



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO HENRÍQUEZ UREÑA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA

Detección de Anticuerpos IgG Anti *Pythium insidiosum* Mediante el Método ELISA en Suero Canino del Distrito Municipal La Victoria, República Dominicana

Anteproyecto de Trabajo de Grado Sustentado por:

Valeria Franco Mora

Michelle Marie Sánchez Castillo

Para La Obtención Del Título De Doctor En Medicina Veterinaria

Asesoras

Dra. Silvana González

Dra. Paloma Ortiz

Santo Domingo, D.N., República Dominicana

2022

Agradecimientos

En primer lugar, le damos gracias a Dios por la oportunidad de cumplir este gran paso en nuestras vidas, acercándonos cada día más a nuestra vocación de convertirnos en doctoras en Medicina Veterinaria. Nos das la fortaleza y sabiduría necesaria para seguir adelante en momentos de fatiga y agobio.

A la Dra. Paloma Ortiz, por haber dado todo a su alcance para ayudar a Blue, el primer canino diagnosticado con Pitiosis en el país; por habernos introducido esta emergente enfermedad, por sus consejos a lo largo de todo el estudio y por ponernos en contacto con el laboratorio que procesó las muestras. También, le agradecemos habernos abierto las puertas de la clínica Elemental Veterinary Hospital, facilitándonos la centrífuga para la extracción del suero de las muestras.

A la Dra. Silvana González, por su dedicación, disposición y entrega siempre. Por ayudarnos en la correcta elaboración de este proyecto investigativo, incluso cuando no tenía tiempo. Gracias por leer, argumentar y aconsejarnos una y otra vez sobre nuestro estudio. También por cuidar a Blue durante sus últimos momentos de vida, dándole el amor y la compañía que se merecía.

Al Dr. Robert Glass, por su interés en seguir realizando estudios sobre los oomicetos en la República Dominicana, por siempre contestar y aclarar nuestras dudas con tanta rapidez y por detenidamente procesar cada una de las muestras obtenidas en este estudio en el Laboratorio Veterinario Pan American de Texas, EEUU.

Al Laboratorio Veterinario Central (LAVECEN) en especial a la Dra. Julia Vargas, por su orientación sobre la exportación de las muestras.

A Vanessa Moya por su impresionante, dedicada y hermosa labor de cuidar, proteger y alimentar a todos los caninos y felinos de la fundación Ecoportal Dominicana. También, por recibirnos allá con una sonrisa siempre a pesar de todas las inquietudes que enfrenta en su día a día con las inundaciones del refugio. Gracias por ser nuestra guía en la zona de La Victoria.

A Beбето y Cocón, gracias por acompañarnos en nuestra búsqueda y sujeción de los animales callejeros de La Victoria, mostrando siempre tanta disposición y agrado.

A todos los propietarios de perros muestreados, que confiaron en nosotras y que se interesaron en escuchar y aprender sobre la investigación.

A nuestros compañeros, que hicieron el trayecto de la carrera mucho más divertido, en especial a Diego Hernández, María Vásquez, Isabella Pinna, Josué Ceballos, María Romero, Laura Rojas, Aurora Rodríguez, Lía Colón, Laura Romero. Gracias por su apoyo durante todo el proyecto.

A todos nuestros profesores de la Universidad Nacional Pedro Henríquez Ureña (UNPHU), gracias por brindarnos las herramientas necesarias para guiarnos hacia el desarrollo de nuestra profesión. Gracias a su dedicación y consejos de vida somos quienes somos hoy en día.

Todos fueron una pieza indispensable para la elaboración de este trabajo de grado. Gracias infinitas.

Dedicatoria

A mis ángeles guardianes: Aba, abuela Caridad, Muma y Lola, por acompañarme en cada paso.

A mis padres Antonio Franco y Gina Mora, por el tiempo, el cariño y la confianza depositada en mí. Gracias a ustedes he podido acercarme poco a poco a cumplir el sueño por el que tanto me he esforzado.

A mis hermanos Pedro, Laura y Gina, por el apoyo incondicional a pesar de haber escogido un camino distinto. Gracias por impulsarme a trabajar duro por lo que quiero conseguir.

A todas mis perritas, por enseñarme el amor más genuino, puro y leal, y ser mi mayor razón para siempre querer mejorar como profesional.

A mis futuros pacientes, como muestra de dedicación y entrega. Me comprometo a ustedes, a indagar la raíz de su padecimiento, estar cuando me necesiten y siempre brindarles lo mejor que tengo para ofrecer.

Por último, dedico esta investigación a la Medicina Veterinaria, una pasión que solo algunos entienden, de la cual siempre habrá tanto por aprender.

- Valeria Franco Mora

Le dedico esta tesis en primer lugar a mi mamá, Iris Castillo, gracias por ser la principal promotora de mis sueños, todo lo que soy y seré es gracias a ti. Gracias por apoyarme en cada paso de mi carrera. Espero alcanzar a ser, aunque sea la mitad de lo que eres, eres mi ejemplo a seguir.

A mis Abuelos, Doña Dulce, Doña Laura, y Don Víctor, gracias por enseñarme a respetar y amar a los animales desde chiquita, mi pasión es construida en base a sus enseñanzas, si hoy estoy aquí es gracias a ustedes.

A mis hermanas Laura y Mariel Sánchez, por compartir conmigo este amor tan bonito hacia los animales, por todos los animales que rescataron durante mis estudios, cada uno de ellos represento un reto en mi crecimiento profesional y los recuerdo con mucho cariño a todos.

A mi pareja, Diego Hernández, eres un pilar esencial en mi vida, te dedico esta tesis con mucho amor, gracias por ser el papa de mis hijos perrunos Mila y Pepper, estoy eternamente agradecida contigo por dedicarme tu tiempo, tu cariño, tu paciencia, por ser mi chofer, mi confidente, mi mejor amigo, no hubiese podido lograr esta meta sin tu apoyo.

Los amo infinitamente a todos, estoy agradecida y feliz por el granito de arena que cada uno ha colocado en mí para yo lograr esta meta, y convertirme en la profesional que aspiro a ser. Prometo dedicar todo mi ser a esta carrera que tanto amo y que es mi sueño principal ejercer.

- Michelle Sánchez

INDICE

PRIMERA PARTE	8
Capítulo I: Introducción y Objetivos	9
Introducción.....	9
Objetivos	12
Objetivo General	12
Objetivos Específicos	12
SEGUNDA PARTE	13
Capítulo II: Antecedentes	14
Antecedentes Internacionales	14
Antecedentes Nacionales.....	16
Capítulo III: <i>Pythium spp</i>	18
Generalidades	18
Biología del <i>Pythium insidiosum</i>	19
Morfología.....	19
Fisiopatología	20
Distribución Geográfica	21
Signos Clínicos de Pitiosis en Caninos	21
Métodos Diagnósticos	22
Tratamiento.....	24
Prevención	26

TERCERA PARTE.....	27
Capítulo IV: Materiales y Métodos.....	28
Localización del Estudio	28
Tamaño de la Muestra	28
Selección de la Muestra.....	29
Procedimiento de la Toma de Muestra.....	30
Localización de Análisis de Laboratorio	30
Instrumentos Utilizados.....	31
Equipos y Materiales	31
Descripción del método de diagnóstico ELISA utilizada en el laboratorio Pan American Veterinary Labs PAVL.....	32
Interpretación de los Resultados.....	34
Capitulo V: Resultados	35
Capítulo VI: Discusión de Resultados	37
Capítulo VII: Conclusión y Recomendaciones	38
Conclusión.....	38
Recomendaciones	39
CUARTA PARTE	41
Referencias Bibliografías	41
Anexos.....	46
Anexo I: Tablas.....	46
Tabla 1. Datos de los caninos muestreados y resultados de la prueba serológica ELISA para <i>Pythium insidiosum</i> , <i>Lagenidium spp.</i> y <i>Paralagenidium spp.</i>	46

Tabla 2. Interpretación del puntaje de los resultados (Pan American Veterinary Laboratories).....	48
Tabla 3. Resultados de las pruebas diagnósticas ELISA de las muestras serológicas colectadas en la provincia La Altagracia y La Romana (Ruiz Solis & Richardson Santana, 2020).	49
Anexos II: Gráficas.....	50
Gráfica 1. Frecuencia de detección de anticuerpos anti <i>P. insidiosum</i> en suero canino en el Distrito Municipal La Victoria en 124 caninos muestreados.	50
Gráfica 2. Porcentaje de la exposición de los caninos muestreados a zonas inundables..	50
Gráfica 3. Porcentaje de caninos con resultados ELISA de límite intermedio para <i>P. insidiosum</i> según el sexo.	51
Gráfica 4. Porcentaje de caninos con resultados ELISA de límite intermedio para <i>P. insidiosum</i> según la edad..	52
Gráfica 5. Signos clínicos observados en los caninos con resultados de límite intermedio para <i>P. insidiosum</i>	51
Anexos III. Figuras.....	53
Figura 1. Mapa de Santo Domingo donde se delimita La Victoria como zona urbana (Ministerio de Economía, Planificación y Desarrollo, 2015).....	53
Figura 2. Ubicación y Mapa del Distrito Municipal de La Victoria (Defensa Civil Republica Dominicana, 2014).	54
Figura 3. Cuencas y subcuencas hidrográficas de la provincia Santo Domingo (Secretaría de Estado de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2007).....	54
Figura 4. Zonas Susceptible a inundaciones la provincia Santo Domingo (Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2003).....	55

Figura 5. Áreas Protegidas de Santo Domingo. Se observa el Parque Nacional Humedales del Ozama ubicado en las delimitaciones del Distrito Municipal La Victoria (GIZ y Ministerio Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2016).....	55
Figura 6. Blue, Primer caso de Pitiosis canina diagnosticado en República Dominicana (Ortiz, 2019).	56
Figura 7. Materiales utilizados para la parte práctica del estudio.	56
Figura. 8, 9 10 y 11: Recolección de muestras de sangre de la vena yugular o cefálica durante la parte práctica de la investigación, en el Distrito Municipal La Victoria entre los meses marzo y mayo del año 2022.	57
Figuras 12 y 13: Colocación de muestras en tubos recolectores estériles, identificados individualmente.	58
Figuras 14 y 15: Muestras almacenadas en nevera portátil con hielo.	59
Figura 16: Suero obtenido por el método de centrifugación.	59
Figura 17: Tubos con suero congelados.	60
Anexo IV. Resultado de Biopsia caso Blue post Gastrostomía (Ortiz, 2019).....	61
Anexo V. Diagnóstico caso Blue por el método ELISA (Ortiz, 2019).....	62
Anexo VI. Necropsia Caso Blue (Ortiz, 2019).....	63
Anexo VII. Cálculos estadísticos para determinar el tamaño de la muestra.	64
Anexo VIII. Formulario de recolección de datos.....	64
Anexo IX. Encarte informativo sobre el <i>Pythium insidiosum</i> para entregar a los propietarios de los caninos del estudio.	65

PRIMERA PARTE

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Capítulo I: Introducción y Objetivos

Introducción

La Pitiosis es una enfermedad granulomatosa causada por el oomiceto *Pythium insidiosum*, también llamada infección por moho de agua o cáncer de pantano. Esta afecta una amplia variedad de especies, principalmente a caninos, equinos y humanos (W, C, & K, 2013) que tienen acceso a pantanos, lagos, aguas estancadas o zonas inundables. Se reconoce como una enfermedad emergente debido al cambio climático (Laohapensang, R.B, J, & N, 2009).

Desde las últimas dos décadas, el *Pythium spp.* ha surgido como un patógeno de creciente importancia a nivel mundial. Tanto en medicina humana, como en medicina veterinaria, el espectro clínicamente relevante se ha ampliado de manera constante a medida que se reconocen con mayor frecuencia infecciones oportunistas por este pseudohongo que no se reconocía como patógeno (Berryessa et al., 2008; White et al., 2008).

En el caso de la especie canina, la infección por *P. insidiosum* es más frecuente en perros jóvenes y en adultos inmunosuprimidos (Grooters A., 2003). Los mismos contraen la enfermedad por ingestión o contacto directo con agua contaminada con el microorganismo, pudiendo causar afecciones cutáneas y/o gastrointestinales (GI). Regularmente presentan síntomas muy generales y fácilmente confundibles en el día a día de la clínica de pequeños animales, lo que conlleva a que la enfermedad pueda ser subdiagnosticada hasta el punto de cursar con síntomas severos y progresivos que pueden llegar a ser mortales. Por esta razón, se debe tomar en cuenta como diagnóstico diferencial la Pitiosis en cualquier canino joven con signos crónicos de enfermedad GI, una masa abdominal palpable o evidencia histológica de gastroenteritis piogranulomatosa o eosinofílica (Berryessa, Marks, Pesavento, & et al., 2008).

Se estima que menos del 10% de los perros se curan solo con medicamentos. La única opción de tratamiento para una posible cura es la resección completa del tejido afectado mediante cirugía combinada con la inmunoterapia. En el tracto GI, la Pitiosis clínicamente simula un carcinoma invasivo, por lo que debe intentarse una extirpación quirúrgica agresiva. Para la Pitiosis cutánea que involucra una extremidad, puede ser necesaria la amputación. El pronóstico de la Pitiosis en caninos es reservado (Michigan State University, s.f.).

La República Dominicana ofrece un clima tropical con altos niveles de temperatura y humedad todo el año, logrando que sean las condiciones perfectas para el crecimiento y el desarrollo del *Pythium spp.* Por su localización geográfica en medio del Caribe, cuenta con una temporada ciclónica que convierte la isla propensa a inundaciones a lo largo de todo el territorio nacional (Diario Libre, 2020), creando la posibilidad de que existan más casos positivos de los que han sido reportados.

