Universidad Nacional Pedro Henríquez Ureña

Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales

Escuela de Medicina Veterinaria

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.

Trabajo de Grado Presentado por:

Tania Beatriz Bayón Reyes

Alejandra Beatriz Fernández Aguilar

Asesores

Dra. Silvana M. González F.

Dra. Paloma Ortiz Rivas

Para la Obtención del Título de Doctor en Medicina Veterinaria

Santo Domingo, República Dominicana

2021

Agradecimientos

A nuestra asesora teórica la Dra. Paloma Ortíz Rivas por la magnífica idea de este proyecto investigativo, por confiar en nuestro trabajo y por siempre dar la milla extra ayudándonos durante todo el proceso. También estamos eternamente agradecidas por brindarnos un espacio en su clínica Elemental Veterinary Hospital para procesar las muestras durante la parte experimental de este trabajo.

A la Dra. Silvana M. González F. por su apoyo incondicional, por estar ahí como asesora en el diseño y ejecución de este trabajo investigativo, y por compartir su experiencia y conocimientos sobre los equinos con nosotras.

Al Dr. Robert Glass y su laboratorio Pan American Veterinary Laboratories, porque sin él y su auspicio, este trabajo no hubiese sido posible. Muchas gracias por creer en nosotras y en este proyecto. Gracias por sacar de su tiempo para procesar las muestras y por siempre estar ahí para contestar nuestras dudas y curiosidades.

A nuestro compañero de estudios y futuro colega Stefan Von Deschwanden por formar parte del equipo de este trabajo investigativo. Gracias por ayudarnos a conocer Monte Plata y su gente, también por acompañarnos durante días largos de muestreo y siempre estar ahí brindándonos su apoyo.

Gracias al Dr. Ramia, su esposa y nuestra colega Cecilia Oropeza, a los hermanos Leyba, Stefan Trueb, Rafael González y a todos los que confiaron en nosotras para permitirnos trabajar con sus caballos, y por su apoyo al proyecto investigativo.

A nuestros amigos y colaboradores de este experimento: Dr. Valmore Carrillo, Laura Calero, Jesús Peña, Julio Manuel López (Bubba), Elias Martinez, Marla Lalane, y Victoria Matias, quienes nos ayudaron en diversas etapas de este trabajo.

A la Dra. Ramona Martínez de LAVECEN y su equipo de trabajo por sacar de su tiempo para ayudarnos durante el proceso de enviar las muestras obtenidas al exterior.

A nuestros profesores por guiarnos y educarnos en este proceso de formación profesional.

A nuestros compañeros universitarios por acompañarnos en nuestra completitud del pensum universitario y que juntos logramos aprender a trabajar en equipo en vocación a la carrera de Medicina Veterinaria.

Por último, a la Universidad Nacional Pedro Henriquez Ureña por brindarnos la oportunidad de utilizar sus recursos y facilidades para nuestra formación profesional.

Dedicatoria

Le dedico este trabajo de grado a mis padres, Zoraida M. Reyes y Jorge L. Bayón. Gracias por ser los principales promotores de mis sueños. Gracias por creer en mí y darme la oportunidad de estudiar lo que tanto anhelaba; sin ustedes esto hubiera sido mucho más difícil. Gracias por su paciencia, por el apoyo incondicional que siempre me han brindado. Sus consejos hoy hacen de mí una mujer de bien. No los defraudaré, verán que todos los sacrificios y tragos amargos hoy rinden frutos. No existen palabras para describir el amor inmenso que siento por ustedes. Que Dios los bendiga y guarde siempre. ¡Los amo !

- Tania Beatriz

Esta tesis la dedico con todo el amor y cariño a la mejor versión de mí, para recordar que todo lo que me propongo, lo puedo lograr. A mis padres Beatriz y Alejandro, y a mi abuelita Rosa por su paciencia, educación y confianza que han depositado en mí y que me han guiado a ser la persona que soy hoy y la profesional que seré mañana. A mis amistades cercanas por su acompañamiento y consejos que me han inspirado a seguir adelante sin importar los obstáculos. A mi gato Alex por su excelente compañía, lleno de amor y ternura en los días buenos y malos.

Por último, tomo en cuenta también a aquellas personas que me acompañaron a lo largo de mi carrera, marcaron mi trayectoria universitaria y en cierto momento me brindaron un consejo. Quiero expresar mi apoyo y agradecimiento a todas esas personas que se sienten capaz de realizar todo lo que se propongan y recordar que con dedicación y confianza, toda meta es alcanzada.

Estoy eternamente agradecida por mi proceso y en plena confianza de que este proyecto expande los horizontes de la medicina veterinaria de manera internacional.

- Alejandra Beatriz

Índice

Página

PRIMERA PARTE

1. **Introducción** ……. 6

1.1. Objetivos …….. 8

1.1.1. Objetivo General …….....8

1.1.2. Objetivos Específicos ……...8

2. **Capítulo I: Revisión Literaria**

2.1. Antecedentes ……...…..9

2.1.1. Antecedentes Internacionales …….…...9

2.1.2. Antecedentes Nacionales ……,…..11

2.2. Biología del *Pythium insidiosum*…….…..12

2.3. Epidemiología …….…13

2.4. Pitiosis en Humanos ……...14

2.5. Pitiosis en Equinos …….……15

2.6. Patofisiología de la Pitiosis en Equinos ……...16

2.7. Inmunología de las Infecciones causadas por *Pythium insidiosum* ...17

2.8. Métodos de Diagnóstico …….……18

2.9. Tratamiento y Prevención de la Enfermedad ……...21

SEGUNDA PARTE

3. **Capítulo II: Materiales y Métodos**

3.1. Localización de Estudio ……23

3.2. Tamaño de Muestra …….…..24

3.3. Selección de Muestra ……..….24

3.4. Recolección de Datos ……25

3.5. Equipo y Materiales Utilizados …….26

3.6. Descripción del método de diagnóstico ELISA utilizada en el laboratorio PAVL……26

3.7. Interpretación de Resultados …….28

TERCERA PARTE

4. **Capítulo III: Resultados** …….30

5. **Capítulo IV: Discusión de Resultados** ……...33

6. **Capítulo V: Conclusiones y Recomendaciones**……..36

6.1. Conclusiones ……...36

6.2. Recomendaciones ……...36

CUARTA PARTE

7. **Referencias Bibliográficas** ……..…38

8. **Anexos** …….……43

8.1. Anexo I**:** Tablas y Gráficas …….….43

8.2. Anexo II: Figuras y Fotos ……....52

8.3. Anexo III: Formulario de participantes ……..57

8.4. Anexo IV: Carta autorización PAVL y LAVECEN ……....59

PRIMERA PARTE

1. Introducción

La Pitiosis es una enfermedad emergente a nivel mundial, especialmente en países húmedos tropicales y subtropicales, que afecta a muchas especies de mamíferos, incluyendo al hombre. La misma es causada por un protista, es altamente infecciosa y provoca lesiones que pueden causar la muerte a los animales que la padecen, especialmente si no se detecta a tiempo ([25]). Esta enfermedad comenzó a estudiarse en el siglo pasado y por lo tanto aún queda mucho por conocer de ella.

Los primeros casos documentados de una enfermedad fúngica similar en equinos fueron reportados alrededor del año 1884 con las publicaciones de Smith, Fish y Drouin. No fue hasta 1987, con el estudio de De Cock, Mendoza L. et al., que se introdujo el nombre binomial de *Pythium insidiosum* para describir la enfermedad en equinos de Costa Rica. Desde su descubrimiento, la Pitiosis ha sido conocida por una diversidad de nombres tales como: espundia y cáncer de los pantanos. ([5,8,12,15,19,22,25]). Algunos autores sugieren que los cólicos recurrentes están asociados con dicha forma de la enfermedad. ([3]).

En la última década se han reportado casos en Brasil, Colombia, Costa Rica, Estados Unidos, Indonesia, Japón, Tailandia, siendo el equino la especie más frecuentemente afectada ([19]). Curiosamente, en el año 1993, en Haití, se reportó un caso de Pitiosis en humanos ([37]) lo cual crea una alerta para la salud pública nacional, ya que compartimos el mismo territorio isleño.

En el año 2019, se documentó el primer caso de Pitiosis canina en Santo Domingo, República Dominicana. Dado a que ya se conoce la existencia del microorganismo en el país, y el equino es la especie más susceptible, surge la intención de investigar si existe la enfermedad en dicha especie dentro del país, especialmente en aquellas zonas de alto riesgo. En la actualidad no existe evidencia

alguna de un diagnóstico de Pitiosis en equinos en la República Dominicana, lo que nos inclina a pensar que tal vez no haya sido diagnosticada por confundirla con otras enfermedades que presentan sintomatología similar en esta especie.

Los mamíferos afectados con Pitiosis son principalmente aquellos que tienen acceso a aguas estancadas, pantanos, lagos y zonas inundables. Esta enfermedad puede presentarse en todo el año, pero se observa un gran número de casos en épocas de lluvia o justamente después de ella" ([6]). La enfermedad se asocia con la formación de lesiones infiltrativas piogranulomatosas e inflamación eosinofílica en los tejidos de animales afectados([25]). Las lesiones cutáneas son similares a otras causadas por muchas otras enfermedades tales como: Habronemiasis, Lagenidiosis, Linfangitis Granulomatosa o Epizoótica. También se asemejan a aquellas producidas por cuerpos extraños y por otras causas producentes de abscesos subcutáneos.

La finalidad de este proyecto es determinar si los equinos del país, especialmente en zonas de alto riesgo, padecen o han padecido de la enfermedad. Dicha investigación se utilizará para educar e informar a los profesionales de la salud del país sobre los riesgos que representa la enfermedad, tanto como su distribución, importancia de la detección temprana y orientarlos acerca de las terapias que existen para la misma.

Este trabajo investigativo ha sido uno innovador que se hará en paralelo con otros trabajos similares en la isla, pero con distintas especies animales y eventualmente se realizará con humanos. Los datos recopilados por este trabajo y otros similares serán utilizados para ampliar el conocimiento que existe sobre la enfermedad y su distribución mundial. De igual modo, los resultados serán compartidos con el laboratorio Pan American Laboratories en Texas, Estados Unidos. Este laboratorio cuenta con los científicos pioneros en el descubrimiento de la Pitiosis, asimismo como los que han desarrollado la inmunoterapia para la enfermedad. Los

datos obtenidos ayudarán al conocimiento nacional e internacional sobre enfermedades infecciosas emergentes que tienen repercusiones incluso para la salud pública.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivo General

Detectar anticuerpos IgG anti *Pythium insidiosum* en suero equino, utilizando el Método ELISA, en zonas inundables en tres municipios de la provincia de Monte Plata, República Dominicana durante los meses de agosto a septiembre del año 2020.

1.1.2. Objetivos Específicos

1. Identificar la relación entre resultados serológicos positivos y signos clínicos asociados a la enfermedad.
2. Determinar si existe predilección de edad, raza, sexo o color de pelaje en los casos positivos.
3. Determinar factores agro-ecológicos y climáticos locales asociados a la enfermedad.

