

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS



**DETECCIÓN MOLECULAR DE *Dirofilaria immitis* EN SANGRE DE PERROS
Y EN VECTORES POTENCIALES EN MEXICALI, BAJA CALIFORNIA**

TESIS

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS
PRESENTA

M.V.Z. Malinali Ortega Pérez Tejada

Director de Tesis
Dr. Luis Tinoco Gracia

Asesores

Dr. Gilberto López Valencia
Dr. Gerardo Enrique Medina Basulto
M.C. Sergio Arturo Cueto González

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO

FEBRERO DE 2014

Detección molecular de *Dirofilaria immitis* en sangre de perros y en vectores potenciales en Mexicali, Baja California. Tesis presentada por Malinali Ortega Pérez Tejada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias Veterinarias, que ha sido aprobada por el comité particular indicado:

Dr. Luis Tinoco Gracia
Director

Dr. Gilberto López Valencia
Asesor

Dr. Gerardo Enrique Medina Basulto
Asesor

MC. Sergio Arturo Cueto González
Asesor

AGRADECIMIENTOS

A Dios, esa fuerza superior, a ese ser que es omnipotente, quien me regaló a mí familia, quien me regala cada amanecer y por sobretodo quien me regala el entendimiento para realizar cada reto de vida.

A mis dulces Padres, quienes siempre están pendientes de encomendarme en sus oraciones y de pedir por mí, para que cada día sea mejor, no solo en mi trabajo, sino como mujer, como madre y como persona.

A mi preciosa hija, la que me cambió por completo la vida y que se ha convertido en mi corazón latiendo afuera de mi cuerpo.

A mis hermanos por sus consejos y ayuda en los momentos más difíciles y solitarios.

A mi tutor, por brindarme una oportunidad, por su valioso aporte, su dedicación constante, la confianza depositada en mí y por su gran calidad humana.

A mis asesores, por sus ideas brillantes y por brindarme todos estos valiosos detalles que llevaron a la culminación de esta Investigación.

A CONACYT por apoyarme con una beca, ya que sin esa ayuda no hubiera logrado un estudio de posgrado ni soñando.

A la UABC, por permitir mi desarrollo profesional desde la licenciatura. A esta Institución que se ha convertido en mi alma máter.

A la Coordinadora de Posgrado, por su tiempo, atenciones y apoyo incomparable.

A los maestros que compartieron conmigo un poco de su tiempo y sus grandes conocimientos.

A la Distribuidora MAICO y a la empresa IDEXX por el donativo de los kits de diagnóstico serológico que permitieron la realización de este trabajo.

*Dedicado con todo mi cariño y amor a las personas que
hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mi
sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que
el camino se terminaba: MIS PADRES.....Por todo el apoyo
otorgado durante mis estudios, por corregir mis errores y
ayudarme a aprender de ellos, por enseñarme a trabajar con
entusiasmo y esfuerzo, por brindarme un hogar feliz y
armonioso y por enseñarme a tenerle amor a la vida y
respeto al prójimo.*

*Y especialmente, a la luz de mi vida: mi hija Renata, cuyo
nacimiento coincidió con mi estudio de Maestría. ELLA es lo
mejor que me pudo haber pasado y ha venido a este mundo
a darme el último empujón para terminar. Es sin duda, mi
referencia para el presente y el futuro y es el motor que me
sacó adelante.....*

CONTENIDO

RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE CUADROS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Definición.....	4
Etiología.....	4
Hospedadores.....	5
Vectores.....	5
Ciclo biológico.....	7
<i>Desarrollo en el mosquito.....</i>	<i>7</i>
<i>Desarrollo en el mamífero hospedador.....</i>	<i>9</i>
Epidemiología.....	10
<i>Factores de riesgo.....</i>	<i>11</i>
<i>Distribución geográfica.....</i>	<i>11</i>
Patofisiología.....	14
Signos Clínicos.....	16
Zoonosis.....	16
Diagnóstico.....	17
<i>Técnicas clínicas.....</i>	<i>17</i>
<i>Imagenología.....</i>	<i>18</i>

Electrocardiografía (ECG).....	19
<i>Hematología</i>	20
<i>Técnicas de microscopía</i>	20
<i>Método de la gota de sangre gruesa</i>	21
<i>Método del microcapilar (Test de Woo)</i>	21
<i>Método de Knott modificado (Técnica de sedimentación)</i>	22
<i>Método del filtro microporo (Técnica de filtración)</i>	22
<i>Técnicas serológicas</i>	23
<i>Inmunofluorescencia indirecta (IFI)</i>	24
<i>Enzaimunmo análisis de absorción (ELISA)</i>	25
<i>Técnicas moleculares</i>	26
<i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	26
Tratamiento.....	28
<i>Médico</i>	28
<i>Adulticida</i>	28
<i>Microfilaricida</i>	29
<i>Quirúrgico</i>	30
Prevenición y control.....	31
OBJETIVOS	33
HIPÓTESIS	34
MATERIALES Y MÉTODOS	35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
CONCLUSIONES	53

RESUMEN

La dirofilariosis canina es una enfermedad cardiopulmonar zoonótica fatal en perros causada por el nematodo *Dirofilaria immitis* que se transmite por mosquitos de la Familia *Culicidae*, siendo el principal hospedador el perro doméstico, pero también se incluyen cánidos salvajes, el gato doméstico, mustélidos, leones marinos, osos, mapaches, félidos silvestres, caballos y el hombre. Ocasiona síndromes cardiopulmonares fatales y el diagnóstico depende en gran parte de la etapa larvaria del parásito. Debido a que en Mexicali se reúnen las condiciones biológicas y medioambientales para el desarrollo del parásito el objetivo de este estudio fue detectar molecularmente *Dirofilaria immitis* en perros y mosquitos, así como estimar la concordancia entre 2 pruebas diagnósticas para dirofilariosis. Se muestreó sangre de 384 perros y 903 mosquitos hembras capturadas en una zona rural de la ciudad en el periodo de septiembre del 2012 a septiembre del 2013. Se realizó ELISA y PCR para la detección del parásito y los mosquitos fueron agrupados por especie y analizados con PCR. Se identificaron un total de 6 perros seropositivos y 9 por PCR y se obtuvo una concordancia entre las pruebas serológicas del 100%, mientras que la concordancia entre la prueba serológica y molecular fue sustancial ($Kappa = 0.78\%$). Se identificaron 5 especies de mosquitos y 4 fueron positivas. Se obtuvo la abundancia relativa y la tasa mínima de infección por mosquito infestado. Se demuestra que tanto en perros como en mosquitos de Mexicali se encuentra *Dirofilaria immitis* y considerando que es una enfermedad zoonótica, es importante realizar medidas preventivas.

Palabras clave: Dirofilariosis, ELISA, PCR, concordancia, *Dirofilaria immitis*, vectores

ABSTRACT

Canine heartworm disease is a fatal zoonotic cardiopulmonary disease in dogs caused by the nematode *Dirofilaria immitis*, is transmitted by mosquitoes of the family *Culicidae*, the main host is domestic dog, but also include wild canids, domestic cats, mustelids, sea lions, bears, raccoons, wild felines, horses and man. It causes fatal cardiopulmonary syndromes and the diagnosis depends mainly on the larval stage of the parasite. Because in Mexicali the biological and environmental conditions for parasite development are found the objective of this study was to molecularly detect heartworm in dogs and mosquitoes, and estimate the correlation between two diagnostic tests for heartworm. Blood of 384 dogs were sampled and 903 female mosquitoes were captured in a rural area of the city in the period September 2012 to September 2013. ELISA and PCR was performed for detection of the parasite and the mosquitoes were grouped by species and analyzed by PCR. A total of 6 and 9 seropositive dogs were identified by PCR and concordance between the serological testing was 100%, while the correlation between serological and molecular tests was substantial (Kappa = 0.78 %). 5 species of mosquitoes were identified and 4 were positive . The relative abundance and MFIR were obtained per mosquito infested. We show that dogs and mosquitoes in Mexicali are infected and considering it is a zoonotic disease, it is important to implement preventive measures.

Keywords: heartworm, ELISA, PCR, concordance, *Dirofilaria immitis*, vectors.

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Título	Pág.
1	Resultados de serología con ambas pruebas de IDEXX SNAP® en muestras de 384 perros, donde se muestran los animales positivos, negativos, el porcentaje de positivos y la sensibilidad y especificidad de cada prueba.....	46
2	Concordancia entre PCR y ELISA para diagnóstico de dirofilariosis.....	47
3	Concordancia entre IDEXX SNAP® 4Dx® plus Test y IDEXX SNAP® prueba para el gusano del corazón felino en suero de perros.....	48
4	Resultados de la recolección de mosquitos hembras.....	49
5	Resultados del análisis de PCR para <i>Dirofilaria immitis</i> y de la MFIR.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Pág.
1	Presencia de una larva de <i>Dirofilaria immitis</i> en el abdomen de un mosquito <i>Culex pipiens</i>	6
2	Ciclo biológico de <i>Dirofilaria immitis</i>	8
3	Incidencia de la dirofilariosis en los Estados Unidos basado en un promedio de los casos reportados en las clínicas veterinarias en el 2005.....	13
4	Dispositivo IDEXX SNAP® 4Dx® positivo a <i>Ehrlichia canis</i> , <i>Anaplasma phagocytophilum</i> y <i>Dirofilaria immitis</i>	38
5	Dispositivos IDEXX SNAP® prueba para el gusano del corazón felino negativo (izquierda) y positivo (derecha).....	39
6	Resultados de PCR en las 6 muestras de perros seropositivos.....	44
7	PCR de dos muestras de ADN y un control negativo.....	45
8	Cromatograma de 415 pb obtenido como resultado de la secuenciación con identidad a <i>D. immitis</i>	45
9	Abundancia relativa de especies de mosquitos por mes de muestreo en donde se observa la cantidad de mosquitos para cada una de las especies recolectadas en el periodo de	

septiembre del 2012 a septiembre del 2013.....	51
--	----

INTRODUCCIÓN

La dirofilariosis canina es una enfermedad cardiopulmonar causada por un parásito nematodo denominado *Dirofilaria immitis* (Leydi, 1856) que se encuentra ampliamente distribuida en áreas tropicales y subtropicales del mundo con las prevalencias más altas conocidas en Estados Unidos, Japón, Australia e Italia (Polizopoulou *et al.*, 2000; Rosa *et al.*, 2000, Simón y Genchi; 2001). Además del perro, puede afectar a zorros, coyotes, lobos, gatos domésticos y salvajes, osos, leones marinos, primates (Forrester *et al.*, 1973; Gómez *et al.*, 1999; Rubio, 2000) y al ser humano (Faust *et al.*, 1941; Muro *et al.*, 1999, Narine *et al.*, 1999).

Los mosquitos de la Familia *Culicidae* actúan como vectores primarios y se conocen al menos setenta especies que son receptivos como hospedadores y vectores de *D. immitis*, distribuidos entre los géneros: *Anopheles*, *Culex*, *Aedes*, *Culiseta*, *Mansonia*, *Coquillettidia* y *Psorophora* (Simón y Genchi, 2001). De acuerdo a Medina y col. (2008) en un estudio realizado en la ciudad de Mexicali, se detectó la presencia de los géneros *Culex*, *Aedes*, *Culiseta* y *Psorophora* respectivamente.

Desde que Faust y col. (1957) denunciaron la primera dirofilariosis humana por *D.immitis*, encontrando un verme en la vena cava de una mujer en Nueva Orleans, el número de casos diagnosticados de esta zoonosis ha ido en aumento, principalmente en lugares donde la infección es endémica en gran parte de la población canina (Gómez *et al.*, 1999; Muro *et al.*, 1999; Cancrini *et al.*, 2000). La infección generalmente es asintomática, pero en algunos casos se

describe con dolor al pecho, tos, esputo hemoptoico, fiebre y ascitis. Radiológicamente la imagen es compatible con un nódulo solitario, de bordes bien definidos y lisos, de forma esférica, que ha sido denominado como “lesión de moneda”. Estas lesiones son benignas, pero en ocasiones se confunden con nódulos cancerosos, lo que puede conducir a una cirugía torácica innecesaria y muy agresiva (Georgi y Georgi, 1994; Bowman y Lynn, 1999; Muro *et al.*, 1999)

La detección de microfilarias en sangre por las técnicas hematológicas Woo y Knott modificada, se realiza desde la década de los 80's (Acevedo *et al.*, 1981; Bautista *et al.*, 2001) pero debido a que clínicamente la infección producida por este parásito puede ser aparente o inaparente ha sido necesaria la utilización conjunta de técnicas de diagnóstico serológicas (Ferrer *et al.*, 2002), las cuales presentan los inconvenientes de no detectar la presencia de la enfermedad cuando los parásitos adultos aún son inmaduros, en infecciones leves con menos de 5 parásitos o con la presencia exclusiva de parásitos machos, otorgando así un resultado falso negativo (Roth *et al.*, 1993). Debido a esto, en la actualidad se está introduciendo la utilización de técnicas moleculares, las cuales evidencian la presencia del parásito a través de la detección del ADN de éste (Giogia *et al.*, 2010; Vezzani *et al.*, 2011). La principal ventaja de esta técnica reside en su extraordinaria sensibilidad, ya que una sola microfilaria o un fragmento de esta en la muestra es suficiente para dar lugar a un resultado positivo (Lee *et al.*, 2007; Thanchomnang *et al.*, 2010; Dantas-Torres, 2012).

Debido a que en la Ciudad de Mexicali se presentan las condiciones biológicas y medioambientales para el desarrollo de *D. immitis*, como lo son:

extensas áreas de cultivo, una amplia red de canales circundantes y altas temperaturas que favorecen el desarrollo de los mosquitos vectores así como la presencia de caninos domésticos a los que en su mayoría no se les realizan revisiones periódicas ni se toman medidas de prevención y control adecuadas, debe considerarse que existe un potencial riesgo de infección de importancia en la salud pública.

Considerando lo descrito anteriormente y que no existe información documentada sobre detección molecular de *D. immitis* en perros ni conocimiento de qué especies de mosquitos son portadores y vectores del mismo en Mexicali, este estudio tiene como objetivo la detección molecular de *Dirofilaria immitis* en perros y mosquitos en Mexicali, Baja California, así como estimar la concordancia entre 2 pruebas diagnósticas para dirofilariasis.

