

DESCRIPCIÓN ANATOMOPATOLÓGICA DE PITIOSIS CUTÁNEA EN EQUINOS

Anatomopathological Description of Equine Skin Pythiosis

Adelys A. Márquez^{*1}, Yaritza J. Salas^{**}, José L. Canelón^{***}, Yurimaua Perazzo^{****}
y Victoria Colmenárez^{**}

Unidad de Investigación en Cs. Funcionales “Dr. Haitý Moussatché”. **Área de Anatomía Patológica Veterinaria. *Área de Producción de Equinos. ****Área de Microbiología e Inmunología Veterinaria. Decanato de Ciencias Veterinarias. Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado”. Barquisimeto. Venezuela*

Correo-E: adelism@ucla.edu.ve

Recibido: 17/02/10 - Aprobado: 09/07/10

RESUMEN

La presente investigación tuvo por objetivo describir macroscópicamente y microscópicamente, la pitiosis cutánea en el caballo criollo venezolano que habita la región de los llanos venezolanos en la zona correspondiente a los estados, Apure, Barinas y Portuguesa. Para ello, se realizaron visitas a distintos hatos durante los períodos de sequía y lluvioso, en el lapso comprendido entre enero 2008 a diciembre 2009. Se tomaron muestras de 8 animales con lesiones cutáneas compatibles con pitiosis, se realizó su descripción macroscópica y se obtuvieron varios fragmentos de tejido, los cuales se fijaron en formol buferado al 10%. Posteriormente, fueron procesadas para histopatología, coloreadas con hematoxilina y eosina, metenamina de plata de Grocott y finalmente se observaron bajo microscopía óptica. Todas las muestras presentaron hallazgos histopatológicos compatibles con pitiosis, lo cual fue confirmado a través de cultivo microbiológico. Los resultados obtenidos demostraron que la pitiosis cutánea es una enfermedad presente en el caballo criollo de los llanos venezolanos, caracterizada macroscópicamente por un aumento de volumen en forma de placa ulcerada, sangrante e irregular de color blanco amarillento, con apariencia de

ABSTRACT

An experimental research was conducted to describe both macroscopically and microscopically skin pythiosis in the Venezuelan Creole horse, which dwells in the Venezuelan plains of the States of Apure, Barinas, and Portuguesa. Visits were made to different farms between January 2008 and December 2009. Samples of eight horses with a skin disease consistent with skin pythiosis were taken and macroscopically analyzed. For the histopathological description, several tissue fragments were obtained and fixed in 10% buffer formalin. Subsequently, samples were stained with Hematoxylin-Eosin and Grocott's silver methenamine, and observed under the light microscope. All samples showed histopathological findings consistent with skin pythiosis, which was confirmed through microbiological cultures. The results show that skin pythiosis is a dermatosis commonly seen in the Creole horse that populates the Venezuelan plains. Macroscopically, the lesions were characterized as irregular plaque-shaped, ulcerated, increased in volume, hemorrhagic, with a white-yellowish color, and a granulation tissue appearance, when examined both superficially and profoundly. Eventually, necrotic areas that

¹ A quien debe dirigirse la correspondencia (To whom correspondence should be addressed)

tejido de granulación, al corte superficial a profundo. Eventualmente, fueron halladas zonas de necrosis que contenían concreciones irregulares de color amarillento, duras, de superficie arenosa, que se correspondieron con las estructuras sólidas *kunkers*. Por otra parte, el estudio microscópico reveló una dermatitis granulomatosa, eosinofílica de difusa a multifocal.

(Palabras clave: Caballos, *Pythium*, patología, piel (animal), lesiones, Venezuela)

contained irregular, yellowish, hard, sandy surfaces, which corresponded to kunker structures, were found. Conversely, the microscopic study revealed a diffuse to multifocal eosinophilic, granulomatous dermatitis.

(Key words: Horses, *Pythium*, pathology, skin (animals), lesions, Venezuelan)

INTRODUCCIÓN

La Pitiosis, es una enfermedad granulomatosa crónica que afecta a humanos y a varias especies animales, causada por el oomiceto *Pythium insidiosum* (Leal *et al.*, 2001). Mendoza *et al.* (1993) postuló que el ciclo del *P. insidiosum* se basa en la colonización de diversas plantas acuáticas que sirven de substrato para el desarrollo y reproducción del organismo mientras origina los zoosporangios que contienen en su interior numerosas zoosporas. Éstas, una vez libres en el agua, necesitan temperaturas de 30 a 40°C, 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, se tornan esféricas, 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 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.