2. Capítulo I: Revisión Literaria

2.1. Antecedentes

2.1.1. Antecedentes Internacionales

La Pitiosis es una enfermedad relativamente reciente ya que sus orígenes se remontan a apenas el siglo pasado. Los avances en la tecnología han puesto a la disposición de científicos mejores pruebas diagnósticas lo cual ha permitido cada día confirmar nuevos casos. Así mismo, los drásticos cambios climáticos han fomentado la detección de casos positivos. Los cuerpos de agua se han secado y existe crecimiento orgánico en donde antes había agua. En épocas de lluvia, estas zonas vuelven a tener agua logrando el ambiente ideal para la proliferación del *P. insidiosum*. ([12])

Los primeros casos oficiales de Pitiosis en equinos fueron reportados en Costa Rica, mediante la publicación del 1986 de Mendoza y Alfaro como primer antecedente. En su estudio "*Pitiosis Equina en Costa Rica: Reporte de 39 casos*", Mendoza y Alfaro realizan las descripciones clínicas y patológicas de 39 casos de la enfermedad en equinos, así como su diagnóstico serológico y tratamiento. En este estudio se determinó que la Pitiosis en equinos es principalmente de forma cutánea y que no existe predilección de raza ni sexo para la infección. También se descubre que, en los casos crónicos, los animales mueren por la toxemia producida por infecciones bacterianas secundarias propiciadas por la lesión principal del *Pythium.*

Se escogió el estudio del año 1993 de Virgile R. y Perry et al titulado "*Úlcera corneal humana causada por Pythium insidiosum*" como antecedente a este estudio, ya que recalca que la Pitiosis no es exclusiva de animales y que por tanto hay que educar a la población de médicos humanos sobre dicha enfermedad y la importancia de su pronta detección para que el tratamiento sea efectivo. Dicho estudio también ubica el microorganismo en Haití, con quien compartimos el mismo territorio isleño.

El tercer antecedente es el trabajo de Bezzerra y Pedroso et al del año 2010 titulado "Pitiosis intestinal en el Brasil Sureño" se estudió un caso poco común de

Pitiosis gastrointestinal en un equino. Este estudio fue utilizado como referencia para recalcar que a pesar de que la forma cutánea de la enfermedad es la más común, también existen otras formas importantes de la infección por *P. insidiosum* que pueden ser mortales si no se tratan a tiempo. También concluyen que los cólicos recurrentes están asociados con dicha forma de la enfermedad.

Un estudio similar fue llevado a cabo en el año 2013 en Córdoba, Colombia por Cardona et al. En su estudio descriptivo prospectivo "*Frecuencia de Pitiosis cutánea en caballos de producción en explotaciones ganaderas de Córdoba, Colombia*" donde se determina la frecuencia de la presentación cutánea de la enfermedad. Evaluaron la totalidad de equinos en siete explotaciones ganaderas ubicadas en zonas inundables de la provincia durante dos meses, pasada la época de lluvias. De la totalidad de equinos, observó un 26.9% de ejemplares con características clínicas e histopatológicas compatibles con Pitiosis cutánea. Entre las conclusiones más relevantes está que no existe predilección de raza ni sexo, pero sí hay diferencias significativas en cuanto a la ubicación de las lesiones.

Por último, en la publicación de Weiblen y Machado et al del 2016 titulada "Seroprevalencia de infecciones por *Pythium insidiosum* en equinos de Río Grande do Sul, Brasil", se realiza un estudio epidemiológico para detectar anticuerpos anti *P. insidiosum* en equinos. Dicho estudio escogió un número de fincas a muestrear dentro de una región considerada de alto riesgo que cumplía con las condiciones climatológicas y ecológicas necesarias para la proliferación del microorganismo. Entre sus conclusiones, determinaron que la seroprevalencia en ganado equino era de 11.1% con variaciones ligeras entre diversas subregiones muestreadas y que por lo tanto, la presencia de dicho microorganismo es notable en criaderos de caballos.

2.1.2. Antecedentes Nacionales

Existe el primer caso de Pitiosis Multisistémica en caninos, reportado por la Dra. Paloma Ortiz de la Clínica Elemental Veterinary Hospital, y confirmado por histopatología (anexo V), PCR y serología, el cual está en proceso de publicación para ser entregado a las debidas autoridades nacionales. Inicialmente, el paciente canino llamado Blue se presentó con emaciación severa, decaimiento y linfonódulos reactivos. Un estudio endoscópico reveló una enorme masa en el estómago del animal y existían altas sospechas de que fuera de origen neoplásico. La masa fue removida y se envió muestra para biopsia. El estudio histopatológico reveló que la masa era de origen fúngico o similar y mencionaba la posibilidad de que fuera causado por *P. insidiosum*. Fue entonces, cuando la Dra. Ortiz decidió orientarse y estudiar más a fondo el patógeno. En sus investigaciones, la doctora contactó al laboratorio Pan American Veterinary Laboratories, quienes cuentan con los científicos expertos en la enfermedad y fue así como adquirió la terapia adecuada para el animal.

Lamentablemente, a pesar de los arduos esfuerzos de tratamiento intensivo y de haber recibido la terapia adecuada, Blue falleció en diciembre del 2019. La necropsia arrojó que Blue se encontraba en una etapa muy avanzada de la enfermedad y tenía rastros de una respuesta nodular inflamatoria diseminada en todos los órganos de su cuerpo, incluyendo el cerebro. Este caso nos recalca la importancia de la detección temprana para establecer una terapia adecuada y aumentar la supervivencia de los animales que padecen de la enfermedad.

A inicios del año 2020, se reportó otro caso que permanece presuntivo de Pitiosis gastrointestinal en un canino en la Clínica Veterinaria de la Universidad Nacional Pedro Henríquez Ureña, en la ciudad de Santo Domingo. Dicho caso fue atendido por la Dra. Sara Genao y se le realizaron pruebas de histopatología. Dado a que el propietario no deseaba hacer estudios de diagnóstico más certeros, no se

realizaron pruebas de ELISA ni PCR, por lo tanto el caso permanece como un diagnóstico presuntivo de micosis gastrointestinal por un agente fúngico no identificado.

2.2. Biología del Pythium

El género *Pythium* está formado por alrededor de 85 especies pertenecientes al reino Stramenopila, filo Oomycota, clase Oomycetes y familia Pythiaceae" ([5,15,27]). Son organismos saprófitos principalmente de plantas y peces ([29]). El *Pythium insidiosum* es el único en su género que ha demostrado infectar tejidos de mamíferos ([19,27]).

El Pythium es eucarionte y ha sido descrito como hongo por su crecimiento en hifas. Las hifas del *P. insidiosum* "miden entre 4-10 µm en diámetro con ramas perpendiculares laterales". ([19]). Su pared celular está compuesta principalmente por β-1 y 3 glucanos con mínimas cantidades de ergosterol, por lo que se diferencian de hongos verdaderos cuya pared celular está compuesta principalmente por quitina ([19,29]).

Su reproducción es tanto sexual como asexual. "En el estado asexual o vegetativo, el *Pythium* produce clamidosporas inactivas o esporangios que dan origen a las hifas o a la vesícula de zoosporas. Durante la reproducción sexual, el anteridio fertiliza un oogonio para producir una oospora" ([29]). Según la universidad de Penn State en Estados Unidos, sólo algunos miembros del género *Pythium* tienen la capacidad de producir zoosporas. Las mismas son una adaptación evolutiva del organismo que le permite enquistarse en células hospederas. Las zoosporas, son flageladas y hacen quimiotaxis hacia tejidos animales dañados o lesionados. En algunos casos, las zoosporas se desenquistan en la célula hospedera, dando origen a nuevas zoosporas. ([27,29]).

La producción de zoosporas es solamente posible en ambientes acuáticos, con temperaturas entre 20-37°C, con proporciones adecuadas de carbono, nitrógeno y calcio ([19]).

2.3. Epidemiología

La República Dominicana reúne los requisitos necesarios para el crecimiento del *Pythium insidiosum*, ya que ofrece un clima tropical con épocas de lluvias que, en su mayoría, ocasionan inundaciones. En general, la distribución geográfica es amplia, pues ha sido reportada en varios países tropicales, subtropicales y templados del mundo que incluyen: Brasil, Venezuela, Colombia, Argentina, Costa Rica, Guatemala, Panamá, Nicaragua, Haití y Estados Unidos de América, especialmente en los estados próximos al Golfo de México (por ejemplo: Florida, Louisiana, Mississippi y Texas). Fuera de las Américas, ha sido descrita en otras zonas y países, como en el sudeste de Asia (Tailandia e Indonesia), India, Corea del Norte, Nueva Guinea, Nueva Zelandia, Japón; así mismo en Australia y África ([19,31]).

"Se sospecha que no existe predisposición de raza, sexo y edad para la infección, y el consecuente desenvolvimiento de la enfermedad." ([19]). Sin embargo, según Cardona J.A et al, en Colombia se reporta con mayor frecuencia en caballos de vaquería entre los 3 y 9 años, y reporta que la raza y coloración de la capa o pelaje también pudieran ser factores predisponentes; lo antes expuesto es considerado como causante de otras patologías como son: sarcoide, fibroma, papiloma, carcinoma de células escamosas y melanoma. ([4]).

Según Cardona J.A., Vargas- Viloria M. et al., la frecuencia de la presentación del *Pythium insidiosum* puede verse influenciada por las precipitaciones abundantes y la elevada humedad relativa, la cual favorece formación de cuerpos de agua y potreros inundables, siendo estas, las mejores condiciones para la reproducción del microorganismo. En efecto, la gran mayoría de los casos de pitiosis se observan durante o después de la estación lluviosa. Por ende, los índices de morbilidad y mortalidad son variables según si los equinos fueron mantenidos en sitios con cúmulos de agua, potreros inundados con poco drenaje y/o vegetación acuática abundante.

Para Cardona J.A., Vargas- Viloria M. et al. las condiciones agroecológicas son determinantes para el desarrollo del pseudo-hongo en su ecosistema, y el principal factor que determina la proliferación y distribución de este. Se descubrió que su prevalencia se debe a la secreción de exo-antígenos, que son estrategias evolutivas desarrolladas por *P. insidiosum* para asegurar su proliferación en el tejido del hospedero. Esta hipótesis es confirmada por el hecho de que se hallan hifas viables de *P. insidiosum* sólo dentro de la reacción eosinofílica, lo que indica que el agente patógeno usa este mecanismo de defensa para asegurar su supervivencia.

2.4. Pitiosis en Humanos

A pesar de no ser una enfermedad zoonótica, la Pitiosis además de afectar a los animales, también ha sido diagnosticada en humanos. Las tres formas más comunes observadas son la Pitiosis cutánea, oftálmica y sistémica ([19]). La primera, siendo la más común, se observa principalmente en las extremidades y en la cara. La segunda, observada en el caso de Haití, es ocular y causa queratitis en los pacientes. Por último, la más grave de todas es la sistémica, cuya presentación causa vasculitis, trombosis y aneurismas.

“Los factores de riesgo asociados con la enfermedad en humanos aparentan estar relacionados con talasemia mientras que otros son ocupacionales” ([18]), especialmente aquellos trabajos en ambientes acuáticos como la pesca de agua dulce y en fincas de arroz. Cabe destacar que el microorganismo penetra a su hospedero a través de piel o mucosas previamente lesionadas ([19]). No obstante, se recomienda a la población mundial a no consumir o bañarse en aguas estancadas donde abunda la materia orgánica .

2.5. Pitiosis en Equinos

La Pitiosis se puede manifestar de dos formas, la primera y más común en equinos es la Pitiosis cutánea ([7,10,30]). La segunda forma de presentación y más común en caninos es la Pitiosis gastrointestinal en la cual se ven afectados el estómago e intestino, principalmente. ([7]).

Las lesiones cutáneas son más frecuentes en áreas con el mayor contacto con aguas contaminadas de zoosporas; estas se observan por lo general en las extremidades, como también en la zona inguinal, porción ventral (del animal en reposo), latero toraco-abdominal, y pectoral. También son observadas en áreas donde los equinos se laceran o lesionan con mayor frecuencia, como es el caso de la cara, nariz y cavidad oral ([19,30]) (ver fotos 1-4).

Márquez A., Salas Y, et al. describen que las lesiones cutáneas en equinos se caracterizan por ser de crecimiento lento, insidioso, circulares, ulceradas o no ulceradas hasta formar grandes granulomas de hasta 50 cm de diámetro. Se han observado lesiones granulomatosas ulceradas o no ulceradas, ubicadas en la porción distal del metacarpo o metatarso pudiendo implicar las falanges. Las lesiones ulceradas varían de tamaño (100 mm), siendo redondeadas o alargadas con múltiples zonas de necrosis. Las lesiones no ulceradas se caracterizaron por presentar múltiples tractos fistulosos que drenan un material serosanguinolento, e incluso material purulento.

