

## Mastite por *Pythium insidiosum* em éguas

Mastitis by *Pythium insidiosum* in Mares

Erick Platini Ferreira de Souto<sup>1</sup>, Lisanka Ângelo Maia<sup>1</sup>, Daniel Medeiros Assis<sup>2</sup>,  
Eldinê Gomes de Miranda Neto<sup>2</sup>, Glaucia Denise Kommers<sup>3</sup>, Glauco José Nogueira de Galiza<sup>1</sup>,  
Franklin Riet-Correa<sup>4</sup> & Antônio Flávio Medeiros Dantas<sup>1</sup>

### ABSTRACT

**Background:** Pythiosis is a chronic inflammatory disease caused by the oomycete *Pythium insidiosum*. This disease has been reported in several species, but most cases occur in horses. In this species, the cutaneous form is more prevalent, with occasional involvement of adjacent lymph nodes and bone tissue. The involvement of the mammary glands was not properly characterized. Therefore, the aim of this study is to describe cases of pythiosis with the involvement of the mammary glands in mares.

**Case:** A retrospective study of all biopsy samples and necropsy examinations of horses, performed at the Animal Pathology Laboratory of the Federal University of Campina Grande from January 2000 to December 2018, was carried out. During the study period, 142 cases of cutaneous pythiosis were identified. Of these, in three the lesions extended to the mammary glands. Mares with 3-, 7- and 12-year-old, mongrel, from the backlands of the Paraíba were affected. On physical examination, the mares presented swollen mammary glands and multifocal wounds, which discharge serosanguinolent secretion. Clinical evolution ranged from 15 to 30 days. The animals had been medicated, but the wounds did not heal and mastectomies were performed. Macroscopically, the mammary glands were enlarged and with multifocal areas of ulceration measuring 1 to 3.5 cm in diameter. At the cut surface, they exhibited fistulous tracts containing *kunkers*. In the histopathological evaluation, was observed diffuse and marked inflammatory infiltrate of eosinophils extending through the deep dermis and interlobular mammary stroma; and multifocal areas, sometimes focally extensive, of eosinophilic necrosis with intralesional negative images of hyphae. In histological sections stained by periodic acid-Schiff, the walls of the hyphae were weakly stained in blue; but when impregnated by Grocott methenamine silver, they were strongly marked in black and were characterized by semi-parallel walls, rare septations and branching, and a diameter varying from 3-8 µm. At immunohistochemistry, the hyphae showed strong cytoplasmic and wall immunostaining for the anti-*P. insidiosum* antibody.

**Discussion:** The diagnosis of mastitis by *Pythium insidiosum* was established based on the epidemiological, clinical, anatomopathological and immunohistochemical findings. Lesions in horses are more frequently located at the extremities of the limbs and the ventral portion of the thoracoabdominal wall. In these cases, it is likely that the lesions have started on the skin adjacent to the udder and have extended to the mammary parenchyma. The intralesional structures known as *kunkers* have been described in horses, mules, donkeys, and camels, being absent in the other animal species affected. The *kunkers* are always present in equine pythiosis and allow the establishment of an accurate presumptive diagnosis. Clinically important findings include wounds that discharge serosanguineous secretions and do not heal through conventional treatments. Histological lesions characterized by areas of eosinophilic necrosis with intralesional hyphae, which are weakly stained by PAS and strongly impregnated by GMS, are highly suggestive of pythiosis. Pythiosis is relatively frequent in horses in the backlands of Paraíba, predominantly in the cutaneous form. The involvement of the mammary glands is an uncommon presentation that should be included as a differential diagnosis of mastitis in mares.

**Keywords:** equine disease, mammary gland, *kunkers*, oomycete.

**Descritores:** doença de equinos, glândula mamária, *kunkers*, oomiceto.

DOI: 10.22456/1679-9216.91877

Received: 22 January 2019

Accepted: 27 April 2019

Published: 19 May 2019

<sup>1</sup>Laboratório de Patologia Animal & <sup>2</sup>Clínica Médica de Grandes Animais, Hospital Veterinário Universitário, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR), Patos, PB, Brazil. <sup>3</sup>Dep. de Patologia Veterinária, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil. <sup>4</sup>National Institute of Agricultural Research, La Estanzuela, Colonia, Uruguay. CORRESPONDENCE: E.P.F. Souto [erickplatini@gmail.com - Tel.: +55 (83) 999302020]. Laboratório de Patologia Animal, Hospital Veterinário Universitário - UFCG. Av. Universitária S/N. Bairro Santa Cecília. CEP 58708-110 Patos, PB, Brazil.

