

Utilização da técnica de imuno-histoquímica para confirmar casos de pitiose cutânea equina diagnosticados por meio de caracterização clínica e avaliação histopatológica

[Immunohistochemistry analysis to confirm cases of cutaneous pythiosis in horses diagnosed by means of clinic characterization and histopathologic evaluation]

R.G.S. Dória¹, S.H. Freitas², F.S. Mendonça³, L.P. Arruda⁴, F.M. Boabaid⁵, A. Martins Filho⁴, E.M. Colodel⁶, C.A.A. Valadão²

¹Universidade de São Paulo – FZEA-USP – Pirassununga, SP

²Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FCAV-UNESP – Jaboticabal, SP

³Universidade Federal Rural do Pernambuco – UFRPE – Recife, PE

⁴Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Cuiabá – UNIC – Cuiabá, MT

⁵Faculdade de Veterinária – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS – Porto Alegre, RS

⁶Universidade Federal de Mato Grosso – FAMEV-UFMT – Cuiabá, MT

RESUMO

Avaliaram-se 12 feridas granulomatosas em membros torácicos e pélvicos de equinos da raça Pantaneira. Foi realizado diagnóstico sugestivo para pitiose cutânea de acordo com as características clínicas das feridas e avaliação histopatológica, com as colorações de hematoxilina-eosina (HE) e Prata Metenamina de Grocott (GMS). A confirmação do diagnóstico foi realizada por exame imuno-histoquímico, método streptavidina-biotina marcada (LSAB). O diagnóstico histopatológico foi de dermatite piogranulomatosa, focal extensa, acentuada, associada a “pseudo-hifas” características de *Pythium insidiosum* (pitiose cutânea), nos 12 animais desta pesquisa. O diagnóstico de pitiose foi confirmado em 100% dos casos pela imunomarcagem positiva (LSAB) para *Pythium insidiosum*, caracterizada pela visualização de estruturas ramificadas e septadas, sendo observados 100% de paridade entre as técnicas. É possível concluir que a caracterização clínica das feridas granulomatosas com aspecto de pitiose em equinos associada ao resultado histopatológico sugestivo para pitiose equina constituem métodos de diagnóstico confiáveis, os quais podem ser confirmados pela técnica de imuno-histoquímica.

Palavras-chave: equinos, histopatologia, imuno-histoquímica, pitiose

ABSTRACT

Twelve granulomatous lesions in the thoracic and pelvic limbs of horses from pantaneira breed were evaluated. It was performed suggestive diagnostic of cutaneous pythiosis according to the clinic characteristics of the lesions and histopathological exams using hematoxylin and eosin (HE) and Grocott's methenamine silver (GMS) stains. The confirmation of the diagnoses was performed by the labelled streptavidin biotin (LSAB) method (immunohistochemistry). Extensive focal pyogranulomatous dermatitis associated with “pseudo hyphae” characteristic of *Pythium insidiosum* (subcutaneous pythiosis) was the histopathological diagnosis for all 12 horses used in this study. It was confirmed in 100% of the cases by the positive result to *Pythium insidiosum* in the immunohistochemistry exam, characterized by the visualization of branched and septated structures. It was observed 100% of parity between the techniques. We can conclude that clinical characterization of the granulomatous lesions with pythiosis aspects in horses associated with histopathology suggestive of equine pythiosis constitute a reliable method of diagnostic that can be confirmed by immunohistochemistry technique.

Keywords: horses, histopathology, immunohistochemistry, pythiosis

Recebido em 28 de outubro de 2012

Aceito em 23 de agosto de 2013

E-mail: redoria@usp.br

INTRODUÇÃO

A zigomicose constitui um conjunto de afecções micóticas de estreita semelhança anatomopatológica, que acomete a pele e o tecido subcutâneo, o trato digestório e o respiratório, especialmente de equinos (Rodrigues e Luvizotto, 2000; Biava et al., 2007). Constitui um grupo complexo de doenças piogranulomatosas que inclui a pitiose, a conidiobolomicose e a basidiobolomicose, causadas por *Pythium insidiosum*, *Conidiobolus coronatus* e *Basidiobolus haptosporus* (*Basidiobolus ranarum*), respectivamente (Mendoza et al., 1996; Biava et al., 2007).