En la Pitiosis cutánea equina se observan estructuras sólidas llamadas *kunkers*, que se encuentran limitadas al área de la lesión, donde se originó el ingreso del patógeno ([16,19,22]). Las mismas no se manifiestan en otras especies afectadas por el oomiceto y tienen su origen en el acúmulo focal de eosinófilos alrededor de las hifas ([22]).

★ Los ***Kunkers*** (Figura 1) - Terminología definitiva, sin traducción al español -. "Son lesiones encontradas en equinos que se caracterizan macroscópicamente por un aumento de volumen en forma de placa ulcerada, sangrante e irregular

de color blanco amarillento, con apariencia de tejido de granulación, al corte superficial a profundo, y de fácil desprendimiento. Por otra parte, el estudio microscópico revela una dermatitis granulomatosa, eosinofílica de difusa a multifocal" ([6]).

"Las afecciones intestinales se caracterizan por lesiones granulomatosas en el yeyuno, las cuales producen obstrucción parcial o total, dolor abdominal, anorexia y pérdida de peso; en estos casos la posible forma de infección es a través de la ingesta de agua contaminada con zoosporas de *P. insidiosum*" ([27]).

Adicionalmente, se han reportado casos de diseminación de *P. insidiosum* hacia los nódulos linfáticos regionales y pulmones, sin embargo, al mismo tiempo, existían lesiones cutáneas. Para este tipo de lesiones en equinos es necesario realizar un diferencial con otras lesiones de piel como son la Habronemiasis cutánea, tejido de granulación exuberante o neoplasias, donde el estudio histopatológico es fundamental para su diagnóstico; no obstante, la presencia de los previamente mencionados *kunkers*, tractos fistulosos, y secreción fibrino-sanguinolenta son inequívocas en la Pitiosis cutánea equina ([4]).

2.6. Patofisiología de la Pitiosis en Equinos

"El *P. insidiosum* penetra a su hospedero mamífero a través de piel o tejidos previamente lesionados" ([18]). Cuando las zoosporas entran por la herida, "se enquistan para producir una glicoproteína que le permite una mejor adhesión al tejido" ([6]). Una vez el microorganismo se encuentra dentro del tejido se transforma en hifas, provocando una reacción inflamatoria eosinofílica con mastocitos, macrófagos, células plasmáticas y linfocitos ([18]).

"La reacción eosinofílica provocada por el *P. insidiosum*, causa el desarrollo de cuerpos asteroidales alrededor de las hifas en el tejido afectado. Lo anterior es

conocido como el fenómeno de Splendore-Hoeppli, nombre otorgado por quienes lo descubrieron”([18]). Dicho fenómeno se debe al depósito de complejos antígeno-anticuerpo y remanentes de células inflamatorias en el lugar de infección. “Microscópicamente, se visualiza material eosinofílico amorfo con configuraciones radiales similares a una estrella, rodeando el agente causal” ([9]) (Figura 2). El fenómeno de Splendore-Hoeppli en equinos es tan pronunciado que los eosinófilos se degranulan alrededor de las hifas formando lesiones coralinas caseificadas llamadas *kunkers*([19]).

Los *kunkers* se van desarrollando hasta lograr necrosar el tejido, lo que da origen a un fuerte olor fétido. “Dichas lesiones se caracterizan por producir en el equino prurito intenso, provocando como consecuencia la automutilación de la herida” ([14]). “Las lesiones continúan en crecimiento hasta corroer los ligamentos, tendones y huesos, lo que producirá la muerte del animal dentro de los seis meses aproximadamente” ([12]).

La rápida destrucción de tejido producida por el *P. Insidiosum* se debe a la intensa reacción alérgica del animal ante la presencia de las hifas en el tejido. La respuesta inmunológica de tipo Th2 (Linfocitos T Cooperadores tipo 2) es la que promueve la reacción en el animal([12,36]).

2.7. Inmunología de las Infecciones causadas por *Pythium insidiosum*

Las zoosporas de *P. insidiosum* entran al huésped dado a que la barrera principal de defensa no se encuentra en su perfecto funcionamiento (piel, membranas mucosas, endotelio vascular). Como se mencionó anteriormente, el organismo sólo es capaz de penetrar la piel o tejido animal que está previamente lesionado. Luego, ocurre una reacción inmunitaria no específica en donde diferentes fagocitos (leucocitos, macrófagos y células dendríticas) llegan al sitio de infección con el fin de eliminar el agente extraño ([18]).

La respuesta inmune inicial no logra combatir el microorganismo y éste comienza a desarrollar las hifas; los antígenos liberados por las hifas dentro del tejido animal son claves para el desarrollo de la infección en mamíferos. “Los antígenos exógenos liberados por el *P. Insidiosum* son presentados a las células dendríticas plasmáticas o linfoides locales” ([18]). Éstas a su vez, “liberan diferentes combinaciones de citoquinas que determinarán el tipo de reacción inmunológica que tendrá el animal hospedero” ([36]).

“En las infecciones de Pitiosis, se ha sugerido que una respuesta inmune tipo Th2 o de linfocitos T cooperadores tipo 2 es la responsable de la reacción inflamatoria severa. Esto se evidencia con el hallazgo de interleucinas IL-4 e IL-5 elevadas, encontradas en humanos con Pitiosis arterial”([18]). Dicha reacción inmunológica “estimula la producción de anticuerpos neutralizantes y de IgE, los cuales son los iniciadores de la hipersensibilidad primaria y de eosinofilia”([17]). Según varios investigadores, se entiende que la reacción tipo Th2 permanece en el huésped ya que el organismo ha desarrollado una “estrategia evolutiva de protección en la que se esconde dentro del material eosinofílico descompuesto. Esto a su vez hace que constantemente el sistema inmune del animal hospedero esté detectando antígenos del *P. insidiosum* y presentándose a células dendríticas, lo que promueve una mayor carga de eosinófilos y de mastocitos en el sitio de infección, proliferando la misma” ([18]).

2.8. Métodos de Diagnóstico

El diagnóstico rápido de la Pitiosis es la clave para la resolución exitosa de las lesiones. Los métodos comúnmente utilizados para el diagnóstico de la enfermedad son: montajes húmedos, cultivo, histopatología, ensayos basados en ADN, distintos métodos de serología e inoculación en animales de laboratorio.

Los montajes húmedos, a pesar de no ser un método de diagnóstico definitivo, se utilizan para detectar la presencia de hifas indicativas de *P. insidiosum* u otro

patógeno zigomiceto en tejidos frescos. Para dicha preparación, “se recolecta tejido de lesiones infectadas, se sumerge en agua destilada a temperatura ambiente y luego se fija con KOH al 10%” ([27]). La muestra luego es observada por microscopía directa.

“Para el cultivo del organismo, se toma una muestra de lesiones activas y se coloca en agua destilada a temperatura ambiente hasta ser transportadas al laboratorio. Cabe destacar que las muestras transportadas o almacenadas bajo 4°C resultan en la muerte del microorganismo en cuestión, por lo que se debe tomar las medidas necesarias para asegurar la viabilidad de estas; se puede conservar entre 4 y 6°C. Ya en el laboratorio, “la muestra biopsiada se coloca en agar Sabouraud dextrosado y se incuba a 37°C por 24 a 48 horas. Luego de un día, se comienzan a observar colonias aplanadas de 20mm de diametro” ([27]).

Pasadas las 24 horas, se observan hifas cenocíticas ramificadas a 90°, es decir, sus células tienen múltiples núcleos dispersos en su citoplasma ya que ocurrió división celular y no citoplasmática. En cultivos más viejos, se pueden observar algunas septas. “Para la visualización de las zoosporas, se agrega grama procesada en soluciones salinas con calcio, a los cultivos y se incuba por 2-3 horas adicionales a 37°C” ([19]).

Para visualizar los cambios producidos por el *P. insidiosum* en tejidos animales, la histopatología es de gran utilidad. “Con este método se puede visualizar el cambio típico en los tejidos sugestivo de una reacción inflamatoria eosinofílica. Aun así, los cambios producidos son indistinguibles de aquellos que producen otros hongos, por lo que no se considera un método de diagnóstico definitivo” ([19,27]). El tejido de las lesiones observadas es recolectado y teñido con hematoxilina- eosina o con tinción de plata para mejor visualización de hifas ([27]).

“La identificación de secuencias de ADN de *P. insidiosum* por PCR es la técnica idealmente utilizada para el diagnóstico definitivo, especialmente para casos de Pitiosis multisistémica.”([19,27]). Dado a la particularidad de la formación de los kunkers en equinos esta técnica nos limita en tiempo en que se puede obtener las muestras.

Según conversaciones con el Dr. Robert Glass, quien ha dedicado una gran parte de su carrera profesional al estudio de la Pitiosis, el animal debe tener lesión activa sin evolución avanzada para obtener hifas, por tal razón no es costo efectivo utilizar dicha técnica en equinos y se prefiere el uso de serología. Entre las técnicas serológicas que se han utilizado se encuentran: fijación de complemento, inmunodifusión, pruebas de anticuerpos inmunofluorescentes, el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y Western Blot. Éste último mencionado, "a pesar de ser de gran especificidad y sensibilidad al detectar proteínas antigénicas de *P. insidiosum* en suero de pacientes con Pitiosis, es de poca utilidad en el diagnóstico clínico por su alto costo y requerimiento de equipos sofisticados" ([27]).

El diagnóstico de Pitiosis equina antiguamente se realizaba por fijación de complemento, pero dicha prueba no se realiza en la actualidad porque a pesar de ser sensitiva, resultaba no ser específica para el microorganismo. Por otro lado, la prueba de inmunodifusión detecta precipitados de antígenos del *P. insidiosum* en suero equino y humano, pero a pesar de demostrar alta especificidad, es poco sensible. Lo anterior indica que sólo resulta ser positivo en etapas tempranas de la enfermedad, arrojando falsos negativos en casos crónicos o de animales recuperados ([19]).

Los ensayos de inmunohistoquímica (inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa), han demostrado ser tanto específicos como sensibles para la detección de hifas de *P. insidiosum* en muchas especies. "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" ([27]). Por otro lado, a pesar de ser una herramienta muy útil para diagnosticar Pitiosis en muchas especies, los ensayos de anticuerpos inmunofluorescentes no han sido útiles para el diagnóstico de la enfermedad en equinos. "Esto se debe a que las lesiones muestreadas, llamadas *kunkers* en esta especie, tiñen de manera uniforme a través de toda la lesión por los exoantígenos que liberan las hifas en la matriz de dichas lesiones" ([19]).

Por último, el método de Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas, mejor conocido como ELISA (por sus siglas en inglés), ha demostrado ser 100% específico y más de un 95% sensible para la detección de anticuerpos IgG anti *P. insidiosum* en numerosas especies, incluyendo el equino ([19]). "ELISA es un ensayo realizado en un plato y está diseñado para detectar y cuantificar sustancias como péptidos, proteínas, anticuerpos y hormonas. Es por esto que, en adición de detectar anticuerpos, se ha utilizado para monitorear el progreso del animal durante tratamiento ya que arroja títulos de anticuerpos a distintos niveles según el nivel de infección" ([19,27]).

En zonas enzoóticas, los equinos que están saludables han arrojado títulos bajos de anticuerpos anti *P. insidiosum*, lo que según L. Mendoza es sugestivo de que pueden existir infecciones subclínicas ([19]).

2.9. Tratamiento y Prevención de la Enfermedad

El tratamiento de la Pitiosis equina resulta difícil, pero tiene buen pronóstico si es iniciado a tiempo. Existen tres métodos terapéuticos para tratar esta enfermedad: quirúrgico, por fármacos y la inmunoterapia. "La remoción quirúrgica de las lesiones es el método más practicado a pesar de que tiene una alta probabilidad de reincidencia" ([27]). La reincidencia de la Pitiosis luego de la remoción quirúrgica se debe a la resección incompleta del microorganismo y por esto la cirugía debe de ser radical. En adición, en la especie, las lesiones son principalmente cutáneas y están ubicadas en las extremidades del animal, lo que dificulta la remoción radical de tejido sin dañar tejido circundante. En ocasiones, si las lesiones no son de gran extensión, la cauterización luego de la remoción quirúrgica ha resultado ser efectiva ([19]).

