

REVISION BIBLIOGRAFICA

Pythiosis: Una patología emergente en VenezuelaJuan J. Luis-León^{1,2}, Rosa Cristina Pérez¹

¹Facultad de Ciencias de la Salud, Sede Aragua.
Departamento de Microbiología. Maracay. Estado
Aragua. Venezuela.

²Instituto de Investigaciones Biomédicas de la
Universidad de Carabobo BIOMED-UC, Facultad de
Ciencias de la Salud. Sede Aragua. Maracay. Estado
Aragua. Venezuela

Correspondencia: Rosa Cristina Pérez
E-mail: rosacristinap@gmail.com

Recibido: Junio 2010

Aceptado: Febrero 2011

RESUMEN

La pythiosis es una enfermedad que se presenta en humanos y en otros mamíferos, tales como equinos, caninos y bovinos. El agente etiológico de esta patología es *Pythium insidiosum*, un oomycete acuático presente en diversas regiones geográficas del mundo. Las manifestaciones clínicas cutáneas de tipo granulomatoso y gastrointestinales son las presentaciones que predominan en animales infectados. La infección puede diseminarse hacia otros tejidos (ej., óseo y pulmonar). La pythiosis humana tiene cuatro formas clínicas de presentación: cutánea o subcutánea, vascular, ocular y ocasionalmente se presenta en localizaciones anatómica inusuales (ej., cerebro). En Venezuela se han reportado casos en caninos, bovinos y equinos. En este artículo se presenta una revisión actualizada de la literatura en relación a la epidemiología, ciclo de vida del agente etiológico, patogénesis, presentación clínica en animales y humanos, diagnóstico, tratamiento y los casos de pythiosis en Venezuela.

Palabras clave: Pythiosis, *Pythium insidiosum*, Oomycete, Venezuela.

ABSTRACT

Pythiosis is a disease that occurs in humans and other mammals, such as horses, canines and cattle. The etiologic agent is *Pythium insidiosum*, an aquatic oomycete present in various geographic regions of the world. The cutaneous granulomatous form and gastrointestinal are common clinical presentations which predominate in infected animals. The infection can spread to other tissues (e.g. osseous and pulmonary). Human pythiosis has four clinical forms: cutaneous or subcutaneous, vascular, ocular and occasional anatomical sites may occur (e.g.

brain). Cases in canines, bovines and equines have been reported in Venezuela. This article updated a review of the literature on the epidemiology, lifecycle of the etiological agent, pathogenesis, clinical presentation in animals and humans, diagnosis, treatment, and cases of pythiosis in Venezuela.

Key words: Pythiosis, *Pythium insidiosum*, Oomycete, Venezuela.

INTRODUCCIÓN

La pythiosis es una enfermedad cuyo agente etiológico es *Pythium insidiosum* (1), un microorganismo clasificado en el Reino *Straminipila*, Phylum *Oomycota*, Clase *Oomycetes*, Orden *Pythiales*, Familia *Pythiaceae* y Género *Pythium* (2-4). Los miembros de la clase *Oomycetes* son filogenéticamente distantes del reino de los hongos y están más cercanos a las algas. Esta distancia taxonómica se refleja en la composición de la pared y membrana celular. En este sentido, la quitina que es el componente esencial en la pared celular de los hongos no se encuentra en la pared celular de los *Oomycetes*, en éstos predominan componentes como la celulosa y el β -glucan. Asimismo, a diferencia de los hongos la membrana celular de los *Oomycetes* carece del esteroide ergosterol (2-4). El propósito del presente trabajo es presentar una revisión actualizada de la literatura con respecto a la epidemiología de la pythiosis, ciclo de vida del agente etiológico, patogénesis, presentación clínica, diagnóstico, tratamiento y los casos de pythiosis descritos hasta ahora en Venezuela.

Aspectos epidemiológicos. La distribución geográfica de la pythiosis es amplia y se ha reportado en diversos países de clima tropical, subtropical y templado del mundo, entre los que figuran Brasil, Venezuela, Colombia, Argentina, Costa Rica, Guatemala, Panamá, Nicaragua, Haití y los Estados Unidos, especialmente en estados cercanos al Golfo de México (ej., Florida, Luisiana, Misisipi y Texas). Fuera del continente americano, se han descrito casos en varios países, tales como en el Sudeste de Asia (particularmente Tailandia e Indonesia), India, Korea del Norte, Nueva Guinea, Nueva Zelanda, Japón, Australia y Mali (Africa) (1-3, 5).

Se han reportado la existencia de variantes geográficas de este oomycete. En este sentido, Schurko y colaboradores detectaron polimorfismo en 28 aislamientos de *P. insidiosum* originarios de América, Asia y Australia, al encontrar variaciones en las secuencias espaciadoras internas de los genes que codifican las subunidades mayor y menor del ARN ribosomal, de este microorganismo. Los resultados obtenidos permitieron agrupar a 27 de los aislamientos en referencia en tres grupos diferentes: Grupo I constituido por aislamientos de América (Costa Rica, Brasil, Estados Unidos y Haití), Grupo II integrado por aislamientos oriundos de Asia (India, Tailandia, Japón y Nueva Guinea) y Australia, y Grupo III conformado por 2 aislamientos procedentes de Tailandia y Estados Unidos. Los autores mencionados fundamentados en estos hallazgos plantearon la posibilidad de una reclasificación del microorganismo en subespecies (6).

La pythiosis es a menudo diagnosticada en equinos, caninos y bovinos (2, 5, 7-19), con menos frecuencia se han reportado casos en felinos (20-22) y ovinos (23-25). Esporádicamente se ha descrito la enfermedad en animales

mantenidos en cautiverio tales como jaguar (20), tigre de bengala (22), camello (26) y en un oso (3). Recientemente fue descrito un caso en un ave migratoria (27). Asimismo, las especies del género *Pythium* se les considera entre los fitopatógenos más destructivos, ocasionando grandes pérdidas económicas en las cosechas. Además también causan enfermedad en los peces. Aunque existen alrededor de 120 especies descritas, solo *P. insidiosum* ocasiona patologías en animales y humanos (1, 4).