El primer caso diagnosticado en la República Dominicana ocurrió en el 2019 por la Dra. Paloma Ortiz en Santo Domingo, lo que impulsó la investigación en caninos. Previo a este caso, se desconocía la enfermedad en el país. En el año 2020, las Dras. Keila D. Ruiz Solís y Evis M. Richardson Santana realizaron un estudio titulado “Identificación de anticuerpos contra *Pythium insidiosum*, a través de Ensayo por Inmunoadsorción Ligada a Enzimas en caninos en las Provincias La Altagracia y La Romana”. En el mismo, se muestrearon noventa y nueve (99) caninos y se identificaron nueve casos positivos, surgiendo la incógnita de cuál realmente es la distribución de la enfermedad ya que al ser un descubrimiento muy reciente, no se cuenta con suficiente documentación sobre el alcance que posee (Ruiz Solis & Richardson Santana, 2020).

Este trabajo de grado sirve con la intención de estudiar y analizar la presencia del *Pythium insidiosum* en el Distrito Municipal La Victoria, ubicado en el municipio de Santo

Domingo Norte. Esta localización fue escogida por contar con el ambiente necesario para la proliferación del microorganismo debido a las altas inundaciones que presenta y por ser una localidad donde existe una alta población de mamíferos, aumentando las probabilidades de que estos estén expuestos a la enfermedad.

Los datos recopilados en este trabajo sirven como documentación de la extensión de la enfermedad en el territorio nacional e internacional debido a que los datos serán analizados por el Laboratorio Veterinario Pan American en Texas, Estados Unidos. Este laboratorio es pionero en la investigación y diagnóstico del *Pythium insidiosum*, ofreciendo a su vez el tratamiento inmunoterapéutico que ha demostrado eficacia para tratar la enfermedad.

Objetivos

Objetivo General

- Detección de Anticuerpos IgG Anti *Pythium insidiosum* Mediante el Método ELISA en Suero Canino del Distrito Municipal La Victoria, República Dominicana.

Objetivos Específicos

- Determinar la presencia del *Pythium insidiosum* en el Distrito Municipal La Victoria.
- Determinar si existe predisposición del *Pythium insidiosum* en caninos en cuanto a sexo y edad.
- Correlacionar la presencia de humedales cercanos a los caninos positivos vs negativo.

SEGUNDA PARTE
REVISIÓN LITERARIA

Capítulo II: Antecedentes

Antecedentes Internacionales

El *Pythium spp.* fue descrito por primera vez en 1884 por el Dr. Smith asociado a lesiones en equinos. Fue aislado por De Haan y Hoogkamer en el año 1901 y el agente en ese momento se denominó *Hyphomycosis destruens equi*, en Indonesia (de Haan and Hoogkamer, 1901). En 1961, Bridges y Emmons finalmente llamaron la enfermedad “Phycomycosis” porque pensaban que el organismo era un Zigomiceto, probablemente una Mortiella (Bridges and Emmons, 1961).

Austwick y Copland en 1974 descubrieron que cuando había crecimiento de colonias en Agar Sabouraud observaban también crecimiento de zoosporas. Así concluyeron que *H. destruens* no era un hongo en sí, sino que era un oomiceto perteneciente al género *Pythium spp.* Más tarde, Chandler en 1980 propuso el término de la enfermedad que conocemos hoy en día, denominada Pitiosis (Austwick and Copland, 1974).

En el año 1987, el oomiceto fue formalmente descrito por De Cock como *Pythium insidiosum* al observar su esporulación sexual y, casi simultáneamente, Shipton, propuso el nombre *Pythium destruens*. Hoy en día *P. destruens* es considerado sinónimo de *P. insidiosum* (Mendoza L. M., Antigenic relationship between *Pythium insidiosum* de Cock, 1989) (Dykstra, 1999).

En cuanto a los estudios referentes a la enfermedad en caninos, en el 1999 Dykstra publicó “Descripción de la Pitiosis cutánea y subcutánea en quince perros” donde se describieron quince (15) casos positivos. Los animales afectados fueron caninos entre nueve

meses y cuatro años; cinco fueron machos y diez fueron hembras. Las lesiones reportadas fueron de carácter crónicas, nodulares y ulceradas en la pared torácica, extremidades y regiones perianales. Tanto la inmunoterapia como la terapia antifúngica con anfotericina B, nistatina liposomal, itraconazol o ketoconazol no tuvieron éxito. El único canino que sobrevivió sufrió la amputación de la extremidad afectada; por lo tanto, el pronóstico de la Pitiosis cutánea de estos perros fue reservado (Dykstra, 1999).

En el 2002, Amy Grooters publicó un estudio nombrado “Desarrollo y evaluación de un Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA) para el serodiagnóstico de Pitiosis en perros”. Se evaluó el suero de cuarenta y tres perros (43) con Pitiosis, ocho perros con Lagenidiosis, otro género de oomicosis canina, dieciséis (16) perros con infecciones fúngicas, veintidós (22) perros con enfermedades gastrointestinales o cutáneas no fúngicas y cincuenta y cinco (55) perros sanos. Los resultados se expresaron como porcentaje de positividad (PP) en relación con un control fuerte positivo en cada placa. Las medianas y los rangos para cada uno de los cinco grupos fueron los siguientes: Pitiosis (81,7%, 50,6-98,5%), Lagenidiosis (17,3%, 11,3-29,2%), otras infecciones por hongos o algas (8,2%, 4,7-15,4%), enfermedades gastrointestinales o cutáneas no fúngicas (6,2%, 3,9-20,7%) y perros sanos (6,7%, 3,0-15,2%). Además, los valores de ELISA medidos después de una terapia quirúrgica exitosa en dos perros mostraron una disminución de concentraciones de anticuerpos anti *P. insidiosum* al rango normal aproximadamente dos meses después del tratamiento. Se concluyó que ELISA es un prueba sensible y específica para el diagnóstico de Pitiosis canina, y puede ser una herramienta útil para monitorear la respuesta médica o la terapia quirúrgica (Grooters, Leise, López, Gee, & O'Reilly, 2002).

Antecedentes Nacionales

En el 2019, la Dra. Paloma Ortiz reportó el primer caso en la República Dominicana en su manuscrito en preparación titulado “Primer Caso Confirmado de Pitiosis Multisistémica en un perro en la República Dominicana”. En éste explica el caso clínico de Blue, un Golden Retriever entero de un año de edad que llegó a consulta en julio, por presentar inapetencia, vómitos y emaciación. En la anamnesis, el dueño reportó varios viajes con el paciente a la provincia de Samaná, región de clima húmedo y abundantes cuerpos hídricos (Figura 6).

Se realizó una endoscopia donde se observó una masa vascularizada y ulcerada en el estómago del paciente. Se procedió a removerla y remitirla a histopatología (Anexo 4) donde se reportó un diagnóstico presuntivo de *P. insidiosum*. Los resultados del método ELISA fueron concluyentes con la enfermedad (Anexo 5) y se logró confirmar el diagnóstico con Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). A pesar de que la Dra. Ortiz le administró al paciente la inmunoterapia suministrada por el Laboratorio Veterinario Pan American (PAVL), lamentablemente Blue falleció en diciembre del 2019. En la necropsia se evidenciaron rastros de una respuesta nodular inflamatoria diseminada en todos sus órganos, incluyendo el corazón, cerebro, entre otros (Anexo 6).

Las Dras. Fernández y Bayón realizaron una investigación de trabajo de grado en la Universidad Nacional Pedro Henríquez Ureña titulado “Detección de Anticuerpos IgG anti *Pythium insidiosum* en Suero Equino, Utilizando el Método ELISA, en Zonas Inundables de Tres Municipios de la Provincia de Monte Plata, República Dominicana durante los meses de agosto y septiembre del año 2020”. En dicho estudio se tomaron muestras de sangre de cincuenta y seis (56) equinos y se detectaron dos casos de caballos con presencia de anticuerpos IgG anti *Pythium insidiosum*, con porcentaje entre 151-199% indicando un límite intermedio.

El límite intermedio puede deberse a que los animales alguna vez estuvieron expuestos al microorganismo o que padecieron la enfermedad y crearon anticuerpos.

En el 2020 se realizó un trabajo de grado titulado “Identificación de Anticuerpos contra *Pythium insidiosum*, a través de Ensayo por Inmunoadsorción Ligada a Enzimas, en caninos en las Provincias La Altagracia y La Romana” en la Universidad Central del Este, donde se muestrearon noventa y nueve (99) caninos en las zonas correspondientes. Se reportaron nueve casos positivos y dieciocho (18) casos de límite intermedio referentes a la enfermedad. Entre los resultados de este estudio se reportó que un 32% (6 caninos) presentó algún ganglio linfático aumentado de tamaño, un 26% (5 caninos) mostró pérdida de peso, 11% (2 caninos) presentaron vómito, y el 11% restante fue totalmente asintomático (Ruiz Solis & Richardson Santana, 2020) (Tabla 3).

Capítulo III: *Pythium spp*

Generalidades

Los oomicetos son microorganismos protistas que viven en el suelo o en el agua y pertenecen al reino Stramenopila. Se les conoce como pseudohongos porque muchos crecen en medios micológicos y producen hifas vegetativas que son morfológicamente similares a las de los hongos de la clase Zygomycotas (Grooters A. , 2003). La presencia de agua facilita la formación de zoosporas, que es la forma infectiva del *P. insidiosum*, lo que conduce a que esto sea un requisito para su propagación (Supabandhu et al. 2008). Éste mayormente crece y se desarrolla en superficies cercanas al agua, pero puede encontrarse en la tierra al haber entrado en contacto con agua contaminada (Mendoza et al., 1993, 1996). La mayoría de los casos se han reportado después de lluvias fuertes o inundaciones dado que esto actúa como un recurso natural para su expansión a nuevas áreas (Miller, 1983) (Mendoza L. H., 1993).

El género *Pythium spp.* tiene alrededor de 200 especies, pero solo el *Pythium insidiosum* ha sido demostrado que es patógeno para los mamíferos, produciendo la enfermedad denominada Pitiosis (Michigan & Mendoza, s.f.). Principalmente ha sido reportada en caninos, equinos y humanos, pero también se han reportado ciertos casos en felinos, ovinos, aves y bovinos (Berryessa, 2008). En caninos es una enfermedad que presenta lesiones cutáneas, gastrointestinales y/o multisistémicas (F, Perazzo Y, Ortega I, Torres, & Lopeza, 2012), siendo la gastrointestinal la manifestación más frecuente.

En localizaciones endémicas de la enfermedad (Hilton, Tepedino, Gleen, & Merkel, 2016), o en países como República Dominicana donde se carece de herramientas que guíen a un rápido diagnóstico y a un tratamiento efectivo, la enfermedad provoca un riesgo de alta

mortalidad. El diagnóstico prematuro es un factor crucial para un mejor pronóstico de los pacientes con Pitiosis.

Biología del *Pythium insidiosum*

Morfología

A pesar de que el *P. insidiosum* no es un hongo verdadero, produce micelios como los hongos. La diferencia principal entre estos es que los oomicetos carecen de ergosterol en su membrana citoplasmática y presentan un tallo diploide y cenocítico. También, sus paredes celulares no contienen quitina y están compuestas de celulosas y betaglucanos (Wim Gaastra, 2010).

Las zoosporas son células de un solo núcleo sin pared celular que pueden nadar con la ayuda de dos flagelos; un flagelo anterior que funciona como timón y un flagelo posterior el cual es responsable del movimiento de la zoospora a través del agua (Wim Gaastra, 2010). Muestran quimiotaxis, son estimulados por la presencia de iones como Potasio (K^+), Calcio (Ca^{2+}), Magnesio (Mg^{2+}) y se vuelven enquistados una vez que entran en contacto con tejido vegetal dañado o en la herida de un mamífero (Austwick, 1974) (Mendoza L. M., Antigenic relationship between *Pythium insidiosum* de Cock and its synonym *Pythium destruens* Shipton, 1987), (Mendoza L. P., 1988) (Chaiprasert, 1990) (Mendoza L. H., 1993).

Fisiopatología

En cuanto a su proceso reproductivo, posee dos ciclos, es tanto sexual como asexual. En su fase sexual realiza la oogamia en la cual el anteridio fertiliza un oogonio para producir una oospora (Mendoza L. , 2016) y, en su fase asexual, el organismo desarrolla zoosporas biflageladas en ambientes húmedos (Alexopoulos et al., 1996). Se considera que las zoosporas son los propágulos infecciosos y su producción comienza con la formación de esporangios que se desarrollan a partir de hifas que han colonizado ciertos tipos de material vegetal.

Los mamíferos tienen dos maneras de infectarse y la vía de entrada del microorganismo determinará la presentación de la enfermedad. A través de ingestión de agua o pasto contaminado causa lesiones gastrointestinales; y mediante quimiotaxis de la zoospora al tejido lesionado causa lesiones cutáneas. Una vez que el tejido objetivo ha sido localizado, las zoosporas producen una glicoproteína que secretan en la superficie cuando se enquistan ayudando a su adherencia (Estrada-Garcia, 1990) (Mendoza L. H., 1993) (Mendoza L. A., 1996). Desarrollan tubos germinativos a una temperatura óptima de 24-36 °C, produciendo hifas que por acción mecánica penetran el tejido produciendo así la enfermedad (Michigan & Mendoza, sf).

