

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

**“Detección de Anticuerpos Anti *Lagenidium spp* en Suero Equino, Mediante el Método
ELISA en el Municipio de Bonaó, República Dominicana.”**



Trabajo de Grado sustentado por:

María del Carmen Vásquez Pérez

Gianna Isabella Pinna Polanco

Para la obtención del título de Doctor en Medicina Veterinaria

Asesoras

Dra. Silvana González

Dra. Paloma Ortiz

Santo Domingo, D.N., República Dominicana

Agosto, 2022

Agradecimientos

Agradezco a Dios por darme entendimiento y fuerza durante toda mi vida y sobre todo en mi formación profesional.

Agradezco a mis padres: Matty y Fidel, por guiarme, acompañarme y apoyarme siempre, por no dejarme nunca bajar los brazos y por creer en mí. Sin ustedes este logro no hubiese sido posible.

A mi familia: hermano, abuelos, tíos, primos por el apoyo que siempre me han brindado.

A mis hermanas de la vida: Janelle y Bianca, por estar y apoyarme siempre en todo.

A tantos amigos que me regaló esta carrera hermosa que amamos y disfrutamos juntos: Valeria, Jesús, Karla, Roger, Helen, Josue, Ilse, Joel, Michelle y muchos más que no son menos importantes por no estar aquí mencionados. En especial, les agradezco a todos los que de una manera u otra formaron parte de este trabajo de investigación.

Agradezco infinitamente a nuestras asesoras: Dra. Silvana González y Dra. Paloma Ortiz. Gracias por su dedicación, su tiempo e interés, por acompañarnos durante todo este largo proceso, por tenernos siempre las puertas abiertas de sus clínicas veterinarias para lo que necesitáramos y por aclararnos tantas dudas, siempre con la mejor actitud. Sin ustedes este trabajo de investigación no hubiese sido posible.

Gracias al Pan American Veterinary Lab (PAVLAB) en Texas, por confiar en nosotras para realizar este trabajo de investigación. Gracias por su auspicio y su tiempo para contestar todas nuestras dudas y procesar las muestras enviadas. Gracias por el aporte que realizan a la comunidad veterinaria de todo el mundo con estas investigaciones.

De igual manera, agradecer al Laboratorio Veterinario Central (LAVECEN) de nuestro país, especialmente a la Dra. Julia Vargas, por ayudarnos con todo el proceso de embalaje y remisión de las muestras hasta el laboratorio de destino para su procesamiento.

Agradezco a los doctores: Uziel Durán, Carlos José Lizardo, Facundo Ottenwalder, Tamayo Acosta, Bianka Socías, Junior Morel, Alfredo Columna y Lissette Gómez por aportar con sus conocimientos y experiencias a este trabajo.

Gracias a los señores Sandy, Alejandro y a todos los propietarios de equinos del municipio de Bonaó que nos permitieron utilizar a sus ejemplares para el muestreo de esta investigación.

Agradezco a nuestros profesores por guiarnos y brindarnos sus conocimientos durante toda nuestra formación profesional y a nuestra Universidad Nacional Pedro Henríquez Ureña (UNPHU) por todos los recursos que ponen a nuestra disposición para nuestra formación.

Por último, quiero agradecer a mi amiga y compañera en la elaboración de este trabajo: Isabella Pinna. Gracias por todo el esfuerzo que pusiste para que las cosas salieran de la mejor manera, gracias por ser mi mano derecha, por aguantarme aun cuando yo misma no lo hacía y, sobre todo, gracias por hacer que todo este proceso sea más llevadero y entretenido. Me quedo con todos estos recuerdos por siempre.

María del Carmen Vásquez

A mis tíos, Paul y Martha Bidó, por recibirnos en Bonaó y ayudarnos a contactar a los principales propietarios de equinos de la región

A nuestra asesora, Dra. Paloma Ortiz Rivas, por servirnos de guía tanto teórica como práctica para llevar a cabo este trabajo de grado, por ofrecernos las instalaciones de su Clínica Veterinaria Elemental para el procesamiento de las muestras, además de ser el puente entre el Pan American Veterinary Laboratories y nosotras.

A nuestra asesora, Dra. Silvana González, quien nos instruyó en cuanto a la correcta redacción y estilo de este trabajo de grado, además de brindarnos sus conocimientos en cuanto a equinos.

Al Dr. Robert Glass y al Pan American Veterinary Laboratories, el cual junto a su equipo fue el responsable de amablemente recibir y procesar las muestras de este estudio de manera totalmente gratuita.

A los señores Sandy Núñez y Alejandro Romero, caballistas y propietarios de equinos del municipio de Bonaó, por ayudarnos con la información de una parte de los equinos muestreados para este estudio y permitirnos muestrear a los ejemplares que están bajo sus cuidados, además de proporcionarnos los datos para poder crear un censo para este estudio.

Al Sr. Ramón Soto por poner a disposición Rancho Don Soto y sus ejemplares para el muestreo de estos. De igual manera al Sr. Manuel Matos, por permitirnos muestrear a sus ejemplares del Rancho Bachué.

Al Dr. Junior Morel, Dra. Valeria Franco y Dr. Alfredo Columna por brindarnos apoyo tanto al momento de la toma y procesamiento de las muestras

A nuestros profesores de la Universidad Nacional Pedro Henríquez Ureña por significar una guía en esta carrera profesional.

Gianna Isabella Pinna

Dedicatorias

Este trabajo se le dedico a mis padres: Fidel Vásquez y Matty Pérez, por su apoyo incondicional e impulsarme siempre a lograr mis metas. En especial a mi madre, por enseñarme a amar y respetar a los animales y la naturaleza desde que tengo uso de razón y, sobre todo, por ser mi mayor fuente de inspiración y ejemplo a seguir, junto a mi querido tío Xavier Pérez, en esta hermosa profesión que compartimos y amamos.

María del Carmen Vásquez

Quiero dedicarle este trabajo primero que nada a mi madre por apoyarme de manera incondicional en todas las maneras posibles en todos los ámbitos de mi vida.

A mis maestros, el Dr. Carlos José Lizardo y a la Dra. Silvana González por ser parte fundamental de mi vida y colaborar para hacerme la profesional que soy hoy.

A mis compañeros de la Dirección General de Ganadería por su apoyo y sus preciados consejos.

Estoy agradecida con Dios por las oportunidades que me ha brindado y me siento emocionada por las nuevas experiencias que vendrán.

Gianna Isabella Pinna

Índice

PRIMERA PARTE.....	1
Capítulo I: Introducción y Objetivos.....	2
Introducción.....	2
Objetivos.....	4
SEGUNDA PARTE.....	5
Capítulo II: Antecedentes.....	6
Historia.....	6
Capítulo III: Agente Etiológico.....	8
Biología de <i>Lagenidium spp</i>	8
Epidemiología.....	9
Lagenidiosis Equina.....	9
Fisiopatología de la Lagenidiosis Equina.....	10
Método Diagnóstico.....	11
Tratamiento y Prevención de la Enfermedad.....	11
TERCERA PARTE.....	13
Capítulo IV: Materiales y Métodos.....	14
Localización Geográfica de la Toma de Muestra.....	14
Tamaño de la Toma de Muestra.....	14
Selección de la Muestra.....	15
Recolección de Datos.....	16
Equipos y Materiales.....	16
Descripción del Método Diagnóstico Elisa utilizado en el PAVL.....	17
Interpretación de los Resultados.....	19
CUARTA PARTE.....	21
Resultados.....	22
Discusión de Resultados.....	23
Conclusión.....	25
Recomendaciones.....	26
Referencias Bibliográficas.....	27
Anexos.....	29

PRIMERA PARTE

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Capítulo I: Introducción y Objetivos

Introducción

A inicios del siglo XXI se dio a conocer por primera vez que un oomiceto denominado “*Lagenidium*” era capaz de afectar a los mamíferos, puesto que anteriormente solo se había estudiado su capacidad para causar la enfermedad llamada Lagenidiosis en organismos acuáticos. Esta patología es de suma importancia clínica debido a que tiene una mortalidad de hasta un 90% en casos avanzados (Marcella, 2011). El reto que representa dar con su diagnóstico complica aún más la resolución de la enfermedad debido a que no existe un tratamiento específico. Las terapias farmacológicas con antifúngicos habituales no dan resultados satisfactorios y su diagnóstico tardío será en la mayoría de los casos de pronóstico reservado (Brown, 2008).

