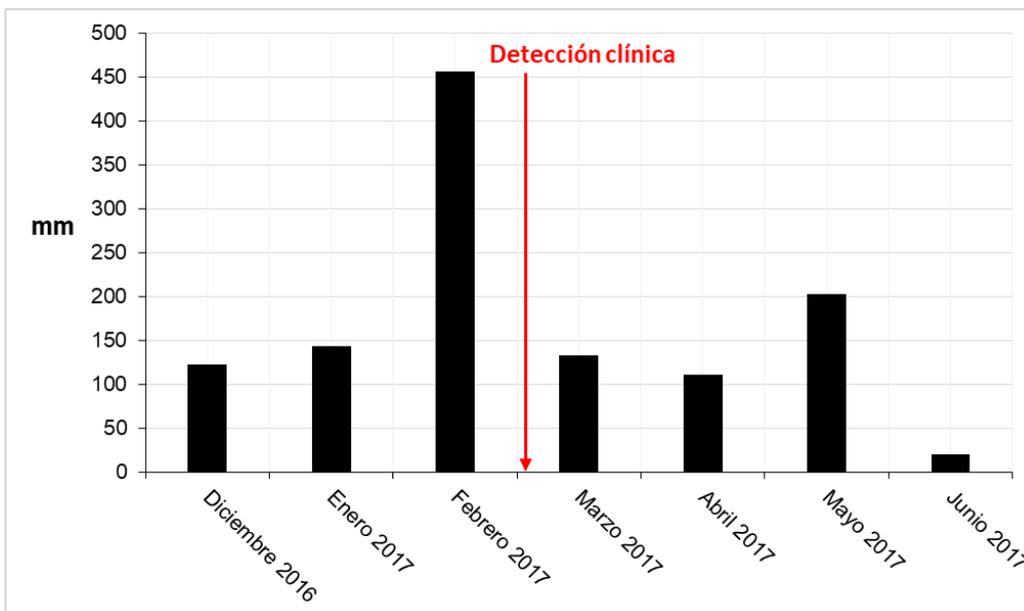


Figura 34. Gráfico de precipitaciones mensuales totales del período comprendido entre diciembre del año 2016 y junio del año 2017 (EEMAC).

Comparando los registros locales con los registros históricos de 30 años (1987- 2017) brindados por el Instituto Uruguayo de Meteorología (Inumet), en los meses previos a la presentación del caso (enero y febrero) las precipitaciones estuvieron por encima de la media y la temperatura alcanzó una máxima necesaria para la proliferación del agente (30 a 40°C) (Figura 35 y 36).

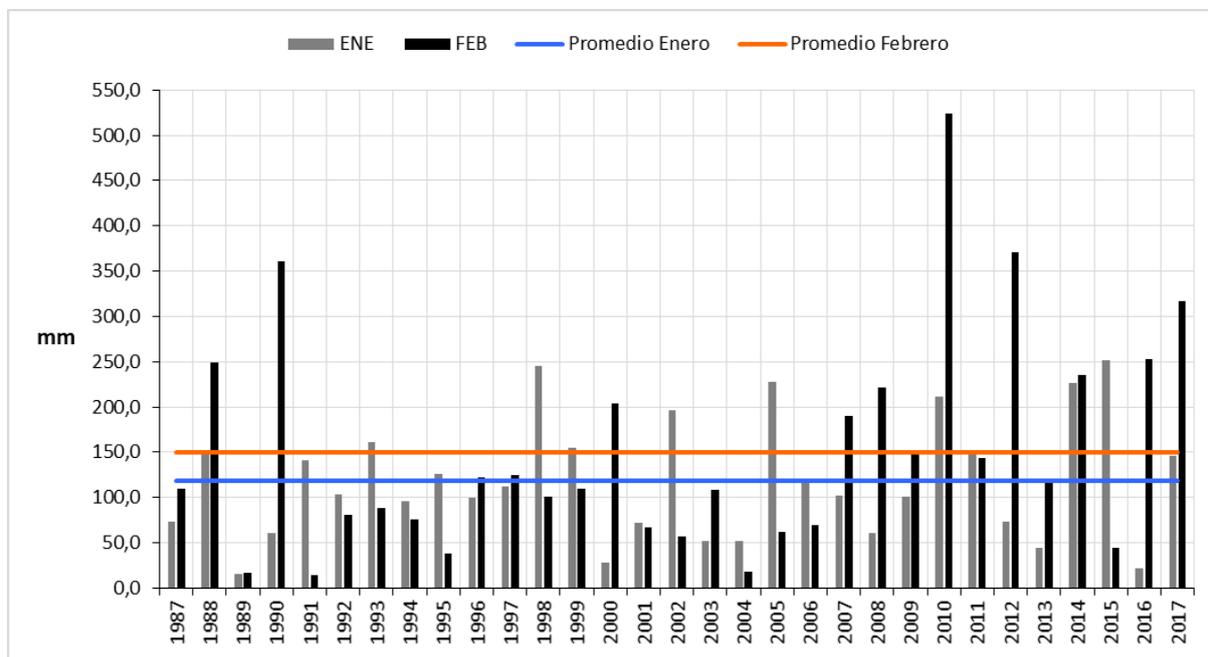


Figura 35. Gráfico de precipitaciones totales registradas en los meses de enero y febrero en el período comprendido entre los años 1987 a 2017 (Inumet).

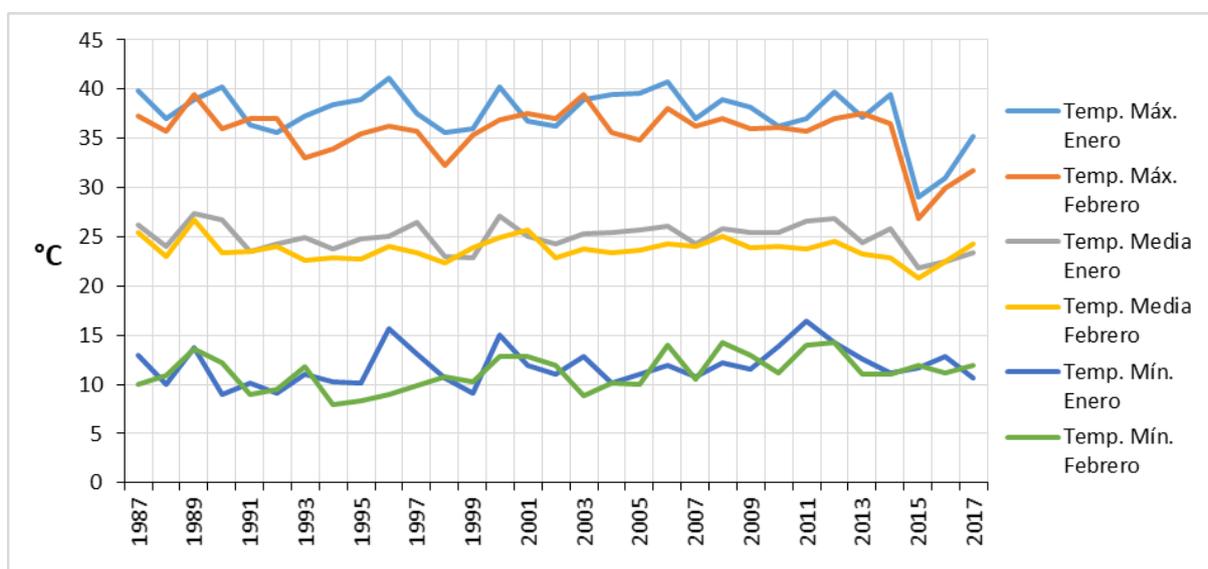


Figura 36. Gráfico de temperaturas máximas, medias y mínimas registradas en los meses de enero y febrero en el período comprendido entre los años 1987 a 2017 (Inumet).