Patogénesis y ciclo de vida. Con base a reportes previos de otros investigadores y a los resultados obtenidos de un estudio en el que describieron en forma detallada las características ultraestructurales de la reproducción asexual de *P. insidiosum*, Mendoza y colaboradores proponen en 1993, un modelo sobre el ciclo de vida y patogénesis de este oomycete, el cual se fundamenta en la colonización de diferentes especies de plantas acuáticas donde se desarrolla el microorganismo, con la formación inicial de numerosas hifas y posterior diferenciación en esporangios que contienen zoosporas motiles biflageladas, las cuales, al ser liberadas en el agua y localizar a otra planta, se reproduce un nuevo ciclo vital. En caso que un individuo susceptible animal o humano entre en el ecosistema del microorganismo, las zoosporas serían las formas infectantes que causarían la enfermedad (1). Se cree que las zoosporas penetren a través de pequeñas heridas en la piel o mucosa gastrointestinal u otros sitios, cuando el huésped tiene contacto con agua contaminada por el microorganismo. La infección también puede ser adquirida por la presencia de hifas o esporas resistentes en suelos y/o gramas (1, 7). Las zoosporas se enquistan y luego producen un tubo germinativo que mecánicamente le permite penetrar al tejido y causar enfermedad (1, 3, 4). No se ha reportado que la infección pueda ser transmitida de animal a animal, o de animal a humano, o de humano a animal, ni tampoco de humano a humano (1, 4, 7). Las condiciones ambientales para el desarrollo de *P. insidiosum* en su ecosistema son determinantes. Para la producción de zoosporas se requiere de temperaturas que oscilen entre 30 y 40°C con acumulo de agua en lagunas o pantanos que pueden ser generadas en la época de lluvias (1, 7).

Análisis *in vitro* han demostrado la atracción de las zoosporas por el pelo, el tejido vegetal y animal. Posterior a su liberación y quimiotaxis, éstas se enquistan sobre la superficie del tejido, pierden sus flagelos, se vuelven esféricas y producen y rodean de una sustancia amorfa que facilita la adherencia y la formación del tubo germinativo (1, 3, 4). También se refiere la posibilidad de la penetración de las zoosporas a través de los folículos pilosos, ello fundamentado en la observación de las hifas en el interior de los folículos pilosos de bovinos infectados. Esta observación cuestiona la necesidad de una lesión en piel para la germinación de las zoosporas (4). En este sentido, se ha reportado que *P. insidiosum* no ejerce suficiente presión para invadir una piel sana, no obstante, en estos casos, la secreción de enzimas con actividad de proteasa jugarían papel importante al reducir la solidez del tejido y por ende facilitar el proceso de colonización tisular (28, 29).

Presentación clínica en las especies animales más afectadas. La especie equina es la más afectada por esta enfermedad y la forma cutánea de

presentación es la que predomina en la mayoría de los casos reportados. A menudo, las lesiones están localizadas en las extremidades distales de los miembros, así como en la porción ventral de la región torácica y abdominal, probablemente debido a la frecuencia y facilidad de contacto con aguas que contienen zoosporas (2, 4, 7). Las lesiones se caracterizan por ser circulares con bordes irregulares y varían en tamaño dependiendo de la localización y duración de la infección, éstas se inician lentamente con un proceso inflamatorio local y el prurito intenso es uno de los hallazgos clínicos característicos. Las mismas suelen expandirse rápidamente y pueden alcanzar 50 cm de diámetro (2, 7). En pocos días se observan lesiones de gran tamaño ulcerativas y con tejido granulomatoso que llegan a rodear toda la extremidad, observándose también la presencia de trayectos fistulosos que descargan material serosanguinolento o purulento (1, 2, 4, 7, 9, 10). Este tejido necrótico se caracteriza por producir un olor desagradable, en el cual destacan unas masas duras blanco amarillentas de aspecto coralino llamadas “kunkers”, las cuales hasta ahora únicamente han sido reportadas en casos de pythiosis equina. Los “kunkers” son de forma irregular, tienen un diámetro que oscila entre 2 a 10 mm, su origen se asocia con el acumulo y desgranulación de eosinófilos alrededor de las hifas de *P. insidiosum* y están rodeados por tejido fibroso y un infiltrado inflamatorio rico en eosinófilos, con presencia de macrófagos y ocasionalmente células gigantes (2, 4, 7, 9, 30). En casos crónicos, la infección puede diseminarse a través de los vasos linfáticos e invadir diversos órganos y tejidos, tales como el tracto intestinal, huesos y pulmones, causando gastroenteritis, osteomielitis y neumonía (1, 7). Con menor frecuencia se puede manifestar la forma clínica intestinal, en la que suelen observarse episodios de cólicos ocasionados por la presencia de masas que ocasionan disminución y/o obstrucción del lumen intestinal. La necropsia revela la presencia de úlceras y masas nodulares que pueden medir hasta 20 cm de diámetro localizadas en la pared del yeyuno (4).

La segunda especie más afectada son los caninos, específicamente perros (*Canis lupus familiaris*), en los que se han descrito formas cutáneas, aunque la forma gastrointestinal de presentación es la que predomina en la mayoría de los casos reportados, probablemente debido a la ingesta de agua o grama contaminadas con *P. insidiosum*. Las manifestaciones clínicas más frecuentes son los trastornos gastrointestinales como vómitos, anorexia crónica, pérdida de peso y diarrea a menudo sanguinolenta. En el estudio de la palpación abdominal suelen detectarse masas nodulares tumorales que generalmente se encuentran en las paredes del estómago y en el intestino, éstas son debidas a la inflamación granulomatosa y piogranulomatosa con áreas de necrosis, y están compuestas por un intenso infiltrado eosinofílico y la presencia de hifas características de *P. insidiosum* (2-4, 11-16). Las lesiones cutáneas se presentan como dermatitis ulcerativas piogranulomatosas con áreas de necrosis infiltradas por neutrófilos, macrófagos y granulomas eosinofílicos (4, 5).

Los bovinos se han constituido en la tercera especie animal más afectada por la pythiosis, debido al elevado número de animales enfermos que han sido descritos en los últimos reportes (17-19). La forma clínica de presentación es la cutánea, la cual se caracteriza por la presencia de lesiones inflamatorias y

ulceradas de tipo granulomatoso, ubicadas principalmente en la porción distal de los miembros (17, 19) y lesiones nodulares ulceradas multifocales localizadas en extremidades posteriores, parte ventral del cuello, el esternón y la cola (18). Histológicamente se detectan la presencia hifas ramificadas de *P. insidiosum* mostrando el fenómeno de Splendore-Hoeppli, el cual probablemente previene la fagocitosis y muerte intracelular del microorganismo, facilitando la cronicidad de la infección (17).