A pesar de la falta de información y estudios que existen mundialmente sobre este oomiceto, en nuestro país se detectaron de manera incidental en el año 2020 anticuerpos de *Lagenidium* en la provincia de Monte Plata, República Dominicana específicamente en los municipios Bayaguana, Yamasá y Monte Plata, por parte de las Doctoras Fernández y Bayón (2020), quienes investigaban sobre otro agente etiológico similar denominado *Pythium*. En aquel entonces se informó a la comunidad veterinaria sobre su existencia en esta región, siendo este el principal motor y objetivo de investigación para este estudio; es por dicha razón que se desea continuar investigando para confirmar la presencia de anticuerpos de este microorganismo en otras áreas del país que presenten condiciones climáticas favorables para su supervivencia.

Debido a la distribución geográfica que hasta ahora se conoce sobre el *Lagenidium* y el parentesco que comparte con el *Pythium* (Grooters, 2003), es claro que este microorganismo se desarrolla efectivamente en lagos y estanques de climas tropicales y subtropicales alrededor del mundo, un hecho que asegura su supervivencia en la mayoría de las regiones de la

República Dominicana. Debido a su elevada humedad y alta pluviometría anual, hemos elegido el municipio de Bonaó, provincia Monseñor Nouel como región de nuestro estudio.

Objetivos

Objetivo General

- Detectar anticuerpos anti *Lagenidium spp* en suero equino, mediante el método ELISA en el municipio de Bonaio de la provincia de Monseñor Nouel, República Dominicana.

Objetivos Específicos

- Identificar la relación entre resultados serológicos positivos y signos clínicos de la enfermedad.
- Determinar la relación entre la Lagenidiosis y las condiciones de manejo e higiénicas del caballo.
- Establecer si existe relación entre la presencia de la enfermedad con la edad, sexo y raza del caballo.
- Determinar la relación entre los resultados serológicos positivos a Lagenidiosis y la condición de vida y actividades del caballo.

SEGUNDA PARTE
REVISIÓN LITERARIA

Capítulo II: Antecedentes

Historia

Fue en 1857 cuando por primera vez escuchamos el nombre *Lagenidium*. Este oomiceto, como se le ha clasificado, fue introducido por Schenk y se dio a conocer por parasitar a organismos acuáticos y larvas de mosquitos (Vilela R. T., 2015). Más recientemente, en el año 1999, la doctora Amy Grooters descubre que afecta seriamente a los mamíferos, gracias a una muestra de tejido perteneciente a un perro que mostraba una enfermedad subcutánea invasiva grave, el cual falleció debido a la rotura de un aneurisma. A partir de este momento, la doctora Grooters ha diagnosticado a más de cuarenta caninos afectados por este microorganismo, publicando por primera vez en el 2003 información concerniente a este hallazgo en Louisiana, Estados Unidos. Gracias a la Doctora Grooters, se confirma su existencia como un nuevo género de oomiceto patógeno para los mamíferos, el cual causa lesiones cutáneas graves muy similares a los de la Pitiosis, otro microorganismo de la familia de los oomicetos (Grooters, 2003). En el año 2012, esta afección fue reportada en Tailandia en humanos por primera vez, causando en la paciente una queratitis ocular.

Más adelante, en los años 2013 y 2014, se investigaron veintiún (21) cepas diferentes del género *Lagenidium* que afectan a los mamíferos, las cuales fueron comparadas con *L. giganteum*, género que años anteriores había sido utilizado como control biológico en larvas de mosquito bajo el nombre de "Laginex", registrado de manera comercial en el año 1995 por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (Vilela R. T., 2015).

Para el año 2020, el *Lagenidium* fue diagnosticado por primera vez en la República Dominicana, provincia Monte Plata, donde de cincuenta y seis (56) equinos muestreados por parte de las Doctoras Fernández y Bayón, nueve (9) resultaron positivos al oomiceto (Fernández & Bayón, 2020).

Se pudo presenciar de primera mano el caso de una yegua en estado de preñez que habitaba en el Criadero La Misericordia, en Monte Plata. Esta presentaba lesiones activas en miembros apendiculares e historial de cólicos recurrentes. Se inició el tratamiento de inmunoterapia durante seis semanas, la cual fue proporcionada por el Pan American Veterinary Lab, al cual inicialmente parecía responder, pero terminó falleciendo 27 días luego del parto debido a que las lesiones en la boca le dificultaron alimentarse con normalidad. Su cría nació con muy bajo peso y también falleció a los pocos días de nacido (R. González, propietario del criadero La Misericordia, comunicación personal del 2 de septiembre del 2021).

El Doctor Kenneth L. Marcella explica que a pesar de que el hallazgo de *Lagenidium* en equinos es bastante reciente, existen tres (3) casos confirmados en esta especie en Estados Unidos. Se sabe que esta es una enfermedad devastadora en las especies estudiadas, llegando a presentar una mortalidad de hasta un 90% en casos avanzados y presentándose de dos formas distintas hasta el momento conocidas. Una de ellas ha sido con un desarrollo rápido de no más de cuatro a cinco semanas y la otra de desarrollo un poco más lento, de seis meses en adelante, pero todos tuvieron en común que las lesiones fueron muy agresivas y con resultados devastadores (Marcella, 2011).

Capítulo III: Agente Etiológico

Biología de *Lagenidium spp*

El género *Lagenidium* incluye a más de cincuenta (50) especies, la mayoría de las cuales se comportan como parásitos de las algas, hongos, rotíferos, nemátodos, crustáceos, dafnias y larvas de mosquitos (Grooters, 2003). Perteneció al filo Pseudofungi, clase Oomycota, orden Lagenidiales, familia Lagenidiaceae (Ilustración 1).

Los oomicetos son microorganismos eucariotas heterótrofos morfológicamente similares a los hongos, pero filogenéticamente están relacionados con los diátomos y las algas marrones, y agrupados con estos familiares fotosintéticos dentro del superfilo Heterokonta. (Derevnina, 2016), (Kamoun, 2014) (Leoro-Garzon, Oomycete metabarcoding reveals the presence of *Lagenidium spp.* in phytotelmata., 2019)

Los oomicetos no son considerados hongos verdaderos; sino más bien miembros del reino Stramenofila. Existen múltiples razones por las que ambos reinos (Stramenofila y Fungi) son diferenciados entre sí, pero la más importante es el hecho de que los oomicetos no poseen ergosterol en su membrana citoplasmática y no poseen quitina, los cuales son componentes importantes en la pared celular de los hongos verdaderos (Brown, 2008).

La reproducción asexual en los oomicetos ocurre por el desarrollo del esporangio, que contiene numerosas zoosporas motiles, reniformes y biflageladas que se desarrollan por escisión progresiva dentro de una vesícula que se forma al final de un tubo de descarga producido por un zoosporangio. Estas zoosporas, al ser liberadas al medio acuático, localizarán las heridas del mamífero mediante quimiotaxis, enquistándose en cuanto entren en contacto con estas, provocando una fuerte reacción inflamatoria y posteriormente desarrollando la enfermedad (Mendoza, 2013).

