



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

“REPORTE DE UN CASO DE PITIOSIS CUTÁNEA EN UN EQUINO”

por:

María Eugenia HERNANDORENA BENTANCOR

Elisa JACKSON OSABA

TESIS DE GRADO presentada como uno
de los requisitos para obtener el título
de Doctor en Ciencias Veterinarias

Orientado: Medicina Veterinaria

Modalidad: Estudio de Caso

MONTEVIDEO
URUGUAY
2018

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de Grado aprobada por:

Presidente de mesa

Dra. Mary Cuns

Segundo miembro (tutor)

Dr. Gonzalo Marichal

Tercer miembro

Dra. Elizabeth Pechiar

Fecha: 30/08/2018

Autor:

Br. Eugenia Hernandorena

Br. Elisa Jackson

Agradecimientos:

Queremos brindar nuestro más sincero agradecimiento a nuestro tutor el Dr. Gonzalo Marichal por la paciencia, dedicación, confianza y el respaldo brindado hacia nosotras. Ha sido un privilegio poder contar con su guía y ayuda.

A nuestras familias, en especial a nuestros padres, hermanos, abuelos y tíos, los que día a día nos acompañaron en este camino, dándonos su apoyo incondicional y esforzándose para que podamos llegar a la meta.

A nuestros amigos y a todas las personas que han formado parte de nuestras vidas acompañándonos y apoyándonos durante los años de estudio.

A la Facultad de Veterinaria, profesores, veterinarios quienes nos han brindado las herramientas necesarias para nuestra formación como futuros profesionales. Cabe mencionar a cada uno de los compañeros que de una u otra manera ayudaron a forjar un escalón más en este ascenso.

Agradecer al personal de la Biblioteca de la Facultad de Veterinaria por su disposición y ayuda.

¡A todos muchas gracias!

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
1. LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	6
2. RESUMEN.....	8
2.1 SUMMERY.....	9
3. INTRODUCCIÓN.....	10
3.1 Generalidades de la pitiosis cutánea.....	10
3.2 Etiología.....	10
3.3 Epidemiología.....	11
3.4 Fisiopatología.....	13
3.5 Signos Clínicos.....	15
3.6 Pitiosis en las diferentes especies.....	17
3.6.1 Pitiosis en perros.....	17
3.6.2 Pitiosis en gatos y ganado.....	18
3.6.3 Pitiosis en humanos.....	19
3.7 DIAGNÓSTICO.....	20
3.7.1 Hallazgos clínicos patológicos.....	21
3.7.2 Examen directo.....	21
3.7.3 Cultivo Microbiológico.....	22
3.7.4 Histopatología.....	23
3.7.5 Inmunoquistoquímica.....	24
3.7.6 PCR.....	26
3.7.6.1 PCR anidado.....	27
3.7.7 Elisa indirecto.....	29
3.7.8 Inmunodifusión.....	30

3.7.9 Inmunocromatografía.....	31
3.7.10 Western Blot.....	31
3.8 Diagnóstico diferencial.....	32
3.9 TRATAMIENTO.....	33
3.9.1 Tratamiento quirúrgico.....	33
3.9.2 Tratamiento farmacológico.....	34
3.9.2.1 Anfotericina B.....	34
3.9.2.2 ARI con Anfotericina B y DMSO.....	34
3.9.2.3 Acetonido de Triamcinolona.....	38
3.9.3 Tratamiento con Inmunoterapia.....	40
4. OBJETIVOS.....	44
4.1 Objetivo general.....	44
4.2 Objetivos particulares.....	44
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
5.1 Caso clínico.....	45
5.2 Métodos diagnósticos.....	46
6. RESULTADOS.....	47
6.1 Resultados de hemogramas.....	47
6.2 Resultados de histopatología.....	48
6.3 Tratamiento.....	48
6.4 Evolución.....	49
7. DISCUSIÓN.....	50
8. CONCLUSIONES.....	52
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

1. LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

CUADROS

CUADRO I: Hemograma del 17 de julio.....47

CUADRO II: Hemograma y leucograma del 7 de agosto 2017.....47

FIGURAS:

Fig. 1. Mapa que muestra la distribución de la pitiosis.....11

Fig. 2. Microscopía electrónica de la transmisión del *Pythium* en las diferentes etapas del desarrollo.....12

Fig. 3. Microscopía electrónica de la transmisión de las zoosporas móviles de *P. insidiosum* (a-c).....12

Fig. 4. Propuesta de hipótesis de trabajo de los mecanismos patogénicos implicados durante la infección natural y los desencadenados por inmunoterapia.....15

Fig. 5. Lesión granulomatosa en la región abdominal.....16

Fig. 6. Lesión granulomatosa en pecho y hombro.....16

Fig. 7. Lesión granulomatosa en la región distal de un miembro posterior.....16

Fig. 8. Lesión de pitiosis en la región ventral del labio inferior.....16

Fig. 9. (a, b) Lesiones cutáneas causadas por *P. insidiosum* en dos perros con infección subcutánea.....17

Fig. 10. Lesiones en un gato con pitiosis subcutánea.....18

Fig. 11. Ulceración granulomatosa con superficie irregular, presencia de material necrótico y exudación fibrino-sanguinolenta en un bovino.....18

Fig. 12 (a, b). Lesión gangrenosa seca en la pierna izquierda en un paciente tailandés. (b) Digital angiografía del mismo paciente con oclusión de la arteria femoral superficial izquierda.....20

Fig. 13. Inflamación orbitaria severa causada por la infección por *Pythium insidiosum* en un niño sano.....20

Fig. 14. Muestra de tejido infectado y visualización de los *kunkers*.....21

Fig. 15. Secreción fibrinosanguinolenta de una lesión granulomatosa.....21

Fig. 16. Dermis. Lesión altamente vascularizada con fibrosis e intenso infiltrado difuso de eosinófilos, seguidos por macrófagos y neutrófilos. H-E....	24
Fig. 17. Dermis. Fenómeno de SH (flecha). H-E.....	24
Fig. 18. Dermis. Hifas de <i>P. insidiosum</i> ramificadas en 90° y pobremente tabicada. Grocott.....	24
Fig. 19. Tinción de Grocott, mostrando estructuras ramificadas y ocasionalmente septadas de color café oscuro.....	24
Fig. 20. Hifas de <i>P. insidiosum</i> de la periferia de un kunker.....	26
Fig. 21. Lesiones cutáneas alopécicas múltiples bilaterales de diferentes tamaños con escaras.....	46
Fig. 22. Herida en la región abdominal ventral, de forma oval, profunda, de aspecto granulomatoso, ulcerante y necrótico con trayectos fistulosos, secreción sanguinopurulenta.....	46
Fig. 23. Escisión de muestras de tejido infectado.....	46
Fig. 24. Muestras de tejido infectado fijadas en formol al 10%.....	46

2. RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo hacer una descripción de las manifestaciones clínicas, lesiones macro y microscópicas, aspectos epidemiológicos, métodos diagnósticos y posibles tratamientos de pitiosis cutánea. Se realizó el estudio de un caso clínico de un equino hembra con una herida crónica en región ventral de abdomen y en mal estado general, proveniente del departamento de Treinta y Tres (Uruguay). Una vez que ingresó al Hospital de Equinos de la Facultad de Veterinaria se le realizó el examen clínico, constatándose una ulceración granulomatosa grave con presencia de masas necróticas y calcificaciones que se desprenden fácilmente, con coloración blanco-amarillentas, que contienen hifas e infiltrado de eosinófilos llamados “*kunkers*”, juntamente con la presencia de trayectos fistulosos y descarga fibrinosanguinolenta, siendo estas señales inequívocas de pitiosis. Se le realizaron exámenes colaterales para descartar patologías dermatológicas con características clínicas similares. Los exámenes realizados incluyeron hemograma; en el cual se destacó una anemia severa, y análisis de histopatología; con intensa proliferación de tejido conjuntivo dispuesto de forma irregular, marcada inflamación piogranulomatosa, infiltración de eosinófilos, seguido por macrófagos y neutrófilos, presencia de masa necrótica multifocal y el fenómeno Splendore-Hoepli. El diagnóstico se fundamentó en las características clínicas-epidemiológicas y hallazgos histopatológicos. Debido a la evolución crónica del caso y la zona involucrada, el tratamiento quirúrgico no se pudo realizar, optándose de esta forma por un tratamiento sintomático, con la administración de antibióticos, antiinflamatorios, curación diaria de la herida, hierro y vitamina B12 por la gravedad de la anemia, junto con la vacuna Pitium-Vac®. Luego de 20 días se continuó el tratamiento en el domicilio por decisión del propietario. No se obtuvo ninguna respuesta al tratamiento, por lo cual con fines éticos se optó por la eutanasia.

2.1 SUMMARY

The objective of this work was to describe clinical manifestations, macro and microscopic lesions, epidemiological aspects, diagnostic methods and possible treatments for cutaneous pythiosis. The study of a clinical case was made, a female equine with a chronic wound in ventral abdomen region and in poor general condition, from the department of Treinta y Tres (Uruguay). Once admitted to the Equine Hospital of the Veterinary Medicine School, the clinical examination was performed, and a severe granulomatous ulceration was confirmed, with the presence of necrotic masses and calcifications that easily detach, with white-yellowish coloration, containing hyphae and the infiltrate of eosinophils called “*kunkers*”, with plates and fistulae and fibrinous-bloody discharge, all being unmistakable signs of pythiosis. Collateral exams were performed to rule out dermatological pathologies with similar clinical characteristics. The exams included a blood count; in which a severe anemia was highlighted, and histopathology analysis; with an intense proliferation of irregularly arranged connective tissue, a marked pyogranulomatous inflammation, with infiltration of eosinophils, followed by neutrophils, and the presence of a multifocal mass and the Splendore-Hoeppli phenomenon. The diagnosis is based on clinical-epidemiological characteristics and histopathological findings. Due to the chronic evolution of the case and the area involved, the surgical treatment could not be performed, thus a symptomatic treatment was chosen, with the administration of antibiotics, non-steroidal anti-inflammatory drugs, daily wound healing, iron and vitamin B12 because of the severity of the anemia, along with the Pitium-Vac® vaccine. After 20 days, treatment was continued at home by the owner's decision. No response to the treatment was obtained, therefore we opted for euthanasia for ethical purposes.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 GENERALIDADES DE LA PITIOSIS CUTÁNEA

La pitiosis cutánea equina es una enfermedad crónica, infecciosa, proliferativa y ulcerosa, a menudo pruriginosa, que afecta la piel y el tejido subcutáneo de las extremidades, la región torácica-abdominal o la cabeza. Es causada por el *Pythium insidiosum*, un oomiceto filogenéticamente distinto del reino de los hongos y más cercano al de las algas (León y Pérez, 2011). Ésta se presenta en zonas inundables, con abundante vegetación en descomposición en regiones tropicales y subtropicales (Robinson y Sprayberry, 2012).

Esta enfermedad ha sido reportada también en perros, gatos, ganado y humanos, sin ser considerada una zoonosis (Mosbah y col., 2012).

Las lesiones se caracterizan por su apariencia granulomatosa, y en forma de cráter, trayectos fistulosos, secreción fibrino-sanguinolenta y salida de material necrótico caseificado denominados “*kunkers*”. Es conocida también como: Espundia equina o ficomicosis; Cáncer de los Pantanos; Hongo de la Costa del Golfo; Oomicosis; Saguijuelas de la Florida; Dermatitis granular; Ferida brava; entre otros (Cardona y col., 2013).

El primer registro que se tiene es de 1884 realizado por Smith (Márquez y col., 2010), el aislamiento fue realizado por De Haan y Hoogkamer en equinos a partir de granulomas subcutáneos en 1901, pero sólo pudo identificarse hasta 1961 como *Hyphomyces destruens* y en 1987 cuando De Cock lo clasificó con el actual nombre (Leal y col., 2001).

3.2 ETIOLOGÍA

El agente etiológico es *Pythium insidiosum*, un microorganismo clasificado como perteneciente al reino Stramenopila, phylum Pseudofungi, clase Oomycetes, orden Pythiales, familia Pythiaceae y género Pythium. Estudios taxonómicos más profundos, basados en análisis de secuenciación de ARN ribosomal confirman que los miembros de la clase Oomycetes son filogenéticamente distintos del reino de los hongos y más cercanos al de las algas (León y Pérez, 2011).

Esta diferencia taxonómica está referida a la composición de la pared y la membrana celular. En ese sentido, la quitina que es un componente esencial de la pared celular de los hongos, no está presente en la pared celular de los Oomicetos. En éstos predominan componentes como la celulosa, β -glucanos e

hidroxiprolina. Al contrario de los hongos, en la membrana celular de los Oomicetos falta el ergosterol esteroide, de modo que no responde a la exposición de los agentes anti fúngicos que inhiben o se unen a este compuesto (Vicarivento y col., 2008).

Hay aproximadamente 120 especies del género *Pythium* de las cuales *P. insidiosum* es la única especie que se sabe que infecta a humanos y animales. El organismo se presenta en dos formas, que incluyen la ramificación en ángulo recto, las hifas anchas, y la zoospora biflagelada motora acuática, que es una característica específica de los oomicetos (Mendoza, 2016).

3.3 EPIDEMIOLOGÍA

La distribución geográfica es amplia. La pitiosis ha sido reportada en varios países tropicales y subtropicales del mundo, principalmente en Brasil, Venezuela, Colombia, Guatemala, Panamá, Nicaragua, Haití, USA , Indonesia, Australia, Costa Rica, Argentina, Grecia, Egipto, Francia, Japón, entre otros.



Fig. 1. Mapa que muestra la distribución de la pitiosis en las regiones tropicales, subtropicales y templadas del mundo. Fuente: Mendoza, 2016

El ciclo del *P. insidiosum* se basa en la colonización de diversas plantas acuáticas que sirven de substrato para el desarrollo y la reproducción asexual del organismo produciendo zoosporas biflageladas, las cuales se liberan periódicamente al medio acuático. Éstas una vez libres en el agua, se mueven hasta encontrar otra planta o animal en el que se enquistan y emiten el tubo germinativo mientras crean un nuevo micelio y el ciclo se completa. Las zoosporas se trasladan con movimientos giratorios sobre su propio eje hacia la superficie de los tejidos que le ofrecen quimiotaxis, tales como el tejido animal y vegetal, donde dejan de moverse, pierden sus flagelos y se tornan esféricas. Éstas producen y se rodean de un material amorfo que actúa como una

sustancia que facilita la adhesión de las zoosporas a la superficie del hospedador y, a partir del lugar ocupado anteriormente por los dos flagelos emite una proyección engrosada que conduce a la formación de un tubo germinativo, que servirá para penetrar los tejidos y desarrollar las hifas que invaden al organismo intra y extracelular (Mendoza y col., 1993).

