

Pitioserinofacial em Ovino: Relato de caso

[PythiosisrhinofacialzygomycosisinSheep- Case report]

André Valerio Goloni^{1*}; Michel Abdalla Helayel²; Adriano Tony Ramos³; Sandro Estevan Moroni⁴; Francisco Baptista⁵; Isaura Maria Madeira Nunes⁶; Priscylla Leite de Araújo¹; Glaucia Denise Kommers⁷; Marcos Antonio Aguiar Júnior⁸.

RESUMO: O objetivo deste artigo é relatar um caso no estado do Tocantins de pitiose rinofacial, em um animal da espécie ovina (*Ovis aries*), com aumento de volume no lado esquerdo da região nasal que persistia por 30 dias. Foi procedida biopsia do tecido acometido parte foi processada rotineiramente para estudo histológico e imunohistoquímico, e parte realizada cultura específica. A identificação do agente foi feita através das características morfológicas culturais em meio específico, por visualização microscópica realizada através da técnica de microcultivo em lâminas e pela coloração com Azul de Lactofenol e o diagnóstico foi confirmado através dahistopatologia e imunohistoquímica. O tratamento consistiu de limpeza local com iodopovidonauma vez ao dia; fluconazol 300mg, uma vez ao dia, durante sete dias por via oral, associado a 1g de iodeto de potássio, uma vez ao dia durante sete dias por via intravenosa. O animal não respondeu satisfatoriamente à terapia e morreu nove dias após o início do tratamento, sendo realizada a necropsia logo após.

Palavras-chaves: Ruminantes, *Pythium insidiosum*, diagnóstico, piogranuloma.

ABSTRACT: The objective of this paper is to report the first case in the state of Tocantins

Pythiosisrhinofacialzygomycosis in an animal of the ovine(*Ovis aries*), with increasing volume on the left side of the nasal region which persisted for 30 days. Biopsy was performed routinely affected tissue processed for histological and immunohistochemical study, with another part of the fragment held specific culture. The Identification was made through the morphological cultural specific medium for microscopic visualization performed using the technique microcultive on slides and staining with Blue Lactophenol and the diagnosis was confirmed by histopathology and immunohistochemistry. The treatment consisted of cleaning site with povidoneiodineonce daily, 300mg fluconazole once daily for seven days by oral associated with1gof potassium iodide, once a day for seven days intravenously.The animal did not respond satisfactorily to the therapy and died nine days after initiation of treatment. The autopsy performed soon after the death of the animal and did not reveal noteworthy.

Keywords:Ruminants, *Pythium insidiosum*, diagnosis, piogranuloma.

¹Graduando em Medicina Veterinária, Universidade Federal do Tocantins. Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia (EMVZ) – Medicina Veterinária da Universidade Federal do Tocantins (UFT). Br 153, Km 112, cx postal 132. Araguaína – TO. CEP 77804970.

*Autor para correspondência: andregoloni@hotmail.com

¹Clínica Médica de Ruminantes, EMVZ – UFT

¹Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus curitubano

¹Laboratório de Bioquímica e Morfologia, EMVZ - UFT

¹Laboratório de Higiene e Saúde Pública, EMVZ - UFT

¹Programa de Pós Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos – EMVZ - UFT

¹Laboratorio de Patologia Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria.

¹Médico Veterinário Autônomo, Araguaína - TO

INTRODUÇÃO

Pitiose, enfermidade piogranulomatosa crônica do tecido subcutâneo, eventualmente sistêmica, que atinge várias espécies animais, inclusive o homem (Meireles et al., 1993; Mendoza et al., 1996). Seu agente etiológico pertence ao Reino Straminipila, Classe Oomycetes, Ordem Pythiales, Família Pythiaceae, Gênero *Pythium* (Monteiro, 1999) que possui mais de 120 espécies, dos quais apenas *P. insidiosum* é conhecido por causar doenças tanto em mamíferos quanto em plantas (Alexopoulos et al., 1996).

Doença de ocorrência quase que exclusiva de regiões de clima subtropical e tropical, tem sido descrita nas Américas, alguns países europeus e sudeste asiático (Chaffin et al., 1995; Foil, 1996; Mendoza et al., 1996; Radostits, 2002).

