

## GRANULOMATOSIS ENZOÓTICA BOVINA (PYTHIOSIS): UNA PATOLOGÍA EN REBAÑOS BOVINOS DEL ALTO APURE-VENEZUELA

*Bovine Enzootic Granulomatosis (Pythiosis): A Pathology in Bovine Herds in High Plains of Apure State, Venezuela*

Carlos Marín A.<sup>\*1</sup>, Nancy de López<sup>\*\*</sup>, Morella de Rolo<sup>\*\*</sup>, Luisa de Álvarez<sup>\*\*</sup>, Carlos Marín R.<sup>\*\*</sup>

<sup>\*</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias. Cátedra de Patología. Universidad Central de Venezuela. Apartado 4563. <sup>\*\*</sup>Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-CENIAP). Apartado 588. Maracay 2101. Estado Aragua. Venezuela

**Correo-E: cmarinap@hotmail.com**

Recibido: 15/09/21- Aprobado: 28/06/22

### RESUMEN

Se ha documentado que durante la segunda mitad del siglo XIX, empezaron a aparecer lesiones epizooticas cutáneo-granulomatosas en las extremidades de los équidos en varios países asiáticos y, posteriormente, en Australia. En 1987, se identificó al oomiceto *Pythium insidiosum*, como agente causal, única especie reconocida responsable de esta infección secular primordial en équidos asiáticos. Un siglo más tarde, se reportó que otros mamíferos como caninos, felinos, humanos y ganado vacuno, eran susceptibles de ser infectados por este microorganismo (a menudo con resultados mortales). Se conocen pocos casos de esta patología en ganado bovino, generalmente limitados a un pequeño número de animales, mayormente terneros, o mautes de 1 y 2 años de edad. Los resultados de investigaciones realizadas en rebaños de ganado cebú cruzado, de la ganadería extensiva del Alto Apure, que pastan permanentemente en áreas inundadas y en cuatro municipios de esa región, arrojaron alta incidencia, alta frecuencia y severa patogenicidad de la enfermedad cutáneo-granulomatosa, conocida como granulomatosis enzoótica bovina (GEB), localizada predominantemente en las partes

### ABSTRACT

It has been documented that during the second half of the 19th century, epizootic cutaneous-granulomatous lesions began to appear on the limbs of equids in several Asian countries and later in Australia. In 1987, the oomycete *Pythium insidiosum* was identified as the causative agent, the only recognized species responsible for this primary secular infection in Asian equids. A century later, other mammals such as canines, felines, humans and cattle were reported to be susceptible to infection by this organism (often with fatal results). Few cases of this pathology are known in cattle, generally limited to a small number of animals, mostly calves, or yearlings of 1 and 2 years of age. The results of research carried out in herds of crossbred zebu cattle, from the extensive cattle ranching of Alto Apure, which graze permanently in flooded areas, and in four municipalities of that region, showed high incidence, high frequency and severe pathogenicity of the cutaneous-granulomatous disease, known as bovine enzootic granulomatosis (BEG), located predominantly in the lower parts of the extremities. This article is a historical account of BEG, product of the evaluation of 25 cattle farms in the state of Apure. The incidence and prevalence

<sup>1</sup> A quien debe dirigirse la correspondencia (To whom correspondence should be addressed)

inferiores de las extremidades. Este artículo constituye un recuento histórico de la GEB, producto de la evaluación de 25 establecimientos ganaderos del estado Apure. La incidencia y prevalencia de la GEB variaron en los distintos grupos etarios del rebaño, siendo alrededor del 25 al 35% en animales jóvenes (1 a 3 años) y de 3 a 4%, en animales mayores de 4 años. En un 95% de los casos, las lesiones estuvieron limitadas a la piel de la región metacarpiana, metatarsiana, pezuñas y tejidos subyacentes. El comportamiento clínico-epidemiológico y patogénico del *Pythium insidiosum*, permitió formular la hipótesis de que podría haberse producido allí un cambio o reordenamiento en la estructura genómica de este oomiceto, como fue demostrado previamente en Asia, Australia y América. Esto haría necesaria la reclasificación del hongo en una subespecie.