Epidemiología

La Lagenidiosis posee características epidemiológicas y clinicopatológicas muy similares a las descritas en la Pythiosis Cutánea. Además, cuentan con la misma distribución geográfica y mecanismos de infección (Grooters, 2003).

La mayoría de los casos confirmados de Lagenidiosis en animales han sido localizados en el sureste de Estados Unidos (Texas, Tennessee, Virginia e Indiana), específicamente en mamíferos que habían estado expuestos a cuerpos de agua como lagos o estanques (Marcella, 2011).

La República Dominicana posee un ambiente idóneo para la proliferación del *Lagenidium spp* debido a su clima subtropical, oscilando en diversas regiones entre semiárido a muy húmedo, temperatura media de 25 grados Celsius, especialmente con sus épocas erráticas de lluvia (abril a junio y septiembre a noviembre normalmente) y la incidencia de tormentas tropicales entre los meses de agosto a noviembre (País, s.f).

En cuanto al ciclo biológico de la especie *Lagenidium spp* se ha sugerido que estos probablemente utilizan sustratos naturales de plantas para completar el ciclo de vida en el medio ambiente. (Mendoza, 2013)

Lagenidiosis Equina

Aunque ha resultado escasa la información acerca de la Lagenidiosis en caballos, se entiende que esta enfermedad es sumamente peligrosa y mortal de no ser tratada a tiempo; esto se pudo ver en los casos que se diagnosticaron en los caballos del criadero La Misericordia en Bayaguana y los encontrados por las doctoras Fernández y Bayón en la provincia de Monte Plata (Fernández & Bayón, 2020).

Aunque la Lagenidiosis sólo ha sido descrita en gatos, perros y humanos (Mendoza, 2013), han sido actualmente diagnosticados y reportados casos en equinos en E.E.U.U (Marcella, 2011) y en la República Dominicana (Fernández & Bayón, 2020).

“La infección por Lagenidium en la especie equina es un descubrimiento mucho más reciente con tres casos confirmados. Una cepa de este pseudohongo de rápido desarrollo (cuatro a cinco semanas) y una cepa de más lento crecimiento (más de seis meses) han sido identificadas y ambas cepas son fatales en el 90% de los casos. Con la forma agresiva en la que estas lesiones crecen y el devastador resultado de la infección, uno podría pensar que los veterinarios y dueños de caballos deberían conocer bien esta enfermedad, pero no es así” (Marcella, 2011).

El Doctor Robert Glass aportó a este manuscrito que *“no hay datos que indiquen que existe una transmisión animal a animal y está más de un 90% seguro de que un caballo infectado no puede contaminar el medio ambiente”* (Marcella, 2011).

Fisiopatología de la Lagenidiosis Equina

El ciclo biológico de los oomicetos es bastante similar entre ellos; las esporas penetran al tejido afectado de los animales, enquistándose en cuanto entran en contacto con este, y posteriormente causando la enfermedad (Mendoza, 2013).

El *Pythium* y el *Lagenidium* son organismos que provocan lesiones cutáneas y subcutáneas, gastrointestinales o multisistémicas en animales mamíferos. Las lesiones del *Lagenidium* han sido descritas en perros y se presentan muy similares a las de la Pitiosis equina y canina, desarrollando *“pequeños tejidos ulcerados que se agrandan rápidamente y desarrollan lesiones multicéntricas subcutáneas”* (Mendoza, 2013).

Método Diagnóstico

El Pan American Veterinary Laboratories (**PAVL**) en Texas, Estados Unidos, ofrece un panel diagnóstico por el método de Ensayo por Inmunoabsorción ligado a Enzimas (**ELISA**) para la identificación de los oomicetos *Pythium*, *Lagenidium* y *Paralagenidium*, el cual es el método diagnóstico ideal y el que se estará utilizando para este trabajo de grado debido a que es costo-efectivo y el más fácil de realizar para el muestreo de poblaciones grandes.

Las pruebas de ELISA también podrían utilizarse para monitorear la respuesta al tratamiento en mamíferos con Lagenidiosis, ya que la eliminación de la infección produce una disminución progresiva de los títulos de anticuerpos si el tratamiento es exitoso (Mendoza, 2013).

En cuanto a los demás métodos diagnósticos, existe la posibilidad de hacer ensayos de inmunohistoquímica para detectar *Lagenidium spp* en tejidos infectados, pero este método aún no está disponible. Por otro lado, los elementos hifales de las especies de *Lagenidium* pueden ser detectados por muestras de biopsia clínica recolectadas de las áreas infectadas, preferiblemente de las áreas con úlceras avanzadas. Como último método a describir, ensayos basados en PCR han sido desarrollados tanto para *P. insidiosum* como para *Lagenidium spp*. Este método diferencia con precisión los elementos hifales de *Lagenidium spp* y las estructuras desarrolladas por *P. insidiosum* en cultivo o tejido infectado (Mendoza, 2013).

Tratamiento y Prevención de la Enfermedad

El tratamiento médico de Pitiosis y Lagenidiosis no ha sido históricamente satisfactorio y se atribuye a que el ergosterol (el objetivo para la mayoría de los agentes antifúngicos tradicionales) no está presente en la membrana celular de los oomicetos. A pesar de esto, la cura ha sido lograda en algunos humanos y pacientes veterinarios siguiendo tratamientos con medicamentos que atacan el ergosterol, como el Itraconazol, Terbinafina y Anfotericina B.

Estas respuestas, aunque han sido infrecuentes, sugieren la necesidad de seguir investigando los efectos relacionados a estos fármacos en oomicetos patógenos (Brown, 2008). Según estudios realizados por el PAVL que aún no han sido publicados, la inmunoterapia ha sido el método de tratamiento utilizado con resultados más satisfactorios.

El diagnóstico temprano es importante para la resolución de esta enfermedad, ya que esto permite realizar cirugía radical y escisión del tejido afectado, siendo este el tratamiento de elección en la mayoría de los casos, sin embargo, esta estrategia no siempre se puede llevar a cabo debido al estado avanzado de la enfermedad al momento de ser diagnosticada (Mendoza, 2013).

Como método preventivo, se recomienda evitar que mamíferos con heridas abiertas entren en contacto con cuerpos de agua estancada presuntamente contaminada con el oomiceto.

TERCERA PARTE

MATERIALES Y MÉTODOS

Capítulo IV: Materiales y Métodos

Localización Geográfica de la Toma de Muestra

Este estudio se llevó a cabo en zonas inundables artificiales y naturales de la provincia de Monseñor Nouel, Municipio Bonao, en la República Dominicana. La toma de muestra se realizó en zonas que se encontraran próximas a cuerpos hídricos como lagunas, pantanos, humedales y arrozales; siendo escogidas porque cumplen con los requisitos medioambientales para favorecer la proliferación del *Lagenidium spp.*

La provincia de Monseñor Nouel tiene una extensión de 992 km². Limita al Norte con las provincias La Vega y Sánchez Ramírez; al Este con las provincias Sánchez Ramírez y Monte Plata; al Sur con San José de Ocoa y San Cristóbal; y al Oeste con La Vega. Está dividida en tres municipios; **Bonao** (18°56'00"N 70°24'00"O), **Maimón** (18°46'N 70°20'O) y **Piedra Blanca** (18°50'N 70°18'O). (Naturales., 2017) (Ilustración 2).

El clima de la provincia de Monseñor Nouel es tropical. La temperatura media anual es 23.0 °C en Bonao. La precipitación es significativa, incluso durante el mes más seco (febrero). La temporada con mayores precipitaciones tiene una duración de siete meses, desde el 22 de abril hasta el 25 de noviembre, con una probabilidad entre 16% y 24% por día de que se presenten lluvias. La precipitación es de 1614 mm al año (tabla 2) (WeatherSpark, s.f) (Data, s.f).

