



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**FACULTAD DE MEDICINA  
VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**DIAGNÓSTICO DE *Dirofilaria immitis* EN  
PERROS DEL ESTADO DE PUEBLA  
UTILIZANDO UN ELISA DIRECTO**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**PRESENTA:**

**Alma Rosario Trejo Campos**

**DIRECTORES DE TESIS:**

**Dr. Abel Edmundo Villa Mancera  
MPA. Erick C. Fernández Meneses**

**Tecamachalco, Puebla 2024**



**BUAP**

Asunto: Votos Aprobatorios

Dr. Fernando Utrera Quintana.  
Director.  
Facultad De Medicina Veterinaria Y Zootecnia.  
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.  
Presente.

Por medio del presente, me permito informar a usted que revisamos la Tesis titulada: "DIAGNÓSTICO DE *Dirofilaria immitis* EN PERROS DEL ESTADO DE PUEBLA UTILIZANDO UN ELISA DIRECTO." presentada por la PMVZ. Alma Rosario Trejo Campos con matrícula 201632025, bajo la dirección del Dr. Abel Edmundo Villa Mancera y el M.P.A. Erick C. Fernández Meneses.

Considerando que la Tesis para obtener el Título de Médico Veterinario Zootecnista, cumple con los requisitos necesarios para ser discutida en el examen Profesional correspondiente OTORGAMOS NUESTROS VOTOS APROBATORIOS.

**Sinodales**

Presidente: M. en C. Carlos Gerardo Castillo Sosa.  
Secretario: M.V.Z. Herminio Ignacio Jiménez Cortez.  
Vocal: Dr. Abel Edmundo Villa Mancera

ATENTAMENTE

"Pensar bien es perseverar"  
El Salado, Tecamachalco, Pue., a 10 de enero de 2024.

Dr. Jorge Ezequiel Hernández Hernández  
Coordinador de Titulaciones y Exámenes Profesionales de la Fmvz-Buap



Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Carretera Cañada Morelos  
Km 7.5 El Salado,  
Tecamachalco, Pue.  
Tel. 222 229 95 00 Ext. 2593

Vc.Bo.  
Dr. Fernando Utrera C  
Director  
10/04/2024  
[Signature]

CONTENIDO	pagina
DEDICATORIA .....	i
AGRADECIMIENTOS .....	ii
I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN .....	2
III. MARCO TEÓRICO.....	5
3.1 Dirofilariasis .....	5
3.2 Historia.....	6
3.3 Agente etiológico .....	7
3.4 <i>Dirofilaria immitis</i> .....	9
3.5 <i>Dirofilaria repens</i> .....	10
3.6 Transmisión .....	11
3.7 Signos y síntomas .....	13
3.8 Diagnóstico .....	14
3.9 Tratamiento.....	15
3.10 Factores de riesgo .....	16
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
V. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	18
VI. HIPÓTESIS.....	19
VII. OBJETIVOS .....	20
7.1 Objetivo general.....	20
7.2 Objetivos específicos.....	20
VIII. MATERIAL Y MÉTODOS .....	21
8.1 Obtención de muestras positivas y negativas de <i>D. immitis</i> .....	21
8.2 Prueba modificada de Knott .....	21
8.3 Área de estudio y obtención de muestras a analizar .....	22
8.4 Optimización de la concentración de suero problema y anticuerpo secundario por ELISA directo .....	23
8.5 ELISA indirecto con muestras problema, controles positivos y negativos .....	23
8.6 Análisis estadístico .....	24
IX. RESULTADOS.....	25
9.1 Determinación de muestras positivas y negativas .....	25

9.2 ELISA directo para muestras de perro de los municipios de Puebla.....	26
X. DISCUSIÓN .....	29
XI. CONCLUSIONES .....	34
XII. LITERATURA CITADA.....	35

## **DEDICATORIA**

Esta tesis está dedicada a mi madre Margarita Campos y a mi nanis Alma Janintzitzio Sánchez, sin ellas esto no hubiera sido posible.

Margarita campos te dedico con mucho amor esta tesis, fuiste, eres y serás siempre mi mayor orgullo y la persona más importante en mi vida te amo mamá.

“Gracias mujeres hermosas, sin ustedes yo no sería nada”

## **AGRADECIMIENTOS**

Primero que nada, gracias a Dios por haberme permitido salir adelante y terminar mi carrera y no permitirme claudicar en el camino.