Em equinos, a enfermidade caracteriza-se pela formação de granulomas eosinofílicos, com a presença de massas necróticas denominadas “kunkers” (Mendoza e Alfaro, 1986; Meireles et al., 1993). Os sinais clínicos caracterizam-se por lesões ulcerativas granulomatosas, formando grandes massas teciduais, com bordas irregulares, de aparência tumoral, com hifas recobertas por células necróticas que formam massas branco-amareladas, semelhantes a corais, chamadas internacionalmente de “kunkers”. Os “kunkers” variam de 2 a 10 mm de diâmetro, tem forma irregular, ramificada, com aspecto arenoso e penetram no tecido granular, dentro de seios formados ao longo do seu trajeto. O tamanho das lesões depende do local e duração da infecção e apresentam secreções serossanguinolenta, mucossanguinolenta, hemorrágica e, às vezes, mucopurulenta e fétida, que drenam dos tecidos granulomatosos e necróticos, em forma de colmeias (Leal et al., 2001a).

A pitiose causa prejuízos significativos para a criação de equinos no Brasil, sendo que a falta de diagnóstico agrava o quadro e faz com que essa afecção seja uma ameaça à vida dos equinos (Leal et al., 2001a; Santurio et al., 2004). Tradicionalmente, o diagnóstico da pitiose baseia-se nos aspectos clínicos e histopatológicos e no isolamento e identificação do agente por meio de suas características culturais, morfológicas e reprodutivas. O diagnóstico é relativamente fácil em casos crônicos; porém, lesões cutâneas iniciais ou sistêmicas são de difícil detecção pelos métodos tradicionais (Leal et al., 2001b). O exame histopatológico é auxiliar no diagnóstico de pitiose, o qual necessita de outras provas para confirmação, como a

imuno-histoquímica (Brown et al., 1988). Histologicamente, a pitiose caracteriza-se por inflamação granulomatosa e granulocítica. Nos equinos, os “kunkers” apresentam-se como áreas de necrose eosinofílica, de tamanho variado, forma circular e com contornos irregulares, compostas por hifas, colágeno, arteríolas e células inflamatórias, especialmente eosinófilos. Em torno das hifas, os eosinófilos estão desgranulados e, em direção à periferia, os grânulos tornam-se mais evidentes. Na borda é comum encontrar eosinófilos intactos. A área entre os “kunkers” é caracterizada por inflamação granulomatosa e supurativa, composta por exsudato inflamatório espesso de neutrófilos e eosinófilos (Miller e Campbell, 1984; Brown et al., 1988; Chaffin et al., 1995; Headley e Arruda, 2004). Em cortes histológicos, corados com métodos histoquímicos à base de prata, podem-se observar hifas com paredes espessas, esparsamente septadas, irregularmente ramificadas (normalmente em ângulo reto) e medindo de 2 a 6µm de diâmetro (Miller e Campbell, 1984; Chaffin et al., 1995; Headley e Arruda, 2004; Santurio et al., 2006a). Porém, a identificação precoce da doença torna-se difícil com a utilização desse método (Santurio et al., 2004) e requer diferenciação de outras lesões granulomatosas (Chaffin et al., 1992; Leal et al., 2001a). O diagnóstico diferencial inclui, principalmente, a habronemose, e, também, neoplasias, tecido de granulação exuberante e granulomas fúngicos e bacterianos (Chaffin et al., 1992).

Atualmente, métodos como a imuno-histoquímica (Brown et al., 1988), imunodifusão (Miller e Campbell, 1982; Kaufman et al., 1990), ensaio imunoenzimático ELISA (Mendoza et al., 1997; Santurio et al., 2006b) e, mais recentemente, os métodos moleculares (Grooters e Gee, 2002; Schurko et al., 2004; Vanittanakom et al., 2004) auxiliam e suportam o diagnóstico precoce e correto dessa afecção (Mendoza et al., 1996). Em 1988, Brown et al. descreveram pela primeira vez o método de imuno-histoquímica para diagnóstico de pitiose equina, que foi posteriormente utilizado por vários autores (Fischer et al., 1994; Purcell et al., 1994). O teste imuno-histoquímico de coloração, utilizando a técnica de peroxidase indireta, diferencia o *Pythium insidiosum* de outros fungos. Consiste na coloração seletiva das hifas de *Pythium insidiosum* e na ausência de coloração das

hifas de fungos dos gêneros *Basidiobolus* e *Conidiobolus*, com base em cortes histológicos do material fixado em formalina (Biava *et al.*, 2007). Em 2002, Reis Jr. e Nogueira comprovaram que o método de imuno-histoquímica apresenta uma alta especificidade no diagnóstico de infecção pelo *Pythium insidiosum*.