Esta patología ha sido descrita en América, algunos países europeos y en el sureste asiático (Foil, 1996). El primer reporte de esta enfermedad fue probablemente realizado en equinos por Smith (1884), denominada por muchos años *Pycomicete*, y conocido en general como *bursatii*, dermatitis granular, *hyphomycosis destruens* equina o cáncer

de los pantanos (De Cock *et al.*, 1987). Según las bases morfológicas en cultivo, el agente etiológico fue llamado *Hyphomices destruens*, considerado en ese entonces como un zigomiceto (Voss *et al.*, 1981). A partir de técnicas de inmunodifusión y anticuerpos fluorescentes, Mendoza *et al.* (1987) demostraron que el *P. insidiosum* aislado de casos de pitiosis en caninos, caballos y humanos eran antigénicamente idénticos entre ellos y diferentes al *Pythium* spp. no patógeno aislado de las plantas y de la tierra. De igual forma, Mendoza y Marín (1989), a través de inmunodifusión observaron seis bandas en común entre el antígeno del *P. destruens* y *P. insidiosum* aislado de humanos y animales con pitiosis, por lo que concluyeron que el agente etiológico de la pitiosis era una sola especie, el *P. insidiosum*.

Esta enfermedad en animales tiene dos formas de presentación, la primera y más común en equinos es la pitiosis cutánea (Foil *et al.*, 1984; Purcell *et al.*, 1994; Grooters *et al.*, 2002; Liljebjelke *et al.*, 2002; Santurio *et al.*, 2006). La segunda forma de presentación y más común en caninos es la pitiosis gastrointestinal en la cual se ven afectados el estómago e intestino (Foil, 1996). Las lesiones cutáneas en equinos se caracterizan por ser de crecimiento lento, insidioso, circulares y ulceradas hasta formar grandes granulomas de hasta 50 cm de diámetro. Se ubican por lo general en la zona inguinal ventral, sitios que están en contacto con las aguas; sin embargo, se han reportado en la cara, nariz y cavidad oral (Purcell *et al.*, 1994). En la pitiosis cutánea equina se observan estructuras sólidas llamadas *kunkers* no reportadas en lesiones de bovinos o caninos y tienen su origen en el acúmulo focal de eosinófilos alrededor de las hifas (Miller y Campbell, 1984).

En Venezuela, fue descrita una enfermedad denominada Granulomatosis Enzoótica Bovina que afecta al ganado de carne de las sabanas venezolanas, caracterizada por lesiones en las extremidades y grandes indicios de ser producida por *P. insidiosum* (Marín *et al.*, 1991). Sin embargo, esto sólo pudo ser demostrado en estudios posteriores por Pérez *et al.* (2005) quienes observaron lesiones granulomatosas ulceradas o no, ubicadas en la porción distal del metacarpo o metatarso pudiendo implicar las falanges. Las lesiones no ulceradas se caracterizaron por presentar múltiples tractos fistulosos que drenaban un material serosanguinolento, e incluso material purulento. Años más tarde la pitiosis canina fue reportada en su forma gastrointestinal (Capodacqua, 2004; Mendoza *et al.*, 2005).

Las lesiones ulceradas varían de tamaño (100 mm), siendo redondeadas o alargadas con múltiples zonas de necrosis. A pesar de que en Venezuela aún no ha sido reportada la pitiosis en humanos y en equinos, existen indicios de la presencia de esta enfermedad en el caballo criollo venezolano, que habita en los llanos inundables, donde las condiciones climatológicas favorecen la sobrevivencia y perpetuación del *P. insidiosum* además de ser el ambiente en el cual permanecen durante sus faenas de trabajo, especialmente en la época de entrada y salida de las lluvias, momento en el cual el nivel de las aguas inundan las sabanas, prolifera el *P. insidiosum* y los animales se hacen más susceptibles por estar constantemente expuestos. Es por ello que en este estudio se planteó como objetivo describir macroscópica y microscópicamente aquellas lesiones compatibles con pitiosis cutánea en el caballo criollo venezolano ubicado en la región de los llanos venezolanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio desarrolló una investigación de campo descriptiva, en la cual se empleó un diseño longitudinal de evaluación. La población está referida a los caballos criollos venezolanos ubicados en los llanos inundables venezolanos. Para la toma de muestra se realizaron varias visitas a hatos del estado Apure, Barinas y Portuguesa durante el período comprendido entre enero y diciembre 2009, sequía e invierno, con promedios de precipitación anual de 1.100 mm y temperatura máxima de 35°C y mínima