**(Palabras clave:** *Pythium insidiosum*; dermatitis nodular; granulomatosis enzoótica bovina; pododermatitis cutáneo granulomatosa; pythiosis)

of BEG varied in different age groups of herds, being around 25 to 35% in young animals (1 to 3 years old) and 3 to 4% in animals older than 4 years old. In 95% of the cases, lesions were limited to the skin of the metacarpal and metatarsal region, hooves and underlying tissues. The clinical-epidemiological and pathogenic behavior of *Pythium insidiosum* led to the hypothesis that a change or rearrangement in the genomic structure of this oomycete could have occurred there, as previously demonstrated in Asia, Australia and America. This would necessitate the reclassification of the fungus into a subspecies.

**(Key words:** immunohistochemistry, nervous tissue, *Caiman Crocodilus Crocodilus*)

## INTRODUCCIÓN

Las Pythiosis son patologías de vegetales, mamíferos y peces, producidas por un microorganismo del género *Pythium*, el cual reúne alrededor de 120 especies que se describen como “hongos acuáticos” o “mohos de las aguas”. Se encuentran entre los más destructores patógenos de plantas, semillas vegetales almacenadas, raíces y gran variedad de tejidos vegetales. Filogenéticamente están distantes del reino de los hongos y más cercanos a las algas y ocasionan dermatitis piogranulomatosa ulcerada y nodular exudativa y rápidamente progresiva [1]. La enfermedad ha sido reportada en diversas especies como la equina [2], canina [3], felina [4], ovina [5], aves migratorias [6], humanos [7] y bovinos [9-11]. Haciendo un breve recorrido por la historia de la pythiosis animal, encontramos que los primeros casos se reconocieron en epizootias de equinos del Continente Asiático. A mediados del siglo XIX fueron estudiados y descritos los primeros casos de lesiones tórpidas cutáneo-granulomatosas en las extremidades de caballos de la India, pero sin obtener resultados concretos sobre la etiología. Existen casos bien documentados sobre el tema, destacando los publicados entre otros por Smith *et al.* [11], en

los cuales solo se sugiere la naturaleza fungoide del agente aislado. Bridges y Emmons [12] aislaron un microorganismo filamentoso, estéril, a partir de casos de equinos afectados por la granulomatosis en Texas y Florida, muy similar desde el punto de vista clínico-patológico a los estudiados por los investigadores holandeses [13]. Finalmente, en 1987, de Cock *et al.* [13] encontraron que todos los aislamientos realizados hasta la fecha, tanto de animales como de humanos, fueron provocados por la especie única de los Oomycetos: *Pythium insidiosum* [14], un microorganismo clasificado en el Reino Stramenopila, Phylum Oomycota, Clase Oomycetes, Orden Pythiales, Familia Pythiaceae y Género *Pythium*. Esta es la única especie descrita como causante de infección en mamíferos y peces, siendo más frecuente históricamente la pythiosis equina y, más recientemente, con menor incidencia en perros, gatos, humanos y bovinos [2, 3, 7, 9]. No es contagiosa de animal a animal, ni de animal al hombre.

En resumen, los casos de esta granulomatosis cutánea, estudiados en el siglo XIX y buena parte del siglo XX, primero en Asia y Australia y luego reportada en varios países con características agroecológicas de bosque tropical y subtropical

lluvioso [15], fueron todos reconocidos en equinos. Fue a partir del año 1971 cuando comienzan a aparecer descripciones de casos de pythiosis en otras especies, como por ejemplo, en caninos, bovinos, humanos y gatos. La especie bovina ocupaba el tercer lugar como la menos afectada por esta patología en el mundo, pero en el nicho ecológico de los llanos altos del estado Apure ocupa el ahora el 1er lugar por su carácter enzoótico masivo y expansivo. En este sentido, la detección de variantes geográficas del *Pythium insidiosum*, fueron reconocidas, cuando Schurko et al. [16] identificaron polimorfismo en 28 aislamientos del Oomyceto originarios de América, Asia y Australia, encontrándose variaciones en las secuencias espaciadoras internas de los genes que codifican las subunidades mayor y menor del ARN ribosomal del microorganismo [16].