Por otro lado, gracias a José Cardona-Álvarez et al, se ha documentado el uso de antimicóticos quimioterapéuticos para tratar algunos animales. De estos, se ha reportado el uso de yoduro de potasio intravenoso. Los resultados de dicho tratamiento no son consistentes en todos los casos. Se ha reportado también el uso intravenoso de

Anfotericina B, a pesar de que su uso es principalmente como antimicótico actuando en el ergosterol de la pared celular fúngica y el *Pythium* carece de este componente, por lo tanto ha tenido resultados poco exitosos en algunos casos. Ambas drogas mencionadas son altamente hepatotóxicas por lo que su uso prolongado está contraindicado ([4]).

"La inmunización de equinos con productos derivados de *P. insidiosum* han resultado ser exitosos en casos de la enfermedad aguda y en el 50% de los casos de pitiosis crónica" ([17,27]). La vacuna más reciente fue creada por Mendoza y su formulación es a base de exo y endo proteínas extraídas *del P. insidiosum*. Se ha demostrado, por histopatología, que "luego de la inmunoterapia la reacción eosinofílica inicial es sustituida por macrófagos y linfocitos T. Aparenta ser que los antígenos de la inmunoterapia estimulan una reacción de tipo Th1, lo que ayuda a eliminar el patógeno de los tejidos. Las reacciones tipo Th1 promueven la respuesta inmune mediada por células, la activación de macrófagos y un retardo en las reacciones de hipersensibilidad ([17]). Por esto, cultivos de tejidos de animales inmunizados siempre salieron negativos a la presencia de hifas"([18]).

Existen casos reportados de equinos inmunizados y curados que recaen al año de terminado el tratamiento, no obstante, la vacuna ha probado ser curativa y profiláctica. Para prevenir las infecciones con *P. insidiosum* se recomienda alejar animales de áreas pantanales, humedales o zonas donde coexista la vegetación y el agua, así como la vacunación profiláctica de los individuos en zonas de riesgo ([18])

SEGUNDA PARTE

3. Capítulo II: Materiales y Métodos

3.1.Localización de Estudio

El estudio fue realizado en las zonas inundables naturales y artificiales (Ver fotos 5-7) de tres de los cinco municipios de la provincia de Monte Plata, República Dominicana. Específicamente se muestreó en fincas aledañas a ríos, pantanos, con estanques de agua artificiales o aquellas consideradas como humedales. Los municipios que se incluyeron en este estudio fueron: Bayaguana (coordenadas: 18° 47' 00'' N - 69° 36' 00'' W),Yamasá (coordenadas: 18° 47' 00'' N - 70° 03' 00'' W) y Monte Plata (coordenadas: 18° 45' 00'' N - 69° 51' 00'' W). Adicional a eso, se recopilaron muestras de equinos ubicados en el trayecto de la carretera Hacienda Estrella a La Luisa, dado a que es una zona que contiene muchas siembras de arroz y cuyo ambiente pudiera favorecer a la aparición del *P. Insidiosum*.

Se seleccionó dicha provincia porque cumple con los requisitos agro-ecológicos y climáticos ideales para la proliferación del microorganismo en cuestión, en adición a ser una provincia de alta producción ganadera (que cuenta con equinos de trabajo en condiciones de salubridad ideales y deseables para nuestro estudio) y de caballos de carrera. “Monte Plata cuenta con una temperatura promedio de 30°C, una humedad relativa de más de un 95% y un índice de precipitación promedio de 20% ([11]). En adición contiene numerosos ríos tales como: el Ozama, Yabacao, Comate, Yamasá, Mijo, Sabita y Guanuma, los cuales en tiempos de lluvia suelen salirse de su cauce y provocar inundaciones.

Por otro lado, los municipios seleccionados tienen en sí una gran extensión de territorio bajo la clasificación de humedal según el Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales de la República Dominicana.

Se define como humedal a “cualquier superficie de terreno cubierta de agua estancada, permanente o temporal, dulce, salobre o salada, natural o artificial que incluye marismas, pantanos, extensiones de aguas marinas o praderas de yerbas marinas” ([11]).

3.2. Tamaño de Muestra

Las muestras fueron tomadas de cincuenta (50) equinos distribuidos en veintidós (22) propiedades o unidades productivas.

3.3. Selección de Muestra

Dada la fórmula estadística para determinar número de muestreo en poblaciones infinitas ([35]), si se asume un valor de confianza de 95%, un error del 5%, y un valor de prevalencia en cada propiedad de 25% a priori según el estudio similar realizado en Brasil ([39]), entonces el número de muestreo sería de 288 propiedades. Al aplicar el factor de ajuste para poblaciones finitas, con 292 unidades productivas con equinos según el Precenso Agropecuario 2015 de República Dominicana establecido para Monte Plata, entonces tenemos un total de 77 unidades o propiedades productivas.

- ★ Una unidad agropecuaria productiva es un terreno, dentro de un distrito, utilizados total o parcialmente como una unidad económica para el productor ([23]).

Al dividir las 77 propiedades o unidades productivas entre los cinco municipios, entonces hay alrededor de 15 unidades productivas por municipio para un total de 45 propiedades. Dicho número es ajustado a la mitad, dado a que no considera que las unidades productivas a evaluar son en zonas con condiciones climáticas ya

establecidas. Para ser considerada como parte del estudio, la propiedad debía de ubicarse en zona inundable ya sea natural o artificial.

Se estableció que cada propiedad muestreada tenía al menos un equino para ser considerada parte del estudio. Similar al estudio realizado en Brasil por Weiblen y Machado, en fincas con 10 equinos o menos, se muestrearon la totalidad de ejemplares. En fincas con más de 10 equinos, se tomó hasta un máximo de 15 ejemplares. Para el estudio completo se estableció un mínimo de 50 equinos. Los equinos se incluyeron en el muestreo sin discriminar por edad, sexo, raza o color de pelaje, pero dándole cierta prioridad a aquellos que tuvieran lesiones o signos clínicos sugestivos de Pitiosis.

3.4. Recolección de Datos

Se realizaron visitas a dichas propiedades agropecuarias entre los meses de agosto y septiembre del año 2020. Se realizó una identificación de cada animal, de la propiedad donde se encontraba cada uno, su historial clínico y se procedió a realizar un examen físico básico de los caballos. Dichos datos relevantes se anotaron en un formulario que incluimos en los anexos de este trabajo (Anexo III). Luego, se tomaron muestras de sangre de la vena yugular de cada equino en tubos separadores de suero debidamente identificados (Ver fotos 8, 9, 11, 12). Las muestras de cada día fueron almacenadas en un refrigerador a temperaturas entre 0-4 grados Celsius. Luego, las mismas fueron centrifugadas para posteriormente separar el suero en un tubo de recolección de sangre limpio y sin aditivos. Todas las muestras de suero fueron almacenadas de manera exitosa en un congelador hasta culminar el muestreo total y fueron enviadas al laboratorio Pan American Veterinary Laboratories, para que se realizaran las prueba serológicas ELISA. El laboratorio establece que las muestras de suero congeladas son viables hasta por un período de seis meses.

De encontrar casos positivos que presentaran lesiones activas características de Pitiosis, se acordó proceder a confirmar uno de estos resultados con prueba de PCR.

3.5. Equipo y Materiales Utilizados

Los materiales utilizados para la recolección de las muestras fueron los siguientes: (ver foto 10)

- Jeringas de 5cc (aproximadamente 100 unidades)
- Alcohol isopropilico 70%
- Algodón
- Tubos de recolección de sangre al vacío
    - Sin aditivos y con gel separador
- Centrífuga
- Congelador/ Refrigerador
- Tabla de anotaciones
- Bolígrafos

3.6. Descripción del método de diagnóstico ELISA utilizado por el Laboratorio Pan American Veterinary Labs (PAVLs)

Para este proyecto se utilizó el formato ELISA más popular, el de detección indirecta. Este método utiliza un anticuerpo secundario marcado o un complejo de biotina-estreptavidina para la amplificación; el anticuerpo secundario tiene especificidad por el anticuerpo primario ([27]).

Según Thermo Fisher Scientifics, las ventajas de este método es que existe una amplia variedad de anticuerpos secundarios que están disponibles comercialmente. Es versátil ya que se pueden hacer muchos anticuerpos primarios en una especie y usar el mismo anticuerpo secundario marcado para la detección. La sensibilidad aumenta porque cada anticuerpo primario contiene varios epítopos que pueden unirse al anticuerpo secundario marcado, lo que permite la amplificación de la señal. Dentro de las desventajas puede existir la reactividad cruzada con el anticuerpo secundario,

dando como resultado una señal inespecífica, y se requiere un paso de incubación adicional en el procedimiento.

Según el PAVL o Pan American Veterinary Labs., los pasos para el procedimiento ELISA indirecto son los siguientes.

1) Preparación de la placa de dilución:

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

2) Preparación de la placa del antígeno:

- Seleccionar los pozos recubiertos con el antígeno apropiado para la prueba a realizar.
- Agregar el número de placas y tiras recubiertas necesarias para cada prueba.
- Transferir 50 ul de las muestras diluidas a los pozos con el antígeno seleccionado.
- Cubrir las placas de antígeno con la placa de dilución e incubar por veinte (20) minutos a temperatura ambiente.
- Lavar la placa de antígeno tres veces.
- Añadir 100 ul de buffer conjugado a cada pozo.
- Cubrir nuevamente las placas e incubar por veinte (20) minutos
- Con los 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
- Lavar la placa tres (3) veces y secar.
- Agregar 100 ul de solución OPD a cada pozo.
- Incubar por veinte (20) minutos para desarrollo de color.

- Agregar 100 ul de solución STOP al terminarse el periodo de incubación.
- Esperar cinco (5) minutos y leer la placa con una longitud de onda de 490 nm.

En resumen, los pasos de este formato son:

1. El antígeno se une y recubre al 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.

3.7. Interpretación de Resultados por ELISA

Los resultados fueron interpretados por el laboratorio de la siguiente manera: se dividió la densidad óptica (DO) de cada muestra entre la densidad óptica de las de control negativo y se multiplicó el resultado por cien y se expresó en porcentaje.

Ejemplo:

(DO de la muestra / DO control negativo) x 100 = Puntuación del paciente (% de actividad)

Interpretación de Puntaje: ([27]).

0 - 150%	NEGATIVO
151 - 199%	LÍMITE INTERMEDIO
200 % o más	POSITIVO

Estos porcentajes no están relacionados a especificidad ni a sensibilidad, sino que nos indican los distintos niveles de infección según la cantidad de títulos de anticuerpos o densidad óptica resultante. Siendo esta una prueba serológica que mide anticuerpos IgG, la previa exposición a Pythium sin una infección actual puede inducir niveles de anticuerpos que pueden ser detectables durante varios meses luego de la exposición.

Según Robert Glass del Pan American Vet Labs en Lexington, Texas, el límite negativo indica que el animal nunca ha padecido de la enfermedad ni tampoco ha tenido contacto con el agente. El límite intermedio sugiere que el animal tuvo una reacción, ya sea por haber padecido de la enfermedad y superarla, o haber tenido una reacción alérgica al *P. Insidiosum* llamada "Enfermedad de las Vías Respiratorias inducida por Pythium" o PIAD por sus siglas en inglés, la cual causa una dificultad respiratoria significativa, cicatrices por la inflamación crónica de la región faríngea nasal y aún está bajo investigación. Por lo general, estos caballos dan una puntuación positiva baja o límite en esta prueba, sin haber padecido de la enfermedad.

Por otra parte, en zonas enzoóticas, los equinos que están saludables han arrojado títulos bajos de anticuerpos anti *P. insidiosum*, lo que según L. Mendoza es sugestivo de que pueden existir infecciones subclínicas([19]).