Com base nesses dados, este trabalho objetiva avaliar a confiabilidade do diagnóstico de pitiose cutânea em equinos realizado por meio de avaliação clínica da ferida e exame histopatológico, comparando-o com o teste de imuno-histoquímica, considerado de elevada especificidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 12 equinos, selecionados na região do Pantanal mato-grossense, jovens e adultos, com idades entre quatro meses e dez anos, e pesos entre 80 e 350kg, da raça Pantaneira, que apresentavam feridas granulomatosas em membro torácico ou pélvico, distalmente às articulações do cotovelo (umerorradial e umeroulnar) ou do joelho (femorotibial e femoropatelar). Sob anestesia geral intravenosa, foram realizadas biópsias das feridas granulomatosas nos membros dos equinos para confirmação do diagnóstico.

As biópsias contendo “*kunkers*” foram fixadas em solução de formol neutro a 10%, por um a dois dias, clivadas, processadas rotineiramente e incluídas em parafina. Os cortes destinados à avaliação histopatológica foram corados pela hematoxilina-eosina (HE) e Prata Metenamina de Grocott (GMS – Grocott’s methenamine silver). Os cortes histológicos destinados à imuno-histoquímica foram montados nas lâminas, previamente tratadas com solução de gelatina 0,3% e aderidos a estas por meio do calor (60 °C), durante 24 horas, após o que as lâminas foram submetidas à imuno-histoquímica. Utilizou-se o método streptavidina-biotina marcada (LSAB), de acordo com Brown *et al.* (1988) e Gimeno *et al.* (1999).

A desparafinização dos cortes foi realizada em estufa a 60° C, durante 30 minutos. Na sequência, os cortes foram hidratados em soluções de xilol I e II, permanecendo dez minutos em cada solução e com passagens

sucessivas, a cada dois minutos, em álcool 100%, 90%, 80% e 70% e, posteriormente, foram lavados em água destilada por dez vezes. Realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena pela incubação das lâminas com peróxido de hidrogênio a 3%, em água destilada, durante 15 minutos, à temperatura ambiente, e as amostras foram, novamente, lavadas em água destilada. O bloqueio de proteínas inespecíficas foi realizado incubando-se os cortes com leite em pó desnatado a 5%, diluído em solução tampão de fosfato (PBS), durante 15 minutos. A recuperação antigênica foi realizada com solução tampão de citrato de sódio a 10mM, com pH 6,0, mediante calor (micro-ondas, potência máxima), por dois minutos, adicionando, conforme necessário, solução tampão (citrato de sódio ou PBS) para evitar a evaporação. Após cinco minutos, destinados à resfriamento da amostra, nova lavagem em água destilada foi realizada. A incubação com o anticorpo primário policlonal anti-*Pythium insidiosum* produzido em coelho (cedido à Universidade Federal do Mato Grosso – UFMT, produzido pelo Laboratório de Pesquisas Micológicas – LAPEMI da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM) foi realizada na diluição de 1:100, em solução tampão (PBS), mantida por 1 hora, a 37°C, em estufa, e nova lavagem com água destilada foi realizada. Depois desse procedimento, incubou-se o complexo streptavidina-biotina (LSAB) com o anticorpo secundário biotilado universal durante 20 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, foi feita a lavagem com tampão TBS (solução TRIS salina tamponada) e incubação pela streptavidina, também, por 20 minutos, em temperatura ambiente, e lavagem com água destilada. A revelação da reação foi feita com o cromógeno diaminobenzidina (DAB; Peroxidase substrate – Kit DAB K3466, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA), durante 5 a 10 minutos, seguida de lavagem em água destilada. A contracoloração dos cortes foi realizada com hematoxilina de Harris, com permanência de um minuto. As lâminas foram lavadas em água corrente e passaram por desidratações sucessivas, a cada um minuto, em banhos de álcool 70%, 80%, 90% e 100% e soluções de xilol III e IV. A montagem das lâminas foi realizada com bálsamo do Canadá (Labsynth, Diadema, SP, Brasil). O protocolo para a imuno-histoquímica utilizada neste trabalho foi adaptado de Gimeno *et al.* (1999).