### **A MÍ MADRE**

Mamita querida, te admiro y te respeto, valoro tu enorme esfuerzo para sacarme adelante cada día y me siento muy orgullosa de ti, por eso y por muchas cosas más, gracias por todo el apoyo incondicional que me diste en todo momento, amor, comprensión, paciencia, tus consejos, tus regaños, cada uno me sirvió como motivación para seguir adelante. Hoy este trabajo es para ti, mereces mucho más de mi parte, pero esto solo es el comienzo de un gran futuro juntas. Esta tesis es con todo mi amor y mi cariño para ti  
MARGARITA CAMPOS TE AMO.

### **A MI NANIS**

Mi segunda madre, siempre he valorado sus consejos y todo el apoyo que me ha brindado a lo largo de mi vida, gracias por convertirse en uno de mis pilares en todo momento, aquí está la tesis que prometí hacer y entregarles como parte de mi titulación, he cumplido mi promesa, gracias por todo Jani Sánchez.

### **SEÑOR MANUEL**

Señor Manuel de Santiago le agradezco mucho su apoyo brindado en esta travesía que emprendí hace años por la universidad y que se cierra con la presentación de esta tesis.  
GRACIAS.

**A MIS DIRECTORES DE TESIS**

**DOCTOR ABEL EDMUNDO VILLA MANCERA Y MPA ERICK C.  
FERNANDEZ MENESES**

Gracias doctor ABEL por todas sus enseñanzas durante mi estancia con usted, su tiempo y dedicación para la elaboración de esta tesis. Gracias a usted aprendí mucho de laboratorio y sus consejos fueron muy valiosos. MPA ERICK gracias por su tiempo y apoyo en la elaboración de esta tesis, sin la ayuda de ambos esto no hubiera sido posible. GRACIAS.

## I. RESUMEN

En este estudio se determinó la seroprevalencia de *Dirofilaria immitis* en 136 perros de dos municipios del Estado de Puebla, utilizando un anticuerpo policlonal para detectar antígenos en suero de *D. immitis* en ensayos inmunoenzimáticos ligados a enzimas (ELISA). La eficacia del ensayo se comparó con la prueba modificada de Knott. El anticuerpo policlonal utilizado en el ELISA directo se caracterizó por una alta sensibilidad (100%) y especificidad (100%) para los municipios de Tecamachalco y Quecholac Puebla muestreados. El área bajo la curva fue de 1 para los dos ensayos de los dos municipios, lo que representó una prueba de alta precisión. El punto de corte para el municipio de Tecamachalco fue de 0.50 y para Quecholac de 0.49. La prevalencia de *D. immitis* para el municipio de Tecamachalco Puebla fue de 10.81% y para el municipio de Quecholac fue de 8.06%; mientras que la prevalencia para el estudio fue de 9.56%. Este estudio demuestra que el anticuerpo policlonal anti-*D. immitis* puede utilizarse con éxito para diagnosticar la infección por *D. imittis* en perros y monitorear efectivamente la prevalencia para plantear estrategias de prevención contra la dirofilariasis.



## II. INTRODUCCIÓN

Dirofilariasis es una enfermedad de origen zoonótico y emergente que puede poner en riesgo la vida de los perros, gatos y animales silvestres, en especial carnívoros, en ocasiones puede ser transmitida al humano, aunque se han detectado pocos casos de la enfermedad en los humanos. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que esto pueda cambiar en un futuro, por efecto de los cambios en el medio ambiente ideales para el desarrollo de los vectores, la cantidad de animales que cada día son más propensos a la enfermedad entre otros factores, esto promueve que cada vez sea más común encontrar perros en todo el mundo infectados de dirofilaria y por ende mayor exposición de los humanos.

Los mosquitos son los principales transmisores. Varias especies de los *géneros Culex spp. Aedes spp. y Anopheles spp.* intervienen en la transmisión de este parásito (Mendoza et al., 2020). Desde el punto de vista epidemiológico la enfermedad suele ser más prevalente en lugares donde las condiciones son óptimas para el desarrollo del vector. Las zonas donde los climas son tropicales y subtropicales son las más vulnerables.

Los causantes de la mayoría de los casos de dirofilariosis en seres humanos y animales, son *D. immitis* y *D. repens*, ambos nematodos pertenecen al género *Dirofilaria* y son especies de importancia en medicina veterinaria y humana.