TERCERA PARTE

4. Capítulo III: Resultados

Se muestreó un total de cincuenta y seis (56) equinos distribuidos en veintidós (22) propiedades durante los meses de agosto y septiembre de este año 2020. Cuarenta y cinco (45) ejemplares y quince (15) propiedades en el municipio de Monte Playa, cuatro (4) propiedades y ocho (8) ejemplares en la zona de Bayaguana y el resto en Yamasá. Dichas fechas coincidieron con inundaciones repentinas en las zonas de muestreo.

Se detectó la presencia de anticuerpos IgG anti *Pythium insidiosum* en suero equino en dos (2) de los cincuenta y seis (56) ejemplares. Estos ejemplares son del municipio de Monte Plata, uno de los tres municipios de la provincia de Monte Plata estudiados. Los títulos de anticuerpos arrojados fueron de clasificación límite intermedio, siendo el resto de la población muestreada negativa para la presencia del organismo en cuestión, con una frecuencia de 3.57% (Gráfica 1); ninguno de estos casos mostraba lesiones activas evidentes (Tabla 1).

De los doce(12) animales con historial relacionado a signos clínicos asociados a Pitiosis, entre ellas: lesiones inactivas y/o cólicos recurrentes, sólo un 16.7% (2/12) resultó tener anticuerpos anti *P. insidiosum* (Gráfica 2). Se observó que los rangos de edad de 2-6 años y mayores de 17 fueron los afectados con Pitiosis. La frecuencia de Pitiosis en estos rangos de edad fue de 2.9% (1/34) y 20% (1/5) respectivamente (Gráfica 3). Dichos animales afectados por Pitiosis son pertenecientes a la raza Paso Fino, y cabe aclarar que estos animales no estaban estabulados y tenían acceso a pastoreo libre. Al comparar el número de casos de equinos con anticuerpos anti *P. insidiosum* con los no afectados por Pitiosis, se obtuvo que la raza Paso Fino fue afectada al 25% (2/8) (Gráfica 4).

En cuanto al sexo, un 3.8% de hembras afectadas de la totalidad de 26 hembras muestreadas y un 3.3% para machos afectados, de un total de 30 machos evaluados

(Gráfica 5). Ambos equinos con anticuerpos anti *P. insidiosum* eran de color zaino. Al comparar los animales de este color afectados con los no afectados, vemos que la pitiosis afectó a dicho color de pelaje en un 16.7% (Gráfica 6).

En detalle, en el municipio de Bayaguana se realizaron visitas a cuatro propiedades, todas con características climáticas y agroecológicas similares. La humedad promediaba el 87%, húmedas todo el año y todas las fincas muestreadas estaban ubicadas cerca de cañadas con zonas inundables naturales (Tabla 2). Los 8 caballos muestreados en esta zona, resultaron ser todos negativos para la presencia del *P. insidiosum* (Tabla 1). Ninguno de los caballos examinados en este territorio mostró lesiones activas sugestivas de Pitiosis.

El historial de dos equinos (002, 003) de este municipio mostraba que habían padecido de lo que los propietarios llamaban “culebrilla”, otros dos (007, 008) de cólicos recientes y/o recurrentes, y solo uno (004) con presencia de cicatrices a nivel de la segunda falange del miembro posterior izquierdo (cicatriz compatible con lesión producida por pitiosis cutánea pasada).

En el municipio de Monte Plata se visitaron 15 unidades productivas. La mayoría de los equinos muestreados en este trabajo investigativo (45 ejemplares) habitaban dicho territorio. La humedad promedio resultó ser de un 87% y al igual que en el municipio anterior, permanecían húmedas durante todo el año (Tabla 2). En este municipio predominaron las zonas inundables mixtas, tanto naturales (ríos, lagunas y cañadas) como artificiales (arrozales).

Fue en esta región que se encontraron los dos casos positivos de límite intermedio. Ambos pertenecientes a la misma propiedad, y ambos con cicatrices de lesiones cutáneas en sus miembros apendiculares. Ambos ejemplares eran de raza Paso Fino y color zaino. Uno era macho en el rango de edad de 4 años (011) y otra hembra de más de 17 años (012) (Tabla 1).

De los equinos examinados en esta región con resultados negativos para la presencia de anticuerpos IgG anti *P. insidiosum*, sólo uno (021) presentaba lesión activa en su miembro anterior derecho, a nivel del menudillo (Ver foto 14). Otros 5 (006, 016, 022, 031, 050) tenían historial o cicatrices de lesiones sugestivas de Pitiosis.

En Yamasá, se visitaron 3 propiedades y un total de 6 ejemplares (todos de trabajo). El territorio que predominaba en estas propiedades era de tipo inundable natural, cerca de cañadas. La humedad promedio era de 86% y permanecía así durante todo el año. Todos los equinos muestreados en este municipio resultaron ser negativos en la prueba serológica y solo uno (051) mostraba una lesión redonda activa sugestiva de Pitiosis (Ver foto 13 y tabla 1).

Dado a que el laboratorio Pan American Laboratories se encuentra investigando la distribución mundial de Pitiosis, Lagenidiosis y otras enfermedades causadas por oomicetos, nos permitieron utilizar las muestras obtenidas para investigar la presencia de *Lagenidium* . Ya que los hallazgos incidentales encontrados durante el muestreo son de gran significancia; los incluímos a groso modo a continuación: (Tabla 1).

- El 17.8% de los animales muestreados resultaron positivos a *Lagenidium*, incluyendo los dos ejemplares (011-012) que arrojaron títulos de límite intermedio para *P. insidiosum*.
- 9 de estos caballos resultaron ser reales positivos para Lagenidium y 1 de límite intermedio.
- Un 41.7 % de los equinos con historial sugestivo de Pitiosis (cicatrices y/o cólicos) resultaron positivos para anticuerpos anti *Lagenidium* .

5. Capítulo IV: Discusión de Resultados

La Pitiosis en equinos no había sido reportada en República Dominicana. En este trabajo investigativo, se detectaron dos casos de caballos con presencia de anticuerpos IgG anti *Pythium insidiosum* en una misma propiedad de Monte Plata, República Dominicana durante los meses de agosto y septiembre de este año 2020.

Los equinos con títulos de anticuerpos IgG para *P. Insidiosum* no presentaban lesiones activas de Pitiosis por lo que corroborar el diagnóstico por otros métodos como histopatología y por PCR no fueron posibles. Aun así, se considera la prueba serológica ELISA como la más sensible y específica disponible para el diagnóstico de esta enfermedad.

Dichos resultados de nuestra investigación representan una frecuencia de 3.57% en relación con los animales muestreados. Contrario a lo esperado, la frecuencia detectada fue mucho más baja en relación con otros trabajos similares cuyas frecuencias fluctuaban los 11.1% ([39]) y 26.9% ([4]).

En los casos previamente descritos, la zona de hallazgo de La Luisa en el municipio de Monte Plata, y la época del año del muestreo cumplen con las condiciones climáticas y ambientales que epidemiológicamente favorecen el ciclo de vida de *Pythium sp.* ([1,4,39]). Dichas condiciones necesarias son: lluvias abundantes, terrenos inundables, temperatura promedio de 29°C, humedad promedio de 87% y pastoreo cerca de una laguna, pudieran predisponer a estos animales a una posible infección. Estos datos coinciden con los hallazgos de Weiblen C., Machado G., et al. quienes discuten que "*P. insidiosum* es un oomiceto acuático y su ciclo está relacionado con la presencia de agua y materia orgánica"([39]); siendo cualquier territorio de este tipo considerado uno de alto riesgo para padecer la enfermedad.

Con la data de este experimento se encontró que la patología afecta a ambos sexos del mismo modo y que puede afectar tanto a animales jóvenes como geriátricos. De los resultados obtenidos, la raza más predispuesta fue la Paso Fino y el color de

pelaje zaino. Estas relaciones no pueden generalizarse ni ser consideradas universalmente ciertas hasta realizar un trabajo investigativo más amplio en el país.

Los casos con títulos de anticuerpos anti *P. insidiosum* detectados arrojaron valores de densidad óptica clasificados como de límite intermedio. Lo anterior significó una de dos cosas: que estos equinos alguna vez padecieron de la enfermedad y crearon anticuerpos, o que la enfermedad es endémica de la zona y los animales han creado cierta resistencia al microorganismo. Se descartó la posibilidad de que los animales padecieran la Enfermedad de las Vías Respiratorias inducida por Pythium (PIAD) dado a que ninguno de los animales, en su examen físico, mostró evidencia de dificultad respiratoria característico de la enfermedad según conversaciones con el Dr. Glass de Pan American Veterinary Laboratories.

De la totalidad de suero equino evaluado con historial o algún signo sugestivo de la enfermedad, sólo un 16.7% (2 de los 12 con historial relacionado) resultó tener anticuerpos anti *P. Insidiosum*. Esto quiere decir que existen otras enfermedades diferenciales que afectan a los equinos estudiados con más frecuencia que la Pitiosis.

Al investigar la presencia de *Lagenidium* en estos animales, encontramos que de los 12 caballos con historial relacionado a Pitiosis (cicatrices en miembros apendiculares y cólicos) un 41.7% de éstos resultaron ser positivos para la presencia de este otro oomiceto, incluyendo los dos equinos también afectados por Pitiosis. En la totalidad de muestras, el *Lagenidium* afectó a los equinos en un 17.8%, lo que hace a esta enfermedad de mayor riesgo que la Pitiosis en la zona estudiada.

La Lagenidiosis, es una enfermedad aún menos estudiada en equinos que la Pitiosis. La misma cursa de modo similar a la Pitiosis, con lesiones similares, pero con la característica alarmante de que puede infectar larvas de mosquitos([40]). Este último detalle aún está bajo investigación, pero representaría una vía de diseminación rápida en República Dominicana.

Cabe mencionar que en redacción de esta porción del trabajo de tesis, se recibió una llamada del propietario de los dos equinos afectados por la enfermedad, indicando que uno de estos (012) tiene lesiones activas actualmente (diciembre 2020) de lo que él llama “Culebrilla” (nombre popular que se ha utilizado en la República Dominicana para referirse a la enfermedad Linfangitis Epizoótica), que anteriormente había padecido (no lo mencionó durante la toma de muestra) y que siempre lo ha tratado mediante cauterización de las lesiones con mucho éxito, pero en esta ocasión dicho tratamiento no ha funcionado. Durante el muestreo de esta tesis, al enseñar imágenes de equinos con Pitiosis los propietarios reconocían dichas imágenes como “Culebrilla”. Queda por investigar si la popular enfermedad conocida como “Culebrilla” está relacionada a un diagnóstico específico o a un conjunto de enfermedades que desarrollan lesiones cutáneas similares.

Con fines de dar seguimiento, se ha de confirmar el diagnóstico de estos caballos que dieron positivos tanto a *P. Insidiosum* como *Lagenidium* , y proporcionar alternativas de tratamiento para este animal. Pan American Veterinary Laboratories tiene el compromiso de proporcionarnos pruebas de Inmunodifusión o ID que aunque son menos sensibles que la serología ya realizada, nos pueden ayudar a corroborar la data recopilada. En adición, nos brindarán la inmunoterapia adecuada para tratar la enfermedad que esté activa en el momento. Los hallazgos de dichas pruebas, de estar listos a principios del año siguiente, serán compartidos al presentar este trabajo de grado, como datos adicionales. A pesar de darse por concluido este proyecto investigativo, se entiende que esta investigación en el país recién está comenzando.

6. Capítulo V: Conclusiones y Recomendaciones

6.1. Conclusión

1. Se detectaron equinos en zonas inundables de uno de los tres municipios de Monte Plata, República Dominicana con anticuerpos igG anti P. insidiosum.
2. Hasta el momento, la pitiosis afecta a ambos sexos del mismo modo y puede infectar tanto a animales jóvenes como geriátricos.
3. A pesar de que el color zaino y la raza paso fino fueron afectados, se require mayor investigación del su posible relación.
4. Monte Plata, especialmente los municipios estudiados cumplen con las condiciones climáticas y agro-ecológicas ideales para la proliferación de las zoosporas del Pythium , pero al momento la pitiosis no representa una amenaza para los equinos del país.

