ARTICULO

Confirmación de *Pythium insidiosum* como agente etiológico de la Granulomatosis Enzoótica Bovina mediante análisis de secuencia

Juan J. Luis-León[1,2], Rosa Cristina Pérez[1], José Luis Vivas[3], Leonel Mendoza[4] y Francisco Triana Alonso[2]

[1]Universidad de Carabobo. Facultad de Ciencias de la Salud, Sede Aragua. Departamento de Microbiología. Maracay. Estado Aragua. Venezuela.

[2]Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Carabobo BIOMED-UC, Facultad de Ciencias de la Salud. Sede Aragua. Maracay. Estado Aragua. Venezuela.

[3]Laboratorio "Delgado Launois". Clínica Lugo. Maracay. Estado Aragua. Venezuela.

[4]Medical Technology Program, Microbiology and Molecular Genetics, Michigan State University, 322 North Kedzie Hall, East Lansing, MI 48824-1031, USA

Correspondencia: F. J. Triana-Alonso

E-mail: ftrianaalonso@yahoo.com

RESUMEN

La Granulomatosis Enzoótica Bovina (GEB) es una enfermedad que afecta al ganado bovino en regiones de sabana inundable de Venezuela. El agente etiológico de la GEB ha sido identificado previamente en animales infectados como *Pythium insidiosum*, mediante estudios inmunológicos y de morfología microscópica. Para confirmar la identidad del microorganismo por análisis de secuencia, se tomaron muestras de tejido infectado de 20 bovinos y se aisló ADN genómico total. La secuencia correspondiente al ADNr 18S fue amplificada mediante PCR usando cebadores previamente reportados (NS1 y NS8). El segmento amplificado (1,8 kpb) fue clonado en el plásmido pCR®2.1-TOPO® y expandido en células de *E. coli* transformadas. El ADN recombinante recuperado fue secuenciado y se comparó con secuencias reportadas para *P. insidiosum* y otras especies del género *Pythium*: *P. myriotylum*, *P. monospermum*, *P. Ro21* y *P. spinosum*. El alineamiento múltiple de las secuencias demostró una identidad total del segmento amplificado con la secuencia de referencia para *P. insidiosum*, y diferencias significativas con las demás secuencias incluidas en el análisis. Estos resultados, junto a las evidencias previas, demuestran que el agente etiológico de la GEB en los bovinos estudiados es *Pythium insidiosum*. Este hallazgo tiene implicaciones importantes pues la enfermedad puede ocasionar grandes pérdidas económicas y su agente causal puede infectar también a humanos (causando Pythiosis humana). Por lo tanto, es necesario caracterizar las cepas de *P. insidiosum* que se encuentran en el país y emprender la producción de vacunas inmunoterapéuticas y el desarrollo de tratamientos específicos.

Palabras clave: Granulomatosis Enzoótica Bovina, *Pythium insidosum*, PCR, secuenciación

ABSTRACT

Confirmation of *Pythium insidiosum* as an etiologic agent of Enzootic Bovine Granulomatosis by sequence analysis

Enzootic bovine granulomatosis (EBG) is a disease that affects bovine cattle in the flooded Savanna regions of Venezuela. The etiologic agent was previously identified as *Pythium insidiosum* by means of microscopic morphology and immunological methods. To confirm the identity of the microorganism by sequence analysis, infected tissue samples were taken from 20 bovines and total genomic DNA was isolated. The sequence corresponding to rDNA 18S was amplified by PCR using previously reported primers (NS1 and NS8). The amplified segment (1.8 kbp) was cloned in the plasmid pCR®2.1-TOPO® and expanded in transformed E. coli cells. The recovered recombinant DNA was sequenced and compared with reported sequences for *P. insidiosum* and other species of the genus *Pythium*: *P. myriotylum*, *P. monospermum*, *P. Ro21* and *P. spinosum*. Multiple alignment analyses revealed a total identity of the amplified segment with the reference sequence of *P. insidiosum*, as well as significant differences with the other sequences included. These results, together with the previous evidence, demonstrate that the etiologic agent of EBG in the infected animals studied is indeed *Pythium insidiosum*. This finding has important implications because the disease causes high economic loses and the causative agent can also infect humans (causing human Phytiosis). Therefore, it is necessary to characterize the strains of *P. insidiosum* found in the country and begging projects of an immunotherapeutic vaccine production and development of specific treatments.

Key words: *Pythium insidiosum*, bovine enzootic granulomatosis, PCR, sequencing

INTRODUCCIÓN

En la ganadería bovina de los llanos venezolanos, particularmente en los rebaños criados bajo sistema de explotación extensiva, vienen apareciendo una serie de enfermedades denominadas exóticas, debido a falta de información sobre su etiología. Estas enfermedades constituyen una seria amenaza por su difusión en diferentes rebaños del país, limitando la productividad y crecimiento de la población bovina. Entre estas enfermedades, destaca una nueva patología, descrita al principio de la década de los 90 (1), que afecta especialmente a bovinos jóvenes, con una evolución de brotes de carácter enzoótico y cuyo comportamiento es variable de un animal a otro. Las características epidemiológicas y las lesiones observadas en los bovinos han determinado la denominación Granulomatosis Enzoótica Bovina (GEB).

