

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS
DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO Y SEROLÓGICO DE LAS INFECCIONES
CAUSADAS POR *Pythium insidiosum* EN MÉXICO

TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA
ANDIRA ALEJANDRA HERNÁNDEZ ROMAHN

TUTOR: DR. ROBERTO A. CERVANTES OLIVARES

COMITÉ TUTORAL:
DRA. ELIZABETH MORALES SALINAS
DR. LEONEL MENDOZA

MÉXICO, D.F. 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

A mi mamá, mi angel guardián, la mujer que más amo y admiro.

A Donatia y Misa, my close kins, mis amigos y compañeros de vida.

A la nueva generación, Jade y Giselle.

A Ale, mi negro querido, mi mar de sensaciones.

A la integrante más nueva y pequeñita.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. RACO, mi maestro y mentor, por todo su apoyo, confianza, observaciones, cariño.... usted ha colaborado enormemente en lo que ahora soy.

A la Dra. Elizabeth, por su invaluable ayuda.

Al Dr. Leonel Mendoza, por su asilo en MSU, sus enseñanzas y por el honor de trabajar con él.

A Caro, por tu apoyo que nunca falta, por tus palabras que nunca sobran y tu cariño que nunca acaba.

Al honorable jurado: Dr. Francisco Trigo Tavera, Dra. Ma. de los Angeles Martínez, Dra. Carolina Segundo Zaragoza, Dra. Lucían García, Dr. Roberto A. Cervantes Olivares, por sus sugerencias y observaciones que enriquecieron esta tesis.

Al Biomedical Laboratory Diagnostics en MSU, en especial a Ellen Rzepka, Kathy Doig, y David Thorne, por su apoyo en tierras lejanas y también a mis compañeros de MSU, en especial a Hermes, Irwin, Eidi, Edith, Kumbi y Ashley, por su amistad y cobijo.

A todo el Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ de la UNAM, por todo el apoyo que se me brindó.

A mis colegas y amigos del laboratorio de Micología en especial a Ceci, David, Chucho, Ale y Angie, porque ustedes son la parte divertida y emotiva de este proceso.

A Alejandro, por su ciberayuda, por el amor, paciencia y apoyo que siempre me tienes.

A todos mis compañeros de Posgrado que hicieron agradable mi recorrido.

A my roommate Edith, por su amistad y apoyo.

A mis buenas amigas de siempre, tanto de la infancia, como de la licenciatura y ahora posgrado, porque aunque estemos físicamente lejos nuestra amistad permanece.

A Toño y Alejandra, por el nido seguro que siempre he tenido.

A mis tías y tíos que siempre me han apoyado.

A mis abuelitas, Conchita y Maru, porque siempre están al pendiente de todo.

A mi “alma mater”, la UNAM, por albergar un rato más a esta estudiante orgullosamente PUMA.

Al Dr. Horacio Chavira de la DS/ILPH/UNAM y al Dr. Carlos Hernández por su cooperación con las muestras de este trabajo.

A todos aquellos que de una u otra forma formaron parte de este trabajo.

La sustentante recibió beca de CONACYT (No. de registro 205316) y beca del Programa de Movilidad Internacional de Estudiantes de la Dirección General de Estudios de Posgrado, UNAM.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
1.1 ABSTRACT	2
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 Historia	5
2.2 Distribución	5
2.3 Etiología	8
2.3.1 Morfología	8
2.3.1.1 Macroscópica	8
2.3.1.1 Microscópica	9
2.3.2 Ecología	9
2.3.3 Ciclo de vida	9
2.4 Manifestaciones clínicas y lesiones	11
2.4.1 Animales	11
2.4.2 Humanos	13
2.5 Métodos de diagnóstico	14
2.5.1 Histopatología	15
2.5.2 Morfológico	15
2.5.3 Serológico	15
2.5.4 Técnicas moleculares	17
2.6 Tratamiento	17
2.6.1 Escisión del tejido	17
2.6.2 Inmunoterapia	18
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. OBJETIVO GENERAL	20
4.1 Objetivos particulares	20
5. MATERIAL Y MÉTODOS	21
5.1 Colección de muestras clínicas de equinos	21
5.1.1 Suero para las pruebas serológicas (Inmunodoble difusión [IDD], Ensayo inmunoabsorbente de enzima ligada [ELISA] indirecto, Western Blot [WB])	21
5.1.2 Tejido para histopatología	22
5.1.3 Concreciones para el aislamiento	22
5.2 Identificación morfológica	22
5.2.1 Observación directa con KOH 20%	22
5.2.2 Aislamiento y cultivo	23
5.2.3 Producción de zoosporangios y zoosporas	23
5.3 Histopatología	24
5.4 Diagnóstico serológico	
5.4.1 Producción de antígeno para IDD, ELISA y WB	24
IDD	24

5.4.2 IDD	25
5.4.3 ELISA indirecto	26
5.4.4 WB	27
5.4.5 Análisis estadístico	27
6. RESULTADOS	30
6.1 Colección de muestras clínicas de equinos	30
6.2 Identificación morfológica	30
6.2.1 Observación directa con KOH 20%	30
6.2.2 Aislamiento y cultivo	30
6.2.3 Producción de zoosporangios y zoosporas	34
6.3 Histopatología	36
6.4 Diagnóstico serológico	38
6.4.1 Producción de antígeno para IDD, ELISA y WB	38
6.4.2 IDD	40
6.4.3 ELISA indirecto	41
6.4.4 WB	43
6.4.5 Valoración de las pruebas diagnósticas	45
7. DISCUSIÓN	47
8. CONCLUSIONES	53
9. LITERATURA CITADA	54
10. ANEXOS	61
10.1 Soluciones de uso general	61
10.2 Soluciones para ELISA	62
10.3 Soluciones para geles PAGE-SDS	62
10.4 Soluciones para WB	65
10.5 Agar fenolizado para IDD	65
10.6 Medio de inducción para zoosporogénesis	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Distribución mundial de la pytiosis	6
Figura 2.	Ciclo de vida de <i>Pythium insidiosum</i>	9
Figura 3.	Equinos con pytiosis	11
Figura 4.	Concreciones que se obtienen de las lesiones granulomatosas en equinos con pytiosis.	11
Figura 5.	Prueba de IDD	26
Figura 6.	Prueba de ELISA indirecto	26
Figura 7.	Gel de poliacrilamida con SDS	27
Figura 8.	Observación directa con KOH al 20% de muestra H11.	33
Figura 9.	Cultivo de 48 hrs de <i>P. insidiosum</i>	33
Figura 10.	Tinción de lactofenol azul de algodón de un cultivo puro de <i>P. insidiosum</i>	32
Figura 11.	Observación directa con microscopio invertido de zooporangios de cepa MTPI-04 de <i>P. insidiosum</i>	34
Figura 12.	Histopatología de tejido equino lesionado con <i>P. insidiosum</i>	37
Figura 13.	Gel de SDS-PAGE teñido con azul de bromofenol al 0.2% que muestra el patrón del antígeno metabólico de las cepas ATCC de <i>P. insidiosum</i>	39
Figura 14.	Gel de SDS-PAGE teñido con azul de bromofenol al 0.2% que muestra el patrón del antígeno somático de la cepa ATCC 28251 de <i>P. insidiosum</i>	39
Figura 15.	Reacción entre el antígeno metabólico de <i>P. insidiosum</i> y el suero equino	41
Figura 16.	ELISA indirecto que muestra los resultados de todas las diluciones (1/100 a 1/6400) de las muestras clínicas de suero equino	42
Figura 17.	ELISA indirecto que muestra los resultados de la dilución 1/200 de las muestras clínicas de suero equino	42
Figura 18.	WB que muestra las reacciones entre el antígeno metabólico de <i>P. insidiosum</i> y las muestras de suero equino	43
Figura 19.	WB que muestra las reacciones entre el antígeno somático de <i>P. insidiosum</i> y las muestras de suero equino	44

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Descripción de las muestras clínicas de equinos con lesiones granulomatosas obtenidas en este estudio.	32
Cuadro 2.	Resultados de la IDD de las muestras de sueros equinos.	40
Cuadro 3.	Resultados obtenidos en todas las técnicas morfológicas y serológicas de las muestras clínicas que se trabajaron en este estudio.	46

1. RESUMEN

Pythium insidiosum es el agente etiológico de la pytiosis, enfermedad que causa lesiones granulomatosas en el tejido cutáneo y subcutáneo en animales y el hombre, que en ocasiones puede afectar otros tejidos. La enfermedad es frecuente en regiones tropicales y subtropicales, principalmente en las estaciones de verano y otoño. Aunque México posee climas propicios para el desarrollo de este microorganismo y está rodeado de países donde esta enfermedad ha sido previamente informada, la pytiosis no se había diagnosticado aún en este país. Se colectaron 11 muestras de equinos con lesiones granulomatosas sugestivas a pytiosis de los estados de Guerrero (n=4) y Tabasco (n=7). Para el diagnóstico se utilizaron técnicas morfológicas clásicas como la observación directa con KOH al 20%, aislamiento e histopatología del tejido y concreciones. Las preparaciones con KOH al 20% mostraron hifas aseptadas ramificadas aproximadamente de 8 μm de diámetro. En preparaciones histológicas con tinciones con hematoxilina y eosina y ácido peryódico de Schiff se observaron focos de necrosis con infiltrados compuestos abundantes de eosinófilos y neutrófilos; con tinciones de plata se visualizaron hifas aseptadas. Las técnicas serológicas como la inmunodoble difusión, ELISA indirecto y Western Blot mostraron que 8/11 sueros equinos presentaron anticuerpos contra *P. insidiosum*. La inmunodoble difusión mostró de una a tres líneas de precipitación en 7/11 sueros equinos, el ELISA indirecto detectó 8/11 sueros equinos con títulos de anticuerpos hasta 1:6400 y el Western Blot con el antígeno metabólico, identificó proteínas de 37 a 75 kDa en 8/11 sueros equinos. Las técnicas serológicas confirmaron que 8 de los 11 equinos con lesiones granulomatosas presentaron anticuerpos contra *P. insidiosum* y por lo tanto fueron diagnosticados como pytiosis. Este es el primer informe de la pytiosis equina en México, la cual tiene que ser diagnóstico diferencial con la habronemiasis cutánea. Basados en estos resultados es posible que esta enfermedad esté presente en otros animales, incluyendo al hombre.

Palabras claves: *Pythium insidiosum*, pytiosis, inmunodoble difusión, Western Blot, ELISA, equinos.

1.1 ABSTRACT

Pythium insidiosum is the etiologic agent of pythiosis, a disease that causes cutaneous and subcutaneous granulomatous lesions in animals and man, which occasionally affect other tissues. It occurs mainly in tropical and subtropical environments, during summer and fall. Despite Mexico possesses climates proper for the development of this microorganism and it is surrounded by countries where the disease has been diagnosed, pythiosis had not yet been diagnosed in this country. Eleven samples were collected from horses with granulomatous lesions suggestive of pythiosis from the states of Guerrero (n=4) and Tabasco (n=7). Morphological techniques as direct observation with KOH 20%, culture isolation and histopathology were performed from tissue and “kunkers”. KOH 20% mounts showed branching non septated hyphae about 8 µm of diameter. Histopathological slides with hematoxylin and eosin and periodic acid of Schiff stains showed necrotic areas surrounded by infiltrates composed of abundant eosinophils and neutrophils; with silver stains non septated hyphae were visualized. Serological techniques such as immunodiffusion, indirect ELISA and Western Blot showed that 7/11 sera were positive for antibodies against *P. insidiosum*. Immunodiffusion showed one, two or three precipitin lines in 7/11 equine sera, indirect ELISA showed antibody titers up to 1:6400 in 8/11 equine sera and Western Blot with metabolic antigen identified proteins from 37 to 75 kDa in 8/11 equine sera. Serological techniques confirmed that 8 of 11 horses with granulomatous lesions showed antibodies against *P. insidiosum* and therefore diagnosed as pythiosis, identifying for the first time this disease in Mexico, which have to be a differential diagnosis for cutaneous habronemiasis. Based on this finding we believe that the disease is probably present in other animals, including man.

Key words: *Pythium insidiosum*, pythiosis, immunodiffusion, Western Blot, ELISA, horses.

2. INTRODUCCIÓN

La Pytiosis es una enfermedad que se caracteriza principalmente por presentar lesiones granulomatosas cutáneas y subcutáneas, que con menor frecuencia se manifiesta en intestino, pulmones, hueso o como enfermedad sistémica (Mendoza y Newton, 2005). Ha sido descrita en una variedad de animales y en el hombre, en diferentes lugares geográficos, donde el clima es subtrópico, trópico húmedo y templado (de Cock et. al., 1987), lo cual correspondería a los climas cálidos húmedos y subhúmedos con lluvias en verano (“Am” y “Aw”) presentes en México (García E. 1988). *Pythium insidiosum*, el agente etiológico de la pytiosis, un microorganismo clasificado dentro del reino de los Cromistas, filum Oomycota y clase de los Oomicetos, un grupo de microorganismos poco estudiados en México en el área de la salud animal. Los Oomicetos son una clase con más de 500 especies, cuyo nombre proviene de su estructura sexual (oogonia) y del hábitat en donde se encuentran. Los microorganismos pertenecientes a este filum son de importancia económica y comercial, aunque lo más importante es el daño que provocan en la agricultura y salud animal. Esta clase estaba considerada antes como parte del reino Fungi, sin embargo, características ultraestructurales y secuencias moleculares indican que pertenecen al reino de los Cromistas, llamado también Stramenopila. En cuanto a las características ultraestructurales se encuentra: la quitina, que es un componente presente en grandes cantidades en la pared de los hongos, se encuentra en pocas cantidades en algunos Oomicetos; los esteroides, como el ergosterol, son componentes de la membrana de los hongos, el cual es el blanco de la mayoría de los antimicóticos, y que no tienen los Oomicetos; clorofila c, es un componente utilizado por los Oomicetos para el almacenamiento de energía en lugar de almidón. Basados en las comparaciones entre las secuencias moleculares de los genes, entre otros, de la subunidad ribosomal pequeña, la actina y la tubulina, se muestra que los hongos y los Oomicetos se encuentran filogenéticamente distantes uno del otro (Latijnhouwers et. al., 2003).

Se han encontrado distintos Oomicetos afectando a los animales, tal es el caso de *Saprolegnia* spp. que produce lesiones en la piel de los peces, especialmente los salmónidos (Torto-Alalibo et. Al., 2005); *Lagenidium* spp. ocasiona lesiones granulomatosas en linfonodos y piel de perros (Grooters, 2003), sin embargo, no se ha publicado más

INTRODUCCIÓN

información acerca de este microorganismo y se piensa que Grooters et. al. (2003) pudieron haber confundido a *Lagenidium* spp. con un cepa de *P. insidiosum* (Supabandhu et. al., 2008); *Pythium insidiosum* que causa lesiones granulomatosas en piel, pulmones, intestino, hueso, vasos sanguíneos o como enfermedad sistémica en perros, gatos, borregos, vacas, equinos, fauna silvestre y humanos. Las enfermedades ocasionadas por los Oomicetos tienen en común que generalmente los animales afectados, fallecen (Holloway, 2003).

P. insidiosum produce zoosporangios y zoosporas biflageladas móviles que tienen una atracción quimiotáctica hacia piel, pelo de equino, cabello de humano, hojas de lirio acuáticas y pasto. Para invadir al huésped es necesario que exista un daño previo en la piel, ya que las zoosporas no son capaces de penetrar por piel intacta. Las lesiones de la pytiosis en equinos generalmente se encuentran localizadas en miembros o en vientre, las cuales se desarrollan rápidamente y en algunos casos, esta enfermedad puede ser mortal. Debido a la severa reacción eosinofílica alrededor de las hifas de *P. insidiosum*, en equinos se forman masas coraliformes (concreciones) en las sinuosidades de la lesión. Estas concreciones son de color bronceado amarillo a gris, con forma irregular de 2 a 20 mm. Este tipo de lesiones no sólo se presentan en esta enfermedad por lo que dentro del diagnóstico diferencial se encuentran lesiones causadas por los hongos de los géneros *Conidiobolus* spp. y *Basidiobolus* spp., habronemiasis cutánea causada por el parásito *Habronema* spp., granulomas bacterianos y carcinoma de las células escamosas, entre otras (Chaffin et al. 1995). En México, es posible que esta enfermedad se haya confundido con la habronemiasis cutánea debido a la similitud que tiene con las lesiones macroscópicas de la pytiosis.