Pythiosis en humanos La pythiosis humana fue reportada por primera vez en Tailandia en 1985, país que posee la tasa más alta con aproximadamente 80% de los casos, sin embargo, esporádicamente se han reportado casos en otros países, entre los que figuran Estados Unidos, Australia y Nueva Zelanda (31-33). Diversos estudios clínicos y epidemiológicos de los casos de pythiosis humana en Tailandia, han revelado que la mayoría de los pacientes cursan la enfermedad con compromiso de los vasos sanguíneos, seguido de casos oculares y con menor frecuencia figuran la presentación de lesiones cutáneas/subcutáneas y casos atípicos diseminados en localizaciones anatómicas no usuales. La mayor parte de los pacientes sufren de desórdenes hematológicos de tipo hemoglobinopatías, fundamentalmente talasemia y hemoglobinuria paroxística nocturna (32). Asimismo, ha sido observada una fuerte asociación entre las patologías hematológicas mencionadas con los casos de pythiosis vascular, diseminada y las formas cutáneas/subcutáneas. En contraposición, la mayor parte de los pacientes con pythiosis ocular u oftálmica son personas aparentemente sanas. La enfermedad predomina en el sexo masculino y la mayoría se dedican al cultivo de diferentes rubros agrícolas que se desarrollan en zonas inundadas de aguas estancadas (32).

En el año 2005 fue reportado el primer caso de pythiosis humana en Latinoamérica, específicamente en Brasil. Se trató de un policía de 49 años de edad, el cual en sus tiempos libres desarrollaba actividades vinculadas al contacto con agua ya que era aficionado a la pesca. Esta persona presentó una úlcera tibial de 15 cm de diámetro y el diagnóstico presuntivo inicial fue de celulitis bacteriana. Los resultados de la histopatología revelaron la presencia de una inflamación granulomatosa supurativa asociada a la presencia de hifas gruesas no septadas, lo que condujo al diagnóstico de una zigomicosis. A pesar de la terapia antimicótica, la lesión siguió progresando, por lo que la amputación del miembro afectado fue considerada. Después de una extensiva debridación quirúrgica, tratamiento con anfotericina B e injerto de piel, el paciente logró la curación (34).

Presentación clínica de la pythiosis en humanos

- **Pythiosis cutánea o subcutánea.** En estos casos, por lo general, la infección se circunscribe al tejido cutáneo o subcutáneo. Esta forma clínica se caracteriza por inflamación crónica y dolor intenso en los granulomas subcutáneos, así como también, en las úlceras con tejido granulomatoso. Las lesiones habitualmente se observan en una de las extremidades, aunque la infección aguda puede manifestarse como una celulitis necrotizante de ambas piernas (32).

- **Pythiosis vascular.** Esta presentación clínica se caracteriza por el desarrollo de un síndrome de insuficiencia arterial crónica, frecuentemente localizado en las extremidades inferiores, con manifestaciones de claudicación de la pierna afectada, fiebre, parestesia, prurito, formación de vesículas y úlceras en la piel, celulitis, fascitis necrotizante, edematización de las piernas, ausencia de pulso arterial, desarrollo de masas abultadas en la zona inguinal o en el abdomen, en este caso por aneurisma aórtico. Los síntomas pueden tardar meses en manifestarse y los pacientes, en su mayoría, refieren contacto con agua estancada y pantanosa antes de la enfermedad. La infección puede ocurrir en una o ambas piernas y una de las principales causas de muerte es la ruptura del aneurisma de la aorta (32).
- **Pythiosis ocular u oftálmica** En esta situación, los pacientes suelen presentar una úlcera localizada en la cornea o queratitis y en algunos de ellos se observan síntomas como dolor, irritación, disminución de la agudeza visual, hinchazón del párpado, enrojecimiento de la conjuntiva, infiltración corneal, cornea perforada o acumulación de pus en la cámara anterior del ojo. La endoftalmitis puede ocurrir en casos graves. No se han reportado casos con pythiosis ocular primaria diseminada a otros órganos y, en su mayoría, los pacientes refieren un trauma corneal antes de iniciar la enfermedad (32). Recientemente fue reportado un caso de queratitis por *P. insidiosum* en un niño australiano de 3 años de edad después de nadar en estanques (33) y otro por contaminación a través de lentes de contacto (35).
- **Pythiosis en localizaciones anatómicas inusuales.** Son pocos los casos con esta forma clínica de presentación y, por lo general, se presenta en pacientes que padecen de una enfermedad de base (ej., hemofilia, leucemia linfoblástica o talasemia) y afecta localizaciones anatómicas del organismo que no son invadidas con frecuencia por *P. insidiosum* (ej., tracto gastrointestinal, cerebro y senos paranasales) (32).

Diagnóstico

- **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 correspondientes a las diferentes formas de presentación de la pythiosis, tanto en animales como en humanos (1-4, 7, 12-24, 31, 32).
- **Examen directo.** El estudio de 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-Hoepli (17).

- **Histopatología.** En el estudio histopatológico se emplean a menudo las coloraciones de Hematoxilina-Eosina, Impregnación de Plata Methenamina-Tricromo de Gomori y la combinación de ambas (17). En casos de pythiosis bovina se observan hifas en focos de necrosis, con una reacción gigantocelular periférica caracterizada por células multinucleadas tipo Langhans, abundantes neutrófilos indicativo de lesión inflamatoria granulomatosa, presencia de eosinófilos y células plasmáticas. Es de destacar, que mediante la coloración de Impregnación de Plata Methenamina-Tricromo de Gomori las hifas se observan de paredes gruesas, poco septadas y ramificadas con diámetros entre 4 a 6 μm (17).
- **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. *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 (3, 4, 32). 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 (1, 3, 4, 32, 36).
- **Serología.** El diagnóstico serológico de la pythiosis se realiza con la finalidad de detectar la presencia de anticuerpos anti-*P. insidiosum* en los individuos, animal o humano, infectados por este microorganismo. Con esta intención se han empleado diferentes pruebas, entre las que figuran la inmunodifusión doble, aglutinación pasiva (indirecta) de partículas de látex, ELISA indirecto, Western blot o inmunoblot, hemaglutinación pasiva (indirecta) y recientemente se ha desarrollado una prueba de inmunocromatografía. Algunos de estos métodos han mostrado alta sensibilidad y especificidad ($\geq 90\%$) (1-4, 17, 32, 37-40).
- **Métodos inmunohistoquímicos.** El propósito de estos ensayos es investigar la identidad de las hifas presentes en los tejidos infectados. Los métodos incluyen pruebas de inmunoperoxidasa e