Para a produção de zoósporos são necessárias temperaturas entre 30 e 40°C e o acúmulo de água como banhadors e lagoas (Miller & Campbell, 1982). Onde ocorre a liberação de zoósporos móveis biflagelados (Chaffin et al., 1995), que são atraídos para os pêlos por mecanismo quimiotático e penetram na pele dos animais através de lesões pré-existentes, iniciando a infecção cutânea (Mendoza et al., 1996), ou ainda, pelo folículo piloso sem a necessidade de lesões na pele (Santurio et al., 1998).

Em ovinos as lesões localizam-se principalmente na região inferior dos membros e abdômen, do mesmo modo que nos equinos, porém são mais secas e sem a formação de kunkers (massas necróticas de material amarelado e endurecido) (Tabosa et al., 1999). Os ovinos e bovinos não apresentam prurido, e os linfonodos regionais em ovinos podem estar lesionados apresentando-se com marcado aumento de volume e ulcerados (Tabosa et al., 2004).

O diagnóstico presuntivo da doença pode ser feito com base na epidemiologia, sinais clínicos e aspectos macro e microscópicos das lesões. Já o diagnóstico definitivo deve ser feito através do isolamento e caracterização do *P.*

insidiosum ou ainda por imunohistoquímica (IHQ) (Riet-Correa et al., 2007).

Deve-se considerar no diagnóstico diferencial fungos da Ordem Entomophthorales (*Basidiobolus*, *Haptosporus* e *Conidiobolus*), da Ordem Mucorales e ainda, com enfermidades como, habronemose, linfangite epizoótica, prototecose, rinosporidiose, criptosporidiose, rinite atópica e neoplasias (fibroma, carcinoma epidermóide, mixoma, adenoma e adenocarcinoma) (Riet-correa et al., 2007; Portela et al., 2010).

RELATO DE CASO

O objetivo deste trabalho é relatar um caso de pitiose em ovino no estado do Tocantins.

No dia 03.05.2012 foi dada entrada no Hospital Veterinário Universitário (HVU) da Universidade Federal do Tocantins (UFT) um animal da espécie ovina (*Ovis aries*), fêmea, da raça Santa Inês, de quatro anos de idade, oriunda de uma propriedade rural localizada no município de Babaçulândia, TO.

O histórico clínico, informações sobre o manejo nutricional e sanitário, morbidade e mortalidade foram obtidos com o proprietário. O animal apresentava quadro de magreza acentuada, seu principal sinal clínico era o aumento de volume no lado esquerdo da região nasal (Figura 1) que persistia por mais de 30 dias, com presença de secreção serosanguinolenta e formação de ulcera com tecido esponjoso no palato, o mesmo relatado por (Santurio et al., 2008; Carrera et al., 2013), onde relataram também a presença de fístula no palato duro e septo nasal. O rebanho era formado por 112 ovinos, todos da raça Santa Inês, criados em sistema semi-intensivo (abrigados à noite) em pastos formados por *Brachiaria brizantha* e recebiam suplementação mineral específica para. As fontes de água naturais eram invadidas por plantas nativas (muitas em decomposição). O proprietário relatou que nos últimos dois anos outros três ovinos, em condições nutricionais normais, todos acima de

um ano de idade, morreram apresentando os mesmos sinais clínicos e evolução.

O histórico do caso é semelhante aos descritos por (Portela *et al.*, 2010), referentes a casos de conidiobolomicose rinofacial. Carrera *et al.* (2013), relatou os mesmos sinais clínicos em ovinos infectados com *P. Insidiosum*, entretanto, constatou a presença de fístula no palato duro, ligando o vestíbulo nasal à cavidade oral, bem como se percebeu odor desagradável. Ubiali *et al.* (2013), observou em seu estudo com ovinos, que dos 15 animais infectados por *P. insidiosum*, 14 animais apresentaram lesão da cavidade nasal com exsudado fétido, com oclusão nasal parcial em alguns animais.

O caso ocorreu no período das águas, e na propriedade os animais tinham acesso a água parada com presença de material vegetal em decomposição, assim como a maioria dos relatos de pitiose (Tabosa *et al.*, 2004; Riet-Correa *et al.*, 2007; Santurio *et al.*, 2008; Carrera *et al.*, 2013).