En Bonao la humedad percibida varía considerablemente a lo largo de todo el año; el período más húmedo dura nueve meses, desde el 25 de marzo hasta el 10 de enero, con hasta un 99% de índice de humedad en agosto (WeatherSpark, s.f).

Tamaño de la Toma de Muestra

Las muestras fueron tomadas de ciento cincuenta y tres (153) equinos distribuidos en los alrededores de Bonao.

Selección de la Muestra

Según el Precenso Nacional Agropecuario realizado por el Ministerio de Economía, Planificación y Desarrollo de la República Dominicana en el año 2015, se establece que las unidades productivas dedicadas a la crianza de equinos en la provincia de Monseñor Nouel es un total de 18 unidades. En una visita realizada a la provincia para corroborar esta información se notó que la cantidad de unidades productivas existentes es superior a las establecidas en el documento citado, por lo tanto, la cantidad de equinos existente también es superior. Para mayor credibilidad de este estudio se realizó un censo no oficial entrevistando a los habitantes del municipio de Bonao. El siguiente paso fue tomar el porcentaje de prevalencia de la población muestreada en el estudio de las doctoras Fernández y Bayón (Fernández & Bayón, 2020), donde de cincuenta y seis equinos muestreados, nueve de ellos resultaron positivos a *Lagenidium*, representando un 16% de prevalencia. Este cálculo nos arroja un total de ciento cincuenta y tres animales para muestrear, siendo la población recogida en la entrevista de quinientos setenta y ocho animales, repartidos entre los caballos de paseo y los de trabajo de Los Arroces.

Fórmula utilizada para realizar este cálculo:

$$n = \frac{Z^2 * P * Q * N}{(N - 1) * E^2 + Z^2 * P * Q}$$

Donde:

n = Tamaño de la muestra a calcular (153)
N = Total de la población (578)
P = Prevalencia esperada (16%)
Q = Probabilidad en contra (1-P)
Z = Coeficiente de confianza (95%)
e = Precisión (5%)

Recolección de Datos

Se visitaron propiedades localizadas en la provincia de Monseñor Nouel, municipio de Bonao, entre los meses de noviembre del año 2021 a enero del 2022. Se procedió a identificar cada equino, la propiedad en la que habita, se le creó un historial clínico y se le realizó un examen físico completo donde todo hallazgo fue redactado en un formulario para cada paciente. Teniendo toda esta información, se procedió a tomar muestras de sangre de la vena yugular de cada equino considerado para el estudio y esta se colocó en tubos de plástico para suero, con activador de coagulación BD Vacutainer® de tapón rojo de 6.0ml, luego fueron identificados individualmente y refrigerados a una temperatura de 0-4 grados Celsius. Las muestras fueron centrifugadas para obtener el suero en un tubo de recolección nuevo y sin aditivos. Las muestras del suero se almacenaron en un congelador donde pueden mantenerse viables por hasta seis meses, hasta terminar la recolección total para luego ser enviadas al Pan American Veterinary Laboratories (**PAVL**) en Texas, Estados Unidos, a través del Laboratorio Veterinario Central (**LAVECEN**), organismo oficial encargado de la remisión de muestras a laboratorios del exterior, quienes se encargaron del empaque y envío al laboratorio de referencia. En el PAVL se realizó el diagnóstico a través del panel diagnóstico por método **ELISA** para la identificación de los Oomicetos *Pythium*, *Lagenidium* y *Paralagenidium*, con interés diferencial de *Lagenidium spp.*

Equipos y Materiales

Los materiales necesarios para la recolección de las muestras son:

- Jeringas de 10cc (200 unidades aproximadamente)
- Algodón
- Alcohol isopropílico al 70%
- Guantes

- Tubos plásticos de recolección de sangre BD Vacutainer® de 6.0ml sin aditivos y con gel separador
- Centrífuga
- Refrigerador
- Congelador
- Tabla de anotaciones
- Lápices, bolígrafos y corrector
- Fial o tortol

Descripción del Método Diagnóstico Elisa utilizado en el PAVL

El método de diagnóstico que utiliza el Pan American Veterinary Labs (PAVL) para este estudio es el método de ELISA de detección indirecta. El ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) es una prueba basada en platina que está diseñada para detectar y cuantificar sustancias solubles como los péptidos, proteínas, anticuerpos y hormonas. Esta prueba representa un método poderoso para detectar y cuantificar una proteína específica en una mezcla compleja (Scientific, s.f), pero tiene como desventaja el hecho de que puede ocurrir una reacción cruzada con anticuerpos secundarios, resultando así una señal inespecífica.

Los pasos para la realización del procedimiento ELISA son los siguientes (información suministrada por el PAVL o Pan American Veterinary Labs).

- I. Preparación de la placa de dilución:
 1. Colocar 200 ul de diluyente de suero en los pozos.
 2. Añadir 10 ul de cada suero (muestra y control).
 3. Dejar los primeros 3 pozos en blanco, y colocar el control negativo, y el control positivo.

II. Preparación de la placa del antígeno:

1. Seleccionar los pozos recubiertos con el antígeno apropiado para la prueba a realizar.
2. Agregar el número de placas y tiras recubiertas necesarias para cada prueba.
3. Transferir 50 ul de las muestras diluidas a los pozos con el antígeno seleccionado.
4. Cubrir las placas de antígeno con la placa de dilución e incubar por veinte (20) minutos a temperatura ambiente.
5. Lavar la placa de antígeno tres veces.
6. Añadir 100 ul de buffer conjugado a cada pozo.
7. Cubrir nuevamente las placas e incubar por veinte (20) minutos
8. Con los 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
9. Lavar la placa tres (3) veces y secar.
10. Agregar 100 ul de solución OPD a cada pozo.
11. Incubar por veinte (20) minutos para desarrollo de color.
12. Agregar 100 ul de solución STOP al terminarse el periodo de incubación.
13. 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 el pozo.
2. El suero del paciente se agrega al pozo, y si hay anticuerpos contra el antígeno, se unirán al antígeno.
3. Se agrega anti-IgG (cadena pesada y ligera) marcada con peroxidasa, específica de especie.
4. El anti-IgG se unirá a los anticuerpos que se unieron en el paso 2.

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

Interpretación de los Resultados

Los resultados fueron interpretados por el PAVL 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:

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

Interpretación de Puntaje:

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

Estos porcentajes, según la cantidad de títulos de anticuerpo o densidad óptica resultante, indican los distintos niveles de infección que pudiesen estar presentes. Estos resultados no indican especificidad ni sensibilidad. Esta prueba se especializa en medir anticuerpos IgG, lo que quiere decir que una exposición previa al *Lagenidium* sin que exista una infección actualmente puede aun así arrojar niveles de anticuerpos detectables por hasta varios meses luego de que el paciente haya sido expuesto al oomiceto.

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 contraído la enfermedad y superarla, o haber desarrollado una reacción alérgica al oomiceto. Por lo general, estos caballos que desarrollan reacciones alérgicas dan una puntuación positiva baja o límite en esta prueba, sin haber presentado nunca la enfermedad. En cuanto a la realización del panel completo, la puntuación por enfermedad más alta será considerada la verdadera positiva y las demás serán consideradas reacción cruzada.

CUARTA PARTE

RESULTADOS

Resultados

Para este estudio se muestreó un total de ciento cincuenta y tres (153) equinos ubicados en la provincia Monseñor Nouel, en el municipio de Bonao, donde se recorrió la localidad en busca de ejemplares, los cuales fueron escogidos al azar. De esta manera se visitaron diversas propiedades, ranchos, potreros y casas con jaulas improvisadas, hasta obtener el número de caballos contemplado para este trabajo de investigación.