inmunofluorescencia directa. El análisis inmunohistoquímico es una de las herramientas más precisa para la identificación de *P. insidiosum*. Estas pruebas son útiles para establecer diagnóstico diferencial entre casos de pythiosis y otras patologías como habronemiasis, neoplasias (ej., carcinoma de células escamosas), granulomas bacterianos y patologías micóticas, tales como conidiobolomicosis y basidiobolomicosis (1, 4, 7, 8, 11, 17)

- **Métodos de biología molecular** Las pruebas moleculares incluyen la amplificación del ADN de este microorganismo mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (41), hibridización mediante el uso de sondas de ADN especie específica (42) y procedimientos de secuenciación del gen ADNr 18S o de las regiones espaciadoras internas ubicadas entre genes que codifican las subunidades del ARN ribosomal de este oomycete (ej., ADNr 5.8S), y su posterior análisis de alineamiento múltiple con la finalidad de comparar la secuencia obtenida con la reportada en el Banco de Genes para *P. insidiosum* (8, 11, 33, 43).

Tratamiento. Como se mencionó, la membrana plasmática de este agente no contiene ergosterol, componente en el cual ejercen su acción la mayoría de los fármacos antifúngicos, razón por la cual, la mayor parte de estas drogas no han mostrado ser efectivas (2). Se han utilizado las soluciones saturadas de yoduro de sodio y de potasio, junto al procedimiento quirúrgico de debridación del tejido en los casos de pythiosis cutánea y subcutánea con algunos buenos resultados, sin embargo, no es efectivo en los casos de pythiosis vascular, ocular y otros tipos de pythiosis (32). En casos de pythiosis vascular, el tejido infectado puede ser removido mediante resección de la arteria infectada, amputación por encima o por debajo de la rodilla y/o aneurismectomía, dependiendo del nivel y el alcance de las arterias afectadas. La tromboembolectomía no es recomendable ya que la infección se puede propagar mientras se extrae un coágulo infeccioso (32). La amputación de la extremidad es llevada a cabo en la mayor parte de los pacientes con pythiosis vascular, no obstante, un alto porcentaje de éstos mueren a causa de la reaparición de la infección o sobreviven con algunas secuelas. Asimismo, un alto número de los casos de pythiosis ocular requieren enucleación o evisceración del globo ocular afectado, dado que es difícil controlar la infección por queratectomía (32). La inmunoterapia se presenta como una opción válida en el tratamiento de la pythiosis (2). En este sentido, se ha desarrollado un protocolo inmunoterapéutico a partir de la administración subcutánea de una mezcla de antígenos de un aislado de *P. insidiosum* [dosis: 100-200 µL (concentración: 2 mg/mL) (número de dosis: 2; intervalo interdosis: 14-15 días)]. La respuesta clínica favorable se correlaciona con el desarrollo de una fuerte reacción cutánea inflamatoria de hipersensibilidad retardada observada 24-48 horas post-administración de la primera dosis (44, 45). Alrededor de 60% de los equinos, 97% del ganado vacuno y 33% de los perros con pythiosis han respondido favorablemente a la inmunoterapia (46). Asimismo, este tipo de tratamiento ha mostrado ser efectivo en casos de pythiosis vascular humana (32, 45, 46).

Pythiosis en Venezuela. En Venezuela se han reportado casos de pythiosis en caninos, bovinos y equinos. El primer caso de pythiosis canina lo reportan Mendoza y colaboradores en el año 2005 (11), en un perro de raza Terrier de 11 meses, el cual fue referido al Hospital Veterinario de la Universidad Centroccidental "Lisando Alvarado" (Barquisimeto), quien presentó signos de depresión, anorexia, vomito, diarrea sanguinolenta y la presencia de masas

nodulares a la palpación abdominal. El estudio histopatológico en la pared y mucosa del enterocolon, reveló la presencia de áreas necróticas multifocales con abundantes eosinófilos, histiocitos, células gigantes e hifas gruesas (4-8 μm de diámetro) con pocos septos, ubicadas en el centro de las áreas necróticas eosinofílicas. El aislamiento fue infructuoso, no obstante el análisis inmunohistoquímico mediante inmunofluorescencia directa y la secuenciación del gen ADNr 18S demostraron la infección por este oomycete.

Posteriormente, Salas y colaboradores (13) describieron la pythiosis gastrointestinal en 46 perros referidos tanto al Hospital Veterinario ante mencionado como a clínicas privadas. Los resultados revelaron la presencia de una lesión multinodular, de aspecto tumoral que involucra estómago e intestino. Histopatológicamente se observó gastritis y enteritis piogranulomatosa multifocal extensiva e hifas largas, poco septadas, de 3 a 5 μm de diámetro y ramificadas. Asimismo, estos investigadores realizaron un estudio dirigido a describir la estructura y ultraestructura de *P. insidiosum* y las lesiones que produce en el tracto gastrointestinal de los perros. Las muestras examinadas mostraron tejido necrótico, trombosis vascular y numerosas hifas de *P. insidiosum*, las cuales se caracterizaron por mantener su integridad a pesar de estar íntimamente relacionadas con células fagocíticas, ser largas, onduladas, de paredes aplanadas, de 3 a 5 μm de diámetro, ramificadas en ángulo de 90° y externamente rodeadas por un material granular electrón denso en forma de incrustaciones, sugestivo del fenómeno de Splendore-Hoepli (47).