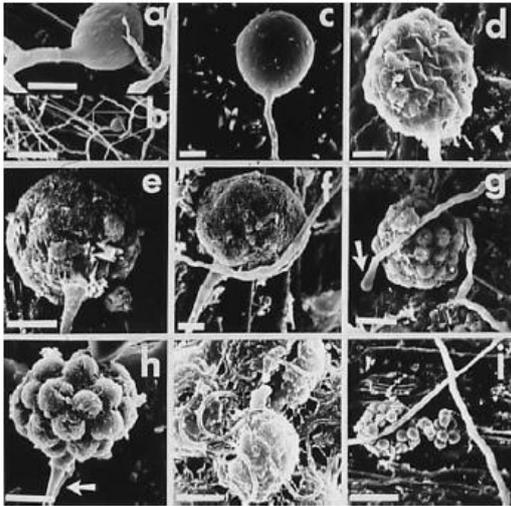


Fig. 2. Microscopía electrónica de la transmisión de *Pythium* en las diferentes etapas del desarrollo. La formación de vesículas globosas e hifas en una hoja son los primeros pasos en la colonización de un hospedador de planta (a, b). Las fotografías de electrones muestra la formación de esporangios que conduce al lanzamiento de un tipo secundario zoosporas (c-j). Fuente: Mendoza, 1993

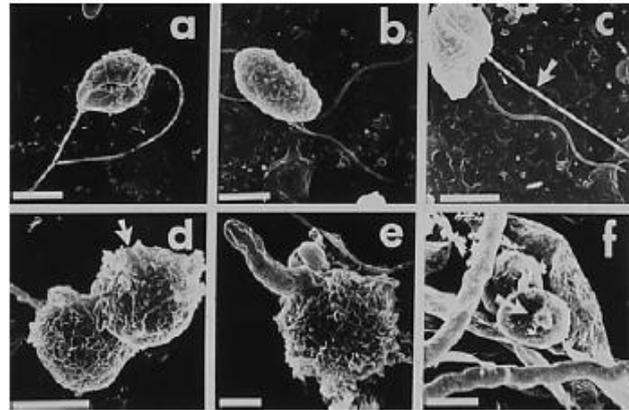


Fig. 3. Microscopía electrónica de la transmisión de las zoosporas móviles de *Pythium insidiosum* (a-c). Las zoosporas enquistadas se caracterizan por su morfología globosa (d-f). Las flechas indican el lugar una vez ocupado por los flagelos. Una sustancia amorfa utilizada para unir las zoosporas al tejido del huésped es evidente sobre la superficie de zoosporas enquistadas. Zoosporas que se alejan de los tejidos de hojas o animales no secretan este material amorfo (f). Fuente: Mendoza, 1993.

Las condiciones ambientales son determinantes para el desarrollo del organismo en su ecosistema. Para que sea posible la producción de zoosporos son necesarias temperaturas entre 30 y 40°C, además del acúmulo de agua en regiones inundables y vegetación en descomposición. La gran mayoría de los casos fueron observados durante o después de estaciones lluviosas (Santurio y col., 2006).

Esta patología se ha reportado en diferentes especies como la bovina, ovina, canina, felina y humanos, sin embargo es la especie equina donde más se informan casos (Mendoza y col., 1996).

Además de causar enfermedad cutánea en caballos, también se han reportado casos de infección por *P. insidiosum* en pulmón, hueso, intestino y enfermedad sistémica. En perros el patógeno causa infección cutánea, subcutánea y gastrointestinal, siendo esta última la más común por la ingestión de zoosporas. Otros reportes describen una forma nasal, retrobulbar, piel y subcutáneo en gatos y enfermedad cutánea en ganado bovino y ovino (Mendoza y Newton, 2005).

Los caballos más susceptibles son aquellos que se paran en aguas infectadas o beben de ella. De todos modos no todos adquieren la infección, tienen mayor riesgo los caballos jóvenes, gerontes o inmunosuprimidos (Robinson y Sprayberry, 2012).

En los humanos se han observado tres formas clínicas de pitiosis, una forma cutánea con lesiones granulomatosas y ulcerativas que envuelven piel y subcutáneo de miembros y rostro incluyendo el área periorbital. La segunda forma es la pitiosis oftálmica que causa queratitis, y la forma vascular o sistémica causa un síndrome de insuficiencia arterial crónica de las extremidades que va desde una claudicación intermitente crónica a una ulceración gangrenosa de las piernas (Pal M, 2014).

Aunque la pitiosis ha sido descrita en humanos, no hay reportes publicados acerca de la transmisión entre animales ni entre animales y humanos, por lo tanto no es considerada una zoonosis (Mendoza y col., 1996).

En Uruguay, esta enfermedad está asociada a campos bajos arroceros y/o inundables donde se forman lagunas con aguas estancadas. Por lo tanto los departamentos de mayor riesgo son los de la región Este del país, entre ellos Treinta y Tres, Rocha, Cerro Largo y Rivera, los cuales limitan con Brasil, país donde la enfermedad es endémica (Dutra, 2012).

En el 2017 se registraron 4 casos de pitiosis cutánea en nuestro país. Éstos ocurrieron en la 9^o de Rocha, 2^o y 3^o de Treinta y Tres y 7^a de Durazno, entre fines de verano y otoño (marzo a junio). En tres de estos casos las lesiones cutáneas se localizaron en las extremidades y el caso restante en la región del abdomen (Dutra, 2017).

3.4 FISIOPATOLOGÍA

La patogénesis de la pitiosis no está del todo clara, en parte debido a que esta enfermedad no es reproducible en huéspedes naturales. Datos obtenidos en laboratorio indican que las zoosporas de *P. insidiosum* presentan un tropismo por tejidos animales y vegetales. De esta manera, las zoosporas con su porción móvil presentan un rol importante en la infección natural de los huéspedes (Miller, 1983; Mendoza y col., 1993).

De todos modos, hay reportes de casos en humanos y animales que no presentaron contacto con aguas estancadas, siendo la inoculación de hifas, restos de esporas, u oogonias, una forma de contraer la enfermedad (Rinaldi y Seidenfeld, 1989).

Cuando un animal o humano entra en contacto con aguas habitadas por *P. insidiosum*, las zoosporas se sienten atraídas por heridas abiertas en la piel,

enquistándose en los tejidos expuestos. El *P. insidiosum* no puede penetrar la piel sana, ya que no presenta la fuerza suficiente para penetrar la piel intacta. Diferentes estudios muestran que este patógeno necesita un daño en la piel para invadir el huésped (Miller y Campbell, 1984; Mendoza y col., 1996).

El período entre el primer contacto con la piel y el desarrollo de las lesiones es de aproximadamente 3 a 4 semanas (Dutra, 2012).

Se conoce que las zoosporas secretan una sustancia pegajosa que les permite mantener estrecho contacto con el huésped durante las fases iniciales de invasión. De esta forma, y estimuladas por la temperatura de la piel del hospedero, las zoosporas enquistadas desarrollan un tubo germinativo, frecuentemente en dirección al tejido lesionado y de forma mecánica penetran los tejidos (Mendoza y col., 1993).

Una vez dentro, el *P. insidiosum* inicia una respuesta inmunitaria en el huésped mediada por células (respuesta Th2), en su mayoría eosinófilos y algunos neutrófilos, siendo esta respuesta insuficiente para prevenir la propagación del agente. Esta respuesta Th2 se basa también en la producción de grandes cantidades de IL-5, IL-4 y otras citoquinas, siendo probablemente activada por las hifas del *P. insidiosum*, las cuales expresan un exoantígeno soluble que modula la respuesta inmune del huésped (Mendoza y col., 2005).

Los eosinófilos entonces, en un esfuerzo para fagocitar el microorganismo, se desgranulan alrededor de las hifas. Nuevos eosinófilos llegan al lugar y se fusionan alrededor de los ya desgranulados y continúan desgranulándose, formando una masa llamada “*kunker*”. Éstos están compuestos de eosinófilos desgranulados entrelazados con hifas viables de *P. insidiosum*. El material eosinofílico se denomina fenómeno de Splendore-Hoeppli alrededor de las hifas de *P. insidiosum*, siendo ésta una característica principal en la infección de los equinos pero no de otras especies (Mendoza y col., 2016).

El extenso daño del tejido que se observa en humanos y animales, en estadios agudos y crónicos de la enfermedad ha sido atribuido a la liberación de agentes químicos a partir de la desgranulación de eosinófilos y mastocitos. Clínicamente, la ulceración extensa de la piel acompañada por la producción de grandes cantidades de tejido de granulación y fibroso, es la principal característica de esta infección cutánea (Miller, 1981; Mendoza y col., 2003).

Cuando el *P. insidiosum* invade órganos internos, el desarrollo de masas es mal diagnosticado como neoplasias, siendo esto uno de los principales inconvenientes (Mendoza y Ajello, 1996).

Se cree que el sistema inmunitario del huésped es “engañado” por los exoantígenos de *P. insidiosum*, ya que el huésped siempre está produciendo más eosinófilos y células mastocíticas, debido a que el sistema inmunitario del

huésped esta siempre detectando antígenos que este patógeno presenta a las células detríticas locales. De esta manera, el patógeno usa las defensas del huésped para camuflarse dentro del material eosinófilo formado por la desgranulación de los eosinófilos. Esta estrategia podría proteger al patógeno de ser totalmente presentado al sistema inmune del huésped, asegurando su presencia en los tejidos infectados (Mendoza y Villalobus, 1992).

Basado en el efecto destructivo de la respuesta inflamatoria disparada por este patógeno en el huésped infectado, y el hecho de que es el único oomiceto patógeno en mamífero, se puede especular que el *P. insidiosum* recientemente desarrollo la habilidad para sobrevivir en tejidos de mamíferos, siendo respaldado por un análisis filogenético (Schurko y Mendoza, 2003).

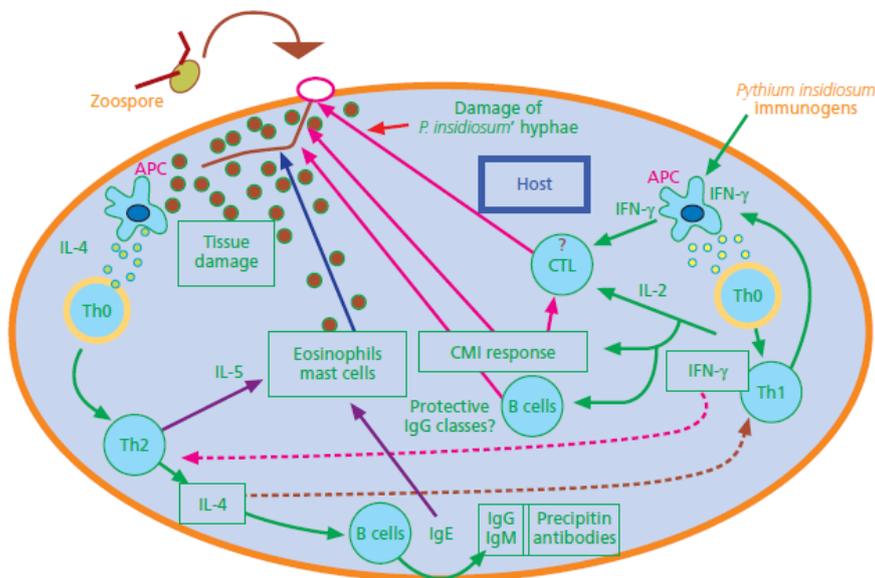


Fig. 4. Propuesta de hipótesis de trabajo de los mecanismos patogénicos implicados durante la infección natural y los desencadenados por inmunoterapia. Fuente: Mendoza, 2003.

3.5 SIGNOS CLÍNICOS

Las lesiones cutáneas producidas por el agente son más frecuentes en las partes distales de las extremidades, porción ventral toraco-abdominal, pectoral y boca, probablemente por el mayor contacto de estas áreas con aguas contaminadas con zoosporos. Éstas se caracterizan por la formación de lesiones ulcerativas granulomatosas sobresalientes y elevadas con bordes irregulares y en forma de cráter, a menudo pruriginosas. El tamaño de las lesiones depende del sitio y tiempo de evolución de la infección y puede medir entre 12 y 50 cm de diámetro, con trayectos fistulosos o cavitaciones formadas por el oomiceto en su trayecto invasivo en el tejido granular, con presencia de

masas necróticas, duras, que se desprenden fácilmente, de color blanco amarillento llamadas “*kunkers*”. También se evidencia secreción de fluidos sanguinopurulentos, hemorrágicos o fibrinosanguinolentos con características filantes o constantes (Cardona y col., 2013).

En algunas ocasiones se observan automutilaciones, debido al prurito, así como claudicación cuando la lesión se presenta en las extremidades (Leal, 2001).



Fig. 5. Lesión granulomatosa en la región abdominal. Fuente: Facultad de Veterinaria Montevideo Uruguay 2017.



Fig. 6. Lesión granulomatosa en pecho y hombro. Fuente: Romero B y col, 2016. Reporte de un caso clínico en Florencia, Colombia.



Fig. 7. Lesión granulomatosa en la región distal de un miembro posterior. Fuente: Dr. Bruno Espinosa, Uruguay 2018.



Fig. 8. Lesión de pitiosis en la región ventral del labio inferior. Fuente: Cardona 2016.

3.6 PITIOSIS EN LAS DIFERENTES ESPECIES

3.6.1 Pitiosis en perros

Los primeros reportes de la infección en perros por pitiosis, fueron con lesiones cutáneas y gastrointestinales en el Golfo de México y USA. Lesiones subcutáneas de esta enfermedad se han encontrado también en miembros, cara y cola (Heller, 1971; Miller, 1983; Pavletic y col., 1983; Foil y Short, 1984).

La pitiosis sistémica, involucrando los órganos internos también ha sido reportada (Foil y Short, 1984; Thomas y Lewis, 1998). Las lesiones cutáneas son pruriginosas, despojadas del pelo y perforadas por trayectos sinusales fistulosos que descargan un exudado serosanguinolento. Los hallazgos histopatológicos incluyen áreas de necrosis multifocal con neutrófilos y macrófagos. Infiltración granulomatosa discreta, rodeado por eosinófilos, neutrófilos y células epiteliales. Las células gigantes también han sido informadas en los casos crónicos. Las hifas detectadas en estos tejidos miden entre 4,4 a 8,6µm de diámetro (Mendoza, 2016).

La pitiosis gastrointestinal en perros es caracterizada por vómitos, pérdida de peso y diarrea esporádica. Cursa con la formación de masas duras granulomatosas, con áreas de gran espesor y ulceración de la mucosa que está presente en la mayoría de los casos. Las lesiones pueden diseminarse a tejidos adyacentes como el páncreas, el útero y ganglios linfáticos mesentéricos. Histológicamente la mucosa muestra una ulceración, atrofia e hiperplasias de células epiteliales. La submucosa esta engrosada y la mucosa muscular contienen granulomas focales. En los tejidos afectados se observan neutrófilos, eosinófilos, células plasmáticas, macrófagos, células epiteliales y células gigantes (Miller, 1983; Pavletic y col., 1983; Thomas y Lewis, 1998).

Las hifas del *P. insidiosum* son difíciles de detectar en tinciones de Hematoxilina-Eosina, pero con la tinción de Grocott son fácilmente detectables hifas entre 2,5 y 8,9 µm de diámetro. Se han reportado casos de pitiosis canina en Australia y USA (Mendoza, 2016).