Este periodo se extendió desde finales de noviembre del 2021 hasta enero del año 2022, completándose el muestreo en un total de seis (6) viajes. Luego de ser recolectadas las muestras, las mismas fueron centrifugadas, marcadas con un número específico para cada ejemplar desde el 001 hasta el 153 y posteriormente congeladas para así ser transportadas hasta el Laboratorio Veterinario Central (LAVECEN) quien fue el organismo encargado de enviar estas muestras hasta el Pan American Veterinary Laboratories (PAVLAB) en Texas, quienes realizaron el procesamiento de las muestras.

Un mes más tarde, el PAVLAB remitió los resultados vía correo electrónico, en los cuales se determinó que no se obtuvieron resultados que indicaran la presencia de una infección de Lagenediosis activa en el momento de la toma de muestra. Sin embargo, se obtuvieron resultados en la puntuación intermedia, lo que sugiere que estos caballos pudieron haber contraído la enfermedad en algún momento y superarla o haber tenido reacciones alérgicas al oomiceto sin presentar signos clínicos característicos de la enfermedad como se muestra en la tabla de resultados (tabla 3).

Dentro del panel diagnóstico utilizado por el PAVLAB para este estudio también se identifican los oomicetos *Pythium spp* y *Paralagenidium spp*. En los resultados reportados de estos dos microorganismos se obtuvieron ejemplares positivos para cada una de estas enfermedades. Un puntaje de 327 para el equino número 108 en *Pythium spp* y un puntaje de 230 para el equino número 075 en *Paralagenidium spp*.

Discusión de Resultados

En cuanto a la interpretación de los resultados, el Pan American Veterinary Lab suministró un sistema de puntaje en el que se indica que una puntuación mayor o igual a 200% es considerada como positiva, una puntuación entre 151 y 199% es considerada intermedia y de 150% o menos es negativa debido a la carga de anticuerpos sugestiva a la presencia del microorganismo.

Dentro de la clasificación del límite intermedio, se reportaron seis (6) casos, los cuales representan un 3.92% de la muestra total (anexo 2). En cuanto a la raza, de estos seis (6) ejemplares, cuatro (4) fueron caballos de raza Mestiza, esto representando un 66.67% de la muestra total intermedia, uno (1) de ellos fue de raza Trotón Galopero, representando un 16.67% y el restante 16.67% pertenece al de un ejemplar de raza Paso Higüeyano (anexo 3). Estos seis (6) caballos son utilizados para paseo y viven en jaulas.

Con relación al sexo de los ejemplares, cuatro (4) de ellos resultaron ser machos, representando un 66.67% del grupo intermedio, siendo así el 33.33% restante perteneciente a las hembras (anexo 4).

En este grupo las edades fueron clasificadas dentro de los rangos de 2-6 años, representando estos un 33.33% de la muestra, de 7-16 años, siendo un 50% de la muestra y de 17 años en adelante es el 16.67% restante (anexo 5).

El resto de la población muestreada (147) resultaron negativos a la presencia de anticuerpos en suero, representando un 96.08% del total de la población muestreada (anexo 2).

Como se pudo apreciar en la tabla antes mencionada (anexo 6) referente a los signos clínicos de la enfermedad y los resultados intermedios de los ejemplares, se evidenció que solo en dos (2) de los seis (6) casos que obtuvieron puntuación intermedia se observaron lesiones que podrían ser indicativas de Lagenidiosis.

En cuanto a la relación entre la enfermedad y las condiciones de manejo, higiénicas y de actividad de los ejemplares y luego de recolectar toda la información posible referente a estas, no se pudo concretar que existiese algún factor determinante entre las condiciones antes mencionadas y los resultados serológicos obtenidos en este estudio.

Debido a lo antes mencionado y para llevar a cabo una investigación completa, por recomendación del PAVLAB, se decidió repetir la prueba a los seis ejemplares que resultaron dentro del límite intermedio, para de esta manera corroborar el diagnóstico. Se pudieron

recolectar cuatro (4) de las seis (6) muestras que se necesitaban, esto debido a una negativa por parte de los propietarios de dos (2) de los caballos de volverles a tomar la muestra de sangre.

Al recibir nuevamente los resultados de estos cuatro (4) equinos un mes después, se obtuvo para uno de los ejemplares un resultado de 278 puntos para *Pythium*, confirmando el diagnóstico positivo a *Pythium* para el equino número 108, de raza Trotón Galopero Colombiano, macho de 16 años, el cual al momento de la toma de muestra no presento signos clínicos ni lesiones características de la enfermedad, en otras palabras, aparentaba estar en perfecto estado de salud.

Conclusión

Con respecto a la determinación de la presencia de anticuerpos anti *Lagenidium spp* en suero equino mediante el método ELISA, según los resultados interpretados por el Pan American Veterinary Lab, no se pudo determinar la presencia de anticuerpos al momento de la toma de muestra. Sin embargo, los hallazgos obtenidos en esta investigación confirman la existencia de individuos con puntuación intermedia dentro de la muestra, asegurando que estos ejemplares estuvieron expuestos al oomiceto en algún momento de sus vidas.

En cuanto a los ejemplares dentro el límite intermedio, ninguno mostró signos clínicos característicos, exceptuando a los dos (2) ejemplares que exhibieron lesiones de piel, a los cuales no fue permitido por sus dueños realizarles pruebas complementarias.

Ya que no se obtuvieron resultados serológicos positivos en este muestreo, es imposible determinar si existe una relación entre estos y las condiciones de vida y actividades del animal. Tampoco se llegó a una respuesta concluyente en cuanto a la relación entre presencia de la enfermedad y la edad, el sexo y la raza. En cuanto a los resultados intermedios, estos resultaron ser inconcluyentes debido a la reducida cantidad y la diversidad de estos.

Recomendaciones

1. Se recomienda continuar con trabajos de investigación de Lagenidiosis en otras áreas del país que cumplan con condiciones ambientales favorables para la proliferación de este oomiceto.
2. Realizar investigaciones similares con relación al *Phytium* y otros oomicetos, en otras especies mamíferas.
3. Continuar educando e informando a la comunidad veterinaria, autoridades sanitarias competentes y a la población de interés de la existencia de esta enfermedad.
4. Recomendamos al sector agropecuario y autoridades pertinentes a realizar censos periódicamente dentro de las zonas de interés agropecuario, para que los siguientes estudios puedan llevarse a cabo con datos más precisos.

Referencias Bibliográficas

- Brown, T. A. (2008). . *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* and a *Lagenidium* sp to itraconazole, posaconazole, voriconazole, terbinafine, caspofungin, and mefenoxam. *American Journal of Veterinary Research*.
- Cessé, A. O. (2010). . *HACE 28 AÑOS BONAO FUE ELEVADO A PROVINCIA MONSEÑOR NOUEL. HACE 28 AÑOS BONAO FUE ELEVADO A PROVINCIA MONSEÑOR NOUEL. .*
- Data, C. (s.f).
- Derevnina, L. (2016). Emerging oomycete threats to plants and animals.
- Fernández, A., & Bayón, T. (2020). *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.*
- Grooters, A. M. (2003). *Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice.*
- Hnilica, K. A. (2016). *Small Animal Dermatology. Elsevier Gezondheidszorg.*
- Kerwin, J. (s.f). *Lagenidium giganteum. .*
- Leoro-Garzon, P. G. (2019). Oomycete metabarcoding reveals the presence of *Lagenidium* spp. in phytotelmata.
- Leoro-Garzon, P. G. (2019). *Oomycete metabarcoding reveals the presence of Lagenidium spp. in phytotelmata.*
- Marcella, K. (2011). Puzzling Issue.
- Medicine, I. (2016). *Pythiosis, Lagenidiosis, and Zygomycosis.* Obtenido de Veterian Key.
- Mendoza, L. &. (2013). *The Mammalian Pathogenic Oomycetes. Current Fungal Infection Reports.*
- Naturales., M. d. (2017). *Plan para el desarrollo económico local de Monseñor Nouel.*
- Pais, M. (s.f). *Monsenor Nouel.*
- País, M. (s.f). *Clima en la República Dominicana.*
- Reinprayoon, U. P. (2013). *Lagenidium* sp. Ocular Infection Mimicking Ocular Pythiosis. *Journal of Clinical Microbiology.*
- Scientific, T. F. (s.f). *Overview of ELISA.*
- Vilela, R. T. (2015). *Lagenidium giganteum Pathogenicity in Mammals. Emerging Infectious Diseases.*

Vilela, R. T. (2015). *Emerging Infectious Diseases journal*. .