Con respecto a los casos autóctonos de pythiosis bovina, es importante señalar que en la ganadería bovina de los llanos venezolanos destaca una patología de tendencia crónica, descrita al principio de la década de los 90 por Marín y colaboradores, denominada Granulomatosis Enzoótica Bovina (GEB) (48). Los casos de GEB se han observado principalmente en el estado Apure en ecosistemas de sabana inundable. Las lesiones se presentan en la parte inferior de los miembros anteriores o posteriores. Inicialmente se observa un proceso inflamatorio local con posterior alopecia, evolucionando hacia un aumento del volumen de la región afectada, pérdida de la piel y exposición de los tejidos. La lesión avanza hacia mayor severidad con necrosis tisular, osteolisis y fractura del miembro afectado (48). El estudio inicial descriptivo de la GEB permitió sugerir una probable etiología micótica de esta patología o *P. insidiosum* como agente causal, sin embargo, no se logró identificar al microorganismo que ocasiona la enfermedad (48).

En el año 2005, Pérez y colaboradores (17) reportan un estudio realizado en el estado Apure, cuyo objetivo fue identificar al agente etiológico de la GEB en 63 bovinos diagnosticados con la enfermedad. Las manifestaciones clínicas incluyeron lesiones inflamatorias y ulceradas de tipo granulomatoso localizadas en los miembros de terneros jóvenes (Figura 1A). La histopatología reveló una reacción inflamatoria con neutrófilos, eosinófilos, células gigantes e hifas gruesas y ramificadas, de 4 a 6 μm de diámetro, con espacios claros en forma de anillos en cortes transversales (Figura 1B) y mostrando el fenómeno de Splendore-Hoepli (Figura 2A). Ocasionalmente en el interior de células gigantes fue posible observar segmentos de hifas (Figura 2B). El análisis inmunohistoquímico de inmunofluorescencia directa comprobó que las hifas eran de *P. insidiosum*. El examen directo demostró hifas gruesas, cenocíticas, hialinas y ramificadas (Figura 2C) con el fenómeno de Splendore-Hoepli (Figura 2D). En agua destilada

estéril segmentos de tejido incubados a 37 °C mostraron crecimiento algodonoso con hifas ramificadas en ángulo de 90°, característica patognomónica de este oomycete. La presencia de anticuerpos anti-*P. insidiosum* fue evidenciada mediante varias técnicas serológicas. Los hallazgos obtenidos indicaron que *P. insidiosum* es el agente etiológico de la GEB.

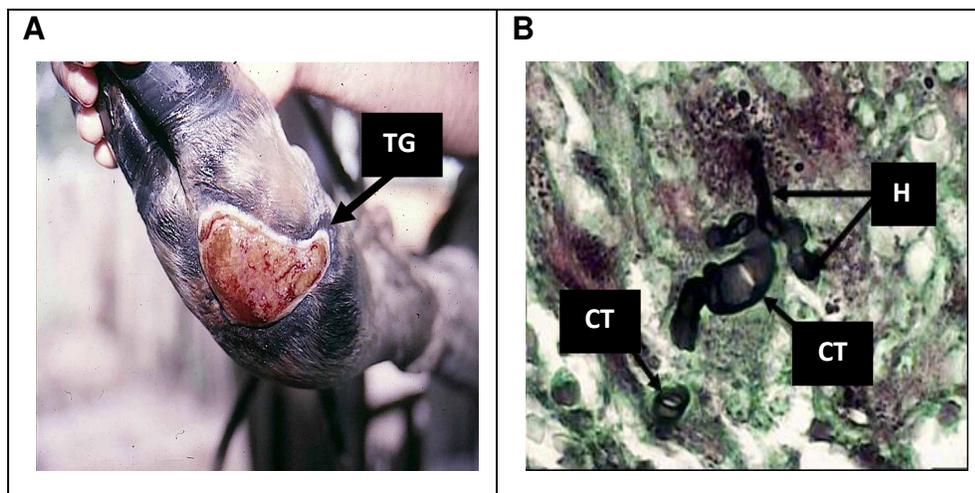
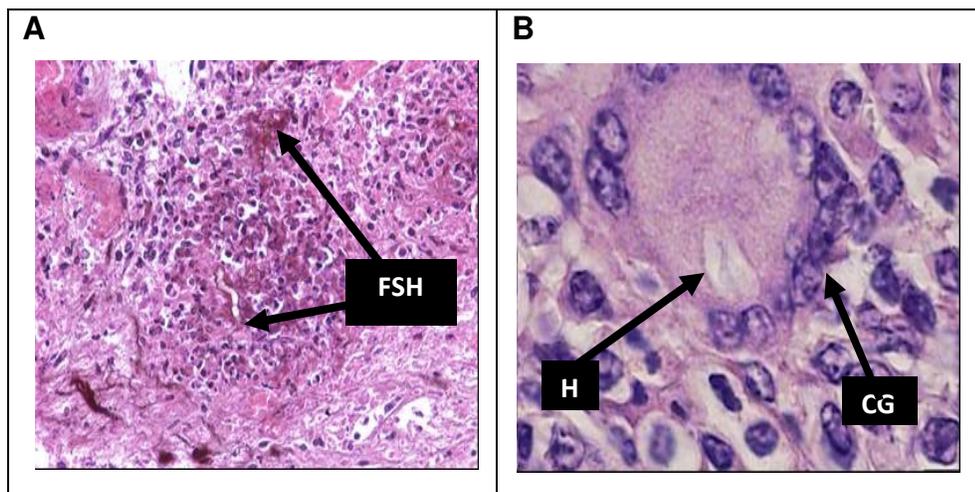


Figura 1. (A) Lesión ulcerada con tejido granulomatoso (TG), localizada en miembro anterior del bovino. **(B)** Hifa gruesa irregular y ramificada de color pardo (H), sobre un fondo de tejido conectivo de color verde. Se observan espacios claros con forma de anillo en corte transversal (CT). Impregnación de Plata de Gomori (1000X).