Aunque ambas especies causan la enfermedad la forma adulta de cada nematodo se alberga en un lugar diferente para desarrollarse dentro del cuerpo del animal, en el caso de *D. immitis* los nematodos adultos se han localizado en los grandes vasos, específicamente en la arteria pulmonar y vena cava, y en órganos como el corazón. En cambio, la forma

adulta de *D. repens* se ha encontrado en tejido subcutáneo, dando así a cada uno una forma distinta en su desarrollo y una posible diferenciación en su diagnóstico.

Los signos clínicos se desarrollan de forma gradual y generalmente comienzan con una disminución de la tolerancia al ejercicio, tos crónica que progresa a disnea de moderada a severa, postración, ascitis, caquexia y síncope o excitación posterior al ejercicio (Venco et al., 2005). La muerte de los animales generalmente ocurre debido a una insuficiencia cardíaca del lado derecho (Bendas et al., 2022).

La forma para diagnosticar la enfermedad puede incluir varios componentes entre los que destacan un ecocardiograma, radiología y un hemograma completo, sin embargo, no hay una prueba rápida y específica que pueda detectar la enfermedad, aunado a todo ello, también se pueden incluir pruebas como electrocardiografía que pudieran ser de gran utilidad en los casos más avanzados.

El ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas (ELISA) es usado para la detección de antígenos y anticuerpos de virus o bacterias, los anticuerpos son proteínas que produce el sistema inmune para proteger al organismo cuando este detecta sustancias dañinas llamadas antígenos, en cambio los antígenos son sustancias que se pueden producir dentro del organismo derivado de enfermedades autoinmunes o externas producidas por virus o bacterias inclusive, por algún alimento consumido por animal.

En México se han realizado varios estudios epidemiológicos con la finalidad de detectar la presencia de esta enfermedad en toda la República Mexicana, lo que ha arrojado datos sobre que su prevalencia se concentra mayormente en las regiones tropicales, pues como ya se ha mencionado anteriormente, el clima es uno de los factores predisponentes, ya que favorece la reproducción de los mosquitos portadores de dicha enfermedad.

Los factores que rodean la enfermedad son muchos, dando así más probabilidades de desarrollo para los vectores, el aumento de los mosquitos en las zonas, el cambio climático que afecta al planeta, las escasas pruebas específicas para la detección temprana de dirofilaria y la falta de información de los propietarios favorece el aumento de casos de esta zoonosis.

Por ello, es necesaria e indispensable la investigación encaminada a encontrar más pruebas que ayuden con el diagnóstico de dirofilaria, los resultados serian un avance y una puerta abierta para el futuro de nuevas y mejoradas formas de diagnóstico, con lo que se lograría una detección temprana de la enfermedad en nuestras mascotas y posteriormente un tratamiento oportuno, logrando así una mejor salud.

### III. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 Dirofilariasis

La dirofilariasis es una enfermedad de origen zoonótico y de importancia para la salud pública tanto en medicina veterinaria como en medicina humana, los principales hospedadores son los perros, sin embargo, también pueden ser afectados otras especies de mamíferos, se transmite de forma directa a través de la picadura del mosquito, dando lugar a una infección que puede desarrollarse subcutáneamente o en algún órgano como el corazón, por ello a esta enfermedad también se le puede conocer como gusano del corazón. Los signos pueden ser variados, dependiendo del lugar de desarrollo y en algunos casos los animales afectados pueden no tener signos de la enfermedad, es decir, no llegar a presentar ningún signo. Entre los nematodos transmitidos por mosquitos con potencial zoonótico, *Dirofilaria repens* y *Dirofilaria immitis* (Spirurida: Onchocercidae) juegan un papel importante desde una perspectiva de salud pública. *Dirofilaria immitis* causa una enfermedad grave (dirofilariosis) en perros y otros carnívoros y ocasionalmente infecta a humanos, mientras que *D. repens* generalmente causa una infección subcutánea no patógena (Capelli et al., 2018). *Dirofilaria immitis* suele alojarse en el corazón y en las arterias pulmonares, mientras que *D. repens* se ha encontrado subcutáneamente.

Se han estudiado varios fármacos para prevenir y curar la enfermedad, sin embargo, aún queda un amplio campo por descubrir y un largo camino por recorrer para poder erradicarla por completo, además de que los viajes, el clima y la falta de información por parte de los lugareños son algunos de los factores que favorecen el desarrollo de la enfermedad, lo cual hace más difícil su eliminación.