Los casos de GEB se han observado principalmente en el estado Apure, en ecosistemas de sabana inundable. Las lesiones se presentan en la parte inferior de los miembros anteriores o posteriores. Inicialmente se observa un proceso inflamatorio local con posterior alopecia, evolucionando hacia un aumento del volumen de la región afectada, pérdida de la piel y exposición de los tejidos. La lesión avanza hacia mayor severidad con necrosis tisular, osteolisis, y fractura del miembro afectado. Clínicamente los bovinos enfermos muestran hipertermia, dolor, claudicación, retraso en el desarrollo (por disminución de la búsqueda de alimento), aunado a esto la enfermedad es de tendencia crónica (1).

En un trabajo previo, usando técnicas histopatológicas, inmunofluorescencia, y distintas pruebas inmunológicas se señaló a *Pythium insidiosum* como agente etiológico de la GEB (2). *P. insidiosum* es un organismo clasificado en el Reino

Straminipila, Phylum *Oomycota*, Clase *Oomycetes*, Orden *Pythiales* y Familia *Pythiaceae* (3). Las especies de género *Pythium* habitan en suelos altamente húmedos, por lo que se les consideran entre los fitopatógenos más destructivos ya que ocasionan grandes pérdidas económicas en una variedad de cultivos. Adicionalmente, la especie *P. insidiosum* se ha encontrado como agente etiológico de enfermedades en mamíferos, las cuáles son identificadas como Pythiosis (4,5).

El estudio inicial descriptivo de la GEB permitió sugerir una probable etiología micótica de esta patología o *P. insidiosum* como agente causal, sin embargo, no se logró identificar al microorganismo que ocasiona la enfermedad (1). No obstante, investigaciones realizadas en otros países indican claramente a *P. insidiosum* como agente etiológico de lesiones inflamatorias o ulceradas con formación de granulomas en la piel y/o huesos ubicadas en la parte inferior de los miembros anteriores o posteriores de bovinos (6,7) y equinos (8-10), lesiones granulomatosas nasales y retrobulbares en gatos (11), gastrointestinales en perros (12-15) y mulas (16), entre otros mamíferos.

P. insidiosum es también agente etiológico de patologías en humanos (17). Estas se caracterizan por lesiones oculares (18-22) e invasión de vasos sanguíneos (con consecuencias graves), especialmente en pacientes con hemoglobinopatías (23,24), así como lesiones inflamatorias dérmicas de tipo granulomatoso (25). Es por lo tanto importante determinar en forma concluyente la presencia de *P. insidiosum* en nuestro país. No solamente por el daño económico en la cría de ganado vacuno sino también porque representa un riesgo para la salud de los trabajadores involucrados en la cría. La identificación por morfología microscópica y técnicas inmunológicas (2) tiene siempre como limitante la posibilidad de que la presencia de un organismo relacionado de lugar a falsos positivos. Por esta razón, en este estudio se identificó el agente etiológico en casos de GEB mediante técnicas moleculares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población y muestra. La población estuvo constituida por bovinos de raza Brahma (42.071 animales), censados por el Servicio Autónomo de Sanidad Agropecuaria de la Parroquia Mantecal (SASA-Mantecal) y ubicados en seis hatos del Municipio Muñoz del Estado Apure. La muestra estuvo conformada por 20 bovinos que presentaron lesiones compatibles con Granulomatosis Enzootica Bovina (1). Se solicitó el consentimiento informado de los dueños de los animales, para lo cual se describió como se presentaba la enfermedad en estudio, el propósito de la investigación y el procedimiento a seguir para la toma de muestras de tejido.

Muestra biológica. Se tomaron muestras de tejido granulomatoso y necrótico observado en los bovinos enfermos, a través de biopsias. Las extracciones de tejido se realizaron asépticamente con bisturí estéril, previo lavado de las lesiones con agua destilada estéril, colocando parte de la biopsia en un frasco con formol al 10% para el análisis molecular, el resto del tejido se introdujo en una cápsula de petri estéril, para realizar el estudio micológico, como fue reportado previamente (2).

Estudio Micológico por examen directo. Siguiendo el procedimiento previamente descrito (7,26), los tejidos fueron cortados en segmentos de aproximadamente 10 a 20 mm de diámetro y depositados en tubos de 12 x 100 y se realizaron tres lavados con 5 mL de agua destilada estéril agitando vigorosamente los tubos entre cada