7.4. Hallazgos macroscópicos

En la zona ventral del abdomen, la piel se presentaba húmeda, ulcerada, exudando líquido serosanguinolento. Se extrajo una masa de tejido con un peso de 3,337 Kg y con las siguientes dimensiones: 40 cm de largo por 25 cm de ancho por 13 cm de espesor. Al corte se observó abundante proliferación de tejido conjuntivo, de coloración amarillenta, que abarcaba piel y subcutáneo; infiltrando músculo del recto abdominal y la vaina del recto; con múltiples formaciones blanco-amarillentas de textura caseosa, tipo coral ("kunkers") (Figura 37 y 38).

En la necropsia del animal se destacaba severo edema y congestión pulmonar, como también hemorragias difusas en el miocardio, sin otros hallazgos de significación.

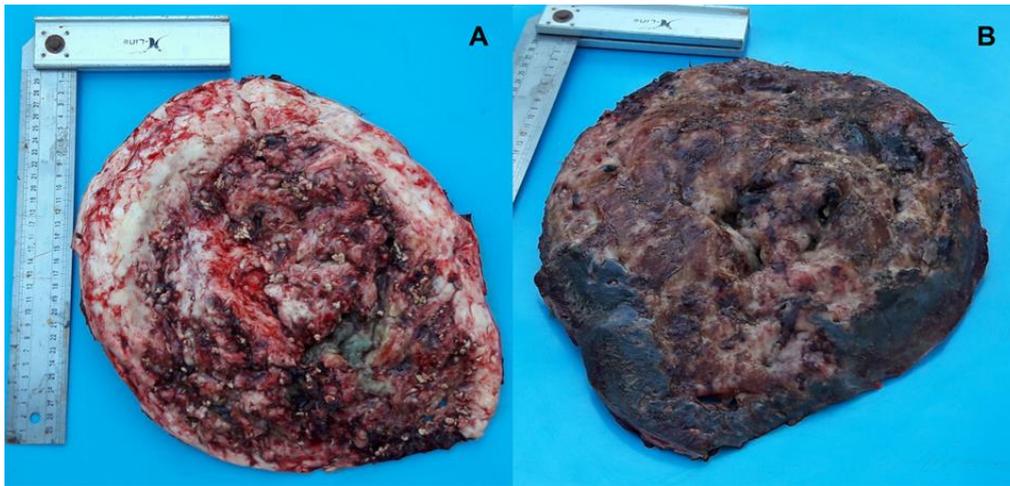


Figura 37. Equino. A: Tejido extirpado en su cara adyacente a la pared abdominal. Se observa abundante tejido de granulación, extensas áreas de fibrosis y focos amarillentos de textura caseosa ("kunkers"). B: Tejido extirpado, cara superficial.

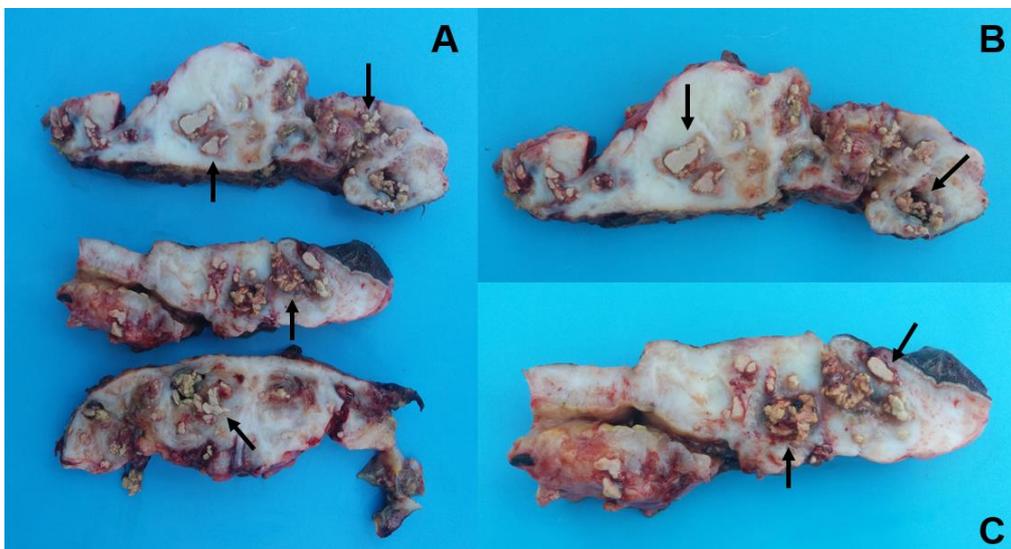


Figura 38. Equino. A, B y C: Cortes transversales del tejido extirpado. Tejido de granulación, áreas multifocales de necrosis con contenido supurativo hemorrágico y concreciones blanco-amarillentas ("kunkers") (flechas).

7.5. Histopatología e inmunohistoquímica

Al examen histopatológico de la piel del abdomen donde se encontraba la lesión, se observó extensa ulceración de la epidermis. En dermis superficial y profunda, se visualizó proliferación de tejido conjuntivo difusa, neovascularización, áreas multifocales de necrosis rodeada por abundantes polimorfonucleares y macrófagos. Los focos necróticos que corresponden a los “kunkers”, consisten en una densa colección de eosinófilos con núcleos pobremente definidos y escasas trabéculas de colágeno degenerado. En el tejido conjuntivo se encontró un infiltrado de eosinófilos difuso y en menor número de plasmocitos. Se observó la presencia de hifas coloreadas positivamente con la coloración argéntica de Grocott dentro de las áreas de necrosis (Figura 39). La técnica de inmunomarcación (IHQ) en los cortes histológicos fue positiva a *P. insidiosum* (Figura 40).

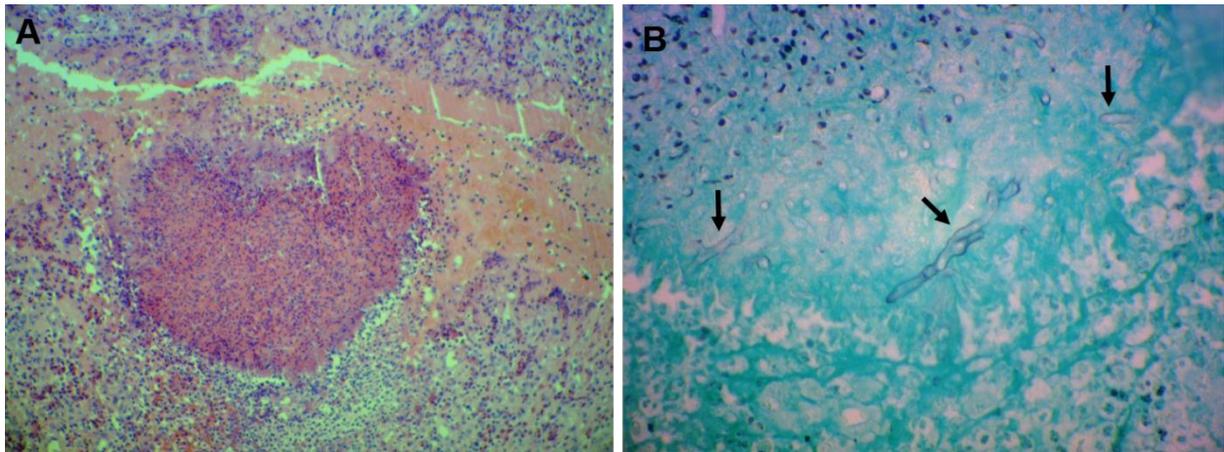


Figura 39. Equino. Piel. A: Hematoxilina y eosina (H-E) 100X. Foco de necrosis rodeada por polimorfonucleares y macrófagos. Se observan también en el tejido conjuntivo un infiltrado difuso de eosinófilos. B: Grocott, 400X. Presencia de hifas (flechas) en lesión de subcutáneo. (Schanzembach et al., 2019).