### 3.2 Historia

La primera observación de *D. repens* probablemente fue reportada en un ser humano en 1566 por Amato Lusitano, un médico portugués, quien declaró en su *Curationum Medicinalium Centuria* “puella trima... per oculi internam partem, quam angulum magnum appellamus, a jumbrici cuius dam caput appere coepis...” (en una niña de 3 años, en la zona que llamamos gran ángulo del ojo, de repente empezó a aparecer la punta de un gusano que a veces se sitúa en el ojo haciendo su opacidad) entre 1864 y 1879, se publicaron tres informes en Europa (Italia y Hungría) sobre infecciones humanas subcutáneas y oculares, antes del artículo de Addario sobre *Filaria conjunctivae*, más tarde considerada sinónimo de *D. repens*. Ercolani demostró que cuando no se encuentran gusanos en el corazón de los perros microfilarémicos, por lo general están presentes en el tejido conectivo subcutáneo o en otros sitios del cuerpo, lo que sugiere que dos especies de *Dirofilaria* están involucradas en las infecciones por filarias caninas (Capelli et al., 2018).

En 1911 fue descrita y nombrada por primera vez en base de muestras enviadas por Bonvicini, un profesor clínico de Bolonia. Algunos años más tarde, se elucidó el desarrollo L1-L3 del parásito en el huésped intermediario del mosquito. En cuanto a la presentación clínica de la infección, se informó dermatitis por *D. repens* en perros, aunque no se proporcionó evidencia etiológica clara (Capelli et al., 2018). *Dirofilaria immitis* o gusano del corazón fue visto por primera vez en una necropsia hecha por Francesco Birago en un perro de caza de su propiedad en 1626.

### 3.3 Agente etiológico

Es causada por dos tipos de nematodos *D. immitis* y *D. repens*. En *D. immitis*, los gusanos adultos se alojan en la arteria pulmonar y el ventrículo derecho del corazón del perro. Los mosquitos hembra ingieren las microfilarias, dentro de las cuales realizan dos mudas sucesivas hasta que las larvas del tercer estadio (L3) se inoculan en el hospedador definitivo durante la siguiente ingesta de sangre. En humanos, los gusanos inmaduros se embolizan en las microarterias pulmonares, lo que da lugar a la formación de nódulos pulmonares benignos (dirofilariosis pulmonar), de los cuales la mayoría de los casos son asintomáticos (Mendoza et al., 2020).

Las microfilarias del gusano del corazón del perro *D. immitis* presentan una subperiodicidad sin picos diurnos o nocturnos claros, donde se observa un patrón de ondas, pero las microfilarias no desaparecen por completo de la sangre periférica (Jitsamai et al., 2021).

Mientras que las formas adultas de *D. repens* suelen desarrollarse en el tejido subcutáneo de perros y gatos, dejando al ser humano solo como un huésped accidental, ya que, los nematodos no tienen la capacidad de desarrollarse y migrar a la forma adulta que es la que produce microfilarias dando así, muy pocos casos de dirofilariosis en humanos.

La temperatura umbral para permitir la maduración del parásito hasta la etapa infectiva dentro del mosquito es de 14°C; existe una relación lineal entre la tasa de desarrollo del parásito y las temperaturas de 18°C a 34°C. La cantidad requerida de calor para el desarrollo larval hasta la etapa infectiva es de 130 unidades de desarrollo del gusano del corazón, que se define como la suma acumulada de la media diaria de edad por encima del umbral de temperatura de 14°C en un período de 30 días (McGill et al., 2019).

Algunos mosquitos son capaces de pasar el invierno; sin embargo, se supone que el efecto de los mosquitos que pasan el invierno en el patrón general de transmisión del gusano del corazón es insignificante (McGill et al., 2019). En un estudio realizado en Irán en 2020, se recolectaron 67 gusanos filariales, incluidos 41 parásitos hembras y 26 machos, del sistema cardiovascular de 43 perros callejeros, que se sometieron a microscopía óptica y electrónica de barrido (SEM) (Khanmohammadi et al., 2020). El resultado microscópico arrojó lo siguiente. La morfología general de estos gusanos adultos era cilíndrica con cuerpo alargado de color gris blanquecino, cutícula estriada transversalmente y los machos eran más pequeños que las hembras. Las colas de las hembras eran rectas, grandes y redondeadas, mientras que las colas de los machos estaban enrolladas. La porción cefálica era radialmente simétrica y redondeada. Los parásitos tenían piezas bucales especializadas. La abertura oral no contenía labios en el aro. El aparato bucal estaba rodeado por cuatro pares de pequeñas papilas cefálicas con un par de anfibios laterales. El esófago constaba de dos partes que incluían una porción faríngea muscular (corpus) corta y espaciosa y un área glandular ancha (istmo) junto con células glandulares marginales. La parte posterior del esófago era moderadamente redondeada y el anillo nervioso rodeaba alrededor de 1/3 de la sección longitudinal del esófago. En la flecha gruesa muestra un aparato vulvar en la unión esófago-intestino. La parte anterior del intestino se expandió. Aunque la hendidura del gusano era detectable debajo de la cabeza y cerca del esófago, los deiridos laterales no estaban bien desarrollados y situados aproximadamente en el nivel medio del esófago. No se observó diferencia entre extremos anteriores en ambos sexos. La parte inferior de los gusanos machos era espiral y estaba completamente torcida (Khanmohammadi et al., 2020).