lavado. Seguidamente, el tejido se colocó durante 30 minutos en tubos de 12 x 100 mm con 5 mL de solución de antibióticos (250 mg/L de Penicilina G y 500 mg/l de Sulfato de Streptomicina; Sigma Chemical CO.). Posteriormente, se lavaron con agua destilada estéril (5 mL) en la forma antes descrita y finalmente, se colocaron en tubos de 12 x 100 mm contentivos de 5 mL de agua destilada estéril manteniéndose éstos a una temperatura que osciló entre 35 a 38 ºC, hasta su traslado al laboratorio (aproximadamente 72 horas). Una vez en el laboratorio, se realizó, a cada muestra, un nuevo lavado con 5 mL de solución de antibióticos y un segundo lavado con 5 mL de agua destilada estéril en la forma descrita. En algunos tubos donde se transportó el tejido fue observado un crecimiento algodonoso. A esta masa algodonosa se le realizaron tres lavados en 5 mL de la solución de antibióticos ya mencionada y posteriormente se depositó en un tubo de 12 x 100 mm con 5 ml de la solución de antibióticos y se incubó en una estufa a 37°C durante 6 horas, al cabo de las cuales se cultivó en placas con medio Sabouraud Dextrosa Agar en las condiciones antes citadas. A la masa algodonosa previo y posterior al cultivo, se le realizó un examen directo en fresco, sin reactivos para visualizar la morfología del organismo en crecimiento.

Extracción de Acidos Nucleicos. Las muestras de tejido posiblemente infectado (~300 mg) con *P. insidiosum* fueron congeladas en nitrógeno líquido y pulverizadas en un mortero antes de mezclar con 600 ml de buffer de ruptura (Tris-HCl 20 mmol/L pH 8.0, EDTA 5 mmol/L, NaCl 150 mmol/L, SDS 1%) y la disrupción completada pasando por una aguja 20 G 1½. Después de centrifugar a 15.000xg por 30 segundos, se tomaron alícuotas del sobrenadante (200 µL) y se efectuó una digestión con proteinasa K (200 µg/mL) por 1 hora a 55°C. Después de extraer con Fenol:Cloroformo:Alcohol isoamílico (25:24:1), se precipitaron los ácidos nucleicos con etanol (2 volúmenes, 12-24 h a -20°C). Los ácidos nucleicos recuperados por centrifugación se resuspendieron en 150 µL de agua estéril y se incubaron con 5 unidades de ribonucleasa (Promega; Madison, WI) en las condiciones indicadas por el fabricante por dos horas a 37°C. Terminada la incubación se realizó de nuevo una extracción con Fenol: Cloroformo: Alcohol isoamílico y precipitación con etanol. El ADN recuperado fue disuelto en 150 µL de agua estéril, analizado por electroforesis en gel de agarosa (0,7% en amortiguador TAE) y almacenado a -20°C hasta su uso (27).

Amplificación de secuencias de ADNr 18S. Las amplificaciones se realizaron usando cebadores para amplificar un fragmento de 1,8-1,9 Kb del ADNr correspondiente al ARNr 18S *Pythium insidiosum*: el cebador directo NS1 (5´-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3´) y el reverso NS8 (5´-TCCGCAGGTTCACC(TA)ACGGA-3´) como se ha descrito previamente (10,15). Las reacciones de amplificación se hicieron en un volumen de 25 µL conteniendo: 2,5 µL de buffer concentrado (GeneAmp® 10X PCR buffer II, Perkin Elmer, Foster City, CA), 1,5 µl de MgCl2 25 mM, 2,0 µl de mezcla de dNTPs 10 mmol/L, 2 nanomoles de los cebadores directo (NS1) y reverso (NS8), 0,25 µl de ADN polimerasa (AmpliTaqGold™, PerkinElmer), 5,0 µl de ADN y agua desionizada estéril hasta completar 25 µL. El protocolo de amplificación comprendió un paso de desnaturalización de 10 minutos a 95°C, seguido por 40 ciclos de 1 minuto a 94ºC, 2 minutos a 63ºC, y 3 minutos a 72ºC, seguidos por 1 ciclo final de 1 minuto a 94ºC, 2 minutos a 63ºC, y 10 minutos a 72ºC. Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1%.

Clonamiento del gen ADNr 18S de *P. insidiosum*. Los fragmentos de ADN amplificado fueron clonados usando el sistema "TOPO TA cloning® kit" (Invitrogen; Carlsbad, CA) conteniendo el vector pCR®2.1-TOPO®. Se realizaron reacciones de ligación de 5 µl conteniendo 1-3 µl de ADN amplificado y 1 µL del vector de clonamiento de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Después de incubar 5 min a temperatura ambiente se detuvo la reacción con 1.0 µL de "6X TOPO® Cloning Stop Solution" y se usaron 2 µL de la mezcla para transformar alícuotas de células competentes (TOP10 One Shot® chemically competent cells). A continuación, se reactivaron las células a 42°C por 30 segundos después de haber sido incubadas a 0°C por 30 minutos. Seguidamente, se agregaron 250 µL de medio SOC (Invitrogen) y se incubaron a 37°C por 1 hora. Alícuotas de las células recuperadas fueron sembradas en placas LB agar conteniendo X-gal (Promega; Madison, WI) y 50 µg/mL de kanamicina.