de 24°C. La toma de muestra se llevó a cabo al presentarse los casos clínicos en el período de lluvia, en un total de 8 animales, todos con lesiones cutáneas compatibles con pitiosis. Se realizó la descripción macroscópica y para la toma de la biopsia se utilizó sedación con clorhidrato de xilacina al 10%, a una dosis de 0,8 mg/kg de peso. Seguidamente se realizó lavado de la lesión con abundante agua y posteriormente se llevó a cabo la asepsia con bromuro de lauril dimetil bencil amonio (Gerdex®). Se aplicó anestesia local por infiltración alrededor de la lesión, con cifercaína al 2% y con la ayuda del bisturí se realizaron cortes profundos, obteniéndose varios fragmentos de tejido y los llamados *kunkers*, los cuales fueron fijados en formol buferado al 10%. De igual forma se tomaron muestras para realizar cultivo microbiológico para lo cual pequeños fragmentos de tejidos y *kunkers*, se colocaron en placas de Petri estériles y se transportaron en una cava de plástico a temperatura ambiente (aproximadamente 35°C) hasta el Laboratorio de Microbiología del Decanato de Ciencias Veterinarias de la UCLA. Una vez allí se sumergieron en agua destilada durante 10 min y posteriormente en una solución al 1% de oxitetraciclina durante 15 min. Luego, se secaron empleando gasa estéril. A continuación se realizó la siembra en placas de agar Dextrosa Saboreaud (DIFCO) y Agar Columbia +5% sangre ovina (DIFCO), las placas se incubaron a 37°C durante tres días y se revisaron diariamente. A partir de las colonias sospechosas se realizó la tinción directa de azul de lactofenol para evaluar la morfología de las hifas empleando un microscopio Olympus BX 31.

Identificación histopatológica de lesiones cutáneas compatibles con pitiosis

Del tejido biopsiado se cortaron fragmentos de aproximadamente 0,5 a 1 cm³, debidamente identificados se colocaron en sus respectivas cápsulas de tejido para ser introducidos en el procesador automatizado de tejidos (Citadel® 2000) por un período de 18 h (Edna, 1995). Posteriormente, se prepararon los bloques de parafina (Bob, 1995) a partir de los cuales, se realizaron los cortes a 5 µm de espesor mediante el uso del micrótopo (Leica RM2125, EUA). Una vez efectuado el corte, la película de tejido se colocó sobre una lámina portaobjeto para ser coloreado mediante la técnica de coloración Hematoxilina-Eosina (H&E) y

metenamina de plata de Grocott (Thomas, 1995). Para el estudio histopatológico, cada preparado histológico se observó en toda su extensión con objetivos de 4X, 10X, 40X y 100X en un microscopio óptico marca Olympus BX 31.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al estudio macroscópico la lesión consistió en un aumento de volumen en forma de placa ulcerada e irregular, de color blanco amarillento con apariencia de tejido de granulación, sangrante, que varió en su longitud entre 10 a 25 cm, ubicada en la cuartilla y rodete coronario de miembros posteriores (Figura 1). Al corte superficial a profundo, eventualmente fueron hallados zonas de necrosis que contienen concreciones

irregulares de color amarillento, duras, de superficie arenosa, que corresponden con los *kunkers* (Figura 2). Estos hallazgos son semejantes con lo reportado por Purcell *et al.* (1994), quienes observaron en la pitiosis cutánea equina lesiones caracterizadas por ser de crecimiento lento, insidioso, circulares y ulceradas hasta formar grandes granulomas de hasta 50 cm de diámetro, ubicados por lo general en sitios que están en contacto con las aguas. Por su parte, Miller y Campbell (1984), también observaron en la pitiosis cutánea equina estructuras sólidas llamadas *kunkers* e infirieron que las mismas tienen su origen en el acúmulo focal de eosinófilos alrededor de las hifas.