2.1 Historia

Los primeros informes de lo que se creyó que era pytiosis en equinos, se publicaron a mediados y a finales del siglo XIX. Estos primeros casos son controversiales a causa de la semejanza que tiene esta enfermedad con habronemiasis, una enfermedad causada por una larva del género *Habronema*. Además, estas dos enfermedades compartieron sinonimias en varios países durante este período (mediados y finales del siglo XIX y principios del siglo XX) tales como son: cáncer de los pantanos en Australia, bursitis en la India, sanguijuelosis en E.U.A. y dermatitis granular en Japón. Se piensa que Smith y Drouin fueron los primeros en publicar descripciones de pytiosis a finales de los años 1800. Ambos autores comentaron sobre la presencia de micelio en la lesión. La primera evidencia definitiva de *Pythium* descrito como organismo “fúngico” fue presentada por Fish en 1895, cuando identificó hifas que tenían la apariencia característica de un ficomiceto, aun sin nombre, en cortes histológicos de equinos con sanguijuelosis en Florida. En 1901, de Haan y Hoogkaner publicaron descripciones extensas de varios casos de lo que se pensaba era pytiosis en equinos de Indonesia y nombraron la enfermedad hifomicosis destruens, Haans la renombró como hifomicosis destruens equi. Ellos también informaron el aislamiento de un “organismo fúngico” de las lesiones. Witkamp, en 1924, aisló por segunda vez este organismo. En 1961, Bridges y Emmons nombraron a este organismo como *Hyphomyces destruens* y consideraron que este organismo era un ficomiceto, posiblemente del género *Mortierella*, basándose en la morfología del organismo en el tejido, así como en su micelio ancho, ramificado, septado y no esporulado en cultivo. Sin embargo, este nombre no fue aceptado. En 1966, Amemiya y Nishiyama, en Japón, usaron aislados de equinos con dermatitis granular para reforzar el hecho de que *Pythium* fuera considerado un ficomiceto (Mendoza y Newton, 2005).

En 1974, Austwik y Copland observaron que aislados de *H. destruens* de equinos en Nueva Guinea, producían zoosporas móviles biflageladas y sugirieron que este organismo pertenecía al género *Pythium* y no al género *Mortierella*. En 1980, Ichitani y Amemiya aislaron un organismo de un equino en Japón y sugirieron que era *Pythium gracile*. De Cock et. al. en 1987 quienes trabajaron con aislados de animales (incluyendo el aislado de Japón anterior) encontraron que el organismo era el mismo en todos los casos y propusieron

el nombre de *Pythium insidiosum*. Shipton en el mismo año, trabajando con aislados de equinos en Australia y el aislado japonés, propuso el nombre de *Pythium destruens*. Sin embargo, la mayoría de las publicaciones que conciernen a esta enfermedad desde 1987 se han referido al organismo como *Pythium insidiosum* (Mendoza y Newton, 2005).

2.2 Distribución

Existen informes de que la presencia de la pytiosis ocurre frecuentemente en zonas tropicales, subtropicales y templadas, donde la temperatura y la humedad son requeridas por este organismo para completar su ciclo de vida. Esta enfermedad se ha encontrado en África (Rivierre et al., 2005), Argentina, Australia (Fraco y Parr, 1997), Brasil (Santurio et al., 1998; Reis et al., 2003; Marques et al., 2006), Colombia, Costa Rica (Mendoza y Alfaro, 1986), Egipto, Grecia, Haití, India, Indonesia, Japón, Nueva Guinea, Venezuela (Mendoza et al., 2005; Pérez et al., 2005) Tailandia (Laohapensang et al., 2005) y Estados Unidos, particularmente en estados que limitan con el Golfo de México como son Florida (Gram. et al., 2000), Louisiana (Brown y Roberts, 1988), Mississippi (Allison et. al., 1990; Bentinck-Smith et al., 1989), y Texas (Mendoza, 2005); además de los estados de Alabama (Hnilca, 1998), Illinois (Morton et.al., 1991), Missouri (Purcell et. al., 1994) y Tennessee (Goad, 1984) (Figura 1).



Figura 1. Distribución mundial de la pytiosis (áreas sombreadas en negro) (Mendoza, 2005).

No se ha encontrado que exista predilección de este organismo por la edad, raza o sexo. Lo que tienen en común los animales afectados es que han tenido un contacto prolongado con lugares que contienen agua estancada como son lagos, lagunas o zonas anegadas. Además de la exposición a aguas estancadas, el suelo y el pasto podrían ser fuentes de infección. La enfermedad se puede presentar en todo el año, sin embargo, se ha visto que en verano y otoño, sobre todo después de períodos de precipitación pluvial, son las estaciones en donde ocurren más casos de pytiosis, pues favorecen el crecimiento de este organismo (Mendoza, 2005).

Esta enfermedad se ha informado en equinos (Murria et al., 1978; Goad, 1984; Mendoza y Alfaro, 1986; Brown y Roberts, 1988; Alfaro y Mendoza, 1990; Allison y Gillis, 1990; Purcell et al., 1994; Reis Junior et al. 2003), perros (Fischer et al., 1994; Hnilca, 1998;

Buerguel, 2000; Mendoza et al., 2005), gatos (Rakich et al., 2005), bovinos (Santurio et al., 1998; Pérez et al., 2005), ovinos (Tabosa et al., 2004), un dromedario (Wellehan et al., 2004), un jaguar (Camus et al., 2004) y en humanos (Prasertwitayakij et al., 2003; Laohapensang et al., 2005; Marques et al., 2006), siendo los equinos y perros con el mayor número de informes con esta enfermedad. La transmisión de *P. insidiosum* de animales hacia el hombre no ha sido informada.

2.3 Etiología

Pythium insidiosum es un organismo clasificado dentro del reino Cromista (Stramenopila), filum Oomycota, clase Oomicetos, orden Peronosporales, familia Pythiaceae, género *Pythium* y especie *insidiosum* (Mendoza, 2005). El género *Pythium* forma parte de un grupo que incluye otras 120 especies, las cuales son saprofitas o patógenas para las plantas; *Pythium insidiosum* es la única especie capaz de causar enfermedad en el huésped mamífero (Schurko et al., 2003). Este género no es un hongo, aunque a veces se le llame hongo acuático. No tiene ergosterol en la membrana, ni la cantidad de quitina que poseen los hongos en su pared, pero se enlista dentro de las enfermedades micóticas por su relación histórica con la micología médica y por las estructuras fúngicas (hifas) que se observan en las lesiones.

2.3.1 Morfología

2.3.1.1 Macroscópica

Las colonias en agar Sabouraud se observan planas, es decir, sin micelio aéreo, de patrón radial, color blanco y se observan hifas que penetran el agar (de Cock et. al., 1987).

2.3.1.2 Microscópica

Hifas. Este microorganismo produce hifas hialinas generalmente cenocíticas que miden de 4-10µm de diámetro, con ramificaciones tangentes y puntas redondeadas. Usualmente hay regiones ensanchadas (12-28µm de diámetro) llamadas apresorias (de Cock et. al., 1987).

Zoosporangio y zoosporas. Las colonias en agar son inducidas en medios líquidos a base de iones y Ca^{++} para el desarrollo de sus estructuras asexuales llamadas zoosporangios y

zoosporas. La hifa bajo estas condiciones desarrolla una vesícula (zoosporangio) en la punta, donde fluye el citoplasma de la hifa, formando las zoosporas. La vesícula mide de 20 a 60 μm de diámetro. Cuando madura, las zoosporas rompen la pared de la vesícula y nadan por 20 min y luego enquistan. Las zoosporas son de forma globosa a ovoide, poseen dos flagelos laterales que tienen diferente longitud, uno de ellos tiene un tipo velludo y el otro tipo látigo. (de Cock et. al., 1987).

Oogonia. Estas estructuras sexuales solo han sido desarrolladas in vitro por de Cock (1987). Son intercaladas, hialinas, globosas y miden de 19 a 36 μm de diámetro. La anteridia se encuentra unida a la oogonia y es posible ver de una a tres anteridias por oogonia, miden de 11 a 37 X 6 a 10 μm . De la punta de la anteridia se produce el tubo de fertilización, es rígido y mide de 4 a 6 μm de diámetro (de Cock et. al., 1987).

2.3.2 Ecología

P. insidiosum requiere de un medio acuático y sustratos orgánicos para completar su ciclo de vida. Necesita temperaturas entre 30° a 40°C para su reproducción. Se reproduce asexualmente mediante la producción de zoosporas biflageladas y sexualmente por la producción de oosporas. Las zoosporas son móviles hasta 24 horas después de ser liberadas al medio acuoso y son atraídas por quimiotaxis al tejido animal dañado o tejido de plantas (Mendoza et al., 1993).

2.3.3 Ciclo de vida

El ciclo de vida comienza cuando una planta es colonizada por las zoosporas de *P. insidiosum*, se enquista y comienza a desarrollar tubos germinales hasta la formación de hifas. En seguida se dan las etapas para la diferenciación y maduración del esporangio que conlleva a la liberación de las zoosporas. Las zoosporas móviles nadan, atraídas por sustancias quimiotácticas, y localizan otra planta para comenzar un nuevo ciclo. Si un animal o humano entrara al ecosistema, las zoosporas también serían atraídas por el tejido lesionado. Ahí pierden sus flagelos, y se adhieren al tejido por el uso de una sustancia pegajosa, enquistan hacia dentro del tejido, germinan, invaden al hospedero y causan pythiosis (Mendoza et al., 1993) (Figura 2).

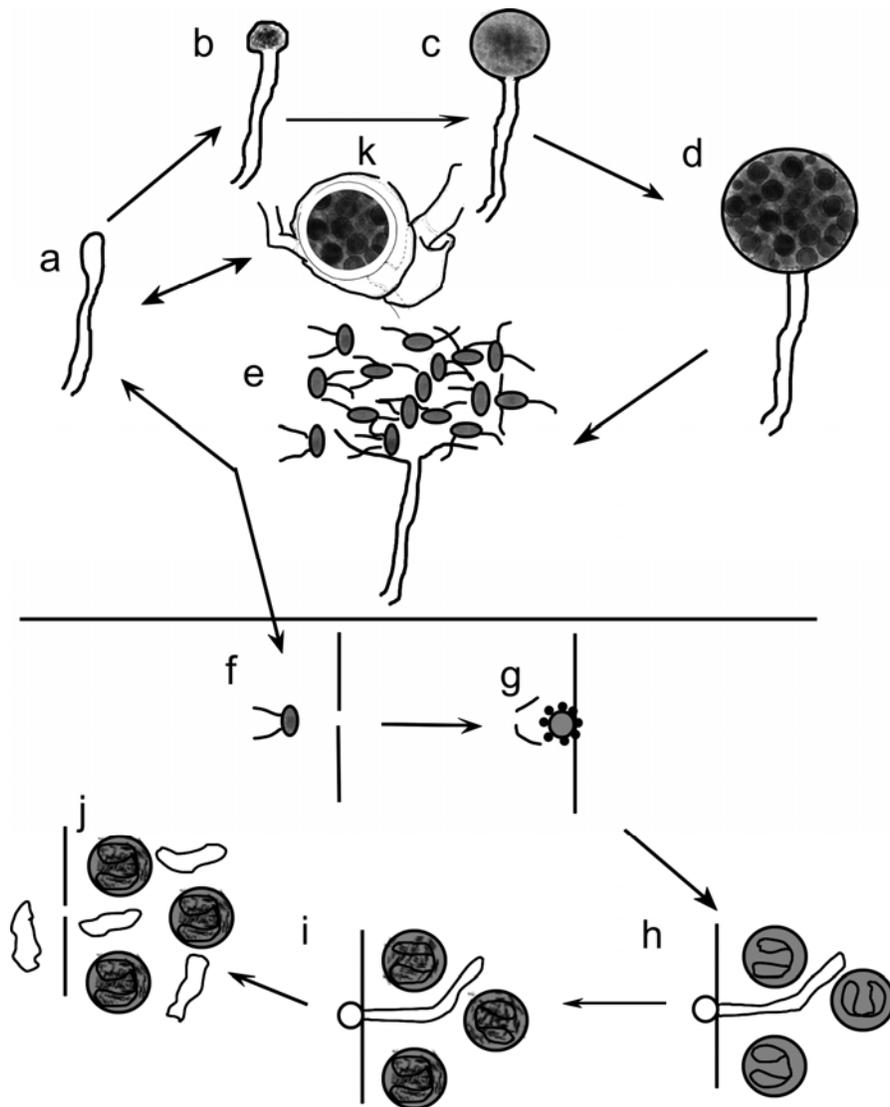


Figura 2. Ciclo de vida de *Pythium insidiosum*. Planta es colonizada por la (a) hifa de *P. insidiosum*, para luego (b-d) diferenciarse en un zoosporangio que posteriormente madura y (e) libera las zoosporas. Las zoosporas nadan para localizar otra (a) planta y comienza nuevamente el ciclo. (f) Si entrara un mamífero con una herida a este ciclo, las zoosporas son atraídas. (g) Las zoosporas se adhieren al tejido con una sustancia pegajosa y pierden sus flagelos. (h) Enquistan, germinan, (i) invaden al huésped y causan pythiosis. (j) En los equinos se forman las concreciones (Adaptado de Mendoza et. al., 1993 y García, 2006).

3.4 Manifestaciones clínicas y lesiones

2.4.1 Animales

Equinos. Por lo general presentan las lesiones en tejido cutáneo y subcutáneo de las extremidades, vientre o tórax (Figura 3), áreas que son las que entran en contacto con el agua estancada. Estas lesiones se expanden con extrema rapidez, en días se observan masas ulcerativas de tejido de granulación con descargas de exudado seroso, mucopurulento, sero-sanguinolento o hemorrágico de las sinuosidades de la lesión. El tejido necrótico despiden un olor desagradable. Existe prurito, el cual conlleva al animal a automutilarse en la zona de la lesión. En las sinuosidades de la lesión se encuentran masas coraliformes de color bronceado amarillo a gris, con forma irregular y de 2-20 mm de diámetro, llamadas concreciones o “kunkers” (Figura 4); estas estructuras sólo se han encontrado en estos animales. Generalmente se presenta una lesión solitaria, de forma redonda. En la forma crónica (> a dos meses), se pueden encontrar lesiones que se expanden a otras zonas cercanas (Chaffin et. al., 1995; Mendoza, 2005), aunque también podrían extenderse a zonas lejanas, a través de vasos linfáticos y linfonodos (Murray et. al., 1978; Chaffin et. al., 1995). Existen informes de equinos con lesiones pulmonares (Goad, 1984), donde se especula que la aspiración o la ingestión con subsecuente aspiración del material infectado como forma de infección. También existen informes de la presentación intestinal por este Oomiceto, donde se encuentran masas intramurales generalmente en yeyuno, las cuales producen obstrucción parcial o total, dolor abdominal, anorexia y pérdida de peso. En estos casos, la forma posible de infección es la ingestión de agua contaminada con este Oomiceto (Chaffin et. al., 1995). Reis et. al. (2003) investigaron tres casos inusuales en equinos con una pytiosis diseminada, en órganos internos, tales como pulmón, hígado, bazo y glándula mamaria.



Figura 3. Equinos con pythiosis. Lesiones granulomatosas en tejido subcutáneo en (A) vientre y (B) miembro, en equinos con pythiosis.



Figura 4. Concreciones que se obtienen de las lesiones granulomatosas en equinos con pythiosis.

INTRODUCCIÓN

Caninos. También se afecta el tejido cutáneo y subcutáneo de miembros, cara y cola, presentando las mismas lesiones que en equinos. Sin embargo, la presentación gastrointestinal es la forma más común en esta especie. Se forman masas granulomatosas intestinales, engrosamiento mural y úlceras en mucosa. Los signos clínicos son vómito, pérdida de peso y diarrea. En el ultrasonido se puede observar engrosamiento del tracto gastrointestinal, una masa abdominal o linfadenopatía mesentérica; se ha visto que puede extenderse a páncreas, útero y linfonodos mesentéricos (Grooters, 2003; Mendoza, 2005).

Felinos. Se ha encontrado afectando el tejido cutáneo y subcutáneo en cola, región inguinal y periorbital con lesiones nodulares o ulcerativas (Grooters, 2003). La presentación intestinal sólo se ha informado en dos casos, donde se encontró una masa a nivel de íleon y mesenterio (Rakich et. al., 2005).

Ovinos. Las lesiones se observan en miembros, abdomen ventral, y región pre-escapular, en donde se presentan úlceras secas o húmedas con superficie roja, café o negro. Se ha encontrado metastasis hacia los pulmones y linfonodos regionales, así como la expansión de la lesión hacia hueso y tendones, lo que se sugiere que el borrego es altamente susceptible a esta enfermedad (Tabosa et. al., 2004).

Bovinos. Se han observado lesiones en tejido cutáneo y subcutáneo en la parte distal de los miembros, de apariencia tumeriforme con y sin ulceración. En los casos donde no se presentan úlceras se observan exudados sero-sanguinolento o pus. Estas lesiones afectan el desarrollo y calidad de vida de los animales infectados (Pérez et. al., 2005), por lo que para los ganaderos podría tener relevancia económica.