Análisis de los clones positivos. Para determinar la presencia de clones positivos se aisló ADN plasmídico directamente de las colonias obtenidas en las placas de agar de la siguiente manera: con un mondadientes estéril se retiró una porción de colonia y se sumergió en 50 µL de EDTA 10 mM, pH 8,0. Seguidamente, se agregó 50 µL de solución de ruptura (NaOH 0,2N, SDS 0,5% y sacarosa 20%), se agitó por vortex por 30 segundos y se incubó por 5 minutos a 70°C. Después de dejar enfriar a temperatura ambiente se agregó 1,5 µL de KCl 4 mol/L y 0,5 µl de azul de bromofenol al 0,4%. Muestras de 50 µl tomadas después de centrifugar a 12.000xg por 3 minutos fueron analizadas en un gel de agarosa al 0,7% corrido en el sistema buffer TAE conteniendo bromuro de etidio (0,5 mg/ml). Los clones conteniendo plásmido con inserto fueron preservados en glicerol al 15% a -80°C.

Purificación y secuenciación de ADN plasmídico. El ADN de plásmido fue purificado a partir de cultivos de 3 ml en medio LBK (medio LB con kanamicina 50 µg/ml) usando el sistema S.N.A.P para minipreparación de plásmido (Invitrogen; Carlsbad, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN obtenido fue secuenciado usando el sistema "ABI Prism™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit" con AmpliTaq® ADN Polimerasa (Perkin Elmer Applied Biosystems; Foster City, CA) y un "ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer" (Perkin Elmer). Como iniciadores de la secuenciación se usaron los cebadores de la reacción en cadena de la polimerasa antes descrita y el cebador universal M13–21 (directo). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias reportadas en el Banco de Genes para distintas especies de *Pythium*: *P. insidiosum* (AY486144) como referencia, *P. myriotylum* (E17133), *P. monospermum* (AJ238653), *P. Ro21* (forma no cultivada, AY129550) y *P. spinosum* (E17134). Para ello se realizaron análisis de alineamiento múltiple con el programa Gene Runner (Versión 3.00, 1994, Hastings Software Inc.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una muestra de las lesiones típicas encontradas en los bovinos con GEB se puede observar en la Figura 1 A.

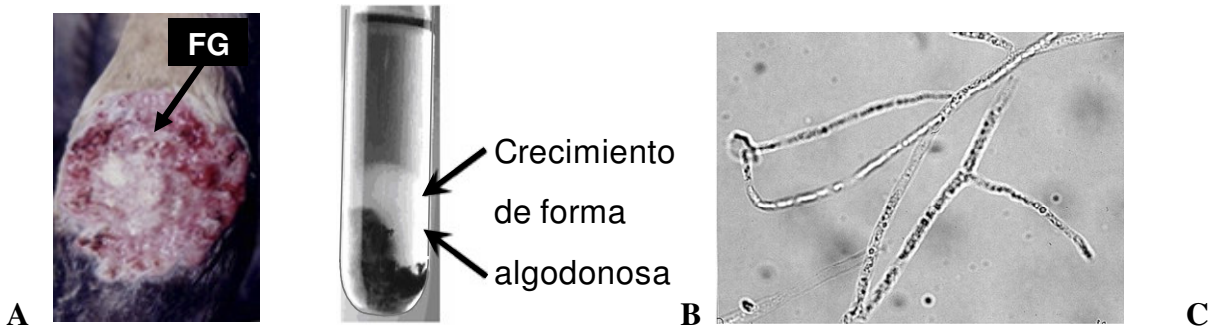


Figura 1. (A) Lesión ulcerada con fondo granulomatoso (FG), localizada en miembro anterior del bovino. **(B)** Crecimiento algodonoso (indicado por las flechas) en una biopsia de tejido ulcerado obtenida de un bovino con GEB. **(C)** Examen microscópico (400X) directo en fresco del crecimiento algodonoso mostrado en B. Se evidencian hifas ramificadas sin septos formando ángulo de 90°.

Se trata de una lesión ulcerada con fondo granulomatoso (FG) que aparece en estadío avanzado de la infección. De este tipo de lesiones se tomaron las biopsias para el estudio. En la mayoría de las muestras colectadas por biopsia de dichas lesiones se evidenció, después del transporte al laboratorio, un crecimiento de aspecto algodonoso (Figura 1B). Este crecimiento algodonoso fue examinado microscópicamente mediante examen directo en fresco, observándose la presencia de hifas alargadas, ramificadas, cenocíticas y sin órganos de reproducción. También se observó la presencia de ramificaciones que formaban un ángulo de 90° (Figura 1C). Este hallazgo es morfológicamente compatible con las hifas de *Pythium insidiosum* ya que este tipo de ramificaciones son observadas cuando el citado hongo crece en medios de cultivo tales como Sabouraud Dextrosa Agar y Sabouraud líquido (2).