## INTRODUÇÃO

Pitiose é uma doença inflamatória crônica causada pelo oomiceto *Pythium insidiosum*. Esse microrganismo é um reconhecido patógeno de plantas que em condições ambientais favoráveis desenvolve os zoósporos biflagelados móveis, forma infectante capaz de causar doença em mamíferos e aves [4]. Considera-se que para a manutenção do ciclo biológico do agente são necessários um meio aquático, com abundância de vegetação e temperaturas superiores a 30°C [4,12].

A doença foi reportada na maioria dos continentes, mas com maior frequência em regiões de clima tropical, subtropical e temperado. A espécie equina é a mais frequentemente acometida. Nessa espécie, a principal forma de apresentação é a cutânea/subcutânea [10], com ocasional envolvimento dos linfonodos [2] e do tecido ósseo [3] adjacentes. A doença foi descrita ainda, nessa espécie, sob as formas pulmonar [5], intestinal [1] e nasal [14]. O comprometimento das glândulas mamárias não foi devidamente caracterizado. Portanto, o objetivo desse trabalho é descrever casos de pitiose com envolvimento das glândulas mamárias em éguas.

## CASOS

Foram revisadas as fichas de biopsias e necropsias de equinos realizadas no Laboratório de Patologia Animal da Universidade Federal de Campina Grande, no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2018, em busca dos casos diagnosticados como pitiose. Dos protocolos clínicos e de necropsias foram obtidas informações referentes aos dados epidemiológicos (sexo, raça, idade e procedência), sinais clínicos e achados anatomopatológicos.

Durante o período de estudo foram diagnosticados 142 casos de pitiose cutânea em equinos. Desses, em 3 (2%) as lesões estendiam-se às glândulas mamárias. Foram acometidas éguas com 3, 7 e 12 anos de idade, mestiças e provenientes de zonas rurais dos municípios de Patos, Sumé e Quixaba, pertencentes à mesorregião do Sertão da Paraíba. Os casos ocorreram durante os meses de maio, julho e agosto, período que compreende o final da estação chuvosa na região. Todas as éguas tinham acesso irrestrito a açudes.

No exame físico, as éguas apresentavam as glândulas mamárias bilateralmente edemaciadas e com ferimentos na pele suprajacente, que em dois casos drenavam secreção serosanguinolenta. A evolução clínica variou de 15 a 30 dias. Os animais haviam

sido tratados com anti-inflamatório não esteroide e as úlceras higienizadas e tratadas com antisséptico tópico, mas os ferimentos não cicatrizavam. Os animais foram submetidos à cirurgia e o produto da mastectomia radical encaminhado para exame anatomopatológico no Laboratório de Patologia Animal da UFCG.

Macroscopicamente, as glândulas mamárias apresentavam-se acentuadamente aumentadas e com áreas multifocais e aleatórias de ulceração medindo de 1 a 3,5 cm de diâmetro (Figura 1A). Ao corte, exibiam cavitações irregulares e tratos fistulosos contendo material amarelado, granular e firme (*kunkers*) [Figura 1B], que se desprendia facilmente a manipulação. Em uma égua, verificou-se secreção láctea com contaminação por exsudato serosanguinolento.

Fragmentos dos tecidos foram coletados, fixados em formol a 10% tamponado, processados rotineiramente para histoquímica, incluídos em parafina, seccionados em cortes de 3 µm e corados por hematoxilina e eosina (HE). Secções histológicas foram ainda submetidas às colorações histoquímicas especiais de ácido periódico de Schiff (PAS) e metenamina nitrato de prata de Grocott (GMS).

Para identificação do agente foi utilizada a técnica imuno-histoquímica (IHQ). Para isso, utilizou-se o anticorpo primário policlonal anti-*Pythium insidiosum* (não comercial) na diluição de 1:800 ligado ao complexo estreptavidina-peroxidase<sup>1</sup> e revelado com o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB)<sup>1</sup>. Como controle positivo, foram utilizadas secções histológicas de um caso confirmado de pitiose em equino, e como controle negativo, as mesmas secções foram utilizadas, com substituição do anticorpo primário por solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo 0,5% de Tween 20 (PBST).

Na avaliação histopatológica, observou-se difuso e acentuado infiltrado inflamatório de eosinófilos estendendo-se através da derme profunda e estroma interlobular mamário (Figura 1C); e áreas multifocais, por vezes focalmente extensas, de necrose de eosinófilos, circundadas por infiltrado inflamatório de macrófagos e ocasionais linfócitos, plasmócitos e neutrófilos. Em meio às áreas de necrose, observaram-se numerosas estruturas tubuliformes que não se coram por HE (imagens negativas de hifas) [Figura 1D].

Em secções histológicas coradas por PAS, as paredes das hifas demonstravam-se fracamente coradas em azul; mas quando impregnadas por GMS, eram

fortemente marcadas em preto e caracterizavam-se por apresentar paredes semiparalelas, raras septações e ramificações, e diâmetro variando de 3-8  $\mu\text{m}$  (Figura 1E). Na IHQ as hifas apresentaram forte imunomarcação do citoplasma e das paredes para o anticorpo anti- *P. insidiosum* (Figura 1F).