O anticorpo primário foi produzido em coelho por meio de uma única inoculação de 20.000 zoósporos de *Pythium insidiosum*, via subcutânea, sem a utilização de adjuvantes. Coletas de sangue a cada 14 dias foram realizadas e a quantificação dos anticorpos foi feita pela técnica de Elisa. O soro utilizado corresponde à coleta no 45º dia, o qual apresentou uma densidade ótica (DO) de 0,281. A DO considerada positiva para coelhos é de 0,105 (Pedroso et al., 2009).

As lâminas coradas foram analisadas em microscopia de luz e fotografadas em câmera fotográfica digital acoplada ao microscópio.

RESULTADOS

A análise das alterações por meio da técnica histoquímica de HE revelou, em todos os animais, áreas necróticas eosinofílicas extensas (“kunkers”) e multifocais na derme superficial e profunda, contendo imagens negativas de estruturas tubuliformes, septadas e com ramificações em ângulo reto (“pseudo-hifas”). Associados às “pseudo-hifas”, notaram-se infiltrado inflamatório difuso e intenso, principalmente na periferia dos “kunkers”, predominando eosinófilos e, também, infiltrado neutrofílico e mononuclear moderado (macrófagos, linfócitos, plasmócitos e raras células gigantes de Langerhans). Havia tecido de granulação exuberante, com proliferação de fibroblastos, fibras colágenas e neovascularização acentuada. As ulcerações na epiderme apresentavam infiltrado neutrofílico moderado a intenso e, por vezes, colônias bacterianas basofílicas superficiais.

Por meio da técnica histoquímica de coloração pela prata (GMS) nas áreas de necrose, visualizou-se grande quantidade de “pseudo-hifas” longas, esparsamente septadas, de contornos irregulares e bem delimitados, seccionadas longitudinal e transversalmente, coradas em preto ou marrom-escuro, tendendo a formar ângulos retos, localizadas principalmente na periferia dos “kunkers”, características de *Pythium insidiosum*.

O diagnóstico histopatológico foi de dermatite piogranulomatosa, focal extensa, acentuada, associada a “pseudo-hifas” características de *Pythium insidiosum* (pitiose cutânea), nos 12 animais desta pesquisa. O diagnóstico de pitiose foi confirmado em 100% dos casos pela imunomarcação positiva (LSAB) para *Pythium insidiosum*, caracterizada pela visualização de estruturas ramificadas e septadas (Fig. 1).

DISCUSSÃO

Todos os animais deste estudo possuíam histórico de habitar pastos com áreas alagadiças, ambiente considerado como predisponente para que ocorra a infecção por *Pythium insidiosum*. Sabe-se que a enfermidade causada por esse “pseudo-fungo” quase que invariavelmente está localizada nos apêndices locomotores ou nas partes baixas do corpo que entram em contato com o material vegetal submerso, contaminado pelo “pseudo-fungo”, sendo os membros de equinos a região anatômica mais frequentemente acometida; pois, ao adentrar os alagados para beber água ou se alimentar de capim, na época chuvosa, no Pantanal mato-grossense, os animais adquirem a doença (Mendoza et al., 1993; Santurio et al., 2004).

O histórico, a caracterização clínica macroscópica e histopatológica da ferida, encontrados nos animais deste estudo, apresentavam semelhanças com os estudos envolvendo a pitiose equina descritos por Bridges e Emmons (1961), Miller e Campbell (1982), Carvalho et al. (1984), Mendoza et al. (1996) e Reis Jr. e Nogueira (2002). Após a análise dos tecidos colhidos das feridas suspeitas de pitiose, encontravam-se áreas de necrose com estruturas cilíndricas filamentosas (“pseudo-hifas”), de coloração verde-escuro, com paredes espessadas, com septos ramificados em ângulo reto para a direita, com 2,5 a 8,5µm de diâmetro, localizados nas margens de uma massa granulomatosa eosinofílica, evidenciados por métodos histoquímicos com coloração argêntica, que se constituíam evidências histológicas fortes da presença da pitiose (Miller e Campbell, 1984; Mendoza et al., 1996; Headley e Arruda, 2004).