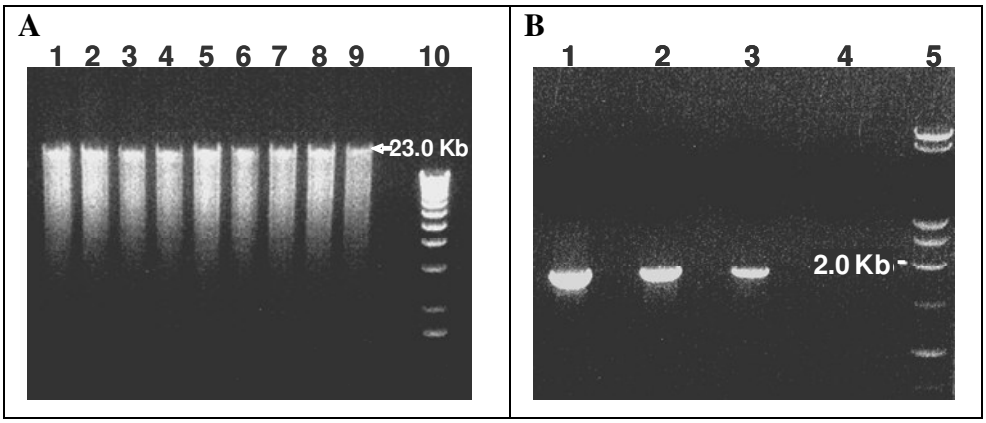
Para confirmar la presencia de *P. insidiosum* se procedió a examinar los tejidos de los bovinos con GEB a través de técnicas moleculares. Para ello, se extrajo el ADN de los tejidos en referencia y la calidad del mismo se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,7%.

En la Figura 2A se presenta la electroforesis del ADN extraído en 9 muestras, donde se evidencia un patrón de degradación moderada y uniforme que se conservó en todas las muestras analizadas. Esta degradación parcial se debe al tratamiento de la muestra durante la extracción y a la fijación previa con formol para su transporte al laboratorio. Sin embargo, el tamaño promedio de los fragmentos de ADN recuperados (la mayor proporción corresponde a más de 20 Kb, ver Figura 2A) supera ampliamente la longitud de la sección de ADN a estudiar (1,8 kpb). Por lo tanto, no era de esperar interferencia con la aplicación de las técnicas de amplificación mediante PCR.

Una sección del ADNr, correspondiente al ARNr 18S de la subunidad ribosomal 40S, fue amplificada a partir del ADN extraído de los tejidos de los 20 bovinos enfermos. Para ello se usaron los cebadores universales NS1 y NS8, que han demostrado alta eficiencia en los protocolos de amplificación de ADN aislado de tejido de mamíferos

infectados (10,15). Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se observó en cada caso un producto amplificado de aproximadamente 1800 pares de bases, que corresponde a la amplificación esperada del ADNr 18S. En la Figura 2B se pueden observar los productos de amplificación de tres muestras de ADN extraído de los bovinos estudiados.

Para determinar la secuencia de nucleótidos de los productos amplificados es necesario obtener una mayor cantidad de ADN, que además debe ser de alta calidad. Para ello, se insertó el ADN amplificado de cada muestra en un vector de clonamiento apropiado y los plásmidos recombinantes obtenidos fueron usados para transformar células competentes de *E. coli*. De esta manera, el ADN plasmídico puede ser amplificado en las células bacterianas y luego purificado para la secuenciación. En la Figura 2C, se muestra el análisis electroforético, en gel de agarosa al 0,7%, del ADN plasmídico aislado de los clones positivos de *E. coli*. En el análisis electroforético se incluyó como control negativo, un plásmido sin el inserto de ADN amplificado (Figura 2C, canal 9) y como control positivo un plásmido recombinante con un inserto de ADN amplificado del ADNr 18S, derivado del material genómico de un aislado de *P. insidiosum* previamente caracterizado (Figura 2C, canal 20). Se observó baja recuperación de plásmido recombinante en solo uno de los clones analizados (Figura 2C, canal 12).