REVISIÓN DE LITERATURA

Definición

La dirofilariosis canina es una enfermedad cardiopulmonar potencialmente fatal en perros y gatos causada por las etapas adultas de *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856). Las alteraciones principales se producen en las arterias y en el parénquima pulmonares (Simón y Genchi, 2001), aunque no son infrecuentes lesiones secundarias en riñón e hígado, principalmente (Patton y Garner, 1970; Carastro et al., 1992; Genchi et al., 1993; Frank et al., 1997; Goggin et al., 1997)

Etiología

Ocasionada por *Dirofilaria immitis*, un nematodo filiforme y cilíndrico de color blanco que posee una cutícula con estriaciones transversales, que alcanza hasta los 30 cm de diámetro y que presenta un dimorfismo sexual marcado (Borchert, 1964; Levine, 1978). Las hembras son vivíparas, liberando microfilarias a la circulación (Gómez et al., 1999). Las microfilarias en promedio miden alrededor de 308 µm. de largo (con un rango de 295 a 325 µm.) y 5 a 7,5 µm. de ancho, son fusiformes y no poseen vaina (Blagburn, 1994; Gómez et al., 1999; Kittleson y Kienle, 2000; Urquhart et al., 2001).

Taxonómicamente se clasifica como perteneciente al Filo *Nemathelminthes*, Clase *Nematoda*, Orden *Spirurida*, Suborden *Spirurina*, Superfamilia *Filaroidea*, Familia *Filariidae*, Género *Dirofilaria* y Especie *immitis* (Borchert, 1964; Urquhart et al., 2001).

Hospedadores

El principal hospedador definitivo y reservorio de la dirofilariosis, es el perro doméstico, pero también se incluyen cánidos salvajes como coyotes, lobos y zorros. Otros posibles huéspedes definitivos alternativos son el gato doméstico, mustélidos (hurones) y leones marinos de California, en los cuales hay desarrollo completo del parásito pero con una parasitación de baja intensidad y generalmente amicrofilarémica (Forrester et al., 1973; Gómez et al., 1999; Miller, 1999; Kittleson y Kienle, 2000). Se han descrito como hospedadores accidentales los osos, mapaches, félidos silvestres como el león africano, caballos (Gómez et al., 1999; Rubio, 2000) y el hombre (Faust et al., 1941; Muro et al., 1999, Narine et al., 1999). En general, los hospedadores accidentales pueden resultar infectados pero no llegar a producir microfilaremia y, por lo tanto, no actúan como reservorios (Miller, 1999).

Vectores

Giuseppe Bancroft fue la primera persona en sugerir que un mosquito era el vector responsable del ciclo biológico de las filarias, idea que no fue aceptada en su tiempo, ya que se creía que la ruta orofecal era la responsable de la transmisión de este grupo de parásitos. Después de varios estudios se descubrió que los mosquitos de la Familia *Culicidae* actúan como vectores primarios. Esta familia se agrupa en dos subfamilias: *Anophelinae* con el género *Anopheles* y *Culicinae* que incluye a los géneros *Culex*, *Aedes*, *Culiseta*, *Mansonia*, *Coquillettidia* y *Psorophora* (Simón y Genchi, 2001).

Al menos setenta especies de culícidos son receptivos como hospedadores intermediarios y vectores biológicos de *D. immitis*, aunque la

capacidad de transmitirlo sólo se ha demostrado en diez especies: siete *Aedes*, dos *Anopheles* y un *Culex*. Las especies de mosquitos no susceptibles parecen carecer de anticoagulinas, de modo que la ingesta de sangre coagula en el interior del intestino del mosquito, dejando atrapadas a las larvas (Ludlam et al., 1970; Gómez et al., 1999; Kittleson y Kienle, 2000; Barriga, 2002).



Fig. 1. Presencia de una larva de *Dirofilaria immitis* en el abdomen de un mosquito *Culex pipiens*.

Estos insectos tienen una distribución cosmopolita, con cerca de 3000 especies alrededor del mundo. Su alto grado de adaptabilidad ha asegurado su presencia en casi cualquier tipo de hábitat. Cada especie se ha adaptado su desarrollo larvario con los tipos de superficies acuáticas que se encuentran en su hábitat y con esto aseguran el desarrollo que necesitan para llegar a la adultez (Simón y Genchi, 2001).

La eficacia y capacidad vectorial de los mosquitos depende del desarrollo de las piezas bucales, capacidad anticoagulante de la saliva, la respuesta inmunitaria con encapsulación melanótica de las larvas del parásito, el número de tomas de sangre para la realización de las puestas, la prolificidad y el rango de vuelo (que puede ser de varios kilómetros), siendo el viento y la intensidad de la luz, factores importantes en su dispersión como vectores. El tamaño de la población depende de la temperatura, humedad relativa, lluvias e intensidad de la luz (Gómez et al., 1999). Se ha demostrado que las especies *Aedes* pueden viajar hasta 50 km por sí solos (Hocking, 1953).

De acuerdo a Medina y col. (2008), en nuestra área de estudio existen los siguientes Culícidos: *Aedes vexans*, *Aedes dorsalis*, *Culex pipiens/quinqüefasciatus*, *Culex tarsalis*, *Culex erytororax*, *Culiseta inornata* y *Psorophora columbiae*.

Ciclo biológico

Desarrollo en el mosquito

El ciclo de la dirofilariosis requiere de un mosquito hembra, que ingiera sangre de un mamífero susceptible a *D. immitis*, y que tenga larvas de primer estado en circulación (L1), denominadas microfilarias (Kittleson y Kienle, 2000). Una vez que el mosquito ingiere las microfilarias, estas migran desde el intestino al hemocelo, para después desplazarse hacia los túbulos de malpighi (Levine, 1978; Bradley et al., 1984; Bowman y Lynn, 1999). Ahí se transforman en L2 en un periodo de 8 a 10 días. La muda a larvas L3, ocurre a los 12 a 13 días después de la infección migran a través del cuerpo del mosquito hasta el espacio cefálico, llegando a las glándulas salivales y probóscide, donde

aguardan a que el mosquito se alimente (Georgi y Georgi, 1994; Bowman y Lynn, 1999; Gómez et al., 1999).

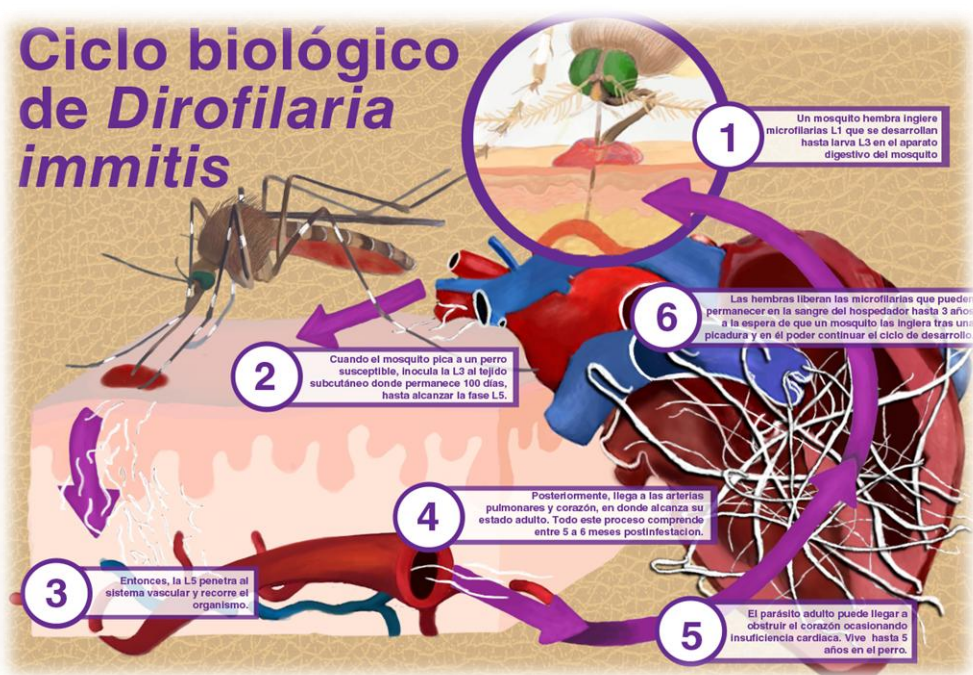


Fig. 2. Ciclo biológico de *Dirofilaria immitis*.

Las L3 de *D. immitis* atraviesan la probóscide llegando, de esa forma, a la piel del nuevo huésped junto con una gota de hemolinfa que impide su desecación. Finalmente ingresan al mamífero por el canal de la picadura (Borchert, 1964; Hendrix et al., 1980; Boch y Supperer, 1982;). El tiempo de maduración de la larva en el mosquito depende mucho de la temperatura ambiental; entre 25 y 32° C. y 60 a 90% de humedad se completa el desarrollo de la microfilaria en 10 a 14 días y a 18° C. demora 30 días (Simón y Genchi, 2001).

Respecto a la cantidad de microfilarias que los mosquitos pueden transmitir, Lai y col. (2000), observaron que podían ingerir entre 12 y 68

microfilarias desde sangre con distinta densidad microfilarial, sin embargo, no hubo diferencias significativas en el número de larvas que alcanzaron el estado infectante que fue de 1 a 3 larvas. Este número limitado, se debería a la inmunorespuesta del mosquito, como melanización y encapsulación de las microfilarias ingeridas (Christensen y Sutherland, 1984; Bradley y Nayar, 1985; Chen y Chen, 1995; Lai et al., 2000). Dependiendo de la especie, un mosquito puede transmitir un máximo de 10 larvas infectantes (Dillon, 2000; Simón y Genchi, 2003).

Desarrollo en el mamífero hospedador

Las larvas L3 migran por los tejidos a localizaciones intermedias como membranas submusculares, tejido subcutáneo, subserosas, tejido adiposo y ocasionalmente a los músculos (Winter, 1959; Georgi y Georgi, 1994; Kittleson y Kienle, 2000; Barriga, 2002). La muda a L4 ocurre entre 2 y 12 días después de la inoculación, pudiendo demorar hasta 70 días (Kotani y Powers, 1982; Hayasaki, 1996). Las L4 pueden encontrarse en los tejidos anteriormente mencionados hasta 4 meses antes de mudar a adultos juveniles y entrar en la circulación venosa (Goggin et al., 1997). La transformación de L4 a L5, ocurre 50 a 70 días post inoculación (Kotani y Powers, 1982; Atkins, 1994).

El estado larval L5 de adulto inmaduro, tiene una gran movilidad y capacidad de penetración en los tejidos, lo que explica las frecuentes localizaciones ectópicas. A los 70 a 120 días post inoculación penetra en una vena sistémica y es transportada por el torrente sanguíneo hasta las arterias pulmonares (F), en cuyas ramas terminales quedan fijadas. En los pulmones maduran por alrededor de 3 meses más (Atkins, 1994; Kume e Itagaki, 1995;

Hayasaki, 1996). El número de gusanos adultos albergados puede variar de 1 a más de 250 en el perro (Kittleson y Kienle, 2000). La supervivencia de *D. immitis* en el perro es de 3 a 8 años (Newton, 1968; Atkins, 1994; Miller, 1999; Dillon, 2000) Si ambos sexos están presentes en las arterias pulmonares, las hembras aparecen fertilizadas cerca de los 120 días después de la infección y pueden continuar reproduciéndose por más de cinco años (Bowman y Lynn, 1999).

Epidemiología

El período prepatente, es decir, el período entre la infección hasta que las microfilarias son detectadas en la circulación sanguínea, es de mínimo 5 hasta 7 meses en perros. Microfilaremiás están presentes en el 60% de los perros con dirofilariosis (Atkins, 1994; Hayasaki, 1996; Luebke y Nelson, 1998, Gómez et al., 1999; Dillon, 2000). La concentración de microfilaremia después de hacerse patente, suele aumentar mucho los próximos 6 meses y con posterioridad declina. Las microfilarias viven por hasta dos años y medio (Rawlings y Calvert, 1997; Bowman y Lynn, 1999; Miller, 1999). No existe relación entre la concentración de microfilarias y el número de hembras adultas, pueden encontrarse incluso en caso de ausencia de vermes adultos (Gómez et al., 1999). Las microfilarias tienen gran capacidad para emigrar intravascular y extravascularmente por todos los órganos, pudiendo pasar de la madre al feto transplacentariamente, lo que permite detectarlas en cachorros (Todd y Howland, 1983). Las larvas transmitidas de esta forma, no llegan a transformarse en parásitos adultos, ya que requieren del paso por el mosquito y son destruidas por el sistema inmune, pero son infectivas para los mosquitos.

Lo mismo ocurre con las microfilarias que pasan por transfusiones sanguíneas (Luebke y Nelson, 1998; Kittleson y Kienle, 2000).

Factores de riesgo

Los cánidos silvestres tienen un importante rol en la transmisión, asegurando la permanencia de la enfermedad en zonas endémicas, a pesar de que los perros domésticos reciban la medicación preventiva. Cánidos domésticos y salvajes, tienen tres veces más probabilidad de ser infectados que los gatos (Donahoe, 1975). En los perros, las razas más expuestas e infectadas con mayor asiduidad, son Pastor Alsaciano, Pointer Inglés, Setters, Retrievers y Beagle. El Bóxer tiene una incidencia inusualmente alta (Rawlings y Calvert, 1997). En general los perros de casta grande (más de 22 kilos) son más afectados (Selby et al., 1980; Polizopoulou et al., 2000). La incidencia de infección aumenta con la edad, lo que podría deberse a la acumulación de vermes, pero esta tendencia se invierte con edad avanzada, encontrándose las menores tasas de parasitación en perros de más de 10 años, relacionado quizás con la vida media del parásito, muerte de la población susceptible o al desarrollo de inmunidad tras exposiciones repetidas (Gómez et al., 1999; Kittleson y Kienle, 2000). Según Rawlings y Calvert (1997), los perros de exterior se infectan con mayor frecuencia, teniendo 4 a 5 veces más posibilidades de infectarse.

Distribución geográfica

El alcance geográfico de esta enfermedad guarda relación directa con la distribución de los mosquitos susceptibles. Ha sido reportada en casi todo el mundo, sobre todo en zonas tropicales y subtropicales ribereñas o con

humedad constante (Polizopoulou et al., 2000; Rosa et al., 2000), debido a que los climas cálidos y húmedos, proporcionan las condiciones ecológicas ideales para el desarrollo del mosquito vector (Muro et al., 1999). Pero el parásito se está adaptando a zonas de clima continental, en las que su transmisión se limita a las estaciones templadas y cálidas (Gómez et al., 1999)

Muchos países alrededor del mundo son endémicos para *D. immitis*. En Estados Unidos la enfermedad ha sido reportada en los 50 estados. Es enzoótica a lo largo de los estados del Golfo Atlántico (Lok, 1988). Desde 1992 el porcentaje de perros afectados en los estados de California y Texas a aumentado entre un 5-20% (Knight y Lok, 1995). Los estudios epidemiológicos demuestran que *D. immitis* está presente en varios países de Sudamérica (Guerrero et al., 1992).