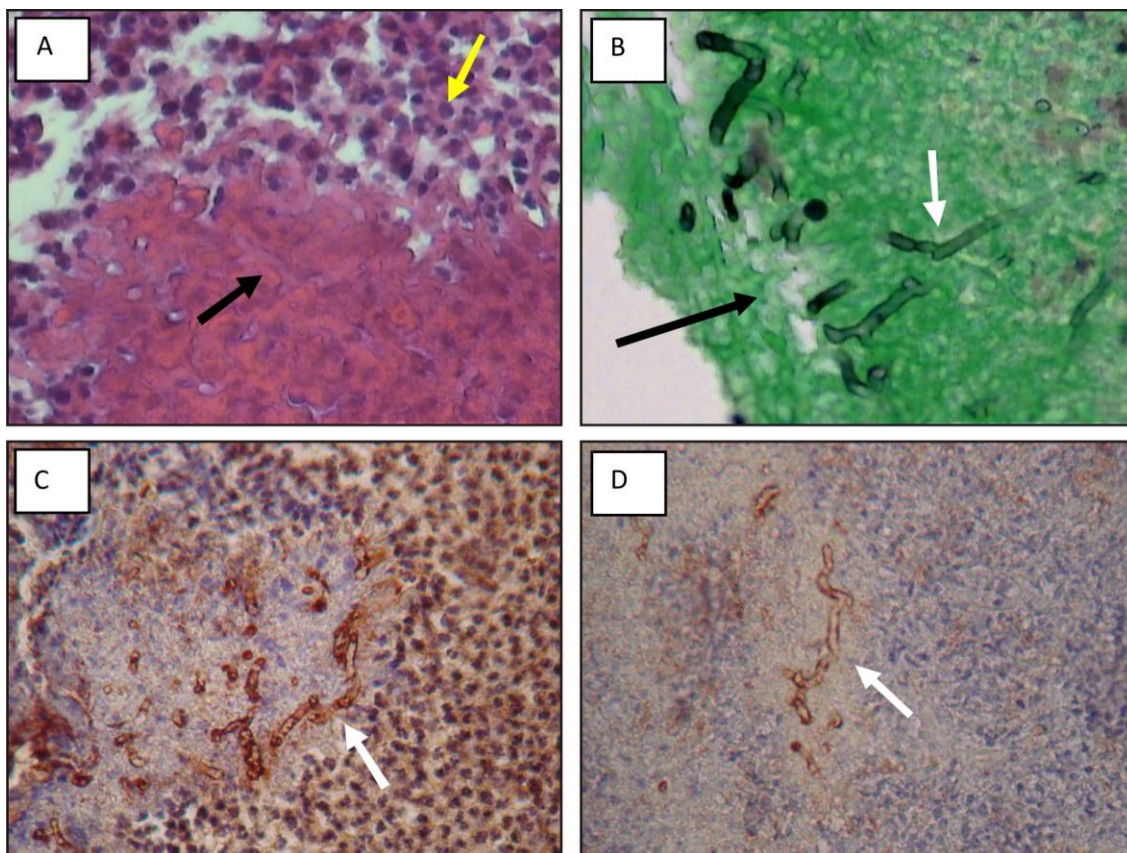


Figura 1. Equino. Tecido de granulação e “kunkers” extraídos das feridas de pitiose nos membros. (A) infiltrado inflamatório (seta amarela) e imagens negativas de “pseudo-hifas” (seta preta) na área de necrose. HE, obj.40x. (B) “Pseudo-hifas” localizadas na periferia dos “kunkers” (seta preta) e a tendência das “pseudo-hifas” em formar ângulos retos (seta branca) (GMS, obj.40x), com características morfológicas de *Pythium insidiosum*. (C, D) Imunomarcção positiva (LSAB) para *Pythium insidiosum* (setas brancas). Imuno-histoquímica, obj.40x.

Porém, deve-se ressaltar que, em estudo recente, 17% dos casos de diagnóstico histopatológico prévio de pitiose, pela coloração à base de prata, foram considerados negativos após pesquisa do *Pythium insidiosum* por imuno-histoquímica (Reis Jr. e Nogueira, 2002; Headley e Arruda, 2004). A basidiobolomicose e conidiobolomicose são granulomas cutâneos micóticos causados, respectivamente, por *Basidiobolus haptosporus* e *Conidiobolus coronatus*, facilmente confundidos com a pitiose (Miller e Campbell, 1984).