En el caso de un animal enfermo que haya fallecido, se recomienda que su cadáver sea cremado para evitar propagación desde tejido infectado en descomposición hacia la tierra ya que pueden existir condiciones ambientales óptimas para el desarrollo de nuevas zoosporas. Hasta el momento no se ha reportado transmisión horizontal ni zoonótica. Otro mamífero se infecta únicamente por ingestión o contacto directo de tejido lesionado con aguas contaminadas.

Distribución Geográfica

La distribución del *P. insidiosum* es relativamente amplia, ocurre normalmente en regiones del Sureste de Asia en los siguientes países: India, Indonesia, Japón, Corea, Nueva Guinea, y es endémica de Tailandia (Ichitani, 1980), (Thianprasit, 1986) (Sohn, 1996).

Se han reportado casos también en países como Argentina, Brasil, Colombia, Venezuela (Mendoza L., 2005), Costa Rica (Mendoza L. A., 1986); (Mendoza L. A., 1990), Guatemala (Mendoza L. A., 1996), Haití (Virgile, 1993), Panamá, Nicaragua (Mendoza L. A., 1986), México y los Estados Unidos (Miller, 1983) (Grooters A. , 2003). Recientemente se reportó el primer caso en la República Dominicana (Paloma Ortiz, 2019).

Signos Clínicos de Pitiosis en Caninos

Se ha reportado de forma cutánea, multisistémica y gastrointestinal, siendo mayormente observada su presentación gastrointestinal. “El hecho de que los perros beban con frecuencia agua estancada y coman pasto que puede contener elementos de *P. insidiosum* explica el elevado número de casos de Pitiosis intestinal en los caninos” indica el Dr. Mendoza (Michigan & Mendoza, s.f.).

Los signos clínicos más frecuentes de la Pitiosis gastrointestinal incluyen vómito, diarrea, anorexia crónica, y masas nodulares a la palpación abdominal que normalmente se ubican en la pared del estómago y/o intestino. Se observa un engrosamiento severo de la mucosa gástrica e intestinal, rara vez se observa en el esófago o en la región faríngea (Grooters A. , 2003). Los hallazgos del laboratorio incluyen eosinofilia, anemia, hiperglobulinemia e hipoalbuminemia. La extensión de la patología hacia los vasos mesentéricos puede provocar

isquemia intestinal, infarto, perforación o hemoabdomen agudo. Además, la infección puede extenderse desde el tracto gastrointestinal hacia tejidos contiguos como el páncreas (Grooters A. , 2003). Histológicamente se puede observar ulceración, atrofia, hiperplasia y abundantes células inflamatorias en la mucosa gastrointestinal (Dr. Mendoza, s.f.).

En la presentación cutánea se presentan lesiones fistuladas, proliferativas, a menudo de rápida expansión con descarga de exudado serosanguinolento que por lo general se encuentran en la cola, las extremidades, el tórax y el abdomen de los caninos. Microscópicamente se observan áreas multifocales de necrosis y abundantes células inflamatorias (Dr. Mendoza, s.f.).

Métodos Diagnósticos

El diagnóstico definitivo del *Pythium insidiosum* se da por tres métodos: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), Western Blot o por diferentes métodos serológicos siendo el más importante la detección de anticuerpos anti *P. insidiosum* mediante el Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas (ELISA).

- A) El diagnóstico molecular por PCR es la técnica sensible para el diagnóstico definitivo, sin embargo, en la práctica diaria no es el método más utilizado por su alto costo y por la necesidad de los caninos presentar lesiones activas a la enfermedad, siendo ya la enfermedad normalmente muy avanzada para su correcto tratamiento (Mendoza L. , 2016).

B) El método por Western Blot es muy específico y sensible, pero por su alto costo y su necesidad de un equipo especial, se utiliza más para fines investigativos que para fines de diagnóstico clínico.

C) En cuanto al diagnóstico del microorganismo en cuestión por los métodos serológicos se encuentran los siguientes:

- 1) El Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA) es uno de los métodos más utilizados en la actualidad ya que es altamente sensible, rápido y no invasivo. Posee un 100% de especificidad y más de un 95% de sensibilidad. Sirve como una herramienta útil para el monitoreo de la respuesta clínica o quirúrgica, también se utiliza para diferenciar los caninos que poseen la enfermedad de aquellos que simplemente han sido expuestos a *P. insidiosum* en medios acuáticos (Grooters, Leise, Lopez, Gee, & O'Reilly, 2002).
- 2) El método por inmunodifusión es la prueba serológica que más se ha usado tanto en medicina humana como en medicina veterinaria. Cuenta con un alto nivel de especificidad, pero con un muy bajo nivel de sensibilidad. Por lo tanto, solo en estadios tempranos de la enfermedad este método da un resultado positivo, excluyendo así la enfermedad crónica y produciendo falsos negativos, lo que conlleva a que de igual manera deba confirmarse la enfermedad utilizando otra prueba más sensible. No es recomendada ya que el 40% de caninos positivos a Pitiosis resultan negativos con esta prueba (Michigan State University, s.f.).

- 3) Por último, las pruebas de anticuerpos inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa son específicas, sensibles y muy útiles para la confirmación del microorganismo en biopsias o cultivos. “Los ensayos con inmunoperoxidasa utilizan anticuerpos anti *P. insidiosum*, policlonales, marcados con peroxidasa para que estos se unan a las hifas en los tejidos lesionados. Estos tejidos son luego observados microscópicamente para identificar las hifas teñidas” (Michigan State University, s.f.).

Existen otros métodos presuntivos como son la determinación del agente por montajes húmedos en 10% Hidróxido de Potasio (KOH), o la observación de hifas por histopatología, en donde la muestra del tejido lesionado es teñida con hematoxilina-eosina o con tinción de plata y visto al microscopio (Wim Gaastra, 2010). La observación de hifas no es un diagnóstico definitivo para *P. insidiosum* debido a que son indistinguibles a los producidos por hongos. De igual manera, por el método de histopatología se puede observar el cambio típico en los tejidos de una reacción inflamatoria eosinofílica (Pan American Veterinary Laboratories. Technical Papers, s.f.).

Tratamiento

No existe un tratamiento específico para la Pitiosis ya que, al carecer de ergosterol, las infecciones por *P. insidiosum* típicamente no responden a tratamientos farmacológicos antimicóticos convencionales. El tratamiento de elección es la extirpación quirúrgica del tejido comprometido combinado con terapias a base de sueros inmunológicos, fabricadas y distribuidas por el Laboratorio Veterinario Pan American. Sin embargo, en el reporte “Manejo exitoso de tres (3) perros con Pitiosis colónica usando itraconazol, terbinafina y prednisona” realizado en Estados Unidos y publicado en el año 2019, se observó resolución completa de

los signos clínicos, regresión de las masas colónicas y disminuciones progresivas en los títulos serológicos después del tratamiento administrado con itraconazol, terbinafina y corticosteroides pero la tasa de respuesta general se ha estimado en menos del 20% (Mendoza L., 2005) (Grooters, 2003).

La resección quirúrgica con márgenes amplios es sin duda alguna el tratamiento más eficaz, no obstante, debido a la ubicación y extensión de las lesiones, normalmente se dificulta la resección completa de los órganos afectados. Por tal motivo, se desarrolló una inmunoterapia que inicialmente se utilizaba para tratar casos de Pitiosis equina, pero en la actualidad también es utilizada como tratamiento en caninos y humanos.

En equinos, se demostró que la inmunoterapia cuenta con una efectividad del 60% en casos tempranos de la enfermedad, mientras que su efectividad disminuye con la cronicidad siendo reportado de un 20% a 40% de efectividad y, aumenta la tasa de curación al 90% cuando se combina con desbridamiento quirúrgico. Lamentablemente, en caninos solo se ha demostrado un 33% de efectividad. Esto se debe a que en equinos la presentación es mayormente de forma cutánea, lo que facilita su diagnóstico al ser visible macroscópicamente, mientras que en caninos su presentación es mayormente de índole gastrointestinal, dificultando su diagnóstico. El Dr. Leonel Mendoza, médico veterinario que se ha dedicado a crear un producto inmunoterapéutico para tratar la enfermedad que causa el *Pythium spp.* explica que debido a que los casos de Pitiosis canina suelen ser diagnosticados tardíamente, resulta en animales con inmunodeficiencia que no responden correctamente a la inmunoterapia (Mendoza L., 2005).

Prevención

En República Dominicana la prevención es un gran reto ya que en temporada de lluvia es muy común la presencia de aguas estancadas. Es mayormente ahí, donde los mamíferos que habitan en zonas susceptibles pudiesen contraer el *Pythium insidiosum*. Algunas medidas que se pueden tomar para prevenir el contagio son:

- Siempre ofrecer agua fresca a los animales para evadir la ingestión de aguas estancadas donde pueda albergar el microorganismo.

- Apartar a los animales de pantanos, estanques y humedales para evitar que caminen o se sumerjan en ellos.

- Vacunación profiláctica en zonas de alto riesgo.

TERCERA PARTE
MATERIALES Y MÉTODOS

Capítulo IV: Materiales y Métodos

Localización del Estudio

Este trabajo se realizó en el Distrito Municipal La Victoria, localizado en el municipio de Santo Domingo Norte, provincia de Santo Domingo, Región Ozama, República Dominicana (Figura 1 y 2).

Los límites territoriales del municipio La Victoria son: al Norte, los municipios de Yamasá y de Monte Plata, provincia Monte Plata; al Sur, municipio Santo Domingo Norte; al Este, municipio Monte Plata, provincia Monte Plata; al Oeste: municipio Yamasá, provincia Monte Plata y municipio Guaricano (Senado de la Republica Dominicana, 2002).

Santo Domingo Norte es el municipio de la provincia de Santo Domingo que cuenta con la mayor cantidad de cuerpos hídricos (Figura 3) y, por ende, mayor tasa de inundaciones (Figura 4). Aparte de los numerosos cuerpos hídricos tales como Arroyo Dajao, Arroyo Los Prados, Arroyo Tasa, Arroyo Cabón, entre otros, La Victoria cuenta también con el Parque Nacional Humedales del Ozama, el cual es el segundo sistema de humedales más grande del país (Listin Diario, 2018) (Figura 5).

Tamaño de la Muestra

El número de habitantes en el Distrito Municipal La Victoria conforme a los datos del Censo 2010 de Población y Vivienda, Oficina Nacional de Estadística es de 60,922 habitantes (Gobierno de la Republica Dominicana, 2010). Según el Centro Antirrábico Nacional (CAN),

se estima que por una proporción de diez personas hay un perro, lo que nos da una población aproximada de 6,092 caninos.

Conforme a las aplicaciones estadísticas, la cantidad a muestrear es de ciento veinticuatro (124) caninos con la finalidad de obtener un porcentaje de la presencia de dicha enfermedad en esta zona determinada.

Para calcular la muestra se efectuó una proporción dado que es un estudio no probabilístico. Utilizando la fórmula para calcular el tamaño de la muestra de una población conocida con variables cualitativas con una población finita, se decidió trabajar con un nivel de confianza del 95% ($\alpha = 0.5$) y ($z = 1.96$), un error máximo admitido de un 5% ($d = 0.05$) y se asumió que la prevalencia de Pitiosis en la población fue de 9% ($p = 0.09$) a priori el estudio similar titulado “Identificación de anticuerpos contra *Pythium insidiosum*, a través de “Ensayo por Inmunoadsorción Ligada a Enzimas”, en caninos en las Provincias La Altagracia y La Romana” donde se encontró un 9% de casos positivos (Anexo 7).

Selección de la Muestra

Para este estudio se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia. Ciento veinticuatro caninos (124) de ambos sexos, con o sin propietarios, con o sin signos clínicos, y con historial de exposición a cuerpos hídricos donde pudiese albergar el microorganismo en cuestión, como son ríos, pantanos, estanques y humedales.

Procedimiento de la Toma de Muestra

Se recolectaron muestras de sangre entre marzo y mayo del año 2022 en el Distrito Municipal La Victoria y se llenaron formularios que incluyen el examen físico y el historial clínico de la mascota (Anexo 8). En caso de poseer dueño, también se incluyeron los datos de contacto de los propietarios.

Primero, se desinfectó el área con alcohol isopropílico al 70% y se recolectaron 3.5 ml de sangre de la vena yugular o de la vena cefálica (Figuras 8, 9, 10 y 11). Se colocaron en tubos recolectores identificados individualmente, estériles, de tapa roja con separador y activador de coágulo (Figuras 12 y 13). Las muestras se fueron almacenando en una nevera portátil con hielo a temperaturas entre 0-4°C (Figuras 14 y 15). Se procedió a centrifugar cada una de las muestras, durante 10 minutos a una velocidad de 1.500-2.000 r.p.m, dando como resultado \pm 1.5 ml de suero (Figura 16). Finalmente, las muestras se mantuvieron congeladas (Figura 17) y al culminar el muestreo fueron enviadas al Laboratorio Veterinario Pan American en Texas, Estados Unidos, para su posterior análisis a través del Ensayo por Inmunoadsorción Ligada a Enzimas (ELISA).