Fauna silvestre. Los informes de los pocos animales de fauna silvestres infectados por este Oomiceto, han descrito varias manifestaciones clínicas: masa tumeriforme en la cara de un dromedario (Wellehan et. al., 2004) y una masa multilobular fibrosa con muchas zonas de necrosis en el pulmón de un jaguar (Camus et. al., 2004). Cabe destacar que tanto el dromedario como el jaguar se encontraban en zoológicos.

2.4.2 Humanos

La mayoría de los casos de pytiosis en humanos se han presentado en Tailandia con más de 90 casos desde 1985. Son pocos los informes provenientes de otros países como Australia, Brasil, Haití, Nueva Zelanda y E.U.A. Se ha sugerido que heridas abiertas, talasemia y ocupaciones involucrando ambientes con agua son factores predisponentes para que los humanos se infecten (Prasertwitayakij et. al., 2003). Mendoza y Newton (2005) describen tres tipos de manifestaciones clínicas: 1) una superficial como la queratitis; 2) lesiones granulomatosas y ulcerativas involucrando tejido cutáneo y subcutáneo de los miembros y cara incluyendo el área periorbital y 3) una forma sistémica que involucra vasos sanguíneos que conlleva a vasculitis, trombosis, aneurismas y muerte.

2.5 Métodos de diagnóstico

Entre los métodos que se han utilizado para diagnosticar pytiosis se encuentran:

2.5.1 Histopatología

En el tejido afectado o concreciones con las tinciones rutinarias como son la hematoxilina y eosina (HE) y el ácido peryódico de Schiff (PAS) se puede observar una reacción inflamatoria con zonas de necrosis, gran cantidad de eosinófilos y neutrófilos rodeados por tejido conectivo vascularizado infiltrado con macrófagos y células gigantes. Las hifas hialinas delgadas aseptadas de 4-6 μ m pueden llegar a observarse con tinciones de PAS, aunque para apreciar mejor estas estructuras se utilizan tinciones de plata, como Gomori-Grocott (GMS).

Los estudios histopatológicos no siempre permiten un diagnóstico definitivo ya que estas lesiones también se pueden encontrar en otras enfermedades como son la habronemiasis (no incluye la observación de hifas), zigomicosis y lagenidiosis (en perros y gatos), particularmente en etapas tempranas (Chaffin et al., 1995; Mendoza y Newton, 2005).

2.5.2 Morfológico

Un laboratorista experimentado en esta área puede realizar el diagnóstico inequívoco de esta enfermedad por medio del aislamiento de *P. insidiosum* de 3 a 7 días. Desafortunadamente, pocas son las personas que tienen conocimiento de este microorganismo y de los métodos para identificarlo. Generalmente, este microorganismo crece en medios para hongos como son el agar dextrosa Sabouraud (SDA), agar harina de maíz y agar infusión cerebro y corazón (BHI). Las concreciones son las muestras donde se encuentran el mayor número de microorganismos, por lo que se utilizan para el aislamiento, para su colección se deben de usar recipientes estériles con agua destilada o solución salina fisiológica (SSF) estéril adicionada con un antibiótico, ya sea, cloranfenicol, ampicilina o tetraciclina para evitar problemas de contaminación y se deben enviar al laboratorio a temperatura ambiente en un tiempo no mayor a 3 días (Grooters et. al., 2002). Crecen a 37°C, y las colonias se pueden apreciar a las 24 hrs. Cuando estos aislados son introducidos en medios acuosos a base de sales, se pueden observar sus estructuras asexuales (zoosporangios y zoosporas) que son las estructuras particulares de este género (de Cock et al., 1987).

2.5.3 Serológico

Son métodos que se utilizan para realizar el diagnóstico en estadios tempranos de la enfermedad.

Inmunodoble difusión (IDD). Ha sido probada como una herramienta útil en el diagnóstico para humanos y animales. Es específica, ya que no tiene reacción cruzada con ningún hongo zigomiceto, sin embargo, no ha podido detectar todos los casos positivos a pytiosis en humanos y perros. El antígeno que se utiliza es el metabólico, detecta de tres a seis precipitinas (Mendoza et al., 1986; Prachartam et al., 1991), no obstante con una precipitina es suficiente para declarar un caso como positivo (Mendoza et. al., 1986).

Aglutinación. Para esta prueba se utilizan partículas de látex unidas a antígenos metabólicos de *P.insidiosum* para detectar anticuerpos en suero. Esta prueba es específica y más sensible que la IDD. Se ha utilizado en humanos y animales detectando la mayoría de los casos positivos. En tan solo 5 min se obtiene el resultado y así se detectan rápidamente a

los animales y humanos afectados por esta enfermedad, sobre todo en las primeras fases de la enfermedad. Esta prueba es la única que está patentada, por lo que está disponible para su compra en forma comercial (Mendoza, 2004).

Fijación de complemento (FC). En esta prueba se utiliza un antígeno de cultivos líquidos que constantemente se congelan y descongelan. La sensibilidad es más baja que en la IDD, además de que tiene reacción cruzada con los antígenos de *Basidiobolus ranarum*, por lo que no es específica. Australia ha sido el único país en utilizarla (Mendoza, 2005).

Ensayos de inmunohistoquímica. Estas técnicas permiten detectar hifas de *P. insidiosum* en tejido mediante inmunoglobulinas específicas. Dos ensayos han sido desarrollados: una utiliza anticuerpos fluorescentes (Mendoza et. al., 1987) y otra inmunoperoxidasa (Brown et. al., 1988). Ambos han demostrado ser sensibles y específicos en tejidos de perros, gatos, equinos y humanos. La técnica de Mendoza et.al. (1987) además de diferenciar a *P. insidiosum* de otras enfermedades similares como *Conidiobolus* o *Basidiobolus*, permite la diferenciación de especies de *Pythium*. Sin embargo en las concreciones de equinos, con los anticuerpos fluorescentes, se ha visto una fluorescencia en toda la sección atribuido a la liberación de exoantígenos por la hifa de *P. insidiosum* (Mendoza, 2005).

Ensayos inmunoenzimáticos (ELISA). Se han utilizado los antígenos metabólicos y somáticos detectando casos positivos a pytiosis que fueron negativos a la IDD en perros y humanos (Mendoza et. al., 1997; Krajajeun et. al., 2002; Vannitanakom et. al., 2004), demostrando ser más sensible que la IDD, en estas especies. A pesar de que se ha detectado que la ELISA tiene una ligera reacción cruzada con los hongos *Conidiobolus* spp y *Basidiobolus* spp., mostrando títulos de anticuerpos en diluciones de 1:100 y 1:200, no parece tener relevancia, ya que el título de anticuerpos en casos positivos es más alto, hasta 1:12.800 (Mendoza et. al., 1997). Asimismo, es una herramienta útil para medir el progreso de un tratamiento en un paciente, donde se observa la disminución paulatina de títulos de anticuerpos (Krajajeun et. al., 2002).

Western Blot (WB). Es la prueba más sensible y específica de todas aunque las más costosa. Los antígenos utilizados han sido tanto el metabólico como el somático. Detecta bandas inmunoreactivas en todos los casos positivos a pytiosis de equinos, perros y humanos. Las bandas inmunodominantes en equinos con el antígeno somático son de 28,

30, 32 kD (Mendoza et. al., 1992), 33.3, 39 y 80 kD (Leal et. al., 2005), mientras que en humanos es de 28, 32, 74, 80 kD (Krajaejun et. al., 2006). Las bandas inmunoreactivas con el antígeno metabólico en humanos y conejos son de 34-43 y 74 kD (Krajaejun et. al., 2006).

2.5.4 Técnicas moleculares

Sondas de ADN específicas de especie se han desarrollado para la identificación de agentes patógenos, ya que pueden detectar ADN en cultivos mixtos, por lo que los cultivos puros son innecesarios. Se ha utilizado al ADN ribosomal como blanco para diseñar sondas de ADN ya que se encuentra en abundancia en las células, lo que aumenta la sensibilidad y se origina una señal fuerte de hibridación en Southern Blot. Schurko A.M. et. al. en 2004, desarrollaron una sonda de ADN específica de *P. insidiosum*, la cual hibridó con el ADN de todos los aislados de *P. insidiosum* y no encontró reacción cruzada con otras especies de *Pythium* u otros patógenos causantes de signos similares a los de pytiosis, lo cual permite ser una herramienta útil y rápida en el diagnóstico correcto. También existe una PCR-anidada, que utiliza la región ITS (espaciador de transcripción interna), para amplificar un producto de PCR sólo de aislados pertenecientes a especies de *P. insidiosum* (Grooters y Gee, 2002).

2.6 Tratamiento

P. insidiosum es resistente a la mayoría de los antifúngicos, a causa de que carece de ergosterol en la membrana citoplasmática, siendo pobres los resultados exitosos al utilizar estos quimioterapéuticos en el paciente (Shenep et. al., 1998), por lo que se han tenido que utilizar otras formas de terapia para esta enfermedad como son la escisión del tejido afectado y la inmunoterapia.

2.6.1 Escisión del tejido

El tratamiento más común es la escisión de la región afectada, por lo que cuando se diagnostica pytiosis la escisión debe ser inmediata. El éxito de este tratamiento dependerá del tamaño, sitio y duración de la lesión. La remoción del tejido afectado se complica

cuando la lesión se extiende hacia músculo, hueso o tendones. Si el tejido afectado no se remueve por completo, la lesión puede reaparecer (Chaffin et. al., 1995).

2.6.2 Inmunoterapia

Diversos inmunomoduladores, o también llamados “vacunas”, han sido desarrollados a partir de las proteínas de las hifas y metabolitos de *P. insidiosum*. Este tratamiento ha sido exitoso en equinos y bovinos. La inmunoterapia en equinos es eficiente en un 90% cuando se administra en casos agudos (> dos meses) con escisión del tejido afectado y cura el 60% sin la escisión del tejido. En casos crónicos (> dos meses) se observa una baja eficiencia (20-40%) (Mendoza et. al., 2003). En bovinos, la eficiencia de los inmunomoduladores ha sido hasta del 100% (Mendoza y Newton, 2005). En los perros, los resultados de la inmunoterapia han sido desfavorables, solo el 33% de los casos tratados han respondido al tratamiento, mientras que en los gatos la eficiencia es nula. Aún no se sabe con certeza la causa de la baja o nula eficiencia en pequeñas especies, pero se piensa que es debido a que el diagnóstico de la pytiosis se realiza cuando llevan meses enfermos, es decir, en casos crónicos. En humanos la inmunoterapia se ha utilizado con resultado favorables en Tailandia, siendo una opción viable para el tratamiento contra esta enfermedad (Mendoza y Newton, 2005).

3. JUSTIFICACIÓN

México posee zonas climáticas “Am” y “Aw” (cálidos húmedos y subhúmedos), los cuales son propicios para el desarrollo de *Pythium insidiosum*. Limita con países donde la pytiosis ha sido informada, como es Norteamérica (principalmente los estados que colindan con el Golfo de México) y Centroamérica. Además, existen informes no oficiales de médicos veterinarios de casos supuestos de habronemiasis cutánea equina en México que pudieron haberse confundido con pytiosis, ya que los animales no responden al tratamiento para esta enfermedad y persisten al finalizar la época de lluvias, período en el que normalmente ésta desaparece.

Es probable que la falta de implementación de las técnicas para el diagnóstico de pytiosis en México así como la escasez de información, contribuyan a mal diagnosticar y por lo tanto no valorar la presencia de esta enfermedad. Por lo que este trabajo fue realizado con el fin de detectar la presencia de la pytiosis equina en México, mediante el desarrollo e implementación de diversas técnicas diagnósticas.

4. OBJETIVO GENERAL

Implementar las técnicas de aislamiento y caracterización de *P. insidiosum*, así como las técnicas serológicas para su diagnóstico en México.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

Aislar a *P. insidiosum* de muestras clínicas de equinos con lesiones granulomatosas cutáneas y subcutáneas en México.

Obtener los antígenos metabólicos y somáticos de cultivos puros de *P. insidiosum*.

Estandarizar la técnica de inmunodoble difusión con el antígeno metabólico para diagnosticar a *P. insidiosum* en equinos en México.

Estandarizar la técnica de ensayo inmunoenzimático indirecto con el antígeno metabólico para diagnosticar a *P. insidiosum* en equinos en México.

Estandarizar la técnica de Western Blot con los antígenos somático y metabólico para diagnosticar a *P. insidiosum* en equinos en México.

Realizar los estudios histopatológicos de las muestras clínicas de equinos con lesiones granulomatosas cutáneas y subcutáneas en México.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Muestras clínicas de equinos

Las muestras de suero, tejido o concreciones se colectaron de 11 equinos que presentaban lesiones granulomatosas ulcerativas cutáneas y subcutáneas que se localizaban en las extremidades, vientre o tórax sugestivas de pytiosis durante el período de estudio, que comprendió desde agosto de 2006 a junio de 2008.

Cada muestra se identificó con el nombre o número de equino, sexo, edad, raza y se anexó la historia clínica.

5.1.1 Suero para las pruebas serológicas (ELISA, IDD, WB)

Se obtuvieron 11 muestras sanguíneas de la vena yugular. La zona a puncionar se desinfectó previamente con alcohol al 70%, cloruro de benzalconio 5% o yodo 2%. Se utilizaron tubos estériles al vacío sin anticoagulante y se llenaron con 7 ml de sangre. Se usaron de dos a tres tubos por cada animal. Las muestras se enviaron en refrigeración (4°C) al laboratorio de Micología del departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. Una vez formado el coágulo, éste se retiró y cada suero se transfirió a tubos Eppendorf estériles de 1.5 mL y se centrifugaron a 15000 g por 5 minutos, posteriormente el sobrenadante se almacenó en un tubo Eppendorf estéril a -20°C hasta su uso.

5.1.2 Tejido para histopatología

Se realizó una escisión de la porción subcutánea de la lesión y se tomaron dos muestras de tejido de 1 cm³ de cada uno de los 8 equinos, a los otros tres no se les pudo tomar este tipo de muestra por la falta de material (H4, H8, H9). Cada muestra se depositó en frascos de 4.5 cm de diámetro y 6.5 cm de altura (4.5 X 6.5 cm) con formalina al 10% suficiente para cubrir el tejido.

5.1.3 Concreciones para el aislamiento

Se colectaron de 6 animales las masas amarillentas con forma de coral (concreciones o “kunkers”) de las sinuosidades del tejido afectado, las cuales se desprendían fácilmente y que midieron de 2 a 20 mm. Se colectaron en tubos falcon de 50 ml con agua destilada estéril con ampicilina* (100µg/ml) y se mantuvieron a temperatura ambiente en un tiempo no mayor de 3 días.

5.2 Identificación morfológica

5.2.1 Observación directa con hidróxido de potasio (KOH) al 20%

Se realizó la observación directa con KOH al 20% a las muestras de concreciones o tejido para observar la presencia de hifas.

5.2.2 Aislamiento y cultivo

Aislamiento de muestras clínicas

Las concreciones se lavaron con agitación vigorosa manual por lo menos tres veces con agua destilada estéril con ampicilina (100 µg/ml). Se descartó el sobrenadante después de cada lavado. Se cortaron en pedazos de 2 a 4 mm de diámetro. Estos pedazos se inocularon por cuadruplicado en cajas de Petri con agar Sabouraud (SDA) [12 g dextrosa (Bioxon), 3 g triptona (Difco), 6 g agar bacteriológico (Bioxon), 600 ml agua destilada] y agar SDA+cloranfenicol (SDAc) [12 g dextrosa (Bioxon), 3 g triptona (Difco), 6 g agar bacteriológico (Bioxon), 500 mg cloranfenicol (Pfizer), 600 ml agua destilada] los cuales se incubaron a 37°C de 24 a 48 hrs junto con un vaso de precipitado con 1000 ml de agua.

* Laboratorios Hormona

Cultivo de cepas tipo de *Pythium insidiosum*[▼]

Se realizó el cultivo de las siguientes cepas de *Pythium insidiosum* en cajas de Petri con agar SDA y agar harina de maíz (DIFCO), las cuales se incubaron a 37°C junto a un vaso de precipitados con 1000 ml de agua destilada de 24 a 48 hrs:

MTPI-04 (cepa aislada de equino, Texas)

MTPI-12 (cepa aislada de humano, Tailandia)

MTPI-14 (cepa aislada de humano, Tailandia)

MTPI-19 (cepa ATCC 58643)

MTPI-21 (cepa ATCC 28251)

MTPI-23 (cepa ATCC 64221)

Todas las cepas pertenecen al Dr. Leonel Mendoza de la Universidad Estatal de Michigan (MSU), MI, E.U.A.

Identificación macroscópica[▼]

Se describieron las colonias de *Pythium insidiosum* en SDA.