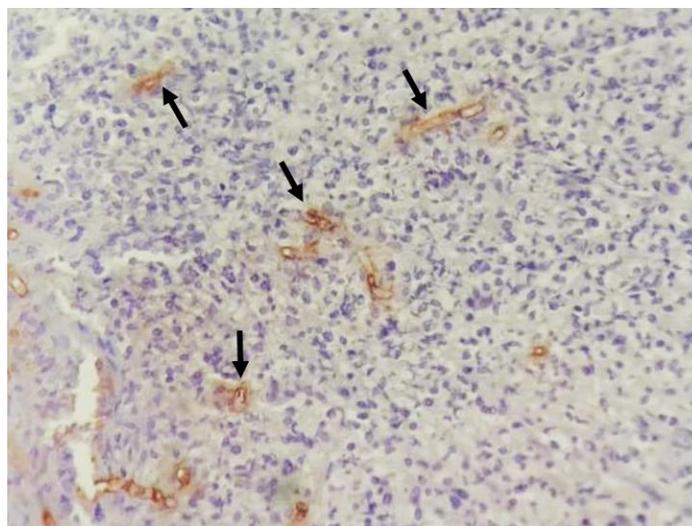


Figura 40. Equino. Piel. Inmunohistoquímica. DAB, 100X. Marcación positiva a *P. insidiosum* (flechas). (Schanzembach et al., 2019).

7.6. Aislamiento e identificación

Después de incubar “kunkers” durante 48 horas a 37°C en agar levadura al 0,1%, se visualizó el crecimiento de un micelio aéreo transparente, corto y delicadamente radiado. Por otro lado, en el agar Sabouraud se observó el desarrollo de un micelio radiado, exuberante y blanquecino. Al observar estos crecimientos microscópicamente se reveló la presencia de hifas cenocíticas con ramificaciones perpendiculares laterales en ángulo recto. La zoosporogénesis se obtuvo tras tres horas de incubación a 37°C.

Observando microscópicamente los fragmentos de gramíneas se reveló la presencia de hifas con formación de vesículas que posteriormente dieron origen a zoosporangios en sus extremos. En el interior de los zoosporangios se reveló la formación de las zoosporas. Éstas presentaban movimientos rápidos de sus flagelos, provocando la ruptura de la membrana del zoosporangio y su posterior liberación al medio de inducción. Los zoosporas liberadas exhibían una forma ovoide y nadaban en diferentes direcciones a través de movimientos de rotación alrededor de su propio eje. Posteriormente, tras cesar sus movimientos, se volvían globosas y emitían tubos germinativos (Figura 41).

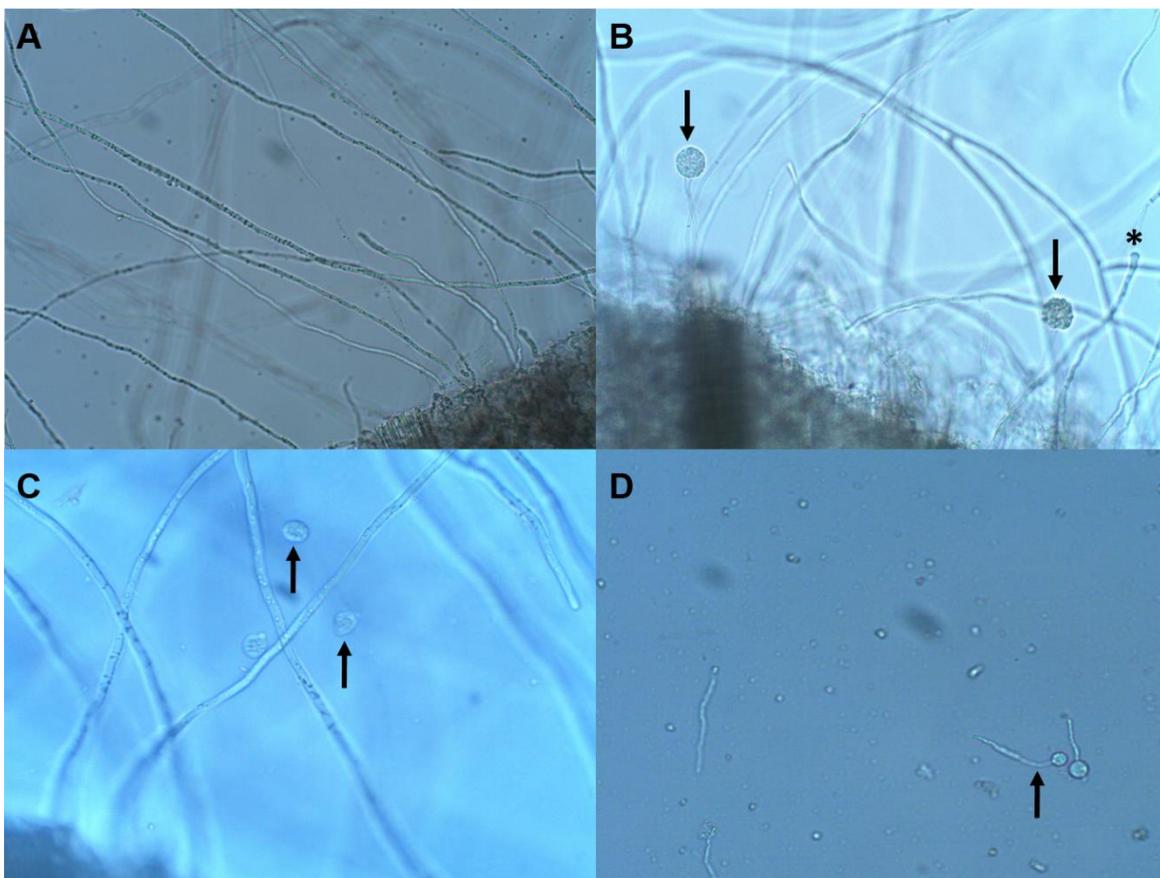


Figura 41. Zoosporogénesis in vitro de *P. insidiosum*, 3 horas de incubación a 37°C. A: 20X. Fragmentos de gramínea (*Paspalum notatum*) colonizados por hifas de *P. insidiosum*. B: 20X. Presencia de vesícula (asterisco) en la extremidad de la hifa e esporangios conteniendo zoosporas en su interior (flechas) C: 40X. Zoosporas con forma ovoide (flechas). D: 20X. Zoosporas emitiendo tubos germinativos (flecha). (Schanzembach et al., 2019).