Neste estudo, a caracterização clínica das feridas granulomatosas e o exame histopatológico sugestivo de pitiose asseguraram diagnósticos positivos para *Pythium insidiosum* em todos os animais estudados, resultados que foram confirmados como positivos pela técnica de

imuno-histoquímica; pois, de acordo com Reis Jr. e Nogueira (2002), a técnica de imunoperoxidase apresenta maior especificidade para a detecção de *Pythium insidiosum* em comparação com a coloração pela prata (GMS), corroborando Brown *et al.* (1988). A probabilidade de falso positivo por imuno-histoquímica é pequena, uma vez que as “pseudo-hifas” apresentam moléculas antigênicas com epítomos específicos do reino Stramenopila, não encontradas nas hifas dos fungos zigomicetos (Mendoza *et al.*, 1997).

Observou-se, então, com este estudo, que, apesar da maior especificidade oferecida pela técnica de imuno-histoquímica, o exame histopatológico, associado a uma avaliação clínica criteriosa da ferida, são confiáveis e podem ser empregados na triagem de casos de pitiose cutânea em

equinos (Reis Jr. e Nogueira, 2002), uma vez que todas as biópsias colhidas de feridas suspeitas de pitiose cutânea foram submetidas aos dois meios de diagnóstico, sendo observados 100% de paridade entre as técnicas, confirmando tratarem-se de casos positivos para *Pythium insidiosum*.

CONCLUSÃO

Conclui-se que a caracterização clínica das feridas granulomatosas com aspecto de pitiose em equinos, associada ao resultado histopatológico sugestivo para pitiose cutânea equina, constituem métodos de diagnóstico confiáveis, os quais podem ser confirmados pela técnica de imuno-histoquímica.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. Santúrio J.M., por fornecer os anticorpos primários para a técnica de imuno-histoquímica; à Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos e à Universidade de Cuiabá, pelo apoio.

REFERÊNCIAS

- BLAVA, J.S.; OLLHOFF, D.R.; GONÇALVES, R.C.; BIONDO, A.W. Zigomicose em equino: revisão. *Rev. Acad.*, v.5, p.225-230, 2007.
- BRIDGES, C.H.; EMMONS, C.E. A phycomycosis of horse caused by *Hyphomyces destruens*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.138, p.579-589, 1961.
- BROWN, C.C.; MCCLURE, J.J.; TRICHE, P.; CROWDER, B.A. Use of imunohistochemical methods for diagnosis equine pythiosis. *Am. J. Vet. Res.*, v.49, p.1866-1868, 1988.
- CARVALHO, E.C.Q.; ROSA, C.A.R.R.; CRUZ, L.C.H.; SCAFF, R.M. "Hyphomyces destruens". Agente da "ferida brava" (Hifomicose) em equinos do Pantanal de MT. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 19., 1984, Cuiabá, MT. *Anais...* São Paulo. SP: [s.n.] 1984 (CD Rom, resumo).
- CHAFFIN, M.K.; SCHUMACHER, J.; HOOPER, N. Multicentric cutaneous pythiosis in a foal. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.201, p.310-312, 1992.
- CHAFFIN, M.K.; SCHUMACHER, J.; MCMULLAN, W.C. Cutaneous pythiosis in the horse. *Vet. Clin. North Am., Eq. Pract.*, v.11, p.91-103, 1995.
- FISCHER, J.R.; PACE, L.W.; TURK, J.R. et al. Gastrointestinal pythiosis in Missouri dogs: eleven cases. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.6, p.380-382, 1994.
- GIMENO, E.J.; MASSONE, A.R.; PORTIANSKY, E.L. Introducción a las técnicas de inmunohistoquímica y aplicaciones en patología veterinaria. In: CURSO INTERNACIONAL DE POSGRADO EN TECNICAS DE INMUNOHISTOQUIMICA, LECTINHISTOQUIMICA Y MICROSCOPIA ELETRÓNICA, 10., 1999, La Plata, Argentina. *Anais...* La Plata, Argentina: [s.n.] 1999. (CD Rom, Resumo).
- GROOTERS, A.M.; GEE, M.K. Development of a nested polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Pythium insidiosum*. *J. Vet. Intern. Med.*, v.16, p.147-152, 2002.
- HEADLEY, S.A.; ARRUDA JR, H.N. Pitiose cutânea equina: um relato de quatro casos. *Cienc. Rural*, v.34, p.289-292, 2004.
- LEAL A.B.M.; LEAL, A.T.; SANTURIO, J.M. et al. Pitiose equina no Pantanal brasileiro: aspectos clínicos patológicos de casos típicos e atípicos. *Pesq. Vet. Bras.*, v.21, p.151-156, 2001a.
- LEAL, A.T.; LEAL, A.B.M.; FLORES, E.F.; SANTURIO, J.M. Pitiose. *Cienc. Rural*, v.31, p.735-743, 2001b.
- KAUFMAN, L.; MENDOZA, L.; STANDARD, P.G. Immunodiffusion test for serodiagnosing subcutaneous zygomycosis. *J. Clin. Microbiol.*, v.28, p.1887-1890, 1990.
- MEIRELES, M.C.A.; RIET-CORREA, F.; FISCHMAN, O. et al. Cutaneous pythiosis in horses from Brazil. *Mycoses*, v.36, p.139-142, 1993.
- MENDOZA, L.; HERMANDEZ, F.; AJELLO, L. Life cycle of the human and animal oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. *J. Clin. Microbiol.*, v.31, p.2967-2973, 1993.