Apesar de haver equinos na propriedade a única espécie acometida foi a ovina, contrapondo o descrito por (Tabosa *et al.*, 2004, Mendonza & Newton, 2005; Grecco *et al.*, 2009) onde citam que, apesar de a doença poder acometer diversas espécies de animais tais como bovinos, ovinos, caprinos, cães, gatos e, inclusive, o homem; a espécie animal mais atingida é a equina. Todos os animais acometidos tinham acima de um ano de idade, contudo (Radostits *et al.*, 2002) citam que a enfermidade não apresenta predisposição por raça, sexo ou idade.

O animal foi submetido a exame clínico completo segundo (Dirksen *et al.*, 1993), além das lesões acima descritas as únicas alterações observadas foram mucosas hipocoradas, linfonodos parotídeo e pré-escapular esquerdo aumentados de volume, febre (40,4°C) e cabeça baixa.

Foram coletadas amostras de sangue por punção da veia jugular com agulha descartável hipodérmica (40X12), onde 5ml foram alocados em tubo a vácuo com anticoagulante EDTA (10%) para realização de hemograma, e 8ml alocados em tubo sem anticoagulante, para

realização de análise bioquímica dos níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gamaglutamiltransferase (GGT), uréia e creatinina, proteínas plasmáticas totais (PPT), albumina e globulina. O material acondicionado sob refrigeração foi imediatamente remetido ao Laboratório de Morfologia e Bioquímica da UFT. O Hemograma foi analisado seguindo as recomendações de (Jain, 1993) e as análises bioquímicas conforme (Kaneko *et al.*, 1997).



Figura 1. Aumento de volume no lado esquerdo da região nasal, em ovino (*Ovis Aires*), diagnosticado com Pitiose rinofacial.

Todos os resultados da bioquímica sérica apresentaram-se dentro dos níveis de normalidade para a espécie (Kaneko *et al.*, 1997).

Em doenças debilitantes crônicas e processos inflamatórios de etiologia fúngica a anemia e a leucocitose são achados frequentes (Santos *et al.*, 2011). O hemograma revelou neutrófilos desnaturados, linfócitos ativados e anemia microcítica hipocrômica, diferente do citado por (Amaral *et al.*, 2013), onde em equinos encontrou anemia normocítica normocrômica.

Foi procedida biópsia do tecido acometido, parte da amostra foi enviada ao Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) da UFT, onde foi fixada em solução de formalina a 10%, processada rotineiramente para estudo histológico e corados pela hematoxilina-eosina (HE), que revelaram proliferação de tecido fibrovascular, com infiltrado eosinofílico acentuado e discretos focos de fibrina, com presença de imagens negativas de hifas (Figura 2).

Pitioserinofacial em Ovino: Relato de caso

As alterações histopatológicas eram sugestivas de lesão de origem fúngica, muito semelhante as descritas por (Santurio et al., 2008). No entanto a diferenciação entre *Conidiobolus* sp. e *P. Insidiosum* baseado apenas na histopatologia é difícil, sendo necessária a realização do exame definitivo como a caracterização morfológica cultural e IHQ (Santurio et al., 2008).

O tratamento consistiu em limpeza local com iodopovidona¹, uma vez ao dia; fluconazol 300mg², uma vez ao dia, durante sete dias por via oral, associado a 1g de iodeto de potássio³, uma vez ao dia, durante sete dias por via intravenosa, devido à suspeita de infecção por *Conideobolus* sp.

Durante o tratamento foram realizados exames clínicos periódicos. O animal não respondeu satisfatoriamente à terapia e morreu nove dias após o início do tratamento, provavelmente por se tratar de uma infecção por *P. Insidiosum*, o qual, o tratamento utilizado não surtiu efeito devido à esse agente não se tratar de um fungo e sim um oomiceto, portanto não possui quitina em sua parede celular e não responde aos antifúngicos tradicionais. Carrera et al. (2013), optou em seu experimento com 6 fêmeas ovinas imunoterápico de utilização equina com 5 aplicações com intervalo de 14 dias, onde apenas em um animal mostrou-se eficaz.