WeatherSpark. (s.f). *El clima y el tiempo promedio en todo el año en Bonao*.

Anexos

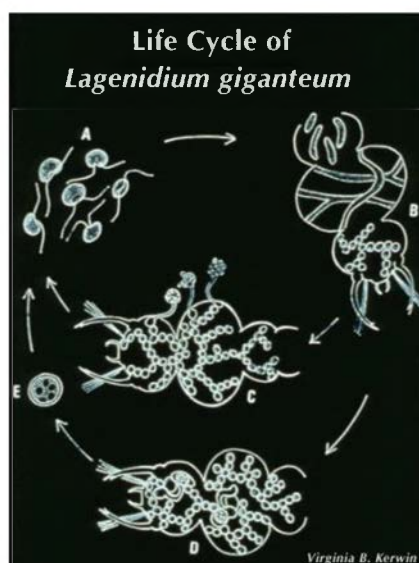


Ilustración 1. Ciclo Biológico del *Lagenidium giganteum*. Diagrama cortesía de [Academic Press](#).

Diagnostic Assays Currently Available for Pythiosis, Lagenidiosis, and Zygomycosis in Dogs and Cats

Assay	Specimen Type	Target	Performance
Cytologic examination	Aspirates of affected tissues	Broad, rarely septate fungal hyphae with tapered, rounded ends	Does not reliably differentiate among pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis.
Culture	Biopsies of affected tissues	<i>Pythium insidiosum</i> , <i>Lagenidium</i> spp., or zygomycetes	Special tissue handling and expertise required for <i>P. insidiosum</i> culture (see text). The use of swab specimens or aspirates may result in false negatives. Species identification requires the use of molecular techniques.
Antibody serology	Serum	Antibodies to <i>P. insidiosum</i> or <i>Lagenidium</i> spp.	Assays that detect anti- <i>Pythium</i> antibodies allow early, non-invasive diagnosis of pythiosis in dogs. Positive test results correlate with active disease, and titers fall with successful treatment. Assays that detect <i>Lagenidium</i> antibodies in dogs are less specific and may be positive in animals with other diseases.
Histopathology	Biopsies of affected tissues	Broad, rarely septate fungal hyphae with tapered, rounded ends	Does not reliably differentiate among pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis. Use of special stains may facilitate detection.
PCR assays	Biopsies of affected tissues	<i>P. insidiosum</i> DNA	Not widely available.

Anexo 1. Métodos Diagnósticos Disponibles para Lagenidiosis, Pythiosis y Zygomycosis (*Medicine*, 2016).

Dominio	Eucariota
Reino	Stramenofila
Superfilo	Heterokonta
Filo	Pseudofungi
Clase	Oomycota
Orden	Lagenidiales
Familia	Lagenidiaceae
Género	Lagenidium
Especie	¿?

Tabla 1. Taxonomía del *Lagenidium* spp (Derevnina, 2016) , (Kamoun, 2014)



Ilustración 2. Mapa de la Provincia de Monseñor Nouel (Cessé, 2010)

	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre
Temperatura media (°C)	20.9	21.1	21.8	22.7	23.4	24.4	24.6	24.7	24.6	24	22.6	21.5
Temperatura min. (°C)	17.6	17.5	18.1	19.3	20.1	20.8	21.2	21.3	21	20.6	19.6	18.4
Temperatura máx. (°C)	26	25.6	26.5	27	27.6	28.7	28.9	29.1	29.2	28.3	26.5	25.5
Precipitación (mm)	82	78	119	180	258	142	113	131	153	149	124	85
Humedad(%)	83%	80%	78%	81%	83%	81%	81%	82%	82%	84%	85%	84%
Días lluviosos (días)	11	11	12	15	17	15	16	17	17	16	14	12
Horas de sol (horas)	6.4	6.9	7.2	7.7	8.3	9.5	9.0	8.9	9.0	8.3	6.8	6.5

Tabla 2. Tabla climática, datos históricos de Bonao. (Data, s.f)

RESULTADOS DE PRUEBAS ELISA PARA " <i>Lagenidium spp</i> "								
# EJEMPLAR	DENSIDAD OPTICA	PUNTAJE %	# EJEMPLAR	DENSIDAD OPTICA	PUNTAJE %	# EJEMPLAR	DENSIDAD OPTICA	PUNTAJE %
001	0.343	143	052	0.212	88	103	0.171	71
002	0.271	113	053	0.181	75	104	0.198	83
003	0.252	105	054	0.195	81	105	0.229	95
004	0.163	68	055	0.184	77	106	0.153	64
005	0.325	135	056	0.244	102	107	0.158	66
006	0.239	100	057	0.19	79	108	0.394	164
007	0.225	94	058	0.224	93	109	0.227	95
008	0.193	80	059	0.238	99	110	0.183	76
009	0.294	123	060	0.195	81	111	0.158	66
010	0.37	154	061	0.206	86	112	0.181	75
011	0.183	76	062	0.158	66	113	0.219	91
012	0.418	174	063	0.164	68	114	0.16	67
013	0.262	109	064	0.28	117	115	0.167	70
014	0.234	98	065	0.181	75	116	0.206	86
015	0.18	75	066	0.196	82	117	0.224	93
016	0.17	71	067	0.245	102	118	0.206	86
017	0.227	95	068	0.19	79	119	0.227	95
018	0.224	93	069	0.426	178	120	0.171	71
019	0.16	67	070	0.307	128	121	0.169	70
020	0.224	93	071	0.182	76	122	0.158	66
021	0.236	98	072	0.196	82	123	0.141	59
022	0.286	119	073	0.188	78	124	0.303	126
023	0.239	100	074	0.31	129	125	0.167	70
024	0.157	65	075	0.264	110	126	0.172	72
025	0.133	55	076	0.2	83	127	0.209	87
026	0.136	57	077	0.198	83	128	0.253	105
027	0.154	64	078	0.251	105	129	0.21	88
028	0.159	66	079	0.145	60	130	0.165	69
029	0.157	65	080	0.179	75	132	0.154	64
030	0.302	126	081	0.457	190	133	0.196	82
031	0.216	90	082	0.22	92	134	0.169	70
032	0.211	88	083	0.279	116	135	0.192	80
033	0.211	88	084	0.388	162	136	0.099	41
034	0.27	113	085	0.168	70	137	0.216	90
035	0.241	100	086	0.272	113	138	0.187	78
036	0.224	93	087	0.186	78	139	0.249	104
037	0.18	75	088	0.21	88	140	0.221	92
038	0.141	59	089	0.276	115	141	0.285	119
039	0.151	63	090	0.292	122	142	0.194	81
040	0.163	68	091	0.178	74	143	0.177	74
041	0.133	55	092	0.167	70	144	0.135	56
042	0.155	65	093	0.246	103	145	0.185	77
043	0.143	60	094	0.192	80	146	0.162	68
044	0.207	86	095	0.147	61	147	0.281	117
045	0.334	139	096	0.226	94	148	0.191	80
046	0.268	112	097	0.178	74	149	0.257	107