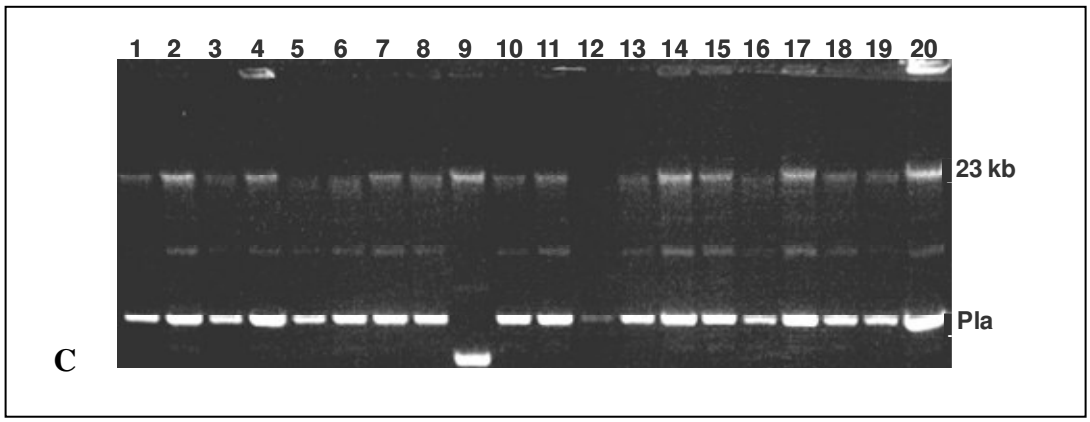


Figura 2. (A) Electroforesis en gel de agarosa al 0.7% del ADN extraído de 9 muestras de tejido ulcerado de bovino con Granulomatosis Enzoótica Bovina (canales 1 a 9); el canal 10 corresponde a los marcadores de peso molecular (1 Kb Ladder de Promega). **(B)** Análisis electroforético de los productos de amplificación del ADNr 18S de muestras de ADN aislado del tejido citado (canales 1-3), comparando con un control negativo (canal 4) y patrones de peso molecular (1 Kb, canal 5). Se indica la posición del marcador de 2 Kb. **(C)** Análisis del ADN plasmídico de los clones positivos obtenidos después de transformar células de *E. coli* con plásmidos recombinantes conteniendo insertos correspondientes a los productos de amplificación del ADNr 18S (ver B) (canales 1-8, 10-11-19); el canal 9 corresponde a un control negativo; el canal 20 corresponde a un plásmido control positivo (Pla); el material correspondiente a ADN genómico de *E. coli* contaminante está marcado como 23.0 Kb.

Finalmente, el ADN plasmídico procedente de clones positivos fue purificado y secuenciado como se indica en la sección de Materiales y Métodos. Las secuencias obtenidas fueron comparadas, mediante alineamiento múltiple, con la reportada para *P. insidiosum* (AY486144) y de otras especies de *Pythium*: *P. myriotylum* (E17133), *P. monospermum* (AJ238653), *P. Ro21* (forma no cultivada, AY129550) y *P. spinosum* (E17134). La Tabla 1 muestra los resultados del análisis de alineamiento para los primeros 284 nucleótidos de la secuencia clonada de los aislados obtenidos. Se puede observar una identidad total con la secuencia reportada para *P. insidiosum*, y esta identidad se conserva a lo largo de toda la secuencia amplificada (resultados no mostrados). No se encontró lo mismo con las secuencias de las otras especies del género *Pythium* incluidas en el análisis. Como se puede observar en la Tabla 1 (ver al final del texto), hay en cada caso diferencias de secuencia, inserciones y supresiones.

Los resultados obtenidos, junto a las evidencias microscópicas e inmunológicas previamente reportadas (2), demuestran que el agente etiológico de la GEB en los bovinos estudiados es *Pythium insidiosum*. Este hallazgo tiene implicaciones económicas importantes pues la enfermedad es causal de grandes pérdidas en nuestra ganadería. Además, el hecho de que el agente causal también puede infectar a humanos, pone en la palestra un potencial problema de salud pública, pues los trabajadores de la ganadería están expuestos al agente infeccioso. En primer lugar, se debe investigar la dimensión del problema usando los métodos de diagnóstico disponibles para humanos y animales (2,28,29). En segundo lugar, es pertinente la inversión en adquisición y estudio de los tratamientos inmunológicos

que existen para animales (30,31) y humanos (24). Por otra parte, es también necesario ampliar el estudio del agente causal en nuestros rebaños, comenzando, por ejemplo, con su aislamiento y caracterización antigénica. Esto podría conducir a mediano plazo a la producción de vacunas inmunoterapeúticas y tratamientos específicos para las cepas de *P. insidiosum* que se encuentran en nuestro medio.

AGRADECIMIENTOS. *Los autores desean agradecer la colaboración del Servicio Autónomo de Sanidad Agropecuaria (SASA) de la Parroquia Mantecal, Municipio Muñoz, estado Apure; en particular a los Médicos Veterinarios Nancy Vieira y Frank Oliveros por su valiosa ayuda en la organización, recolección de las muestras y supervisión de las normas bioéticas aplicadas en esta investigación. También a la Asociación de Ganaderos respectiva por la colaboración prestada. Este trabajo fue financiado parcialmente por el Programa de Tecnología Médica de la Universidad de Michigan (Medical Technology Program, Michigan State University, USA)*