Localización de Análisis de Laboratorio

El Laboratorio Veterinario Central (LAVECEN) es un organismo dependiente de la Dirección General de Ganadería (DIGEGA), considerado el laboratorio de referencia nacional por respaldar al Sector Agropecuario y al Ministerio de Salud Pública, específicamente con el diagnóstico de la salud animal. A través de esta entidad fueron empacadas y enviadas las ciento veinticuatro (124) muestras de suero obtenidos mediante la centrifugación de las distintas muestras de sangre extraídas de los animales seleccionados para el estudio. Fueron recibidas

por el Dr. Leonel Mendoza y enviadas al Dr. Robert Glass quien las procesó en el Laboratorio Veterinario Pan American ubicado en Texas, Estados Unidos, utilizando el método ELISA para la identificación de los oomicetos *Pythium spp.*, *Lagenidium spp.* y *Paralagenidium spp.*, con interés particular de diagnosticar *P. insidiosum*.

Instrumentos Utilizados

Se utilizó un formulario el cual sirvió como instrumento para la organización de la recolecta de datos y examen físico de cada canino. Este instrumento fue elaborado para recopilar la información específicamente necesaria para este estudio (Anexo 8). También, se les entregó físicamente un encarte informativo sobre la enfermedad a los propietarios de los caninos en el área del estudio para explicarles el propósito de la toma de muestra y qué medidas pueden tomar para prevenir que su mascota contraiga la enfermedad (Anexo 9).

Equipos y Materiales

Los materiales utilizados para la parte práctica de este estudio fueron (Figura 7):

- ❖ Jeringas de 5cc (aproximadamente 150 unidades)
- ❖ Alcohol isopropílico 70%
- ❖ Guantes
- ❖ Algodón
- ❖ Tubos de recolección de sangre estériles con gel separador
- ❖ Centrífuga

- ❖ Congelador/ Refrigerador
- ❖ Tabla de anotaciones
- ❖ Bolígrafos
- ❖ Bozales
- ❖ Soga
- ❖ Agua Oxigenada
- ❖ Estetoscopio
- ❖ Termómetro
- ❖ Cronómetro

Descripción del método de diagnóstico ELISA utilizada en el laboratorio Pan American Veterinary Labs PAVL

Según el PAVL, los pasos para el procedimiento ELISA indirecto son los siguientes.

I) Preparación de la placa de dilución:

1. Colocar 200 ul de diluyente de suero en los pozos.
2. Añadir 10 ul de cada suero (muestra y control).
3. Dejar los primeros tres (3) pozos en blanco, y colocar el control negativo, y el control positivo.

II) Preparación de la placa del antígeno:

1. Seleccionar los pozos recubiertos con el antígeno apropiado para la prueba a realizar.
2. Agregar el número de placas y tiras recubiertas necesarias para cada prueba.

3. Transferir 50 ul de las muestras diluidas a los pozos con el antígeno seleccionado.
4. Cubrir las placas de antígeno con la placa de dilución e incubar por veinte (20) minutos a temperatura ambiente.
5. Lavar la placa de antígeno tres veces.
6. Añadir 100 ul de buffer conjugado a cada pozo.
7. Cubrir nuevamente las placas e incubar por veinte (20) minutos.
8. Con los cinco (5) minutos restantes del periodo de incubación, prepare la solución OPD.
 - a. Medir 35mg de OPD congelada.
 - b. Agregar 10 ml de sustrato buffer.
 - c. Mezclar suavemente varias veces.

1. Lavar la placa tres veces y secar.
2. Agregar 100 ul de solución OPD a cada pozo.
3. Incubar por veinte (20) minutos para desarrollo de color.
4. Agregar 100 ul de solución STOP al terminarse el periodo de incubación.
5. Esperar cinco minutos y leer la placa con una longitud de onda de 490 nm.

En resumen, los pasos de este procedimiento son:

1. El antígeno se une y recubre el pozo.
2. El suero del paciente se agrega al pozo, y si hay anticuerpos contra el antígeno, se unirán al antígeno.
3. Se agrega anti-IgG (cadena pesada y ligera) marcada con peroxidasa, específica de especie.
4. El anti-IgG se unirá a los anticuerpos que se unieron en el paso 2.

5. Se agrega sustrato OPD. Si el antisuero marcado con peroxidasa está presente, se desarrolla el color.
6. La cantidad de color está en relación con la cantidad de peroxidasa. Si el suero del paciente no tiene anticuerpos contra el antígeno, no habrá color.

Interpretación de los Resultados

Los resultados son interpretados por el laboratorio de la siguiente manera: se divide la densidad óptica (DO) de cada muestra entre la densidad óptica de las de control negativo, se multiplica el resultado por cien y se expresa en porcentaje.

Ejemplo: $(DO \text{ de la muestra} / DO \text{ control negativo}) \times 100 = \text{Puntuación del paciente}$
(% de actividad)

Interpretación de Puntaje:

Un porcentaje de 0-150% indica un resultado negativo, un porcentaje entre 151-199% indica un límite intermedio y un porcentaje superior a 200% indica un resultado positivo a la prueba (Tabla 2). Estos porcentajes indican los distintos niveles de infección según la cantidad de títulos de anticuerpos o densidad óptica resultante, no se relacionan a especificidad ni a sensibilidad. Al ser una prueba serológica que mide anticuerpos IgG, puede reconocer anticuerpos de una previa exposición al microorganismo, aunque el individuo no presente una infección actual ya que marca niveles de anticuerpos durante varios meses luego de la exposición.

Capítulo V: Resultados

Para este estudio, se tomaron muestras de un total de ciento veinticuatro (124) caninos de ambos sexos, con o sin propietarios, con presencia de signos clínicos o asintomáticos, que poseen historial de exposición a cuerpos hídricos donde se pudiese albergar el *Pythium indisiosum*, como son ríos, pantanos, estanques y humedales del Distrito Municipal La Victoria entre los meses de marzo y mayo del año 2022 (Tabla 1).

Se detectó que ninguno de los caninos muestreados arrojó títulos serológicos ELISA positivos a Pitiosis (puntaje de densidad óptica de 200%). Sin embargo, dieciséis (16) presentaron un resultado en límite intermedio (puntaje de densidad óptica de 151-199%) sugestivo de algún contacto previo con el microorganismo. Estos resultados representan un 12.9% en relación con los animales muestreados. Los demás ciento ocho (108) animales están negativos al *Pythium insidiosum* (puntaje de densidad óptica 0-150%) (Gráfica 1).

En relación con los animales que tuvieron exposición con zonas inundables naturales o artificiales, de los ciento veinticuatro (124) caninos muestreados el 93% (115/124) estuvo en contacto en algún momento con los mismos y el 7% (9/124) no tuvo ningún tipo de contacto con humedales según la información proporcionada por los propietarios (Gráfica 2).

De la totalidad de caninos muestreados, 55% (69/124) son hembras de los cuales el 10% (7/69) resultaron con títulos de límite intermedio, y el 44% (55/124) restante son machos, presentando el 16% (9/55) títulos de límite intermedio (Gráfica 3).

De la totalidad de caninos muestreados respecto a la edad, hubo un 14% de caninos menores de un 1 año, un 60% entre 1-3 años, un 15% entre 3-6 años, y un 11% mayor de 6

años. Se observó que el rango de los caninos que presentaron límite intermedio para la enfermedad fue de 1-8 años siendo el 69% (11/16) de edad entre 1-3 años (Gráfica 5).

De los ciento veinticuatro (124) caninos muestreados cuarenta y ocho (48) presentaron algún signo clínico relacionado a Pitiosis, pero solo nueve de los dieciséis (16) que presentaron anticuerpos ante *Pythium insidiosum* de límite intermedio presentaron signos clínicos característicos de la enfermedad. El 44% (7/16) presentó signos gastrointestinales, el 6% (1/16) presentó lesiones cutáneas y el 50% restante (8/16) fueron asintomáticos. Todos ellos contaron con historial de previa exposición a zonas inundables (Gráfica 4).

En base a estos resultados podemos deducir que no hay predisposición por sexo ni edad, pero sí que es estrictamente necesario la exposición a aguas estancadas para la infección y propagación del *P. insidiosum*.

Debido a que la prueba serológica ELISA proporcionada por el Laboratorio Veterinario Pan American contaba con el diagnóstico de dos oomicetos adicionales, se observaron ciertos hallazgos incidentales significantes que son dignos de mencionar y analizar:

El 2% (3/124) de los animales muestreados resultaron positivos a *Lagenidium spp.* De esos tres casos positivos, uno de los animales presentaba vómitos al momento del estudio, otro de ellos presentaba una lesión de piel redonda en el miembro anterior izquierdo y el tercero, asintomático. En cuanto a la relación del sexo de los animales positivos a *Lagenidium spp.* hubo un macho y dos hembras. En cuanto a la edad, los tres caninos estuvieron en el rango entre 2-5 años y todos estuvieron expuestos a zonas inundables naturales, específicamente cañadas.

El 15% (18/124) de los animales muestreados resultaron con títulos intermedios a *Lagenidium spp.* de los cuales 67% (12/18) son hembras y 33% (6/18) son machos. Con relación a los signos clínicos se observó que un 17% (3/18) de estos presentaba síntomas gastrointestinales, diarrea específicamente, un 11% (2/18) presentaba lesiones de piel y un 72% asintomáticos. Todos estuvieron expuestos a zonas inundables naturales.

Un 2% (2/124) mostró títulos serológicos intermedios al oomiceto *Paralagenidium spp.* Ambos caninos eran hembras, asintomáticas, una de un año de edad y otra de seis años, ambas con previa exposición a zonas inundables.

Capítulo VI: Discusión de Resultados

El *Pythium insidiosum* se ha convertido objeto de estudio en la República Dominicana a partir del primer caso positivo en caninos reportado por la Dra. Paloma Ortiz y posterior a este, otros nueve caninos fueron detectados positivos por las Dras. Keila D. Ruiz Solís y Evis M. Richardson Santana en las Provincias la Altagracia y La Romana. A raíz de esto, ha surgido la incógnita de saber cuál es la extensión de la enfermedad en el país, ya que aún se desconoce.

En el presente estudio, aunque no hubo ningún caso positivo, se detectaron múltiples caninos, exactamente dieciséis (16), con presencia de valores en rango de límite intermedio de anticuerpos IgG anti *Pythium insidiosum* en el Distrito Municipal de la Victoria, República Dominicana. Esto sugiere que los caninos estuvieron en contacto con el patógeno en algún momento, implicando que no se debe descartar la presencia del microorganismo en

el área de estudio. A raíz de estos resultados recae la importancia de continuar investigando en diferentes zonas del país para lograr determinar cuáles son las áreas de mayor riesgo de la enfermedad.

Entre los hallazgos incidentales se observaron tres casos positivos a *Lagenidium spp.* Este microorganismo fue diagnosticado por primera vez en el 2020 como hallazgo incidental durante el trabajo investigativo de grado de las Dras. Bayon y Fernández realizado en equinos de la Provincia de Monte Plata. La Provincia de Monte Plata limita al Norte al municipio de la Victoria, lo que concuerda con que posiblemente en Santo Domingo Norte, el principal oomiceto emergente sea el *Lagenidium spp.* Una particularidad amenazante de este microorganismo es que puede infectar larvas de mosquitos (Viela & Taylor, 2015) lo que implicaría una rápida expansión de la enfermedad en el país. Al igual que el *Pythium insidiosum*, en perros, esta enfermedad cursa con lesiones cutáneas y subcutáneas pero afecta con frecuencia a las extremidades, región mamaria, y/o tronco.

Capítulo VII: Conclusión y Recomendaciones

Conclusión

La Pitiosis es una enfermedad emergente de la cual aún queda mucho por estudiar e investigar a nivel mundial. República Dominicana cuenta con un ambiente ideal para el desarrollo y proliferación del oomiceto *Pythium insidiosum*. Aparte de su alta mortalidad, la mayor inquietud es que puede cursar de manera asintomática hasta encontrarse en una etapa muy avanzada. Consecuentemente, implicaría un diagnóstico tardío y la incapacidad de ofrecer el tratamiento a tiempo.

A pesar de que no hubo ningún caso positivo al *P. insidiosum*, múltiples caninos presentaron valores en rango de límite intermedio. Esta investigación en conjunto con las demás en el tema, aportan a la determinación de áreas de mayor riesgo para identificar la necesidad de instaurar un protocolo profiláctico. Igualmente, contribuir a que la enfermedad sea considerada como diagnóstico diferencial de patologías gastrointestinales y/o cutáneas.

Cabe destacar los hallazgos incidentales de otros oomicetos que resultan de importancia en el país como son el *Lagenidium spp.* y *Paralagenidium spp.*, habiendo detectado tres casos positivos al *Lagenidium spp.*

Recomendaciones

1. Continuar investigando la presencia de *Pythium insidiosum* en otras áreas del país con condiciones climáticas húmedas, particularmente en zonas inundables. Por los antecedentes nacionales existentes, se recomienda realizar investigaciones en zonas del Este o en Samaná.
2. Realizar investigaciones en otras especies como en humanos y en bovinos.
3. Se recomienda investigar a mayor profundidad los microorganismos *Lagenidium spp.* y *Paralagenidium spp.* y la presencia de éstos en el país, ya que como hallazgo incidental de nuestros resultados se observó una cantidad significativa de animales previamente expuestos a dichos microorganismos.

4. Se recomienda a todos los propietarios de animales, ofrecerle siempre acceso a agua potable para beber, y en animales con presencia de lesiones cutáneas, evitar contacto con agua estancadas.
5. En áreas con altas incidencias de mosquitos, se recomienda fumigar periódicamente.
6. Se recomienda actualizar las estadísticas sobre los censos de las diferentes especies de animales domésticos en el país.
7. Exhortamos a todos nuestros colegas a conocer el *Pythium insidiosum* por su fácil manera de camuflajearse como una enfermedad gastrointestinal y/o cutánea, así puedan considerarlo como un diagnóstico diferencial en las zonas de alto riesgo.