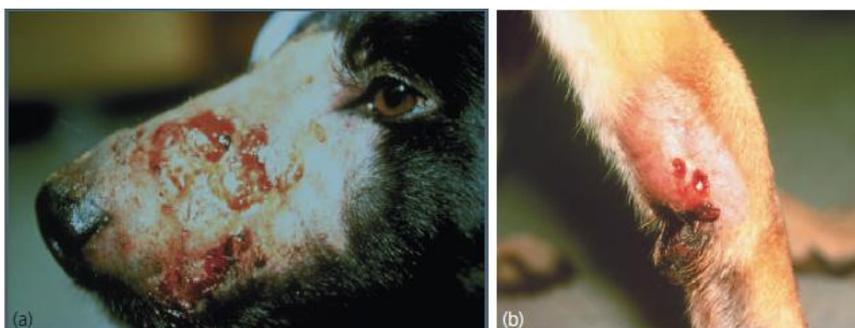


Fig. 9. (a, b) Lesiones cutáneas causadas por *Pythium insidiosum* en dos perros con infección subcutánea. Fuente: Mendoza 2016.

3.6.2 Pitiosis en gatos y ganado.

Pocos casos de pitiosis en gatos y terneros se han descrito en la literatura. Bissonnette (1991) fue el primero en diagnosticar un caso de pitiosis en un gato con hinchazón facial, pero ninguno de sus órganos internos estaba involucrado. *P. insidiosum* se aisló del tejido infectado. Las características histopatológicas encontradas en este caso fueron similares a las registradas en caballos y perros.

Un total de cinco terneros han sido reportados con la enfermedad en la literatura. Casos de úlceras múltiples focales en piel y trayectos fistulosos drenando un exudado purulento e hinchazón de articulaciones en fetos han sido diagnosticados con pitiosis (Mendoza, 2016). Miller y sus colegas en 1985 reportaron que *P. insidiosum* fue aislado de dos de los terneros estudiados, mientras se encontraron hifas de *P. insidiosum* en el tejido de un tercer caso. Secciones histológicas de este caso mostraron incrustaciones granulares alrededor de la hifa, y presencia del fenómeno Splendore-Hoeppli. Observaciones similares fueron descritas por Santurio en 1998 en terneros en la región pantanal de Brasil. El análisis histopatológico y el análisis de secuenciación del ADN de los tejidos infectados confirmaron la presencia del patógeno.



Fig. 10. Lesiones en un gato de Florida, EE. UU con pitiosis subcutánea. Fuente: Mendoza 2016.



Fig. 11. Ulceración granulomatosa con superficie irregular, presencia de material necrótico y exudación fibrino-sanguinolenta. Fuente: Cardona 2012.

3.6.3. Pitiosis en humanos.

La mayoría de los casos en humanos han ocurrido en Tailandia, con sólo algunos informes en Australia, Haití, Nueva Zelanda y USA. Los primeros cinco casos de esta enfermedad involucró dos mujeres y tres hombres en las zonas rurales del norte de Tailandia. Diez casos más fueron reportados en las mismas áreas de Tailandia en 1992 y 1993. La mayoría se asocia con un síndrome de hemoglobinopatía. Clínicamente se observa una gangrena progresiva y dolor en las extremidades. Sorpresivamente todos los casos mostraron arteritis de los grandes vasos. El análisis angiográfico indicó la oclusión de las arterias ilíacas, poplítea y femoral. El tratamiento de la amputación fue exitosa en 7 de los 15 casos. También se registró la invasión fatal de las arterias abdominales con la oclusión de la parte infrarrenal de la aorta. Hasta aquí, la mayoría de los casos de pitiosis humana han ocurrido en Tailandia, con alrededor de noventa nuevos pacientes informados desde los primeros casos (Sathapatayavongs y Ledachaikul, 1989).

Tres pacientes con pitiosis orbitaria subcutánea fueron diagnosticados en USA (Rinaldi y Seidenfeld, 1989). Uno era un niño sano en Texas que había sido accidentalmente golpeado en su ojo derecho. Desarrollo un edema progresivo periorbital con quemosis, eritema y celulitis periorbital. *P. insidiosum* fue aislado del tejido biopsiado. Los detalles del segundo caso no fueron discutidos. El tercer caso fue registrado por Shenep en 1998 en un niño de 2 años de Tennessee. Dos adicionales casos de pitiosis con una historia clínica similar se informaron en Australia por Triscott en 1993, involucrando a un niño de 11 y 14 años. Ambos desarrollaron hinchazones periorbitarios que rápidamente progreso a un tumor orbital. El diagnóstico fue hecho histopatológicamente por el ensayo de la inmunoperoxidasa por inmunohistoquímica. Además de la arteritis de los vasos y pitiosis subcutánea en humanos, casos de queratitis también se han registrado en Haití, Nueva Zelanda y Tailandia (Mendoza, 2016).

Triscott en 1993 descubrió en detalle la histopatología de la pitiosis subcutánea en humanos. Encontró que las características histológicas eran similares a la de pitiosis equina. Masas granulares eosinofílicas de aproximadamente 7 mm de diámetro, que contienen eosinófilos degenerativos, gránulos eosinofílicos, hifas y eosinófilos intactos en el borde de las áreas granulomatosas fueron los principales hallazgos encontrados. También se informó un infiltrado mixto de eosinófilos, linfocitos, neutrófilos, macrófagos y mastocitos. Como en la pitiosis equina, las hifas de *P. insidiosum* se restringieron a las áreas de las masas granulares eosinofílicas. Sin embargo, los "kunkers", tal como se registran en la pitiosis equina, no se han detectado en tejidos de casos humanos.

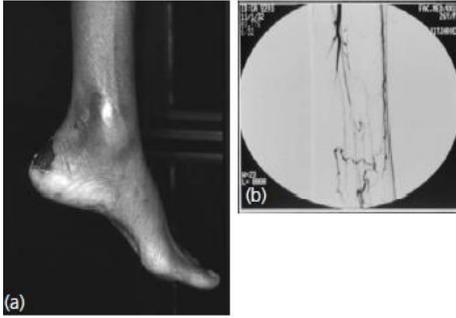


Fig. 12 (a, b). Lesión gangrenosa seca en la pierna izquierda causada por *Pythium insidiosum* en un paciente talasémico tailandés. (b) Digital angiografía por sustracción del mismo paciente que muestra oclusión de la arteria femoral superficial izquierda. Fuente: Mendoza 2016.



Fig. 13. Inflamación orbitaria severa causada por la infección por *Pythium insidiosum* en un niño sano. Fuente: Mendoza 2016.

3.7 DIAGNÓSTICO

Aunque la enfermedad es bien conocida en los países de la región, su diagnóstico nunca se había confirmado del lado Uruguayo hasta el año 2012, tal vez por desconocimiento o confusión con otras patologías similares (Dutra, 2012).

El diagnóstico presuntivo de la enfermedad se basa fundamentalmente en la observación de las características clínicas de la lesión asociadas a las condiciones epidemiológicas descritas, las características histopatológicas en la tinción de Hematoxilina Eosina (H-E) y Grocott, siendo el diagnóstico definitivo a través del aislamiento e identificación del agente. Es preciso establecer los diferenciales de la enfermedad, debido a que el diagnóstico clínico muestra ser aparentemente sencillo, pero a menudo es diagnosticado erróneamente como habronemiasis cutánea, tejido de granulación exuberante, granuloma piógeno y sarcoide equino, ya que se caracterizan por lesiones similares en forma general. Sin embargo, la presencia de “*kunkers*” (masas necróticas caseificadas), trayectos fistulosos y secreción filante fibrinosanguinolenta son inequívocas en la pitiosis (Reis y col., 2003).

Actualmente, métodos como la inmunohistoquímica, ELISA, inmunodifusión, Western Blot y PCR, pueden auxiliar en el diagnóstico precoz y correcto de la enfermedad (Reis y col., 2003; Santurio y col. 2006; Pedroso y col. 2009; Trost y col., 2009; Bezerra y col., 2010).

Los análisis de inmunohistoquímica, PCR e inmunoblot no están disponibles aún en el Uruguay (Dutra, 2014).

3.7.1 Hallazgos clínicos patológicos

El diagnóstico clínico patológico se basa en la sintomatología, examen físico, signos clínicos y radiológicos, indicadores hematológicos, estudio anatomopatológico y las características macroscópicas de las lesiones, que corresponden a un aumento de volumen en forma de placa ulcerada e irregular, de color blanco amarillento con apariencia de tejido de granulación, sangrante, con una longitud de hasta 50cm. Al corte superficial a profundo, se constatan zonas de necrosis que contienen concreciones irregulares de color amarillento, duras de superficie arenosa, que corresponden a los “*kunkers*” (Márquez y col., 2010).

Las alteraciones hematológicas asociadas con pitiosis son inespecíficas e inconsistentes. Incluyen anemia microcítica e hipocrómica, probablemente causada por la deficiencia de hierro que resulta de la pérdida de sangre a largo plazo a través de la abundante secreción serosanguinolenta del granuloma ulcerativo (Miller y Campbell, 1983).



Fig. 14. Muestra de tejido infectado y visualización de los “*kunkers*”. Fuente Dr. Bruno Espinosa, Uruguay 2018.



Fig. 15. Secreción fibrinosanguinolenta de una lesión granulomatosa. Fuente Cardona, 2013.

3.7.2 Examen Directo

El estudio con las muestras de tejido con la técnica descrita por Borelli en 1974 con hidróxido de potasio al 10% y Tinta Parker, permite visualizar hifas hialinas, gruesas, poco septadas y ramificadas. En ocasiones se observa la presencia de vesículas lipídicas en el citoplasma y en algunas de ellas llama la

atención que la periferia está rodeada de incrustaciones, dando aspecto de una corona radiada formando el fenómeno Splendore-Heoppli (Pérez y col., 2005).

La técnica de examen directo es un procedimiento destinado a detectar mediante la observación al microscopio, las estructuras fúngicas presentes en la muestra a través del uso de reactivos como el hidróxido de potasio con o sin colorantes (Weinberg y col., 2003).

3.7.3 Cultivo Microbiológico

Para el cultivo de las diferentes muestras tales como biopsias de tejido, se recomienda que éstas deban ser almacenadas o transportadas a temperatura ambiente en agua destilada estéril con la adición de antibióticos (ampicilina, para inhibir el crecimiento bacteriano secundario).

P. insidiosum crece relativamente bien en una variedad de medios, tales como agar harina de maíz, agar extracto de malta al 2%, agar infusión cerebro corazón, agar Sabouraud dextrosa, agar dextrosa de patata, agar sangre o agar V8. Las biopsias deben ser divididas en segmentos pequeños, colocadas en la superficie del agar e incubadas a 37°C en cámara húmeda.

El crecimiento es rápido (12 a 24 horas), formando unas colonias planas con el micelio sumergido en el medio de cultivo, de color blanco amarillento. Las hifas son cenocíticas, hialinas y miden entre 2 a 10 µm de diámetro, generalmente las ramificaciones laterales tienen un ángulo perpendicular de 90° y ocasionalmente se pueden observar septos, sin embargo, los septos son abundantes en hifas de cultivos viejos.

Para confirmar el aislamiento es necesario inducir la formación de zoosporas. Esto se logra a partir de cultivos de 1 a 2 días de crecimiento en agar agua al 2% con hojas de grama estéril a 37°C durante 18 a 24 horas. Las hojas de grama infectadas con *P. insidiosum* se colocan en una solución de sales minerales diluida al 1%. Después de 2 a 4 horas de incubación a 37°C, las zoosporas empiezan a crecer en el interior de los esporangios generados en las porciones terminales de hifas diferenciadas (Santurio y col., 2006).

La identificación morfológica es laboriosa, consume mucho tiempo y requiere experiencia para reconocer al microorganismo específico, lo cual puede llevar a un mal diagnóstico. Los factores ambientales como temperatura, medio de cultivo y el tiempo pueden también afectar las características morfológicas y fisiológicas del agente (Botton y col., 2010).

3.7.4 Histopatología

La toma de muestras se realiza por biopsias de tejido infectado. Ésta se puede realizar bajo anestesia general o neuroleptoanalgesia.

En la histopatología, las muestras se fijan en formol al 10% y son procesadas rutinariamente para el examen histopatológico en la que se incluyen en parafina, cortadas a 5µm de espesor y coloreadas por Hematoxilina Eosina (H-E) y coloración de Plata Metenamina de Grocott (GMS).

En la coloración de H-E, la lesión se caracteriza por ser altamente vascularizada, con numerosas arteriolas, intensa proliferación de tejido conectivo dispuesto irregularmente, numerosos fibroblastos, con una marcada infiltración inflamatoria piogranulomatosa con una intensa infiltración de eosinófilos polimorfonucleares, seguida de macrófagos y neutrófilos en menor proporción con una distribución difusa. También se observa la presencia de masas necróticas multifocales y del fenómeno Splendore-Hoeppli, lo que corresponde a una dermatitis granulomatosa eosinofílica difusa multifocal (Márquez y col., 2010).

En la coloración de Grocott, son visibles estructuras ramificadas, ocasionalmente septadas, de color marrón oscuro, con paredes lisas y paralelas, de tamaño entre 2,6 – 6,4 µm que a veces forman ángulos de 90° (Cardona y col., 2013).

La Plata Metenamina de Grocott es un método de tinción especial empleada para hongos. La reacción tintorial está basada en que, en presencia de ácido periódico, los polisacáridos de la pared celular de los hongos son oxidados a aldehídos. Éstos a su vez reducen el complejo nitrato – plata metanamina (o metenamina) produciendo una coloración de café a negra debido al depósito de plata reducida en los lugares de localización de los aldehído (Arango y col., 2003).

Los estudios histológicos no siempre llevan a un diagnóstico definitivo, debido a que la apariencia histológica de la pitiosis, basidiobolomicosis y conidiobolomicosis son similares. Para un diagnóstico definitivo el *P. insidiosum* debe ser aislado de los tejidos infectados (Mendoza, 2016).

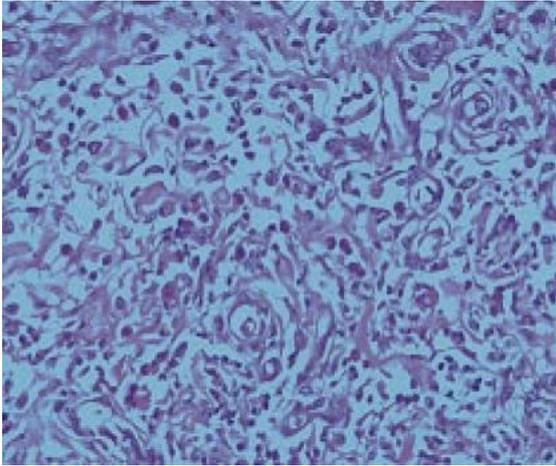


Fig. 16. Dermis. Lesión altamente vascularizada con fibrosis e intenso infiltrado difuso de eosinófilos, seguidos por macrófagos y neutrófilos. Hematoxilina y Eosina. 40X. Fuente: Márquez, 2010.