Las áreas endémicas se han demostrado en Argentina con prevalencias hasta del 11% y en Brasil con prevalencias hasta del 16%. En Colombia la prevalencia se mantiene en el 5% mientras que en países como Puerto Rico y Cuba alcanzan hasta el 20%. Las Bahamas es una de las áreas más altas, alcanzando un 54% de prevalencia (Guerrero et al., 1992; Kozek et al., 1995; Labarthe et al., 1997).

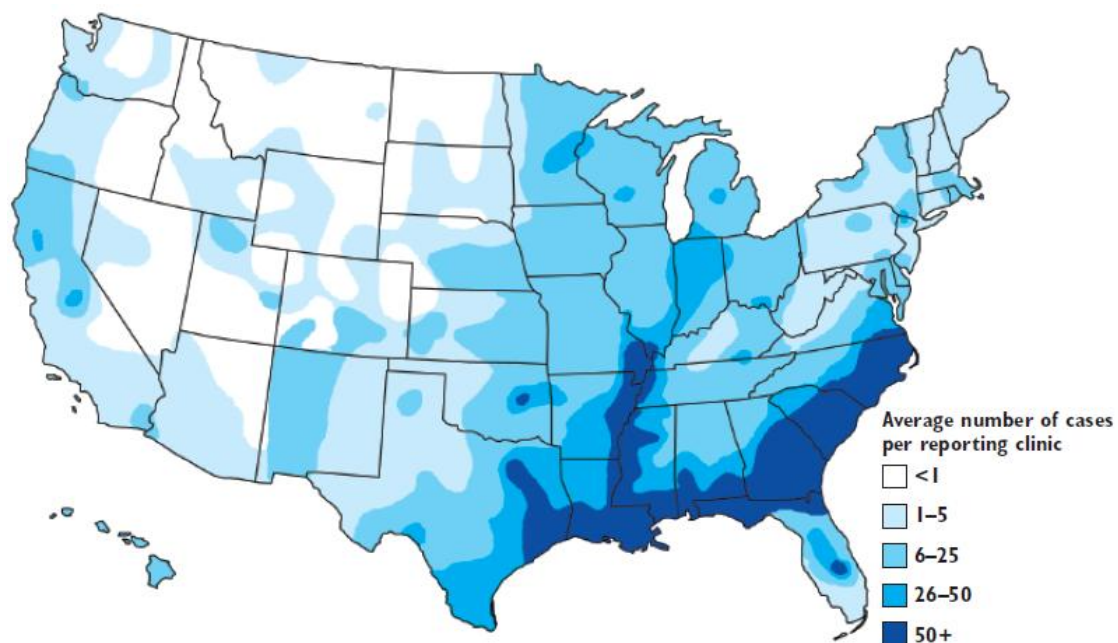


Fig. 3. Incidencia de la dirofilariosis en los Estados Unidos basado en un promedio de los casos reportados en las clínicas veterinarias en el 2005 (Hoch y Strickland, 2008a).

La enfermedad existe de igual manera en Australia, Asia y el pacífico, África y Europa con prevalencias desde el 11% al 46% respectivamente. En México se estima una prevalencia de 7.5%, donde los rangos más altos observados se presentaron en las ciudades de Tuxpan, Tampico y Ciudad Madero. En el área metropolitana de Monterrey se encontró una prevalencia de 13.5% (Simón y Genchi, 2001). En baja California se encontró que existe una prevalectía de 11.6% hasta 21.5% en la ciudad y en el valle de Mexicali respectivamente (Suárez, 1993; Rodríguez, 1993). Para la ciudad de Tijuana, Gutiérrez (1995) encontró un 10% de la población canina afectada, mientras que en Ensenada la prevalencia encontrada fue de 11.3% (Aldaco, 1995).

Patofisiología

Se distinguen tres posibles síndromes: la hipertensión pulmonar o “cor pulmonale”, el fallo congestivo del corazón derecho y el síndrome de vena cava o del fallo hepático. Cualquiera de ellos puede verse agravado por complicaciones tromboembólicas derivadas de la muerte de los vermes (Adcock, 1961; Rawlings y Tackett, 1990; Rawlings y Calvert, 1997; Rawlings, 2002).

La hipertensión pulmonar es la alteración funcional más significativa y es debida a las alteraciones que sufre el endotelio de la arteria parasitada. La pared presenta aspecto rugoso y tonalidad púrpura por intensa proliferación de la íntima; endarteritis pulmonar, aterosclerosis o hiperplasia que presentan todos los perros con dirofilariosis (Kittleson y Kienle, 2000; Oliveira et al., 2010).

El fallo congestivo del corazón derecho se provoca al perderse la elasticidad de las paredes arteriales, que no admiten la dilatación requerida para que se mantenga un flujo de sangre normal. Para compensar la disminución de flujo aumentan la presión y el trabajo del ventrículo derecho, con dilatación e hipertrofia del corazón derecho y fallo congestivo por incapacidad para mantener la alta presión de perfusión que se requiere para mover la sangre por el pulmón (Couto y Nelson, 2000; Hoch y Strickland, 2008a; Godel et al., 2012).

El síndrome de vena cava o del fallo hepático es particularmente frecuente en animales muy jóvenes (menos de 3 años). Es la forma más grave de presentación de la enfermedad y responde a la presencia de más de 100

vermes adultos (Ettinger y Feldman, 2007). Ocurre por la dificultad en el paso de la sangre de las venas cavas al corazón, debido a la existencia de un gran número de parásitos adultos en las cavas, en la aurícula derecha, en la válvula tricúspide o ventrículo derecho, produciendo taponamiento y fallo cardíaco (Atkins, 1994; Gómez et al., 1999; Kittleson y Kienle, 2000, Bowman et al., 2007).

La trombosis y la lisis de coágulos con restos del parásito puede provocar un déficit local de los factores de coagulación y coagulopatía intravascular diseminada (CID) que causa hemorragias multifocales. Esta patología es muy importante cuando se provoca la muerte brusca del parásito por administración de un fármaco adulticida y es una complicación tromboembólica que debe considerarse siempre que se realice el tratamiento quimioterapéutico de la dirofilariosis (Atkins, 1994; Gómez et al., 1999; Kittleson y Kienle, 2000, Hoch y Strickland, 2008a).

Signos clínicos

Los signos de hipertensión pulmonar más frecuentes son: tos, disnea y una menor tolerancia al ejercicio. Según se agrava la enfermedad aparecen síncope, hemoptisis y pérdida de peso, aún con buen apetito (Knight, 1994; Gómez et al., 1999; Polizopoulou et al., 2000; Couto y Nelson, 2000). La epistaxis asociada a trombocitopenia puede presentarse en perros con enfermedad arterial pulmonar grave y complicaciones tromboembólicas (Ettinger y Feldman, 2007).

La forma más frecuente de presentación del síndrome de vena cava es la aparición brusca de un choque cardiogénico con taquicardia, taquipnea, disnea y colapso. En el examen cardiovascular de estos perros se aprecia pulso yugular sistólico, soplo de insuficiencia tricuspídal y a veces taquicardia supraventricular. La aparición brusca de hemoglobinuria, bilirrubinuria y debilidad, deben ser siempre sospecha de una dirofilariosis con síndrome de vena cava, únicos hallazgos físicos que pueden considerarse patognomónicos de la dirofilariosis (Malik et al., 1998, Kittleson y Kienle, 2000; Hoch y Strickland, 2008a). El síncope también se atribuye a una isquemia cerebral (Barriga, 2002).

Zoonosis

Los hospedadores humanos pueden ser infectados igualmente que los hospedadores caninos por la picadura de un mosquito que lleva la larva en el tercer estadio (Orihel y Eberhard, 1998, Ahid et al., 1999, Lai et al., 2001). Debido a que el hombre es un huésped accidental, el parásito no puede madurar hacia la adultez y se presenta en una forma filarial como un nódulo subcutáneo o pulmonar. Dicha larva frecuentemente es destruida por la respuesta inmune del humano, no obstante en algunos casos los gusanos preadultos pueden emigrar hacia el corazón (Gershwin et al., 1974; Green et al., 1994, Gamble et al., 1998).

La lesión característica de una dirofilariasis es un nódulo solitario en el pulmón con forma de moneda, de 1 a 3 cm de diámetro, aunque en algunos casos han sido observadas múltiples lesiones nodulares (Sako et al., 2000, Bielawski et al., 2001). La mayoría de las infecciones se han presentado en

personas adultas y los síntomas que se presentan más comúnmente son: tos, dolor en el pecho, hemoptisis, fiebre y escalofríos (Calvert y Rawlings, 1993; Echeverri et al, 1999; Theis et al, 2001).

Se ha reportado detección serológica de anticuerpos contra dirofilariasis, pero con baja sensibilidad y especificidad (Bielawski et al., 2001). Y aunque en la mayoría de los casos es una enfermedad benigna, tiene una gran importancia por ser una zoonosis parasitaria y por la rapidez de afección a mayor cantidad de individuos (Orihel y Eberhard, 1998).

Diagnóstico

No existen en la dirofilariosis signos clínicos que pueden considerarse patognomónicos, por lo que el diagnóstico clínico solamente tiene valor presuntivo, aunque puede ser suficiente en caso de síndrome de vena cava o hemoglobinuria dirofilarial. Es frecuente que la enfermedad se curse incluso de forma asintomática, diagnosticándose la infección, en muchos casos, por observación post-mortem de los vermes en arteria pulmonar y corazón derecho (Labarthe et al., 2003). Ante una sospecha de dirofilariosis la detección de microfilarias en muestras hemáticas y su identificación así como la detección de antígenos y/o de anticuerpos en muestras séricas en casos de amicrofilaremia al igual que la utilización de técnicas moleculares, son las pautas que se deben seguir para llegar al diagnóstico (Bowman, 2009).

Técnicas clínicas

Son un grupo de pruebas que, realizándose de forma individual o en conjunto, son útiles para detectar la presencia de la enfermedad. Algunas de

estas técnicas también pueden ayudarnos a conocer el estado general del paciente con el fin de instaurar el tratamiento que más se acerque de acuerdo a las necesidades clínicas (Frank et al., 1998; Gómez et al., 1999; Kittleson y Kienle, 2000; Simón, 2001).

Imagenología

El grado de alteración cardiopulmonar del paciente puede determinarse por imagenología pero los cambios que se observan pueden ser transitorios y no indicar una enfermedad activa. Se deben de evaluar los signos radiológicos y ecográficos que se observan como consecuencia de los cambios producidos por la acción de los parásitos adultos sobre los tejidos cardíacos y pulmonares en los cuales están alojados (Gómez et al., 2006).

Aunque la radiología no es una prueba altamente sensible ni específica, ya que no es posible observar los parásitos, sino los cambios ocasionados en el huésped, si es de mucha ayuda, pues permite la evaluación del estado cardiopulmonar del paciente, el cual es útil para dar un pronóstico certero. Esta prueba provee el método más objetivo para evaluar la severidad y grado de afección cardiopulmonar secundario a la presencia del parásito (Hoover et al., 1996a, Graham et al., 2012). Para la realización de radiología es necesario tomar 3 proyecciones de tórax: dorsoventral (DV), ventrodorsal (VD) y laterolateral (LL). Los hallazgos típicos y más frecuentemente encontrados son el agrandamiento y "tortuosidad" de las arterias pulmonares lobares (particularmente las caudales) y sus ramas interlobares así como el aumento del tamaño del corazón anterior, también llamado "signo de media luna". Se

puede observar agrandamiento de la arteria pulmonar principal, además de patrones radiográficos del parénquima pulmonar alterados (Thrall, 2003).

La ecocardiografía es una de las pruebas diagnósticas más sensibles, detectando la enfermedad en un 90% de los casos debido a que el cuerpo del parásito adulto es altamente ecogénico y produce una imagen clara y distintiva de éste. Esta prueba provee evidencia definitiva de la infección, además de ser capaz de permitir la evaluación de la anatomía cardíaca, así como las consecuencias funcionales de la enfermedad (Borgarelli et al., 1997; Goggin et al., 1997; Miller, 1999; Kittleson y Kienle, 2000; Hoch y Strickland, 2008a). Es muy útil para estimar el número de parásitos, la presencia de regurgitación tricúspide y la severidad de la hipertensión pulmonar. Se puede observar también dilatación de las cámaras cardíacas derechas así como de la arteria pulmonar principal (Thrall, 2003).

Electrocardiografía (ECG)

La electrocardiografía no es una prueba muy útil para el diagnóstico de este parásito, ya que al menos el 90% de los pacientes infestados presentan ECGs normales. Normalmente se afecta la arteria pulmonar al mismo tiempo estableciéndose un criterio de ECG para hipertrofia ventricular derecha. En otro 50% de tales perros se presenta falla cardíaca congestiva del lado derecho, así que la principal utilidad de un ECG es caracterizar una arritmia que puede ser auscultada. En algunos casos es posible encontrar desviación del eje eléctrico promedio a la derecha, isquemia miocárdica, y en ocasiones se detectan fibrilación atrial y complejos ventriculares prematuros, sobre todo después del tratamiento adulticida (Kittleson y Kienle, 2000). En pacientes con falla cardíaca

congestiva es común la presencia de complejos QRS monomórficos y ritmos rápidos que usualmente superan los 230 latidos por minuto, lo cual es sugestivo de fibrilación atrial, condición que normalmente acompaña el agrandamiento atrial (Hoch y Strickland, 2008a).

Hematología

Técnica auxiliar en el estudio de los componentes de la sangre así como de los trastornos estructurales y bioquímicos de estos elementos, causados por la enfermedad (Reagan et al., 1998). Este tipo de prueba es más recomendable para determinar el estado de salud del animal con el fin que otorgar un tratamiento adecuado, más que para conocer los cambios realizados por la presencia del parásito (Couto y Nelson, 2000).

En el hemograma se puede encontrar anemia no regenerativa, así como eosinofilia, basofilia y un leucograma inflamatorio crónico en general. Puede existir hiperproteinemia por hiperglobulinemia (Ettinger y Feldman, 2007).

La funcionalidad hepática y renal por pruebas bioquímicas; urea, creatinina, BUN, AST y ALT son las más adecuadas, pero en la mayoría de los casos, no se muestran cambios significativos (Gittelman et al., 1981).