7.7. Caracterización molecular

En la reacción de PCR-anidado se obtuvieron fragmentos de ~800pb generados con los cebadores universales (ITS1 y ITS4). En la segunda reacción de PCR se obtuvieron amplicones de ~105pb generados con los cebadores específicos de *P. insidiosum* (PI1 y PI2). Las secuencias de ADN de las regiones ITS1, 5,8r RNA e ITS2 se compararon con las secuencias depositadas en GenBank (registro MF767408), confirmando, con 100% de homología, al aislamiento como *P. insidiosum* (Figura 42).

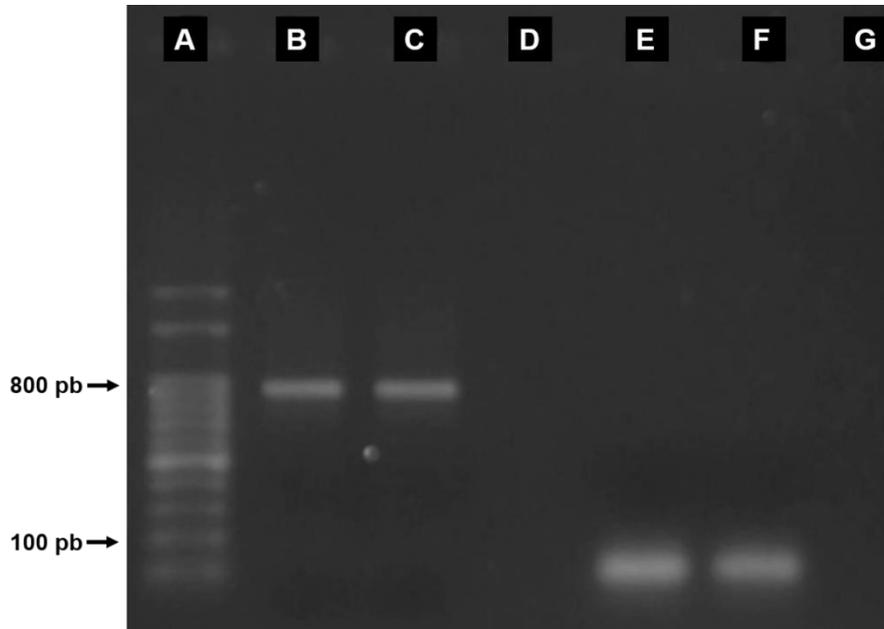


Figura 42. PCR-anidado en gel agarosa A: Marcador de peso molecular 100pb DNA ladder. B: aislamiento de *P. insidiosum*, fragmentos de ~800pb generados con los cebadores (ITS1 e ITS4); C: *P. insidiosum* CBS 101155 (control positivo); D: agua ultra pura (control negativo); E: aislamiento de *P. insidiosum* con amplicones de ~105pb generados con los cebadores específicos de *P. insidiosum* (PI1 y PI2). F: *P. insidiosum* CBS 101155 (control positivo); G: agua ultra pura (control negativo). (Schanzembach et al., 2019).

8. DISCUSIÓN

En este trabajo de tesis se confirma el diagnóstico de pitiosis mediante el aislamiento de *P. insidiosum*, la histopatología e inmunohistoquímica de las lesiones y la secuenciación genómica de los genes ITS1 e ITS2. Este trabajo es el primer caso reportado en la región litoral oeste del país. La región sureste del Uruguay al tener un predominio de áreas con suelos pobremente drenados y cuerpos de agua estacionarios, se encuentra predispuesta a la presentación de esta patología. Tomando en cuenta que el animal se encontraba pastando sobre potreros de campos bajos, inundables, con costas a un curso de agua, podríamos plantearnos que la enfermedad puede desarrollarse en cualquier área del país que presente suelos de drenaje pobre (Dutra 2012; García et al., 2018; Marcolongo et al., 2012; Mendoza et al., 1996; Viegas Sallis, Brayer Pereira y Buss Raffi, 2003).

Al comparar las precipitaciones y temperaturas registradas en los meses previos a la observación del cuadro clínico, con los registros históricos de la zona, se observó que las precipitaciones estuvieron por encima de la media histórica. La temperatura alcanzó una máxima necesaria para la proliferación del agente (mayor a 30°C). Estas condiciones probablemente permitieron el desarrollo y la presencia de *P. insidiosum* en los potreros donde se encontraba el animal. Que además de ser inundables eran suelos de drenaje pobre. Otro hallazgo en el establecimiento, fue la presencia de plantas acuáticas del tipo nenúfares en el área riparia. Estas forman parte del ciclo de vida y colaboran en la propagación del patógeno (Mendoza et al., 1993; Presser et al., 2015)

La ubicación de la lesión, en la pared ventral del abdomen, podría estar relacionada con los períodos de descanso, donde el animal se echaba permaneciendo en decúbito esternal durante tiempo prolongado. De esta forma podría haberse incrementado el reblandecimiento de la piel y la formación de heridas en la zona, donde posiblemente haya penetrado e ingresado el agente. En los equinos las lesiones producidas por esta patología generalmente se ubican en aquellas partes bajas, que permanecen en contacto directo con agua contaminada y pueden brindar acceso a las zoosporas de *P. insidiosum* (Gaastra et al., 2010; Mendoza y Alfaro, 1986).

Con respecto a la evolución clínica, el cuadro fue de evolución crónica con aumento progresivo del tamaño de la lesión. Con el resultado de la biopsia compatible con pitiosis, se decidió realizar la extirpación total de la lesión por cirugía. Cabe destacar que esta decisión se tomó por razones afectivas, a pesar del mal estado general del animal y del dato del hemograma que indicaba anemia.

De acuerdo con Johnston y Henderson (1974), en equinos, además de observar un proceso granulomatoso característico en los estadios crónicos de la enfermedad, se observan focos de necrosis compuesta por eosinófilos, moderado colágeno degenerado y pequeños vasos necrotizados. El aislamiento del agente exclusivamente de los “kunkers” es otro de los factores que dan indicio de una evolución crónica de la infección en el animal. Esto se debe a que en casos crónicos de pitiosis, el único lugar donde se pueden hallar las hifas de *P. insidiosum* es en los “kunkers”. Asimismo, la infiltración de los planos musculares encontrados en la necropsia también indica un estado expansivo y de evolución en el tiempo (Gaastra et al., 2010; Mendoza y Alfaro, 1986).

Los hallazgos histopatológicos mantuvieron concordancia con aquellos descritos en casos de pitiosis equina. Estos hallazgos, se caracterizaron por la presencia de focos de degranulación de eosinófilos y mastocitos alrededor de las hifas del agente. Este tipo de reacción inmune contribuye al progreso de la enfermedad pudiendo volverse crónica. Los resultados del hemograma indicaban un marcado incremento de eosinófilos en la sangre siendo una respuesta característica de estas infecciones en equinos. Los bovinos, a diferencia de los equinos, por lo general curan espontáneamente. Esta cura espontánea se le atribuye al tipo de respuesta inflamatoria dada por las células mononucleares que conforman y predominan en los granulomas. Las células mononucleares destruyen las hifas de *P. insidiosum* y colaboran en la cura de estas lesiones. En los equinos, los eosinófilos son quienes predominan en la reacción inflamatoria, forman los “kunkers” alrededor de las hifas dificultando así la eliminación del agente y la cura de las lesiones. El hecho de que los bovinos tengan una baja susceptibilidad a este agente, podría ser una explicación de por qué no han sido reportados casos de pitiosis en esta especie en Uruguay (Santurio, Alves et al., 2006; Silva do Carmo y Riet- Correa, 2014).