Marín et al. [17-18], reportaron que en los rebaños bovinos mestizos cebú de sistemas de producción extensiva en sabanas hipertérmicas del Alto Apure (municipios Muñoz, Rómulo Gallegos, Bruzual y Páez), se habían comenzado a diseminar casos severos de granulomatosis cutánea, como neoformaciones uni o polinodulares proliferativas necrotizantes y/o fuerte y dolorosa tumefacción granulomatosa ulcerada de la piel y tejidos subyacentes, en las partes bajas de las extremidades en su mayor frecuencia, y menos en otras regiones del cuerpo (cuello, pecho, espalda, abdomen y vientre). El hábitat de pastoreo de estos animales son las sabanas inundables, mal drenadas, de suelos saturados, salinos con lagunas de aguas estancadas, cubiertas de diversas especies de plantas acuáticas con predominio del lirio, acumulación de detritus vegetales y temperaturas ambientales constantes que oscilan entre 27° y 50 °C, todo lo cual, constituye el hábitat o nicho ecológico del *Pythium insidiosum* que al producir zoosporas biflageladas, la cual es su principal elemento infectante, se adhieren a las plantas y/o al contacto con la piel reblandecida por el agua, con escoriaciones y pequeñas heridas en las partes bajas de las extremidades de terneros, mautes y adultos, los cuales contraen el patógeno, en ese hábitat acuoso altamente propicio para la realización de su ciclo biológico (Figura 1). Esta patología se ha extendido a los municipios vecinos, probablemente a partir del área de los Módulos Hidrológicos de Mantecal (municipio Muñoz) donde es posible que se haya producido un cambio



Figura 1. Paisaje del hábitat característico del *Pythium insidiosum*. Rebaño pastoreando en sabanas inundables, mal drenadas con aguas estancadas

(“reordenamiento” o “reacomodo”) de la estructura genómica del microorganismo, manifestándose en una nueva “cepa” o subespecie con más alta patogenicidad (mayor incidencia y morbilidad), más prevalente en bovinos de alrededor 1-3 años de edad, provocándoles serias dificultades para movilizarse (claudicaciones o cojeras), retraso en el crecimiento, causando un impacto económico importante. Esto viene a ser una observación epidemiológica de principal relevancia, porque la misma solo afecta mayormente a bovinos que ahora se comportan como un nuevo huésped específico y no tanto los équidos, a pesar de que pastorean conjuntamente en las sabanas inundables. En otras palabras, ahora los équidos son menos susceptibles a la infección de esta variedad de *Pythium insidiosum*, con alta susceptibilidad para los bovinos de cría extensiva.

De lo anteriormente expuesto, el objetivo general de este trabajo fue describir la historia natural y el comportamiento epidemiológico de la Granulomatosis Enzoótica Bovina en un área geográfica bien delimitada y caracterizar la expresión clínico-patológica; y a la vez, intentar explicar las causas que determinaron la probable ocurrencia del fenómeno biológico en la estructura íntima del *Pythium insidiosum* por el cambio de huésped que se produjo del equino, huésped natural secular y su posterior adaptación al bovino en forma enzoótica masiva.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### I. Diagnóstico

Las investigaciones realizadas para la identificación del agente causal de la Granulomatosis Enzoótica Bovina (GEB) y caracterización de la historia natural de la misma, fueron las siguientes: i. Estudio clínico: En los municipios Bruzual, Mantecal y Paéz en cada

hato o fundo visitado, se reunió el rebaño afectado y se hizo el examen semiológico correspondiente, en relación a: edad, condición corporal, trastornos de la marcha (claudicación o postración), temperatura corporal, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, apetito, rumia, micción, defecación, localización, distribución y características de las lesiones cutáneas.

ii. Estudio anatomopatológico: se realizaron biopsias a una muestra mediante de 10 animales por rebaño, con lesiones cutáneo-nodulares en 10 de las 25 fincas visitadas en los cuatro municipios que presentaron la más alta incidencia y cuadro clínico más severo y complicado. Para la toma de las biopsias, se inmovilizaron los animales, atando los cuatro miembros y se colocaron en posición decúbito lateral derecho, previa sedación con Xilacina al 2% y anestesia local con Lidocaína al 2%. Las biopsias fueron obtenidas en fragmentos de 3x2x4cm, profundizando las lesiones nodulares o las inflamatorias tumefactas necrótico-exudativas, piogranulomatosas fistulizadas en el área metacarpo y/o metatarso-falangeana en su mayor parte y de otras regiones (cuello, tórax, abdomen). Se fijaron en formol neutro al 10% V/V y se procesaron según la técnica histológica convencional de deshidratación en alcoholes, en tolueno-xilol, para la inclusión en bloques de parafina y preparación de cortes de 3µm y 5µm de espesor realizados con micrótopo de deslizamiento. La coloración de los cortes de 5µm de espesor se hizo con hematoxilina-eosina (H&E) y los de 3µm, con impregnación con sales de plata-methenamina-tricrómico de Gómori.