Histopatológicamente, el estudio reveló una lesión en piel caracterizada por ser altamente vascularizada, con numerosas arteriolas, intensa proliferación de tejido conectivo dispuesto irregularmente, numerosos



Figura 1. Miembro posterior derecho de equino. Placa ulcerada, irregular y sangrante con apariencia de tejido de granulación de 10 cm de diámetro aproximadamente y ubicada en la cuartilla



Figura 2. Fragmentos de la lesión donde se evidencian los *kunkers* (flecha) como concreciones irregulares de color amarillento, duras y de superficie arenosa

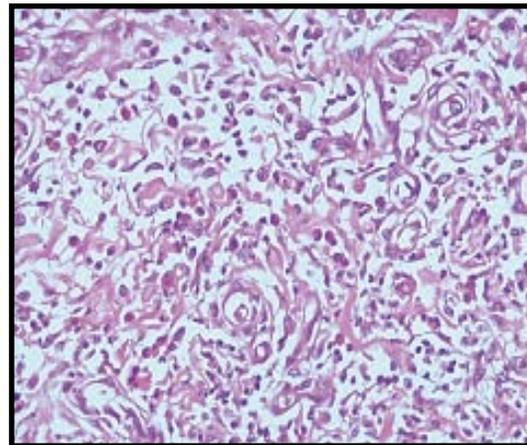


Figura 3. Dermis. Lesión altamente vascularizada con fibrosis e intenso infiltrado difuso de eosinófilos, seguidos por macrófagos y neutrófilos. Hematoxilina y Eosina. 40X

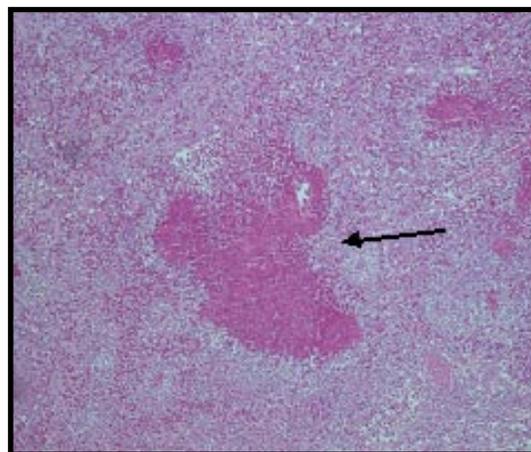


Figura 4. Dermis. Fenómeno de Splendore Hoeppli (flecha). Hematoxilina y Eosina. 40X

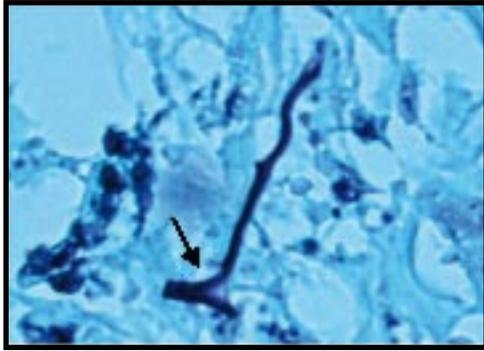


Figura 5. Dermis. Hifas de *P. insidiosum* ramificadas en 90° (flecha) y pobremente tabicada. Metenamina de plata de Grocott. 100X

fibroblastos, intenso infiltrado de polimorfonucleares eosinófilos, seguidos por macrófagos y en menor proporción neutrófilos distribuidos difusamente, presencia de zonas de necrosis multifocal (Figura 3). y fenómeno de Splendore Hoeppli, lo que en general corresponde con una dermatitis granulomatosa eosinofílica difusa a multifocal (Figura 4). Asimismo, con la coloración de metenamina de plata de Grocott se evidenciaron las hifas ramificadas en 90° y pobremente tabicadas que corresponden con *P. insidiosum* (Figura 5). Lo anteriormente expuesto concuerda con dermatitis granulomatosa multifocal con hifas de *P. insidiosum* observables con métodos histoquímicos (Santurio *et al.*, 2006). De igual forma, fueron descritas las lesiones microscópicas como pequeños granulomas multifocales rodeados de tejido conectivo denso que en el centro de los granulomas presentan pequeñas y numerosas hifas ocasionalmente septadas, ramificadas, de pared lisa, de 4 a 8 μm de diámetro (Miller *et al.*, 1985). El total de animales muestreados resultaron positivos a *P. insidiosum* por cultivo microbiológico.

CONCLUSIÓN

La pitiosis cutánea es una enfermedad presente en el caballo criollo de los llanos venezolanos caracterizada por una dermatitis granulomatosa, eosinofílica difusa a multifocal.

El caballo criollo venezolano es susceptible y está constantemente expuesto a la pitiosis, lo que afecta su calidad de vida y puede lograr disminuir su resistencia al trabajo rudo del llano.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos al Consejo de Desarrollo Humanístico y Tecnológico CDCHT de la UCLA por el financiamiento prestado (proyecto 009-VE-2008) y la cooperación de Álvaro Álvarez, Camilo Álvarez y todo el personal de Agropecuaria Flora C.A. ("AGROFLORA").