6.2. Recomendaciones

1. Recomendamos continuar el trabajo investigativo de Pitiosis en otras zonas del país con características climáticas similares, incluyendo varias especies animales.

2. La metodología empleada se puede utilizar en estudios de investigaciones de otros temas similares o áreas similares, como por ejemplo, la presencia y prevalencia de *Lagenidium*, que acorde con nuestros resultados y como hallazgo incidental, presenta ser una incógnita de mayor gravedad que la misma presencia de *P. insidiosum* en el país.

3. La baja frecuencia de la enfermedad reportada en este trabajo investigativo no implica bajar la guardia contra ésta y otras enfermedades similares. Por lo

contrario, se debe continuar educando a la población veterinaria del país sobre este y otros organismos patógenos similares.

4. Se recomienda continuar educando a la población sobre esta enfermedad relativamente nueva en nuestro país, que pudiera afectar directa o indirectamente a las unidades productivas vulnerables, sus animales y a sus productores.

5. El *P. insidiosum* es un agente infeccioso agresivo y emergente a nivel mundial. Su tratamiento exitoso depende exclusivamente de un diagnóstico prematuro.

6. Desde el punto de vista académico, invitamos a la facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales de la Universidad Nacional Pedro Henriquez Ureña, a nuestros colegas, compañeros y profesores a conocer sobre la importancia de continuar la investigación del tema abordado en este proyecto de grado y así contribuir al conocimiento de los oomicetos patógenos a nivel mundial.

7. Desde el punto de vista práctico, recomendamos que el sector agropecuario de nuestro país continúe la labor de crear censos actualizados para las zonas de alta producción agropecuaria, así, los estudios posteriores gocen de un mejor alcance investigativo con veracidad y éxito.

CUARTA PARTE

7. Referencias Bibliográficas

1. Acero-Mondragón E.J., Botero-Rosas D.A., et al. Micosis por *Pythium insidiosum* primer caso con diagnóstico definitivo en Colombia. *NOVA: Publicación Científica en Ciencias Biomédicas* 2013; Vol 11(19): 65-72.

2. Alfaro, A.A., Mendoza, L. Four cases of equine bone lesions caused *by Pythium insidiosum*. *Equine Veterinary Journal* 1990; 22:295-297.

3. Bezerra J., Pedroso P.M.O. et al. Equine intestinal Pythiosis in Southern Brazil*. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec* 2010; 62(2): 481-483.

4. Cardona J.A., Vargas-Viloria M. et al. Frecuencia de Pythiosis Cutánea en Caballos de Producción en Explotaciones Ganaderas de Córdoba , Colombia. *Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia* 2014; 61(1): 31-43.

5. De Cock WAW, Mendoza L, Padhye AA, et al*. Pythium insidiosum* sp. Nov., the etiologic agent of pythiosis. J *Clinical Microbiology* 1987; 25: 344-349.

6. Estrada-Coates A.T., Alva-Trujillo M. et al. Pitiosis Cutánea Equina. *Actualidades en Medicina Veterinaria y Zootecnia México* 2016: 15: 16-22.

7. Foil, C.S., Short B.G., et al. A report of subcutaneous pythiosis in five dogs and a review of the etiologic agent Pythium spp. *Journal of American Animal Hospital Association* 1984; 20; 959-966.

8. Gaastra W, Lipman L.J.A, De Cock et al. *Pythium insidiosum*: An Overview. *Veterinary Microbiology* 2010; 146: 1-16.

9. Gopinath D. Splendore-Hoeppli phenomenon. *Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP* 2018, *22*(2), 161–162. https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_79_18.

10. Grooters, A.M., Leise, B.S. et al. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of pythiosis in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2002;16: 142-6.

11. López Y. Un País de Humedales. *Biodiversidad. Listin Diario*.2/2/2014: Obtenido en línea de: https://listindiario.com/la-vida/2014/02/02/309093/un-pais-de-humedales en abril del año 2020.

12. Marcella K. "Swamp Cancer": The increasing threat of equine pythiosis.2011. Obtenido dehttps://www.dvm360.com/view/swamp-cancer-increasing-threat-equine-pythiosis

13. Márquez A., Salas Y, et al. Descripción Anatomopatológica de Pitiosis Cutánea en Equinos. *Revista Facultad Ciencias Veterinarias* UCV 2010. Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado", Barquisimeto. Venezuela ,2010: 51(1): 37-42.

14. Mendoza L, Alfaro, A.A. Equine Pythiosis in Costa Rica: report of 39 cases. *Mycopathologia* 1986;94: 123-129.

15. Mendoza L, Ajello L, McGinnis MR. Infections caused by the oomycete pathogen *Pythium insidiosum*. *Journal Mycology Medicine* 1996;6: 151-164.

16. Mendoza L, Kaufman L, William M, Glass R. Serodiagnosis of Human and Animal Pythiosis using an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 1997;4(6): 715-718.

17. Mendoza L., Mandy W, Gass R. An improved *Pythium insidiosum* vaccine formulation with enhanced immunotherapeutic properties in horses and dogs with pythiosis. *Vaccine* 2003; 21: 2797-2804.

18. Mendoza L, Newton J. Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum*. *Medical Mycology* 2005; 43: 477-486.

19. Mendoza L. Pythium Insidiosum. *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections* 2016; 24:P 135.1-135.57.

20. Miller RI. Granulomatous and Neoplastic diseases of the equine skin: a review. *Vet Rev Monograph* No.6 Townsville, Australia, Department of Tropical Veterinary Science, James Cook University, 1983: 1- 52.

21. Miller RI, Campbell RS. Immunological studies on equine Phycomycosis. *Australian Veterinary Journal* 1982; 58: 377-382.

22. Miller RI, Campbell RS. The Comparative pathology of Equine Phycomycosis. *Veterinary Pathology* 1984; 21: 325-332.

23. Ministerio de Economía , Planificación y Desarrollo.Oficina Nacional de Estadística. VII Pre Censo Nacional Agropecuario 2015.Santo Domingo, abril , 2016;P:122.

24. Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales de República Dominicana. Monte Plata.Obtenidode:https://ambiente.gob.do/informacion-ambiental/informacion-provincial/monte-plata/ en abril del año 2020.

25. Morgan R. Pythiosis/ Lagenidiosis. VINcyclopedia of Diseases 2010.Obtenido en línea de:https://www.vin.com/Members/Associate/Associate.plx?from=GetDzInfo&DiseaseId=809 en enero del 2020.

26. Oficina Nacional de Estadística (2015). *División Territorial 2015, República Dominicana.* (PDF). Octubre 2015. Santo Domingo.

27. Pan American Veterinary Laboratories. Technical Papers. Obtenidos en línea de : https://pavlab.com/pavlab/pythiosis-insidiosum/technical-papers/biology-of pythium/ el día 8 de enero de 2020.

28. Pan American Veterinary Laboratories. Technical Papers. Obtenidos en línea de : https://pavlab.com/pavlab/pythiosis-insidiosum/technical-papers/horse-pythiosis/ el día 8 de enero de 2020.

29. Pennsylvania State University. What is Pythium?. Obtenido en línea de: https://plantpath.psu.edu/pythium/module-1/pythium en abril del año 2020.

30. Purcell, K.L., Johnson, P.J., et al. Jejunal obstruction caused by *Pythium insidiosum* granuloma in a mare. *Journal of American Veterinary Medicine Association 1994; 205:*337-9.

31. Rivierre C, Laprie C et al. Pythiosis in Africa. Journal of Emerging Infectious Diseases 2005; 11(3): 479-481.

32. Romero A, García J et al. Equine pythiosis in the eastern wetlands of Uruguay. *Brazilian Journal of Veterinary Research* 2019: 39(7): 469-475.

33. Schanzembach M, Brayer D et al.. Descripción de un caso de pitiosis cutánea equina y su diagnóstico mediante diversas técnicas. *SMVU*. 2019; (55) 96-101.

34. Thermo Fisher Scientific. Pierce Protein Methods. What is an ELISA (enzyme-linked immunosorbentassay)dehttps://www.thermofisher.com/do/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-elisa.html#2 en Mayo del 2020.

35. Thusfield,M. Veterinary Epidemiology.Oxford: Wiley-Blackwell,2007.p 610.

36. Tizard I.R. T- Helper Cells & Their Response to Antigen. *Veterinary Immunology: An Introduction*. Saunders, 7ma edición.(10-13): 105-153.

37. Virgile, R., Perry, HD., et al. Human corneal ulcer caused by *Pythium insidiosum*. Cornea 1993; 12: 81-83.

38. Walker N. Equine Pythiosis. *The Educated Horseman: Disease Series*. Louisiana State University, Ag Center Pub. 3606. Versión en línea: www.LSUAgCenter.com

39. Weiblen, C.,Machado,G., et al.Seroprevalence of *Pythium insidiosum* infection in equine in Rio Grande do Sul, Brazil.Ciencia Rural 2016;46:1:1-8.

40.Viela Raquel, Taylor John W. et al.Lagenidium giganteum Pathogenicity in Mammals.Emerging Infectious Diseases 2015; 21(2): 290-297.

8. Anexos

ANEXO I: Tablas y Gráficas

Tabla 1: Tabla de Datos de Equinos Muestreados y Resultados de Prueba Serológica ELISA (*P. Insidiosum* y *Lagenidium*)

ID	# De Propiedad	Fecha de Muestreo	Ubicación de Finca	Raza	Rango Edad (años)	Sexo	Color de pelaje	Signos Clínicos/ Historial asociado a Pitiosis ¿si o no ?	Lesiones recientes sugestivas de Pitiosis cutánea ¿si o no ?	Resultados ELISA P. insidiosum	Resultados ELISA *Lagenidium*	Comentarios
001	1	8/16/2020	Bayaguana	Paso fino	2-6	F	ZAINO	NO	NO	NEGATIVO	NEGATIVO	
002	1	8/16/2020	Bayaguana	Criollo	12-16	M	ALAZÁN	SI	NO	NEGATIVO	NEGATIVO	HISTORIAL CULEBRILLA
003	1	8/16/2020	Bayaguana	Criollo	2-6	F	ZAINO	SI	NO	NEGATIVO	NEGATIVO	HISTORIAL CULEBRILLA
004	1	8/16/2020	Bayaguana	Criollo	7-11	M	ZAINO	SI	NO	NEGATIVO	NEGATIVO	CICATRIZ LESIÓN
005	2	8/16/2020	Monte Plata	Higüeyano	7-11	M	ALAZÁN	NO	NO	NEGATIVO	POSITIVO	
006	2	8/16/2020	Monte Plata	Criollo	2-6	M	ALAZÁN	SI	NO	NEGATIVO	POSITIVO	CICATRIZ LESIÓN
007	3	8/16/2020	Bayaguana	Paso fino	7-11	M	ALAZÁN	SI	NO	NEGATIVO	POSITIVO	CÓLICO RECIENTE
008	4	8/16/2020	Bayaguana	Criollo	2-6	M	PINTO	SI	NO	NEGATIVO	POSITIVO	CÓLICO RECURRENTE
009	4	8/16/2020	Bayaguana	Criollo	12-16	M	ZAINO	NO	NO	NEGATIVO	POSITIVO	
010	5	8/16/2020	Bayaguana	Criollo	2-6	M	ZAINO	NO	NO	NEGATIVO	POSITIVO	