Técnicas de microscopía

La demostración de las microfilarias de *D. immitis* en la sangre es el método más simple para diagnosticar la infestación por gusanos cardíacos. La extracción de sangre de venas periféricas es satisfactoria. Afortunadamente, la mayor parte de las infestaciones son patentes, y aquellas que se transforman en ocultas en general exhiben una variedad de aspectos clínicos y respuesta a las pruebas que ayudan a su identificación. No obstante un número importante

de casos no serán acertados si no se emplea en conjunto alguna otra técnica (Kittleson y Kienle, 2000, Simón y Genchi, 2001).

Aunque estas pruebas son las primeras en realizarse, por ser las más comunes, es importante mencionar que un 30% de los perros infectados no tienen microfilarias circulantes, a pesar de tener parásitos adultos, por lo que la negatividad en estas pruebas no descarta la presencia de la enfermedad (Datz, 2003).

Método de la gota de sangre gruesa

Por lo común, las microfilarias de *D. immitis* son numerosas y su movimiento se detecta con facilidad mediante este examen microscópico. A veces, cuando la cantidad de microfilarias es baja, es necesario teñir la gota de sangre con Giemsa para poder observar al parásito (Bowman, 2009). La prueba se realiza colocando una pequeña gota de sangre tomada de una vena periférica en un portaobjetos cubierto con un cubreobjetos. Enseguida se observa al microscopio a baja amplificación y es posible que se vea un movimiento circular de las microfilarias. Esta prueba es poco confiable, ya que la ausencia de microfilarias no significa ausencia de la enfermedad, pero es fácil de realizar, utilizando materiales comunes y además es económica (Cordero del Campillo, 1999).

Método del microcapilar (Test de Woo)

Es una prueba rápida y sencilla que permite realizar la detección en casos que presenten microfilarias circulantes. Para la realización de esta prueba se llena un microcapilar con sangre periférica. Después se centrifuga la muestra durante 5 minutos con el fin de diferenciar la zona flogística para

determinar la presencia de las microfilarias con la ayuda de un microscopio de luz convencional (Ferrer et al., 2002). El inconveniente de este método es que no se puede diferenciar entre las microfilarias de *Dirofilaria immitis* y alguna otra filaria y es por esto que las muestras positivas tienen que ser sometidas a un examen morfológico y biométrico para su diferenciación (Simón, 2001). Si el paciente no ha sido sometido a algún tratamiento microfilaricida, la especificidad y sensibilidad de esta prueba es de 90% y 89% respectivamente (Bautista, 2001).

Método de Knott modificado (Técnica de sedimentación)

Esta prueba hemoliza los glóbulos rojos y concentra los glóbulos blancos y las microfilarias. Se basa principalmente en un proceso de concentración de dirofilarias por centrifugado y además permite la realización de estudios de morfología del parásito. Consiste en mezclar 1 ml de sangre con 9 ml de formol al 2% lo cual se lleva a centrífuga a 1500 rpm durante 5 minutos. Se descarta el sobrenadante y se toma una muestra del sedimento el cual se tiñe con azul de metileno para poder realizar el diagnóstico de acuerdo a las características morfológicas y biométricas de las larvas. Este método presenta una sensibilidad del 90% pero es necesaria experiencia por parte de quien la realiza, ya que se necesita hacer una correcta identificación morfológica de las microfilarias (Boch y Supperer, 1982; Georgi y Georgi, 1994; Rodriguez y Cob, 2004; Quiroz, 2008).

Método del filtro microporo (Técnica de filtración)

La concentración por filtración de la sangre hemolizada se realiza a través de membranas de policarbonato de 3 a 5 mm de diámetro de poro

donde quedan retenidas las microfilarias (Georgi y Georgi, 1994; Gómez et al., 1999; Miller, 1999; Simón, 2001). La filtración es más ventajosa que la sedimentación cuando existen menos de 100 microfilarias por mililitro de sangre; además es un método de diagnóstico más rápido y de fácil lectura. Se emplea principalmente como un indicador de microfilaremia Sin embargo, la filtración provoca un acortamiento de las microfilarias lo que dificulta su identificación morfométrica (Ferrer et al., 2002; Rodriguez y Cob, 2004).

Técnicas serológicas

El alto grado de especificidad y sensibilidad de las técnicas serológicas actuales comparadas con otras técnicas diagnósticas han hecho que estas pruebas sean el principal método de identificación de la infección en perros (Graham et al, 2012). Originalmente, los estudios serológicos se basaban en la detección de anticuerpos contra *D. immitis*. El problema principal con estas técnicas surgió al ser menor su sensibilidad. En este sentido, existió una gran cantidad inaceptable de falsos positivos y reacciones cruzadas con helmintos intestinales (*Toxocara canis*, *Toxascaris leonina*, *Ancylostoma caninum* y *Uncinaria stenocephala*). Aunque por otra parte, los perros tratados frente a las microfilarias de *D. immitis* con ivermectina también resultaban positivos (Gómez et al., 2006).

Todo esto hizo posible que este tipo de pruebas hayan sido sustituidas por pruebas encaminadas a la detección de antígenos parasitarios en el suero. En contraste con las pruebas encaminadas a detectar anticuerpos, la detección de antígenos es mucho más específica y no se encuentran falsos positivos debidos al reconocimiento de antígenos (Graham et al., 2012).

El empleo de técnicas inmunodiagnósticas está recomendado en aquellos casos en que los animales presenten signos clínicos que hagan sospechar de la presencia de la enfermedad, pero que no se pueda poner en evidencia la presencia de microfilarias utilizando métodos microscópicos (Ettinger y Feldman, 2007). Las causas de la amicrofilaremia en presencia de adultos de *D. immitis* pueden ser por: localizaciones ectópicas de los vermes adultos que sucede cuando los adultos de *D. immitis* no migran al corazón o a la arteria pulmonar, localizándose en otros órganos del animal, infestaciones por vermes de un sólo sexo, infestaciones en período de prepatencia, infestaciones tratadas con fármacos microfilaricidas o infestaciones estériles debido a la respuesta inmunitaria del perro que produce anticuerpos frente a la liberación de microfilarias por la hembra, siendo esta última la verdadera dirofilariosis oculta y la eliminación de las microfilarias se produce por la captura de las larvas en los capilares pulmonares; sin embargo, los adultos situados en el corazón no sufren ningún daño (Frank et al., 1998; Dillon, 2000; Courtney y Zeng, 2001; Ferrer et al., 2002; Bazoocchi et al., 2008). Las técnicas inmunológicas, por su parte, también pueden dar lugar a falsos negativos, incluso en perros muy parasitados, debido a la alteración que en estos animales, sufre la respuesta inmune (Patton, 1991)

Inmunofluorescencia indirecta (IFA)

Se utiliza para detectar anticuerpos que reconozcan a los antígenos que se encuentran en la cutícula del parásito adulto. Esta técnica hace uso de dos anticuerpos; el anticuerpo primario es el que reconoce y se une al de la

molécula diana, mientras que el secundario que es el que se encuentra marcado con el fluoróforo, reconoce al primario y se une a él. Esta técnica es un poco más compleja, requiere más pasos y es posible que sufra interferencias, pero en contrapartida es mucho más flexible que una técnica directa y debido a que es posible que un anticuerpo primario se una a más de anticuerpo secundario, implica un efecto de amplificación que también aumenta la sensibilidad de la técnica. Posee una especificidad del 90% y una sensibilidad de 85.7% (Bautista et al., 2001).

Enzima inmuno análisis de absorción (ELISA)

Es la técnica más utilizada para detectar antígenos de los parásitos adultos hembra. Se considera 100% específica para dirofilariosis, pero su sensibilidad depende del sexo de los parásitos, la edad y cantidad de los mismos y por estas razones varía entre 89-92.5%. Esta prueba no detecta infestaciones por dirofilarias macho, ni infestaciones con hembras inmaduras menores a 7 meses. Existen actualmente diferentes kits comerciales que son fáciles de utilizar, tienen una lectura rápida y sencilla, pueden dar un pronóstico más certero y han sido ampliamente distribuidos y utilizados tanto en hospitales de enseñanza como en clínicas privadas (Hoover et al., 1996a; Gómez et al., 1999; Kittleson y Kienle, 2000; Ferrer et al., 2002). Para obtener resultados fiables y reproducibles, las pruebas de antígeno deben realizarse en estricto cumplimiento de las instrucciones del fabricante. La exactitud de todas las pruebas del parásito del corazón en condiciones de campo se ve influenciada por el cumplimiento de las instrucciones, el almacenamiento y la manipulación del equipo de prueba y la muestra. Esto ha sido simplificado para varias

pruebas que utilizan dispositivos que minimicen el número de pasos y parcialmente “automatizan” el procedimiento. Aún así, resultados falsos negativos y falsos positivos pueden ocurrir (Roth, 1993).

La intensidad del color de un resultado positivo de la prueba de antígeno no puede ser utilizada para determinar el nivel de carga de gusanos. La cantidad de antígeno en circulación tiene un efecto directo, pero impreciso en la relación con el número de adultos del parásito del corazón hembras (Ranjbar et al., 2007). La utilidad de ELISA para evaluar el grado de parasitismo se ve limitada por complicaciones de confusión tales como el aumento transitorio de la antigenemia asociado con la muerte del gusano reciente, a bajos niveles de antígeno de las infecciones de gusanos adultos jóvenes y/o a la presencia de sólo unas pocas hembras adultas. Por lo tanto, el análisis cuantitativo de los resultados de antígenos es muy especulativo y requiere una correlación con otros datos relevantes (Sánchez et al., 2006).

Técnicas moleculares

Estas técnicas pueden poner en evidencia la presencia del parásito a través de la detección del DNA de éste. La principal ventaja de estas técnicas reside en su extraordinaria sensibilidad; una sola microfilaria en la muestra es suficiente para dar lugar a un resultado positivo (Gioia et al., 2010).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Es una técnica que permite la detección directa de fragmentos del genoma, tanto en tejidos o células aisladas, como en fluidos biológicos. La importancia del PCR reside en su capacidad para amplificar ADN (ya sea puro o

impuro, esté entero o fragmentado) por un método de proliferación químico. De esta manera es posible amplificar secuencias de DNA específicas (de un tamaño comprendido entre 50 a 2.000 pares de bases) más de un millón de veces en sólo unas pocas horas (Lee et al., 2007; Giogia et al., 2010; Vezzani et al., 2011).

Este método fue descrito por Mullis en 1984. Consiste en copiar repetidamente un determinado fragmento de ADN que se encuentra flanqueado por una determinada secuencia de nucleótidos. Para ello es necesaria la intervención de una enzima, ADN polimerasa, que a partir de una secuencia molde y en presencia de unos cebadores que indicarán la región de comienzo, es capaz de fabricar la cadena complementaria a dicha cadena en dirección 5'-3' (Rishniw et al., 2006).

Los cebadores consisten en secuencias, normalmente de 17 a 22 nucleótidos, complementarios al extremo 5' de cada cadena del fragmento de ADN dejando libre el extremo 3' donde la polimerasa se encargará de ir incorporando los nucleótidos complementarios a la cadena molde (Lee et al., 2007).

La prueba de PCR ha mostrado una alta sensibilidad para detectar los gusanos en sangre de de la especie *D. immitis*. También son satisfactorios los resultados en cuanto a la detección del parásito en los mosquitos de las especies *Aedes albopictus*, *Aedes aegypti* y *Culex pipiens* (Dantas-Torres, 2012).

Tratamiento

Debido a la complejidad de la enfermedad, se ha dividido el tratamiento en dos tipos: médico y quirúrgico. El principal objetivo es mejorar la condición clínica del animal y eliminar en su mayor posible todas las etapas larvarias del parásito, con las mínimas complicaciones que puedan originarse (Knight, 1994; Polizopoulou et al., 2000; Graham et al., 2012).

Médico

En animales con infecciones patentes, se procede generalmente eliminando los vermes adultos y posteriormente las microfilarias circulantes, pero se ha demostrado que los efectos tóxicos de los fármacos arsenicales son más severos en animales con alta microfilaremia (Rawlings et al., 1993 Dillon, 2000; Rawlings et al., 2001).

Adulticida

La Administración de Alimentos y Fármacos (FDA), sólo ha aprobado dos fármacos para su utilización como adulticidas: la tiacetarsemida sódica y el dihidroclorhidrato de melarsomina (Knight, 1994; Hampshire, 2005).

La tiacetarsemida sódica es un compuesto orgánico perteneciente al grupo de los fenilarsenoidales. Produce efectos variables, toxicidad frecuente y efectos colaterales potencialmente graves. El mecanismo exacto del efecto adulticida no ha sido determinado (Hoch y Strickland, 2008b). Se administra mediante inyecciones endovenosas estrictas de 2.2 mg/kg, a intervalos de 6 a 8 horas durante 2 días. Con este sistema los parásitos se van destruyendo

paulatinamente evitando complicaciones tromboembólicas (Kittleson y Kienle, 2000; Rosa et al., 2000; Couto y Nelson, 2000). Se debe restringir el ejercicio al mínimo durante las 4 a 6 semanas siguientes al tratamiento y deben ser observados durante 2 a 3 días para evaluar hepatotoxicidad. (Graham et al., 2012).

El dihidroclorhidrato de melarsomina es un fármaco organoarsenical trivalente y tiene que reconstituirse. Puede conservar su estabilidad sólo durante 24 horas si se mantiene refrigerado y en la oscuridad. Se administran dos dosis de 2.5 mg/kg por vía intramuscular profunda en los músculos epiaxiales de la región lumbar entre L3 y L5, separadas por 24 horas; cada dosis se administra alternando de lado. Hay que mantener presión digital sobre el punto de inyección durante uno o dos minutos. Esta posología consigue que alrededor del 76% de los perros tratados sean negativos a las pruebas de antígenos en 4 meses (Rawlings y Calvert, 1997; Dillon, 2000; Gómez et al., 2006).

Microfilaricida

Las lactonas macrocíclicas son los agentes de elección para el tratamiento microfilaricida aunque no están aprobados por la FDA para este uso. El único producto aprobado es el yoduro de ditiazanina que, generalmente, no está disponible. Por esta razón se incluye a todas las avermectinas dentro de las recomendaciones para el tratamiento microfilaricida (Blagburn, 1994; Hoch y Strickland, 2008b).

La ivermectina puede administrarse a dosis preventiva de 6 µg/Kg inmediatamente después del tratamiento adulticida (Bowman y Lynn, 1994;

Knight, 1994; Miller, 1999; Dillon, 2000; Kittleson y Kienle, 2000). El número de microfilarias se reduce paulatinamente hasta llegar prácticamente a cero en unos 6 a 12 meses. Es importante considerar la toxicidad que puede presentarse en algunos perros de raza Collie a partir de dosis de 100 mg/kg (Rawlings et al, 2001).