El análisis macro e histopatológico de la lesión sumado al aislamiento y posterior identificación molecular del agente, permiten obtener un diagnóstico preciso de la pitiosis. En el caso de no poder aislar al agente por medios microbiológicos es importante apoyarse en la realización de pruebas inmunohistoquímicas para la detección de antígenos específicos. El aislamiento de *P. insidiosum* por sí solo no permite la identificación adecuada del agente dado que comparte características morfológicas con los hongos filamentosos *Basidiobolus ranarum* y *Conidiobolus coronatus*. Éstos además son causantes de lesiones similares en localizaciones anatómicas que coinciden con las producidas por *P. insidiosum* (Chaffin et al., 1995; Headley y Arruda, 2004).

El cultivo microbiológico, el estudio histopatológico y las pruebas inmunohistoquímicas son útiles para el diagnóstico de la pitiosis, pero pueden resultar un tanto inconclusas y difíciles. Es la caracterización molecular con posterior secuenciación de ADN de las regiones ITS1, 5,8r RNA e ITS2 la técnica más precisa y rápida para lograr un diagnóstico confirmatorio de *P. insidiosum* (Botton et al., 2011)

En equinos, cuando se presentan lesiones con estas características se debe realizar un diagnóstico diferencial con otras patologías, como son la basidiobolomycosis; la conidiobolomycosis; la habronemiasis; sarcoides y otras neoplasias equinas; granulomas bacterianos o fúngicos; reacciones de cuerpos extraños y tejidos de granulación exuberantes. En estos casos, el estudio histopatológico juega un rol fundamental para su diagnóstico. Por otra parte, detectar y diagnosticar de forma temprana esta patología es de suma importancia para obtener éxito con el tratamiento y un pronóstico favorable. Para la cura de la pitiosis cutánea equina se han utilizado tres formas de tratamientos; de manera aislada o en conjunto. La extirpación quirúrgica del tejido afectado, el uso de antimicóticos y la inmunoterapia. Se cree que el mejor tratamiento contra *P. insidiosum* podría ser aquel que combine la vacunación con el tratamiento quirúrgico (75% de eficacia) o la vacunación con antifúngicos (Cardona et al., 2013b; Chaffin et al., 1995; Gaastra et al., 2010; Headley y Arruda, 2004; Mendoza et al., 1996; Mendoza y Newton, 2005; Sallis et al., 2003; Santurio, Alves et al., 2006).

9. CONCLUSIONES

Se confirma el diagnóstico de pitiosis cutánea equina por primera vez en el litoral oeste del Uruguay. Diagnóstico que se logra a través del estudio microbiológico (aislamiento), histopatológico e inmunohistoquímico, así como también a técnicas moleculares.

Si bien en el litoral oeste del Uruguay no hay predominio de áreas extensas con suelos bajos, inundables, de pobre drenaje, como sucede en el sureste; basta contar con un área pequeña con drenaje pobre donde se dé la tríada epidemiológica (agente, huésped y medio ambiente) y que se reúnan las condiciones de temperatura y humedad, para hacer posible el mantenimiento, proliferación y expansión del agente. Por lo tanto ante lesiones a nivel de piel de carácter proliferativas y de evolución crónica en equinos, se debe incluir a la pitiosis en el diagnóstico diferencial.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acero- Mondragón, E.J., Botero Rosas, D.A., y Maldonado Arango, M.I. (2013). Micosis por *Pythium Insidiosum* primer caso con diagnóstico definitivo en Colombia. *NOVA*, 11(19), 65-72.
- Alfaro, A.A., y Mendoza, L. (1990). Four cases of equine bone lesions caused by *Pythium insidiosum*. *Equine Veterinary Journal*, 22(4), 295-297.
- Allassia, M., Moroni, C., Angeli, E., Mazzini, R., Aguirre, F., Russi, N., ... Canal, A.M. (2016). Descripción de un brote de dermatitis piogranulomatosa en terneros en la provincia de Santa Fe. *Revista de medicina veterinaria (Buenos Aires)*, 97(3), 20.
- Austwick, P.K.C., y Copland, J.W. (1974). Swamp cancer. *Nature (Londres)*, 250, 84.
- Badenoch, P.R., Mills, R.A.D., Chang, J.H., Sadlon, T.A., Klebe, S., y Coster, D.J. (2009). *Pythium insidiosum* keratitis in an Australian child. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, 37(8), 806-809.
- Becegatto, D.B., Zanutto, M. de S., Cardoso, M.J.L., y Sampaio, A.J.S. de A. (2017). Pitiose equina: revisão de literatura. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, 20(2), 87-92.
- Berryessa, N.A., Marks, S.L., Pesavento, P.A., Krasnansky, T., Yoshimoto, S.K., Johnson, E.G., y Grooters, A.M. (2008). Gastrointestinal Pythiosis in 10 Dogs from California. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22,1065-1069.
- Bissonnette, K.W., Sharp, N.J.H., Dykstra, M.H., Robertson, I.R., Davis, B., Padhye, y A.A., Kaufman, L. (1991). Nasal and retrobulbar mass in a cat caused by *Pythium insidiosum*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 29(1), 39-44.
- Bosco, S. de M.G., Bagagli, E., Araújo, J.P., Candeias, J.M.G., Fabiano de Franco, M., Marques, M.E.A., ... Marques, S.A. (2005). Human Pythiosis, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 11(5), 715-718.
- Botton, S.A., Pereira, D.I.B., Costa, M.M., Azevedo, M. I., Argenta, J.S., Jesus, F.P.K., ... Santurio, J.M. (2010). Identification of *Pythium insidiosum* by Nested PCR in Cutaneous Lesions of Brazilian Horses and Rabbits. *Current Microbiology*, 62(4), 1225-1229.
- Brayer Pereira, D.I., Morais Santurio, J., Hartz Alves, S., Siqueira Argenta, J., Cavalheiro, A.S., y Ferreiro, L. (2008). Zoosporogênese in vitro entre isolados do oomiceto *Pythium insidiosum*. *Ciência Rural, Santa Maria*, 38(1), 143-147.
- Brown, C.C., y Roberts, E.D. (1988). Intestinal pythiosis in a horse. *Australian Veterinary Journal*, 65(3), 88-89.
- Cardona Álvarez, J.A., Vargas Vilorio, M., y Perdomo A., S.C. (2012). Frequency of presentation of bovine cutaneous pythiosis (*Pythium insidiosum*) in three cattle