BIBLIOGRAFIA

1. Marin C, Lopez N, Perez C, Mirabal G, Rolo M, Urdaneta J. Primer reporte de la Granulomatosis Enzootica Bovina en Venezuela. Fonaiap Divulga 1991; 37: 15–16.
2. Pérez RC, Luis-León JJ, Vivas JL, Mendoza L. Epizootic cutaneous pythiosis in beef calves. Vet. Microbiol. 2005; 109: 121-128.
3. Krajaejun T, Sathapatayavongs B, Chaiprasert A, Srimuang S. Do You Know Human Pythiosis? J Infect Dis Antimicrob Agents. 2008; 25(1): 45-51.
4. De Cock A, Mendoza L, Padhye, A; Ajello L, Kaufman L. *Pythium insidiosum* sp. nov., the Etiologic Agent of Pythiosis. J Clin Microbiol. 1987; 25(2): 344-349.
5. Mendoza, L. 1998. *Pythium insidiosum*, In L. Collier, A. Balows, M Sussman (ed.), Topley & Wilson's microbiology and microbial infections, 9th ed. Arnold, London, England. 1998; pp 617–630.
6. Miller RI, Olcott BM, Archer M. Cutaneous pythiosis in beef calves. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1985; 186: 984–986.
7. Santurio JM, Monteiro AB, Leal AT, Kommers GD, de Sousa RS, Catto JB. Cutaneous pythiosis in calves from the Pantanal region of Brazil. Mycopathologia. 1998; 141: 123–125.
8. Alfaro AA, Mendoza L. Four cases of equine bone lesions caused by *Pythium insidosum*. Equine Vet. J. 1990; 22: 295–297.
9. Mendoza L, Nicholson V, Precott JF. Immonoblot analysis of the humoral immune response to *Pythium insidiosum* in horses with pythiosis. J. Clin. Microbiol. 1992; 30: 2980–2983.
10. Reis JL, Quiroz de Carvalho EC, Nogueira RHG, Lemos LS, Mendoza L. Disseminated pythiosis in three horses. Vet. Microbiol. 2003; 96: 289–295.
11. Bissonnette KW, Sharp NJ, Dykstra MH, Robertson IR, Davis B, Padhye AA, Kaufman L. Nasal and retrobulbar mass in a cat caused by Pythium insidiosum. J Med Vet Mycol. 1991; 29(1): 39-44.
12. Bentinck-Smith J, Padhye AA, Maslin WR, Hamilton C, McDonald RK, Woody BJ. Canine pythiosis--isolation and identification of *Pythium insidiosum*. J Vet Diagn Invest. 1989; 1(4): 295-298.
13. Graham JP, Newell SM, Roberts GD, Lester NV. Ultrasonographic features of canine gastrointestinal pythiosis. Vet Radiol Ultrasound. 2000; 41(3): 273-277.
14. Liljebjelke KA, Abramson C, Brockus C, Greene CE. Duodenal obstruction caused by infection with Pythium insidiosum in a 12-week-old puppy. J Am Vet Med Assoc, 2002; 220(8): 1188-1191, 1162.
15. Mendoza L, Arias M, Colmenarez V, Perazzo Y. Intestinal canine pythiosis in Venezuela confirmed by serological and sequencing analysis. Mycopathologia. 2005; 159: 219-222.
16. Purcel KL, Johnson PJ, Kreeger JM, Wilson DA. Jejunal obstruction caused by a Pythium insidiosum granuloma in a mare. J Am Vet Med Assoc. 1994; 205: 337–339.

17. Vanittanakom N, Supabandhu J, Khamwan C, Praparattanapan J, Thirach S, Prasertwitayakij N, Louthrenoo W, Chiewchanvit S, Tananuvat N. Identification of Emerging Human-Pathogenic Pythium insidiosum by Serological and Molecular Assay-Based Methods, J Clin Microbiol 2004; 42(9): 3970-3974.
18. Virgile R, Perry HD, Pardanani B, Szabo K, Rahn EK, Stone J, Salkin I, Dixon DM. Human infectious corneal ulcer caused by *Pythium insidiosum*. Cornea. 1993; 12(1): 81-83.
19. Imwidthaya P. Human pythiosis in Thailand. Postgrad Med J. 1994; 70(826): 558-560.
20. Murdoch D, Parr D. *Pythium insidiosum* keratitis. Aust N Z J Ophthalmol. 1997; 25(2): 177-179.
21. Krajaejun T, Pracharktam R, Wongwaisayawan S, Rochanawutinon M, Kunakorn M, Kunavisarut S. Ocular pythiosis: is it under-diagnosed? Am J Ophthalmol. 2004; 137(2): 370-372.
22. Bosco Sde M, Reis GM, Theodoro RC, Macoris SA, Marques SA, Macoris Dda G, Bagagli E. Morphological and molecular characterization of an equine isolate of *Pythium insidiosum* and comparison with the first human isolate from the same geographic region.Med Mycol. 2008; 46(6): 557-565.
23. Krajaejun T, Sathapatayavongs B, Pracharktam R, Nitiyanant P, Leelachaikul P, Wanachiwanawin W, et al. Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. Clin Infect Dis. 2006; 43(5): 569-576.
24. Wanachiwanawin W, Mendoza L, Visuthisakchai S, Mutsikapan P, Sathapatayavongs B, Chaiprasert A, et al. Efficacy of immunotherapy using antigens of *Pythium insidiosum* in the treatment of vascular pythiosis in humans. Vaccine. 2004; 22(27-28): 3613-3621.
25. Prasertwitayakij N, Louthrenoo W, Kasitanon N, Thamprasert K, Vanittanakom N. Human pythiosis, a rare cause of arteritis: case report and literature review. Semin Arthritis Rheum. 2003; 33(3): 204-214.
26. Mendoza L. Alfaro AA. Equine pythiosis in Costa Rica: report of 39 cases. Mycopathologia, 1986; 94: 123-129.
27. Sambrook J, Russell D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001; Chapter 6.
28. Jindayok T, Piromsontikorn S, Srimuang S, Khupulsup K, Krajaejun T. Hemagglutination test for rapid serodiagnosis of human pythiosis. Clin Vaccine Immunol. 2009; 16(7): 1047-1051.
29. Krajaejun T, Imkhieo S, Intaramat A, Ratanabanangkoon K. Development of an immunochromatographic test for rapid serodiagnosis of human pythiosis. Clin Vaccine Immunol. 2009; 16(4): 506-509.
30. Hensel P, Greene CE, Medleau L, Latimer KS, Mendoza L. Immunotherapy for treatment of multicentric cutaneous pythiosis in a dog. J Am Vet Med Assoc. 2003; 223:215-218.
31. Mendoza L, Mandy W, Glass R. An improved *Pythium insidiosum*-vaccine formulation with enhanced immunotherapeutic properties in horses and dogs with pythiosis. Vaccine. 2003; 21:2797-2804.