La milbemicina es un macrólido al igual que la ivermectina y sólo se comercializa para la prevención de la dirofilariosis. A la dosis profiláctica de 0.5 mg/kg también tiene acción microfilaricida (Grieve et al., 1991; Blagburn, 1994; Knight, 1994). Las ocasionales reacciones adversas son debidas a la respuesta por la muerte de gran cantidad de microfilarias y son raros los efectos por toxicidad del fármaco, salvo en el caso de ciertos perros de raza Collie (Plumb, 2011).

Quirúrgico

Esta técnica está indicada en pacientes con síndrome de la vena cava, en aquellos que se ha observado un gran número de parásitos en la arteria pulmonar mediante una ecocardiografía y en los que es posible acceder a los vermes en la aurícula derecha y venas cavas (Miller, 1999; Couto y Nelson 2000).

El procedimiento se realiza con el animal en decúbito lateral, con anestesia general o sedado más anestesia local. Se aísla la vena yugular derecha distalmente en el surco yugular cervical caudal, colocando una ligadura en el lado craneal de la vena hasta realizar su incisión. Se pueden utilizar como herramienta de extracción una pinza recta de cocodrilo de 20 a 40 cm de

diámetro fino. Se introduce el artefacto lentamente guiándose mediante fluoroscopia, para facilitar el paso por la entrada del tórax se extiende el cuello y a la altura de la base del corazón se dirige el instrumento en orientación medial. Una vez introducidas, se extraen los vermes repitiendo el proceso hasta hacer 5 o 6 intentos fallidos. Es de suma importancia en la operación el evitar la fragmentación de vermes. Tras la extracción se liga la vena yugular distalmente y se efectúan las suturas cutáneas y subcutáneas de rutina (Atkins, 1994; Kitagawa et al., 1998, Gómez et al., 1999). La eliminación de parásitos tiene una efectividad de entre el 80 y el 100% y las lesiones en las estructuras cardiovasculares son mínimas (Kittleson y Kienle, 2000).

Prevención y control

Todos los perros susceptibles de regiones endémicas deben considerarse en riesgo y deben ponerse en programas de vigilancia y profilaxis. En perros adultos, la prevención de la dirofilariosis se realiza básicamente con quimioprofilaxis, mediante dietilcarbamacina o con avermectinas. En cachorros, puede iniciarse cualquiera de estas medicaciones entre los 6 y los 8 meses de edad y en áreas endémicas se comienza al mismo tiempo que reciben su inmunización (Dzimianski, 1994; Rawlings y Calvert, 1997).

En regiones no endémicas, no es recomendable la administración de profilácticos hasta que se establezca la enfermedad, deben realizarse controles frecuentes para determinar si se está o no instaurando en la zona. Cualquier perro que pase de una zona no endémica a una endémica debe recibir tratamiento preventivo (Kittleson y Kienle, 2000). En los trópicos, el potencial de transmisión se extiende durante todo el año, pero en la mayoría de las regiones

templadas se restringe a ciertas épocas del año. No obstante, muchos propietarios prefieren seguir con la administración mensual, ya que les resulta más fácil que interrumpirla y volverla a retomar cada vez (Bowman y Lynn, 1999; Dzimianski, 1994). La administración apropiada durante la estación de transmisión previene constantemente la infección con *D. immitis* (Song et al., 2002). Las dirofilarias no se multiplican in situ, por lo tanto, si la infección se previene, el número de parásitos permanecerá inalterado hasta una próxima infección natural; el uso seguro de drogas quimioprolácticas no se ve afectado por la presencia de adultos (Knight, 1994).

El control de la transmisión en el ámbito de vector es casi imposible, la única medida eficaz de control ha sido administrar drogas quimioprolácticas a los hospedadores definitivos. La dirofilariosis sigue siendo endémica en los lugares donde se ha podido controlar la malaria, debido al número de mosquitos capaces de transmitir la dirofilariosis (Barriga, 2002; Bowman y Lynn, 1999). La prevención del establecimiento de la dirofilariosis en una región no endémica es prácticamente imposible, ya que las poblaciones de perros salvajes se infectan de forma simultánea o antes que los perros domésticos cuando la dirofilaria invade una zona. Del mismo modo, es imposible erradicar la dirofilariosis de una región debido a la escasa colaboración de algunos propietarios, a los perros salvajes y a la población residente de coyotes y zorros infectados (Kittleson y Kienle, 2000).

OBJETIVOS

Objetivo general

Detectar molecularmente *Dirofilaria immitis* en perros y mosquitos en Mexicali, Baja California, así como estimar la concordancia entre 2 pruebas diagnósticas para dirofilariosis.

Objetivos específicos

1. Detectar mediante PCR *D. immitis* en sangre de perros en la zona urbana de Mexicali, Baja California.
2. Detectar mediante PCR *D. immitis* en mosquitos de una zona rural en Mexicali, Baja California.
3. Detectar mediante ELISA *D. immitis* en suero de perros en la zona urbana de Mexicali, Baja California.
4. Secuenciar las muestras detectadas como *D. immitis* en sangre de perros y en mosquitos.
5. Evaluar la concordancia entre una prueba molecular y una prueba serológica con las muestras de sangre de perros.
6. Evaluar la concordancia entre dos pruebas serológicas, una con ELISA para perro y otra con ELISA para gato.
7. Identificar a las especies de vectores potenciales de *D. immitis* en una zona rural de Mexicali, Baja California.
8. Determinar la abundancia relativa de las especies de mosquitos en el periodo de muestreo.

HIPÓTESIS

Existe *Dirofilaria immitis* en perros y en mosquitos en Mexicali, Baja California y hay una fuerza de concordancia sustancial entre las 2 pruebas diagnósticas para Dirofilariosis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este proyecto se llevó a cabo en el Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias (IICV) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) ubicado en la zona rural del Fraccionamiento Campestre en la ciudad de Mexicali, Baja California, México y se localiza en las coordenadas 32° 34' 10.4" latitud norte y 115° 27' 3.7" latitud oeste. La ciudad se destaca a nivel nacional por registrar, en período de verano, las temperaturas más altas en todo México, teniendo así un clima desértico cálido con una temperatura máxima registrada de 52° C y una mínima de -8° C (INEGI, 2010).

Los sujetos muestreados en este estudio incluyeron: i) sangre de 384 perros y ii) mosquitos hembras capturadas en una zona de estudio específica. La duración del estudio fué de 12 meses y se realizó en el periodo del 6 de Septiembre del 2012 al 5 de Septiembre del 2013. Los análisis de las muestras se llevaron a cabo en el Laboratorio de Salud Pública Veterinaria, el Laboratorio de Biología Molecular y el Laboratorio de Parasitología del IICV.

Tipo de estudio:

Se realizó un estudio epidemiológico observacional transversal por conveniencia para detección de *Dirofilaria immitis*.

Tamaño de la muestra:

El tamaño de muestra para detección se realizó considerando los siguientes valores: un nivel de significancia de 95%, un nivel de prevalencia del 3%, un tamaño de la población de 20 000 y una sensibilidad del 99% resultando en un tamaño de muestra de 78 animales.

Análisis estadístico:

Para el análisis de la concordancia entre las dos pruebas diagnósticas se utilizó el coeficiente kappa de cohen con el programa SAS (Statistical Analysis Software). El cálculo del rango mínimo de infección en los mosquitos se realizó con el programa de Excel “add-on pooled Inf Rate versión 3.0” siguiendo las indicaciones de Biggerstaff (2006).

Criterios de inclusión y exclusión

Se consideró cualquier animal igual o mayor a 6 meses de edad, de cualquier raza y sexo atendidos en cualquiera de las 60 clínicas veterinarias participantes en el estudio. Muestras sanguíneas hemolizadas o insuficientes fueron excluidas del estudio.

Zona de captura de mosquitos

Se realizó la captura de mosquitos hembras en el IICV, el cual tiene proximidad a núcleos urbanos y a zonas agrícolas en todo su alrededor. El muestreo fue realizado una vez por semana durante 2 horas, en las fechas anteriormente mencionadas, con la ayuda de un tubo de aspiración en áreas de descanso de los mosquitos que fueron previamente identificadas. Cada mosquito muestreado se identificó de acuerdo a una guía aprobada por autoridades sanitarias en México (Meyer y Dhillon, NOM-032-SSA2-2002) y posteriormente se agruparon por especie en tubos de eppendorf (con un mínimo de 1 mosquito y un máximo de 10) con el fin de realizar la extracción de ADN y llevar a cabo la prueba de PCR. Debido al sostenido esfuerzo de muestreo y al hecho de que los métodos de obtención de mosquitos no fueron

selectivos para algunas especies, fue posible determinar la abundancia relativa de cada una de las especies de mosquitos en todo el año.

Origen de las muestras sanguíneas de perros

Para el análisis con las pruebas serológicas se escogieron aleatoriamente 384 muestras y para el análisis con la prueba de PCR fueron en total 78 muestras. Éstas fueron obtenidas de un banco de sueros de un proyecto anterior realizado en el periodo de Enero del 2005 a Diciembre del 2006.

Diagnóstico serológico en sangre de perros

Se utilizó el kit IDEXX SNAP® 4Dx® plus Test que utiliza el empleo de antígenos purificados proporcionando una sensibilidad de hasta 94.8% y una especificidad de 100% (Ferrer et al., 2002). La técnica consistió en la colocación de 3 gotas de suero junto con 4 gotas de conjugado (incluido en el kit) en un vial de plástico de 1.5 ml con tapa desechable. Después se procedió a invertir con cuidado el vial de muestra en 4 o 5 ocasiones para homogenizar. Todo el contenido obtenido se vertió en el pocillo de muestra de un dispositivo IDEXX SNAP® 4Dx® plus y una vez que el color azul empezó a aparecer en el círculo de activación, fue presionado firmemente el dispositivo para activar. Posteriormente se dejó transcurrir un tiempo de 8 minutos y se realizó la lectura de los resultados. Cualquier aparición de color azul en el punto del cuadrante derecho después de la aplicación de la muestra indicó la presencia de antígenos de *Dirofilaria immitis*, es decir, un resultado positivo. Un resultado negativo estuvo indicado por la producción de color solo en el punto de control positivo, situado en el cuadrante superior izquierdo. Un resultado inválido se

mostró cuando no se produjo color alguno en el punto de control del dispositivo (IDEXX, 2011).



Fig. 4. Dispositivo IDEXX SNAP® 4Dx® positivo a *Erlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum* y *Dirofilaria immitis*.

Para evaluar la concordancia entre las pruebas de diagnóstico serológicas, las muestras antes mencionadas fueron sometidas a un estudio posterior con el kit de IDEXX SNAP® prueba para el gusano del corazón felino, que utiliza el empleo de antígenos purificados proporcionando una sensibilidad de hasta 87.5% y una especificidad de 100%. La técnica consistió en la colocación de 2 gotas de suero junto con 5 gotas de conjugado (incluido en el kit) en un vial de plástico de 1.5 ml con tapa desechable. Después se procedió a invertir con cuidado el vial de muestra entre 3 a 5 ocasiones para homogenizar. Todo el contenido obtenido se vertió en el pocillo de muestra de un dispositivo

IDEXX SNAP® prueba para el gusano del corazón felino y una vez que el color azul empezó a aparecer en el círculo de activación, se presionó firmemente el dispositivo para activar. Posteriormente se dejó transcurrir un tiempo de 10 minutos y se procedió a realizar la lectura de los resultados. Cualquier aparición de color azul en el punto del cuadrante derecho o en el del cuadrante izquierdo después de la aplicación de la muestra indicó la presencia de antígenos de *D. immitis*, es decir, un resultado positivo. La intensidad de color es proporcional a la concentración de antígeno de filaria en la muestra. Un resultado negativo estuvo indicado por la producción de color solo en el punto de control positivo, situado en el cuadrante medio superior. Un resultado inválido se mostró cuando no se produjo color alguno en el punto de control del dispositivo (IDEXX, 2011).



Fig. 5. Dispositivos IDEXX SNAP® prueba para el gusano del corazón felino negativo (izquierda) y positivo (derecha).

Diagnóstico molecular en sangre de perros y en mosquitos

La detección de *Dirofilaria immitis* en sangre de perros y en mosquitos por PCR se realizó con los iniciadores “Diro F” y “Diro R” (Watts *et al.*, 1999; Liu

et al., 2005; Lee *et al.*, 2007) los cuales presentan un fragmento final de 440 pares de bases (pb) con la siguiente secuencia:

Diro F (5´ - GCA TCT TAG AAC TTG GTC CAT CC -3´)

Diro R (5´ - CCA AGG ATT TAC CGC CAC -3´)

Extracción de ADN en mosquitos

Se realizó con el kit de Qiagen® y la guía “DNeasy® Blood & Tissue Handbook”, siguiendo el protocolo de “purificación de ADN total a partir de tejidos de animales” que se explica a continuación: los mosquitos agrupados por especie se maceraron con la ayuda de un mortero para lograr la destrucción de su exoesqueleto. El contenido se vació en un tubo de 1.5ml y se añadieron 180 µl de búffer ALT y 20 µl de proteinasa K. Se mezcló con vórtex durante 5 segundos y se incubó a 56°C durante 3 horas. Una vez transcurrido el tiempo, se mezcló nuevamente en vórtex por 15 segundos y se agregaron 200 µl de Búffer AL. Se mezcló con vórtex durante 15 segundos y se incubó a 70°C durante 10 minutos más. Después se centrifugó la muestra a fuerza máxima durante 5 segundos, se agregaron 200 µl de etanol al 96% y se mezcló en vórtex durante 10 segundos. El contenido obtenido fue trasladado a una columna mini giro (incluida en el kit) que fue colocada en un tubo de 2ml; se centrifugó a 8000rpm por 1 minuto y se desechó el tubo de 2ml. La columna fue colocada en un nuevo tubo de 2ml y se agregaron 500 µl del Búffer AW1, se centrifugó nuevamente a 8000rpm por 1 minuto y fué desechado nuevamente el tubo de 2ml. La columna se colocó en un tubo de 2ml y se agregaron 500 µl del Búffer AW2, se centrifugó la mezcla a 14000rpm por 3 minutos, se desechó el tubo de colección, se colocó en un nuevo tubo y se centrifugó nuevamente a

14000rpm durante 1 minuto. Se dejó la columna de 3-5 minutos al aire con la tapa abierta. La columna mini giro fue colocada en un tubo de eppendorf de 1.5ml y se agregaron 150µl de agua grado molecular libre de ADNasa y ARNasa directamente en la membrana de la columna. Se dejó incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto y finalmente se centrifugó a 8000rpm durante un minuto para eluir. El ADN obtenido fue congelado a -20 hasta el momento de su utilización en la prueba de PCR.