Identificación microscópica[▼]

Las colonias de *Pythium insidiosum* en SDA se observaron en un microscopio invertido y se les realizó una tinción de lactofenol azul de algodón para su observación microscópica.

5.2.3 Producción de zoosporangios y zoosporas[▼]

Pedazos de pasto (10X4mm) previamente esterilizados en autoclave (115°C, 10 lb, 10 min) se colocaron en cultivos de 24 hrs de *Pythium insidiosum* y se incubaron a 37°C por 24 hrs. Las hojas de pasto se transfirieron a 30 ml de medio acuoso de inducción en un vaso de precipitado de 100 ml e incubadas por 4 horas. Al término de este tiempo se observaron los pedazos de pastos en un microscopio invertido.

[▼] Estas técnicas se realizaron en el laboratorio de Diagnóstico Biomédico bajo la dirección del Dr. Leonel Mendoza durante una estancia de investigación en la MSU con el fin de implementarlas en el laboratorio de Micología del departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ, UNAM.

5.3 Histopatología[•]

Las muestras de tejidos en formalina amortiguada al 10% se procesaron por la técnica histológica de rutina, se incluyeron en parafina, se cortaron a 3 µm de grosor y se tiñeron con HE para observar las lesiones microscópicas, así como con PAS, para observar las mismas lesiones, y los “fantasmas” de las hifas intralesionales. Las muestras además se tiñeron con Gomori-Grocott para facilitar la identificación de las hifas.

5.4 Diagnóstico serológico

Para las siguientes pruebas diagnósticas (IDD, ELISA indirecto y WB) se utilizaron sueros equinos de pytiosis comprobada como controles positivos obtenidos del laboratorio del Dr. Mendoza.

5.4.1 Producción de antígeno para IDD, ELISA y WB[▼]

Para obtener el antígeno metabólico se utilizaron las cepas ATCC de *P. insidiosum* 28251, 58641, 64221 y cepa MTPI-14; para el somático se usó la cepa ATCC 28251. Cada cepa tipo de *Pythium insidiosum* se sembró en SDA y se incubó a 37°C por 24 hrs. Un bloque de 3 mm² del cultivo de 24 hrs se utilizó para inocular 500 ml de caldo SDA [10 g dextrosa (Bioxon), 2.5 g triptona (Difco), 600 ml agua destilada], se incubó a 37°C a 150 rpm por 5 días. El cultivo se inactivó con timerosal (0.02 %) a temperatura ambiente por 1 hora. El caldo se filtró usando papel filtro (Whatmann No. 1), donde se obtuvieron dos compuestos: la masa celular, donde se obtuvo el antígeno somático y el caldo, donde se obtuvo el metabólico.

El caldo se concentró 100 veces por diálisis utilizando una membrana con punto de corte de peso molecular de 12,000 a 14,000 Da de polivinilpirolidona (Amicon). Este antígeno metabólico fue utilizado para las pruebas de IDD, ELISA y WB.

[•] Esta técnica se realizó en el departamento de Patología de la FMVZ, UNAM, bajo la dirección de la Dra. Elizabeth Morales Salina.

[▼] Estas técnicas se realizaron en el laboratorio de Diagnóstico Biomédico bajo la dirección del Dr. Leonel Mendoza durante una estancia de investigación en la MSU con el fin de implementarlas en el laboratorio de Micología del departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ, UNAM.

La masa celular se transfirió a un mortero para ser macerado con nitrógeno líquido. El polvo resultante (antígeno somático) se colocó en un tubo falcon de 15 ml previamente congelado y se guardó a -20°C no más de 1 mes. Este antígeno somático fue utilizado para las pruebas de WB.

La concentración de ambos antígenos se midieron con una curva patrón de albúmina en un gel de poliacrilamida con SDS.

5.4.2 Inmunodoble difusión (IDD)

En una caja de Petri de poliestireno de 10 X 4mm (Sagasi) se agregaron 20 ml de agar fenolizado y se dejó polimerizar. Se usó un patrón de 6 pozos de 4 mm de diámetro y una separación entre cada pozo de 4 mm. El pozo central se llenó con 40 μl del antígeno metabólico. Los pozos restantes se llenaron con 40 μl de suero testigo positivo, testigo negativo con agua destilada y los restantes con las muestras de suero (Figura 5). Se incubó de 24 a 48 hrs en cámara húmeda a temperatura ambiente. Se observó la apariencia de líneas de precipitación.

5.4.3 Ensayo inmunoabsorbente de enzima ligada (ELISA) indirecto

Se utilizaron microplacas de poliestireno (NUNC) de fondo plano de 96 pozos que se sensibilizaron con 100 μl de antígeno metabólico (500ng/ml) diluido en solución de carbonatos[■] (1.59 g Na_2CO_3 , 2.93 g NaHCO_3 , 1000 ml agua destilada, pH 9.2) que se dejó en reposo toda la noche a 4°C . Se realizaron 5 lavados con amortiguador salino de fosfatos con 1% de Tween 20* (PBS-T) y se bloqueó con leche descremada al 5% por 60 min a 37°C . Se realizaron diluciones dobles seriadas para todas las muestras desde 1:100 hasta 1:6400 en PBS-T; 50 μl de cada dilución se adicionó a cada pozo y se incubó por 60 min a 37°C . Se incluyeron 6 pozos con sueros testigos positivos y negativos; como blancos se utilizaron pozos sin antígeno, sin suero y sin anticuerpo secundario (Figura 6). Se realizaron 5 lavados con PBS-T. Se adicionaron 100 μl de conjugado de conejo anti-inmunoglobulina G de equino (Jackson ImmunoResearch Laboratories) 1/8000 en PBS-T a

■ Anexo 10.2

* Anexo 10.1

cada pozo y se incubaron a 30°C por 60 min. Se realizaron otros 5 lavados con PBS-T. Se les adicionó 100 µl de solución cromógeno/sustrato* (4 mg Ortofenilenediamina, 5 ml Ácido cítrico 0.1M, 5 ml Citrato de sodio, 4 µl Peróxido de hidrógeno 30%) a cada pozo y se dejó reaccionar a temperatura ambiente por 5 min o hasta observar reacción colorimétrica con el testigo positivo. La reacción se detuvo con 100 µl de ácido sulfúrico 2N. Las placas se leyeron en un lector de ELISA (BioTek) a una absorbancia de 490 nm. El punto de corte se determinó mediante la prueba de “t” Student con el programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versión 11, utilizando los resultados de absorbancia en la ELISA de los sueros positivos a pytiosis por WB y los sueros negativos a pytiosis por WB.

5.4.4 Western Blot (WB) [■]

Se realizó el gel de poliacrilamida con SDS* (SDS-PAGE) utilizando un gel separador al 12% y un gel concentrador al 4%, donde se colocaron 4 µl de marcador de peso molecular en kD (BioRad) y 5 µl del antígeno metabólico en solución reguladora 2X* (1.25 ml Tris-HCl 0.5M pH 6.8, 2 ml SDS 10%, 0.5 ml 2-mercaptoetanol, 1 ml glicerol, 0.25 ml azul de bromofenol 0.2%) o 5 µl del somático en solución reguladora 2X en cada pozo (Figura 7). El gel se corrió a 150 volts aproximadamente por 120 min, en amortiguador de corrida* (30 mg Tris base, 144 g Glicina, 10 g SDS, 2000 ml agua destilada pH 8.3)1X. La transferencia se realizó en una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Millipore) a 50 volts toda la noche en un amortiguador de transferencia[♦] (9.075 g Tris base, 3.2 g Glicina, 600 ml Metanol, 2400 ml agua destilada pH 8.3). La membrana se cortó en 8 tiras, cada tira se colocó en un tubo falcon de 15 ml. Cada tira de membrana de PVDF se incubó a 37°C con solución bloqueadora con leche descremada al 5% por 90 min en agitación constante. Se realizó un lavado con solución A[○] (200 ml Tween 20 10%, 2000 ml PBS 0.01M pH7.2) dos

[■] Esta técnica, con el antígeno somático se realizó en el laboratorio de Diagnóstico Biomédico bajo la dirección del Dr. Leonel Mendoza durante una estancia de investigación en la MSU con el fin de implementarla en el laboratorio de Micología del departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ, UNAM.

* Anexo 10.3

♦ Anexo 10.4

○ Anexo 10.1

lavados con solución B^o (PBS 0.01M pH 7.2) y dos lavados con solución C[♦] (Tris 0.1M pH 9.2). La membrana de PVDF se incubó a 37°C con la muestra de suero equino por 60 min en agitación constante. Nuevamente se realizaron los lavados con las soluciones A, B y C. La membrana de PVDF se incubó a temperatura ambiente con los anticuerpos conjugados de conejo anti-inmunoglobulina G de equino (Jackson ImmunoResearch Laboratorios) por 60 min en agitación constante. Por último, la membrana se reveló con solución de cromógeno/sustrato^o.

5.4.5 Análisis estadístico

El punto de corte se determinó mediante la prueba de “t” Student con el programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versión 11, utilizando los resultados de absorbancia en la ELISA de los sueros positivos a pytiosis por WB y los sueros negativos a pytiosis por WB.

Se utilizó un cuadro de contingencia 2X2 para la prueba estadística J_i^2 y con las fórmulas necesarias se determinó la sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos, de cada una de las pruebas diagnósticas realizadas (IDD y ELISA) y se compararon entre sí utilizando como prueba patrón los resultados del WB con el antígeno metabólico.

Se utilizó el coeficiente Kappa de Cohen (“k”) para determinar la concordancia entre las diferentes pruebas, tomando como prueba patrón los resultados del WB con el antígeno metabólico.

^o Anexo 10.1

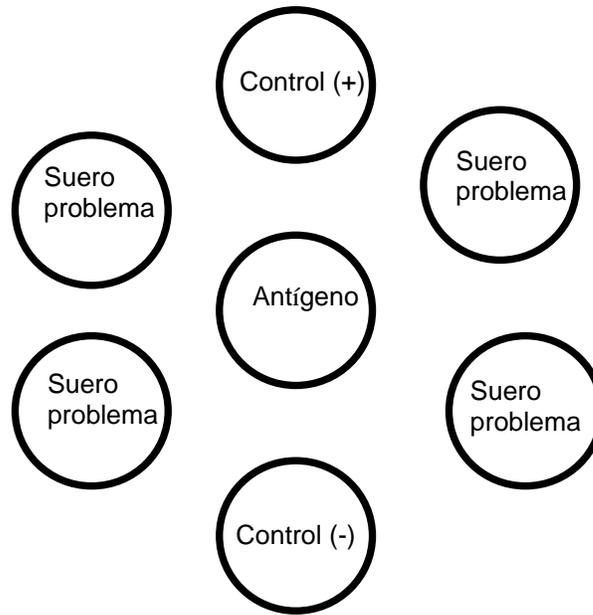


Figura 5. Prueba de inmunodoble difusión.

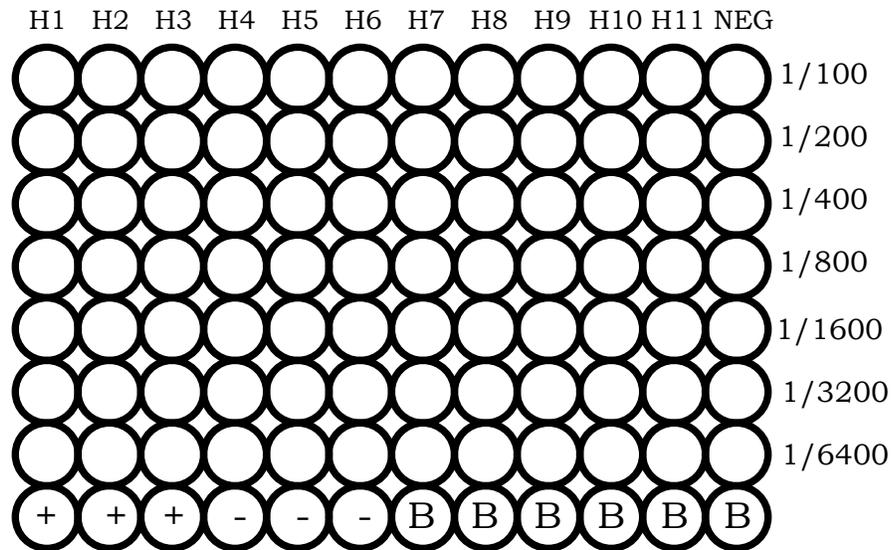


Figura 6. Prueba de ELISA indirecto. Donde: H1 a H11=muestras de suero; 1/100 a 1/6400=diluciones se suero utilizadas; B=blanco; (+)=control positivo; NEG y (-)=control negativo.

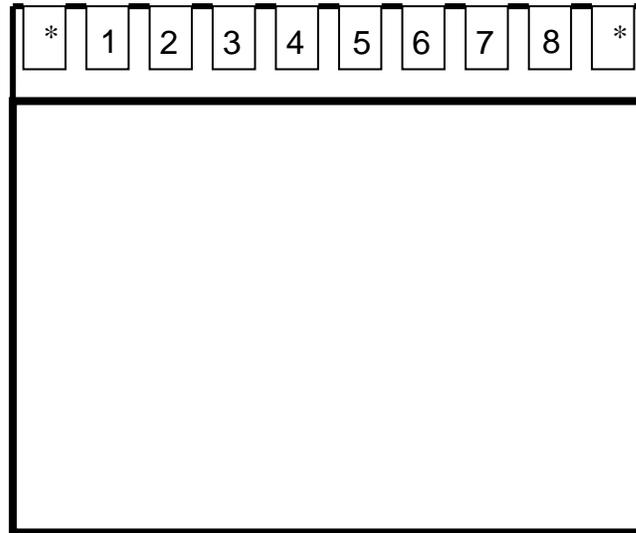


Figura 7. Gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE).
Donde: 1= Marcador de peso en kD; 2-8=antígeno metabólico
o somático según sea el caso; *=vacío

6. RESULTADOS

6.1 Colección de muestras clínicas de equinos

Se obtuvieron un total de 11 muestras clínicas de equinos que presentaban lesiones granulomatosas sugestivas a pytoisis (Cuadro 1). Cuatro muestras (H1, H2, H5 y H6) procedían del estado de Guerrero y siete (H3, H4, H7, H8, H9, H10 y H11) provenían de Tabasco. Muestras H1 y H2 fueron muestras tomadas por la autora, enviadas en uno y dos días respectivamente, al laboratorio de Micología del departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ, UNAM. Muestras H3, H4, H5, H7 y H11 fueron enviadas en malas condiciones al laboratorio. Muestras H5 y H6 fueron enviadas en dos días al laboratorio. De las muestras H1, H2, H3, H7 y H11 se obtuvieron concreciones, tejido y suero fueron; de H4, concreciones y suero; de H5, H6 y H10, tejido y suero, no había concreciones; y de H8 y H9, sólo suero, no había material para obtener muestras de tejido y concreciones.

6.2 Identificación morfológica

6.2.1 Observación directa con KOH al 20%

En la observación directa con KOH al 20% de las concreciones o del tejido afectado de las muestras H1, H2, H7, H10 y H11, se observaron hifas hialinas delgadas aseptadas y ramificadas (Figura 8). En las muestras H3 y H4 no se pudo realizar la observación directa con KOH al 20% debido a las malas condiciones del tejido. Muestras H5, H6 fueron negativas. A las muestras H8 y H9 no se les realizó esta observación porque no había muestra de concreciones ni de tejido.

6.2.2 Aislamiento y cultivo

Aislamiento de muestras clínicas

No fue posible aislar a *Pythium insidiosum* de las muestras clínicas H1, H2, H3, H4, H7 y H11, debido a la contaminación bacteriana y fúngica. Sin embargo, a las 48 hrs después de cultivar muestras de H10, creció una colonia sin micelio aéreo de color beige, que con la tinción lactofenol azul de algodón se apreciaron hifas hialinas delgadas aseptadas,

ramificadas, no se observaron estructuras asexuales; la inducción para esporular este cultivo fue negativo. El aislado fue enviado a un centro de referencia (MSU, MI, E.U.A) para su identificación, donde se determinó que era un hongo contaminante del grupo de los Ascomicetos. A las muestras H5 y H6 no se les realizó el aislamiento debido a que fueron positivas por histopatología a *Habronema* spp. En las muestras H8 y H9 no había tejido ni concreciones para realizar el aislamiento.

Cultivo de cepas tipo de *Pythium insidiosum*

Todas las colonias crecieron de 24 a 48 horas, en medios SDA y agar harina de maíz. Crecieron en un patrón radial y se observó que las hifas penetraban en el agar. En SDA las colonias fueron de color blanco a beige y en agar harina de maíz, translúcidas, observadas sólo a contraluz (Figura 9). Ambas colonias, al observarse en un microscopio invertido, presentaban hifas hialinas delgadas aseptadas, sin estructuras asexuales. Con la tinción azul de algodón, en ambos medios, también se observaron hifas hialinas delgadas aseptadas, ramificadas, y no se observaron estructuras asexuales (Figura 10).