011	6	8/18/2020	Monte Plata	Paso fino	2-6	M	ZAINO	SI	NO	LÍMITE	POSITIVO	CICATRIZ LESIÓN
012	6	8/18/2020	Monte Plata	Paso fino	17+	F	ZAINO	SI	NO	LÍMITE	POSITIVO	CICATRIZ LESIÓN
013	6	8/18/2020	Monte Plata	Paso fino	17+	F	BAYO	NO	NO	NEGATIVO	NEGATIVO	
014	6	8/18/2020	Monte Plata	Paso fino	7-11	F	NEGRO	NO	NO	NEGATIVO	NEGATIVO	
015	7	8/18/2020	Monte Plata	Criollo	7-11	F	BAYO	NO	NO	NEGATIVO	NEGATIVO	
016	7	8/18/2020	Monte Plata	Criollo	7-11	F	PINTO	SI	NO	NEGATIVO	NEGATIVO	CICATRIZ LESIÓN
017	7	8/18/2020	Monte Plata	Criollo	2-6	F	ALAZÁN	NO	NO	NEGATIVO	NEGATIVO	
018	8	8/18/2020	Monte Plata	Criollo	2-6	M	BAYO	NO	NO	NEGATIVO	POSITIVO	
019	9	8/18/2020	Monte Plata	Criollo	2-6	M	RUCIO	NO	NO	NEGATIVO	NEGATIVO	
020	9	8/18/2020	Monte Plata	Criollo	2-6	F	BAYO	NO	NO	NEGATIVO	NEGATIVO	
021	10	8/18/2020	Monte Plata	Criollo	2-6	F	ALAZÁN	NO	SI	NEGATIVO	NEGATIVO	LESIONES REDONDAS ACTIVAS EN MENUDILLOS
022	10	8/18/2020	Monte Plata	Criollo	2-6	F	RUCIO	NO	SI	NEGATIVO	NEGATIVO	
023	11	8/18/2020	Monte Plata	Criollo	≤1	M	NEGRO	NO	NO	NEGATIVO	NEGATIVO	
024	11	8/18/2020	Monte Plata	Criollo	2-6	M	ALAZÁN	NO	NO	NEGATIVO	NEGATIVO	

025	11	8/18/2020	Monte Plata	Criollo	12-16	M	ZAINO	NO	NO	NEGATIVO	NEGATIVO	
026	11	8/18/2020	Monte Plata	Criollo	2-6	F	ALAZÁN	NO	NO	NEGATIVO	NEGATIVO	
027	12	8/18/2020	Monte Plata	Criollo	17+	F	APALOOSA	NO	NO	NEGATIVO	NEGATIVO	
028	13	8/18/2020	Monte Plata	Criollo	17+	M	APALOOSA	NO	NO	NEGATIVO	NEGATIVO	
029	13	8/18/2020	Monte Plata	Criollo	12-16	F	APALOOSA	NO	NO	NEGATIVO	NEGATIVO	
030	14	8/18/2020	Monte Plata	Criollo	2-6	F	ALAZÁN	NO	NO	NEGATIVO	NEGATIVO	
031	15	8/27/2020	Monte Plata	Pura Sangre	2-6	M	RUCIO	SI	NO	NEGATIVO	NEGATIVO	CICATRIZ LESIÓN (BUCAL BILATERAL)
032	16	8/27/2020	Monte Plata	Criollo	2-6	M	PALOMINO	NO	NO	NEGATIVO	NEGATIVO	
033	16	8/27/2020	Monte Plata	Criollo	7-11	M	ZAINO	NO	NO	NEGATIVO	NEGATIVO	
034	16	8/27/2020	Monte Plata	Paso fino	7-11	M	ZAINO	NO	NO	NEGATIVO	NEGATIVO	
035	16	8/27/2020	Monte Plata	Criollo	2-6	M	PINTO	NO	NO	NEGATIVO	LÍMITE	
036	16	8/27/2020	Monte Plata	Paso fino	12-16	F	ALAZÁN	NO	NO	NEGATIVO	NEGATIVO	
037	17	8/28/2020	Monte Plata	Criollo	2-6	M	ALAZÁN	NO	NO	NEGATIVO	NEGATIVO	
038	17	8/28/2020	Monte Plata	Criollo	2-6	M	RUANO ROJO	NO	NO	NEGATIVO	NEGATIVO	

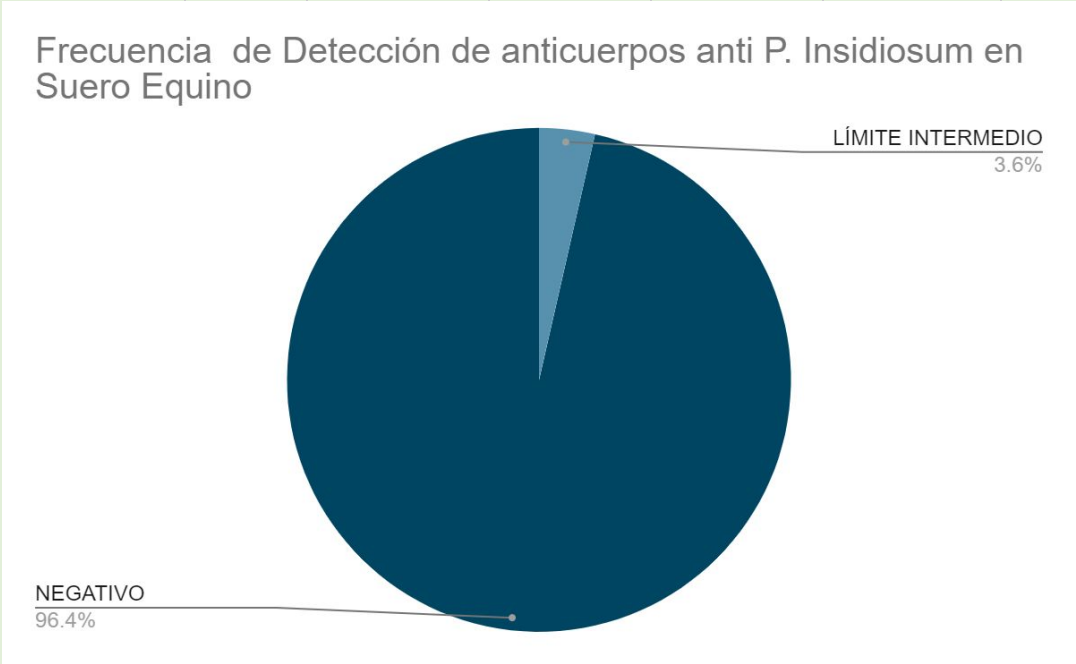
039	17	8/28/2020	Monte Plata	Criollo	7-11	F	ALAZÁN	NO	NO	NEGATIVO	NEGATIVO	
040	17	8/28/2020	Monte Plata	Criollo	2-6	F	ALAZÁN	NO	NO	NEGATIVO	NEGATIVO	LESIÓN EN PECHO CON MIASIS
041	17	8/28/2020	Monte Plata	Criollo	≤1	F	ALAZÁN	NO	NO	NEGATIVO	NEGATIVO	
042	17	8/28/2020	Monte Plata	Criollo	2-6	F	PINTO	NO	NO	NEGATIVO	NEGATIVO	
043	18	8/29/2020	Monte Plata	Criollo	2-6	F	ALAZÁN	NO	NO	NEGATIVO	NEGATIVO	
044	18	8/29/2020	Monte Plata	Cuarto de milla	7-11	M	ALAZÁN	NO	SI	NEGATIVO	NEGATIVO	ABSCESO EN MIEMBRO POSTERIOR IZQUIERDO
045	18	8/29/2020	Monte Plata	Criollo	2-6	F	RUANO GRIS	NO	NO	NEGATIVO	NEGATIVO	
046	18	8/29/2020	Monte Plata	Cuarto de milla	17+	F	RUANO ROJO	NO	NO	NEGATIVO	NEGATIVO	
047	18	8/29/2020	Monte Plata	Cuarto de milla	2-6	F	RUANO ROJO	NO	NO	NEGATIVO	NEGATIVO	
048	18	8/29/2020	Monte Plata	Cuarto de milla	2-6	M	RUCIO	NO	NO	NEGATIVO	NEGATIVO	
049	18	8/29/2020	Monte Plata	Criollo	2-6	M	ALAZÁN	NO	NO	NEGATIVO	NEGATIVO	
050	19	8/29/2020	Monte Plata	Pura sangre	2-6	M	ZAINO	SI	NO	NEGATIVO	NEGATIVO	HISTORIAL CULEBRILLA
051	20	9/6/2020	Yamasá	Criollo	2-6	F	BAYO	SI	SI	NEGATIVO	NEGATIVO	LESIÓN REDONDA ULCERADA MIEMBRO POSTERIOR DERECHO

052	20	9/6/2020	Yamasá	Criollo	2-6	M	ZAINO	NO	NO	NEGATIVO	NEGATIVO	
053	20	9/6/2020	Yamasá	Criollo	12-16	M	BAYO	NO	NO	NEGATIVO	NEGATIVO	
054	21	9/6/2020	Yamasá	Criollo	2-6	F	BAYO	NO	NO	NEGATIVO	NEGATIVO	
055	21	9/6/2020	Yamasá	Criollo	2-6	M	BAYO	NO	NO	NEGATIVO	NEGATIVO	
056	22	9/6/2020	Yamasá	Criollo	2-6	M	BAYO	NO	NO	NEGATIVO	NEGATIVO	

Tabla 2: Distribución de Resultados ELISA para *P. Insidiosum* y *Lagenidium* por propiedad

# propiedad	Ubicación	% de humedad	Tipo de Zona Inundable	Descripción zona inundable	Resultados ELISA + P.insidiosum (agrupados reales pos y limite intermedio)	Resultados ELISA - P.insidiosum	Resultados ELISA + Lagenidium (agrupados reales pos y limite intermedio)	Resultados ELISA - Lagenidium
1	Bayaguana	87	natural	Cañadas	0	4	0	4
2	Monte Plata	86	natural	Cañadas	0	2	2	0
3	Bayaguana	87	natural	Cañadas	0	1	1	0
4	Bayaguana	87	natural	Cañadas	0	2	2	0
5	Bayaguana	87	natural	Cañadas	0	1	1	0
6	Monte Plata	90	natural	Laguna	2	2	2	2
7	Monte Plata	89	artificial	Arrozal	0	3	0	3
8	Monte Plata	89	artificial	Arrozal	0	1	1	0
9	Monte Plata	89	mixta	Arrozal	0	2	0	2
10	Monte Plata	87	mixta	Arrozal	0	2	0	2
11	Monte Plata	87	mixta	Arrozal	0	4	0	4
12	Monte Plata	87	mixta	Arrozal	0	1	0	1
13	Monte Plata	87	mixta	Arrozal	0	2	0	2

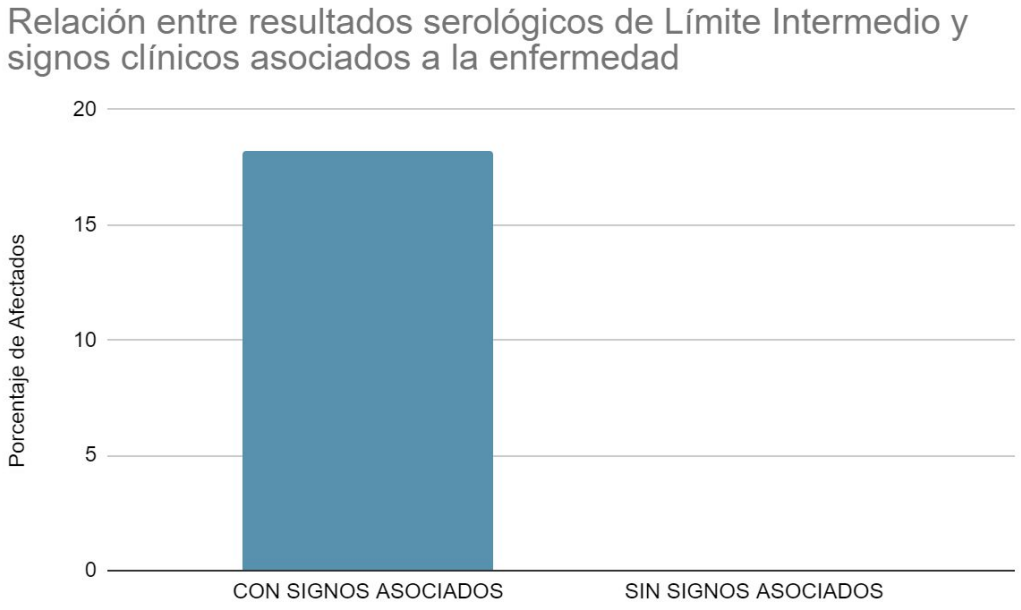
14	Monte Plata	87	mixta	Arrozal	0	1	0	1
15	Monte Plata	87	natural	Cañadas	0	2	0	2
16	Monte Plata	85	natural	Cañadas	0	4	1	3
17	Monte Plata	86	natural	Ríos	0	6	0	6
18	Monte Plata	87	natural	llano húmedo	0	7	0	7
19	Monte Plata	87	natural	Ríos	0	1	0	1
20	Yamasá	84	natural	Cañadas	0	3	0	3
21	Yamasá	87	natural	Cañadas	0	2	0	2
22	Yamasá	86	natural	Cañadas	0	1	0	1