Extracción de ADN en sangre de perros

Se realizó con el kit de Qiagen® y la guía “DNeasy® Blood & Tissue Handbook”. Debido a que la extracción fue realizada a partir del coágulo y no de la sangre fresca se utilizó el protocolo de “purificación de ADN total a partir de tejidos de animales” que se explica a continuación: Se cortaron 25 mg del coágulo y se vació a un tubo de 1.5ml en pequeños pedazos. Se añadieron 180 µl de búffer ALT y 20 µl de proteinasa K. Se mezcló con vórtex durante 5 segundos y se incubó a 56°C durante 18 horas. Una vez transcurrido el tiempo, se mezcló nuevamente en vórtex por 15 segundos y se agregaron 200 µl de Búffer AL. Posteriormente se agregaron 200 µl de etanol al 96% y se mezcló en vortex durante 10 segundos. El contenido obtenido fue trasladado a una columna mini giro (incluida en el kit) que fue colocada en un tubo de 2ml; se centrifugó a 8000rpm por 1 minuto y se desechó el tubo de 2ml. La columna fue colocada en un nuevo tubo de 2ml y se agregaron 500 µl del Búffer AW1, se centrifugó nuevamente a 8000rpm por 1 minuto y fué desechado nuevamente el tubo de 2ml. La columna se colocó en un tubo de 2ml y se agregaron 500 µl del

Búffer AW2, se centrifugó la mezcla a 14000rpm por 3 minutos y se desechó el tubo de 2ml. La columna mini giro fue colocada en un tubo de eppendorf de 1.5ml y se agregaron 200 µl del Búffer AE directamente en la membrana de la columna. Se dejó incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto y finalmente se centrifugó a 8000rpm durante un minuto para eluir. El ADN obtenido fue congelado a -20 hasta el momento de su utilización en la prueba de PCR.

Ensayo de PCR en sangre de perros y mosquitos

La amplificación del PCR se realizó con la mezcla maestra PROMEGA, la cual resulta en un volumen total de 50 µl conteniendo: 25 µl de 2x HSTMM, 18 µl de H₂O molecular, 5 µl de la muestra de ADN y 1 µl de cada iniciador diluidos a 20 pmol. El perfil térmico utilizado fue iniciado con un calentamiento de 95° C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturalización de 94° C por 40 segundos, hibridación de 55° C por 40 segundos y extensión de 72° C por 40 segundos. Después de los 40 ciclos, hubo una extensión adicional de 72° C por 7 minutos. Posteriormente, para la visualización de resultados, se realizó una resolución electroforética de los productos amplificados en geles de agarosa al 1 % en una solución amortiguadora de tris-acetato EDTA (TAE) al 0.5% conteniendo el colorante de ácidos nucleicos GR Safe®, en lugar de bromuro de etidio. Después se visualizó debajo de luz U.V. para identificar los patrones específicos de la especie y determinar un resultado positivo o negativo (Watts *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2007). Las muestras positivas fueron enviadas a Laboratorios Eurofins MWG Operon en Estados Unidos para realizar la secuenciación. Para prevenir que las muestras se contaminaran, la

extracción del ADN, las preparaciones de PCR y la amplificación y detección de productos de PCR se realizaron en diferentes áreas del laboratorio (Simón y Genchi, 2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis molecular en sangre de perros y mosquitos

De un total de 98 muestras de sangre de perros que fueron evaluadas por la técnica de PCR, se obtuvieron 9 perros positivos como se muestra en la Figura 4. Los productos de PCR obtenidos se mandaron a secuenciar, resultando con una identidad del 100% con *Dirofilaria immitis*.

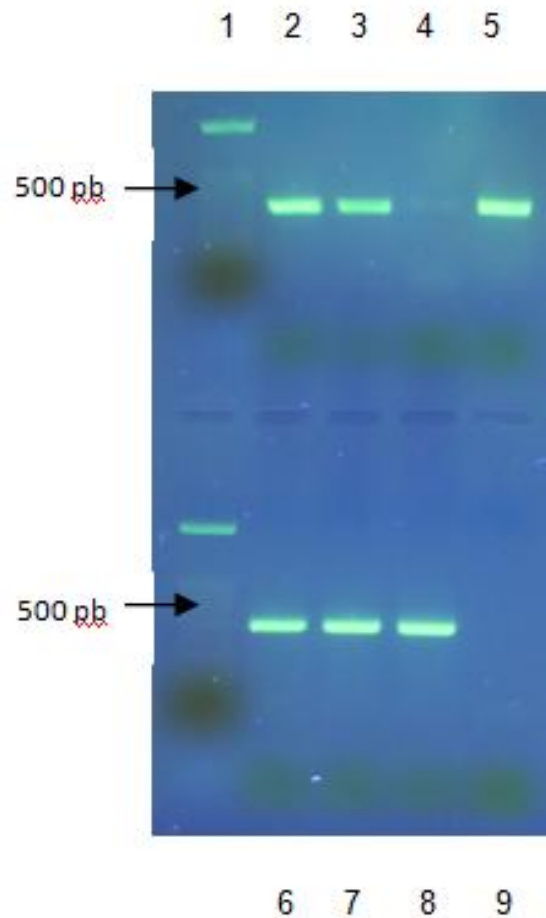


Fig. 6. Resultados de PCR en las 6 muestras de perros seropositivos. Línea 1. Marcador de peso molecular. Línea 2 a 7. Muestras de perros positivos a *D. immitis* con fragmentos de 440 pb. Línea 8. Control positivo. Línea 9. Control negativo.

Se analizaron 136 grupos de mosquitos mediante PCR, de los cuales 13 resultaron positivos (9.55%). En la figura 7 se observan los fragmentos de 440 pb encontrados en uno de los grupos por medio de la prueba de PCR.

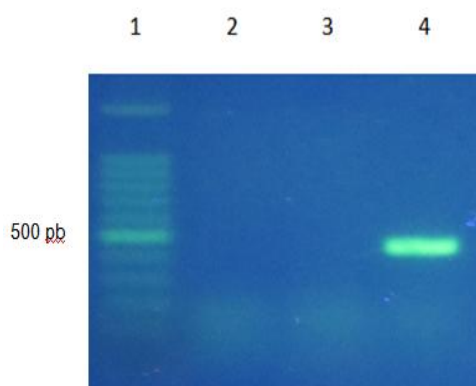


Fig. 7. PCR de dos muestras de ADN y un control negativo. Línea 1: Marcador de peso molecular. Línea 2 y 3: grupos de *P. columbiae* muestreados en Septiembre del 2012 negativos. Línea 4: Grupo de *P. columbiae* muestreado en Septiembre del 2012 positivo.

Los productos de PCR de los grupos positivos fueron secuenciados con una identidad del 100% a *D. immitis*.

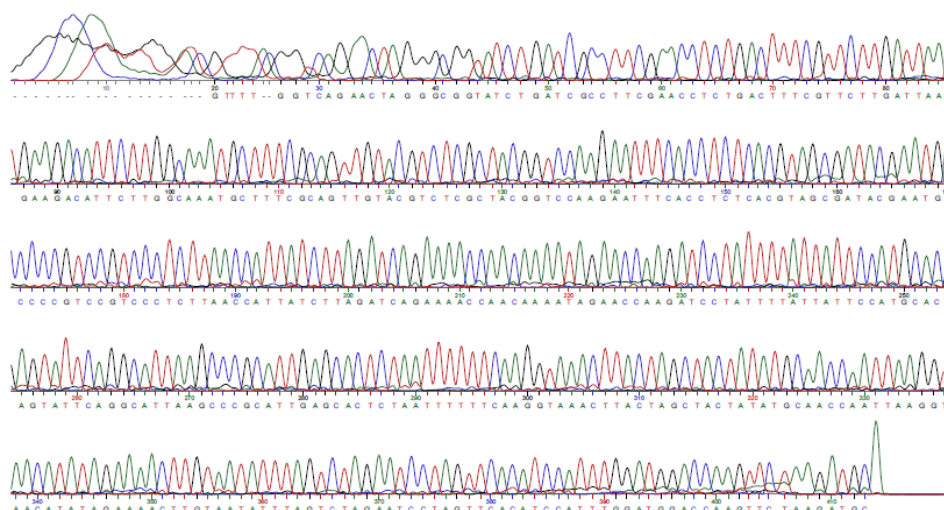


Fig. 8. Cromatograma de 415 pb obtenido como resultado de la secuenciación con identidad a *D. immitis*.

Los iniciadores utilizados en este estudio que fueron descritos anteriormente por Watts et al (1999), Liu et al. (2005) y Lee et al. (2007) mostraron un producto de 440pb específico del gen *ribosomal 16s* para *D. immitis* y fueron útiles para evaluar tanto a los perros infestados como a los vectores potenciales para la enfermedad.

Análisis serológico en sangre de perros

De un total de 384 muestras de suero, se obtuvieron 6 positivos a *D. immitis* con las pruebas serológicas de IDEXX SNAP® 4Dx® plus Test y IDEXX SNAP® prueba para el gusano del corazón felino, como se puede observar en el cuadro 1.

Cuadro 1. Resultados de serología con ambas pruebas de IDEXX SNAP® en muestras de 384 perros, donde se muestran los animales positivos, negativos, el porcentaje de positivos y la sensibilidad y especificidad de cada prueba

Prueba	+	-	TOTAL	% positivos	Se	Sp
SNAP® 4Dx® plus	6	378	384	1.56%	94.8%	100%
SNAP® gusano corazón felino	6	378	384	1.56%	87.5%	100%

Concordancia entre las pruebas diagnósticas

Se observó que la concordancia entre la prueba serológica y molecular fue sustancial siendo de 0.78 (I.C. 95% 0.54-1.00) tal como se indica en el cuadro 2. Debido a que no existió diferencia significativa en el uso de las dos pruebas se puede concluir que la decisión de cuál prueba utilizar para el diagnóstico de *D. immitis* dependerá del criterio del Médico Veterinario tratante y de variables como: tiempo, costo, equipo de laboratorio, estado de salud del animal, etc.

Cuadro 2. Concordancia entre PCR y ELISA para diagnóstico de dirofilariosis.

		ELISA		
PCR		-	+	
	-	69	3	72
	+	0	6	6
		69	9	78

En el caso de las pruebas serológicas IDEXX SNAP® 4Dx® plus Test y IDEXX SNAP® prueba para el gusano del corazón felino, la concordancia fue casi perfecta (Kappa= 1.00) como se indica en el cuadro 3.

Cuadro 3. Concordancia entre IDEXX SNAP® 4Dx® plus Test y IDEXX SNAP® prueba para el gusano del corazón felino en suero de perros.

		ELISA gato		
ELISA perro		-	+	
	-	378	0	378
	+	0	6	0
		378	6	384

Esto es un excelente indicador de que la prueba diseñada para gatos es igualmente efectiva que la prueba para perros y es posible utilizarla para el diagnóstico de la enfermedad en perros siempre y cuando se cuente con el dispositivo y materiales para llevar a cabo el diagnóstico.

De acuerdo a Bautista et al (2001) se estima que en los lugares donde la prevalencia de dirofilariosis canina es superior al 10%, en la población humana este valor se aproxima al 5%, pero al desconocerse la prevalencia de la enfermedad en perros de una región, se contribuye al sub diagnóstico en humanos. Es por eso de suma importancia la realización de pruebas diagnósticas que funcionen tanto en perros como en humanos.

Especies de vectores potenciales y abundancia relativa

El cuadro 4, muestra la distribución de mosquitos capturados por género y especie en el periodo de Septiembre 2012 a Septiembre 2013, donde se

puede observar que se capturaron un total de 903 mosquitos que pertenecen a 3 géneros distintos, encontrándose principalmente *Culex* (63.5%) seguido por *Psorophora* (30%).

Cuadro 4. Resultados de la recolección de mosquitos hembras

Género	Especie	No. mosquitos	Grupos	Porcentaje
<i>Culex</i>	<i>pipiens</i>	535	68	59.25%
	<i>tarsalis</i>	38	16	4.21%
	<i>erytrotorax</i>	1	1	0.11%
<i>Aedes</i>	<i>vexans</i>	56	18	6.20%
<i>Psorophora</i>	<i>columbiae/toltecum</i>	273	33	30.23%
TOTAL		903	136	100%

Estos resultados coinciden con los de Medina et al. (2008) en el que se encontró la presencia de los mosquitos de los mismos géneros en la misma zona de estudio, a excepción de que, el autor encontró además mosquitos de las especies *Aedes dorsalis* (0.43%) y *Culiseta inornata* (0.21%). Este hallazgo puede deberse a que el muestreo de este autor fue realizado en la tarde, a diferencia del presente estudio, que fue realizado en las mañanas. Además, la cantidad de mosquitos de las especies antes mencionadas, fue relativamente

baja, implicando que existe un número bajo de mosquitos de las mismas y por lo tanto, se dificulta su búsqueda y captura.

La abundancia relativa de las especies encontradas se puede observar en la figura 9. Se encontró que *C. pipiens* fué la especie más abundante y puede encontrarse en la mayoría de los meses del año y con mayor número de individuos en los meses de noviembre a julio, aunque se observó que la población disminuye drásticamente en los meses de mayor temperatura que son de agosto a octubre. Por el contrario, la especie de *P. columbiae/toltecum* se mostró ausente en los meses fríos, ya que su número aumentó en gran medida solamente en los meses de junio a septiembre, cuando la temperatura en la ciudad se encuentra en su rango más elevado. *C. tarsalis* fué también encontrado a lo largo del año, ya que a pesar de que se encontraban pocos individuos, se lograba de manera constante en cada muestreo desde el mes de noviembre hasta junio. La especie de *A. vexans* fué abundante en los meses de octubre a noviembre y de marzo a junio, es decir, en la época de otoño y primavera, pero estuvo ausente en las épocas de invierno y verano. El mosquito de la especie *C. erythrorax* se encontró en el mes de diciembre y debido a que solo fue un individuo no fue posible determinar su frecuencia relativa ni periodicidad.