Cuadro 1. Descripción de las muestras clínicas de equinos con lesiones granulomatosas obtenidas en este estudio.

Identificación de la muestra	Origen Fecha de muestreo	Tipo de muestra			Sexo	Edad	Raza	Historia Clínica	Curso de la enfermedad*	Resultado evolutivo
		Concreciones	Tejido	Suero						
H1**	Coyuca de Benitez, Guerrero. 21/Sept/06	✓	✓	✓	Macho	6 años	Criolla	15 días con lesión granulomatosa en miembro torácico	Agudo	Desconocido
H2**	Coyuca de Benitez, Guerrero. 17/Nov/06	✓	✓	✓	Hembra	7 años	Criolla	9 días con úlceras en abdomen. Tx cirugía y	Agudo	Sin enfermedad por 1 y medio
H3	Villahermosa, Tabasco. 13/Mar/07	✓	✓	✓	Macho	Desconocido	Criolla	Dos meses con lesión granulomatosa en abdomen.	Agudo	Eutanasia
H4	Villahermosa, Tabasco. 16/Abr/07	✓	✓	✓	Macho	Desconocido	Criolla	Meses con lesión granulomatosa en miembro torácico	Crónico	Eutanasia
H5	Chilpancingo, Guerrero. 27/Sept/07	✓	✓	✓	Hembra	Desconocido	Criolla	15 días con lesiones granulomatosas en diferentes regiones.	Agudo	Sin enfermedad
H6	Chilpancingo, Guerrero. 27/Sept/07	✓	✓	✓	Hembra	Desconocido	Criolla	15 días con lesiones granulomatosas en diferentes regiones.	Agudo	Sin enfermedad
H7	Villahermosa, Tabasco. 17/Dic/07	✓	✓	✓	Hembra	Desconocido	Criolla	Meses con lesión granulomatosa en miembro torácico	Crónico	Eutanasia
H8	Villahermosa, Tabasco. 27/Dic/07	✓	✓	✓	Macho	1 año	Criolla	Un mes con lesión granulomatosa en miembro torácico	Agudo	Aún con la lesión
H9	Villahermosa, Tabasco. 27/Dic/07	✓	✓	✓	Hembra	5 años	Criolla	Un mes con lesión ulcerosa en miembro torácico izquierdo.	Agudo	Aún con la lesión
H10	Villahermosa Tabasco. 14/Mar/08	✓	✓	✓	Hembra	Desconocido	Criolla	Meses con lesión granulomatosa en miembro.	Crónico	Eutanasia
H11	Villahermosa, Tabasco 21/Abr/08	✓	✓	✓	Hembra	Desconocido	Criolla	Meses con la lesión granulomatosa en vientre.	Crónico	Eutanasia

✓ Muestras en el laboratorio. * Muestras en mal estado. ** = obtenidas por la autora. Tx = tratamiento. (+) = positivo a pyitosis. (-) = negativo a pyitosis. ■
 Curso agudo (< dos meses), curso crónico (> dos meses)

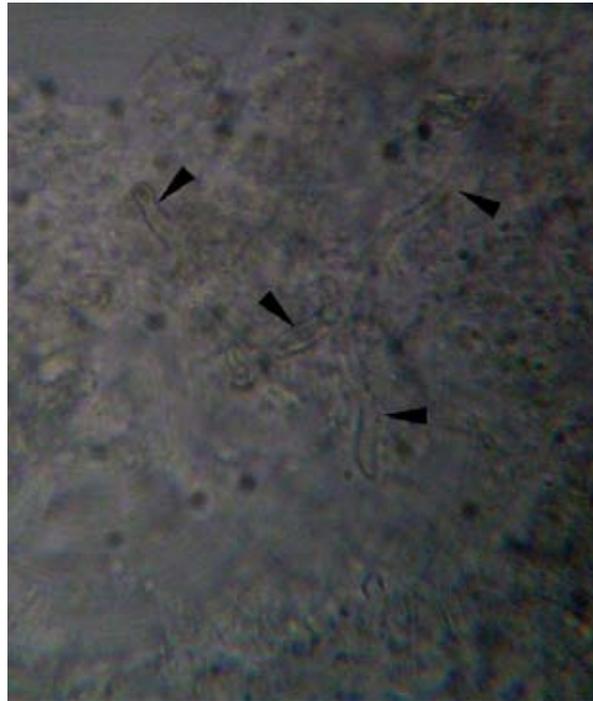


Figura 8. Observación directa con KOH al 20% de muestra H11. Las flechas muestran hifas delgadas cenocíticas, con ramificaciones. 40X

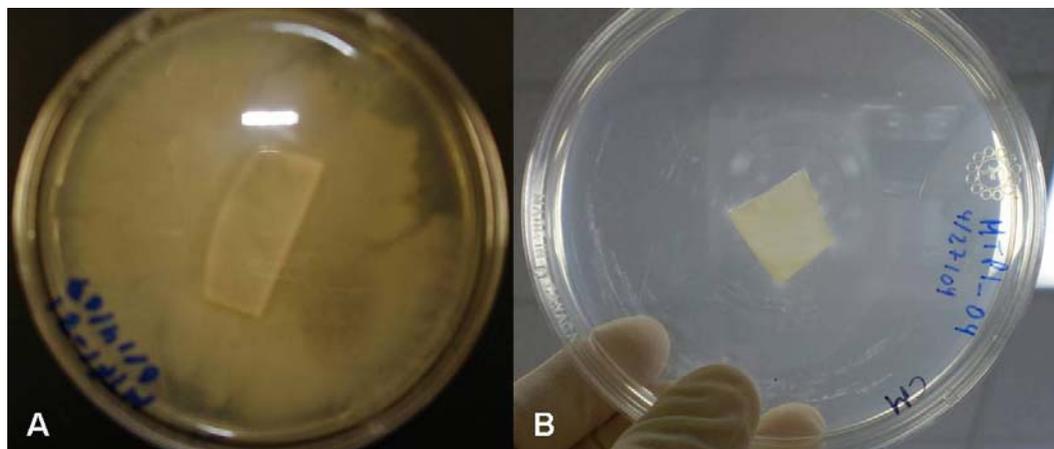


Figura 9. Cultivo de 48 hrs de *P. indisioum*. (A) En SDA y (B) agar harina de maíz.

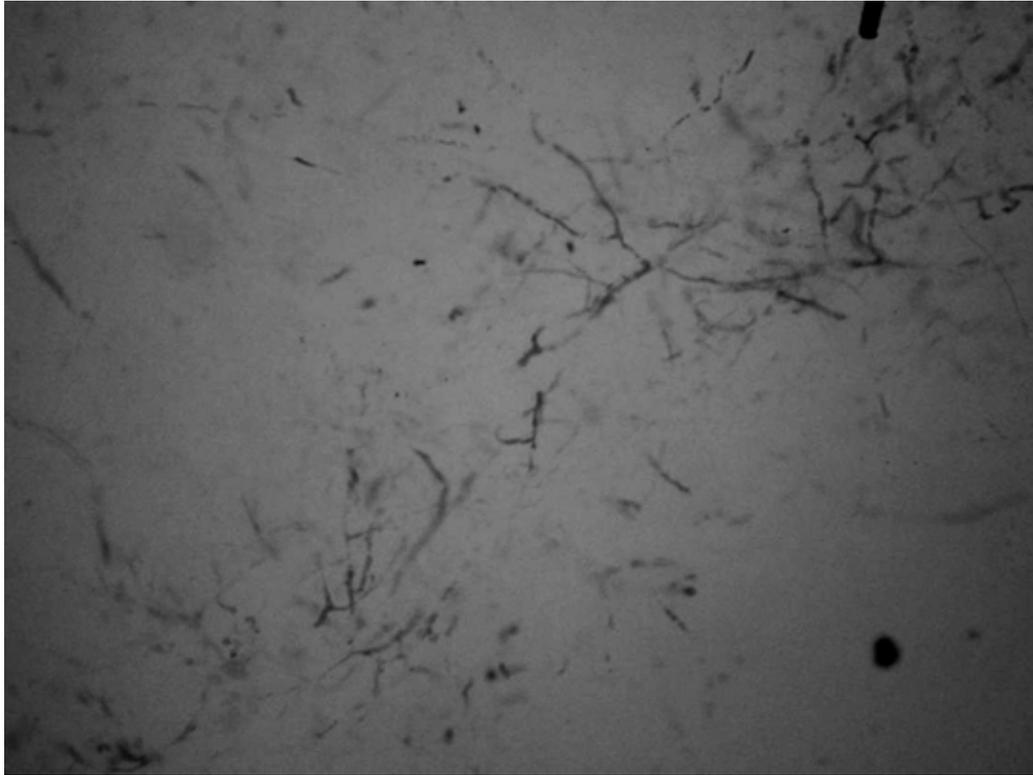


Figura 10. Tinción de lactofenol azul de algodón de un cultivo puro de *P. insidiosum*. Se observan hifas hialinas delgadas aseptadas con ramificaciones (10X).

6.2.3 Producción de zoosporangios y zoosporas

Se utilizó la cepa MTPI-04 (cepa aislada de equino, Texas) y la cepa ATCC 28251 para inducir la esporulación. Las estructuras asexuales pudieron observarse hasta las 24 horas de incubación. Los zoosporangios eran redondos con estructuras redondeadas por dentro, que más adelante formarían las zoosporas, también se observaron hifas que se iban a diferenciar en zoosporangios (Figura 11). Las zoosporas eran ovoides flageladas, y se encontraban en movimiento o estáticos en el fondo.

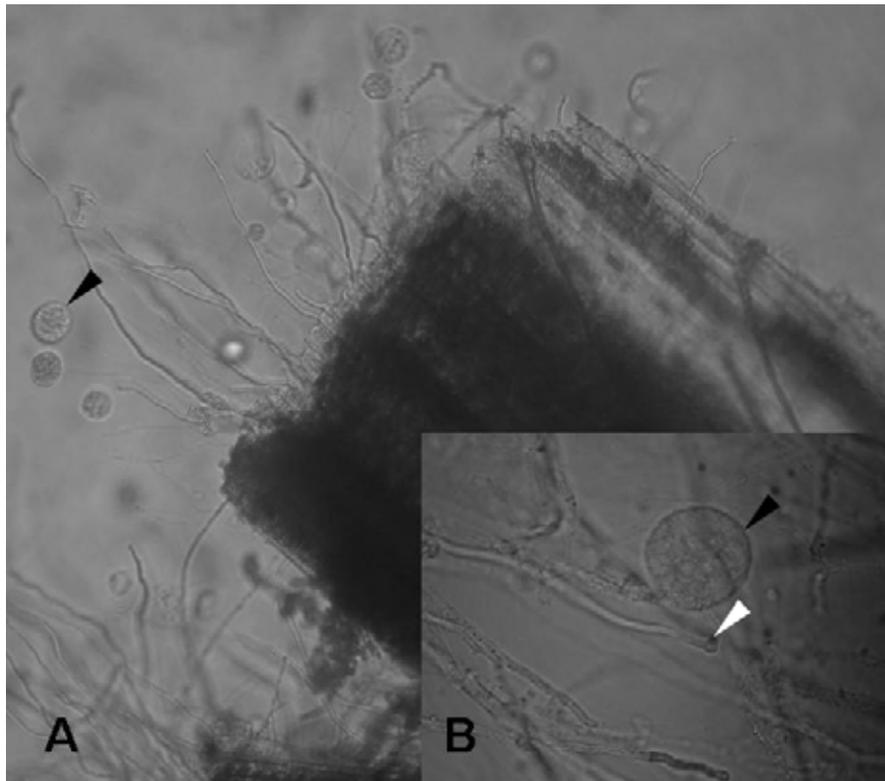


Figura 11. Observación directa con microscopio invertido de zoosporangios de cepa MTPI-04 de *P. insidiosum*. Flechas negras indican los zoosporangios (10X). Flechas blancas indican una hifa que se va a diferenciar en zoosporangio (40X).

6.3 Histopatología

El estudio histopatológico de 8/8 muestras de tejidos (H1, H2, H3, H5, H6, H7, H10 y H11) con las tinciones HE y PAS mostraron dermatitis ulcerativa, gran cantidad de eosinófilos y neutrófilos rodeados por tejido conectivo vascularizado infiltrado con macrófagos y células gigantes. No se observaron hifas bien definidas con estas tinciones (Figura 12), solamente el contorno de estructuras compatibles con hifas “fantasmas” en 5/8 muestras (H1, H2, H3, H10 y H11). La tinción Gomori-Grocott mostró hifas aseptadas intralesionales de 4-6 μ con ramificaciones en el centro de los focos de necrosis, rodeadas por eosinófilos y neutrófilos (Figura 12) en 5/8 muestras clínicas (H1, H2, H3, H10 y H11). Las muestras H5 y H6, con la tinción HE, además de presentar dermatitis neutrofílica y eosinofílica con áreas necróticas multifocales y proliferación de tejido de granulación, mostraron estructuras compatibles con el parásito *Habronema* spp.

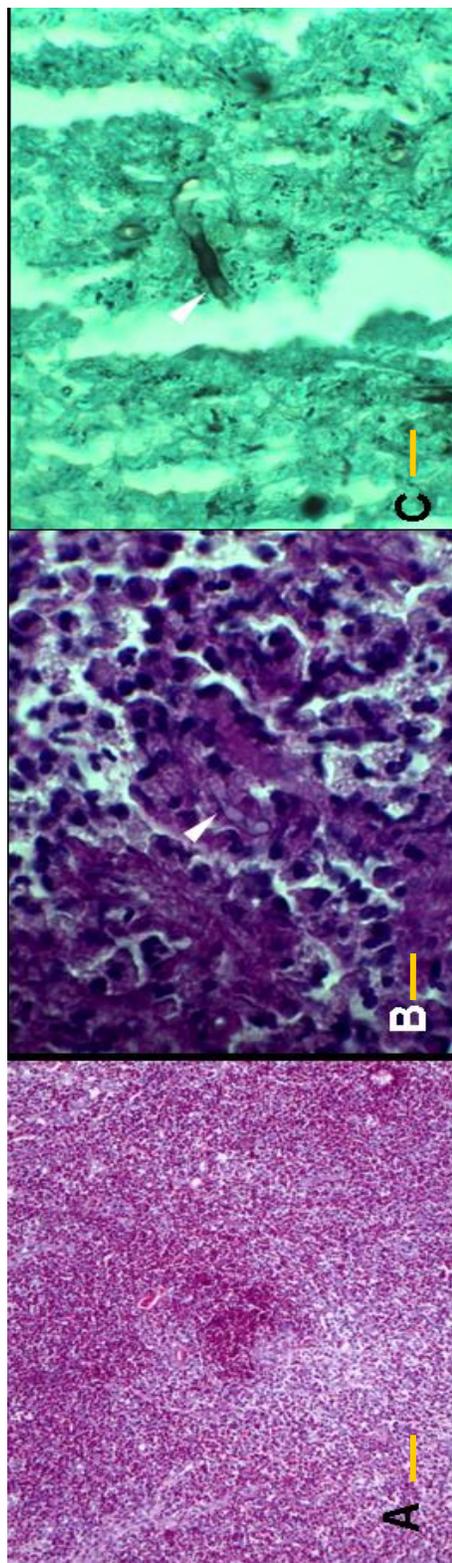


Figura 12. Histopatología de tejido equino lesionado por *P. indiosum*. A. Focos de necrosis rodeados de infiltrados abundantes de eosinófilos y polimorfonucleares (HE) 4X. Barra 200 μ m. B. Detalle de la figura A, flecha indica un “fantasma” de una hifa (PAS) 40X. Barra 20 μ m. C. Flecha indica hifas cenocíticas en tejido lesionado (Gomori-Grocott). 40X. Barra 20 μ m.

6.4 Diagnóstico serológico

6.4.1 Producción de antígeno para IDD, ELISA y WB

Se obtuvo 1 ml de antígeno metabólico a una concentración de 1 a 2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ a partir de cepas ATCC mismo que fue dividido en dos tubos de 0.5 ml cada uno; sólo la cepa ATCC 28251 tuvo tres tubos con 0.5 ml cada uno. Se corrió un gel de SDS-PAGE para observar diferentes bandas (Figura 13), donde se detectaron aproximadamente de 5 a 12 bandas en todas las cepas. La mayoría de las bandas (aproximadamente ocho) se localizaron en rangos de 25 a 75 kDa, mientras que las demás (aproximadamente cuatro) pesaron más de 75 kDa. Por cada 20 μg de antígeno somático, diluidos en 100 μl de solución reguladora 2X se obtuvieron 2.5 $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$. Se corrió un gel de SDS-PAGE para observar diferentes bandas y para saber la cantidad de antígeno que se debería agregar para el WB (Figura 14). Se detectaron aproximadamente 19 bandas. La mayoría de las bandas (aproximadamente 12) se localizaron en rangos de 25 a 193 kDa, mientras que las demás (aproximadamente siete) pesaron menos de 25 kDa.