iii. Observación microscópica en examen fresco del microorganismo. Esta se llevó a cabo con la técnica descrita por Borelli, empleando hidróxido de potasio (KOH) al 10% y tinta Parker en una gota gruesa de exudado purulento en un extendido sobre un porta objetos y observación al microscopio.

iv. Cultivo y aislamiento del agente etiológico. Para ello, se tomaron muestras de tejido fresco con material supurado en tubos de ensayo, manteniéndose para el transporte, en agua destilada estéril adicionada de antibióticos, sin refrigeración, a temperatura ambiente. Se dividieron en pequeños fragmentos que se colocaron en la superficie del agar Sabouraud-dextrosa en placas de Petri y se incubaron a 37 °C en cámara húmeda durante 24 horas, Mendoza [22].

## II. Tratamiento

El tratamiento de la granulomatosis enzoótica bovina es difícil y poco eficaz cuando se recurre a un solo recurso terapéutico como por ejemplo a quimioterapia, cirugía o inmunoterapia, pero si se usan combinaciones, particularmente de las dos primeras, se pueden obtener mejores resultados [22].

## RESULTADOS

### I. Diagnóstico

i. Estudio clínico-patológico: La incidencia y prevalencia de la GEB en los 25 establecimientos ganaderos visitados fue variable en los distintos grupos etarios del rebaño, afectándose alrededor del 25 al 35% de los animales jóvenes (1 a 3 años) y del 3 a 4% en animales mayores de 4 años. Las lesiones estaban limitadas a la piel de los metacarpos, metatarsos, pezuñas y tejidos subyacentes, en un 95%. No se produjo extensión o metástasis de pythiosis a otros tejidos como huesos, linfonódulos, ojos, arterias, órganos de los sistemas digestivos o respiratorio, por lo que este agente solo tiene como “órgano efector” a la piel de los miembros (partes bajas) y, más escasamente, otras regiones externas del bovino. La frecuencia de presentación de pythiosis en bovinos en todo el Alto Apure se estimó en el grupo etario de 1 a 3 años, el cual fue el más afectado, en un 35% en promedio y se caracterizó por severas lesiones inflamatorias agudas que cursan al inicio con prurito, celulitis focal y depilación (alopecia) de la zona, a medida que el edema aumenta hasta la tumefacción notable de los metacarpos o metatarsos y pezuñas que tienden a la ulceración y a la cronicidad, localizándose más frecuentemente en las partes bajas de las extremidades, en forma de masas o nódulos (que pueden alcanzar entre 30 a 50 mm de diámetro), con una coloración color marrón oscuro, con formación de material purulento que drena a través de fistulas, culminando en un proceso incapacitante, doloroso, necrótico-exudativo que afecta la piel, subcutáneo, vasos, cartílagos articulares (externos e internos), nervios y tendones. Estas neoformaciones tienen repercusión en el estado general, produciendo claudicación, pérdida de peso (~25 a 30%) y retraso en el crecimiento. Algunos animales caen postrados y mueren siendo el porcentaje de mortalidad ~2%.



En los adultos, se evidencian nódulos necrotizantes distribuidos, además de las patas, en otras partes del cuerpo (parte inferior del cuello, tórax o abdomen) que se necrosan fácilmente se desprenden fácilmente de su pedículo o base de fijación; al corte, la lesión es densa, de color crema rosáceo con ductos irregulares para el drenaje de pus sanguinolento (Figuras 2 y 3).



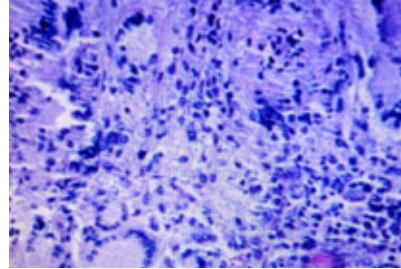
**Figura 2.** Lesiones granulomatosas ulceradas de bordes cortantes y fondo granulomatoso