No início, suspeitou-se que se tratava de Conidiobolomiose rinofacial, pela similaridade entre as duas doenças em relação ao histórico e sinais clínicos (Riet-Correa et al., 2007). E ainda pelos animais infectados por *Conidiobolus* sp. não responderem favoravelmente ao tratamento, ao contrario dos infectados por *Pythium insidiosum*, que em alguns casos respondem bem ao tratamento (Portela et al., 2010).

Casos fatais semelhante a este, foram descritos por (Santurio et al., 2008), em quatro ovinos da raça Santa Inês. Os animais apresentavam aumento de volume nasal, com deformidade marcante, ulceração e perda de tecido no palato duro causando uma fístula oro-

nasal. O curso clínico da doença variou de 28 a 50 dias.

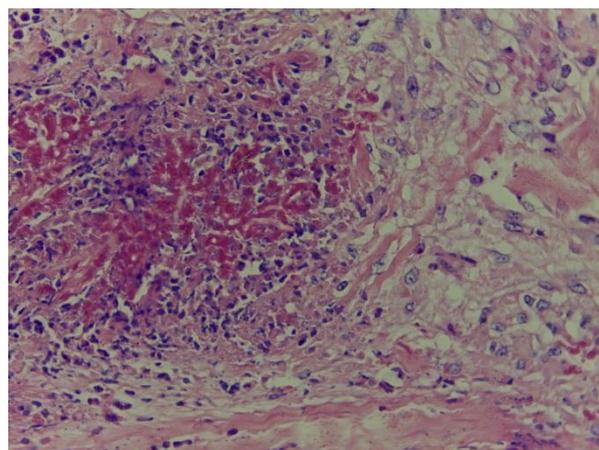


Figura 2. Proliferação de tecido fibrovascular, com infiltrado eosinofílico acentuado e discretos focos de fibrina, com presença de imagens negativas de hifas, HE, Obj. 40x, em ovino (*Ovis Aires*), diagnosticado com Pitiose rinofacial.

A necropsia foi realizada logo após a morte do animal, sendo observada ulcera com perda de tecido no local do aumento de volume nasal, que se estendia até o palato. Foram coletados fragmentos dos linfonodos pré-escapular e parotídeo esquerdos, pulmão, fígado, rim, coração, encéfalo e trato gastrointestinal, sendo em seguida fixados em solução formalina a 10% e enviados ao Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) da UFT, processados rotineiramente para estudo histológico e corados pela hematoxilina-eosina (HE).

Os linfonodos apresentavam grande quantidade de macrófagos e eosinófilos, com focos de necrose que alteraram a arquitetura tecidual. Na pele ao redor das lesões havia proliferação de tecido fibrovascular, com infiltrado eosinofílico acentuado e discretos focos de fibrina, com presença de imagens negativas de hifas. Nos demais órgãos não foram observadas alterações dignas de nota.

Essas alterações são sugestivas de lesão de origem fúngica, e já foram descritas em estudos anteriores (Santurio et al., 2008).

Os blocos com lesões foram enviados ao Laboratório de Patologia Veterinária da UFSM submetidos à técnica de IHQ com anticorpo anti-*Pythium*. Observou-se forte imunomarcagem de

¹Geyer Medicamentos S.A., Porto Alegre, Brasil

²Pfizer Ltda, Guarulhos, Brasil

³Prado S.A., Curitiba, Brasil

numerosas hifas de *Pythium insidiosum* (Figura 3).

A IHQ para *P. insidiosum* tem sido amplamente utilizada em diferentes espécies animais (Howerth *et al.*, 1989; Fischer *et al.*, 1994; Tabosa *et al.*, 2004; Santurio *et al.*, 2006). Em casos testados em outro estudo, não houve reação cruzada na IHQ com fungos dos gêneros *Conidiobolus* e *Basidiobolus* (Brown *et al.*, 1988).

Mesmo com a cultura do agente a técnica de IHQ foi fundamental para o diagnóstico. Esta técnica têm sido utilizada para diferenciar pitiose de lesões causadas por exemplo pelos zigomicetos dos gêneros *Conidiobolus* e *Basidiobolus*, que morfologicamente podem ser confundidos com os casos de pitiose (Ginn *et al.*, 2007).