CUARTA PARTE

Referencias Bibliografias

- Austwick, P. C. (1974). *Swamp cancer. - Hyphomycosis destruens equi.*
- Berryessa, N. M. (2008). *Gastrointestinal pythiosis in 10 dogs from California.* California.
- Bridges, C. E. (1961). *A phycomycosis of Horses Caused by Hyphomyces Destruens.* J. Am. Vet. Med. Assoc. 138, 579–589.
- Chaiprasert, A. S. (1990). *Induction of zoospore formation in Thai isolates of Pythium insidiosum.*
- Defensa Civil Republica Dominicana. (2014). *Trabajando sobre la plataforma de un*
Trabajando sobre la plataforma de un modelo de Gestión de Riesgos Cubano. Obtenido de <https://www.eird.org/pr14/panelistas/paralela4/PEDRO-SANTANA.pdf>
- Diario Libre. (22 de 06 de 2020). Recuperado el 10 de 07 de 2021, del centro de la temporada ciclónica es el más catastrófico para rd: <https://www.diariolibre.com/actualidad/medioambiente/el-centro-de-la-temporada-ciclonica-es-el-mas-catastrofico-para-rd-LL19650803>
- Dr. Mendoza. (s.f.). *Michigan State University.* Obtenido de Canine Pythiosis: <https://bld.natsci.msu.edu/research/pythium-insidiosum/canine/>
- Dykstra, M. J.-H. (1999). *A description of cutaneous-subcutaneous pythiosis in fifteen dogs.* *Medical Mycology.*
- Paloma Ortiz (2019), Elemental Veterinary, comunicación personal.
- Estrada-Garcia, M. C. (1990). *Estrada-Garcia, M.T., Callow, J.A., Green, J.R., 1990. Monoclonal antibodies to the adhesive cell coat secreted by Pythium aphanidermatum zoospores recognize 200 300Mr glycoproteins stored within large peripheral vesicles.*

- F, Z., Perazzo Y, Ortega I, Torres, A., & Lopeza, J. (2012). Caracterización de proteínas inmunodominantes de *Pythium insidiosum* y su uso en inmunoensayos para la detección de. *Gaceta de Ciencias Veterinarias*, 25-30.
- GIZ y Ministerio Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2016). Obtenido de https://ambiente.gob.do/wp-content/uploads/2019/02/Gran-Sto_Dgo_Areas_Protegidas.pdf
- Gobierno de la Republica Dominicana. (2010). *Censo 2010 de la Republica Dominicana*. Obtenido de https://web.archive.org/web/20130927111852/http://censo2010.one.gob.do/volumenes_censo_2010/vol1.pdf
- Gonzalez, H. R. (1975). *Espundia equina: etiología y patogenesis de una ficomicosis*. Bogota.
- Grooters, A. (2003). Grooters AM: Weird Fungi: Making Sense of Emerging and Unusual Mycoses. *ACVIM*.
- Grooters, A. M., Leise, B. S., Lopez, M. K., Gee, M. K., & O'Reilly, K. L. (2002). development of a nested polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Pythium insidiosum*. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 142–146. doi:10.1111/j.1939-1676.2002.tb02345.x
- Haan, J. H. (1901). *Hypho-Mycosis Destruens*. *eeartsen- nijkundige Bld. voor Ned. Indie* 13, 350–374.
- Hilton, R., Tepedino, K., Gleen, C., & Merkel, K. (2016). Swamp cancer: a case of human pythiosis and review of the literature. *British Journal of Dermatology*, 394-397. Doi: doi.org/10.1111/bjd.14520
- Hyphomycosis, B. t. (1924). *Witkamp, J. Ned. Ind. Blad voor Diergeneesk. en Dierenteelt* 36, 229–245.

- Ichitani, T. A. (1980). *Pythium gracile isolated from the foci of granular dermatitis in the horse.*
- Laohapensang, k., R.B, R., J, S., & N, V. (2009). *Vascular pythiosis in a thalassemic patient.*
- Listín Diario. (01 de 07 de 2018). Obtenido de Cinco grandes sistemas de humedales en el Gran Santo Domingo albergan rica diversidad de especies: <https://listindiario.com/la-republica/2018/07/01/522129/cinco-grandes-sistemas-de-humedales-en-el-gran-santo-domingo-albergan-rica-diversidad-de-especies>
- Mendoza L., F. M. (2005). *Four cases of equine bone lesions caused by Pythium insidiosum.*
- Mendoza, L. (2005). Immunology and immunotherapy of the infections caused by Pythium insidiosum. *Medical Mycology*, 43, 477–486. Doi: <https://doi.org/10.1080/13693780500279882>
- Mendoza, L. (2016). *Pythium Insidiosum, Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections.*
- Mendoza, L. A. (1986). *Equine pythiosis in Costa Rica.*
- Mendoza, L. A. (1990). *Four cases of equine bone lesions caused by Pythium insidiosum.*
- Mendoza, L. A. (1996). *infections caused by the oomycetous pathogen Pythium insidiosum*
- Mendoza, L. H. (1993). *Life cycle of the human and animal oomycete pathogen Pythium insidiosum.*
- Mendoza, L. M. (1987). *Antigenic relationship between Pythium insidiosum de Cock and its synonym Pythium destruens Shipton.*
- Mendoza, L. M. (1989). *Antigenic relationship between Pythium insidiosum de Cock.*
- Mendoza, L. P. (1988). *method to obtain rapid zoosporogenesis of Pythium insidiosum.* *Mycopathologia.*
- Michigan State University. (s.f.). *Pythium Insidiosum Diagnosis.* Obtenido de <https://bld.natsci.msu.edu/research/pythium-insidiosum/diagnosis/>

Michigan State University. (s.f.). *Serologic and Molecular tests*. Obtenido de <https://bld.natsci.msu.edu/research/pythium-insidiosum/serologic-and-molecular-tests>

Michigan, U., & Mendoza. (s.f.). *Biology of Pythium Insidiosum*. Obtenido de <https://bld.natsci.msu.edu/research/pythium-insidiosum/biology-of-pythium/>

Miller, R. C. (1983). *Experimental pythiosis in rabbits*.

Ministerio de Economía, Planificación y Desarrollo. (2015). En *División territorial* (pág. 510). Obtenido de <https://www.lmd.gob.do/transparencia/phocadownload/Publicaciones/Division-Territorial-2015.pdf>

Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2003). Obtenido de https://ambiente.gob.do/wp-content/uploads/2019/02/INUNDAC_STO_DGO.pdf

Pan American Veterinary Laboratories. (s.f.). Obtenido de Technical Papers: <https://www.pavlab.com/pavlab/pythiosis-insidiosum/technical-papers/diagnosis-of-pythiosis/>

Pan American Veterinary Laboratories. *Technical Papers*. (s.f.). Obtenido de Diagnosis of Pythiosis: <https://www.pavlab.com/pavlab/pythiosis-insidiosum/technical-papers/diagnosis-of-pythiosis/>

Ruiz Solis, K. D., & Richardson Santana, E. M. (2020). Identificación de anticuerpos contra *Pythium insidiosum*, a través de Ensayo por Inmunoabsorción Ligada a Enzimas en caninos en las Provincias La Altagracia y La Romana.

Schurko, A. M. (2004). *Development of a species specific probe for Pythium insidiosum and the diagnosis of Pythiosis* J. Clin. Microbiol. 42, 2411–2418.

Secretaría de Estado de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2007). Obtenido de https://ambiente.gob.do/wp-content/uploads/2019/02/Santo_Domingo_Cuencas.pdf

Sohn, Y. K. (1996.). *Enteric pythiosis in a Jindo dog*. Korea.

Thianprasit, M. (1986). *Human pythiosis*.

Virgile, R. P. (1993). *Human corneal ulcer caused by Pythium insidiosum*

W, M., C, G., & K, C. (2013). *Pythiosis. uller and Kirk's Small Animal Dermatology* (7th ed ed.). Elsevier Saunders.

Wim Gaastra, L. J. (2010). Pythium Insidiosum an overview. *Elsevier*, 146 (1-2). doi: 10.1016/j.vetmic.2010.07.019

ANEXOS

Anexo I: Tablas

Tabla 1. Datos de los caninos muestreados y resultados de la prueba serológica ELISA para *Pythium insidiosum*, *Lagenidium spp.* y *Paralagenidium spp.*

ID	NOMBRE	SEXO	Historial clínico (si aplica)	EDAD	PYTHIUM	LAGENIDIUM	PARALAGENIDIUM	Exposición a Aguas Estancadas
1	Zeus	Macho	caquexia	1 año	LIMITE	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
2	Zera	Hembra	asintomatico	3 año	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
3	Abby	Hembra	caquexia, papilema oral	3 año	LIMITE	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
4	Vico	Macho	Sobreviviente de Distemper y lesiones cutaneas	1 año	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
5	Kai	Macho	Anemia	1 año	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
6	Benny	Macho	Historial de tv, ectoparasitos	2 año	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
7	Kiara	Hembra	asintomatico	1 año	LIMITE	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
8	Demmy	Hembra	asintomatico	3 año	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
9	Pirata	Macho	Zonas alopecicas mpid	3 año	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
10	Nia	Hembra	añorexia	1 año	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
11	Mixie	Hembra	asintomatico	1 año	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
12	Nube	Hembra	asintomatico	2 año	NEGATIVO	LIMITE	NEGATIVO	SI
13	Mancha	Macho	asintomatico	1 año	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
14	Max	Macho	asintomatico	3 año	NEGATIVO	LIMITE	NEGATIVO	SI
15	Luki	Macho	asintomatico	3 año	LIMITE	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
16	Lucero	Hembra	asintomatico	1 año	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
17	Estrellita	Hembra	Lesion cutanea MAD	1 año	LIMITE	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
18	Brisa	Hembra	asintomatico	2 año	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
19	Scooby	Macho	asintomatico	2 año	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
20	Oreo	Hembra	Ehrlichia y anemia, congestionada	6 meses	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
21	Nashla	Hembra	historial de distemper	1 año	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
22	Camelia	Hembra	congestinada	2 año	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
23	Menta	Hembra	historial de distemper, diarrea	3 año	NEGATIVO	LIMITE	NEGATIVO	SI
24	Cris	Hembra	asintomatico	3 año	LIMITE	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
25	Baldo	Macho	Sobreviviente de Distemper	3 año	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
26	Quino	Macho	asintomatico	1 año	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
27	Kira	Hembra	asintomatico	3 año	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
28	Kika	Hembra	asintomatico	3 año	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
29	Leia	Hembra	lesiones cutanea en el cuello	1 año	NEGATIVO	LIMITE	NEGATIVO	SI
30	Elio	Macho	Sobreviviente de Distemper, dificultad respiratoria	1 año	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
31	Ninja	Hembra	lesion ulcerada MAD	2 año	NEGATIVO	LIMITE	NEGATIVO	SI
32	Penco	Macho	asintomatico	2 año	LIMITE	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
33	Angel	Macho	historial de distemper	3 año	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
34	fifi	Hembra	asintomatico	4 año	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
35	pirulais	Macho	asintomatico	3 año	NEGATIVO	LIMITE	NEGATIVO	SI