**Figura 3.** Tumor con lesión granulomatosa nodular en metacarpo

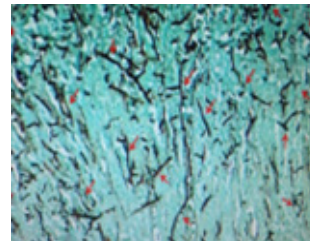
ii. Estudio histopatológico: Con la coloración H&E, los cambios estructurales producidos por el Oomyceto consistieron de múltiples granulomas inflamatorios que se extendían a la dermis profunda y tejidos subyacentes, acompañados de cambios de tipo crónico que afectaron las capas epidérmicas y anexos. Los granulomas presentaban varias zonas de necrosis alrededor de las cuales se pudieron observar abundantes infiltrados polinucleares neutrófilos y eosinófilos, muchos en vías de degeneración. Inmediatamente a éstos, se observó la proliferación de histiocitos y macrófagos activados formando una especie de manto o tapiz, acompañados de linfocitos pequeños que se acumulaban en un tejido

fibroplásico bien vascularizado. Enormes células gigantes tipo cuerpo extraño y con núcleos en forma de corona en la periferia, se encontraron sostenidas en el componente fibroblástico que se extiende a los granulomas vecinos. Necrosis y hemorragia acompañaban al proceso inflamatorio (Figura 4).



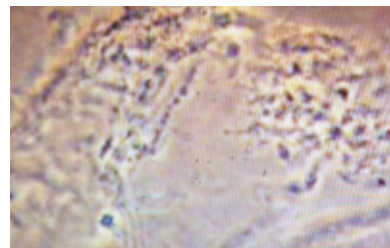
**Figura 4.** Histopatología (H&E) reacción inflamatoria granulomatosa característica con formaciones gigantocelular con abundantes histiocitos, macrófagos, neutrófilos y eosinófilos

La coloración de Grocott mostró hifas gruesas de color negrozco, escasamente septadas y parcialmente ramificadas con paredes lisas y articuladas en ángulo recto (Figura 5).



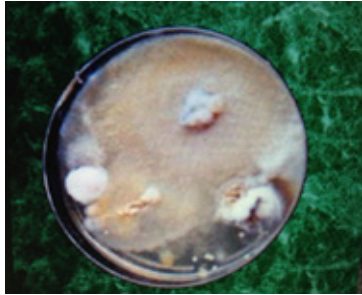
**Figura 5.** La coloración de Grocott muestra múltiples hifas con ramificaciones en ángulo recto con escasos septos

iii. La observación microscópica del *Pythium insidiosum* al examen fresco, permitió visualizar hifas hialinas ramificadas, cenocíticas, gruesas, poco septadas, que muestran en el citoplasma escasas vesículas lipídicas, algunas de ellas con incrustaciones en la periferia que al contacto con la luz producen un halo iridiscente conocido como reacción o fenómeno



**Figura 6.** Examen fresco de KOH al 10% muestra al *P. insidiosum* y reacción de Splendore Hoeppli

de Splendore-Hoepli (Figura 6). iv. Crecimiento en el cultivo micológico. El período de crecimiento fue de alrededor de 24 h, formando colonias planas con el micelio sumergido en el medio de cultivo, de color blanco-amarillento. Las hifas gruesas eran cenocíticas, hialinas, con ramificaciones laterales en ángulo recto y escasamente septadas, características de *P. insidiosum* (Figura 7).



**Figura 7.** Cultivos de *P. insidiosum* en agar Sabouraud dextrosa aspecto algodonoso del micelio

## II. Tratamiento

El tratamiento en general de la GEB es lento, costoso y exige dedicación diaria para la atención individual de los animales afectados. No obstante, las terapias combinadas, como las que se ensayaron en las prácticas realizadas en varias fincas, empleando anfotericina B, yoduro de potasio y acetona de triancinolona acuoso 10mg/mL (CIBA-GEIGY) arrojaron resultados favorables. Elitraconazole y terbinafine pueden producir efectos secundarios. El método quirúrgico asociado a procesos de cauterización es eficaz cuando se elimina todo el tejido infectado para que no haya recurrencia, sin embargo, la cirugía no puede ser usada en todos los casos porque la localización, estructuras anatómicas involucradas y tamaño o extensión de las lesiones imposibilitan este tipo de abordaje terapéutico permanentemente. Desde 1980, se ha venido utilizando en Australia la inmunoterapia [19] en equinos, preparándola con nueva formulación. Es un inmunobiológico producido a partir de cultivos de *P. insidiosum* obtenido de macerados de masa fúngica o del contenido de antígenos del sobrenadante de los cultivos, y se ha obtenido recuperación entre el 60% y 70% de los animales tratados con lesiones recientes. Este tratamiento se ha probado en bovinos, es costoso, debe mantenerse en refrigeración y utilizarse en un plazo no mayor de 1 mes después de preparado. Las condiciones en las cuales se desenvuelve la vida y la

ganadería extensiva del Alto Apure, el escaso acceso a los medicamentos, la energía eléctrica, así como a otros insumos, además de la escasa eficacia y costo del inmunoterápico constituyen grandes limitaciones, y descartan completamente su uso para el tratamiento de esta patología [22].