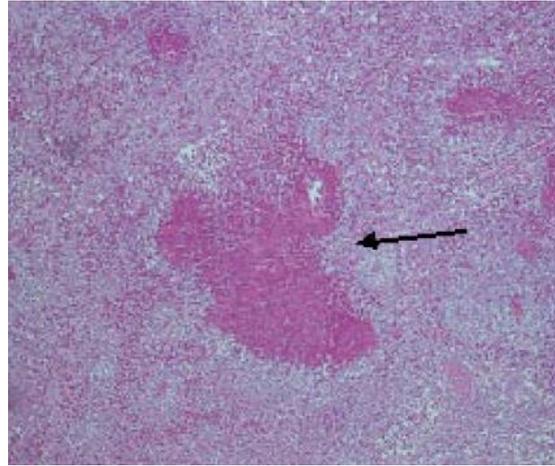


Fig. 17. Dermis. Fenómeno de Splendore Hoeppli (flecha). Hematoxilina y Eosina. 40X. Fuente: Márquez, 2010.

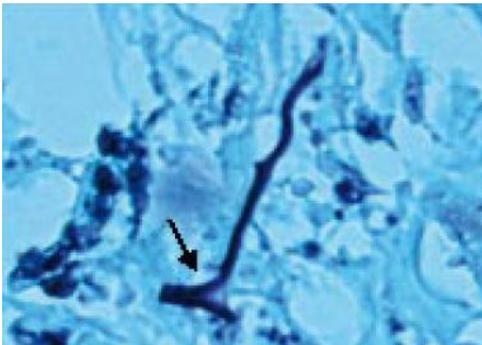


Fig. 18. Dermis. Hifas de *P. insidiosum* ramificadas en 90° (flecha) y pobremente tabicada. Metenamina de plata de Grocott. 100X. Fuente: Márquez, 2010.

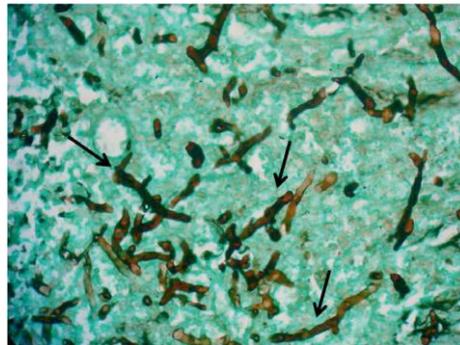


Fig. 19. Tinción de Grocott, mostrando estructuras ramificadas y ocasionalmente septadas de color café oscuro. Fuente: Cardona, 2010.

3.7.5 Inmunohistoquímica

Prueba de laboratorio en la cual se usan anticuerpos a fin de identificar ciertos antígenos en una muestra de tejido. Por lo general, los anticuerpos están unidos a una enzima o a un tinte fluorescente. La enzima o el tinte se activan cuando los anticuerpos se unen al antígeno en la muestra de tejido, de esa manera el antígeno se puede observar al microscopio. Esto posibilita la visualización del agente, juntamente con la lesión.

El diagnóstico de pitiosis por esta técnica utiliza muestras de tejido cutáneo infectado, previamente fijadas en formol al 10% e incluidas en parafina y procesadas rutinariamente para histopatología.

Las biopsias conteniendo “*kunkers*” son fijadas en solución de formol neutro al 10%, por uno o dos días, escindidas y procesadas rutinariamente e incluidas en parafina. Los cortes histológicos destinados a inmunohistoquímica son montados en láminas, previamente tratadas con solución de gelatina 0.3% y adheridos a este medio por calor (60°C), durante 24 hs y por último las láminas son sometidas a inmunohistoquímica, utilizándose el método Estreptidina-biotina marcada (LSAB).

La desparafinización se realiza en estufa a 60°C durante 30 minutos, luego los cortes deben ser hidratados en soluciones de silol I y II, permaneciendo 10 minutos en cada solución y con pasajes sucesivos a cada dos minutos en alcohol 100%, 90%, 80%, 70% y posteriormente son lavados en agua destilada por 10 veces. Luego se realiza el bloqueo de la peroxidasa endógena por la incubación de las láminas con peróxido de hidrógeno al 3% en agua destilada, durante 15 minutos a temperatura ambiente y las muestras son nuevamente lavadas en agua destilada. Por otro lado, el bloqueo de las proteínas inespecíficas es realizado incubándose los cortes con leche en polvo desnatado al 5%, diluido en solución tampón de fosfato (PBS) durante 15 minutos. La recuperación antigénica se realiza con solución tampón de citrato de sodio a 10 mM, con pH 6 mediante calor (microondas potencia máxima) por 2 minutos y si es necesario, se le añade mas solución tampón para evitar la evaporación. Luego de 5 minutos destinados a la refrigeración de la muestra, se realiza un nuevo lavado en agua destilada.

La incubación con el anticuerpo primario policlonal anti-*P. insidiosum* producido en conejos se realiza en una dilución de 1:100, en solución tampón PBS, mantenida por una hora a 37°C en estufa y luego un nuevo lavado con agua destilada. Después de este procedimiento, se incuba el complejo Estreptidina-biotina (LSAB) con el anticuerpo secundario biotinilado universal durante 20 minutos en temperatura ambiente. Enseguida, se realiza un lavado con solución tampón TBS (solución TRIS salina tamponada) e incubación por estreptidina también por 20 minutos a temperatura ambiente y lavado con agua destilada. La revelación de la reacción fue realizada con el cromógeno diamino benzidina (DAB) durante 5 a 10 minutos, seguido del lavado en agua destilada. La contra coloración de los cortes fue realizada con hematoxilina de Harris, con permanencia de 1 minuto. Las láminas deben ser lavadas en agua corriente y pasar por deshidrataciones sucesivas a cada 1 minuto en baños de alcohol 70%, 80%, 90%, 100% y soluciones de silol III y IV.

El anticuerpo primario es producido en conejo por medio de una única inoculación de 20.000 zoosporos de *P. insidiosum*, vía subcutánea, sin la

utilización de adyuvantes. Se realizan colectas de sangre cada 14 días y la cuantificación de los anticuerpos es realizada por la técnica de ELISA. El suero utilizado corresponde a la colecta en el día 45. Las láminas coloreadas son analizadas en microscopía de luz.

La inmunomarcación positiva es caracterizada por la visualización de estructuras ramificadas y septadas. Esta técnica es considerada de alta especificidad en el diagnóstico de pitiosis, la probabilidad de falsos positivos es pequeña, ya que las pseudo hifas presentan moléculas antigénicas con epítomos específicos del reino Stramenofila no encontradas en las hifas de los hongos zigomicetos (Doria y col., 2014).

Esta técnica es de ayuda en los casos que se sospecha de pitiosis y el aislamiento no es obtenido (Pedroso y col., 2009).

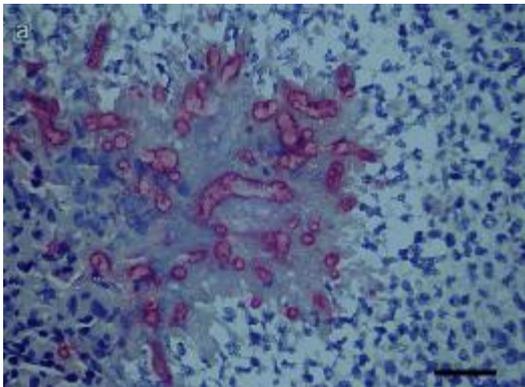


Fig. 20. Pitiosis cutánea equina. Hifas de *P. insidiosum* de la periferia de un kunker. Fuente: Martins, 2012.

3.7.6 PCR: Método de biología molecular

La técnica de amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que consiste en la amplificación in vitro de un fragmento de ADN específico. Para llevar a cabo el experimento de amplificación es necesario conocer, al menos parcialmente, la secuencia del fragmento a amplificar (un gen, una parte de un gen, una región no codificadora, etc.). Básicamente, se trata de replicar una y otra vez un mismo fragmento de ADN y, para ello, debemos realizar in vitro lo que hacen las células in vivo para replicar su ADN.

La PCR anidada conocida como Nested PCR es una variante de la PCR convencional que comprende dos rondas de amplificación con distintos pares de primers en cada una, con el fin de incrementar la sensibilidad y la especificidad de la detección. Primero se realiza una reacción con los primers externos para amplificar una región de ADN más extensa que contiene el segmento diana. Después, este producto de amplificación se utiliza como

molde de una segunda PCR con los primers internos para amplificar la región específica.

Las muestras para la extracción del ADN para el diagnóstico de pitiosis se realizan a partir de los “*kunkers*” y de tejidos infectado. Éstas son almacenadas durante la noche en nitrógeno líquido. La extracción de ADN es realizada por el siguiente método: las muestras son maceradas en un mortero estéril y resuspendidas en buffer (100mM Tris – Cl, 50mM EDTA, 2% SDS, 1% 2-Mercaptoetanol), 10% STAB, y 5N de NaCl. Luego de la homogenización, las muestras son incubadas a 65°C por 45 minutos y luego a 37°C por 15 minutos.

Las muestras fueron precipitadas con 0,55 volúmenes de alcohol isopropílico, centrifugadas 10 minutos a 13.000 rpm e incubadas con alcohol etanol al 70% por 3 minutos en un lugar a temperatura ambiente y centrífugado por 3 minutos a alta velocidad. El ADN es resuspendido en 100 µl de buffer tris- EDTA estéril, y una alícuota de 30 µl e incubado con 100 µg / ml de RNase A (Invitrogen) a 37°C por 30 minutos. El mismo protocolo de extracción de ADN es aplicado a las muestras control. La calidad y la concentración de las muestras de ADN deben ser verificadas por electroforesis.

3.7.6.1 PCR anidado

El PCR anidado es un método diagnóstico importante, rápido, de alta sensibilidad y especificidad para la identificación del agente de la pitiosis endémica y experimental. Se puede utilizar como una técnica adicional en casos de que el cultivo no logre identificar el agente.

Un estudio realizado en el año 2010 por Botton, Pereira y col. en Brasil, tuvo como objetivo evaluar la aplicación del PCR anidado en el diagnóstico de *P. insidiosum* para detectar directamente su ADN en lesiones clínicas en equinos y lesiones experimentales en conejos.

Este PCR fue modificado y usado para amplificar parte de una región ADN_r. En la primer ronda de PCR, regiones espaciales internas transcritas (ITS1, 5.8S ARN y ITS2), fueron amplificadas usando los primers de hongos universales ITS1 y ITS4. Para amplificar un fragmento más largo, se utilizó el primers ITS4 en lugar del ITS2. Las amplificaciones fueron realizadas en 25 µl de reacción, conteniendo 50 ng de ADN templado, 3 µM de cada primers (Invitrogen), 100µM de una mezcla de dNTP, 2 mM de MgCl, 2,5 unidades de Taq ADN polimerasa y 2,5 µl de 10 X enzimas buffer.

El templado son las cadenas de ADN que se separan y funcionan como molde, para que la enzima sintetice las nuevas cadenas que llevan la secuencia blanco de interés. Ésta es la ADN polimerasa encargada de la catálisis de la reacción, la enzima más usada se llama Taq ADN polimerasa. Los primers son secuencias de oligonucleótidos que delimitan la secuencia blanco que se desea

amplificar y son complementarios a ésta. Por su parte, dNTP's son las bases nitrogenadas con los que la Taq polimerasa construye las nuevas cadenas de ADN y el magnesio es un cofactor enzimático que influye en la especificidad de la reacción.

Todas las amplificaciones fueron llevadas a cabo en un termociclador programable. Los parámetros para la primer ronda del PCR fueron desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos, 32 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, donde las cadenas de ADN son calentadas y separadas, luego hibridación a 57°C por 30 segundos, en esta etapa los primers se alinean al extremo 3' del templado separado anteriormente e hibridan con su secuencia complementaria, se continúa con una extensión a 72°C por 30 segundos y una extensión final a 72°C por 10 minutos. En esta última etapa de extensión, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5' a 3'.

Para la segunda ronda de amplificación de PCR, los productos (incluidos los controles positivos y negativos) fueron diluidos 1:50 con agua destilada estéril, y 5 µl fueron usados como modelo usando los primers específicos de *P. insidiosum*: PI 1 y PI 2. Estos primers corresponden a un segmento del gen ADNr ITS1. Las reacciones de PCR fueron realizadas de la misma manera que las descritas anteriormente y los siguientes parámetros: desnaturalización inicial a 94 °C por 3 minutos, 28 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, luego la hibridación a 65°C por 30 segundos, continuando con 72 °C por 30 segundos y una extensión final 72°C por 10 minutos. Una alícuota de 10µl de cada reacción de las dos rondas de amplificación de PCR fueron sometidas a electroforesis, para corroborar que se amplificó la secuencia blanco de interés correctamente.

Luego de la amplificación de PCR anidado, el 64.28% (18/28) de conejo muestras y el 100% (21/21) de las lesiones equinas fueron clasificadas como positivo. En la primer ronda de PCR se produjeron amplicones con aproximadamente 800 BP de tamaño. En la segunda ronda amplicones de 105 BP fueron observados, lo que confirmó estudios anteriores como el realizado por Grooters y Gee en el 2002.

Esta técnica es especialmente útil para detectar *P. insidiosum* en cultivos en los cuales previamente no se pudo identificar al agente en base a las características morfológicas. Además provee un diagnóstico más rápido que los cultivos, ya que estos últimos pueden demorar incluso más de 3 días para que se visualicen estructuras. Los resultados sugieren que el PCR anidado es una

importante y eficiente herramienta para diagnóstico de la forma endémica y la forma producida experimentalmente.

La desventaja de esta técnica en los equinos, es que los “*kunkers*” contienen las hifas dentro de ellos, lo que dificulta la extracción del ADN, limitando de esta forma, el procedimiento diagnóstico por dicha técnica. Por otro lado, se necesita equipamiento costoso y personal especializado (Botton y col., 2011).

3.7.7 ELISA indirecto (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas)

Método analítico, que depende de la reacción antígeno- anticuerpo, en el cual se determina la concentración de antígeno o la concentración de anticuerpo, mediante el uso de uno de ellos inmovilizado en fase sólida y el otro en solución.

En el caso de ELISA indirecto, se utiliza para la detección de anticuerpos en muestras de suero, utilizando un anticuerpo primario anti-antígeno y uno secundario anti primario marcado.

La preparación del antígeno se puede realizar a partir de fragmentos de cultivo de *P. insidiosum*, los cuales son inoculados en caldo Sabouraud Dextrosa a 37°C bajo agitación de 120 rpm durante 6 a 7 días. El cultivo luego de la inactivación con timerosal al 0,02% es filtrado. La masa fúngica retirada es pesada y resuspendida (1g de masa fúngica/5ml de PBS) en tampón fosfato 0,02M pH 7,4. La masa es sonicada (23Watts con pulsos de 30 segundos durante 3 minutos) en baño de gel. El material resultante de la sonicación es centrifugado a 70.000 rpm durante 15 minutos y el sobrenadante obtenido es colectado como antígeno soluble. La concentración de proteínas es determinada por el método de LOWRY modificado, usando albúmina bovina como padrón (1 mg/ml). Éste es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas.

Para la sensibilización de las placas, se utilizan placas de poliestireno de 95 pocillos de fondo plano, éstas son sensibilizadas con antígeno soluble (10 mg/pocillo) diluido en tampón carbonato 0,05M pH 9,6 e incubadas por la noche a 4°C para adsorción del mismo en la superficie de la placa. Luego de la incubación, las placas son lavadas con tampón PBS 0,02M pH 7,2 secadas a 37°C por 10 minutos y almacenadas a 4°C hasta el momento de su uso.