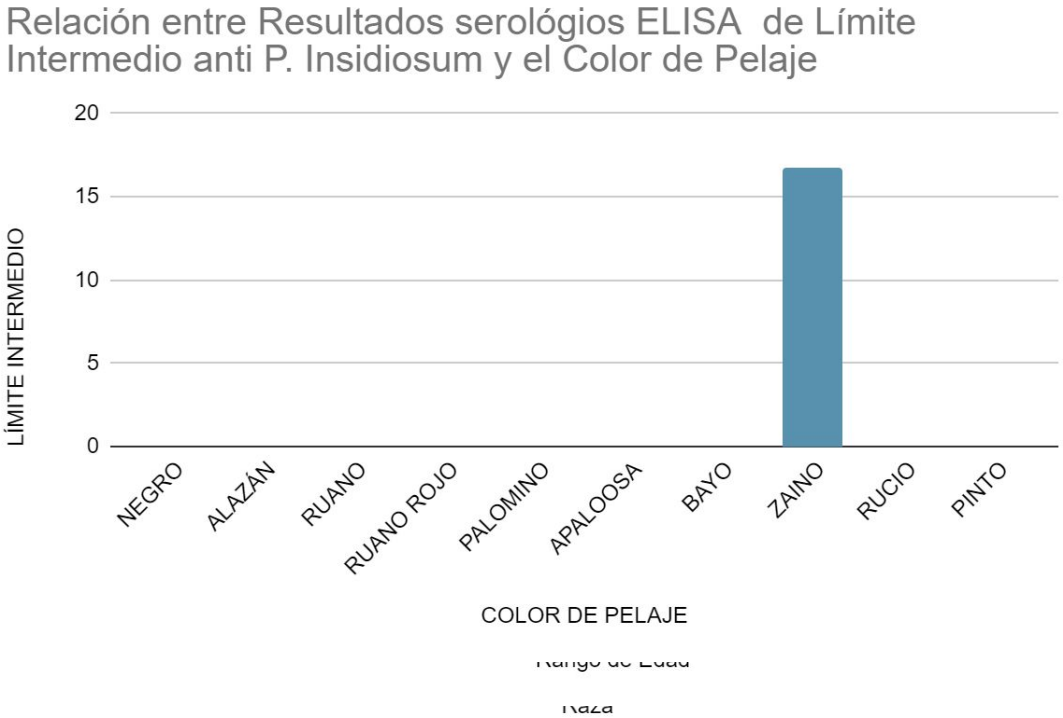


Gráfica 1: Frecuencia de Detección de anticuerpos anti P. Insidiosum en Suero Equino.

Gráfica 2: Relación entre Animales con Historial Sugestivo de Pitiosis y Resultados serológicos compatibles con la enfermedad.

Gráfica 3: Relación entre Animales con Resultados serológicos compatibles con Pitiosis y grupos de edad





Gráfica 4:Relación entre Animales con Resultados serológicos compatibles con Pitiosis y razas equinas

Gráfica 5: Relación entre Animales con Resultados serológicos compatibles con Pitiosis y el color de pelaje del equino

Gráfica 6: Relación entre Animales con Resultados serológicos compatibles con Pitiosis y el sexo del animal

ANEXO II: Figuras y Fotos

Figura 1: Fragmentos de la lesión donde se evidencian los *kunkers* (flecha) como concreciones irregulares de color amarillento, duras y de superficie arenosa ([13])**.**

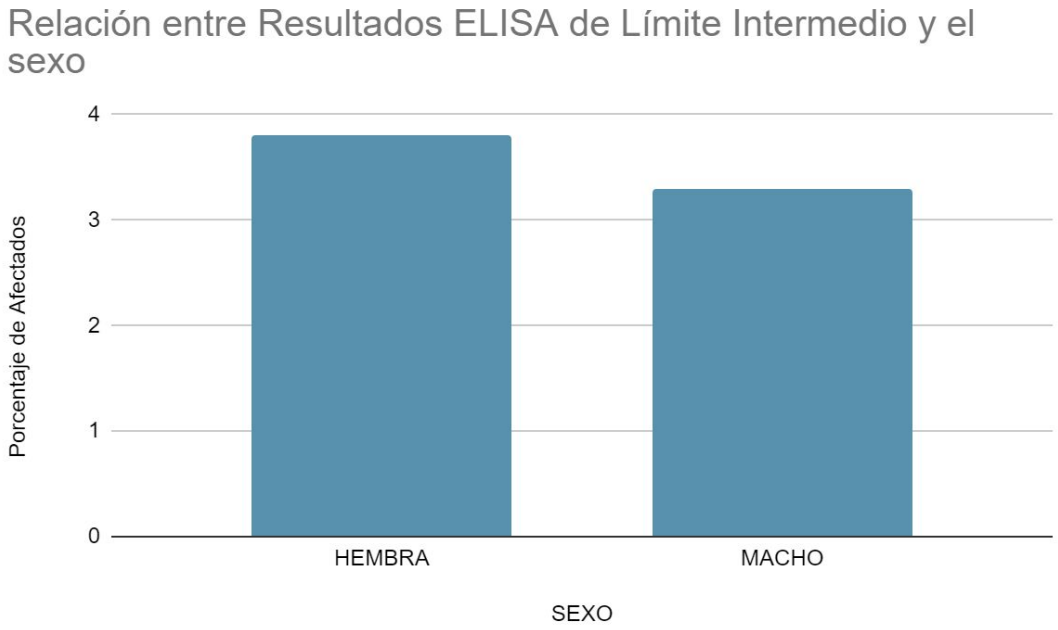


Figura 2: Rasgos histológicos del fenómeno Splendore- Hoeppli observado en infecciones de *P. insidiosum* ([9]).

Foto 1:(izquierda) Tejido de granulación en la región ventral del abdomen con

descarga serosanguinolenta o mucopurulenta. **Foto 2:**(derecha) Múltiples lesiones de

Pitiosis cutánea localizadas en la región torácica lateral, inguinal, y lateral del metatarso posterior izquierdo ([6]).

Foto 3:(izquierda) Lesión de Pitiosis cutánea en la región lateral de la mandíbula ([6]).
Foto 4: (derecha)Miembro anterior izquierdo de caballo diagnosticado con Pitiosis ([38])**.**

Foto 5 y 6: Aguas estancadas en zonas de muestreo; provincia Monte Plata 2020.

Foto 7: Libre pastoreo de equinos en zonas con aguas estancadas; provincia Monte Plata 2020.

Foto 8 y 9: Recolección de muestras de sangre de la vena yugular durante la parte práctica de la investigación, en la provincia de Monte Plata entre los meses agosto y septiembre del año 2020.

Foto 10: (izquierda) Parte de los materiales utilizados para la recolección de muestras; jeringas 5cc - 10cc, tubos recolectores al vacío, algodón, entre otros...

Foto 11: (centro) Parte de las muestras de sangre recolectadas en tubos separadores de suero debidamente identificados.

Foto 12: (derecha) Muestras de suero equino debidamente separadas.

Foto 13: Lesión redonda ulcerada sugestiva de Pitiosis en miembro posterior derecho. (ID: 051)

Foto 14: Lesión activa en miembro anterior derecho, a nivel del menudillo; sugestiva de Pitiosis. (ID: 021)

ANEXO III: Formulario de participantes

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

Formulario de participantes:

----------Información Propietario o Encargado----------

Nombre: _____ Número de Teléfono: _____

----------Descripción de Unidad Productiva/ Propiedad ----------

Tipo de explotación: _____ Ubicación: _____

Extensión: _____ Número de equinos en finca: _____

Porcentaje (%) de Humedad: _____ Es húmedo el año entero? SI / NO

Tipo de zona inundable:

- Natural
- Artificial

Descripción de Zona Inundable: _____

¿Han tenido animales con lesiones? SI / NO

¿Han tenido animales con cólicos recurrentes? SI / NO

----------Información de Equino----------

Nombre: _____ Edad: _____

Sexo: _____ Raza: _____

Color: _____ Temperamento: _____

Historial Clínico:

_____

_____

Examen Físico:

Temperatura: _____

Mucosas: _____

Llenado Capilar: _____

Frecuencia Cardiaca: _____

Frecuencia Respiratoria: _____

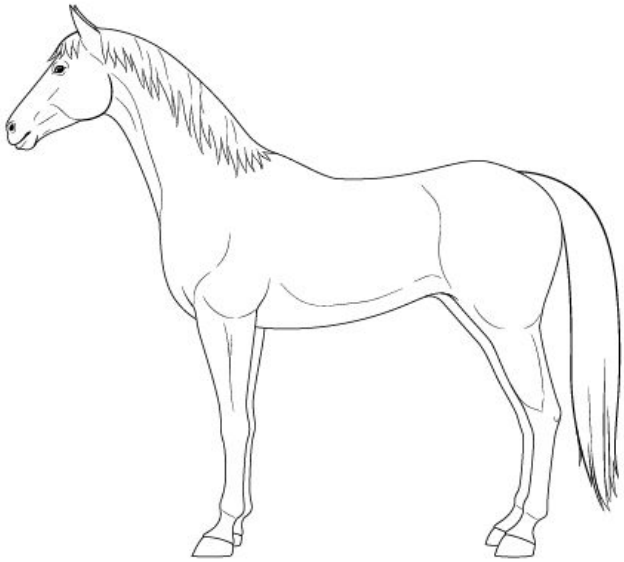
Auscultación Abdominal: _____

Condición Corporal: _____

Pelaje: _____

Sistema músculo/esquelético: _____

Observaciones:



ANEXO IV: Carta de autorización por parte del Dr. Leonel Mendoza asociado a Pan American Veterinary Lab (PAVL) para recibir y procesar las muestras enviadas al exterior a través de LAVECEN.

MICHIGAN STATE
UNIVERSITY

September 28, 2020

Dr. Julia Vargas
Director of Diagnostics,
Ave. Monumental 50
Los Girasoles,
Santo Domingo, Dominican Republic 665023

Dear Dr. Vargas,

Thank you for your interest in our diagnostic services to identify *Pythium insidosum* infecting mammals. We agreed to collaborate testing your sera to help in the identification of this disease in your animals. We will be using ELISA and Western Blot analyses to confirm the final diagnosis.

When you submit the sera, please indicate the selected specimens are for research purposes only and that they will be open upon arrival in our research laboratory only. If you have questions regarding the testing, please send an e-mail to the below address.

Sincerely,

Leonel Mendoza,
Professor
Biomedical Laboratory Diagnostics,
Michigan State University
354 Farm Lane, N. Kedzie Lab. Room N324
East Lansing, MI 48824
(517)432-1234
mendoza9@msu.edu

College of Natural Science

Biomedical Laboratory Diagnostics
North Kedzie Hall

354 Farm Lane, Room N322
East Lansing, MI 48824

517-353-7800
Fax: 517-432-2006
bld.msu.edu