## DISCUSIÓN

El comportamiento y evolución clínica de los animales enfermos, las características morfológicas macroscópicas e histopatológicas con lesiones que muestran al Oomyceto con los rasgos morfológicos y fenotípicos que lo identifican, aunado a la reacción célula-inflamatoria típica, corroborado con la presencia del microorganismo en el examen fresco y en el cultivo, dan cuenta de que el agente causal de la GEB es *Pythium insidiosum*, lo cual fue confirmado por los trabajos de Luis-León *et al.* [20] y Luis – León y Pérez [21] quienes lo aislaron e identificaron por análisis de secuenciación, a partir de muestras de tejido de bovinos infectados de donde se aisló el ADN genómico total. La secuencia correspondiente al ADNr 185 fue amplificada mediante PCR. No obstante estas confirmaciones, que no dejan lugar a duda sobre su identificación, quedan aún interrogantes sobre el comportamiento clínico-epidemiológico y patogénico por la alta agresividad y sensibilidad específica para los bovinos de esta región, por haberse originado probablemente una nueva “cepa” o variante que emergió en el municipio Muñoz, la cual es necesario investigar porque difiere notablemente de los pocos casos de pythiosis bovina que han aparecido en otros países con similares condiciones ambientales y agroecológicas a las del estado Apure. Hasta el presente, estos focos de pythiosis bovina siempre han sido marginales en cuanto al número de animales afectados y casi limitados a muy escasos grupos de bovinos jóvenes, tal como ha sido señalado por Miller *et al.* [8] en Louisiana, EE.UU, Santurio *et al.* [7] en Pantanal y Silva *et al.* [10] en Brasil y Cardona *et al.* [15] en Córdoba, Colombia. Como una suerte de hipótesis para intentar explicar el cambio de comportamiento clínico-epidemiológico y patogénico del *Pythium insidiosum*, se sugiere, por las razones antes expuestas, que se haya producido algún cambio o “reordenamiento” del ADN y/o del ARN ribosomal del Oomyceto, capaz de inducir la aparición de una nueva “cepa” o variante geográfica

como las identificadas por Schurko *et al.* [16]. Todo lo cual se habría producido al haber provocado una modificación profunda de la ecología y de la biodiversidad, particularmente de los ecosistemas de sabanas hipertérmicas altas no inundables a sabanas mal drenadas con aguas estancadas durante todo el año, luego de implementarse el inmenso proyecto agroecológico representado por los Módulos Hidrológicos de Mantecal (1973-1978), que se construyeron con la finalidad de proporcionar agua y forrajes naturales a la promisoría ganadería regional. Como testimonio de haberse producido tales cambios en la ecología y biodiversidad, quedó demostrado en numerosas investigaciones transdisciplinarias e interdisciplinarias realizadas en sistemas y ecosistemas de la flora y fauna de esa área geográfica, las cuales fueron llevadas a cabo por diferentes instituciones científicas del país y del exterior. En razón de la fuerza de los razonamientos y evidencias señaladas para darle soporte a la hipótesis del cambio genómico del *P. insidiosum* que afecta a la ganadería extensiva del alto Apure, consideramos pertinente darle continuidad a esta investigación, toda vez que Schurko [16] la ha llevado a cabo exitosamente, logrando determinar 28 aislamientos del Oomyceto originarios de América, Asia y Australia, en los cuales encontraron variaciones en las secuencias espaciadoras internas de los genes que codifican las subunidades mayor y menor del ARN ribosomal del microorganismo, lo cual podría conducir a una posible reclasificación del mismo en subespecies, entre las cuales pudiera incluirse la posible variedad que haya surgido en Mantecal, estado Apure.