Posteriormente para la realización del test, las placas son inicialmente bloqueadas con 100µl de solución de albumina bovina 0,2% por pocillo e incubadas a 37°C/1hora. Los sueros a testear deben ser diluidos en PBS pH 7,2 (1:2000), distribuidos en las placas (100µl/pocillo) e incubados por 1 hora a 37°C. Cada muestra testeada es sometida a dos repeticiones por placa y 5 repeticiones interplacas totalizando 10 repeticiones por muestra. Luego de la

incubación con anticuerpo primario las placas son lavadas 4 veces con solución de lavado (PBS 7,4 con 0,05% de TWEEN 20) y sometidas a incubación con anticuerpo secundario específico (anti-IgG conjugado con peroxidasa), en dilución 1:10000. A continuación, las placas son nuevamente lavadas para finalmente recibir 100µl de sustrato cromogénico (Orthophenylene-diamine, OPD) diluido en tampón citrato-fosfato 0,15M pH 5. Pasados 15 minutos, la reacción es bloqueada con 10µl de H₂SO₄ 4N, y la lectura es realizada es espectrofotómetro de microplacas, con filtro de 400nm (Santurio y col., 2006).

La técnica de ensayo inmunoenzimático indirecto, es un diagnóstico inmunológico, que permite la detección de infecciones precoces e incluso subclínicas. Esta capacidad es fundamental para detectar infecciones en la fase inicial, favoreciendo el pronóstico (Mendoza y Kaufman, 1997).

El diagnóstico de pitiosis es relativamente fácil en casos crónicos, sin embargo lesiones cutáneas iniciales o sistémicas son de difícil detección por los métodos tradicionales e influyen decisivamente en el uso del tratamiento (Leal y col., 2001).

La técnica de ELISA detecta anticuerpos específicos con alto grado de sensibilidad y especificidad, siendo de ejecución relativamente rápida y fácil. Sin embargo, uno de los puntos críticos para el éxito de la técnica está en la preparación del antígeno (Cardona y col., 2013).

El desenvolvimiento de una técnica de ELISA, significa un avance para el diagnóstico de pitiosis, permitiendo también el monitoreo de la respuesta humoral en animales infectados y el tratamiento por inmunoterapia (Mendoza y col., 1997).

3.7.8 Inmunodifusión

Método de estudio basado en la difusión de un antígeno y un anticuerpo en un gel, generalmente agar, con la subsiguiente formación de un inmunoprecipitado, en el caso de que el anticuerpo sea específico para el antígeno en cuestión.

Esta prueba diagnóstica es específica para la pitiosis en humanos y animales, pero de todos modos, no tiene la sensibilidad necesaria para detectar todos los casos de pitiosis, especialmente los casos en perros y humanos con la forma subcutánea, intestinal y venosa.

Dentro de las técnicas serológicas se han realizado varios estudios comparativos entre la técnica de inmunodifusión y ELISA, como por ejemplo Mendoza y Kaufman, 1997; Krajaejun y Kunakorn, 2002, cuyos resultados indicaron que la inmunodifusión era altamente específica pero tenía una

sensibilidad pobre, mientras que el ELISA tenía tanto alta sensibilidad como especificidad. Por lo tanto, ELISA es la técnica serológica más confiable y por ende, la más utilizada.

3.7.9 Inmunocromatografía

La inmunocromatografía se basa en la migración de una muestra a través de una membrana de nitrocelulosa. La muestra es añadida en la zona del conjugado, el cual está formado por un anticuerpo específico contra uno de los epítomos del antígeno a detectar y un reactivo de detección. Si la muestra contiene el antígeno problema, éste se unirá al conjugado formando un complejo inmune y migrará a través de la membrana de nitrocelulosa. Si no, migrarán el conjugado y la muestra sin unirse.

Técnica que se encuentra actualmente en desarrollo, para el diagnóstico de pitiosis en humanos.

En el año 2009, Krajaejun y col., realizaron un estudio comparativo entre las pruebas serológicas de inmunodifusión e inmunocromatografía, basado en el diagnóstico de Pitiosis en humanos. Dentro de las conclusiones se destacó que la inmunocromatografía presenta un 88% de sensibilidad y 100% de especificidad, mientras que la inmunodifusión como ya se nombró anteriormente presenta baja sensibilidad (61%) y alta especificidad (100%). Se destacó que la inmunocromatografía es una técnica rápida (menos de 30 minutos), fácil, que se puede realizar a campo y confiable para el diagnóstico precoz.

3.7.10 Western Blot

El análisis del Western Blot fue introducido para determinar cuál de los antígenos de *P. insidiosum* era de importancia durante la infección. Se encontró que la IgG equina reconocía la mayoría de las proteínas citoplasmáticas del *P. insidiosum*. Varias proteínas antigénicas (28, 30 y 32 kDa) y otros inmunógenos fueron encontrados como inmunodominantes. Para los resultados negativos del WB se utilizaron sueros de caballos sanos o de caballos con otras enfermedades. Las IgG dirigidas a los antígenos 32, 30 y 28 kDa y otros antígenos inmunodominantes fueron encontrados como persistentes por lo menos un año luego en caballos curados con inmunoterapia. Esto sugiere que estos antígenos prominentes pueden ser importantes protectores inmunógenos en los caballos. Luego se encontró que la adición de antígenos citoplasmáticos conteniendo proteínas inmunodominantes 28, 30 y 32 kDa en la vacuna disponible para pitiosis mejoró sus propiedades curativas (Mendoza y col., 2003). Este hallazgo sugirió que

estas proteínas pueden tener un rol importante en la inmunoterapia. En los casos crónicos de pitiosis, el WB falla en la detección de antígenos citoplasmáticos indicando que la IgG anti-*P. insidiosum* está ausente en suero. Esto apoya el concepto de que los caballos con infección crónica son anérgicos. Este tests es útil para analizar las clases de inmunoglobulinas durante la infección, recientemente este ensayo muestra que es sensible, específico y fácil de realizar (Rosa, 1993).

3.8 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Es preciso establecer los diferenciales de la enfermedad, debido a que el diagnóstico clínico muestra ser aparentemente sencillo, pero a menudo es diagnosticado erróneamente como habronemiasis; neoplasias, especialmente sarcoide y carcinoma de células escamosas; tejido de granulación exuberante; granuloma bacteriano; conidiobolomicosis; y basidiobolomicosis (Reis y col., 2003).

Las lesiones cutáneas causadas por habronemiasis son pruriginosas y también contienen concreciones, siendo éstas más pequeñas que los “*kunkers*” observados en lesiones causadas por *P. insidiosum*. Al examen histológico en tejido de lesiones por habronemiasis se pueden observar larvas de nematodos. Las lesiones de habronemiasis desaparecen espontáneamente al comienzo del clima frío.

La localización geográfica de dónde se encuentran los caballos y la zona en la cual aparecen las lesiones, ayuda a un diagnóstico diferencial más preciso. Las lesiones causadas por *P. insidiosum* ocurren más comúnmente en la parte distal de las extremidades, y la parte ventral del tórax y abdomen. Las lesiones causadas por *Basidiobolus haptosporus* ocurren más comúnmente en el lado lateral del tronco, tórax, cuello, y cabeza, no hay reportes de lesiones en las extremidades. Las lesiones causadas por *Conidiobolus coronatus* ocurren dentro de la cavidad oral, nasal y la faringe.

Histológicamente, las lesiones piogranulomatosas de basidiobolomicosis y conidiobolomicosis se separan del tejido conectivo subyacente por una banda ondulante característica de tejido granulomatoso de color amarillo compuesto por hifas fúngicas y eosinófilos mientras que *P. insidiosum* no causa estas bandas amarillas ondulantes. La morfología de las hifas también puede ayudar a diferenciar la pitiosis de otras formas de ficomicosis. Las hifas de *C. coronatus* y *B. haptosporus* son generalmente más grandes y más comúnmente septadas que las de *P. insidiosum* (Miller y Campbell, 1984).

La diferenciación con el tejido de granulación y las neoplasias es fundamentalmente por histopatología. El tejido de granulación es muy rico en

fibroblastos, vasos sanguíneos y colágeno. En todas las biopsias de tejido tumoral teñidas con la coloración de H-E, se observan características histopatológicas similares entre ellas, las cuales consisten en hiperqueratosis, acantosis e hiperplasia epidérmica con formación de largas proyecciones o papilas epiteliales en dirección a la dermis. También se observa proliferación dérmica densa de fibroblastos, así como los fibroblastos de la unión dermo-epidérmica orientada perpendicularmente en la región de la membrana basal. Se consideran también las características clínicas y la ausencia de “*kunkers*” (Colahan y col., 1998).

3.9 TRATAMIENTO

Han sido instaurados varios tratamientos, métodos químicos (antifúngicos), quirúrgicos e inmunoterápicos. La elección del mismo está influenciado por el tamaño, localización y la cronicidad de las lesiones, así como la edad, el estado nutricional y fisiológico del animal. En la mayoría de los casos se utilizan terapias combinadas (Cardona y col., 2013).

3.9.1 Tratamiento quirúrgico

La intervención quirúrgica requiere la remoción de toda el área afectada, con un margen de seguridad para evitar las recurrencias, ya que éstas pueden ser frecuentes. Esta opción terapéutica se ve dificultada por las estructuras anatómicas involucradas, principalmente los miembros.

La escisión quirúrgica es considerada el método más exitoso, debido a que de esta forma se puede remover todo el tejido infectado. Esta técnica, en la mayoría de los casos es combinada con otras terapias, como la inmunoterapia, fármacos sistémicos o tópicos (Cardona y col., 2013).

La maniobra se realiza bajo anestesia general. Se comienza con un derribo farmacológico administrando un sedante (ej. Xilacina 1,1 mg/kg al 10% IV) y luego de 5 minutos un anestésico disociativo (Ketamina 2,2 mg/kg al 5% IV), esto produce la caída del animal pasando 40 a 60 segundos aproximadamente. Por último se procede a colocar el triple goteo intravenoso (formulado por 1 litro de suero glucosado, 50 gr de Ester Gliceril Guayacolato, 500 mg de Xilacina 10%, 1gr de Ketamina 5%) previendo relajación muscular y mantenimiento anestésico (Doherty y Valverde, 2006).

Luego continuamos con el posicionamiento del paciente de acuerdo al sitio de lesión. Ésta se prepara de forma aséptica, utilizando clorhexidina 0,05%, yodopovidona iodada 1% y alcohol 70%. En los casos en los que la lesión se localiza en miembros, se debería colocar un torniquete proximal a la región, para prevenir las hemorragias.

De esta manera se lleva a cabo la escisión quirúrgica de la lesión, y luego dependiendo de la extensión se pueden realizar incisiones de relajación, socavación y fijación de un colgajo de avance de la piel para cerrar la herida más ancha. En el caso de lesiones viejas y extensas, está permitido que cierren por segunda intención.

Las lesiones son localizadas en la mayoría de los casos, en ventral de tórax, abdomen, pecho, miembros anteriores y posteriores. Las masas a extirpar pueden variar en forma, tamaño y profundidad, siendo esto lo que limita, en algunos casos, la aplicación de esta técnica.

El resultado exitoso del tratamiento a través de la escisión quirúrgica de la Pitiosis parece depender del tamaño, el sitio, la cronicidad de la lesión y el estado fisiológico del animal. En un estudio, las lesiones menores a 15 cm de diámetro con una duración de meses, a través de la escisión quirúrgica llevó a la completa mejora del animal sin complicaciones (Mosbah y col., 2011).

Los cuidados post-quirúrgicos incluyen el uso de vendajes sobre la herida, desinfección cada 3 a 4 días y uso de antiinflamatorios.

El material escindido debería ser remitido al laboratorio para el análisis histopatológico, y así obtener un diagnóstico más preciso.

3.9.2 Tratamiento farmacológico

3.9.2.1 Tratamiento con Anfotericina B

La anfotericina B es un antibiótico macrólido poliénico, de amplio espectro obtenido por fermentación del *Streptomyces nodosus*, un actinomiceto del suelo. Éste se une a los esteroides de la membrana celular del microorganismo, interrumpiendo su integridad osmótica, resultando en la fuga de electrolitos intracelulares (potasio, sodio, magnesio, cloro) y también metabolitos esenciales, nucleótidos y proteínas que causan la muerte del agente.

En teoría la anfotericina B no debería actuar contra el *P. insidiosum* debido a que este carece de ergosterol (al componente que se une este fármaco) en la membrana citoplasmática (Cardona y col., 2013).

Se han hecho ensayos con la administración de anfotericina B vía regional intravenosa sola o combinada con Dimetil Sulfóxido (DMSO) y por vía tópica también combinada con DMSO (Doria y col., 2011).

3.9.2.2 Antibioticoterapia Regional Intravenosa con anfotericina B y DMSO

La ARI es una técnica indirecta que consiste en la infusión de una droga en una vena periférica aislada de la circulación sistémica mediante el uso de un

torniquete. Las drogas llegan a los tejidos dañados por difusión de capilares cercanos debido al alto volumen de infusión, la alta concentración de la droga y por la alta presión intravascular establecida por el torniquete el cual genera un aumento del gradiente de concentración entre tejidos y el espacio intravascular. Esta técnica maximiza la difusión de las drogas a los fluidos sinoviales, hueso y tejidos blandos, así como también a los tejidos poco vascularizados, donde los patógenos normalmente se encuentran protegidos. La perfusión regional con antibióticos es considerada efectiva tratando infecciones en el aspecto distal de los miembros (Doria y col., 2011).

El tratamiento de los caballos con infección de miembros por *P. insidiosum* es todo un reto y su efectividad parece depender de determinados factores, el lugar y tamaño de la lesión, duración de la infección, la inmunocompetencia y el tipo de tratamiento elegido. Las drogas antifúngicas administradas sistémicamente como el yoduro de potasio y de sodio, ketoconazol, miconazol, fluconazol, itraconazol y anfotericina B, han sido administradas con o sin la escisión quirúrgica de la lesión. De todos modos, estas drogas son consideradas peligrosas y caras cuando son administradas sistémicamente y debido a que el *P. insidiosum* no es un hongo verdadero, el organismo ofrece una marcada resistencia a la mayoría de los agentes antifúngicos actualmente disponibles (Cardona y col., 2013).

Se ha reportado que la perfusión regional intravenosa del miembro, con anfotericina B es efectiva para el tratamiento de caballos con lesiones cutáneas en miembros, resolviendo la infección y con complicaciones controlables, como edema del miembro, signos de dolor durante la palpación del miembro, y la inflamación en el sitio de venopunción.

Se realizó un estudio por Doria y col en 2011, donde se demostró que la gran mayoría de los caballos afectados y con presencia de tejido de granulación exuberante en el aspecto distal del miembro torácico pélvico que fueron tratados con perfusión regional intravenosa de anfotericina B, tuvieron una resolución completa de su lesión 35 días luego de un tratamiento o 60 días luego de dos tratamientos. Se considera que la perfusión regional intravenosa es una terapia adjunta efectiva a la escisión quirúrgica y la termocauterización en el tratamiento de caballos con pitiosis en la porción distal del miembro.