## DISCUSSÃO

O diagnóstico de mastite por *Pythium insidiosum* foi estabelecido com base nos achados epidemiológicos, clínicos, anatomopatológicos e imuno-histoquímicos. As lesões da pitiose cutânea dos equinos localizam-se mais frequentemente nas extremidades dos membros e porção ventral da parede tóraco-abdominal [12]. A maior frequência de lesões nessas regiões é atribuída ao contato direto com a água [4,12].

Na região Nordeste do Brasil, casos de pitiose cutânea em equinos têm sido frequentemente

diagnosticados, possivelmente devido às condições epidemiológicas favoráveis ao desenvolvimento do ciclo biológico do agente. Nessa região, preserva-se o hábito de manter reservas de águas, sob a forma de açudes e barragens, aos quais os animais têm acesso, e verificam-se altas temperaturas durante a maior parte do ano [15]. Assim sendo, casos clínicos podem ocorrer o ano inteiro, mas são mais frequentes durante os períodos de maior precipitação pluviométrica ou logo após esses períodos [11,15].

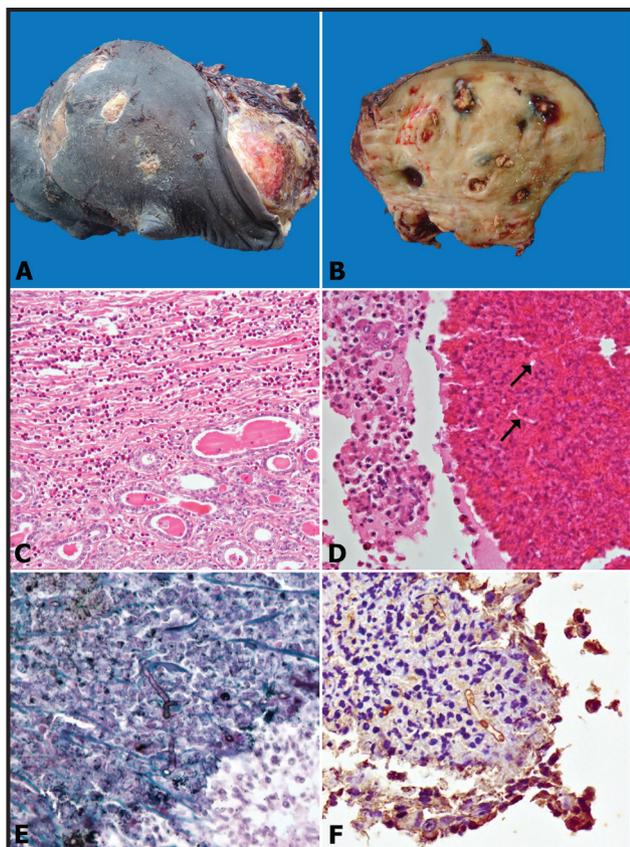
Nesses casos, é provável que as lesões tenham se iniciado na pele adjacente ao úbere e tenham se estendido ao parênquima mamário, sendo a mastite uma consequência relativamente incomum da pitiose cutânea nos equinos.

Casos de mastite em éguas são considerados incomuns, quando comparados à incidência em ruminantes domésticos, e existem poucos trabalhos na literatura científica descrevendo-os [7,9]. A semelhança dos ruminantes, a etiologia da mastite equina é predominantemente bacteriana e geralmente está relacionada a traumas e lacerações nos tetos, com posterior disseminação da infecção para o parênquima glandular [9]. As bactérias *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., e, menos frequentemente, *Corynebacterium* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp. e *Klebsiella* spp. são os principais agentes isolados [13]. Infecções por outros microrganismos são raras, a exemplo de um caso singular de mastite por *Coccidioides immitis* [17].

As estruturas intralesionais denominadas de *kunkers* têm sido descritas em equinos [12], muars [15], asininos [8] e camelos [16], estando ausentes nas demais espécies animais acometidas [4,12]. Os *kunkers* estão sempre presentes na pitiose equina e permitem o estabelecimento de um acurado diagnóstico presuntivo [4]. Achados clinicamente importantes incluem feridas que drenam secreção serosanguinolenta e não cicatrizam mediante tratamentos convencionais.

Na microscopia, áreas de necrose de eosinófilos com hifas intralesionais, que se coram fracamente por PAS e se impregnam fortemente por GMS são altamente sugestivos de pitiose [6]. A excisão cirúrgica do tecido acometido foi uma medida resolutive em todos os casos. O diagnóstico diferencial deve incluir as mastites bacterianas, habronemose cutânea, carcinoma de células escamosas e mifases.