047	0.301	125	098	0.202	84	150	0.227	95
048	0.271	113	099	0.164	68	151	0.206	86
049	0.226	94	100	0.173	72	152	0.147	61
050	0.225	94	101	0.22	92	153	0.219	91
051	0.199	83	102	0.147	61	NEGATIVO	INTERMEDIO	POSITIVO

Tabla 3. Resultados prueba ELISA para *Lagenidium spp.*

RESULTADOS DE PRUEBAS ELISA PARA "Pythium spp"								
# EJEMPLAR	DENSIDAD OPTICA	PUNTAJE %	# EJEMPLAR	DENSIDAD OPTICA	PUNTAJE %	# EJEMPLAR	DENSIDAD OPTICA	PUNTAJE %
001	0.295	122	052	0.106	44	103	0.27	112
002	0.186	77	053	0.124	51	104	0.317	131
003	0.155	64	054	0.124	51	105	0.303	125
004	0.102	42	055	0.113	47	106	0.2	83
005	0.141	58	056	0.187	77	107	0.217	90
006	0.164	68	057	0.169	70	108	0.792	327
007	0.142	59	058	0.14	58	109	0.346	143
008	0.124	51	059	0.161	67	110	0.352	145
009	0.151	62	060	0.164	68	111	0.245	101
010	0.196	81	061	0.153	63	112	0.281	116
011	0.169	70	062	0.125	52	113	0.293	121
012	0.24	99	063	0.123	51	114	0.292	121
013	0.119	49	064	0.146	60	115	0.295	122
014	0.152	63	065	0.122	50	116	0.289	119
015	0.122	50	066	0.15	62	117	0.262	108
016	0.121	50	067	0.137	57	118	0.228	94
017	0.134	55	068	0.136	56	119	0.234	97
018	0.138	57	069	0.222	92	120	0.254	105
019	0.095	39	070	0.207	86	121	0.236	98
020	0.11	45	071	0.145	60	122	0.223	92
021	0.128	53	072	0.151	62	123	0.164	68
022	0.237	98	073	0.122	50	124	0.464	192
023	0.124	51	074	0.183	76	125	0.205	85
024	0.143	59	075	0.126	52	126	0.221	91
025	0.122	50	076	0.121	50	127	0.311	129
026	0.098	40	077	0.12	50	128	0.271	112
027	0.1	41	078	0.158	65	129	0.209	86
028	0.094	39	079	0.097	40	130	0.156	64
029	0.104	43	080	0.12	50	132	0.161	67
030	0.089	37	081	0.233	96	133	0.158	65
031	0.09	37	082	0.166	69	134	0.165	68
032	0.096	40	083	0.233	96	135	0.263	109
033	0.112	46	084	0.157	65	136	0.283	117
034	0.237	98	085	0.112	46	137	0.261	108
035	0.27	112	086	0.137	57	138	0.226	93
036	0.161	67	087	0.167	69	139	0.359	148
037	0.158	65	088	0.12	50	140	0.341	141
038	0.14	58	089	0.157	65	141	0.276	114
039	0.131	54	090	0.221	91	142	0.311	129
040	0.171	71	091	0.131	54	143	0.264	109
041	0.113	47	092	0.127	52	144	0.199	82
042	0.12	50	093	0.188	78	145	0.275	114
043	0.114	47	094	0.192	79	146	0.217	90
044	0.145	60	095	0.213	88	147	0.448	185
045	0.22	91	096	0.332	137	148	0.22	91
046	0.187	77	097	0.242	100	149	0.372	154

047	0.191	79	098	0.304	126	150	0.268	111
048	0.131	54	099	0.272	112	151	0.275	114
049	0.159	66	100	0.335	138	152	0.285	118
050	0.171	71	101	0.402	166	153	0.3	124
051	0.155	64	102	0.247	102	NEGATIVO	INTERMEDIO	POSITIVO

Tabla 4. Resultados prueba ELISA para *Pythium* spp.

RESULTADOS DE PRUEBAS ELISA PARA " <i>Paralagenidium spp</i> "								
# EJEMPLAR	DENSIDAD OPTICA	PUNTAJE %	# EJEMPLAR	DENSIDAD OPTICA	PUNTAJE %	# EJEMPLAR	DENSIDAD OPTICA	PUNTAJE %
001	0.428	118	052	0.386	107	103	0.344	95
002	0.462	128	053	0.441	122	104	0.508	140
003	0.449	124	054	0.565	156	105	0.409	113
004	0.456	126	055	0.376	104	106	0.405	112
005	0.397	110	056	0.447	123	107	0.318	88
006	0.364	101	057	0.575	159	108	0.374	103
007	0.691	191	058	0.483	133	109	0.314	87
008	0.555	153	059	0.517	143	110	0.465	128
009	0.459	127	060	0.718	198	111	0.334	92
010	0.486	134	061	0.702	194	112	0.403	111
011	0.368	102	062	0.504	139	113	0.472	130
012	0.467	129	063	0.454	125	114	0.401	111
013	0.287	79	064	0.476	131	115	0.527	146
014	0.399	110	065	0.327	90	116	0.451	125
015	0.355	98	066	0.336	93	117	0.685	189
016	0.325	90	067	0.448	124	118	0.419	116
017	0.31	86	068	0.355	98	119	0.484	134
018	0.484	134	069	0.464	128	120	0.466	129
019	0.435	120	070	0.487	135	121	0.345	95
020	0.567	157	071	0.374	103	122	0.349	96
021	0.361	100	072	0.459	127	123	0.298	82
022	0.41	113	073	0.506	140	124	0.273	75
023	0.49	135	074	0.481	133	125	0.295	81
024	0.343	95	075	0.834	230	126	0.588	162
025	0.461	127	076	0.432	119	127	0.371	102
026	0.387	107	077	0.373	103	128	0.38	105
027	0.478	132	078	0.53	146	129	0.413	114
028	0.314	87	079	0.294	81	130	0.288	80
029	0.302	83	080	0.252	70	132	0.425	117
030	0.33	91	081	0.602	166	133	0.332	92
031	0.425	117	082	0.398	110	134	0.426	118
032	0.328	91	083	0.554	153	135	0.447	123
033	0.534	148	084	0.551	152	136	0.435	120
034	0.367	101	085	0.47	130	137	0.451	125
035	0.535	148	086	0.442	122	138	0.521	144
036	0.629	174	087	0.535	148	139	0.532	147
037	0.405	112	088	0.454	125	140	0.369	102
038	0.438	121	089	0.213	59	141	0.489	135
039	0.514	142	090	0.425	117	142	0.455	126
040	0.476	131	091	0.404	112	143	0.384	106
041	0.399	110	092	0.212	59	144	0.277	77
042	0.467	129	093	0.488	135	145	0.43	119
043	0.344	95	094	0.441	122	146	0.415	115
044	0.592	164	095	0.429	119	147	0.573	158
045	0.525	145	096	0.333	92	148	0.372	103
046	0.522	144	097	0.298	82	149	0.409	113

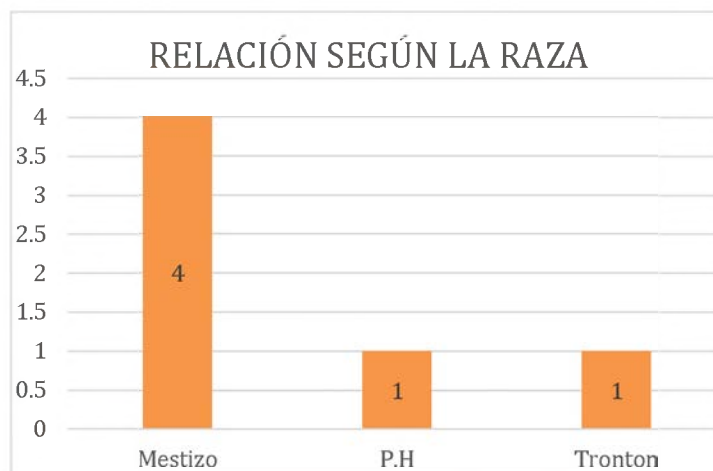
047	0.578	160	098	0.369	102	150	0.492	136
048	0.452	125	099	0.345	95	151	0.498	138
049	0.423	117	100	0.272	75	152	0.334	92
050	0.659	182	101	0.348	96	153	0.433	120
051	0.414	114	102	0.34	94	NEGATIVO	INTERMEDIO	POSITIVO

Tabla 5. Resultados prueba ELISA para *Paralagenidium* spp.