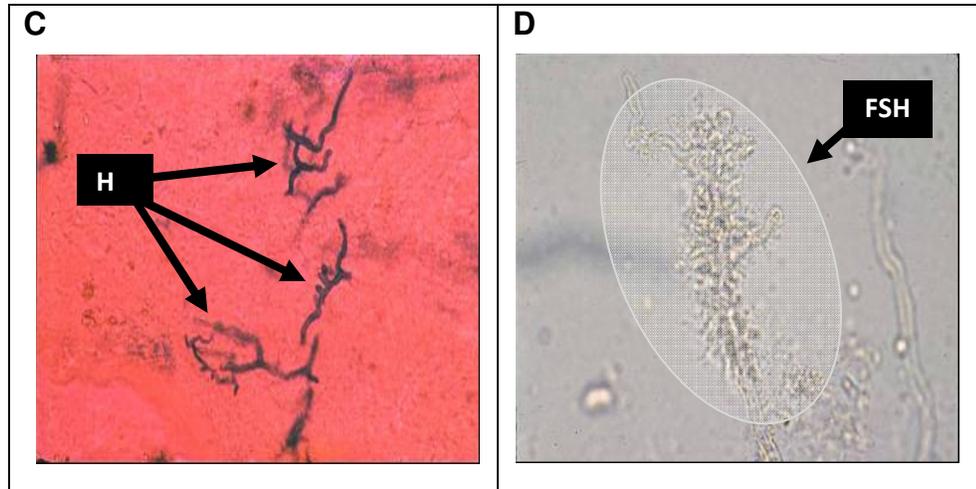


Figura 2. (A) Histopatopatología del granuloma por *Pythium insidiosum* con fenómeno de Splendore-Hoeppli (FSH, flechas). H-E/Impregnación de Plata de Gomori (1000 X). (B) Célula gigante (CG) con segmento intracitoplasmático de posible hifa en su interior (H). H-E (1000X). (C) Hifas gruesas ramificadas poco septada (H). Examen directo KOH + Tinta Parker (400X). (D) Hifa exhibiendo el fenómeno de Splendore-Hoeppli (FSH). Examen directo KOH + Tinta Parker (400X).

Posteriormente, Luis-León y colaboradores (43) reportaron los hallazgos de una investigación realizada con el propósito de confirmar la identidad del microorganismo por análisis de secuencia. Para ello, se tomaron muestras de tejido infectado de 20 bovinos con GEB y se aisló el ADN genómico total. La secuencia correspondiente al ADNr 18S fue amplificada mediante PCR. El segmento amplificado (1,8 kpb) fue clonado y expandido en células de *E. coli* transformadas. El ADN recombinante recuperado fue secuenciado y se comparó con secuencias reportadas para *P. insidiosum* y otras especies del género *Pythium*: *P. myriotylum*, *P. monospermum*, *P. Ro21* y *P. spinosum*. El alineamiento múltiple de las secuencias demostró una identidad total del segmento amplificado con la secuencia de referencia para *P. insidiosum*, y diferencias significativas con las demás secuencias incluidas en el análisis. Estos resultados, junto a las evidencias previas obtenidas por este grupo de investigadores, demuestran que el agente etiológico de la GEB es *P. insidiosum*.

Cabe destacar, que durante el desarrollo de estos dos últimos reportes (17, 43), los investigadores en referencia, a partir de biopsias obtenidas de un caso de pythiosis bovina diagnosticado con GEB y serología marcadamente positiva (3+/4+) mediante aglutinación de partículas de látex, lograron el cultivo de este oomycete en agar Sabouraud dextrosa y en agar infusión cerebro corazón a 37 °C. El crecimiento se caracterizó por ser de forma radiada con colonias planas sumergidas en el agar de cultivo, de color amarillento (Figura 3A) y presencia al examen directo de hifas largas, gruesas, hialinas, poco septadas y con ramificaciones laterales en ángulo de 90°.

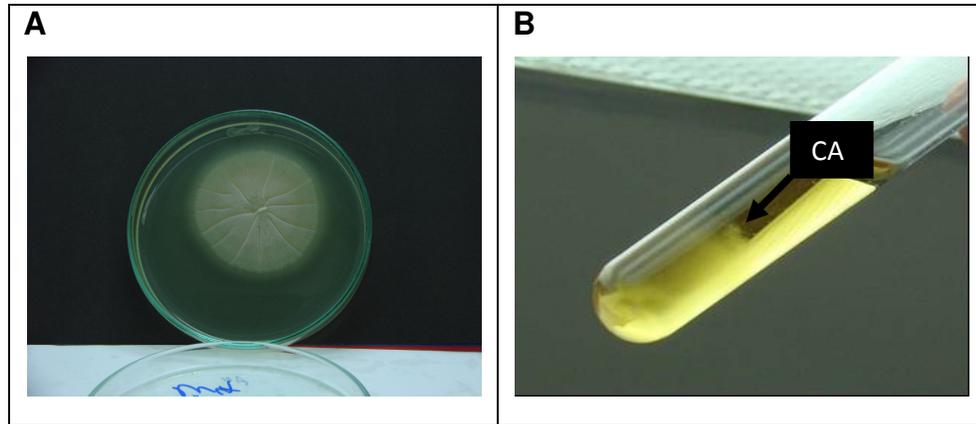


Figura 3. (A) Cultivo de *P. insidiosum* en agar infusión cerebro corazón a 37 °C en cámara húmeda. Muestra obtenida de un caso de Granulomatosis Enzoótica Bovina (Tamaño normal 1X). **(B)** Subcultivo de *P. insidiosum* en caldo Sabouraud dextrosa a 37 °C en cámara húmeda. Se observa crecimiento algodonoso (CA) (Tamaño normal 1X).

Adicionalmente, subcultivos realizados en medio líquido a 37 °C mostraron crecimiento algodonoso (Figura 3B) y la presencia de hifas ramificadas en ángulo de 90° visualizadas con el examen directo (datos no publicados). Aunque la zoosporogénesis no fue posible realizarla, la procedencia de la muestra cultivada, los resultados de la serología y las características morfológicas descritas, las cuales son compatibles con cultivos de este microorganismo previamente reportados, permiten inferir que se trata de *P. insidiosum*.

Adicionalmente, estos investigadores observaron en un equino del estado Apure la presencia de una lesión granulomatosa ulcerada que rodeaba toda la parte inferior de una extremidad, en la cual se destacaban los denominados “kunkers” (Figura 4), de donde fue posible observar hifas gruesas, cenocíticas y ramificadas, mostrando el fenómeno de Splendore-Hoeppli. Asimismo, en el suero de este equino se detectó la presencia de aglutininas anti-*P. insidiosum*, a través de una fuerte reacción de aglutinación de partículas de látex. Estos hallazgos permiten sugerir la presencia de casos de pythiosis equina en Venezuela.



Figura 4. Lesión granulomatosa ulcerada localizada en la parte inferior de la extremidad de un equino. Se observan masas blanco amarillentas de consistencia dura y aspecto coralino denominadas “kunkers” (K) (Tamaño normal 1X).