36	mariposa	Hembra	asintomatico	5 año	NEGATIVO	LIMITE	NEGATIVO	SI
37	Lara	Hembra	asintomatico	4 año	NEGATIVO	LIMITE	NEGATIVO	SI
38	lucy	Hembra	asintomatico	3 año	NEGATIVO	LIMITE	NEGATIVO	SI
39	Sian	Hembra	asintomatico	5 año	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
40	Doky	Macho	asintomatico	8 año	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
41	Higo	Macho	asintomatico	3 año	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
42	Dichoso	Macho	asintomatico	4 año	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
43	tenor	Macho	asintomatico	7 año	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
44	Rayo	Macho	asintomatico	7 año	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
45	Tara	Hembra	asintomatico	8 año	LIMITE	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
46	Sasha	Hembra	asintomatico	12 año	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
47	Bruno	Macho	Sobreviviente de Distemper	3 año	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
48	Laila	Hembra	congestinada	3 año	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
49	nono	Macho	añoorexia, condicion corporal baja	2 año	LIMITE	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
50	Molly	Hembra	Sobreviviente de Distemper	6 año	NEGATIVO	LIMITE	NEGATIVO	SI
51	zaty	Hembra	asintomatico	2 año	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
52	sinto	Hembra	asintomatico	8 año	NEGATIVO	LIMITE	NEGATIVO	SI
53	sassy	Hembra	asintomatico	11 años	NEGATIVO	LIMITE	NEGATIVO	SI
54	Keila	Hembra	congestinada	3 año	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
55	Bolo	Macho	asintomatico	1 año y medio	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
56	Pinta	Hembra	inapetencia	8 meses	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
57	Luna	Hembra	asintomatico	2 año	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
58	amarillo	Macho	caquexia	4 año	NEGATIVO	LIMITE	NEGATIVO	SI
59	Fañola	Hembra	asintomatico	2 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
60	Demetino	Macho	asintomatico	7 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
61	Maria	Hembra	TVT	2 año y medio	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NO
62	draco	Macho	asintomatico	3 meses	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
63	Negrto	Macho	asintomatico	8 meses	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
64	Marrona	Hembra	asintomatico	2 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
65	escobita	Hembra	asintomatico	2 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
66	mama	Hembra	asintomatico	1 año	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NO
67	nieve	Hembra	asintomatico	4 meses	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
68	negrito	Macho	asintomatico	1 año	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
69	josu	Macho	asintomatico	5 años	LIMITE	NEGATIVO	NEGATIVO	NO
70	firu	Hembra	asintomatico	1 año y medio	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
71	lucero	Hembra	asintomatico	11 meses	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
72	campeon	Macho	asintomatico	1 año y medio	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NO
73	negra	Hembra	asintomatico	7 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
74	tiguera	Hembra	asintomatico	1 año y medio	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
75	doggy	Macho	asintomatico	1 año	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
76	pulgoso	Macho	asintomatico	6 meses	NEGATIVO	LIMITE	NEGATIVO	SI
77	gilbert	Macho	añoorexia	9 meses	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
78	toby	Macho	asintomatico	2 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
79	luka	Macho	asintomatico	3 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
80	boca negra	Hembra	vomito	2 años	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	SI
81	stuart	Macho	lesiones cutaneas	10 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
82	karin	Macho	asintomatico	10 meses	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
83	papi	Macho	lesion de piel redonda mai	5 año	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	SI
84	choco	Macho	asintomatico	2 año	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
85	luki	Hembra	asintomatico	3 años	NEGATIVO	LIMITE	NEGATIVO	SI
86	azul	Macho	ectoparasitos	5 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
87	amaya	Hembra	asintomatico	3 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NO
88	Princesa	Hembra	asintomatico	8 años	LIMITE	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
89	benji	Macho	asintomatico	3 meses	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
90	manchoso	Macho	asintomatico	5 años	NEGATIVO	LIMITE	NEGATIVO	SI
91	cremita	Macho	asintomatico	2 años	LIMITE	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
92	chiquita	Hembra	ectoparasitos	2 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
93	kira	Hembra	asintomatico	4 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
94	goofy	Macho	asintomatico	15 años	NEGATIVO	LIMITE	NEGATIVO	SI
95	callejera 1	Hembra	asintomatico	2 años	NEGATIVO	LIMITE	NEGATIVO	SI
96	callejera 2	Hembra	asintomatico	3 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
97	avivero	Macho	ectoparasitos, episodios convulsivos	3 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
98	chucha	Hembra	asintomatico	4 meses	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
99	dori	Hembra	asintomatico	2 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
100	luna	Hembra	vomito, ectoparasitos	2 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
101	eleven	Macho	ectoparasitos	2 años	LIMITE	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
102	el flaco ivan	Macho	asintomatico	4 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NO
103	carpio	Macho	asintomatico	1 año	LIMITE	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
104	sasha	Hembra	diarrea blanca	11 meses	NEGATIVO	LIMITE	NEGATIVO	SI
105	kiara	Hembra	asintomatico	6 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
106	maria	Hembra	asintomatico	7 años	LIMITE	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
107	mora	Hembra	asintomatico	12 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
108	amarillo	Macho	vomito y diarrea, ectoparasitos	4 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
109	pical	Hembra	asintomatico	5 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NO
110	blanca	Hembra	vomito y diarrea, ectoparaditos	3 meses	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
111	negra	Hembra	asintomatico	6 meses	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI

112	amarilla	Hembra	asintomatico	6 meses	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
113	laichy	Hembra	ectoparasitos	1 año	NEGATIVO	NEGATIVO	LIMITE	SI
114	callejero	Macho	caquexia, debilidad	1 año	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
115	chester	Macho	caquexia	3 años	LIMITE	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
116	zeus	Macho	ectoparasitos	2 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
117	cosita	Hembra	ectoparasitos	4 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
118	kimba	Macho	ectoparasitos	2 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NO
119	luna	Hembra	ectoparasitos	2 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
120	perla	Hembra	asintomatico	4 años	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	SI
121	ricky	Macho	inapetencia, vomito	3 meses	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
122	pelusa	Hembra	asintomatico	4 años	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
123	laika	Hembra	vomito y diarreaa	3 meses	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	SI
124	palolalo	Macho	ectoparasitos	1 año	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NO

Tabla 2. Interpretación del puntaje de los resultados (Pan American Veterinary Laboratories).

0 - 150% NEGATIVO
151 - 199% LÍMITE INTERMEDIO
200% < POSITIVO

Tabla 3. Resultados de las pruebas diagnósticas ELISA de las muestras serológicas colectadas en la provincia La Altagracia y La Romana (Ruiz Solis & Richardson Santana, 2020).

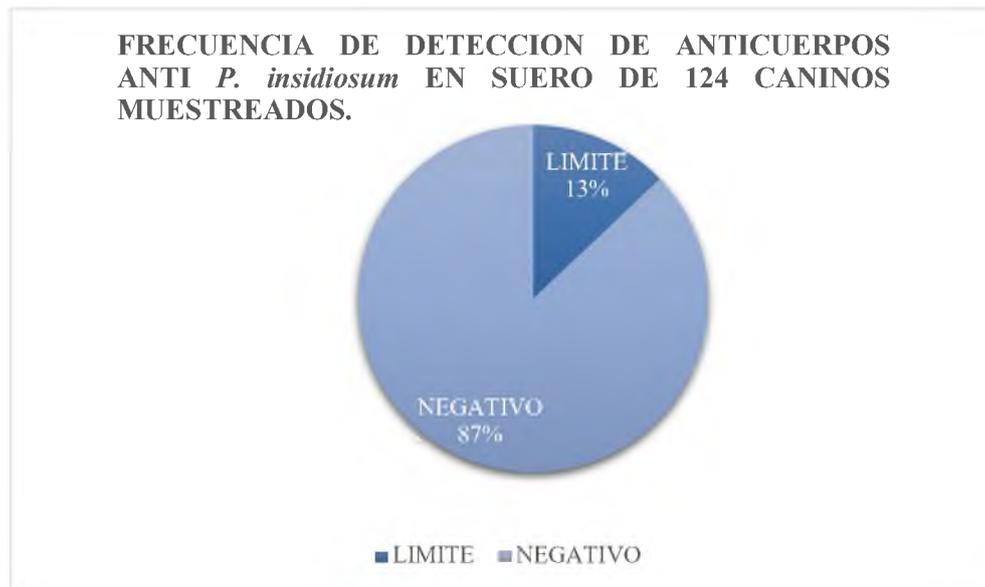
RESULTADOS DE PRUEBAS "ELISAS" PARA <i>Pythium insidiosum</i>								
ID	DO	PUNTAJE (%)	ID	DO	PUNTAJE (%)	ID	DO	PUNTAJE (%)
1	0.242	96	54	0.24	95	88	0.324	121
2	0.171	147	55	0.197	78	89	0.297	111
3	0.502	198	56	0.733	290	90	0.29	113
7	0.431	170	57	0.501	119	91	0.297	111
10	0.199	75	58	0.36	142	92	0.208	81
11	0.404	164	59	0.582	151	93	0.39	154
12	0.202	119	60	0.565	223	97	0.191	75
13	0.463	183	62	0.315	125	114	0.185	71
14	0.383	151	63	0.113	45	115	0.306	121
15	0.474	187	64	0.098	39	116	0.205	81
16	0.57	225	65	0.49	194	117	0.401	151
17	0.285	113	66	0.345	136	119	0.285	113
19	0.262	104	67	0.245	97	120	0.226	89
20	1.005	397	68	0.163	65	121	0.252	100
21	0.12	47	69	0.178	70	122	0.341	141
22	0.275	109	70	0.254	100	123	0.5	198
23	1.211	479	71	0.291	115	124	0.347	131
24	0.367	145	72	0.206	81	125	0.484	191
25	0.209	83	73	0.14	55	126	0.447	171
26	0.145	56	74	0.122	49	127	0.203	80
27	0.194	79	75	0.232	92	128	0.266	105
28	0.209	83	76	0.149	59	129	0.247	91
29	0.2	79	77	0.474	187	130	0.221	81
30	0.514	203	78	0.201	79	131	0.212	84
31	0.203	80	79	0.29	115	132	0.149	67
32	0.23	91	80	0.419	166	133	0.274	101
33	0.203	80	81	0.19	75	134	0.326	129
34	0.34	134	82	0.188	74	135	0.429	176
36	0.37	146	83	0.277	109	136	0.605	239
41	0.205	81	84	0.17	67	137	0.297	117
42	0.171	68	85	0.435	172	138	0.622	248
43	0.179	71	86	0.28	103	420	0.202	80
44	0.191	78	87	0.503	199	1200	1.123	444

LEYENDA:	NEGATIVO:	BORDER:	POSITIVO:
----------	-----------	---------	-----------

Tabla 1. Resultados de pruebas diagnósticas ELISAs de las muestras serológicas colectadas en las provincia La Altagracia y La Romana para la identificación de anticuerpos anti-*Pythium insidiosum*. Se reportaron 9 casos positivos, 18 borderline y 72 negativos.

Anexos II: Gráficas

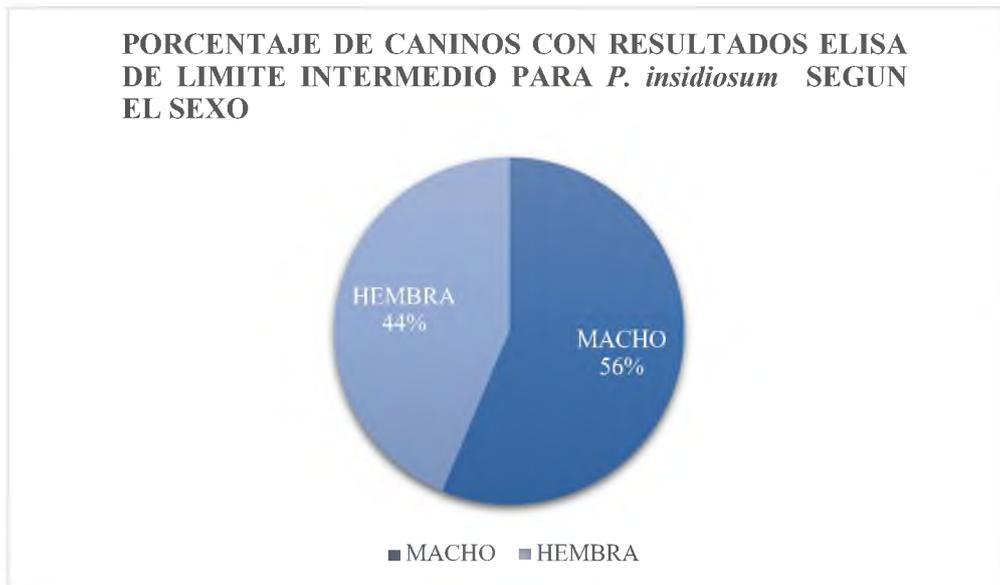
Gráfica 1. Frecuencia de detección de anticuerpos anti *P. insidiosum* en suero canino en el Distrito Municipal La Victoria en 124 caninos muestreados.



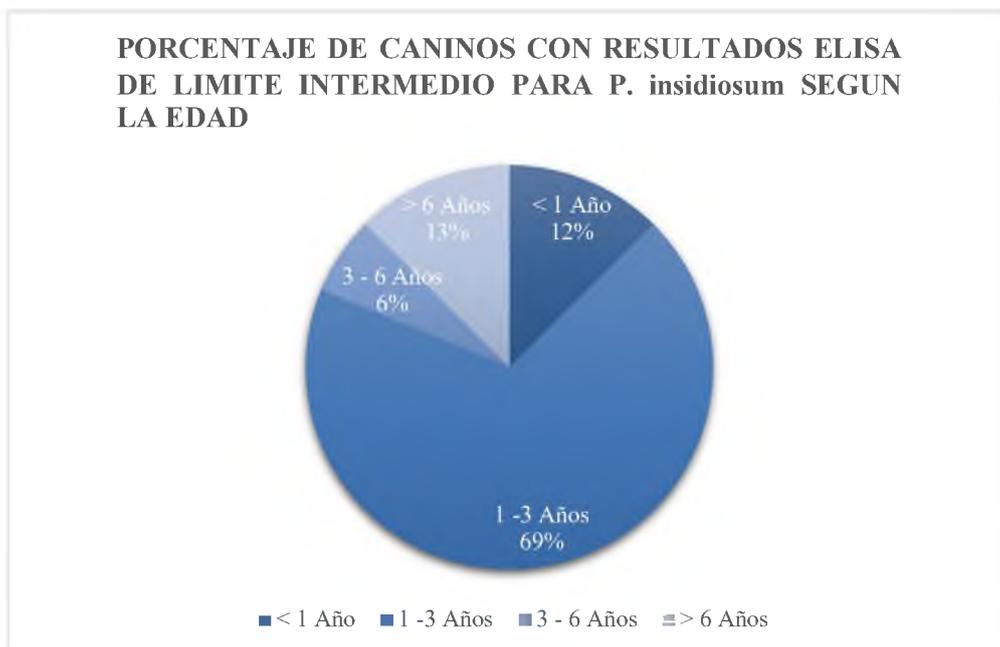
Gráfica 2. Porcentaje de la exposición de los caninos muestreados a zonas inundables.