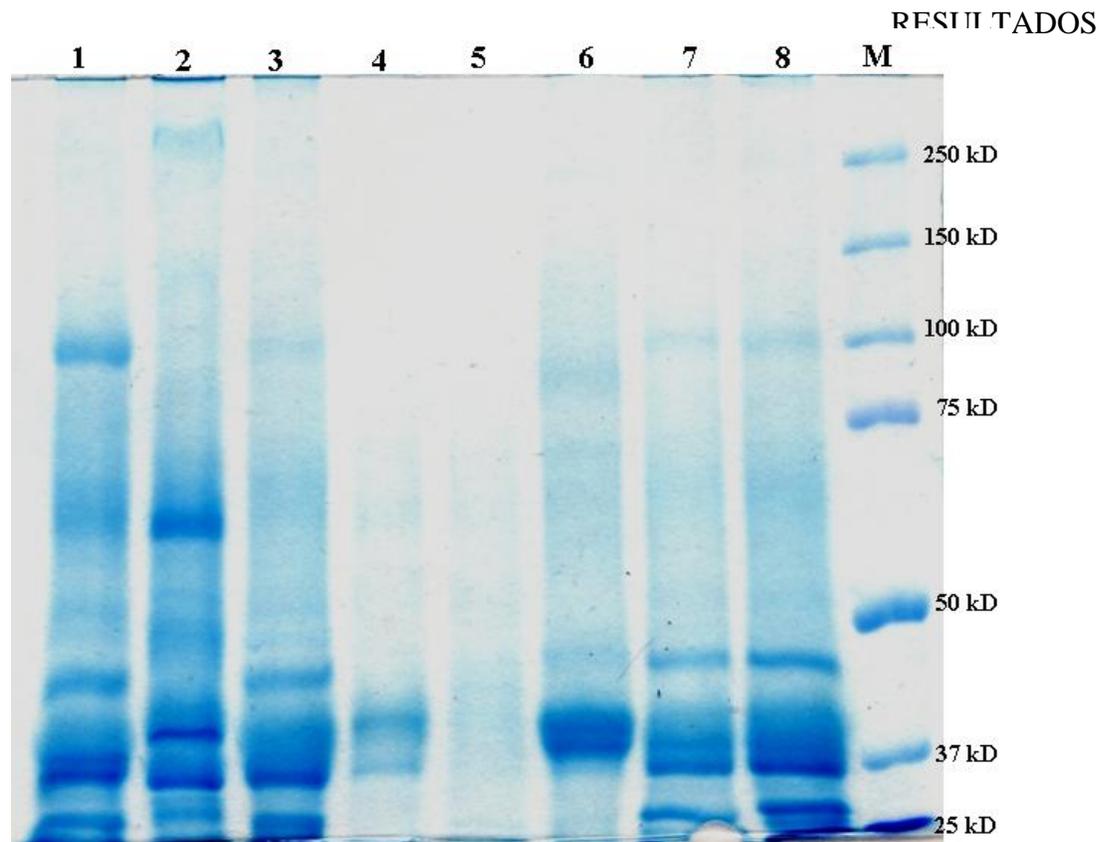


Figura 13. Gel de SDS-PAGE teñido con azul de bromofenol al 0.2% que muestra el patrón del antígeno metabólico de las cepas ATCC de *P. insidiosum*. Carril M= marcador de peso molecular en kDa. Carriles 1,2,6= ATCC 28251; carril 3= MTPI-14; carriles 4,5= ATCC 58643; carriles 7,8= ATCC 64221.

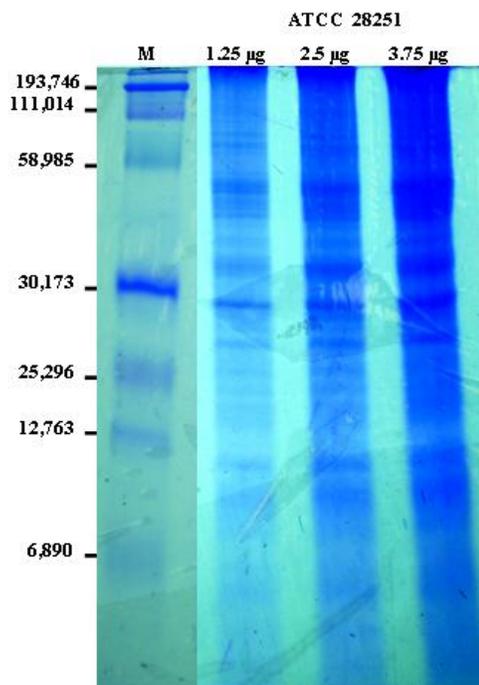


Figura 14. Gel de SDS-PAGE teñido con azul de bromofenol al 0.2% que muestra el patrón del antígeno somático de la cepa ATCC 28251 de *P. insidiosum*. Carril M= marcador de peso molecular en kDa. Los demás carriles tienen una concentración diferente de antígeno somático.

6.4.2 Inmunodoble difusión (IDD)

Con el antígeno metabólico se pudieron observar una, dos o tres bandas de identidad mediante la técnica de IDD (Figura 15) en 7/11 muestras de sueros equinos (Cuadro 2).

Identificación de la muestra	IDD	Número de bandas de identidad
	Resultado	Resultado
H1	(+)	Dos bandas
H2	(+)	Dos bandas
H3	(+)	Dos bandas
H4	NEGATIVO	-----
H5	NEGATIVO	-----
H6	NEGATIVO	-----
H7	(+)	Una banda
H8	(+)	Tres bandas
H9	NEGATIVO	-----
H10	(+)	Dos bandas
H11	(+)	Dos bandas

Cuadro 2. Resultados de la IDD de las muestras de sueros e quinos.

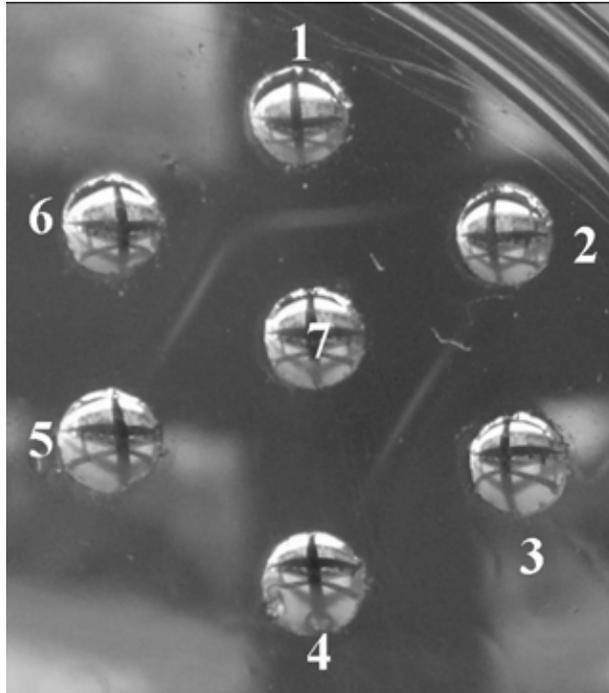


Figura 15. Reacción entre el antígeno metabólico de *P. insidiosum* y el suero equino. Dos bandas de identidad son evidentes en los pozos 3 y 6; una banda de identidad en 1. 1= suero control positivo; 2= muestra H5; 3= H1; 4= Suero control negativo; 5= Agua; 6= muestra H2; 7=antígeno metabólico.

6.4.3 Ensayo inmunoabsorbente de enzima ligado (ELISA) indirecto

Se utilizó el antígeno de la cepa ATCC 28251 de *P. insidiosum*. Los resultados de las absorbancias de cada muestra y de cada dilución se observan en la figura 16. El punto de corte determinado por la prueba “t” de Student fue a partir de la dilución 1/200 (Figura 17), con una absorbancia de 0.104 ($P < 0.05$). Con estos datos las muestras H1, H2, H3, H7, H8 y H10 fueron positivas a anticuerpos anti-*P. insidiosum* y las muestras H4, H6 y H9 resultaron negativas. La muestra H5 resultó ser un falso positivo y H11 un falso negativo. H1, H2 y H3 mostraron títulos altos de anticuerpos mientras que H7, H8, H10 y H11 mostraron títulos bajos parecidos a las muestras H5 y H6, positivas a *Habronema* spp. por histopatología.

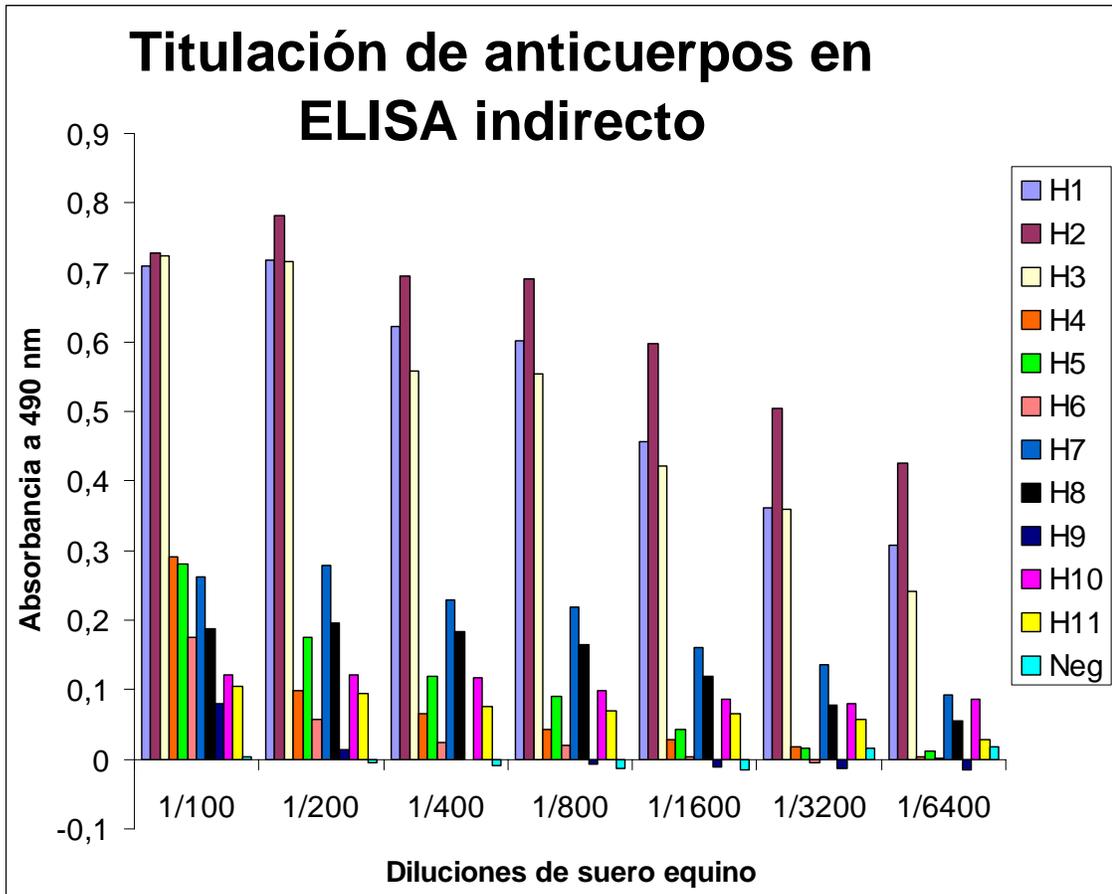


Figura 16. ELISA indirecto que muestra los resultados de todas las diluciones (1/100 a 1/6400) de las muestras clínicas de suero equino. Se grafican las medias de absorbancia.

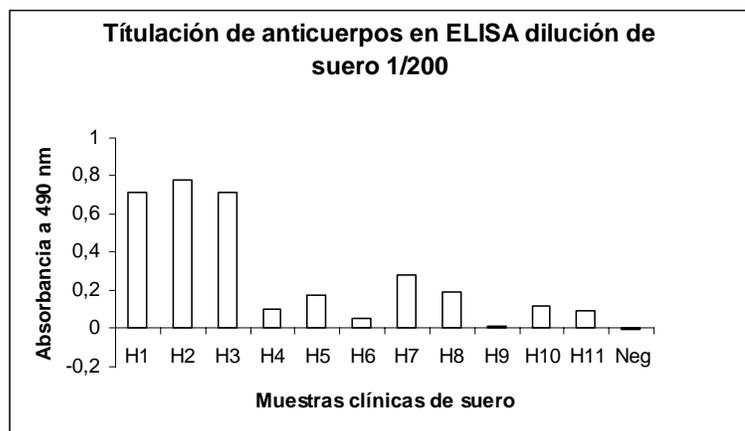


Figura 17. ELISA indirecto que muestra los resultados de la dilución 1/200 de las muestras clínicas de suero equino. Se grafican las medias de absorbancia.

6.4.4 Western Blot (WB)

Se utilizaron los antígenos de la cepa ATCC 28251. De los 11 sueros equinos, siete (H1, H2, H3, H7, H8, H10 y H11) reaccionaron positivamente con alrededor de 12 antígenos metabólicos de *P. insidiosum*, dos arriba de 250 kDa, uno entre 75 y 100 kDa, 4 entre 50 y 75 kDa, dos entre 37 y 50 kDa, y tres debajo de 37 kDa. Estos 7 sueros positivos fueron los mismos que reaccionaron positivamente a IDD. Un suero equino (H5), que fue positivo al parásito *Habronema* spp. por histopatología, detectó tres antígenos metabólicos de *P. insidiosum*, dos localizados arriba de 250 kDa y uno entre 75 y 100 kDa (Figura 18). Los demás sueros equinos (H4, H6 y H9) no reaccionaron con ninguna proteína.

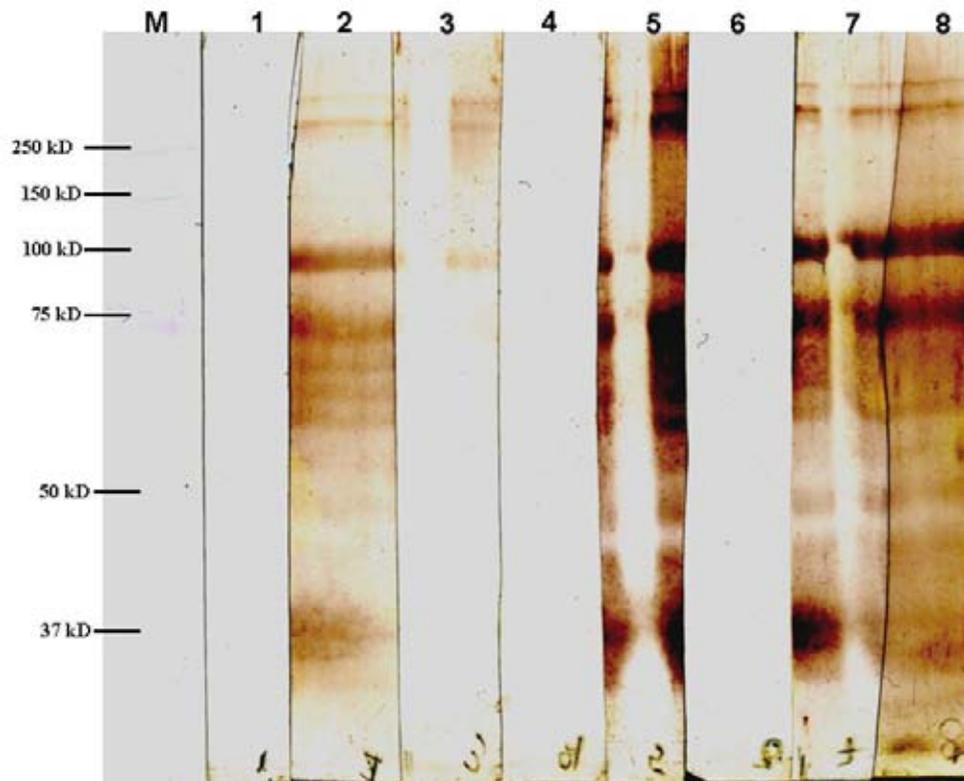


Figura 18. WB que muestra las reacciones entre el antígeno metabólico de *P. insidiosum* y las muestras de suero equino. Carril M= marcador de peso molecular en kDa. Carril 1= muestra H4; carril 2= muestra H3; carril 3= muestra H5; carril 4= muestra H6; carril 5= muestra H8; carril 6= muestra H9; carril 7= muestra H10; carril 8= muestra H11. Los números de lado izquierdo indican los marcadores de masa molecular en kDa.