En correspondencia con estas observaciones en la especie equina, figura un reciente reporte de Márquez y colaboradores (49) en el caballo criollo venezolano que habita la región de los llanos, en zonas correspondientes a los estados Apure, Barinas y Portuguesa. Estos investigadores tomaron muestras de 8 animales con lesiones cutáneas compatibles con pythiosis y realizaron una descripción anatomopatológica de las mismas. El estudio macroscópico de la lesión reveló aumento de volumen en forma de placa ulcerada e irregular, de color blanco amarillento con apariencia de tejido de granulación, sangrante, que varió de longitud entre 10 a 25 cm, ubicada en la cuartilla y rodete coronario de miembros posteriores. Fueron halladas zonas de necrosis que contenían concreciones irregulares de color amarillento, duras, de superficie arenosa, que se corresponden con los denominados “kunkers”. Histopatológicamente, el estudio demostró una lesión en piel altamente vascularizada con fibrosis e intenso infiltrado difuso de eosinófilos, seguidos por macrófagos y en menor proporción neutrófilos. Asimismo, fue posible observar la presencia de hifas gruesas pobremente tabicadas y ramificadas en ángulo de 90°, con el fenómeno de Splendore-Hoeppli. Los autores refirieron que el total de animales muestreados resultaron positivos a *P. insidiosum* por cultivo microbiológico, aunque no describen las características macroscópicas y microscópicas de estos cultivos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mendoza L. *Pythium insidiosum*. En: Ajello L, Hay R, editores. Medical Mycology. Vol 4. 9na. ed. Oxford University Press, Inc. New York 1998; p. 617-630.
2. Leal AT, Monteiro AB, Flores EF, Santurio JM. Pitiose. *Ciência Rural* 2001; 31(4): 735-743.
3. Grooters AM. Pythiosis, langenidiosis and zygomycosis in smal animals. *Vet Clin Smal Anim* 2003; 33: 695-720.
4. Santurio JM, Alves SH, Pereira DB, Argenta JS. Pythiosis: an emergent mycosis. *Act Scient Vet* 2006; 34(1): 1-14.

5. Rivierre Ch, Laprie C, Guiard-Marigny O, Bergeaud P, Berthelemy M, Guillot J. Pythiosis in Africa. *Emerg Infect Dis* 2005; 11(3): 479-481.
6. Schurko A, Mendoza L, de Cock A. Evidence for geographic clusters: molecular genetic differences among strains of *Pythium insidiosum* from Asia, Australia and the Americas are explored. *Mycol* 2003; 95(2): 200-208.
7. Chaffin M, Schumacher J, McMullan W. Cutaneous pythiosis in the horse. *Dermatol* 1995; 11(1): 91-103.
8. Reiss J, de Carvalho E, Nogueira R, Lemos L, Mendoza L. Disseminated pythiosis in three horses. *Vet Microbiol* 2003; 96(3): 289-295.
9. Viegas E, Brayer D, Buss M. Pitiose cutânea em eqüinos: 14 casos. *Ciência Rural* 2003; 33(5): 899-903.
10. Headley S, Arruda H. Equine Cutaneous pythiosis: a report of four cases. *Ciência Rural* 2004; 34(1): 289-292.
11. Mendoza L, Arias M, Colmenárez V, Perazzo Y. Intestinal canine pythiosis in Venezuela confirmed by serological and sequencing analysis. *Mycopathol* 2005; 159: 219-222.
12. Berryessa N, Marks S, Pesavento P, Krasnansky T, Yoshimoto S, Johnson E, Grooters A. Gastrointestinal pythiosis in 10 dogs from California. *J Vet Intern Med* 2008; 22(4): 1065-1069.
13. Salas Y, Márquez A, Corro A, Colmenárez V. Caracterización macroscópica y microscópica de la pythiosis gastrointestinal de perros en Venezuela. *Rev Fac Cs Vets* 2009; 50(1): 23-31.
14. Trost M, Gabriel A, Masuda E, Figuera R, Irigoyen L, Kommers G. Aspectos clínicos, morfológicos e imuno-histoquímicos da pitiose gastrintestinal canina. *Pesq Vet Bras* 2009; 29(8): 673-679.
15. Neto R, Bosco S, Amorim R, Brandão C, Fabris V, Estanislau C, Bagagli E. Cutaneous pythiosis in a dog from Brazil. *Vet Dermatol* 2010; 21(2): 202-204.
16. Pereira D, Schild A, Motta M, Figuera R, Sallis E, Marcolongo-Pereira C. Cutaneous and gastrointestinal pythiosis in a dog in Brazil. *Vet Res Commun* 2010; 34(3): 301-306.
17. Pérez R, Luis-León J, Vivas J, Mendoza L. Epizootic cutaneous pythiosis in beef calves. *Vet Microbiol* 2005; 109: 121-128.
18. Gabriel A, Kommers G, Trost M, Barros C, Pereira D, Schwendler S, Santurio J. Surto de pitiose cutânea em bovinos. *Pesq Vet Bras* 2008; 28(12): 583-587.
19. Grecco F, Schild A, Quevedo P, Assis-Brasil N, Kommers G, Marcolongo-Pereira C, Pereira-Soares M. Pitiose cutânea em bovinos na região Sul do Rio Grande do Sul. *Pesq Vet Bras* 2009; 29(11): 938-942.
20. Camus A, Grooters A, Aquilar R. Granulomatous pneumonia caused by *Pythium insidiosum* in a central American jaguar, *Panthera onca*. *J Vet Diagn Invest* 2004; 16: 567-571.
21. Rakich P, Grooters A, Tang K-N. Gastrointestinal pythiosis in two cats. *J Vet Diagn Invest* 2005; 17: 262-269.
22. Buergelt C, Powe J, White T. Abdominal pythiosis in a Bengal tiger (*Panthera tigris tigris*). *J Zoo Wild Med* 2006; 37(2): 186-189.
23. Tabosa I, Riet-Correa F, Nobre V, Azevedo E, Reis-Júnior J, Medeiros R. Outbreaks of pythiosis in two flocks of sheep in northeastern Brazil. *Vet Pathol* 2004; 41: 412-415.
24. Santurio J, Argenta J, Schwendler S, Cavalheiro A, Pereira D, Zanette R, Alves S, Dutra V, Silva M, Arruda L, Nakasato L, Colodel E. Granulomatous rhinitis associated with *Pythium insidiosum* infection in sheep. *Vet Rec* 2008; 163(9): 276-277.