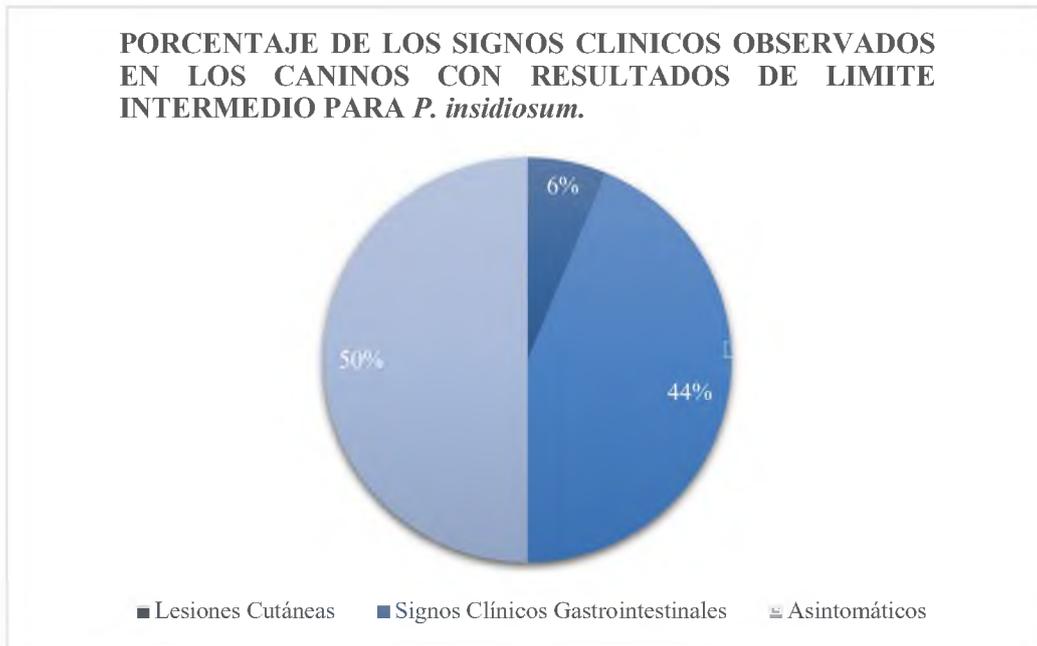
Gráfica 3. Porcentaje de caninos con resultados ELISA de limite intermedio para *P. insidiosum* según el sexo.



Gráfica 4. Porcentaje de caninos con resultados ELISA de limite intermedio para *P. insidiosum* según la edad.



Gráfica 5. Signos clínicos observados en los caninos con resultados de límite intermedio para *P. insidiosum*.



Anexos III. Figuras

Figura 1. Mapa de Santo Domingo donde se delimita La Victoria como zona urbana (Ministerio de Economía, Planificación y Desarrollo, 2015).

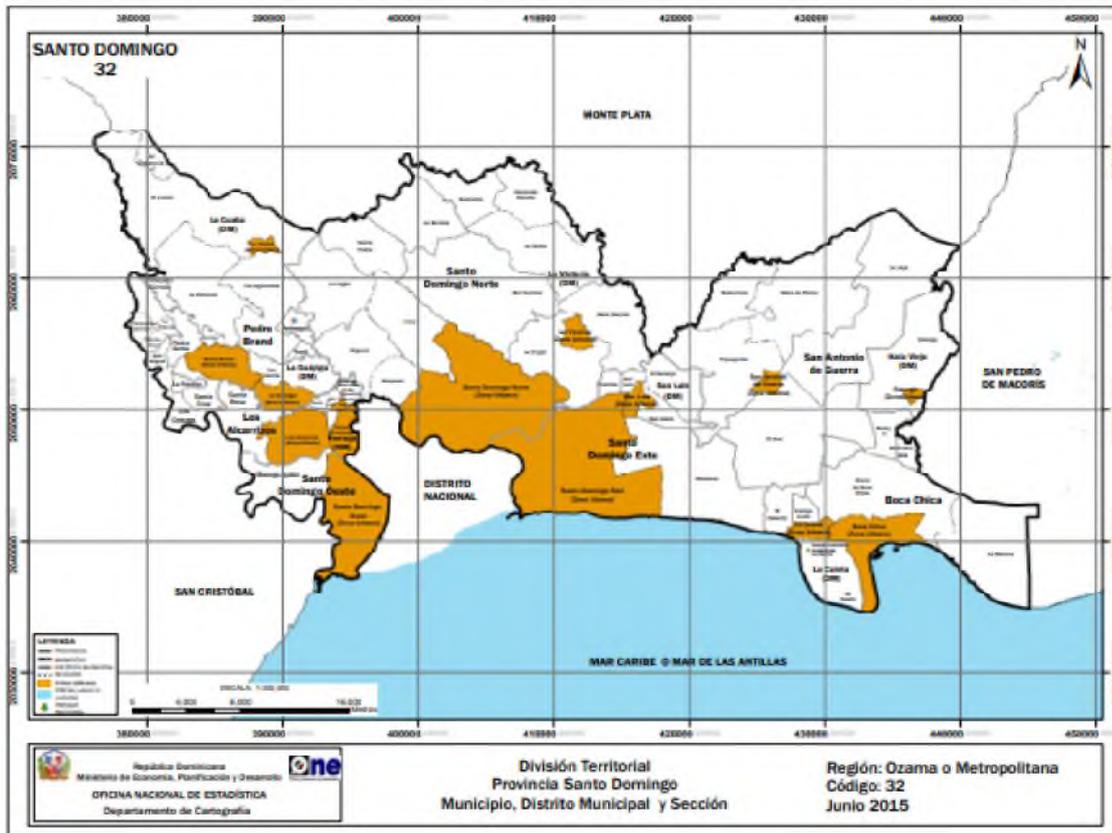


Figura 2. Ubicación y Mapa del Distrito Municipal de La Victoria (Defensa Civil Republica Dominicana, 2014).



Figura.3 Cuencas y subcuencas hidrográficas de la provincia Santo Domingo (Secretaría de Estado de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2007).

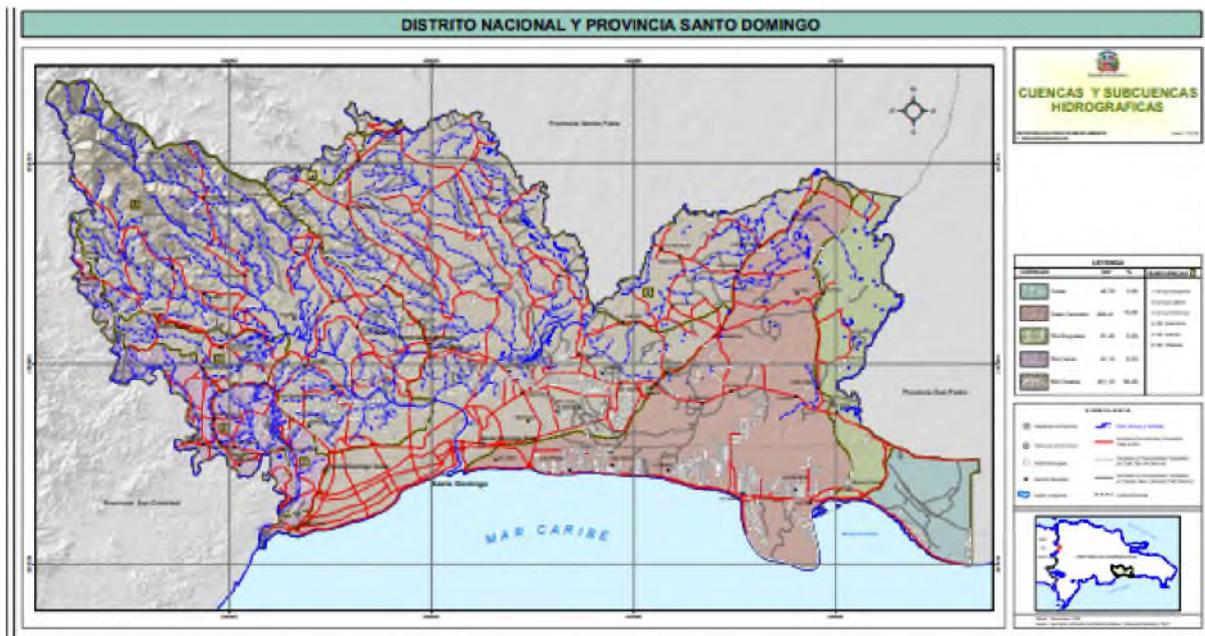


Figura 4. Zonas Susceptible a inundaciones la provincia Santo Domingo (Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2003).

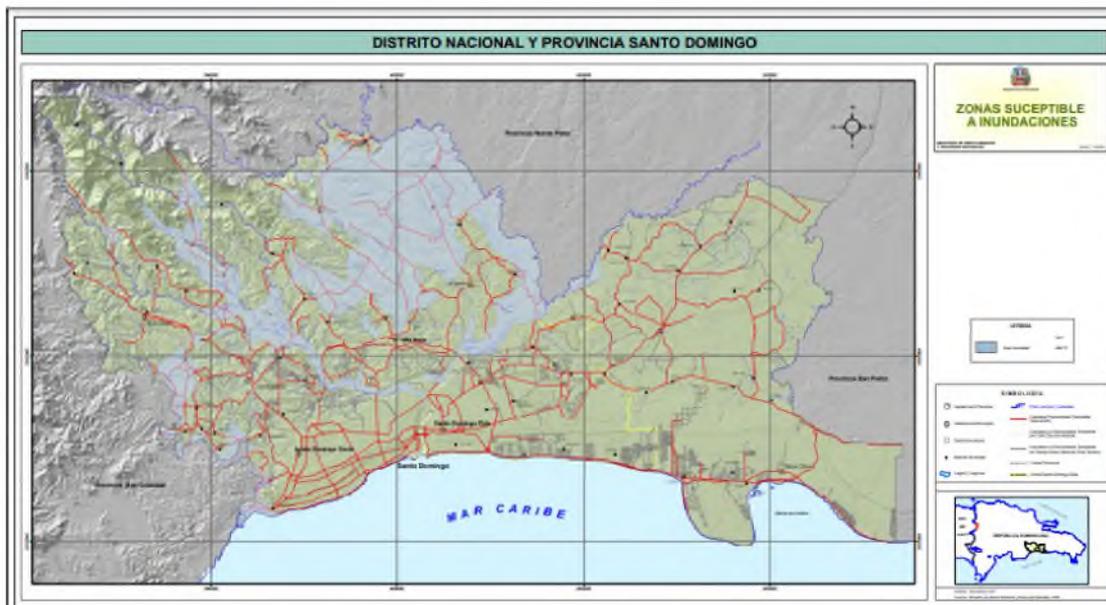


Figura 5. Áreas Protegidas del gran Santo Domingo. Se observa el Parque Nacional Humedales del Ozama ubicado en las delimitaciones del Distrito Municipal La Victoria (GIZ y Ministerio Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2016).

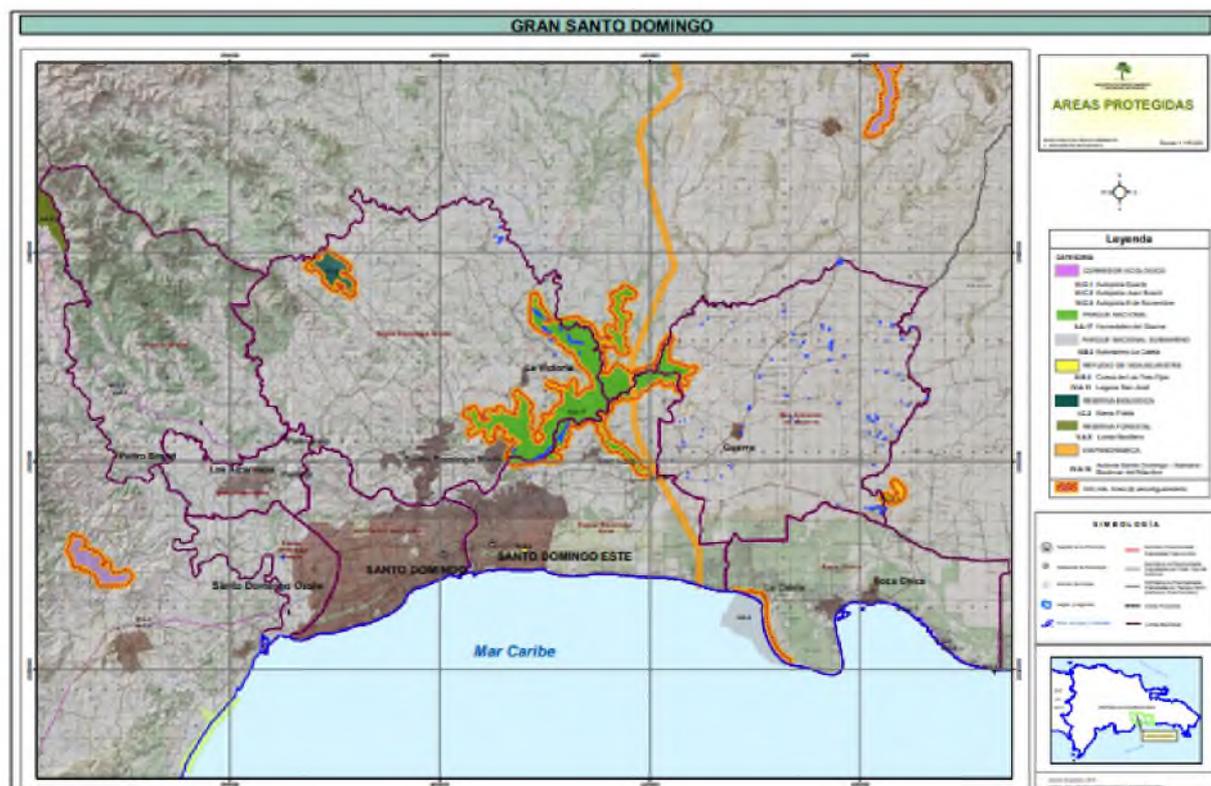


Figura 6. Blue, Primer caso de Pitiosis canina diagnosticado en República Dominicana (Ortiz, 2019).