A pitiose ocorre com relativa frequência em equinos no Sertão da Paraíba, predominantemente sob



**Figura 1.** Mastite por *Pythium insidiosum* em éguas. A- Glândula mamária. Acentuado aumento de volume e áreas multifocais de ulceração. B- Glândula mamária, superfície de corte. Observam-se cavitações irregulares contendo *kunkers* intralesionais. C- Infiltrado inflamatório eosinofílico estendendo-se através do estroma interlobular mamário [HE; Obj.10x]. D- Necrose de eosinófilos com imagens negativas de hifas intralesionais (setas) [HE; Obj.20x]. E- Hifas impregnadas em preto [GMS; Obj.20x]. F- Hifa fortemente imunomarcada em marrom para *P. insidiosum*. [IHQ - complexo estreptavidina-peroxidase; Obj.40x].

a forma cutânea/subcutânea. O comprometimento das glândulas mamárias é uma apresentação incomum, mas que deve ser incluída como diagnóstico diferencial de mastite em éguas.

MANUFACTURER

<sup>1</sup>Dako Denmark A/S. Glostrup, Denmark.

**Acknowledgments.** The authors are grateful to the Capes and to the productivity scholarship of the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), process number 309460/2017-4.

**Declaration of interest.** The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

## REFERENCES

- 1 **Bezerra Júnior P.S., Pedroso P.M.O., Pavarini S.P., Dalto A.G.C., Santurio J.M. & Driemeier D. 2010.** Equine intestinal pythiosis in Southern Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 62(2): 481-483.
- 2 **Chaffin M.K., Schumacher J. & McMullan W.C. 1995.** Cutaneous pythiosis in the horse. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 11(1): 91-103.
- 3 **Eaton S.A. 1993.** Osseous involvement by *Pythium insidiosum*. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*. 15(1): 485-490.
- 4 **Gaastera W., Lipman L.J.A., De Cock A.W.A.M., Exel T.K., Pegge R.B.G., Scheurwater J., Vilela R. & Mendoza L. 2010.** *Pythium insidiosum*: An overview. *Veterinary Microbiology*. 146(1): 1-16.
- 5 **Goad M.E.P. 1984.** Pulmonary pythiosis in a horse. *Veterinary Pathology*. 21(1): 259-261.
- 6 **Grooters A.M. 2003.** Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 33(1): 695-720.
- 7 **Knottenbelt D.C. 2003.** The mammary gland. In: Knottenbelt D.C., Le Blanc M., Lopate C. & Pascoe R.R. (Eds). *Equine Stud Farm Medicine and Surgery*. Edinburgh: Elsevier, pp.343-352.
- 8 **Maia L.A., Olinda R.G., Araujo T.F., Firmino P.R., Nakazato L., Miranda Neto E.G., Dantas A.F.M. & Riet-Correa F. 2016.** Cutaneous pythiosis in a donkey (*Equus asinus*) in Brazil. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 28(4): 436-439.
- 9 **McCue P.M. & Wilson W.D. 1989.** Equine mastitis. A review of 28 cases. *Equine Veterinary Journal*. 21(5): 351-353.
- 10 **Pessoa A.F.A., Pessoa C.R.M., Miranda Neto E.G., Dantas A.F.M. & Riet-Correa F. 2014.** Doenças de pele em equídeos no semiárido brasileiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 34(8): 743-748.
- 11 **Sallis E.S.V., Pereira D.I.B. & Raffi M.B. 2003.** Pitiose cutânea em equinos: 14 casos. *Ciência Rural*. 33(1): 899-903.
- 12 **Santurio J.M., Alves S.H., Pereira D.B. & Argenta J.S. 2006.** Pitiose: uma micose emergente. *Acta Scientiae Veterinariae*. 34(1): 1-14.
- 13 **Smiet E., Grinwis G.C., Van den Top J.G. & Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan M.M. 2012.** Equine mammary gland disease with a focus on botryomycosis: A review and case study. *Equine Veterinary Education*. 24(1): 357-366.
- 14 **Souto E.P.F., Maia L.A., Olinda R.G., Galiza G.J.N., Kommers G.D., Miranda-Neto E.G., Dantas A.F.M. & Riet-Correa F. 2016.** Pythiosis in the Nasal Cavity of Horses. *Journal of Comparative Pathology*. 155(1): 126-129.
- 15 **Tabosa I.M., Medeiros V.T., Dantas A.F.M, Azevedo E.O. & Maia J.C. 1999.** Pitiose cutânea em equídeos no semiárido da Paraíba. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 51(1): 27-30.
- 16 **Videla R., Van Amstel S., O'Neill S.H., Frank L.A., Newman S.J., Vilela R. & Mendoza L. 2012.** Vulvar pythiosis in two captive camels (*Camelus dromedarius*). *Medical Mycology*. 50(1): 219-224.