Em seu estudo com pitiose cutânea em ovinos, (Tabosa *et al.*, 2004), utilizou fragmentos de lesões cutâneas com cerca de 1 milímetro cúbico implantado em Sabouraud agar de dextrose, incubado a 37°C durante 48 horas. Em seguida foram visualizados crescimento micelial e após clarificação com hidróxido de potássio a 10%, foram visualizadas hifas ramificadas em ângulos retos e raramente septadas, semelhante a *P. insidiosum*.

Segundo (Ubiali *et al.*, 2013), em seu experimento, o diagnóstico dos 40 ovinos avaliados, 15 apresentaram diagnóstico positivo para *P. insidiosum* pela imunohistoquímica e 11 positivos no exame PCR, onde utilizou fragmentos frescos de lesões nasais colocados em solução salina contendo antibiótico (ampicilina 100mg/ml), sendo posteriormente macerados e semeados em ágar Sabouraud dextrose 2%, tratadas com cloranfenicol (0,05mg/ml) e incubadas a 30°C por 7 dias, onde foi observado o crescimento de micélios submetidos posteriormente a PCR.

A pitiose deve ser considerada como diagnóstico diferencial em casos de doença nasal crônica em ovinos, mesmo quando os animais não respondem satisfatoriamente ao tratamento.

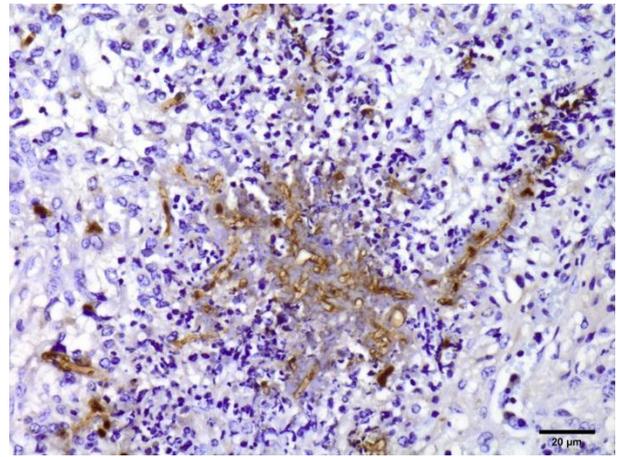


Figura 3. Forte imunomarcção de numerosas hifas de *Pythiuminsidiosum*, IHQ com anti-corpo anti-Pithium, Obj. 40x, em ovino (*Ovis Aires*), diagnosticado com Pitiose rinofacial.

Referências

- Alexopoulos C.J., Mims C.W. & Blackwell M. 1996. Phylum Oomycota. p.683-737 In: Introductory Mycology. New York: John Wiley and Sons. 4 ed.
- Amaral L.A., Meirelles M., Curcio B., Martins C.F., Nogueira C.E.W. 2013. Relato de pitiose equina com envolvimento visceral. A Hora Veterinária. Ano 32. n°192.
- Brown C.C., McClure J.J., Triche P. & Crowder C. 1988. Use of immunohistochemical methods for diagnosis of equine pythiosis. Am. J. Vet. Res. 49(11):1866-1868.
- Carrera M.V., Peixoto R.M., Gouveia G.V., Pessoa C.R.M., Jesus F.P.K., Santurio J.M., Botton S.A., Costa M.M. Pitiose em ovinos nos estados de Pernambuco e Bahia. Pesq. Vet. Bras. 2013; 33(4):476-482.
- Chaffin M.K., Schumacher J. & McMullan W.C. 1995. Cutaneous pythiosis in the horse. Vet. Clin. North Am: Equine Practice, Estados Unidos, 11(1):91-103.
- Dirksen G., Gründerh H.D. & Stöber M. 1993. Rosenberger: Exame Clínico dos Bovinos. 3ª ed. Editora Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro. 419 p.
- Fischer J.R., Pace L.W., Turk J.R., Kreeger J.M., Miller M.A. & Gossner H.S. 1994. Gastrointestinal pythiosis in Missouri dogs: Eleven cases. J. Vet. Diagn. Invest. 6(3):380-382.