Se ha hipotetizado que se pueden alcanzar mejores resultados y con menos complicaciones si se le adiciona DMSO a la perfusión, ya que éste ayuda a alcanzar mayores concentraciones de anfotericina B en los tejidos infectados. Además, al ser un potente antiinflamatorio, reduce la inflamación en el sitio de administración intravenosa a través la supresión de la producción de prostaglandina y atrapa los radicales libres.

El DMSO también posee algunos efectos inhibitorios en el crecimiento de una variedad de hongos, como resultado de su efecto en la respuesta inmune, y

también como resultado de la reducción de endotoxinas inducidas por el daño tisular. Se ha demostrado que la administración intravenosa de DMSO produce una dilatación vascular y un aumento del flujo de la sangre. Estas propiedades asociadas con su habilidad para penetrar membranas biológicas, da razones para combinarlo con una droga antifúngica para la perfusión regional intravenosa del miembro. Dicho esto, este estudio evaluó los efectos de administrar anfotericina B en una solución de DMSO al 10% por perfusión regional intravenosa como una terapia adjunta a la escisión quirúrgica, deseando disminuir los efectos de deterioro vascular asociados con la administración de anfotericina B.

Luego de la escisión quirúrgica como se nombró anteriormente, se procedió a la perfusión regional intravenosa. Para llevar a cabo ésta, se le aplica a proximal de la lesión un torniquete Esmarch, y se ubica una vena superficial (vena cefálica, digital palmar, safena, digital plantar o la vena digital dorsal), próxima a la lesión y distal al torniquete, la vena elegida se cateteriza usando un catéter 20, 22, 24G para la administración de las drogas. Se inyectan 60ml de una solución, conteniendo 50 mg (10ml) de anfotericina B, 6 ml de DMSO y 44 ml de una solución de ringer lactato. Se administra de forma lenta utilizando una jeringa de 60 ml conectada a un infusor. Luego de la administración, el catéter es removido y se aplica presión manualmente en el sitio de venopunción. El torniquete es liberado 45 minutos luego de finalizada la inyección, de forma lenta.

Los estudios han encontrado que mediante la administración de esta droga de forma local, la concentración de ésta en el sitio de la infección puede ser aumentada sin llegar al riesgo de una concentración tóxica.

En este estudio las lesiones fueron evaluadas antes del tratamiento y semanalmente, luego de la administración de anfotericina B y DMSO hasta que las lesiones fueron completamente curadas. Al mismo tiempo, se sacaron muestras de sangre para análisis de laboratorio como hemograma y bioquímica sanguínea.

Los resultados fueron beneficiosos resultando en la completa resolución de las lesiones aproximadamente luego de dos meses. En ninguno de los casos se observaron complicaciones en los sitios de venopunción, y tampoco se observó recurrencia de la pitiosis hasta luego de un año de la resolución de la enfermedad, incluso en los casos en los que no se removió la totalidad del tejido infectado.

Respecto a los análisis de laboratorio, el hemograma mostró un aumento del RBC y PCV (hematocrito) luego del tratamiento. La anemia se resolvió luego de dos semanas de la perfusión regional intravenosa, el recuento leucocitario total y diferencial fue significativamente alto antes del tratamiento con neutrofilia y eosinofilia, los cuales disminuyeron y retornaron a la normalidad luego de dos

semanas del tratamiento. Por otro lado, la concentración del fibrinógeno en suero antes del tratamiento disminuyó dos semanas luego de iniciado el mismo. El resto de los valores no mostró ninguna particularidad. No se observaron cambios en las actividades enzimáticas en suero luego de la perfusión regional intravenosa, sugiriendo que la anfotericina B no causó complicaciones sistémicas como disfunción hepática o renal que sí han sido reportadas cuando la anfotericina B es administrada sistémicamente.

De este estudio se concluye que el tratamiento fue exitoso, económico y de fácil realización. La anfotericina B cuando es administrada sistémicamente no llega a concentraciones terapéuticamente efectivas en el sitio de infección por *P. insidiosum* y puede ser asociado a efectos adversos como nefrotoxicidad y anemia. La perfusión regional intravenosa, demostró que es una técnica efectiva para obtener altas concentraciones de droga en el tejido y que la alta concentración de anfotericina B en el tejido infectado mejora la eficacia de la droga contra *P. insidiosum*. Altas concentraciones de anfotericina B perjudica o inhibe los procesos metabólicos esenciales de este oomiceto resultando en la muerte del microorganismo (Doria y col., 2012).

Los tratamientos médicos administrados sistémicamente en los caballos en los casos de pitiosis han sido reportados como poco efectivo cuando las lesiones se localizan en los miembros.

La trombosis local, isquemia, necrosis tisular y la formación de abscesos, las típicas lesiones características de pitiosis, disminuye el suministro de sangre local y esto disminuye el efecto terapéutico de la droga administrada. La inhabilidad de reseccionar completamente la lesión debido a la proximidad de las articulaciones o huesos, dificulta el tratamiento y favorece la persistencia de la infección.

Las complicaciones asociadas con la perfusión regional intravenosa de anfotericina B como el edema del miembro, sintomatología de dolor durante la palpación e inflamación en el sitio de venopunción, fueron locales y resueltas.

Se reportó que la escisión del tejido exuberante de granulación por sí sola no es suficiente para resolver la infección del miembro causada por el *P. insidiosum*. En los casos crónicos la presencia de fibrosis y zonas de cicatrización, aísla al microorganismo de los mecanismos de defensa del hospedador, así como de medicamentos antimicóticos administrados sistémicamente, lo que justifica la administración de drogas por medio de la perfusión regional intravenosa.

El período de curación está relacionado al tamaño de la lesión. Más grande la lesión, más largo el periodo de recuperación.

Se asume que usando una apropiada dosis de infusión, el aumento de la presión intravascular favorece la difusión de la anfotericina B a través de los tejidos y aumenta la concentración de la droga en el tejido afectado y que la combinación con DMSO incrementa la difusión a través de los tejidos afectados, brindando una mejor resolución de la infección que cuando la anfotericina B es administrada sola. En este caso en los animales que se administró anfotericina B junto con DMSO, solo fue necesaria una sola infusión, en contraste con otros estudios en los que solo se administró anfotericina B.

3.9.2.3 Tratamiento con Acetonido de Triamcinolona

El acetonido de triamcinolona es un glucocorticoide sintético y de depósito. Es utilizado como antiinflamatorio e inmunosupresor en la terapia de enfermedades articulares, respiratorias y oculares en caballos, sin embargo, no ha sido utilizada en tratamiento dermatológicos como la pitiosis cutánea. Se realizó un estudio por Cardona y Vargas en 2015 en la Universidad de Córdoba, Colombia, el cual tuvo como objetivo caracterizar clínicamente, micro y macroscópicamente el proceso de cicatrización de la pitiosis cutánea en equinos tratados por este fármaco. Se utilizaron 24 equinos infectados naturalmente con pitiosis cutánea, diagnosticada por el examen físico general realizado durante el proceso de selección y confirmados por la histopatología en las coloraciones de Hematoxilina Eosina (H-E) y Grocott (GSM). Los animales fueron divididos en dos grupos. Un grupo recibió tratamiento intramuscular con 50 mg de acetonido de triamcinolona cada 15 días hasta completar 3 aplicaciones (grupo tratado) y al segundo grupo no se le realizó tratamiento (grupo control). El presente estudio constituye el primer reporte de equinos tratados con este fármaco contra pitiosis cutánea.

A todos los animales (grupo tratado y grupo control) se les realizó evaluación clínica, macro y microscópica hasta la recuperación completa del granuloma en el grupo tratado. Adicionalmente, en los animales con lesión en la parte distal de los miembros, fueron realizadas proyecciones radiológicas para evaluar el grado de compromiso óseo y fibrosis tisular.

Los resultados revelaron una disminución marcada de las características clínicas en el grupo de animales tratados. Se constató una disminución del prurito aproximadamente a los 11 días, salida de “*kunkers*” a los 13 días, secreción fibrinosanguinolenta a los 14 días y presencia de trayectos fistulosos a los 15 días. Aproximadamente a los 16 días de iniciado el tratamiento se presentó ausencia de signos clínicos y comenzó la formación de la costra y al cabo de 60 días cerraron completamente las heridas. Ninguno de los animales control presentó mejoría y se mantuvieron iguales durante todo el estudio.

Histológicamente, previo al tratamiento se realizaron biopsias y tinciones con H-E, observándose la presencia de intensa proliferación de tejido conjuntivo dispuesto en forma irregular, numerosos fibroblastos y fibras colágenas. Además, marcada infiltración inflamatoria piogranulomatosa, con infiltración de polimorfonucleares principalmente eosinófilos y neutrófilos, presencia de masas necróticas multifocales y el fenómeno Splendore-Hoeppli (SH), lo que corresponde a una dermatitis piogranulomatosa eosinofílica difusa multifocal. En la coloración de Grocott se observaron estructuras ramificadas, ocasionalmente septadas, de color marrón oscuro, con paredes lisas y paralelas, que algunas veces forman ángulos de 90° lo que corresponde a pseudo hifas intralesionales características del oomiceto.

Luego de iniciado el tratamiento se observó que en el grupo tratado, a medida que avanzaba la recuperación del granuloma, disminuyó el proceso inflamatorio, evidenciado por la disminución progresiva de PMN, fibrina, fenómenos de SH, así como el aumento de vasos sanguíneos y tejidos conjuntivo. En el grupo control se mantuvo la dermatitis granulomatosa difusa multifocal con infiltrado inflamatorio intenso, edema y congestión focalizada, así como ausencia de epitelio y formación de una camada fibrino leucocitaria durante todo el estudio (Cardona y col., 2016).

El mecanismo de acción del acetónido de triamcinolona en el caso de la pitiosis cutánea equina aún es incierto, aunque los corticosteroides tienen una variedad de funciones metabólicas, endócrinas e inmunológicas. Clares (2003) y Morato (2006) exponen que el mecanismo de la actividad antiinflamatoria y antialérgica de los corticoesteroides tipo glucocorticoide, es la inducción de las proteínas inhibitoras de la fosfolipasa A2, colectivamente denominadas lipocortinas. Se postula que esas proteínas controlan potentes mediadores de la inflamación como las prostaglandinas, tromboxanos, prostaciclina, leucotrienos y ácidos hidroxieicosatrienoicos, todos sintetizados a partir del ácido araquidónico, cuya liberación es catalizada por la enzima fosfolipasa A2. Como resultado de esta acción, tendrán efectos antiinflamatorios, como atraso en la migración de leucocitos polimorfonucleares, disminución de la fibrinogénesis, disminución de la producción de proteína C-reactiva, supresión de la desgranulación de mastocitos, y efectos inmunosupresores, incluyendo la supresión de los procesos de fagocitosis y reducción del número de eosinófilos y linfocitos.

Por lo tanto, la explicación farmacológica en la recuperación de los equinos con pitiosis tratados con acetónido de triamcinolona se encuentra en el mecanismo de la actividad immuno-moduladora de los glucocorticoides, ya que inhibe la síntesis, liberación y/o acción de citocinas y otros mediadores que promueven la respuesta inflamatoria o inmune.

El acetónido de triamcinolona disminuye la vida media del eosinófilo, bloqueando la síntesis de IL-5 y el factor estimulante de colonias de

granulocitos y macrófagos (GM-CSF), lo que desencadena la apoptosis de estas células. Así el *P. insidiosum* queda expuesto a los neutrófilos y macrófagos, que a la vez eliminan totalmente las hifas del tejido, estimulando la reparación fisiológica de la herida. Adicionalmente, los glucocorticoides prolongan la supervivencia de los neutrófilos y disminuyen la apoptosis de estas células (Meagher y col., 1996).

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, se pudo concluir que el acetinado de triamcinolona fue efectivo en heridas granulomatosas por pitiosis. Se observó una recuperación clínica en todos los animales tratados. Por lo tanto, se puede recomendar el uso del acetinado de triamcinolona como una buena alternativa terapéutica en el tratamiento de esta enfermedad (Cardona y col., 2017).

3.9.3 Tratamiento con Inmunoterapia

La inmunoterapia es un tratamiento que se basa en la inyección de antígenos de *P. insidiosum* derivados de cultivos *in vitro*, dando buenos resultados en el manejo de esta patología tanto en humanos como en caballos, siendo además para ambos un tratamiento seguro. Las propiedades curativas se le atribuyen al cambio de respuesta de Th2 a Th1. Miller, en 1981 fue el primer investigador en reportar que los antígenos de *P. insidiosum* derivados de cultivos poseían propiedades terapéuticas cuando eran inyectados en caballos, dando como resultado la curación del 50% de los animales tratados.

En un reporte posterior, Miller en 1985 se cuestionó la efectividad del tratamiento inmunológico cuando algunos caballos parecían no responder a este tratamiento.

Otros investigadores reportaron que los inmunógenos de *P. insidiosum* no resultaban 100% efectivos en los casos crónicos (Mendoza y Villalobus, 1992).

En trabajos posteriores, con el mismo antígeno que fue utilizado por Miller y aquellos utilizados por Mendoza, se demostró que el 100% de los casos de estadios tempranos de la enfermedad (lesiones de menos de 20 días) fueron curadas, mientras solo un 20 al 40% de los casos crónicos respondieron a la inmunoterapia (lesiones de más de 2 meses).

Desde entonces, la inmunoterapia ha sido utilizada exitosamente en más de 500.000 casos de pitiosis en equinos. Usando una nueva formulación de inmunoterapia, Mendoza en el 2003 reportó 60% de efectividad en los caballos sujetos solo a inmunoterapia. La combinación del desbridamiento quirúrgico del tejido afectado seguido por inmunoterapia, aumentó el rango de curación aproximadamente a 90% cuando es utilizado en casos crónicos y severos. En adición, la inmunoterapia se considera exitosa en ganado con pitiosis, en

contraste a los resultados obtenidos en perros y gatos, en los cuales no es efectivo en la mayoría de los casos.

La causa de la falla de la inmunoterapia en perros y gatos es desconocida, pero una explicación de ésta puede ser que en estos animales el diagnóstico de la enfermedad es tardío, con una infección ya acentuada, sistema inmunitario debilitado y por lo tanto una respuesta a la inmunoterapia pobre (Hensel y col., 2003).

Por otro lado, la inmunoterapia ha sido testeada de forma exitosa en pacientes humanos en Tailandia sufriendo pitiosis arterial (Wanachiwanawin y col., 2004).