Tabla 1. Alineamiento múltiple de las secuencias del ADNr 18S (primeros 280-300 pb) correspondientes a *P. insidiosum* (AY486144), *P. myriotylum* (E17133), *P. monospermum* (AJ238653), *P. Ro21* (forma no cultivada, AY129550), y *P. spinosum* (E17134), con la secuencia correspondiente al ADN aislado de tejido de bovino con GBE (Aisl. bovino).

Organismo	Numeración	Secuencia
Aisl. bovino	1-75	GTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAG TATAAACAACTTTGTACTGTGAAACTGCGAA
P. insidiosum	1-75	GTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAG TATAAACAACTTTGTACTGTGAAACTGCGAA
P. myriotylum	18-92	GTAGTCATACGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAG TATAAACAACTTTGTNCTGTGANACTGCGNN
P. monospermum	1-71	TCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAG TATAAACAATTTTGTACTGTGAAACTGCGAA
P. Ro21	1-71	GCGTCTCGGGACCTAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGCTATAAACAATTTTGTACTGTGAAACTGCGAA
P. spinosum	16-90	GTAGTCATACGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAG TATAAACAATTTTGTACTGTGAAACTGCGAA
Aisl. bovino	76-151	TGGCTCATTATATCAGTTATAGTCTACTCGATAGTACCTTACTACTTGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATA
P. insidiosum	76-151	TGGCTCATTATATCAGTTATAGTCTACTCGATAGTACCTTACTACTTGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATA
P. myriotylum	93-168	TGGCTCATTATATCAGTTATAGTCTACTCGATAGTACCTTACTACTTGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATA
P. monospermum	72-147	TGGCTCATTATATCAGTTATAGTCTACTCGATAGTACCTTACTACTTGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGTTAATA
P. Ro21	72-147	TGGCTCATTATATCAGTTATAGTCTACTCGATAGTACCTTACTACTTGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATA
P. spinosum	91-166	TGGCTCATTATATCAGNTATAGTCTACTCGATAGTACCTTACTACTTGGATAACCGTAGTAATTCTAGAGCTAATA
Aisl. bovino	152-227	CATGCATCAATACCCAACTGCTTGTCGGACGGGTAGCATTTATTAGATTGAAACCAATGCAGTCTTCGGGCTGGTA
P. insidiosum	152-227	CATGCATCAATACCCAACTGCTTGTCGGACGGGTAGCATTTATTAGATTGAAACCAATGCAGTCTTCGGGCTGGTA
P. myriotylum	169-244	CATGCATCAATACCCAACTGCTTGTCGGACGGGTAGCATTTATTAGATTGAAACCAATGCAGTCTTCGGGCTGGTA
P. monospermum	148-223	CATGCATAAATACCCAACTGCTTGTCGGGCGGGTAGCATTTATTAGATTGAAACCAATGCAGTCTTCGGGCTGGTA
P. Ro21	148-223	CATGCATGAATACCCAACTGCTTGTCGGGCGGGTAGCATTTATTAGATTGAAACCAATGCAGTCTTCGGGCTGGTA
P. spinosum	167-242	CATGCATANATACCCAACTGCTTGTCGGGCGGGTAGCATTTATTAGATTGAAACCANTGCAGTCTTCGGGCTGGTA
Aisl. bovino	228-284	TTGTGTTGAGTCATAATAACTGTGCGGACCGCACTTTTGTGCGGTAAATCGATTGAG
P. insidiosum	228-284	TTGTGTTGAGTCATAATAACTGTGCGGACCGCACTTTTGTGCGGTAAATCGATTGAG
P. myriotylum	245-301	TTGTGTTGAGTCATAATAACTGTGCGGACCGCACTTTTGTGCGGTAAATCGATTGAG
P. monospermum	224-280	TTGTGTTGAGTCATAATAACTGTGCGGATCGCACTTT-GTGCGATAAATCGATTGAGT
P. Ro21	224-280	TTGTGTTGAGTCATAATAACTGTGCGGATCGCACTTT-GTGCGATAAATCGATTGAGT
P. spinosum	243-299	TTGTGTTGAGTCATAATAACTGTGCGGATCGCACTTT-GTGCGATAAATCGATTGAGT

Se indican las:
diferencias ▮
inserciones □
supresiones -