Pitioserinofacial em Ovino: Relato de caso

- Foil C.S. 1996. Update on pythiosis (Oomycosis). Proc. North American Veterinary Conference, Orlando, EUA, p.57-63.
- Ginn P.E., Mansell J.E.K.L. & Rakich P.M. 2007. Skin and appendages, p.553-781. In: Maxie M.G. (Ed.), Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Vol.1. 5th ed. Saunders Elsevier, Philadelphia.
- Grecco F.B., Schild A.L., Quevedo P., Assis-Brasil N.D., Kommers G.D., Marcolongo-Pereira C. & Soares M.P. 2009. Pitiose cutânea em bovinos na região Sul do Rio Grande do Sul. Pesq. Vet. Bras. 29(11):938-942.
- Howerth E.W., Brown C.C. & Crowder C. 1989. Subcutaneous pythiosis in a dog. J. Vet. Diag. Invest. 1(1):81-83.
- Jain N.C. 1993. Essentials of Veterinary Hematology. Philadelphia: Lea & Febinger. 417 p.
- Kaneko, J. J., Harvey, J. W., Bruss, M. L. Clinical biochemistry of domestic animals. 5^o ed. San Diego: Academic Press, 1997. 932 p.
- Meireles M.C.A., Riet-correa F., Fischman O., et al. 1993. Cutaneous pythiosis in horses from Brazil. Mycoses. 36:139-142.
- Mendoza L., Ajello L., McGinnis, M.R. 1996. Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. J. Med. Mycol. 6(4):151-164.
- Mendoza L. & Newton J.C. 2005. Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum*. Med. Mycol. 43:477-486.
- Miller R.I. & Campbell R.S.F. 1982. Clinical observations on equine phycomycosis. 1982. Aust. Vet. J. 58:221-226.
- Monteiro A.B. 1999. Imunoterapia da pitiose eqüina: teste de eficácia de um imunobiológico e avaliação leucocitária em animais infectados naturalmente pelo *Pythium insidiosum*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 52 p.
- Portela R.A., Riet-Correa F., Garino Jr F., Garino Jr F., Dantas A.F.M., Simões S.V.D. & Silva S.M.S. 2010. Doenças da cavidade nasal em ruminantes no Brasil. Pesq. Vet. Bras. 30(10):844-854.
- Radostits O.M., Gay C.C., Blood D.C. & Hinchcliff K.W. 2002. Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos. 9^a ed. Editora Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 1737p.
- Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. (ed.) Doenças de Ruminantes e Equídeos. 3^a ed. Vol. 1. Editora Pallotti, Santa Maria, 2007.
- Santos C.E.P., Juliano R.S., Santurio J.M. & Marques L.C. 2011. Eficácia da imunoterapia no tratamento de pitiose facial em equino. Acta Scientiae Veterinariae. 39(1): 955.
- Santurio J.M., Alves S.H., Pereira D.B. & Argenta J.S. 2006. Pitiose: uma micose emergente. Acta Scientiae Veterinariae 34(1):1-14.
- Santurio J.M., Argenta J.S., Schwendler S.E., Cavalheiro A.S., Pereira D.I.B., Zanete R.A., Alves S.H., Dutra V., Silva M.C., Arruda L.P., Nakazato L. & Colodel E.M. 2008. Granulomatous rhinitis associated with *Pythium insidiosum* infection in sheep. Vet. Rec. 163(1):276-77.
- Santurio J.M., Monteiro A.B., Leal A.T., Kommers G.D., Sousa R.S. & Catto J.B. 1998. Cutaneous pythiosis insidiosum in calves from the pantanal region of Brazil. Mycopathologia 141:123-125.
- Tabosa I.M., Medeiros V.T., Dantas A.F.M., Azevedo E.O. & Maia J.C. 1999. Pitiose cutânea em eqüídeos no semiárido da Paraíba. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 51:27-30.
- Tabosa I.M., Riet-Correa F., Nobre V.M., Azevedo E.O., Reis-Júnior J.L. & Medeiros R.M. 2004. Outbreaks of pythiosis in two flocks of sheep in northeastern Brazil. Vet. Pathol. 41:412-415.
- Ubiali D.G., Cruz R.A.S., De Paula D.A.J., Silva M.C., Mendonça F.S., Dutra V., Nakazato L., Colodel E. M., Pescador C.A. Pathology of Nasal Infection caused by *Conidiobolus lamprauges* and *Pythium insidiosum* in Sheep. J. Comp. Path. 2013, Vol. 149, 137 - 145.