En la infección natural, se cree que los exoantígenos de *P. insidiosum* son procesados por las células presentadoras de antígenos y presentados a las células Th0. Las células Th0 se diferencian a Th2 expresando grandes cantidades de IL-5, IL-4 y otras citoquinas. La IL-4 puede estimular las células B para producir IgE y también precipitar IgG e IgM, detectadas en la mayoría de los ensayos serológicos. Por otro lado, la IL-5 e IgE estimulan células mastocíticas y eosinófilos para migrar al sitio de infección. Estas células inflamatorias se desgranulan alrededor de las hifas (fenómeno SH) causando daño en los tejidos y enmascarando las hifas de *P. insidiosum* del sistema inmune del hospedero. La IL4 también puede disminuir la respuesta Th1 bloqueando la respuesta del huésped. Luego de la inmunoterapia, los antígenos son procesados por las células presentadoras de antígenos en una forma diferente que la producida en la infección natural. Luego de la presentación, las células Th0 se desarrollan a Th1 expresando grandes cantidades de IFN γ e IL-2 que dispara una respuesta inmune mediada por células mononucleares, incluyendo linfocitos citotóxicos y macrófagos. Se cree que la inmunidad celular es directamente responsable de eliminar las hifas del *P. insidiosum*. Las células B son también estimuladas para producir IgG dando protección a largo plazo. La continua producción de IFN γ disminuye la respuesta Th2 rompiendo el ciclo creado por los exoantígenos durante la infección natural (Mendoza y col., 2003).

La inmunización de equinos con productos derivados de cultivos de *P. insidiosum* fueron reportados presentando propiedades curativas en Australia (Miller, 1981) y Costa Rica (Mendoza y Alfaro, 1986). Hay dos antígenos presentes en la literatura, como las vacunas de Miller y de Mendoza que han sido utilizadas para la inmunoterapia. La vacuna de Miller fue preparada con antígenos de hifas sonicadas, mientras que en la vacuna de Mendoza se utilizó un precipitado de proteínas a partir de un cultivo de antígenos filtrados. La inmunoterapia de caballos con la vacuna Australiana tuvo un éxito del 53%. Un aumento de este porcentaje de curación se obtuvo cuando la inmunización fue acompañada de la remoción quirúrgica. Resultados similares se obtuvieron con la vacuna de Costa Rica. Sin embargo, la vacuna descrita por Miller pierde

sus propiedades curativas luego del almacenamiento a 4°C. En contraste, la vacuna de Mendoza fue considerada efectiva luego de 18 meses luego de su preparación.

Recientemente Mendoza introdujo un nuevo inmunógeno para el tratamiento de pitiosis tanto en humanos como en animales. Esta nueva formulación contiene exo y endoproteínas extraídas de cultivos de *P. insidiosum*, resultando efectiva en estadios agudos y crónicos de enfermedad (Mendoza y col., 2003). Estos estudios sugieren que los antígenos de las hifas pueden contener productos que están involucrados en la mejora de la respuesta inmunológica.

Los caballos con enfermedad que tuvieron una falla en la respuesta inmune no desarrollaron inflamación en los sitios de inyección de la vacuna. Se sugiere que la respuesta a la inmunización no está solo relacionada al estado inmunitario del huésped infectado, sino que también al tipo de inmunógeno utilizado. Una nueva formulación de la vacuna conteniendo una mezcla de exoantígenos e inmunógenos citoplasmáticos, aumentó las propiedades curativas incluyendo la recuperación de los casos crónicos (Mendoza y col., 2003).

Las complicaciones asociadas con la inmunoterapia son principalmente reacción inflamatoria en el sitio de inyección, contaminación bacteriana secundaria y claudicación en caso de lesiones en miembros. Se han reportado que algunos caballos curados por inmunización volvieron a contraer la enfermedad un año después.

Esto sugiere que la vacuna tiene propiedades profilácticas de corta duración. Las propiedades profilácticas de los inmunógenos de *P. insidiosum* han sido evaluados por Santurio y Leal 2003, en un modelo animal. Estos investigadores confirman que los antígenos derivados de este oomiceto presentan propiedades curativas y profilácticas.

Actualmente en Uruguay no hay vacunas disponibles en el mercado, por lo cual para su obtención debemos recurrir al mercado de Brasil. Éste cuenta con el inmunoterápico llamado PITIUM VAC®. La presentación de la misma es en dos frascos para su reconstitución; uno frasco contiene 34mg de proteínas liofilizadas del *P. insidiosum* y un frasco de 2 ml con agua bidestilada estéril.

Para su inoculación se utiliza un frasco reconstituido con 2 ml de agua estéril y previamente agitado vigorosamente durante 3 minutos. Se aplica todo el contenido por vía subcutánea en la región del cuello, sin importar la edad o el peso. El intervalo de aplicación entre una dosis y otra es de 14 días. Deben ser aplicadas hasta la regresión total de las lesiones. Puede aparecer edema en la región de la aplicación, pero éste desaparece naturalmente. El producto no presenta contraindicaciones, siendo su uso exclusivo para equinos.

Esta vacuna está indicada para equinos con lesiones menores a dos meses de duración y el tiempo necesario para conferir inmunidad es de 14 días luego de la aplicación. El tiempo mínimo para obtener la cura del animal va de 1 mes a un máximo de 10 meses. Actualmente el precio de esta vacuna es de R\$ 60 la dosis (55).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general:

- Describir la presentación clínica de un caso de pitiosis cutánea en un equino.

4.2 Objetivos específicos:

- Profundizar conocimientos sobre la pitiosis cutánea, una enfermedad subdiagnosticada en Uruguay, y de gran importancia en los países de la región.
- Analizar los signos clínicos y los exámenes de laboratorio para el diagnóstico definitivo de la misma.
- Evaluar las distintas opciones terapéuticas utilizadas en la actualidad.
- Contribuir con este estudio, para que sea de utilidad en caso de surgir casos con características similares.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 CASO CLÍNICO

Ingresó al Hospital de Equinos de la Facultad de Veterinaria el de 17 de julio del 2017, un equino hembra, de raza criollo, pelaje moro de 12 años de edad, con el nombre “Llovizna”, proveniente de zonas arroceras, Vergara, Departamento de Treinta y Tres.

El motivo de consulta fue “Herida en el abdomen que no cura”.

La yegua no se encontraba con las medidas sanitarias correspondientes de vacunación y desparasitación. Vivía en un campo, con otros caballos los cuales gozaban de buena salud y se alimentaban del pasto del campo natural y avena.

El propietario relató que el caso comienza con una pequeña herida en la región ventral del abdomen, 3 meses antes del ingreso a facultad, la cual tuvo como complicación una miasis. Se le administro antibiótico, Oxitetraciclina (Terramicina®) durante un mes, sin presentar respuesta al tratamiento y cambiaron el antibiótico por Penicilina-Estreptomicina (Repen®) por 15 días más, desconociendo las dosis y tiempo de administración de las mismas, pero tampoco obtuvieron mejoría.

Una vez ingresada al Hospital, se realizó la valoración de la yegua, iniciando la historia clínica donde se determinaron las constantes fisiológicas (frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, mucosas y temperatura), se constató frecuencia cardíaca elevada, la cual se mantuvo elevado por varios días de internación (80-96 lpm) al igual que las mucosas pálidas. Los demás parámetros no presentaban alteraciones o resultados por fuera de los rangos normales. Además, se observó mal estado general, depresión del sensorio, condición corporal mala y lesiones de piel en todo el cuerpo con presencia de prurito.

El examen objetivo particular fue dirigido a piel y subcutáneo. A la inspección se observó una herida en la región abdominal ventral, de forma oval, profunda, de aproximadamente 50cm por 30cm, de aspecto granulomatoso, ulcerante y necrótico con trayectos fistulosos, secreción sanguinopurulenta, con inflamación y edema en los bordes de la misma. También se constató la presencia de prurito y olor fétido en la herida. Se observaron regiones alopecicas múltiples bilaterales de diferentes tamaños con escaras en todo el cuerpo, predominantemente en el cuello, tórax y miembros.

El mismo día del ingreso al Hospital, fue inmunizada con la vacuna Antitetánica (TETANIC®).



Fig. 21. Lesiones cutáneas alopecicas múltiples bilaterales de diferentes tamaños con escaras. Fuente: Facultad de Veterinaria Montevideo, Uruguay. 2017



Fig. 22. Herida en la región abdominal ventral, de forma oval, profunda, de aspecto granulomatoso, ulcerante y necrótico con trayectos fistulosos, secreción sanguinopurulenta. Fuente: Facultad de Veterinaria Montevideo, Uruguay. 2017.

5.2 Métodos diagnósticos

Se tomaron biopsias de tejido necrótico, tejido de transición (áreas sanas e infectadas) y de piel de las zonas alopecicas de la región del cuello, las cuales fueron fijadas en formol al 10%, y enviadas al DILAVE, Laboratorio Veterinario Oficial, para la evaluación histopatológica.

También se tomaron muestras sanguíneas, en tubo con anticoagulante para realizar hemograma en el Laboratorio del Hospital de la Facultad.



Fig. 23. Escisión de muestras de tejido infectado. Fuente: Facultad de Veterinaria Montevideo, Uruguay 2017.



Fig. 24. Muestras de tejido infectado fijadas en formol al 10%. Fuente: Facultad de Veterinaria Montevideo, Uruguay 2017.

6. RESULTADOS

6.1 Resultados del hemograma

Cuadro I: Hemograma del 17 de julio

	17 de julio del 2017	Valores de referencia
Hematíes	2,73	6 – 12,9 x 10 ¹² /L
Hemoglobina	5,2	11 – 17 g/dl
Hematocrito	14,1	32 – 48 %
V.C.M	52	37 – 59 µ3
H.C.M	18,9	12,3 – 19,7 pg
C.H.C.M	36.4	31 – 39 g/dl
Plaquetas	114	100 – 300 x 10 ⁹ /L
Leucocitos	10,8	5,8 – 12 x 10 ⁹ /L

Cuadro II: Hemograma y leucograma del 7 de agosto 2017

	7 de agosto del 2017	Valores de referencia
Hematíes	2,73	6 – 12,9 x 10 ¹² /L
Hemoglobina	5,5	11 – 17 g/dl
Hematocrito	15,2	32 – 48 %
V.C.M	52	37 – 59 µ3
H.C.M	20,2	12,3 – 19,7 pg
C.H.C.M	36,2	31 – 39 g/dl
Plaquetas	137	100 – 300 x 10 ⁹ /L
Leucocitos	13,7	5,8 – 12 x 10 ⁹ /L
Neutrófilos	67	40 – 70%
Linfocitos	17	20 – 45%
Monocitos	4	0 – 4%
Eosinófilos	12	0 – 4%
Basófilos	0	0 – 3%

En el primer hemograma del Cuadro I, que se realizó el día que ingreso, se constata anemia, que se correlaciona con el aumento de la frecuencia cardíaca y las mucosas pálidas que presentaba el paciente.

En el hemograma del Cuadro II, que se realizó el día 7 de agosto cuando ya el paciente se encontraba en su domicilio y se observa que continuó la anemia y además presentaba una leucocitosis eosinofílica.

6.2 Resultados de histopatología: 1/08/2017 Treinta y Tres

A la histología de las varias piezas recibidas se observa un tejido de granulación con marcada fibrosis y que contiene un proceso inflamatorio de tipo piogranulomatoso, crónico-activo, formado por células epiteliales, gran cantidad de neutrófilos y múltiples áreas necróticas amorfas, eosinofílicas, que contienen eosinófilos normales y necróticos, muchos desgranulados alrededor y a lo largo, fibras colágenas con degeneración hialina. Hay trombosis vascular y vasculitis leucocitoclásica.

Las lesiones histológicas son características de *Pythium insidiosum*

En suma los resultados son compatibles con Pitiosis Equina.

Dr. Fernando Dutra.

6.3 Tratamiento

Debido a la evolución crónica del caso y la zona involucrada, el tratamiento quirúrgico no se pudo llevar a cabo. De esta forma se optó por realizar un tratamiento sintomático con la administración de antibióticos en los cuales se incluyeron penicilina-estreptomicina (REPEN®) 20.000UI/kg, intramuscular cada 12 horas y Gentamicina 6,6 mg/kg, intravenoso cada 24 horas; antiinflamatorio, Diclofenac 0,8 mg/kg, intravenoso cada 12 horas por 8 días, desinfección de la herida, hierro y vitamina B12 10 ml de cada uno, intravenoso lento cada 48 horas y un complejo de vitaminas y minerales, 50 ml oral cada 24 horas (Red cell®) debido a la anemia presente, hasta que fue dada de alta.

El día 24 de julio se le administró una dosis de 20 mg de Acetonido de triamcinolona (Acetidrona®) intramuscular, para disminuir el prurito y basado en los buenos resultados obtenidos de un estudio realizado en Colombia por Cardona y Vargas en el 2015.

El día 29 de julio se le administró la vacuna PITIUM VAC® subcutánea. Esta vacuna es un inmunoterápico específico para esta patología que se inocula cada 14 días y que actúa alterando la respuesta inmunitaria de los animales, promoviendo la disminución de la inflamación y cicatrización de las lesiones, obteniendo mejores resultados en etapas agudas de la enfermedad.

6.4 Evolución

Las lesiones de piel no cedieron en todo el tratamiento, aunque se notó una disminución del prurito luego de la administración del acetinado de triamcinolona.

El 30 de julio del 2017 se continuó el tratamiento a domicilio por decisión propia del propietario. No se obtuvo ninguna respuesta al tratamiento, por lo tanto, para detener el sufrimiento del animal y con fines éticos se optó por la eutanasia.

7. DISCUSIÓN

Una vez que el paciente arribó a la consulta debido al aspecto clínico de la lesión y la anamnesis, se plantearon distintos diferenciales, entre ellos los principales fueron, tejido de granulación exuberante, sarcoide equino y pitiosis cutánea. En primera instancia se tomó una muestra sanguínea para realizar un hemograma, y muestras de tejido afectado para análisis de histopatología, fue inmunizada con una vacuna anti-tetánica y se le instauró un tratamiento sintomático debido al mal estado general y la depresión sensorial.

Mediante la anamnesis, signos clínicos y análisis de laboratorio se determinó un cuadro de pitiosis cutánea (Reis y col., 2003; Socolovski y col., 2007). En nuestro país el método diagnóstico de laboratorio se realiza en el Laboratorio Oficial DILAVE, a través de histopatología por las técnicas de tinción de Hematoxilina-Eosina y Grocott.

Existen además, otras técnicas de importancia para el diagnóstico precoz de la enfermedad, como la inmunohistoquímica, ELISA, inmunodifusión, Western Blot y PCR (Reis y col., 2003; Santurio y col., 2006b; Pedroso y col., 2009; Trost y col., 2009; Bezerra y col., 2010). Esto resulta de gran importancia, debido a que la cronicidad de la lesión empeora el pronóstico vital del paciente.

Si bien el diagnóstico clínico es fácil debido a las lesiones características que presenta esta patología, el desconocimiento y la baja incidencia dificultan su diagnóstico en Uruguay (Dutra, 2012). Ésta se debe a que el agente etiológico se desarrolla en zonas tropicales y subtropicales, entre ellos Brasil, país limítrofe.

Otro dato a destacar, es que los equinos son la especie que resulta más susceptible a la infección por este oomiceto y que contamos con un factor individual, ya que no todos adquieren la enfermedad, teniendo mayor riesgo los caballos jóvenes, gerontes o inmunosuprimidos (Robinson y Sprayberry, 2012).

Por otro lado, el cambio climático ha contribuido a que en estos últimos años hayamos pasado de un clima templado a uno más subtropical, lo que contribuye a un ambiente óptimo para el desarrollo de pitiosis, principalmente en la frontera con Brasil.