- farms in Cordoba, Colombia. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 7(2), 47-54.
- Cardona Álvarez, J.A., Vargas Vilorio, M., y Perdomo Ayola, S.C. (2013a) Evaluación clínica e histopatológica de la pitiosis cutánea en burros (*Equus asinus*). *Revista de Medicina Veterinaria*, 25, 9-19.
- Cardona Álvarez, J., Vargas Vilorio, M., y Perdomo Ayola, S. (2013b) Pitiose cutânea em equinos: uma revisão. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 8(1), 104-113.
- Cardozo, R., Lezcano, F., Merlo, W., Rossiani, A., Insfran, R., Boehringer, S., ... Tártara, G. (2016). Pythiosis en un canino. Primer reporte de un caso en la provincia de Corrientes, Argentina. *Revista Veterinaria Argentina*, 33(344), 1-14.
- Chaffin, M.K., Schumscher, J., y McMullan, W. C. (1995). Cutaneous pythiosis in the horse. *Veterinary Clinics of North America, Equine Practice*, 11(1), 91-103.
- Chaiprasert, A., Samerpitak, K., Wanachiwanawin, W., y Thasnakorn, P. (1990). Induction of zoospore formation in Thai isolates of *Pythium insidiosum*. *Mycoses*, 33(6), 317-323.
- Connole, M.D. (1973). Equine phycomycosis. *Australian Veterinary Journal*, 49(4), 214-215.
- de Cock, A.W.A.M., Mendoza, L., Padhye, A.A, Ajello, L., y Kaufman, L. (1987). *Pythium insidiosum* sp. nov., the Etiological Agent of Pythiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 25(2), 344-349.
- do Carmo, P.M.S., Uzal, F.A., y Riet-Correa, F. (2020). Diseases caused by *Pythium insidiosum* in sheep and goats: a review. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 33(1), 20-24.
- dos Santos, C.E.P., Morais Santurio, J., y Marques, L.C. (2011). Pitiose em animais de produção no Pantanal Matogrossense. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 31(12), 1083-1089.
- Dutra, F. (2012). Pitiosis equina. *Archivo Veterinario del Este*, 4(1-2), 12-13.
- Dykstra, M.J., Sharp, N.J.H., Olivry, T., Hillier, A., Murphy, K.M., Kaufman, L., ... Pucheu-Haston, C. (1999). A description of cutaneous-subcutaneous pythiosis in fifteen dogs. *Medical Mycology*, 37(6), 427-433.
- Ferrari, A. (2012). *Caracterización y potencialidades del sector ecuestre en Uruguay* (Informe final). Recuperado de <https://docplayer.es/11022234-Caracterizacion-y-potencialidades-del-sector-ecuestre-en-uruguay-1.html>
- Fischer, J.R., Pace, L.W., Turk, J.R., Kreeger, J.M., Miller, M.A., y Gosser, H.S. (1994). Gastrointestinal pythiosis in Missouri Dogs: eleven Cases. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 6(3), 380-382.

- Fortin, J.S., Calcutt, M.J., y Kim, D.Y. (2017). Sublingual pythiosis in a cat. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 59(1), 1-5.
- Gaastra, W., Lipman, L.J.A., De Cock, A.W.A.M., Exel, T.K., Pegge, R.B.G., Scheurwater, J., ... Mendoza, L. (2010). *Pythium insidiosum*: An overview. *Veterinary Microbiology*, 146, 1–16.
- Gabriel, A.L., Kommers, G.D., Trost, M.E., Barros, C.S.L., Pereira, D.B., Schwendler, S.E., y Santurio, J.M. (2008). Surto de pitiose cutânea em bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 28(12), 583- 587.
- Galiza, G.J.N., da Silva, T.M., Caprioli, R.A., Barros, C.S.L., Irigoyen, L.F., Figuera, R.A., ... Kommers, G.D. (2014). Ocorrência de micoses e pitiose em animais domésticos, 230 casos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 34(3), 224-232.
- García, J.A., Balestí, S., Romero, A., Quinteros, M.C., y Dutra, F. (agosto, 2018). Cutaneous equine Pythiosis, clínico-pathological features and treatment. En *XI Reunión Argentina de Patología Veterinaria*. Universidad Nacional de la Plata, La Plata.
- Goad, M.E.P. (1984). Pulmonary Pythiosis in a Horse. *Veterinary Pathology*, 21(2), 261-262.
- Grecco F.B., Schild A.L., Quevedo P., Assis-Brasil N.D., Kommers G.D., Marcolongo-Pereira C., y Soares M.P. (2009). Pitiose cutânea em bovinos na região Sul do Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 29(11), 938-942.
- Grooters, A.M., y Gee, M.K. (2002). Development of a Nested Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection and Identification of *Pythium insidiosum*. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16(2), 147– 152.
- Grooters, A.M., Whittington, A., Lopez, M.K., Boroughs, M.N., y Roy, A.F. (2002). Evaluation of Microbial Culture Techniques for the Isolation of *Pythium Insidiosum* from Equine Tissues. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 14(4), 288-294.
- Grooters, A.M. (2003). Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. *Veterinary Clinics of North America, Small Animal Practice*, 4, 695-720.
- Headley, S.A., y Arruda Junior, H.N. (2004). Equine cutaneous pythiosis, a report of four cases. *Ciência Rural (Santa Maria)*, 34(1), 289-292.
- Helman, R.G., y Oliver, J. (1999). Pythiosis of the digestive tract in dogs from Oklahoma. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 35(2), 111-114.
- Hernandorena, M.A., y Jackson E. (2018). *Reporte de un caso de pitiosis cutânea en un equino* (Tesis de grado). Facultad de Veterinaria, UDELAR, Montevideo.
- Intaramat, A., Sornprachum, T., Chantrathonkul, B., Chaisuriya, P., Lohnoo, T., Yingyong, ... Krajaejun, T. (2016). Protein A/G-based immunochromatographic

- test for serodiagnosis of pythiosis in human and animal subjects from Asia and Americas. *Medical Mycology*, 54(6), 641-647.
- Jaeger, G.H., Rotstein, D.S., y Law, J. M. (2002). Prostatic Pythiosis in a Dog. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16(5), 598-602.
- Johnston, K. G., y Henderson, W. K. (1974). Phycomycotic granuloma in horses in the northern territory. *Australian Veterinary Journal*, 50, 105-107.
- Klassen, G.R., Balcerzak, M., y de Cock, A. (1996). 5S Ribosomal RNA gene spacers as species specific probes for eight species of *Pythium*. *The American Phytopathological Society*, 86(6), 581-587.
- Krajaejun, T., Imkhieo, S., Intaramat, A., y Ratanabanangkoon, K. (2009). Development of an Immunochromatographic Test for Rapid Serodiagnosis of Human Pythiosis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 16(4), 506-509.
- Krajaejun, T., Khositnithikul, R., Lerksuthirat, T., Lowhnoo, T., Rujirawat, T., Petchthong, T., ... Sullivan, T.D. (2011). Expressed sequence tags reveal genetic diversity and putative virulence factors of the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum*. *Fungal Biology*, 115(7), 683-696.
- Krajaejun, T., Kunakorn, M., Prachartam, R., Chongtrakool, P., Sathapatayavongs, B., Chaiprasert, A., ... Mootsikapun, P. (2006). Identification of a Novel 74-Kilodalton Immunodominant Antigen of *Pythium insidiosum* Recognized by Sera from Human Patients with Pythiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(5), 1674-1680.
- Krajaejun, T., Sathapatayavongs, B., Chaiprasert, A., y Srimuang, S. (2008). Do you know human pythiosis?. *Journal of Infectious Diseases and Antimicrobial Agents*, 25(1), 45-51.
- Krajaejun, T., Sathapatayavongs, B., Prachartam, R., Nitiyanant, P., Leelachaikul, P., Wanachiwanawin, W., ... Somkaew, S. (2006) Clinical and Epidemiological Analyses of Human Pythiosis in Thailand. *Clinical Infectious Diseases*, 43(5), 569-576.
- Kwon-Chung, K.J. (1994). Phylogenetic Spectrum of Fungi That Are Pathogenic to Humans. *Clinical Infectious Diseases*, 19(1), S1-S7.
- Lekhanont, K., Chuckpaiwong, V., Chongtrakool, P., Aroonroch, R., y Vongthongsri, A. (2009). *Pythium insidiosum* Keratitis in Contact Lens Wear: A Case Report. *Cornea*, 28(10), 1173-1177.
- Loreto, É.S., Alves, S.H., Santurio, J.M., Nogueira, C.W., y Zeni, G. (2012). Diphenyl diselenide in vitro and in vivo activity against the oomycete *Pythium insidiosum*. *Veterinary Microbiology*, 156(1-2), 222-226.
- Luis- León, J.J., Pérez, R.C., Vivas J. L., Mendoza L., y Alonso F. T. (2008). Confirmación de *Pythium insidiosum* como agente etiológico de la Granulomatosis Enzoótica Bovina mediante análisis de secuencia. *Salus*, 12(1), 205-215.