De los 11 sueros, sólo pudo efectuarse el WB con el antígeno somático a 4 muestras de sueros equinos (H1, H2, H3 y H4) que fueron con los que se trabajaron durante la estancia de investigación en MSU y debido a que no se obtuvo un aislado positivo a *P. insidiosum*, no fue posible obtener más antígeno somático. Estas muestras mostraron una reacción positiva a las 3 proteínas inmunodominantes en equinos, que fueron de 28, 30 y 32 kDa (Figura 19).

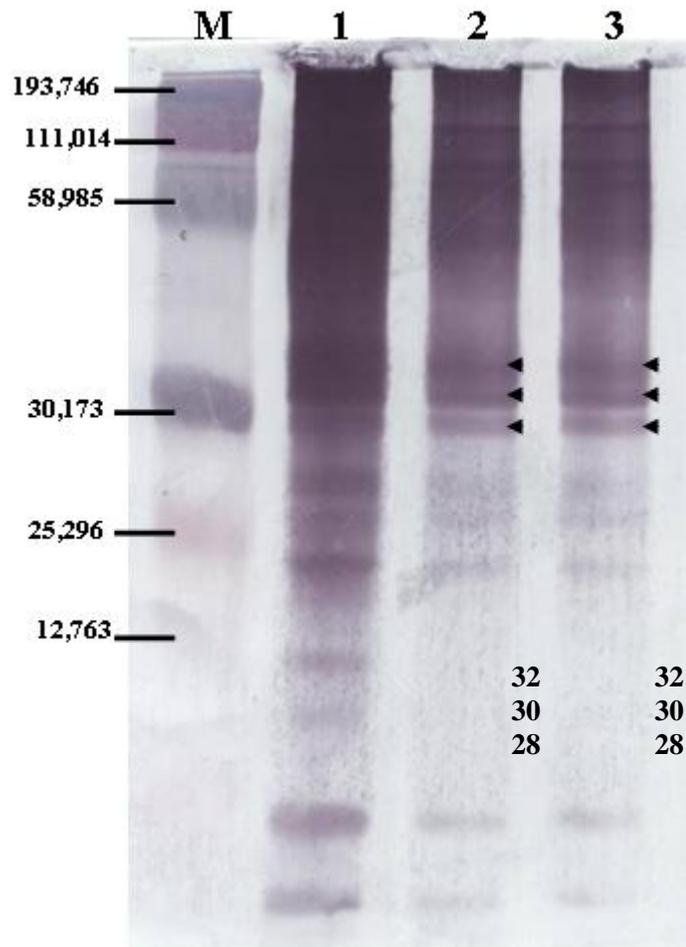


Figura 19. WB que muestra las reacciones entre el antígeno somático de *P. insidiosum* y las muestras de suero equino. Carriles 1,2,3= muestra H1. Las flechas indican las proteínas inmunodominantes de 28, 30 y 32 kDa. Los números de lado izquierdo indican los marcadores de masa molecular en kDa.

6.4.5 Valoración de las pruebas diagnósticas

IDD. La sensibilidad y especificidad fue de 100%, con un valor predictivo positivo del 100% y un valor predictivo negativo del 100%.

ELISA. En una dilución 1/200, se obtuvo una sensibilidad del 85% y una especificidad del 80%, con un valor predictivo positivo del 85% y un valor predictivo negativo del 80%.

Con el coeficiente Kappa de Cohen, se encontró que el valor de “k” entre la IDD y el WB fue de 1,00, lo cual nos da una concordancia casi perfecta; el valor de “k” entre la ELISA y el WB fue de 0,68, lo cual nos da una concordancia sustancial.

A continuación se muestra un cuadro con el resumen de todos los resultados obtenidos al utilizar las diferentes técnicas morfológicas y serológicas para diagnosticar a *P. insidiosum* de muestras clínicas de equinos con lesiones granulomatosas (Cuadro 3), donde se muestra que H1, H2, H3, H7, H9, H10 y H11 son positivos a pytiosis.

Cuadro 3. Resultados obtenidos en todas las técnicas morfológicas y serológicas de las muestras clínicas que se trabajaron en este estudio.

Identificación de la muestra (Pytosis)	PRUEBAS MORFOLÓGICAS					PRUEBAS SEROLÓGICAS			
	KOH 20%	AISLAMIENTO	HISTOPATOLOGÍA			IDD	ELISA	WB Con antígeno metabólico	WB Con antígeno somático
			HyE Focos de necrosis con gran cantidad de células inflamatorias	PAS Focos de necrosis con gran cantidad de células inflamatorias	Gomori- Grocott Hifas cenocíticas intralesionales				
H1 (+)	(+)	NEG	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
H2 (+)	(+)	NEG	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
H3 (+)	----	----	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
H4 (+)	----	----	----	----	NEG	NEG	NEG	(+)	(+)
H5* (+)	NEG	----	(+)	(+)	NEG	NEG	NEG	NEG	----
H6* (+)	NEG	----	(+)	(+)	NEG	NEG	NEG	NEG	----
H7 (+)	(+)	NEG	(+)	(+)	NEG	(+)	(+)	(+)	----
H8 (+)	----	----	----	----	----	(+)	(+)	(+)	----
H9 (+)	----	----	----	----	NEG	NEG	NEG	NEG	----
H10 (+)	----	----	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	----
H11 (+)	(+)	NEG	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	----

Neg= negativo. (+)= positivo. ----= no se realizó.*= casos de habronemiasis cutánea.**= falso positivo

7. DISCUSIÓN

En este trabajo, se informa por primera vez en México la presencia de *Pythium insidiosum* en equinos con lesiones granulomatosas. Las lesiones características en piel tienen distintos nombres en los diferentes estados de donde se recibieron las muestras clínicas: “cucuichi” en Coyuca de Benítez, Guerrero e “iza” en Villahermosa, Tabasco. Estas manifestaciones clínicas generalmente se tratan con antiparasitarios tópicos, antibióticos, lavados con yodo o cristal violeta, ya que se piensa que se trata de *Habronema* spp, los que no responden a estos tratamientos se les realiza la escisión del tejido afectado y los equinos que no responden a ninguno generalmente se sacrifican (comunicación verbal del MVZ Carlos Hernández de Villahermosa, Tabasco y Juan Maciel, dueño de los equinos H1 y H2).

Todos los equinos que presentan pytiosis tienen lesiones granulomatosas en un solo lugar topográfico, no es común que se encuentren en distintos lugares del cuerpo (Mendoza y Alfaro, 1986; Chaffin et. al., 1995), como fue en el caso de H5 y H6, donde tenían de dos a tres lesiones en cara y miembros, que posteriormente se diagnosticaron por los estudios histopatológicos, como lesiones por *Habronema* spp. Las demás muestras clínicas, sólo presentaron una lesión granulomatosa en una región anatómica.

En los estados de Guerrero y Tabasco, de donde se obtuvieron las muestras clínicas de los equinos con lesiones granulomatosas, hay un clima húmedo y subhúmedo tropical con lluvias en verano que en la clasificación de Köppen modificado por Enriqueta García (1998) es “Am” y “Aw” (Peel et. al., 2007), el cual es propicio para el crecimiento y desarrollo de *P. insidiosum*, por lo que encontrar este microorganismo afectando a equinos en estos estados coincide con los informes previos donde encuentran la pytiosis en climas tropicales y subtropicales (Mendoza et. al., 1993; Chaffin et. al., 1995). Estos dos estados no son los únicos con este tipo de clima, por lo que posiblemente la pytiosis se encuentre afectando equinos en otros estados como Veracruz, Chiapas, Colima, Jalisco, etc, sobre todo en los estados que colindan con el Golfo de México.

Las muestras H1 y H2, fueron tomadas apropiadamente, sin embargo, debido a la inexperiencia en ese momento para realizar el cultivo, no fue posible aislar a *Pythium insidiosum* de las concreciones, a causa de la contaminación fúngica que no permitió el crecimiento del Oomiceto de interés. Las muestras que siguieron (H3, H4, H7, H11), fueron

enviadas en malas condiciones para intentar el aislamiento de *P. insidiosum*, por lo que el crecimiento de bacterias y hongos impidió el crecimiento del Oomiceto. Solamente en la muestra H10, se obtuvo un desarrollo de lo que pudo haber sido un Oomiceto. Sin embargo, no esporuló en el medio de inducción y el centro de referencia (Universidad Estatal de Michigan, E.U.A) determinó que se trataba de un hongo contaminante dentro del grupo de los Ascomicetos.

El aislamiento resulta complicado si no se tiene la experiencia o la muestra adecuada, por lo que se debe hacer uso de otras técnicas para confirmar el diagnóstico de la pytiosis. En este estudio, las técnicas de IDD, ELISA y WB con antígeno metabólico fueron utilizadas con éxito para detectar inmunoglobulinas IgG anti-*P. insidiosum* en 7 de los 11 sueros equinos.

La IDD fue capaz de detectar todos los casos positivos de pytiosis equina en este estudio (7/11), lo cual coincide con lo previamente informado, donde la mencionan como una prueba específica y sensible para detectar todos los casos positivos de pytiosis en equinos (Mendoza et. al., 1986). Esta prueba serológica utiliza un antígeno metabólico que es capaz de permanecer estable al menos 1 año (Mendoza et. al., 1986), por lo que no es necesario preparar antígeno soluble fresco para la prueba. En su estudio, Mendoza et. al. (1993), detectaron de 5 a 6 bandas de precipitación, aunque no encontró relación entre la severidad o duración de la enfermedad con las bandas encontradas. No obstante, en equinos tratados con cirugía o inmunoterapia, encontró que disminuían las bandas de precipitación en la prueba, detectando una o ninguna. En este estudio, se detectaron de una a tres bandas de precipitación, que coincide con los trabajos de Mendoza y Alfaro (1986), Bentinck-Smith et. al. (1989) y Pérez et. al. (2005) pero que difieren con los datos de Mendoza et. al. (1993), esto podría explicarse debido a que se utilizó una cepa diferente para obtener el antígeno. La muestra de suero donde se detectó una banda fue H7, un equino al cual se le realizaba la escisión del tejido afectado con regularidad, por lo que esto pudiera ser la razón por la cual sólo aparece una banda de precipitación en la IDD.

La ELISA detectó los 7 casos positivos que detectó la IDD y el WB con el antígeno metabólico, pero también detectó títulos de anticuerpos en un caso positivo a habronemiasis cutánea, el cual obtuvo títulos iguales o más altos que H7, H8, H10 y H11 (muestras positivas a anticuerpos anti-*P. insidiosum*). Mendoza et. al. (1997) muestran

resultados en donde el ELISA detecta títulos de anticuerpos en una dilución menor o igual a 1/100 y 1/200, en muestras con enfermedades heterólogas a la pytiosis, por lo que al parecer, es posible encontrar títulos de anticuerpos en enfermedades diferentes a la pytiosis. La dilución en donde se aprecia una diferencia entre las muestras positivas y negativas es a partir de la dilución 1/200, que difiere con los datos obtenidos por Krajaejun et. al. donde encontraron diferencias significativas en la dilución 1/800 (2006), sin embargo, las muestras con las cuales trabajaron fueron sólo de humanos. El ELISA detectó muestras positivas (H1, H2, H3) con títulos altos de anticuerpos (1/6400) que fueron de equinos con menos de dos meses con la lesión, es decir, los casos agudos y muestras positivas (H7, H8, H10 y H11) con títulos bajos de anticuerpos (1/200), que fueron de equinos con más de dos meses con la lesión, es decir, casos crónicos. Esta relación entre el título de anticuerpos y el tiempo de desarrollo de la lesión coincide con los informes de Mendoza et. al. (1997), donde mencionan que esta técnica también es valiosa para diagnosticar los casos agudos y crónicos de pytiosis. Además, esta técnica se ha utilizado para evaluar el pronóstico de la enfermedad después o durante el tratamiento de un equino con pytiosis (donde es conveniente tomar muestras seriadas) así como estudios epidemiológicos (Mendoza et. al., 1997).

El WB con el antígeno metabólico, fue utilizado como prueba patrón o de “oro”, por la falta del aislamiento de las muestras clínicas, y por la alta sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de la pytiosis (Mendoza, 2005), la IDD tuvo los mismos resultados, sin embargo, al no ser una prueba sensible para todas las especies animales, no se utilizó como prueba patrón. Esta técnica, detectó 7/11 muestras positivas a pytiosis. Las 7 muestras positivas a pytiosis, fueron las mismas que detectó la IDD.

El antígeno metabólico detectó aproximadamente 12 antígenos de diferentes kDa. El antígeno inmunodominante de 74 kDa que detectó Krajaejun et. al. (2006) también se detectó en este estudio por los 7 sueros positivos. Vannittanakom et. al. (2004) también detectaron bandas inmunoreactivas dominantes, aunque en los pesos moleculares de 35 a 42 kDa; en este estudio también se detectaron bandas inmunoreactivas entre los pesos 37 y 50 kDa pudiendo ser las mismas que informa este autor. Las bandas reactivas que se

detectaron en un peso molecular mayor a 250 kDa y la que se detectó entre 75 y 100 kDa, son las mismas bandas que detectó un suero positivo a *Habronema* spp.

En los diferentes estudios previos utilizando la técnica de WB, las enfermedades heterólogas que se han utilizado para demostrar la especificidad de la prueba han sido entre otras las causadas por los hongos *Basidiobolus ranarum* (Grooters et. al., 2003), *Conidiobolus coronatus* (Mendoza et. al., 1992; Grooters et. al., 2003), *Rhizopus* spp. (Krajaejun et. al., 2006) y otras especies de *Pythium* (Krajaejun et. al., 2006), por lo que en este estudio, se muestra por primera vez la enfermedad de habronemiasis cutánea utilizada como diferencial de pytiosis en WB. Se observa una reacción cruzada en las tres bandas inmunoreactivas que detecta el suero con habronemiasis, por lo que no debieran considerarse como proteínas para detectar inmunoglobulinas IgG anti-*P. insidiosum*, no obstante, para confirmar esta reacción cruzada se debiera realizar el WB con un mayor número de sueros equinos positivos a *Habronema* spp., ya que de las dos muestras de suero equino positivas a *Habronema* spp. sólo una mostró bandas inmunoreactivas; también se sugiere realizar un WB con el antígeno metabólico de *Habronema* spp. con muestras de suero equino positivas a pytiosis para confirmar si los anticuerpos contra *P. insidiosum* también presentan reacción cruzada hacia el parásito. Es posible que estas proteínas son la razón por la cual la ELISA detectó H5 con títulos de anticuerpos similares a los positivos con un título de anticuerpos bajo. Otra posible explicación, es que las dos enfermedades estaban presentes en el equino, aunque no hay informes previos de esta asociación.

EL WB utilizando el antígeno somático mostró resultados similares a lo de Mendoza et. al. (1992), donde detectaron los antígenos inmunodominantes 28, 30 y 32 kDa. Las únicas muestras a las que se les realizó esta prueba fueron H1, H2, H3 y H4. Las demás muestras no se trabajaron con el antígeno somático debido a que no se logró el aislamiento de *P. insidiosum* de las muestras clínicas de equinos de México. Todas las muestras excepto H4, detectaron bandas intensas. Cabe mencionar que la muestra H4 fue negativa a pytiosis en las diferentes pruebas serológicas empleadas con el antígeno metabólico. Diferentes autores han trabajado con antígenos metabólicos (Vannitanakom et. al., 2004), antígenos somáticos (Mendoza et. al., 1992, 1997) o ambos (García, 2006; Krajaejun et. al., 2006; Supabandhu et. al., 2008), obteniendo diferentes resultados. García (2006) encontró que las estructuras

de la pared fueron más antigénicas en equinos que las estructuras del citosol, es decir, las inmunoglobulinas encontradas en el suero equino se unieron específicamente en mayor cantidad a las estructuras de la pared celular que a las del citosol. Es posible que esta sea la causa por la cual se encontraron anticuerpos contra el antígeno somático y no para el antígeno metabólico en la muestra H4, siendo más fuerte la unión con los antígenos de pared, aunque también menciona que cada hospedero puede producir diferentes inmunoglobulinas anti-*P. insidiosum* contra las estructuras de la hifa, encontrando un patrón distinto de cada suero de los hospederos estudiados, sin embargo, siendo que la muestra H4 sólo fue positiva a pytiosis por WB con el antígeno somático, existen dudas de que este equino sea un caso positivo a esta enfermedad.

Entre las diferentes pruebas serológicas utilizadas en este trabajo, la IDD fue la más sensible y específica (100%) para detectar en el suero equino inmunoglobulinas IgG contra *P. insidiosum*, no importando la etapa de desarrollo de la lesión que tenían los equinos.

El ELISA indirecto, es un buen método si se requieren trabajar con un gran número de muestras o para realizar estudios epidemiológicos. En este trabajo se logró detectar 6/7 casos positivos, sin embargo, no detectó todos los casos negativos, por lo que esta prueba debe utilizarse en combinación con otra. Es probable que se aumente la sensibilidad y especificidad si se utiliza un antígeno diferente que pueda omitir las tres proteínas detectadas en el suero con habronemiasis cutánea.