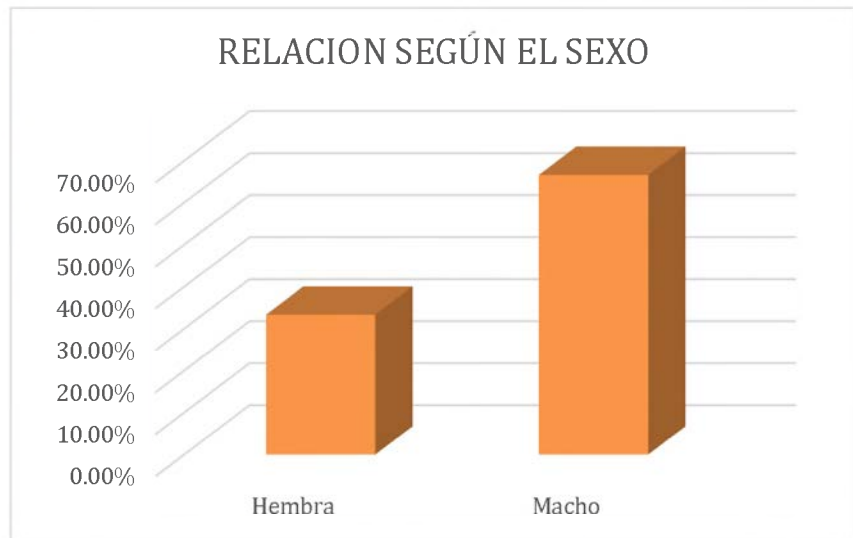
Anexo 2. Columnas comparativas de resultados para *Lagenidium spp.*

Raza	Resultados
MESTIZO	66.67%
TG	16.67%
PH	16.67%



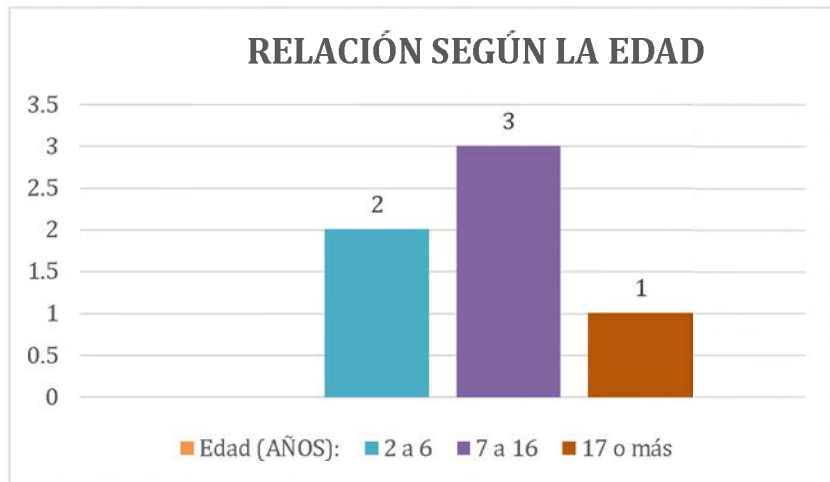
Anexo 3. Relación de los resultados de *Lagenidium spp* según la raza.

Sexo	Resultados
Macho	66.67%
Hembra	33.33%

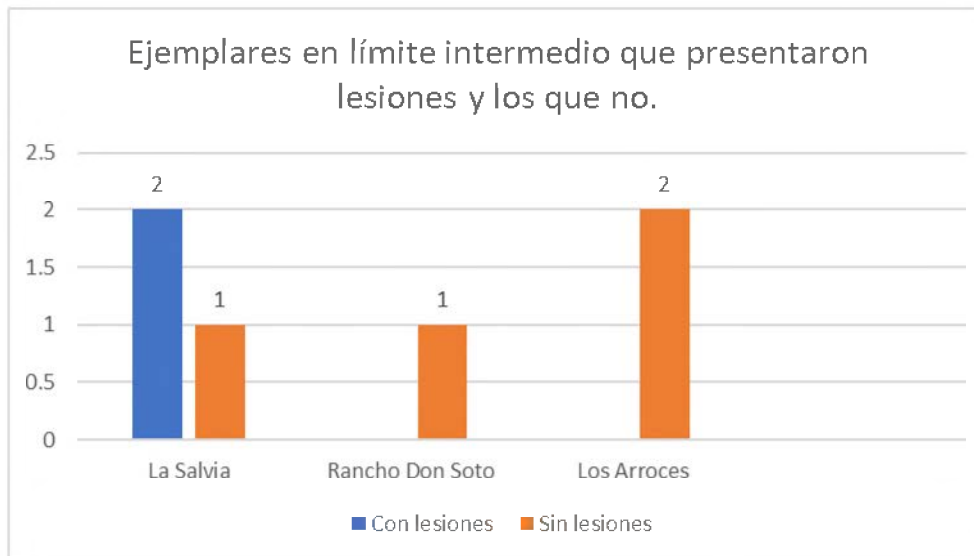


Anexo 4. Relación de los resultados de Lagenidium spp según el sexo.

Edad	Resultados
2 a 6	33.33%
7 a 16	50.00%
17 o mas	16.67%



Anexo 5. Relación de los resultados de Lagenidium spp según la edad.



Anexo 6. Ejemplares dentro del límite intermedio a *Lagenidium spp* que presentaron lesiones y aquellos que no presentaron.

MICHIGAN STATE
UNIVERSITY

January 21, 2022

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 *Lagenidium* and *Paralagenidium* species 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.



College of Natural
Science

Biomedical Laboratory
Diagnostics
North Kedzie Hall

354 Farm Lane, Room N322
East Lansing, MI 48824

517-353-7800
Fax: 517-432-7006
bld@msu.edu

Sincerely,

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "L. Mendoza".

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

MSU is an affirmative action,
equal opportunity institution.

Anexo 7. Primera carta recibida del Michigan State University (PAVLAB) para el envío de las muestras.

MICHIGAN STATE
UNIVERSITY

June 03, 2022

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 *Lagenidium* species 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.



**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
bid.msu.edu

Sincerely,


Lennel Menduza,
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

MSU is an affirmative action,
equal opportunity employer.

Anexo 8. Segunda carta recibida del Michigan State University (PAVLAB) para la confirmación del diagnóstico de las 4 muestras reenviadas.



Figura 1. Equino número 003, presenta lesiones en cabeza y ojo derecho.



Figura 2. Equino número 050, presenta una pobre condición corporal.



Figura 3. Equino número 048, presencia de un posible Habronema.



Figura 4. Equino número 055, presenta pobre condición corporal.



Figura 5. Equinos habitan en potreros con aguas estancadas.



Figura 6. Equinos habitan en potreros con aguas estancadas.



Figura 7. Toma de muestra a uno de los ejemplares.



Figura 8. Toma de muestra a uno de los ejemplares.



Figura 9. Junto a las sustentantes el equino número 108, positivo a Pythium.



Figura 10. Muestras de sangre de los ejemplares.



Figura 11. Muestra del equino número 100.