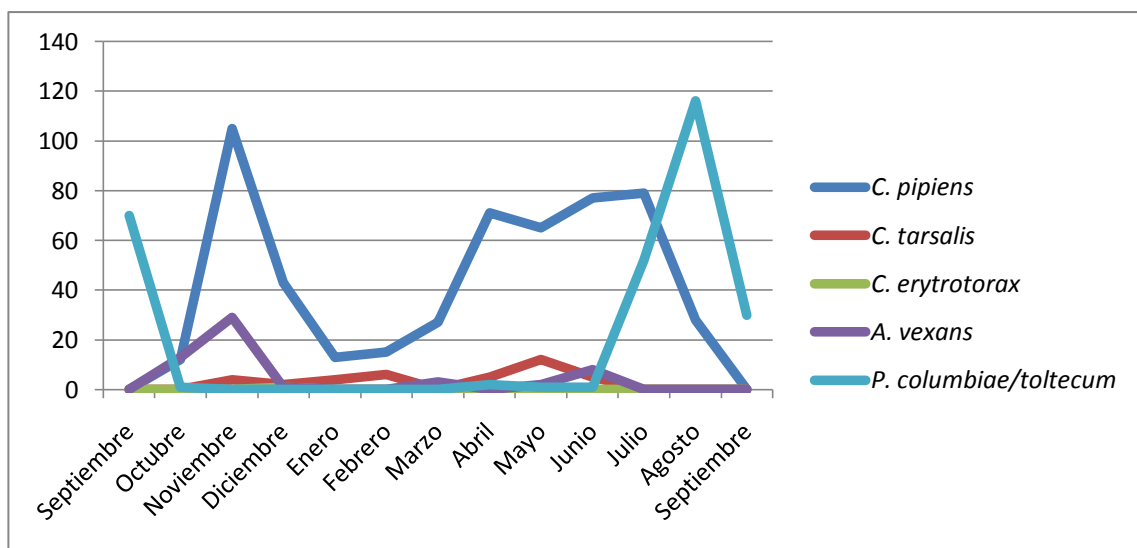


Figura 9. Abundancia relativa de especies de mosquitos por mes de muestreo en donde se observa la cantidad de mosquitos para cada una de las especies recolectadas en el periodo de septiembre del 2012 a septiembre del 2013.

Estos resultados coinciden también con los encontrados por Medina et al. (2008) ya que no se encontró diferencia significativa en la periodicidad de los mosquitos, lo cual nos indica que la abundancia relativa en estas especies se ha mantenido sin variación en estos últimos 7 años.

La Tasa Mínima de Infección (MFIR) que es una estimación del número de mosquitos en el entorno que está infestado con el parásito y se obtiene con el número de grupos de mosquitos infestados entre el total de mosquitos por especie multiplicado por 1000. En el cuadro 5 se observó entre los miembros del grupo de *C. pipiens* (5.61), *C. tarsalis* (26.32), *A. vexans* (53.57) y *P. columbiae/toltecum* (25.64) respectivamente.

Cuadro 5. Resultados del análisis de PCR para *Dirofilaria immitis* y de la MFIR.

Especie	No. Mosquitos	Grupos	Grupos positivos	MFIR
<i>C. pipiens</i>	535	69	3	5.61
<i>C. tarsalis</i>	38	16	1	26.32
<i>C. erytoratorax</i>	1	1	0	0
<i>A. vexans</i>	57	17	3	53.57
<i>P. columbiae/toltecum</i>	272	33	7	25.64
TOTAL	903	136	13	14.40

El MFIR es utilizado para calcular el rango de infección por cada 1000 mosquitos asumiendo que: solo existe un mosquito infectado por grupo muestreado y que a menudo grandes números de mosquitos están expuestos a la enfermedad. La tasa de picadura, que es el número de mosquitos que pican a un huésped por noche, dividido entre el MFIR proporciona el número estimado de picaduras con potencial infestante que el huésped recibe por noche, pero debido a que en el presente estudio esto no se investigó, no fue posible determinar esta tasa y evaluar a la población en riesgo potencial. En el estudio realizado por Lee et al. (2007) se encontró un MFIR en las especies de *A. vexans* y *C. pipiens* muy parecido al de este estudio, lo cual nos indica que si se encuentran las condiciones biológicas y medioambientales requeridas por el vector para su desarrollo, existe un potencial riesgo de infección zoonótico.

CONCLUSIONES

Se demostró que la concordancia entre el diagnóstico por PCR y ELISA fue sustancial (Kappa= 0.78) y entre las pruebas serológicas de IDEXX SNAP® 4Dx® plus Test y IDEXX SNAP® prueba para el gusano del corazón felino, fue casi perfecta (Kappa= 1.00).

En este estudio se demuestra que tanto en perros como en mosquitos de Mexicali se encuentra *Dirofilaria immitis* y considerando que es una enfermedad parasitaria potencialmente zoonótica, es importante realizar medidas de control y prevención de esta enfermedad en perros para que no repercutan en la salud humana.

Es importante concientizar a los propietarios del riesgo que implica no mantener medidas de control y prevención, sobre la salud de la mascota y consecuentemente en la de ellos. Adicionalmente, una detección y tratamiento temprano de esta enfermedad es importante por dos motivos: se disminuye el tiempo de patogenia y por ende el daño a los órganos involucrados y secundariamente, se disminuye el tiempo en que el perro actúa como reservorio.

Los Médicos Veterinarios de la zona rural y urbana de Mexicali no han establecido protocolos profilácticos para este tipo de situación, dejando una ventana abierta para el desarrollo de la dirofilariosis.

Un método para reducir el impacto de la dirofilariosis en la salud de los animales y el hombre es el reducir las poblaciones de mosquitos vectores a

través de la modificación del hábitat y el control químico de las larvas y los adultos, además del tratamiento en animales domésticos. Estos métodos deben ser considerados como parte del plan de prevención del gusano del corazón. Es de suma importancia realizar estudios epidemiológicos que incluyan tasas de infección más específicas así como la determinación de que las especies que se encontraron positivas en el área de estudio son capaces de transmitir la enfermedad a animales y humanos.

LITERATURA CITADA

- Aldaco, L.M. 1995. "Prevalencia de Dirofilariasis en la ciudad de Ensenada, B.C." Tesis. Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias. Universidad Autónoma de Baja California. Mexicali, BC.
- Adcock, J. L. 1961. "Pulmonary arterial lesions in canine dirofilariosis". Am. J. Vet. Res. 22: 655-662.
- Ahid S.M., Lorenço-de-Oliveira R. 1999. "Mosquitos vetores potenciais de dirofilariose canina na Regiao Nordeste do Brasil" Rev Saude Publica; 33:560-5.
- Atkins, C. E. 1994. "Síndrome de dirofilariosis de la cava". Terapéutica Veterinaria de Pequeños Animales. 11ª ed., Interamericana McGraw-Hill, Madrid. España.
- Barriga, O. O. 2002. "Las enfermedades parasitarias de los animales domésticos en la América Latina". Editorial Germinal, Santiago. Chile.
- Bautista, C.R., Arroyo, M.R., Velasco, O. C. y Canto, O.L. 2001. "Comparación de las pruebas quantitative buffy coat, frotis grueso de sangre y observación directa para el diagnostico de la infección por *Dirofilaria Immitis* en perros de tres zonas geográficas de México". Vet. Mex. 32(2): 153-156.
- Bielawski, B.C., Harrington, D. y Joseph, E. 2001. "A solitary pulmonary nodule with zoonotic implications". American College of Chest Physicians. 119: 1250-1252.
- Biggerstaff, B.J. PooledInfRate, Version 3.0: 2006. A Microsoft® Excel® Add-In to compute prevalence estimates from pooled samples. Centers for Disease Control and Prevention, Fort Collins, CO, U.S.A.

- Blagburn, B. L. 1994. "Microfilaricidal therapy: Review and update". Vet. Med. 89: 630-638.
- Boch, J., R.. 1982. "Parasitología en Medicina Veterinaria". Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires. Argentina.
- Bonagura. "Terapéutica Veterinaria de Pequeños Animales". 11^a ed., Interamericana McGraw-Hill, Madrid. España.
- Borchert, A. 1964. "Parasitología Veterinaria". Editorial Acribia, Zaragoza. España.
- Bowmna, D.D., Lynn, R.C. 1999. "Georgis' Parasitology for Veterinarians". 7th ed., W.B.Saunders, Philadelphia. USA.
- Bradley, T. J., Nayar, J. K. 1985. "Intracellular melanization of the larvae of *Dirofilaria immitis* in the Malpighian tubules of the mosquito, *Aedes sollicitans*". J. Invert. Pathol. 45: 339-345.
- Bradley, T. J., Sauerman, D. M., Nayar, J. K. 1984. "Early cellular response in the Malpighian tubules of the mosquito *Aedes taeniorhynchus* to infection with *Dirofilaria immitis*". J. Parasitol. 70: 82-88.
- Calvert AC, Rawlings AC. 1993. "Tratamiento de la dilofilariasis en el perro". Canine Practice; 18:110-6.
- Cancrini, G., Allende, E., Favia, G., Bornay, F., Anton, F., Simón, F. 2000. "Canine dirofilariosis in two cities of southeastern Spain". Vet. Parasitol. 92: 81-86.

- Cancrini, G., Matitucci, S., D'Amelio, S., Coluzzi, M. 1991. "Identification of *Dirofilaria* in man by multilocus electrophoretic analysis". Ann. Trop. Med. Parasitol. 5: 529-532.
- Carastro, S.M., Dugan, S.J., Paul, A.J. 1992. "Intraocular dirofilariasis in dogs". Compend. Contin. Educ. Pract. Vet. 14: 209-217.
- Chen, C. C., Chen, C. S. 1995. "*Brugia pahangi*: effects of melanization on the uptake of nutrients by microfilariae in vitro". Exp. Parasitol. 81: 72-78.
- Christensen, B. M., Sutherland, D. R.. 1984. "Defense reaction of mosquito to filarial worm: comparative studies on the response of three different mosquitoes to inoculated *Brugia pahangi* and *Dirofilaria immitis* microfilariae". J. Invert. Pathol. 4: 267-274.
- Cordero del Campillo, M., Vazquez, F.A y Martínez, F. 1999. Parasitología Veterinaria. McGraw-Hill. Madrid, España.
- Couto, G.C, Nelson, W.R. 2000. Medicina Interna de Animales Pequeños (2^{da} Edición). capítulo 10, Pag. 177-197. Intermédica. Buenos Aires, Argentina.
- Dantas-Torres, F. 2012. "Molecular xenomonitoring of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in mosquitoes from north-eastern Italy by real-time PCR coupled with melting curve analysis". Parasites and Vectors. 5:76.
- Dillon, R. 2000. "Dirofilariosis in dogs and cats". Textbook of veterinary internal medicine. Disease of the dog and cat. 5th ed., W. B. Saunders Company, Philadelphia. USA.
- Donahoe, J. M. R. 1975. "Experimental infection of cats with *Dirofilaria immitis*". J. Parasitol. 61: 599-605.
- Dzimianski, M. T. 1994. "Developing a heartworm prevention program". Vet. Med. 89: 545-550.

- Faust, E.C., Thomas, E.P., Jonea, J. 1941. "Discovery of human heartworm infection in New Orleans". J. Parasitol, 27: 115-122.
- Favia, G., Lanfrancotti, A., Della Torre, A., Cancrini, G., Coluzzi, M. 1996. "A PCR-based method to identify *Dirofilaria repens* and *D. immitis*". Parasitology, 113: 567-571.
- Ferrer, J.M., Árraga, C.M., Alvarado, M. y Sandoval, J.E. 2002. "Diagnóstico de Dirofilariosis canina: un estudio comparativo usando las pruebas de Elisa y de Woo". Revista Científica, FCV-LUZ. 2(5): 351-357.
- Forrester, D. J., Jackson, R. F., Miller, I. F., Clifford, B.T.. 1973. "Heartworms in captive California sea lions". J. Am. Vet. Med. Assoc. 163: 568-570.
- Frank, G. R., Mondesire, R. R., Brandt, K. S., Wisnewski, N. W. 1998. "Antibody to the *Dirofilaria immitis* aspartyl protease inhibitor homologue is a diagnostic marker for feline heartworm infections". J. Parasitol. 84: 1231-1236.
- Frank, JR., Nutter, F.B., Kyles, A.E., Atkins, C.E, Sellon, R.L. 1997. "Systemic arterial dirofilariosis in five dogs". J. Vet. Int. Med. II: 3189-3194.
- Gamble KC, Fried JJ, Rubin GJ. 1998. "Presumptive dirofilariosis in a pale-headed saki monkey (*Pithecia pithecia*)". J Zoo Wildl Med; 29:50-4.
- Genchi, C., Venco, L., Magnino, S., Di Sacco, B. 1993. "Aggiornamerto epiderniologico sulla filariosi del cane e del gano". Veterinaria. 7:5-11.
- Georgi, J. R., Georgi, M. E. 1994. "Parasitología en clínica canina". McGraw-Hill Interamericana, Atlampa. México.
- Gioia, G., Lecova, L., Genchi, M., Ferri., E. Genchi, C y Mortarino, M. 2010. "Highly sensitive multiplex PCR for simultaneous detection and

- discrimination of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in canine peripheral blood". Veterinary Parasitology. 172: 160-163.
- Godel, C., Kumar, S., Koutsovoulos, G., Ludin, P., Nilsson, D., Comandatore, D., Wrobel, N., Thompson, M., Schmid, C.D., Goto, S. Bandi, C., Blaxter, M., Maser, P. 2012. "The genome of the heartworm, *Dirofilaria immitis*, reveals drug and vaccine targets". The FASEB journal. 4650-4661.
- Goggin, J. M., Biller, D. S., Rost, C. M., Debey, B. M., Ludlow, C. L. 1997. "Ultrasonographic identification of *Dirofilaria immitis* in the aorta and liver of a dog. J. Am. Vet. Med. Assoc. 210: 1635-1637.
- Gómez, L.F., Alzate, G.J. y Orozco, S.C. 2006. "Reporte de un caso de *Dirofilaria immitis* en un perro: Hallazgo de antígenos y confirmación del parásito en la necropsia". Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. 19(1): 70-79.
- Gomez, M., Rojo, F. A., Guerrero, J. 1999. "Filariasis". Parasitología Veterinaria. McGraw-Hill Interamericana, Madrid. España.
- Green, L.K., Ansari, M.Q., Schwartz, M.R., Ro, J.Y. y Alpert, L.C. 1994. "Non-specific fluorescent whitener stains in the rapid recognition of pulmonary dirofilariasis: a report of 20 cases". Thorax 49: 590-593.
- Guerrero, J., Ducos de la Hitte, J. Genchi, C., Rojo, F., Gomez-Bautista, M. Labarthe, N., Mancebo, O., Uribe, L.F. Samano, R. 1992. "Update on the distribution of *Dirofilaria immitis* in dogs from Southern Europe and Latin America". American Heartworm Society: 31-37.
- Gutiérrez, J. 1995. "Estudio de campo para determinar la población afectada de Dirofilariasis canina en la ciudad de Tijuana y su importancia dentro de la salud pública". Tesis. Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias. Universidad Autónoma de Baja California. Mexicali.