En Uruguay se describen 7 casos de pitiosis equina cutánea ocurridos en la región Este de Uruguay entre el 2012 y 2017. Todos los casos ocurrieron entre fines de verano y otoño (marzo a junio). Por lo tanto, esta patología presenta una marcada estacionalidad, asociada al ciclo del agente causal, que permite

tomar medidas preventivas que eviten el contacto prolongado en ese período (Dutra y col., 2018).

Al consultar la bibliografía sobre diversos tratamientos para la pitiosis cutánea, se referencia a que el éxito de los mismos, no solo depende de la cronicidad de la enfermedad, sino también de la localización, tamaño de la lesión y estado inmunitario del animal (Cardona y col., 2013).

En la mayoría de los casos reportados se utilizan terapias combinadas para obtener mejores resultados. El tratamiento quirúrgico siempre está indicado, a menos que las lesiones sean muy extensas y comprometan estructuras anatómicas de relevancia. Esta técnica se acompaña con otras terapias, con la inmunoterapia y/o fármacos sistémicos o locales.

La inmunoterapia ha sido más efectiva en estadios tempranos de la enfermedad (Mendoza y col., 2003). En Uruguay no hay vacunas disponibles en el mercado nacional, teniendo que recurrir al mercado de Brasil.

Las terapias farmacológicas consisten en el uso de anfotericina B y DMSO tópico y/o regional intravenosa, pero actualmente en nuestro país no contamos con la anfotericina B de administración intravenosa (Doria y col., 2015).

En el 2015 Cardona y Vargas realizaron un estudio, administrado acetónico de triamcinolona a animales infectados naturalmente de pitiosis obteniendo resultados exitosos en combinación con la escisión quirúrgica. Esto resulta ser una buena alternativa terapéutica en nuestro país por la disponibilidad del fármaco.

El tratamiento insaturado en nuestro caso clínico, una vez diagnosticada la pitiosis, consistió en la aplicación de la inmunoterapia y el uso de acetónico de triamcinolona. Desafortunadamente debido a la cronicidad (3 meses de evolución) de la lesión y su localización no se pudo llevar a cabo la escisión quirúrgica. Esto complicó el pronóstico y no se obtuvo mejorías clínicas, optándose tiempo después por la eutanasia del animal.

8. CONCLUSIONES

La pitiosis cutánea es una enfermedad infecciosa, causada por el *Pythium insidiosum*, un microorganismo que necesita condiciones medioambientales determinantes para su desarrollo, zonas tropicales y subtropicales, inundables y con abundante vegetación.

Si bien el cambio climático en estos últimos años ha contribuido en el desarrollo de este patógeno en nuestro país, seguramente haya sido una patología sub-diagnosticada o mal diagnosticada durante varios años.

El resultado exitoso de los tratamientos para la pitiosis cutánea depende fundamentalmente de un rápido diagnóstico y tratamiento temprano para un buen pronóstico, basándose en la presencia de los *kunkers* que son característicos y únicos en los equinos, y confirmándose por histopatología.

El uso de terapias combinadas en los casos reportados arroja mejores resultados.

En Uruguay se está conociendo más sobre la enfermedad, y seguramente esto haga que mejoren los pronósticos en casos futuros.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arango Arteaga M, Castañeda del Gordo E. (2003). Micosis humanas: Procedimientos diagnósticos; exámenes directos. 2ª ed. Medellín, CIB, 200 p.
2. Barbet JL, Baxter GM, McMullan WC. (1998). Enfermedades de piel. En Colahan PT, Mayhew IG, Merritt AM, Moore JN. Medicina y Cirugía Equina. Buenos Aires, 4ª Edición, 1530-1549 p.
3. Bezerra-Júnior P, Pedroso P, Pavarini S, Dalto A, Santurio J, Driemeier D. (2010). Equine intestinal pythiosis in Southern Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 62(2): 481-483.
4. Bissonnette KW, Sharp NJH. (1991). Nasal and retrobulbar mass in a cat caused by *Pythium insidiosum*. *J Med Vet Mycol.* 29: 39–44.
5. Botton SA, Pereira DIB, Costa MM, Azevedo MI, Argenta JS, Jesus FPK. (2011). Identification of *Pythium insidiosum* by nested PCR in cutaneous lesions of Brazilian horses and rabbits. *Curr Microbiol.* 62:1225–1229.
6. Cardona J, Vargas M, González M. (2013). Evaluación clínica e histopatológica de la pythiosis cutánea en terneros del departamento de Córdoba, Colombia. *Rev MVZ Córdoba;* 18(2):3551-3558.
7. Cardona J, Vargas M, Patarroyo J. (2016). Cutaneous pythiosis in horses treated with triamcinolone acetonide. Part 1. Clinical characterization. *Rev MVZ Córdoba* 21(3):5511-5524.
8. Cardona J, Vargas M, Patarroyo J. (2017). Pythiosis cutaneous in horses treated with triamcinolone acetonide. Part 2. Histological and histochemical description. *Rev MVZ Córdoba* 22(1):5638-5652.
9. Doherty T, Valverde A. (2006). *Manual of Equine Anesthesia and Analgesia.* Oxford, Blackwell Publishing. 209 p.
10. Dória RGS, Carvalho MB, Freitas SH, Laskoski LM, Colodel EM, Mendonça FS, Silva MAG, Grigoletto R, Neto PF. (2015). Evaluation of intravenous regional perfusion with amphotericin B and dimethylsulfoxide to treat horses for pythiosis of a limb. *BMC Vet Res.* 11:152. DOI 10.1186/s12917-015-0472-z
11. Dória RGS, Freitas SH, Mendonça FS, Arruda LP, Boabaid FM, Filho AM, Colodel EM, Valadão CAA. (2014). Utilização da técnica de imunohistoquímica para confirmar casos de pitiose cutânea equina diagnosticados por meio de caracterização clínica e avaliação histopatológica. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 66(1):27-33.

12. Dutra, F (2012) Pitiosis equina. Archivo Veterinario del Este Ene-Jun:12-14. Disponible en: http://www.smvu.com.uy/moduloBiblioteca/10_e945ce47/archivosAdjuntos/n-1.pdf Fecha de consulta: 6 de junio de 2018.

13. Dutra, F (2017) Pitiosis cutánea equina. Archivo Veterinario del Este Ene-Dic:20-21. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Juan_Garcia204/publication/324731979_Archivo_Veterinario_del_Este_-_2017/links/5adfbff30f7e9b285945dfbf/Archivo-Veterinario-del-Este-2017.pdf?origin=publication_detail. Fecha de consulta: 6 de junio de 2018.

14. Foil CS, Short BG. (1984). A report of subcutaneous pythiosis in five dogs and a review of the etiologic agent *Pythium* spp. *J Am Anim Hosp Assoc.* 20: 959–966.

15. García JA, Balestíe S, Romero A, Quinteros C, Dutra F. Pitiosis cutánea equina: descripción clínico patológica y tratamiento cutaneous equine pythiosis: clinico pathological features and treatment. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Juan_Garcia204/publication/324830833_Cutaneous_Equine_Pythiosis_clinico_pathological_features_and_treatment/links/5ae5df8c0f7e9b9793c6ac6e/Cutaneous-Equine-Pythiosis-clinico-pathological-features-and-treatment.pdf?origin=publication_detail Fecha de consulta: 6 de junio de 2018.

16. Grooters AM, Gee MK. (2002). Development of a nested polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Pythium insidiosum*. *J Vet Intern Med.* 16: 147–152.

17. Heller RA, Hobson HP. (1971). Three cases of phycomycosis in Dogs. *Vet Med Small Anim Clin.* 66: 472–476.

18. Hensel P, Greene CE. (2003). Immunotherapy for treatment of multicentric cutaneous pythiosis in a dog. *J Am Vet Med Assoc* 223: 215–218.

19. Krajaejum T, Imkhieo S, Intaramat A, Ratanabanangkoon K. (2009). Development of an immunochromatographic test for rapid serodiagnosis of human pythiosis. *Clin Vaccine Immunol.* 16(4): 506-509.

20. Leal AT, Monteiro AB, Flores EF, Santurio JM. (2001). Pitiose. *Cièn Rural.* 31(4): 735-743.

21. Luis-León J, Pérez R. (2011). Pythiosis: una patología emergente en Venezuela. *Salus online.* 15(1): 79-94.

22. Márquez A, Salas Y, Canelón J, Perazzo Y, Colmenárez V. (2010). Descripción anatomopatológica de pitiosis cutánea en equinos. Rev Fac Cs Vets UCV. 51(1): 37-42.
23. Meagher L, Cousin J, Seckl J, Haslett C. (1996). Opposing effects of glucocorticoids on the rate of apoptosis in neutrophilic and eosinophilic Granulocytes. J immunol. 156:4422-4428.
24. Mendoza L, Villalobos J. (1992b). Evaluation of two vaccines for the treatment of pythiosis in horses. Mycopathologia. 119: 89–95.
25. Mendoza L, Hernandez F, Ajello L. (1993). Life cycle of the human and animal oomycete pathogen *Pythium insidiosum*. Journal of Clinical Microbiology. 31: 2967–2973
26. Mendoza L, Ajello L, McGinnis MR. (1996). Infection caused by the Oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. Journal de Mycologie Medicale. 6:151-164.
27. Mendoza L, Newton J. (2005). Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum*. Medical Mycology. 43: 477 – 486.
28. Mendoza L, Mandy W, Glass R. (2003). An improved *Pythium insidiosum*-vaccine formulation with enhanced immunotherapeutic properties in horses and dogs with pythiosis. Vaccine. 21: 2797–2804.
29. Mendoza L, Kaufman L. (1997). Serodiagnosis of *Pythium insidiosum* infections using an enzyme-linked immunodiffusion assay. Clin Diagn Lab Immunol. 4: 715–718.
30. Mendoza L, Villalobos J. (1992b). Evaluation of two vaccines for the treatment of pythiosis in horses. Mycopathologia. 119: 89–95.
31. Medonza L. (2016). *Pitium insidiosum*. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/292754851_Pythium_insidiosum
Fecha de consulta: 4-06-18.
32. Miller R. (1981). Treatment of equine phycomycosis by immunotherapy and surgery. Aust Vet J. 57: 377–82.
33. Miller R. (1983). Investigation into the biology of the three phycomycotic agents pathogenic for horses in Australia. Mycopathologia. 81: 23–8.
34. Miller RI, Campbell RS. (1983). Experimental pythiosis in rabbits. Sabouraudia. 21:331–341.
35. Miller RI, Olcott BM, Archer M. (1985). Cutaneous pythiosis in beef calves. J Am Vet Med Assoc. 186: 984–986.

36. Mosbah E, Karrouf G, Younis E, Saad H, Ahdy A, Zaghloul A. (2012). Diagnosis and surgical management of pythiosis in draft horses: Report of 33 cases in Egypt. *J. Equine Vet. Sci.* 32(3): 164-169.
37. Pal M. (2014). *Cryptococcus gattii*: An emerging global mycotic pathogen of humans and animals. *J Mycopathol Res.* 52: 1-7.
38. Pavletic MM, Miller RI, Turnwald GH. (1983). Intestinal infarction associated with canine phycomycosis. *J Am Anim Hosp Assoc.* 19: 913–919.
39. Pedroso P, Bezerra-Júnior P, Pescador C, Dalto A, Costa G, Pereira D, Santurio J. (2009). Diagnóstico imunoistoquímico de pitiose cutânea em equinos. *Act. Sci. Vet.* 37(1): 49-52.
40. Pérez R, Luis-León J, Vivas J, Mendoza L. (2005). Epizootic cutaneous pythiosis in beef calves. *Vet Microbiol.* 109: 121-128.
41. Reis-Jr J, Carvalho E, Nogueira R, Lemos L, Mendoza L. (2003). Disseminated pythiosis in three horses. *Vet. Microbiol,* 96: 289-295.
42. Rinaldi MG, Seidenfeld SM. (1989). *Pythium insidiosum* causes severe disease in a healthy boy. *Mycol Observer,* 9: 7-8.
43. Robinson N.E., Sprayberry K.A. (2012). *Terapéutica Actual en Medicina Equina.* 6ª ed. Buenos Aires, Inter-Médica. 772 p.
44. Rosa PS (1993). Development and evaluation of serologic tests to detect pythiosis in horses . Tesis. Louisiana State University, 120 p.
45. Santurio J, Leal A, Alves S, Lübeck I, Griebeler J, Copetti M. (2006). Teste de ELISA indireto para o diagnóstico sorológico de pitiose. *Pesq. Vet. Bras.* 26(1): 47-50.
46. Santurio JM, Monteiro AB. (1998). Cutaneous pythiosis in calves from the Pantanal region of Brazil. *Mycopathologia.* 141: 123–125.
47. Sathapatayavongs B, Ledachaikul P. (1989). Human pythiosis associated with thalassemia hemoglobinopathy syndrome. *J Infect Dis.* 159: 274–80.
48. Schurko A, Mendoza L. (2003a). Evidence for geographic clusters: molecular genetic differences among strains of *Pythium insidiosum* from Asia, Australia and the Americas are explored. *Mycologia.* 95: 200–8.
49. Schurko AM, Mendoza L. (2003b). A molecular phylogeny of *Pythium insidiosum*. *Mycol Res.* 107: 537–44.
50. Socolovski J, Rudiger D, Calderon R, Welker A. (2007). Zigomicose em Equinos. *Ver. Acad. Curitiba.* 5: 225 – 230.

51. Thomas RC, Lewis DT. (1998). Pythiosis in dogs and cats. *Comp Cont Educ Pract Vet.* 20: 63–75.
52. Triscott JA, Weedon D, Cabana E. (1993). Human subcutaneous pythiosis. *J Cutan Pathol.* 20: 267–71.
53. Trost M, Gabriel A, Masuda E, Figuera R, Irigoyen L, Kommers G. (2009). Aspectos clínicos, morfológicos e imunoistoquímicos da pitiose gastrointestinal canina. *Pesq. Vet. Bras.* 29(8): 673-679.
54. UFSM/LAPEMI/EMBRAPA. Pitium-Vac. Disponible en: <http://pitiose.com.br/loja-virtual/pitium-vac/> Fecha de consulta: 7 de junio de 2018.
55. Vicarivento N, Puzzi M, Alves M, Zappa V. (2008) Pitiose: uma micose emergente nos humanos. *Rev. Cient. Eletrôn. Med. Vet;* 6(10). Disponible en: <http://www.revista.inf.br/veterinaria10/revisao/edic-vi-n10-RL71.pdf> Fecha de consulta: 23-4-12.
56. Wanachiwanawin W, Mendoza L, Visuthisakchai S, Mutsikapan P, Sathapatayavongs B, Chaiprasert A, Suwanagool P, Manuskiatti W, Ruangsetakit C, Ajello L. (2004). Efficacy of immunotherapy using antigens of *Pythium insidiosum* in the treatment of vascular pythiosis in humans. *Vaccine* 22: 3613-
57. Weinberg JM, Koestenblantz EK, Tutrone WD, Tishler HR, Najarian L. (2003). Comparison of diagnostic methods in the evaluation of onychomycosis. *J Am Acad Dermatol.* 49: 193-197.