- Luis-León, J.J., y Pérez, R.C. (2011). Pythiosis: Una patología emergente en Venezuela. *Salus*, 15(1), 79-94.
- Marcolongo-Pereira, C., Viégas Sallis, E.S., Raffi, M.B., Brayer Pereira, D.I., Hinnah, F.L., Coelho, A.C.B., y Schild, A.L. (2012). Epidemiologia da pitiose equina na Região Sul do Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 32(9), 865-868.
- Márquez, A.A., Salas Y.J., Canelón J.L., Perazzo, Y., y Colmenárez, V. (2010). Descripción anatomopatológica de Pitiosis cutánea en equinos. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias (Universidad Central de Venezuela)*, 51(1), 37-42.
- Mendoza, L. (2010). Pythiosis. En, W.G. Merz y R.J. Hay (Ed.), *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections* (10ª ed., pp.1-18). Londres: Wiley.
- Mendoza, L., Ajello, L., y McGinnis M.R. (1996). Infection caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. *Medical Mycology*, 6, 151-164.
- Mendoza, L., y Alfaro, A.A. (1986). Equine pythiosis in Costa Rica: Report of 39 cases. *Mycopathologia*, 94(2), 123-129.
- Mendoza, L., Alfaro, A.A., y Villalobos, J. (1988). Bone lesions caused by *Pythium insidiosum* in a horse. *Medical Mycology*, 26(1), 5-12.
- Mendoza, L., Hernandez, F., y Ajello, L. (1993). Life Cycle of the Human and Animal Oomycete Pathogen. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(11), 2967-2973.
- Mendoza, L., Kaufman, L., y Standard, P.G. (1986). Immunodiffusion Test for Diagnosing and Monitoring Pythiosis in Horses. *Journal of Clinical Microbiology*, 23(5), 813-816.
- Mendoza, L., Kaufman, L., y Standard, P. (1987). Antigenic Relationship between the Animal and Human Pathogen *Pythium insidiosum* and Nonpathogenic *Pythium* Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 25(11), 2159-2162.
- Mendoza, L., y Marin, G.M. (1989). Antigenic relationship between *Pythium insidiosum* de Cock et al 1987 and its synonym *Pythium destruens* Shipton 1987. *Mycoses*, 32(2), 73-77.
- Mendoza, L., y Newton, J.C. (2005). Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum*. *Medical Mycology*, 43(6), 477-486.
- Mendoza, L., y Prendas, J. (1988). A method to obtain rapid zoosporogenesis of *Pythium insidiosum*. *Mycopathologia*, 104(1), 59-62.
- Miller, R.I. (1983). Investigations into the biology of three phycomycotic agents pathogenic for horses in Australia. *Mycopathologia*, 81(1), 23-28.
- Miller, R.I., y Campbell, R.S.F. (1982a). Clinical observations on equine phycomycosis. *Australian Veterinary Journal*, 58(6), 221-226.

- Miller, R.I., y Campbell, R.S.F. (1982b). Immunological studies on equine phycomycosis. *Australian Veterinary Journal*, 58(6), 227-231.
- Miller, R.I., y Campbell, R.S.F. (1983). Haematology of horses with phycomycosis. *Australian Veterinary Journal*, 60(1), 28-29.
- Miller, R.I., y Campbell, R.S.F. (1984) The Comparative Pathology of Equine Cutaneous Phycomycosis. *Veterinary Pathology*, 21(3), 325-332.
- Morton, L.D., Morton, D.G., Baker, G.J., y Gelberg, H.B. (1991) Chronic Eosinophilic Enteritis Attributed to *Pythium sp.* in a Horse. *Veterinary Pathology*, 28(6), 542-544.
- Patton, C.S., Hake, R., Newton, J., y Toal, R.L. (1996). Esophagitis Due to *Pythium insidiosum* Infection in Two Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 10(3), 139-142.
- Pedroso, P.M.O., Bezerra Jr. P.S., Pescador C.A., Dalto A.G.C., Costa G.R., Pereira D.I.B., ... Driemeier D. (2009). Diagnóstico imuno-histoquímico de pitiose cutânea em equinos. *Acta Scientiae Veterinariae*, 37(1), 49-52.
- Pereira, D.I.B., Schild, A.L., Motta, M.A., Figuera, R.A., Sallis, E.S.V., y Marcolongo-Pereira, C. (2010). Cutaneous and gastrointestinal pythiosis in a dog in Brazil. *Veterinary Research Communications*, 34(3), 301-306.
- Pérez, R.C., Luis-León, J.J., Vivas, J.L., y Mendoza, L. (2005). Epizootic cutaneous pythiosis in beef calves. *Veterinary Microbiology*, 109(1-2), 121-128.
- Pessoa, C.R.M., Riet-Correa, F., Pimentel, L.A., Garino, F., Dantas, A.F.M., Kommers, G.D., ... Reis-Júnior, J.L. (2012). Pythiosis of the digestive tract in sheep. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 24(6), 1133-1136.
- Presser, J.W., y Goss, E.M. (2015). Environmental sampling reveals that *Pythium insidiosum* is ubiquitous and genetically diverse in North Central Florida. *Medical Mycology*, 53, 674- 683.
- Química.es. (2021). ARN ribosómico. Recuperado de https://www.quimica.es/enciclopedia/ARN_ribos%C3%B3mico.html
- Rakich, P.M., Grooters, A.M., y Tang, K-N. (2005). Gastrointestinal pythiosis in two cats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17, 262-296.
- Reis, A., Marcolongo, C., Sallis, E.S.V., Bruhn, F.R.P., Faria, R.O., Schild, A.L., y Meireles, M.C.A. (2018). Epidemiologia das micoses, pitiose e micotoxicoses em equinos no sudeste do Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 38(6), 1110-1116.
- Rivierre, C., Laprie, C., Guiard, O., Bergeaud, P., Berthelemy, M., y Guillot, J. (2005). Pythiosis in Africa. *Emerging Infectious Diseases*, 11(3), 479-81.