Figura 7. Materiales utilizados para la parte práctica del estudio.



Figura. 8, 9 10 y 11: Recolección de muestras de sangre de la vena yugular o cefálica durante la parte práctica de la investigación, en el Distrito Municipal La Victoria entre los meses marzo y mayo del año 2022.



Figuras 12 y 13: Colocación de muestras en tubos recolectores estériles, identificados individualmente.



Figuras 14 y 15: Muestras almacenadas en nevera portátil con hielo.



Figura 16: Suero obtenido por el método de centrifugación.



Figura 17: Tubos con suero congelados.



Anexo IV. Resultado de Biopsia caso Blue post Gastrostomía (Ortiz, 2019).



TEST RESULTS

Pet Care Veterinaria, S.R.L	ID : 1240858	Sample # : 19066012
Musa, DVM	Owner : Bollig	Drawn Date : 08/02/2019
Gustavo M Ricart Esq. Abraham Lincoln	Pet : Blue	Received Date : 08/02/2019
Santo Domingo	Age : 1 year	Report Date : 08/16/2019
Republica Dominicana.	Sex : M	
P: (809) 333-4400	Species : K9	

PATHOLOGY

STATUS : FINAL

TEST	NORMAL	ABNORMAL UNITS	RANGES
Biopsy 1-2(8200)	Results		
Sp Stain GMS	SEE RESULTS		

[**Biopsy 1-2(8200)**] ACCESSION: NV3919-19

PATIENT: BOLLING, BLUE 19066012

K9, 1, M. GOLDEN RETRIEVER

GROSS: 1 site(s); 5 slide(s); labeled mass from stomach: 10.0x7.0x6.0cm.

MICROSCOPIC: The specimen consists of ulcerated gastric mucosa with moderate to dense submucosal and intramural infiltrates of variably degenerated plasma cells, histiocytes, neutrophils and multinucleate giant cells around areas of necrosis with proliferating vague tubular structures morphologically compatible with Pythium species fungal elements. There is affected tissue at some margins.

DIAGNOSIS: Ulcerative and necrotizing granulomatous gastritis with tubular structures suggestive of Pythium fungus.

COMMENT: This fungus is aggressive and will spread to lymph nodes and other sites. GMS stain to confirm the presence of fungus can be performed on this tissue at your request. This disease is usually poorly responsive to any treatment.

Anexo V. Diagnóstico caso Blue por el método ELISA (Ortiz, 2019).

PAN AMERICAN VETERINARY LABORATORIES

4735 County Road 309 www.pavlab.com
 Lexington, TX 78047
 512.964.3927

SUBMISSION	18892
DATE MAILED	08/30/2019

PAV-ELISA RESULTS

SUBMITTORS NAME/ADDRESS	ACCT CODE	P0000
BOB GLASS PAVL 166 BRUSHY CREEK TRAIL HUTTO, TX 78634 TEL 512 846 2140 FAX bglass@pavlab.com		

HERDFLOCK	
SPECIES	CANINE
OWNER	BOLLIG/ORTIZ DVM PAVL

ANIMAL					ANIMAL				
NAME	PYTH	LAG	PARALAG	CHAGAS	NAME	PyTH	LAG	PARALAG	CHAGAS
BLUE	215	50	115						

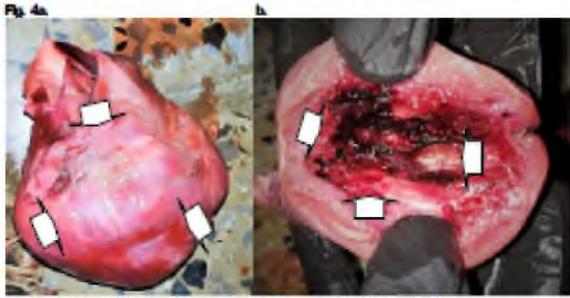
SCALING KEY	
% OF NEGATIVE STANDARD	INTERPRETATION
0-100%	NEGATIVE (N)
101-199%	BORDERLINE (BL)
200% OR GREATER	POSITIVE (P %)

STATUS OF ANIMALS SHOWING BORDERLINE SCORES IS NOT CLEAR.
 RECENT INFECTION OR NON SPECIFIC REACTIVITY MAY CAUSE A BL SCORE.
 ANIMALS SHOWING BL SCORE SHOULD BE RE TESTED WITH FRESH SAMPLES COLLECTED 30-45 DAYS AFTER INITIAL SAMPLE

THERE IS NO CHARGE FOR RE TESTING ANY BODERLINE SAMPLE
 SAMPLES FOR RE TEST MUST BE CLEARLY MARKED WITH THE ORIGINAL TEST REPORT #

Anexo VI. Necropsia Caso Blue (Ortiz, 2019).

CORAZON SE OBSERVA AREA BLANQUECINA DE FORMA CO MUESTRAS MUYAL D'OLUBIDA CON PROXION ENDOVITAL ANTEMORTEM SUPERFICIAL DEL ENDOCARDIO Y ENGROSAMIENTOS IRREGULAR CON HEMORRAGIAS CORNICAS QUE DENOTAN ENDOCARDITIS VULVAR Y VENTRICULAR USUAREDA QUE DENOTA ZONA AMPLIA BLANQUECINA DE SUPERFICIE IRREGULAR (PUEDEN ESTAR POTENCIALMENTE RELACIONADA CON PYTHIOMIE CARDIACA Fig. 4a, Flechas, ASI COMO PERICARDITIS (Fig. 4b, Flechas blancas).

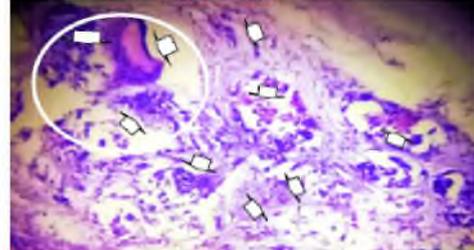


DIAGNOSTICO MACRO HISTORIOLOGICO



EN LA CAVIDAD ABDOMINAL SE APRICO RESPUESTA INFLAMATORIA NODULAR DESINADA A LO LARGO DE LA GRAN CURVATURA ESTOMACAL Y PAREDES LATERALES DE LA CAVA INFERIOR DEL ORGAN Y VECERAL TRANSVERSAL DESDE LA MUCOSA GLANDULAR FUNDICA, REFERE LA PROPIEDAD QUE SE DIAGNOSTICO UN TUMOR GLANDULAR INTRALUMINAL DEL ESTOMAGO, LO CUAL SE ABOCIO CON LA ACCION DEL HONGO *Pythium (Histioglyphus)* EL ESTOMAGO REFLEJA DISTRIBUCION DE ENRIJADO DE ASPECTO GRAULOMATOSO MACRO Y MICROSCOPICO DIFUSO QUE SE ORIGINA EN LA MUCOSA CARDIAL, FUNDICA Y PLEGICA (Fig. 5).

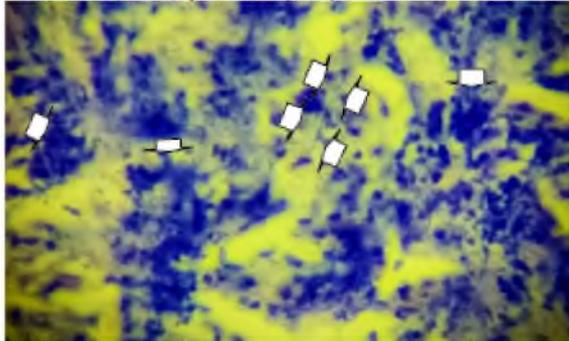
Fig. 5a, Flechas x100, Colección PAS ORCEIN-GOMORI, Descripcón HERS MADURAS DEMARCADAS POR LAS Flechas Y Flechas SUPERIOR EXTRA-CELULAR GIGANTES TIPO LANGHANS Flechas DOBLE SUPERIORE HESLAN (SILVANO-KIPPUS)



CEREBRO SE OBSERVA ZONA DE NECROSIS CORTICAL PARIETO-OCIPITAL DEL (9 CH (Máximo) 1.5 CM) SUPERFICIE EXTERNA CON PERDIDA DE LA INTEGRIDAD MENINGEA DE ASPECTO GRANULOMATOSO DE SUPERFICIE IRREGULAR QUE FULGORO AMARILLO-VERDOSO CON LA LAMPARA DE WOOD (Fig. 5a, Flechas), QUE PERMITE LA CONSERVACION DE PYTHIOMIE NEURO- ENFERMO MACROSO JUNTO A LOS CORTES HISTORIOLOGICOS QUE SE PRESENTAN A CONTINUACION:



SE ENCUENTRA SEMBR PIONOMALOMATOSA MICOTICA CON CELULAS GIANTES MULTINUCLEARES CON HIRACULOS H FLECHAS Y JORNEL. (H & E, x200).



DIAGNOSTICO ANATOMOPATOLOGICO FINAL

COMENTARIOS FINALES

GASTRITIS GRAULOMATOSA SEVERA CON INVASION TRANSNARAL Y PERITONITIS INVASIVA PYTHIUM INCUBOSUM

MEINGOENCEFALITIS GRAULOMATOSA PARIETO- OCCIPITAL DERECHA PYTHIUM INCUBOSUM

ATROFIA HEPATICA MODERADA GENERALIZADA CON PALIDEZ MARCADA Y EMACIACION CAQUEXICA SEVERA

PERICARDITIS MULTIFOCAL INTRAMURAL PYTHIUM INCUBOSUM

SCHOCK SEPTICO DE ORIGEN MICOTICO TERMINAL CON ESPLENOMEGALIA Y HEMOSIDEROSIS POR PYTHIOMIE SISTEMICA

Victor Bernádez, DMV, MSc., PhD. Postdoct.
PROFESOR ESPECIAL FCAV - UASD
Hospital CLINICO VETERINARIO DE LA FCAV - UASD

Anexo VII. Cálculos estadísticos para determinar el tamaño de la muestra.

$$\begin{aligned}n &= (6,092)(1,96)^2(0,09)(0,91)/(0,05)^2(6,092 - 1) + (1,96)^2(0,09)(0,91) \\n &= 1,916.70792768/(0,0025)(6091) + (3,8416)(0,09)(0,91) \\n &= 1,916.70792768/15,54212704 + 0,31462704 \\n &= 1916,70792768/15,54212704 \\n &= 123,3 \approx 124\end{aligned}$$

Anexo VIII. Formulario de recolección de datos.

Formulario de Participantes

Detección de Anticuerpos IgG anti Pythium insidiosum en Suero canino. utilizando el método ELISA en zonas inundables del Distrito Municipal La Victoria, de la provincia de Santo Domingo Norte, República Dominicana.

Paciente Canino #: _____

Información del Propietario

Nombre del Propietario: _____

Teléfono del Propietario: _____

Información del Paciente

Nombre:

Raza Mestizo:

Sexo:

Castrado/Esterilizado Si / No

Edad:

Temperamento:

¿Ha estado expuesto a zonas inundables? Si / No Cual: _____

¿Ha tenido su animal lesiones? Si / No

Asintomático / Sintomáticos

En caso Sintomático:

- **Lesiones Cutáneas:**

Lesiones fistuladas Exudado serosanguinolento Otro: _____

Ubicación:

Extremidades tórax Abdomen Cola

▪ Lesiones Gastrointestinales:

Vomito Diarrea Pérdida de peso Otro: _____

Examen físico:

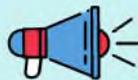
- Temperatura: _____
- Mucosas: _____
- Llenado capilar: _____
- Frecuencia Cardíaca: _____
- Frecuencia Respiratoria: _____
- Porcentaje de hidratación: _____
- Condición Corporal: _____
- Pelaje: _____
- Sistema Musculo/Esquelético: _____
- Observaciones: _____

Anexo IX. Encarte informativo sobre el *Pythium insidiosum* para entregar a los propietarios de los caninos del estudio.

Importancia

El Distrito Municipal de la Victoria, Santo Domingo Norte, ofrece un clima tropical húmedo y posee características en su terreno que acumula agua en temporadas de lluvia, logrando que sean las condiciones perfectas para la proliferación y el desarrollo del *Pythium* spp.

Se debe determinar la presencia del microorganismo en esta zona ya que es un área susceptible y es una enfermedad emergente en el país.



Transmisión

Se transmite por dos vías:

- Por ingestión de agua o pasto contaminado.
- A través de lesiones o heridas en la piel.



OJO: NO se transmite de animales a humanos.



Pythium insidiosum

Valeria Franco
Michelle Sanchez

¿Qué es la Pitiosis?

La Pitiosis es una enfermedad causada por el oomiceto acuático [Pythium insidiosum](#).

Afecta principalmente a los mamíferos que tienen acceso a pantanos, aguas estancadas y zonas inundables, tales como equinos, caninos, bovinos e incluso al ser humano.

Es una patología emergente que se encuentra en diversas regiones geográficas del mundo.

Signos Clínicos

La vía de entrada del microorganismo determinará la ubicación de las lesiones.

Pueden ser:

- Lesiones gastrointestinales como diarrea, vómitos, anorexia.

- Lesiones cutáneas que por lo general se encuentran en la cola, las patas, el tórax, y el abdomen del perro.

- Asintomático



Diagnóstico

Se toma una muestra de sangre y luego se centrifuga para obtener el suero.

El suero se envía al Laboratorio Veterinario Pan American de EE.UU. y a través del método de ELISA se detectan los anticuerpos en la sangre.