El WB con el antígeno metabólico fue efectivo para detectar los casos positivos a pytiosis de los negativos. Esta prueba, además de ser utilizada como una herramienta en el diagnóstico, también se emplea para estudiar las proteínas de *P. insidiosum*, ya sea con el fin de producir un inmunomodulador efectivo o encontrar una proteína más antigénica (Krajaeujun et. al., 2006), así que como prueba diagnóstica para un laboratorio es cara y laboriosa, por lo que se deben emplear otras pruebas más accesibles como la IDD.

El estudio histopatológico es el más solicitado por la mayoría de los veterinarios ya que se obtiene información en un corto tiempo, sin embargo, la información es limitada y a menos de que se utilicen técnicas como la inmunofluorescencia o la histoquímica, sólo nos dará una identificación tentativa del microorganismo del que se trate (Smith, 2008). En este trabajo fueron importantes los estudios histopatológicos para detectar los casos posibles de

pytiosis, aunque lo más importante fue que se detectaron los dos casos de habronemiasis cutánea.

Con base a los estudios morfológicos, histopatológicos y serológicos, de las muestras clínicas de equinos con lesiones granulomatosas de los estados de Guerrero y Tabasco, se confirma la presencia de *Pythium insidiosum* en este país, por lo que debe ser considerado como diagnóstico diferencial de la habronemiasis cutánea, entre otras, en equinos. Debe contemplarse que la presencia de este agente no sólo se limita a equinos, y pudiera estar afectando a otras especies incluyendo al hombre.

8. CONCLUSIONES

Pythium insidiosum se encuentra presente en equinos con lesiones granulomatosas en equinos de México.

La IDD y el WB son técnicas 100% sensibles y específicas para el diagnóstico de *Pythium insidiosum* en equinos con lesiones granulomatosas en México.

En la técnica de ELISA es necesario producir un antígeno más específico para diferenciar los casos positivos de pytiosis.

El estudio histopatológico permite diferenciar los casos posibles de pytiosis de habronemiasis cutánea.

9. LITERATURA CITADA

Alfaro AA, Mendoza L. Four cases of equine bone lesions caused by *Pythium insidiosum*. Equine Vet J. 1990; **22**:295-297.

Allison N, Gillis JP. Enteric pythiosis in a horse. J Am Vet Med Assoc. 1990; **3**:462-464.

Bentinck-Smith J, Padhye JA, Maslin WR, Hamilton C, McDonald RK, Woody BJ. Canine pythiosis-isolation and identification of *Pythium insidiosum*. 1989; **1**: 295-298.

Brown CC, McClure JJ, Triche P, Crowder C. Use of immunohistochemical methods for diagnosis of equine pythiosis. Am J Vet Res. 1988; **49**:1866-1868.

Brown CC, Roberts ED. Intestinal pythiosis in a horse. Aust Vet J. 1988; **65**:88-89.

Buergelt CD. If it's not neoplasia, it may be pythiosis. Vet Med. 2000; **95**:198-200.

Camus AC, Grooters AM, Aquilar RF. Granulomatous pneumonia caused by *Pythium insidiosum* in a central american jaguar, *Panthera onca*. J Vet Diagn Invest. 2004; **16**:567-571.

Chaffin MK, Schumacher J, McMullan WC. Cutaneous pythiosis in the horse. Dermatology. 1995; **11**:91-103.

De Cock AWAM, Mendoza L, Padhye AA, Ajello L, Kaufman L. *Pythium insidiosum* sp. nov., the etiologic agent of pythiosis. J Clin Microbiol. 1987; **25**:344-349.

Fischer JR, Pace LW, Turk JR, Kreeger JM, Miller MA, Grosser HS. Gastrointestinal pythiosis in Missouri dogs: eleven cases. J Vet Diagn Invest. 1994; **6**:380-382.

Fraco DM, Parr D. *Pythium insidiosum* keratitis. Aust NZ J Ophtalmol. 1997; **25**:177-179.

García E. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana. México: Universidad Nacional Autónoma de México. 1988: 116 pp.

García RB. Morphological and antigenic studies of *Pythium insidiosum* hyphae by transmission electron microscopy (MSc Thesis). MI, EUA: MSU. 2005

Goad MEP. Pulmonary pythiosis in a horse. Vet Pathol. 1984; **21**:261-262.

Graham JP, Newell SM, Roberts GD, Lester NV. Ultrasonographic features of canine gastrointestinal pythiosis. Vet Radiol Ultrasound. 2000; **41**: 273-277.

Grooters AM. Pythiosis, lagenidiosis and zygomycosis in small animals. Vet Clin Small Anim. 2003; **33**:695-720.

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

Grooters AM, Hodgins EC, Bauer RW, Znajada NR, Thomas RC. Clinicopathologic findings associated with *Lagenidium* sp. Infection in 6 dogs: initial description of an emerging oomycosis. J Vet Intern Med. 2003; **17**:637-646.

Grooters AM, Whittington A, Lopez MK, Boroughs MN, Roy AF. Evaluation of microbial culture techniques for the isolation of *Pythium insidiosum* from equine tissues. J Vet Diagn Invest. 2002; **14**:288-294.

Hnilca KA. Difficult dermatologic diagnosis. J Am Vet Med Assoc. 1998; **212**:1192-1193.

Holloway S. The Oomycetes-the fungi with teeth and flippers: Editorial. J Vet Intern Med. 2003; **17**:607-608.

Krajeujun T, Kunakorn M, Prachartam R, Chongtrakool P, Sathapatayavongs B, Chairprasert A, Vanittanakom N, Chindamporn A, Mootsikapun P. Identification of a novel 74-kilodalton immunodominant antigen of *Pythium insidiosum* recognized by sera from human patients with pythiosis. J Clin Microbiol. 2006; **44**:1674-1680.

Laohapensang K, Rerkasem K, Supabandhu J, Vanittanakom N. Necrotizing arteritis due to emerging *Pythium insidiosum* infection in patients with Thalassemia: rapid diagnosis with PCR and serological tests —case reports. Int J Angiol. 2005; **14**:123-128.

Latinjhouwers M, de Wit PJGM, Govers F. Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants. Trends Microbiol. 2003; **11**:462-469.

Leal AT, Santurio JM, Leal ABM, Catto JB, Flores EF, Lubeck I, Alves SH. Characterization of the specificity of the humoral response to *Pythium insidiosum* antigens. J Mycol Med. 2005; **15**:63-68.

Marques AS, Eduardo Bagagli E, Bosco SMG, Rosangela M. P. Camargo RMP, Marques MEA. *Pythium insidiosum*: report of the first case of human infection in Brazil. An Bras Dermatol. 2006; **81**:483-485.

Mendoza L. Assay method and kit for *Pythium insidiosum* antibodies United States Board of Trustees of Michigan State University (East Lansing, MI) 6689571. Haslett, MI. 2004. <http://www.freepatentsonline.com/6689571.html>

Mendoza L. Pythiosis. In: Hay RJ, Merz WG. Medical Mycology, Topley's & Wilson's Microbiology Infections. London: Arnold, 2005: 412-429.

LITERATURA CITADA

Mendoza L, Alfaro AA. Equine pythiosis in Costa Rica : Report of 39 cases. *Mycopathologia*. 1986; **94**:123-129.

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

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

Mendoza L, Kaufman L, Mandy W, Glass R. Serodiagnosis of human and animal pythiosis using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1997; **4**:715-718.

Mendoza L, Kaufman L, Standard PG. Immunodifusion test for diagnosing and monitoring pythiosis. *J Clin Microbiol*. 1986; **23**:813-816.

Mendoza L, Kaufman L, Standard PG. Antigenic relationship between the animal and human pathogen *Pythium insidiosum* and nonpathogenic *Pythium* species. *J Clin Microbiol*. 1987; **25**:2159-2162.

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.

Mendoza L, Nicholson V, Prescott JF. Immunoblot analysis of the humoral immune response to *Pythium insidiosum* in horses with pythiosis. *J Clin Microbiol*. 1992; **30**:2980-2983.

Mendoza L, Newton JC. Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum*. *Med Mycol*. 2005; **43**:477-486.

LITERATURA CITADA

Morton LD, Morton DG, Baker GJ, Gelberg HB. Chronic eosinophilic enteritis attributed to *Pythium* sp. in a horse. Vet Pathol. 1991; **28**:542-544.

Murray DR, Ladds PW, Johnson RH, Pott BW. Metastatic phycomycosis in a horse. J Am Vet Med Assoc. 1978; **172**:834-836.

Peel MC, Finlayson BL, McMahon TA. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. Hydrol Earth Syst Sci. 2007; **11**:1633-1644.

Pérez RC, Luis-León J, Vivas JL, Mendoza L. Epizootic cutaneous pythiosis in beef calves. Vet Microbiol. 2005; **109**:121-128.

Prasertwitayakij N, Louthrenoo W, Kasitanon N, Thamprasert K, Vanittanakom N. Human pythiosis, a rare cause of arteritis: case report and literature review. Semin Arthritis Rheum. 2003; **33**:204-214.

Purcell KL, Johnson PJ, Kreeger JM, Wilson DA. Jejunal obstruction caused by *Pythium insidiosum* granuloma in a mare. J Am Vet Med Assoc. 1994; **205**:337-339.

Rakich PM, Grooters AM, Tang K. Gastrointestinal pythiosis in two cats. J Vet Diagn Invest. 2005; **17**:262-269.

Reis Junior JL, Carvalho ECQ de, Nogueira RHG, Lemos LS, Mendoza L. Disseminated pythiosis in three horses. Vet Microbiol. 2003; **96**:289-295.

Rivierre C, Laprie C, Guiard-Marigny O, Bergeaud P, Berthelemy M, Guillot J. Pythiosis in Africa. Emerg Infect Dis. 2005; **11**:479-481.

LITERATURA CITADA

Santurio JM, Monteiro AB, Leal AT, Kommers GD, de Sousa R, Catto JB. Cutaneous Pythiosis insidiosus in calves from the Pantanal region of Brazil. *Mycopathologia*. 1998; **141**:123-125.

Schurko AM, Mendoza L, Lévesque CA, Désaulniers NL, De Cock AWAM, Klassen GR. A Molecular phylogeny of *Pythium insidiosum*. *Mycol Res*. 2003; **107**:537-544.

Schurko AM, Mendoza L, De Cock AWAM, Bedard JEJ, Klassen GR. Development of a species-specific probe for *Pythium insidiosum* and the diagnosis of pythiosis. *J Clin Microbiol*. 2004; **42**:2411-2418.

Smith MB, McGinnis MR. Diagnostic histopathology. In: *Infectious disease: Diagnosis and treatment of human mycoses*. New Jersey: Humana Press Inc, 2008:37-51.

Supabandhu J, Fisher MC, Mendoza L, Vanittanakom N. Isolation and identification of the human pathogen *Pythium insidiosum* from environmental samples collected in Thai agricultural areas. *Med Mycol*. 2008; **46**:41-52.

Tabosa IM, Riet-Correa F, Nobri VMT, Azevedo EO, Reis-Júnior JL, Medeiros RMT. Outbreaks of pythiosis in two flocks of sheep in northeastern Brazil. *Vet Pathol*. 2004; **41**:416-418.

Torto-Alalibo T, Mian T, Gajendran K, Waughn ME, van West P, Kamuon S. Expressed sequence tags from the oomycete fish pathogen *Saprolegnia parasitica* reveal putative virulence factors. *BMC Microbiol*. 2005; **5**:46.

Vanittanakom N, Supabandhu J, Khamwan C, Praparattanapan J, Thirach S, Prasertwitayakij N, Louthrenoo W, Chiewchanvit S, Tananuvat N. Identification of emerging human-pathogenic *Pythium insidiosum* by serological and molecular assay-based methods. *J Clin Microbiol*. 2004; **42**:3970-3974.

LITERATURA CITADA

Wellehan JFX, Farina LL, Keoughan CG, Lafortune M, Grooters AM, Mendoza L, Brown M, Terrell SP, Jacobson ER, Heard DJ. Pythiosis in a dromedary camel (*Camelus dromedaries*). J Zoo Wildlife Med. 2004; **35**:564-568.

10. ANEXO

10.1 SOLUCIONES DE USO GENERAL

Ácido cítrico 0.1M

8.40 g Ácido cítrico

400 ml Agua destilada

Ácido sulfúrico 2N

9.80 ml Ácido sulfúrico

85 ml Agua destilada

Aforar a 100 ml

Azul de bromofenol 0.2%

0.02 g Azul de bromofenol

10 ml Agua destilada

Citrato de Sodio 0.1M

11.76 g Citrato de sodio

400 ml Agua destilada

Amortiguador de fosfato salino (PBS)-T (También solución A para Western Blot)

200 ml Tween 20 10%

2000 ml PBS 0.01M pH 7.2

Leche descremada 5% (Solución bloqueadora)

1 g Leche descremada

20 ml PBS-T pH 7.2

La solución se prepara antes de utilizar.

PBS 0.01M pH 7.2 (También solución B para Western Blot)

17 g NaCl
2.14 g Na₂HPO₄
0.78 g NaH₂PO₄
2000 ml Agua destilada

Solución cromógeno/sustrato

4 mg Ortofenilenediamina
5 ml Ácido cítrico 0.1M
5 ml Citrato de Sodio 0.1M
4 µl Peróxido de hidrógeno 30%

Tween 20 al 10%

50 ml Tween 20
450 ml Agua destilada

10.2 SOLUCIONES PARA ELISASolución de carbonatos pH 9.6

1.59 g Na₂CO₃
2.93 g NaHCO₃
1000 ml Agua destilada

10.3 SOLUCIONES PARA GELES SDS-PAGEAcrilamida/Bis 30%

146 g Acrilamida
4 g N´N´-Bis-methylene-Acrilamida
500 ml Agua destilada
Filtrar y almacenar en oscuridad a 4°C no mas de 30 días

Amortiguador de corrida 5X pH 8.3

30 g Tris base
144 g Glicina
10 g SDS
2000 ml Agua destilada

Decolorante I

40 ml Metanol
40 ml Ácido acético glacial
320 ml Agua destilada

Decolorante II

80 ml Metanol
40 ml Ácido acético glacial
280 ml Agua destilada

Gel separador 12% (2 minigels)

2.5 ml 1.5 M Tris-HCl pH 8.8
100 µl Dodecil sulfato sódico (SDS) 10%
4 ml Acrilamida/Bis 30%
50 µl Persulfato de amonio (APS) 10% (fresco)
3.35 ml Agua destilada
5 µl N,N,N,N'-tetrametilnediamina (TEMED)

Gel concentrador 4% (2 minigels)

2.5 ml 1.5 M Tris-HCl pH 6.8
100 µl SDS 10%
1.3 ml Acrilamida/Bis 30%
50 µl APS 10 % (fresco)
3.3 ml Agua destilada
10 µl TEMED

Solución reguladora 2X

1.25 ml Tris-HCl 0.5 M pH 6.8

2 ml SDS 10%

0.5 ml 2-mercaptoetanol

1 ml Glicerol

0.25 ml Azul de bromofenol 0.2%

Estable por un mes cuando se mantiene en refrigeración.

Solución dodecil sulfato sódico (SDS) al 10%

10 g SDS

Aforar a 100 ml

Tinción Azul de Coomasie

0.1 g Coomasie Blue G-250

40 ml Metanol

10 ml Ácido acético glacial

50 ml Agua destilada

Filtrar antes de usar

Tris-HCl 0.5 M pH 6.8

6 g Tris base

3.5 ml HCl

60 ml Agua destilada

Aforar a 100 ml.

Tris-HCl 1.5M pH 8.8

54.5 g Tris base

5 ml HCl

150 ml Agua destilada

Aforar a 300 ml.

10.4 SOLUCIONES PARA WBAmortiguador de transferencia pH 8.3

9.075 g Tris base

3.2 g Glicina

600 ml Metanol

2400 ml Agua destilada

Tris 0.1M pH 9.2 (Solución C)

12.11 g Tris base

1000 ml Agua destilada

10.5 AGAR FENOLIZADO PARA IDD

Disolver:

50 ml agua destilada

0.9 g NaCl

0.4 g Citrato de Sodio

Adicionar y disolver:

0.25 ml Fenol

7.5 g Glicina

Adicionar y disolver:

0.1 g Agarosa

50 ml Agua destilada

Almacenar a 4°C

10.6 MEDIO DE INDUCCIÓN PARA ZOOSPOROGÉNESIS

Solución #1

500 ml Agua destilada

66.04 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 68.05 g KH_2PO_4 87.09 g K_2HPO_4

Solución #2

250 ml Agua destilada

18.38 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 25.42 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

0.5 ml Solución #1

0.1 ml Solución #2

Aforar a 1000 ml con agua destilada