- Hayasaki, M. 1996. "Re-Migration of Fifth-Stage Juvenile *Dirofilaria immitis* into Pulmonary Arteries after Subcutaneous Transplantation in Dogs, Cats and Rabbits". J. Parasitol. 82: 835-837.
- Hendrix, C. M., Bemrick, W. J., Schlottahauer, J. C. 1980. "Natural transmission of *Dirofilaria immitis* by *Aedes vexans*". Am. J. Vet. Res. 41: 1253-1255.
- Hoch, H. y Strickland, K. 2008a. "Canine and feline dirofilariasis: Life cycle, pathophysiology and diagnosis". Compendium. 1: 133-141.
- Hoch, H. y Strickland, K. 2008b. "Canine and feline dirofilariasis: prophylaxis, treatment, and complications of treatment". Compendium. 2: 146-152.
- Hocking, B. 1953. "The intrinsic range and speed of flight in insects". Trans. R. Ent. Soc. Lond., 104-203.
- Hoover, J.P. Fox, J.C., Claypool, P.L, Campbell, S., Mullins, B. 1996. "Comparison of visual interpretation and optical density measurements of two antigens test for heartworm infections in dogs". Canine Pract. 21: 12-20.
- IDEXX, Lab. 2011. "Annual screening for Vector-borne Disease, The Snap® 4dx® plus Test Clinical Reference Guide". United States.
- IDEXX, Lab. 2011. "Using Snap® 4dx® plus Test kits". United States.
- Kishan Narine, K. Brennan, B., Ian Gilfillan, I., Hodge. A., 1999. "Pulmonary presentation of *Dirofilaria immitis* (canine heartworm) in man". European Journal of Cardio-thoracic Surgery 16 475-477.
- Kittleson, M. D., Kienle, R. D. 2000. "Medicina cardiovascular de pequeños animales" 2a ed., Multimédica, Barcelona. España.
- Knight, D. 1994. "Should every heartworm-infected dog be treated with an adulticide?". Vet. Med. 89: 620-628.

- Knight, D.H., Lok, J.B. 1995. "Seasonal timing of heartworm chemoprophylaxis in the United States". American Heartworm Society: 37-42.
- Kotani, T., Powers, K. G. 1982. "Developmental stages of *Dirofilaria immitis* in the dog". Am. J. Vet. Res. 43: 2199-2206.
- Kozek, W.J., Vazquez, A.E., Gonzalez, C., Iguina, J. Sánchez, E., De Jesus, F., Cardona, C.J. Gómez, C., Seneriz, R., Díaz-Umpierre, J. 1995. "Prevalence of canine filariae in Puerto Rico and The Caribbean". American Heartworm Society: 55-64.
- Kume, S., Itagaki, S. 1995. "On the life-cycle of *Dirofilaria immitis* in the dogs as the final host ". Br. Vet. J. 111: 16-24.
- Labarthe, N. Ferreira, A.M., Guerrero. J., Newcomb, K., Paes de Almeida, E. 1997. "Survey of *Dirofilaria immitis* in random source cats in metropolitan Rio de Janeiro, Brazil, with description of lesions". Vet Parasitol, 71: 301-306.
- Labarthe, N., Serrao, M. L., Fontenele, Y. M., Oliveira, S. J., Lourenco, R. 1998. "Mosquito Frequency and Feeding Habits in an Enzoitic Canine Dirofilariasis Area in Niterói, State of Rio de Janeiro, Brazil". Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 93: 145-154.
- Lai, C.H., Tung, K.C., Ooi, H.K., Wang, J.S. 2001. "Suceptibility of mosquitoes in central Taiwan to natural infections of *Dirofilaria immitis*". Med Vet Entomol;15:64-7.
- Lai, C. H., Tung, K. C., Ooi, H. K., Wang, J. S. 2000. "Competence of *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* as a vector of *Dirofilaria immitis* after blood meal with different microfilarial density". Vet. Parasitol. 90: 231-237.

- Lee, I.Y., Lee, K.J., Lee, J., Ree, H.I., Yong, T.S., 2005. "Detection of the dog heartworm, *Dirofilaria immitis*, in its mosquito intermediate hosts". In: Annual Meeting of the Korean Society for Parasitology, Daejeon, Korea, October 27–28.
- Lee, S.E., Kim, H.C., Chong, S.T., Klein, T.A., Lee, W.J. 2007. "Molecular survey of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* by direct PCR for wild caught mosquitoes in the Republic of Korea". Vet. Parasitol. 148. 149–155.
- Leidy, J. 1856. "A synopsis of entozoan and some of their ecto-cungeners observed by the author". Proc. Acad. Nati. Sci. Philadelphia, 8: 42-58.
- Levine, N. D. 1978. "Tratado de Parasitología Veterinaria". Editorial Acribia, Zaragoza. España.
- Liu, J., Song, K.H., Lee, S.E., Lee, J.Y., Lee, J.I. Hayasaki, M., You, M.J., Kim, D.H. 2005. "Serological and molecular survey of *Dirofilaria immitis* infection in stray cats in Gyeonggi Province, South Korea". Vet. Parasitol. 130, 125-129.
- Lok, J.B. 1988. "*Dirofilaria spp*: taxonomy and distribution". CRC Press, Boca Ratón, Florida. 1-28.
- Ludlam, K. W., Jachowski, L. A., Otto, G. F. 1970. "Potential vector of *Dirofilaria Immitis*". J. Am. Vet. Med. Assoc. 157: 1354-1359.
- Luebke, L., O. Nelson, L. 1998. "Feline Heartworm Disease". Iowa. State. Univ. Vet. 60: 66-71.
- Malik, R., Church, D. B., Eade, I. G. 1998. "Syncope in a cat ". Aust. Vet. J. 76: 465, 470-471.

- Medina, G.E., Sandoval, E.A., Rentería, T., López, G., De la Mora, A., Pujol C.L. 2008. "West Nile Virus detection by RT-PCR from mosquitoes in a locality of Baja California, Mexico". *Revista Latinoamericana de Microbiología*. Vol. 50, Nos. 3 y 4.
- Meyer, R.P., Dhillon, M.S. "Identification of the mosquitoes of California". Edited by Stephen L Durso and The Entomology Committee. California Mosquito and Vector Control Association. 197 Otto Circle Sacramento, California, 95822.
- Miller, M. W. 1999. "Filariosis cardiaca". Harcourt Brace, Madrid. España.
- Muro, A., Genchi, C., Cordero, M., Simón, F. 1999. "Human *Dirofilariasis* in the European Union". *Parasitol. Today*. 15: 386-389.
- Newton, W. L. 1968. "Longevity of an experimental infection with *Dirofilaria immitis* in a dog". *J. Parasitol.* 54: 187-188.
- Norma oficial mexicana NOM-032-SSA2-2002, para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las enfermedades transmitidas por vector.
- Orihel, T.C y Eberhard, M. L. 1998. "Zoonotic filariasis". *Clinical Microbiology Reviews*. 11(2):366-381.
- Patton, O.S., Garner, F.M. 1970. "Cerebral infarction caused by heartworm (*Dirofilaria immitis*) in a dog". *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 156: 600-605.
- Patton, S., McCracken, M.D. 1991. "Prevalence of *Dirofilaria immitis* in Cats and Dogs in Eastern Tennessee". *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 3: 79.

- Polizopoulou, Z. S., Koutinas, A. F., Saridomichelakis, M. N., Patsikas, M. N., Leontidis, L. S., Desiris, A. K. 2000. "Clinical and laboratory observations in 91 dogs infected with *Dirofilaria immitis* in northern Greece". Vet. Rec. 146: 466-469.
- Quiroz, H. 2008. "Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos". Editorial Limusa. México, D.F.
- Rawlings, C. A. 1980. "Cardiopulmonary Function in the Dog with *Dirofilaria immitis* Infection: During Infection and After Treatment". Am. J. Vet. Res. 41: 319-325.
- Rawlings, C. A. 2002. "Effect of monthly heartworm preventatives on dogs with young heartworm infections". J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 38: 311-314.
- Rawlings, C. A., Calvert, C. A. 1997. "Verminosis cardiaca". Tratado de Medicina Interna Veterinaria. 4a ed., Inter-Médica, Buenos Aires. Argentina.
- Rawlings, C. A., Dawe, D. L., McCall, J. W., Keith, J. C., Prestwood, A. K. 1982. "Four types of occult *Dirofilaria immitis* infection in dogs". J. Am. Vet. Med. Assoc. 180: 1323-1326.
- Rawlings, C. A., Tackett, R. L. 1990. "Postadulthood pulmonary hypertension of canine heartworm disease: Successful treatment with oxygen and failure of antihistamines". Am. J. Vet. Res. 51: 1565-1569.
- Rawlings, C. A., Tonelli, Q., Lewis, R. E., Duncan, J. R. 1993. "Semiquantitative test for *Dirofilaria immitis* as a predictor of thromboembolic complications associated with heartworm treatment in dogs". Am. J. Vet. Res. 54: 914-919.

- Rawlings, C.A., Bowman, D.D., Howerth, E.W., Stansfield, D.G., Legg, W. y Luempert, L.G. 2001. "Response of Dogs treated with Ivermectin of Milbemycin starting at various intervals after *Dirofilaria immitis* infection". Veterinary Therapeutics, 2(3): 193-207.
- Reagan, W., Sanders, T. y Denicula, D. 1998. "Hematología Veterinaria: Atlas de Especies Domésticas". Editorial Sastre Vida. Barcelona, España.
- Robinson, N. E. 1999. "Función respiratoria". En: CUNNINGHAM, J. G. 1999. Fisiología veterinaria. 2ª ed., McGraw-Hill Interamericana, Atlapa. México.
- Rodríguez, H.S. 1993. "La prevalencia de Dirofilariasis canina en el Valle de Mexicali y su importancia dentro de la Salud Pública". Tesis. Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias. Universidad Autónoma de Baja California. Mexicali.
- Rosa, A., Ribicich, M., Pérez, G. T., Betti, A., Basso, N., Sigal, G., Volpin, C., Hallu, R. 2000. "Dirofilariosis canina. Tratamiento con melarsomina". Rev. Med. Vet. Ag. 81: 368,371-372.
- Roth, L., Brown, L., Brum, S., Foster, L., Nelson, M., Reczeck, D. y Von Schantz, D. 1993. "Comparison of three diagnostic test for *Dirofilaria immitis* in a low-incidence area". J Vet Diagn Invest. 5: 647-648.
- Sako T et al. 2000. "Human pulmonary dirofilariasis presenting as a small nodule with cavity". J Med Invest; 47:161-3.
- SAS, I.I., SAS/STAT® Statistical analysis software. 9.1 User's Guide. 2004, Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Sánchez, K.M.E., Calvo, R.P., Bello, B.E., Rojas, M.J.C. 2006. "Frecuencia de *Dirofilaria immitis* y su relación con cardiopatías en caninos positivos con la prueba de ELISA". Revista de Investigación, Vol 6. (1): 61-65.

- Selby, L. A., Corwin, R. M., Hayes, H. M. 1980. "Risk Factors Associated with Canine Heartworm Infection". J. Am. Vet. Med. Assoc. 176: 33-35
- Simón, F. y Genchi, C. 2001. "Heartworm infection in humans and animals". Ediciones Universidad Salamanca. Salamanca, España.
- Simón, F., Prieto, G., Morchon, R., Bazzocchi, C., Bandi, C. y Genchi, C. 2003. Immunoglobulin G antibodies against the endosymbionts filarial nematodes (*Wolbachia*) in patients with pulmonary dirofilariasis. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 10(1): 180-181.
- Song, K. H., Hayasaki, M., Choliq, C., Cho, K. W., Han, H. R., Jeong, B. H., Jeon, M. H., Park, B. K., Kim, D. H. 2002. "Immunological responses of dogs experimentally infected with *Dirofilaria immitis*". J. Vet. Sci. 3: 104-109.
- Suárez, R. 1991. "Dirofilariasis canina en el Valle de Mexicali". Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias. Universidad Autonoma de Baja California. Mexicali, B.C.
- Sutton, R.H. y Atwell, R.B. 1985. "Lesions of pulmonary pleura associated with canine heartworm disease". Veterinary Pathology. 22: 637-639.
- Thanchomnang, T., Intapan P.M., Lulitanond. V., Sangmaneedet, S., Chungpivat, S., Taweethavonsawat, P., Choochote, W., Maleewong, W. 2010. "Rapid detection of *Dirofilaria immitis* in mosquito vectors and dogs using a real-time fluorescence resonance energy transfer PCR and melting curve analysis". Veterinary Parasitology 168 (2010) 255–260.
- Theis, J. H., Stevens, F., Theodoropoulos, G., Ziedins, A. C. 1999. "Studies on the prevalence and distribution of filariasis in dogs from Los Angeles County, California". (1996-1998). Canine Pract. 24: 8-16.
- Thrall, D.E. 2003. "Manual de Diagnóstico Radiológico Veterinario". 4^{ta} Edición. Elsevier. Madrid, España.

- Urquhart, G. M., Armour, J., Duncan, J. L., Dunn, A. M., Jennings, F. W. 2001. "Parasitología Veterinaria". Editorial Acribia, Zaragoza. España.
- Vezzani, D., Mesplet, M., Eiras, D.F., Fontanarrosa, M.F., Schnittger, L. 2011. "PCR detection of *Dirofilaria immitis* in *Aedes aegypti* and *Culex pipiens* from urban temperate Argentina". Parasitol Res. 108:985–989.
- Watts, K.J., Courteny, C.H., Reddy, G.R. 1999. "Development of a PCR and probe-based test for the sensitive and specific detection of the dog heartworm *Dirofilaria immitis* in its mosquito intermediate host". Mol. Cell. Probes. 13, 425-430.
- Watts, K.J., Reddy, G.R., Holmes, R.A., Lok, J.B., Knigh, D.H., Smith, G., Courtney, C.H. 2001. "Seasonal prevalence of third-stage larvae of *Dirofilaria immitis* in mosquitoes from Florida and Louisiana". J. Parasitol. 87: 322-329.
- Winter, H. 1959. "The Pathology of Canine Dirofilariosis". Am. J. Vet. Res. 20: 366-371.