25. Souza F, Souza A, Souza Júnior A, Costa F, Riet-Correa F, Mendoza L, Carvalho E, Silva S. Pitiose em ovinos no Estado do Piauí. Disponible en: <http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0255-1.pdf>
26. Wellehan J, Farina L, Keoughan C, Lafortune M, Grooters A, Mendoza L, Brown M, Terrel S, Jacobson E, Heard D. Pythiosis in a dromedary camel (*Camelus dromedarius*). J Zoo Wild Med 2004; 35(4): 564-568.
27. Pasavento P, Barr B, Riggs S, Eigenheer A, Pamma R, Walker R. Cutaneous pythiosis in a Nestling White-faced ibis. Vet Pathol 2008; 45: 538-541.
28. Ravishankar J, Davis Ch, Davis D, MacDonald E, Makselan S, Millward L, Money N. Mechanics of solid tissue invasion by the mammalian pathogen *Pythium insidiosum*. Fung Genet Biol 2001; 34: 167-175.
29. Davis D, Lanter K, Makselan S, Bonati Ch, Asbrock P, Ravishankar J, Money N. Relationship between temperature optima and secreted protease activities of three *Pythium* species and pathogenicity toward plant and animal hosts. Mycol Res 2006; 110: 96-103.
30. Pereira D, Meirelles M. Pitiose. En: Riet-Correa F, Schild A, Lemos R, Borges J, editores. Doenças de ruminantes e eqüideos. Vol 1. 3ª ed. Palloti. Santa María (Brasil) 2007; p. 457-466.
31. Mendoza L, Prasla S, Ajello L. Orbital pythiosis: a non-fungal disease mimicking orbital mycotic infections, with a retrospective review of the literature. Mycoses 2004; 47: 14-23.
32. Krajaejum T, Sathapatayavongs B, Chairasert A, Srimuang S. Do you know human pythiosis?. J Infect Dis Antimicrob Agents 2008; 25(1): 45-51.
33. Badenoch P, Mills R, Chang J, Sadlon T, Klebe S, Coster D. *Pythium insidiosum* keratitis in an Australian child. Clin Experiment Ophthalmol 2009; 37(8): 806-809.
34. Bosco S, Bagagli E, Araújo J, Candeias J, de Franco M, Marques M, Mendoza L, de Camargo R, Marques S. Human pythiosis, Brazil. Emerg Infect Dis 2005; 11(5): 715-718.
35. Lekhanont K, Chuckpaiwong V, Chongtrakool P, Aroonroch R, Vongthongsri A. *Pythium insidiosum* keratitis in contact lens wear: a case report. Cornea 2009; 28(10): 1173-1177.
36. Pereira D, Santurio J, Alves S, Argenta J, Cavalheiro A, Ferreiro L. Zoosporogênese *in vitro* entre isolados do oomiceto *Pythium insidiosum*. Ciência Rural 2008; 38(1): 143-147.
37. Santurio J, Trindale-Leal A, Monteiro-Leal A, Alves S, Lübeck I, Griebeler J, Copetti M. Teste de ELISA indirecto para o diagnóstico sorológico de pitiose. Pesq Vet Bras 2006; 26(1): 47-50.
38. Supabandhu J, Vanittanakom P, Laohapensang K, Vanittanakom N. Application of immunoblot assay for rapid diagnosis of human pythiosis. J Med Assoc Thai 2009; 92(8): 1063-1071.
39. Jindayok T, Piromsontikorn S, Srimuang S, Khupulsup K, Krajaejum T. Hemagglutination test for rapid serodiagnosis of human pythiosis. Clin Vaccine Immunol 2009; 16(7): 1047-1051.
40. Krajaejum T, Imkhieo S, Intaramat A, Ratanabanangkoon K. Development of an immunochromatographic test for rapid serodiagnosis of human pythiosis. Clin Vaccine Immunol 2009; 16(4): 506-509.
41. Grooters A, Gee M. Development of a nested polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Pythium insidiosum*. J Vet Intern Med 2002; 16(2): 147-152.
42. Schurko A, Mendoza L, de Cock A, Bedard J, Klassen G. Development of a species-specific probe for *Pythium insidiosum* and the diagnosis of pythiosis. J Clin Microbiol 2004; 42(6): 2411-2418.
43. Luis-León J, Pérez C, Vivas J, Mendoza L, Triana-Alonso F. Confirmación de *Pythium insidiosum* como agente etiológico de la Granulomatosis Enzoótica Bovina mediante análisis de secuencia. Salus online 2009; 12 Suppl 1: 205-215. Disponible en: <http://salus-online.fcs.uc.edu.ve/>

44. Mendoza L, Mandy W, Glass R. An improved *Pythium insidiosum*-vaccine formulation with enhanced immunotherapeutic properties in horses and dogs with pythiosis. *Vaccine* 2003; 21: 2797-2804.
45. Wanachiwanawin W, Mendoza L, Visuthisakchai S, Mutsikapan P, Sathapatayavongs B, Chaiprasert A, Suwanagool P, Manuskiatti W, Ruangsetakit C, Ajello L. Efficacy of immunotherapy using antigens of *Pythium insidiosum* in the treatment of vascular pythiosis in humans. *Vaccine* 2004; 22: 3613-3621.
46. Mendoza L, Newton J. Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum*. *Med Mycol* 2005; 43(6): 477-486.
47. Salas Y, Colmenárez V, Márquez A, Luis-León J, Castejón O. Estructura y ultraestructura de *Pythium insidiosum* en la pitiosis gastrointestinal canina. *Rev Soc Ven Microbiol* 2009; 29: 117-121.
48. Marín C, de López N, Pérez C, Mirabal G, de Rolo M, Urdaneta J. Primer reporte de la Granulomatosis Enzoótica Bovina en Venezuela. *Fonaiap Divulga* 1991; IX(37): 14-16.
49. Márquez A, Salas Y, Canelón J, Perazzo Y, Colmenárez V. Descripción anatomopatológica de pitiosis cutánea en equinos. *Rev Fac Cs Vets UCV* 2010; 51(1): 37-42.