- MENDOZA, L.; KAUFMAN, L.; MANDY, W.; GLASS, R. Serodiagnosis of human and animal pythiosis using an enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v.4, p.715-718, 1997.
- MENDOZA, L.; AJELLO, L.; MCGINNIS, M.R. Infections caused by the oomycetus pathogen *Pythium insidiosum*. *J. Med. Mycol.*, v.6, p.151-164, 1996.
- MENDOZA, L.; ALFARO, A.A. Equine pythiosis in Costa Rica: report of 39 cases. *Mycopathol.*, v.94, p.123-129, 1986.
- MILLER, R.I.; CAMPBELL, R.S.F. Clinical observations on equine phycomycosis. *Aust. Vet. J.*, v.58, p.221-226, 1982.
- MILLER, R.I.; CAMPBELL, R.S.F. The comparative pathology of equine cutaneous phycomycosis. *Vet. Pathol.*, v.21, p.325-332, 1984.
- PEDROSO, P.M.O.; BEZERRA, JR, P.S.; PESCADOR C.A. *et al.* Diagnóstico imunohistoquímico de pitiose cutânea em equinos. *Acta Sci. Vet.*, v.37, p.49-52, 2009.
- PURCELL, K.L.; JOHNSON, P.J.; KREEGER, J.M.; WILSON D.A. Jejunal obstruction caused by a *Pythium insidiosum* granuloma in a mare. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.205, p.337-339, 1994.
- REIS JR, L.; NOGUEIRA, R.H.G. Estudo anatomopatológico e imuno-histoquímico da pitiose em equinos naturalmente infectados. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.54, p.358-365, 2002.
- RODRIGUES, C.A.; LUVIZOTTO, M.C.R. Zigomicose e pitiose cutânea em equinos: diagnóstico e tratamento. *Rev. Educ. Cont. CRMV-SP*, v.3, p.3-11, 2000.
- SANTURIO, J.M.; ALVES, S.H.; PEREIRA, D.B.; ARGENTA J.S. Pitiose: uma micose emergente. *Acta Sci. Vet.*, v.34, p.1-14, 2006a.
- SANTURIO, J.M.; CATTO, J.B.; CAMASTRI FILHO, J.A. *et al.* Ferida da moda: epidemiologia, diagnóstico, tratamento e experiência com equinos infectados no Pantanal. *Comunicado Técnico 34, Embrapa Pantanal*, p.1-8, 2004.
- SANTURIO, J.M.; LEAL, A.T.; LEAL, A.B. *et al.* Teste de ELISA indireta para o diagnóstico sorológico de pitiose. *Pesq. Vet. Bras.*, v.26, p.47-50, 2006b.
- SCHURKO, A.M.; MENDOZA, L.; DE COCK, A.W.A.M. *et al.* Development of a Species-Specific Probe for *Pythium insidiosum* and the Diagnosis of Pythiosis. *J. Clin. Microbiol.*, v.42, p.2411-2418, 2004.
- VANITTANAKOM, N.; SUPABANDHU, J.; KHAMWAN, C. *et al.* Identification of emerging human-pathogenic *Pythium insidiosum* by serological and molecular assay-based methods. *J. Clin. Microbiol.*, v.42, p.3970-3974, 2004.