## REFERENCIAS

1. Santurio J, Alves S, Pereira D, Argente J. Pitiose: uma micose emergente. Acta Scientiae Veterinariae. 2006; 34:1-14.
2. Frei F, Velho J, Lins L, Nogueira C, Santurio J. Pythiose equina na região sul do Brasil. Ver. Port.Cienc. Vet.2007; 102:107-111.
3. Pereira D, Schild A, Motta M, Figuera R, Sallis E, *et al.* Cutaneous and gastrointestinal pythiosis in a dog in Brasil. Vet. Res.Commun. 2010; 34: 301-306
4. Rackich P, Gooters A, Tang K. Gastrointestinal pythiosis in two cats. J.V.Diagn. Invest.2005; 17: 262-269.
5. Pedroso P, Raimundo D, Bezerra P, Oliveira E, *et al.* Rinite micótica rinofaríngea em um ovino Texel no Rio Grande do Sul. Acta Scientiae Veterinariae. 2009; 37(2):181-185.
6. Pesavento P, Ban B, Riggs S, *et al.* Cutaneous pythiose in a nesling white-faced ibis. Vet. Path. 2008; 45: 538-541.
7. Krajaejum T, Sathapatayavongs B, Chaiprasert A, Srnuangs. ¿Do you know human pythiosis? J. Infect. Dis.Antimicrobs. Agents. 2008; 25(1): 45-51.
8. Miller RI, Olcott BM, and Archer M. Cutaneous pythiosis in beef calves. J. Am. Med. Ass. 1985; 186: 984-986.
9. Santurio J, Monteiro A, Leal A, *et al.* Pythiosis insidiosos in calves from Pantanal region of Brasil. Mycopatologia. 1998; 141: 123-125.
10. Silva T, Neto E, Santurio J, Melo D, Dantas A. Pitiose cutânea en rumiantes. Vet. e Zootec. 2011; 18(4): 871-874.
11. Smith, Fish and Drouin G. History of *Pythium insidiosum* infection. J. Mycol. Med. 1996; 6:156
12. Bridges J and Emmons G. A phycomycosis of Horses caused by *Hyphomyces destruens* J.Am.Vet.Med. Assoc.1961; 38:579.
13. de Cock M., Mendoza L. and Padhye A.A. *Pythium insidiosum* sp. nov., the etiologic agent of pythiosis J.Clin.Microb.1987; 25:344.
14. Cardona JA, Vargas M, Perdomo SC. Frecuencia de presentación de Pythiosis cutánea bovina (*Pythium insidiosum*) en tres explotaciones ganaderas de Córdoba, Colombia. Rev.CESMed. Vet. Zootec. 2012; 7(2):47-54.
15. Cardona J, Reza L, Vergara O. Pythiosis cutánea equina en Córdoba, Colombia. Reporte de cinco casos. Rev. Cientif. FCV-LUZ. 2010; 20(6):590-594.
16. Schurko A, Mendoza L, de Cock A. Evidence for geographic clusters: molecular differences among strains of *Pythium insidiosum* from Asia, Australia and the Americas are explored. Mycol. 2003; 95(2): 200-208.
17. Marín C, de López N, Pérez RC, *et al.* Primer reporte de la Granulomatosis Enzoótica Bovina en Venezuela. Fonaip Divulga 1991; 9(37): 14-16.
18. Marín C, de López N, Pérez RC, *et al.* Estudio de focos enzoóticos en el estado Apure-Venezuela. Memorias IV Jorn. Inv. FCV-UCV. 4-7Dic. 2001
19. Santurio JM, Catto JB, Monteiro Leal AB. Tratamiento Inmunoterápico da pitiose equina. <http://www.cnpgc.embrapa.br/publicacoes/coi/COT67.html>
20. Luis-León JJ, Pérez RC, Vivas JL, Mendoza L y Triana Alonso F. Confirmación de *Pythium insidiosum*

- como agente etiológico de la Granulomatosis Enzoótica Bovina mediante análisis de secuencia. *Salus online. Biol. Molec.* 2018; 11(Sup.1): 1-9.
21. Luis-León JJ, Pérez RC. Pythiosis una patología emergente. *Salus.*2011; 15 (1):1-10.
  22. Mendoza, Leonel (2001). The etiologic agent of Pythiosis. A non-fungal disease studied in Medical Mycology. Michigan State University. Department of Microbiology at url: [www.http://medtech.cls.msu.edu/medtech/mendoza/biology.html](http://medtech.cls.msu.edu/medtech/mendoza/biology.html), 6 pp.