- Salas, Y.J., Colmenares, V.R., Márquez, A.A., Luis-León, J.J., y Olivar, C. (2009). Estructura y ultraestructura de *Pythium insidiosum* en la pitiosis gastrointestinal canina. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 29(2), 117-121.
- Sallis, E.S.V., Pereira, D.I.B., y Raffi, M.R. (2003.) Pitiose cutânea em equinos: 14 casos. *Ciência Rural (Santa Maria)*, 33(5), 899- 903.
- Santurio, J.M., Alves, S.H., Pereira, D.B., y Argenta, J.S. (2006). Pitiose: uma micose emergente. *Acta Scientiae Veterinariae*, 34(1), 1-14.
- Santurio, J.M., Argenta, J.S., Schwendler, S.E., Cavalheiro, A.S., Pereira, D.I.B., Zanette, R.A., ... Colodel, E.M. (2008). Granulomatous rhinitis associated with *Pythium insidiosum* infection in sheep. *Veterinary Record*, 163(9), 276-277.
- Santurio, J.M., Leal, A.T., Leal, A.B.M., Alves, S.H., Lübeck, I., Griebeler, J., y Copetti, M.V. (2006). Teste de ELISA indireto para o diagnóstico sorológico de pitiose. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 26(1), 47-50.
- Santurio, J.M., Monteiro, A.B., Leal, A.T., Kommers, G.D., de Sousa, R.S., y Catto, J.B. (1998). Cutaneous Pythiosis insidiosi in calves from the Pantanal region of Brazil. *Mycopathologia*, 141(3), 123-125.
- Schanzembach, M., Brayer, D., Sallis, S., César, D., Matto, C., Almeida, R., ... Rivero, R. (2019). Descripción de un caso de pitiosis cutánea equina y su diagnóstico mediante diversas técnicas. *Veterinaria (Montevideo)*, 55(212), 96-101.
- Schurko, A., Mendoza, L., de Cock, A.W.A.M., y Klassen, G.R (2003a). Evidence for geographic clusters, molecular genetic differences among strains of *Pythium insidiosum* from Asia, Australia and the Americas are explored. *Mycologia*, 95, 200-208.
- Schurko, A.M., Mendoza, L., Lévesque, C.A., Désaulniers, N.L., De Cock, A.W.A.M., y Klassen, G.R. (2003b). A molecular phylogeny of *Pythium insidiosum*. *Mycological Research*, 107(5), 537-544.
- Scott, D.W., y Miller, W.H. (2011). Fungal Skin Diseases. Pythiosis. En T. Merchant (Ed.), *Equine dermatology* (2ª ed., pp. 191-195). Philadelphia: Saunders.
- Shipton, W.A. (1983). Possible relationship of some growth and sporulation responses of *Pythium* to the occurrence of equine phycomycosis. *Transactions of the British Mycological Society*, 80(1), 13-18.
- Shipton, W.A. (1987). *Pythium destruens* sp. nov., an agent of equine pythiosis. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 25, 137-51.
- Silva do Carmo P.M., y Riet-Correa F. (2014). Doenças fúngicas e pitiose em ruminantes, parte 2. Pitiose. En Centro Médico Veterinario de Paysandú (Ed.), *Jornadas uruguayas de buiatría* (Vol. XLII, pp. 137-142). Paysandú: Centro Médico Veterinario de Paysandú.

- Souto, E.P.F., Maia, L.A., Virgínio, J.P., Carneiro, R.S., Kommers, G.D., Riet-Correa, F., ... Dantas, A.F.M. (2020). Pythiosis in cats in northeastern Brazil. *Journal de Mycologie Médicale*, 30, 1-5.
- Tabosa, J.M., Riet-Correa, F., Medeiros, V.T., y Azevedo, E.O. (2002). Pitiosis cutánea con metástasis pulmonar en ovinos de la región semi-árida del nordeste brasileiro. En Centro Médico Veterinario de Paysandú (Ed.), *Jornadas uruguayas de buiatría* (Vol. XXX, pp. 233-234). Paysandú: Centro Médico Veterinario de Paysandú.
- Tabosa, I.M., Riet-Correa, F., Nobre, V.M. T., Azevedo, E.O., Reis-Júnior, J.L., y Medeiros, R.M.T. (2004). Outbreaks of Pythiosis in Two Flocks of Sheep in Northeastern Brazil. *Veterinary Pathology*, 41(4), 412-415.
- Tomich, T.R., Moraes A.S., Juliano, R.S., Pinto de Abreu, U.G., Rachel, R.C., y Santurio, J.M. (2010). Impacto Econômico Decorrente do Controle da Pitiose Equina Empregandose o Imunoterápico PITIUM-VAC. En Embrapa Pantanal – CPAP (Ed.), *Simposio sobre recursos naturais e socioeconômicos do pantanal*, (Vol. 5, pp. 1-4). Corumbá: Embrapa - CPAP.
- Ubiali, D.G., Cruz, R.A.S., De Paula, D.A.J., Silva, M.C., Mendonça, F.S., Dutra, V., ... Pescador, C.A. (2013). Pathology of Nasal Infection caused by *Conidiobolus lamprauges* and *Pythium insidiosum* in Sheep. *Journal of Comparative Pathology*, 149(2-3), 137-145.
- Universidad de la República, Facultad de Ciencias. (2021). Clasificación de suelos del Uruguay. En *Curso de Edafología* Recuperado de <http://edafologia.fcien.edu.uy/archivos/CLASIFICACION%20%20DE%20%20SUELOS%20%20DEL%20URUGUAY%201.pdf>
- Uruguay country information. (s.f.). *Descripciones del suelo según Coneat, suelos grupo "0"*. Recuperado de <https://www.uruguaycountryinformation.com/suelosconeatsoils-0.htm>
- Van der Plaats-Niterink, J. (1981). *Monograph of the genus Pythium. Studies in mycology* (vol. 21). Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Vanittanakom, N., Supabandhu, J., Khamwan, C., Praparattanapan, J., Thirach, S., Prasertwitayakij, ... Tananuvat, N. (2004). Identification of Emerging Human-Pathogenic *Pythium insidiosum* by Serological and Molecular Assay-Based Methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(9), 3970-3974.
- Vanittanakom, N., Szekely, J., Khanthawong, S., Sawutdeechaikul, P., Vanittanakom, P., y Fisher, M.C. (2014). Molecular detection of *Pythium insidiosum* from soil in Thai agricultural areas. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(3-4), 321-326.
- Vicarivento, N., Puzzi, M., Alves, M., y Zappa, V. (2008). Pitiose, uma micose emergente nos humanos. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, 10, 1-7.

- Viegas Sallis, E.S., Brayer Pereira, D.I., y Buss Raffi, M. (2003). Pitiose cutânea em eqüinos: 14 casos. *Ciência Rural (Santa Maria)*, 33(5), 899-903.
- Vilela, R., Montalva, C., Luz, C., Humber, R.A., y Mendoza, L. (2018). *Pythium insidiosum* isolated from infected mosquito larvae in central Brazil. *Acta Tropica*, 185, 344-348.
- Walker, C.A., y Van West, P. (2007). Zoospore development in the oomycetes. *Fungal Biology Reviews*, 21(1), 10-18.
- Weiblen, C., de Azevedo, M.I., Ianiski, L.B., Stibbe, P.C., Pereira, D.I.B., Zanette, R.A., ... Botton, S. de A. (2019). Genotyping of South American clinical isolates of *Pythium insidiosum* based on single nucleotide polymorphism-based multiplex PCR. *Ciência Rural*, 49(1), 1-7.
- Zanette, R.A., Bitencourt, P.E.R., Alves, S.H., Fighera, R.A., Flores, M.M., Wolkmer, P., ... Santurio, J.M. (2013). Insights into the pathophysiology of iron metabolism in *Pythium insidiosum* infections. *Veterinary Microbiology*, 162(2-4), 826-830.