REFERENCIAS

- Bob, M. 1995. Orientación del Espécimen. Métodos Histotecnológicos. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP). pp. 35-46.
- Capodacqua, J. 2004. Diseño de un protocolo diagnóstico para alteraciones de aspecto tumoral de vías digestivas en perros con diarrea hemorrágica crónica. Trabajo de grado. Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". DCV-UCLA. Cabudare. 97 p.
- De Cock, A.; Mendoza, L.; Padhye, A.; Ajello, L.; kaufman, L. 1987. *Pythium insidiosum* sp. nov. the etiologic agent of pythiosis. *J. Clin. Microbiol.*, 25:344-349.
- Edna, P. 1995. Procesamiento de Tejidos: Deshidratación, Aclaramiento, e Infiltración. Métodos Histotecnológicos. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP). pp. 31-33.
- Foil, C. 1996. Update on pitiosis (Oomycosis) in Internacional Symposium Antimicrobial therapy: Applications in Dermatology, pp. 57-36.
- Foil, C.; Short, B.; Fadok, V.; Kunkle, G. 1984. A report of subcutaneous pythiosis in five dogs: a review of the agent *Pythium* spp. *JAVMA*, 20:959-966.
- Grooters, A.; Leise, B.; Lopez, M.; Gree, M.; O'Reilly, K. 2002. Development and evaluation of an enzyme-linked immuno absorbent assay for the serodiagnosis of pythiosis in dog. *J. Vet. Inter. Med.*, 16:142-146.
- Leal, A.; Monteiro, A.; Flores, E.; Santurio, J. 2001. Pythiosis. *Ciencia Rural* (Santa María), 31:735-743.
- Liljebjelke, K.; Abramson, C.; Brockus, C.; Greene, C. 2002. Duodenal obstruction caused by infection with *Pythium insidiosum* in a 12 week-old puppy. *J. Ame. Vet. Med. Assoc.*, 15:1188-1191.
- Marín, C.; López, N.; Pérez, C.; Mirabal, G.; Rolo, M.; Urdaneta, J. 1991. Primer reporte de la Granulomatosis Enzoótica Bovina en Venezuela. *FONAIAP Divulga*, pp. 14-16.
- Mendoza, L.; Marín, G. 1989. Antigenic relationship between *Pythium insidiosum* de Cock *et al.* 1987 and its synonym *Pythium destruens* Shipton 1987.

Mycoses, 32:73-7.

Mendoza, L.; Hernandez, F.; Ajello, L. 1993. Life cycle of the human and animal oomycete pathogen *Pythium insidiosum*. *J. Clin. Microbiol.*, 31:2967-2973.

Mendoza, L.; Kaufman, L.; Standard, P. 1987. Antigenic Relationship between the Animal and Human Pathogen *Pythium insidiosum* and Nonpathogenic *Pythium* Species. *J. Clin. Microbiol.*, 25:2159-2162.

Mendoza, L.; Arias, M.; Colmenárez, V.; Perazzo, Y. 2005. Intestinal canine pythiosis in Venezuela confirmed by serological and sequencing analysis. *Mycopathol.*, 159:219-222.

Miller, R.; Campbell, R. 1984. Clinical observations on equine phycomycosis. *Aust. Vet. J.*, 58:221-226.

Miller, R.; Olcott, B.; Archer, M. 1985. Cutaneous pythiosis in beef calves. *JAVMA*, 186:984-986.

Perez, R.; Luis-Leon J.; Vivas, J.; Mendoza L. 2005. Epizootic cutaneous pythiosis in beef calves. *Vet. Microbiol.*, 109:121-8.

Purcell, K.; Philip, J.; Kreeger, D. 1994. Jejunal obstruction caused by a *Pythium insidiosum* granuloma in mare. *J. Amer. Vet. Radiol.*, 43:337-339.

Santurio, J.; Hartz, A.; Brayer, P.; Siqueira, A. 2006. pythiosis: uma micose emergente. *Acta Sci. Vet.*, 34:1-14.

Smith, F. 1884. The pathology of bursatee. *Vet J.* 19:16-17.

Thomas, A. 1995. Hematoxilina y Eosina. Métodos Histotecnológicos. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP). pp. 55-58.

Voss, E.; Meikle, D.; Nicholson, R.; Collins, P.; Silva, G. 1981. International Code of botanical nomenclature adopted by the thirteenth International Botanical Congress, Sydney, pp. 34-37.