### 3.4 *Dirofilaria immitis*

*Dirofilaria immitis* es un nematodo que infecta a los cánidos en todo el mundo, así como a otras especies de mamíferos, incluidos los humanos. La relación parásito-cánido permite que los perros alberguen un gran número de parásitos adultos y mantengan las larvas circulando en su torrente sanguíneo hasta por 2 años (Bendas et al., 2022).

Los gusanos y los perros están bien adaptados entre sí, lo que convierte a los perros en el mejor huésped urbano del parásito. Sin embargo, el 30% de los perros no presenta suficientemente microfilaremia, es decir, la baja carga larvaria dificulta la transmisión por mosquitos y el diagnóstico por su detección en las muestras de sangre. Por lo tanto, el diagnóstico canino debe incluir siempre una prueba de microfilarias y pruebas serológicas para detectar antígenos de gusanos adultos (Bendas et al., 2022)

Preocupantemente, se ha informado de *D. immitis* en varios pinnípedos, como la foca de capucha (*Cystophora cristata*), las focas comunes cautivas (*Phoca vitulina*) en Canadá, Portugal y Corea, los lobos marinos africanos (*Arctocephalus pusillus*) en el parque gráfico inanoceánico en Portugal y leones marinos de California (*Zalophus californianus*) en parques zoológicos de Florida, Luisiana y Japón con muertes y signos clínicos como insuficiencia cardiopulmonar, tos y dificultad para respirar (Culda et al., 2022).

Se distribuye principalmente en climas tropicales y subtropicales y depende principalmente de factores ambientales, como la temperatura y la humedad, además del comportamiento humano, como la instalación de sistemas de riego, viajes con mascotas y nuevos desarrollos urbanos, que favorecen la presencia y proliferación de sus vectores de transmisión (Mendoza et al., 2020).



Sin embargo, esto no deja libre de la enfermedad a las zonas donde persiste el clima frío ya que, si se han reportado casos de dirofilaria, por ello la vigilancia constante de los animales y humanos no debe dejar pasar las investigaciones y posteriores análisis en caso de sospecha o al estar expuesto por viajes constantes a zonas tropicales y por supuesto el hecho de trabajar con animales.

### ***3.5 Dirofilaria repens***

El nematodo *D. repens* es responsable de la dirofilariasis subcutánea canina y es el principal agente de la dirofilariasis humana en el Viejo Mundo. Los gusanos adultos de *D. repens* viven en los tejidos conjuntivos subcutáneos e intramusculares de los perros y otros carnívoros. Las hembras, como vivíparas, liberan el primer estadio larvario (L1) en la sangre periférica después del apareamiento. El L1 es recogido por un mosquito mientras chupa sangre, se convierte en la segunda etapa larval (L2) y finalmente a la etapa infectiva (L3) que migra hacia la probóscide para ser transmitida a un nuevo huésped (Barlozzari et al., 2021).

Para la transmisión exitosa de *D. repens* L3 a un huésped canino (u otro vertebrado), un mosquito infectado debe sobrevivir al menos durante el tiempo de incubación extrínseca hasta que la L3 altamente móvil haya alcanzado la probóscide. Además, la especie de mosquito debe ser endémica en las localidades donde hay perros para adquirir y transmitir

la infección, y debe tener una preferencia particular por los caninos para picar. Por lo tanto, esto hace que las especies de mosquitos con una preferencia de hospedador mamífero presentes en localidades urbanas y suburbanas sean adecuadas para sustentar un ciclo endémico de *D. repens* (Capelli et al., 2018).

### 3.6 Transmisión

La transmisión de la enfermedad se da de manera directa a través de la picadura de un mosquito. Existen muchos géneros de mosquitos, de los cuales se ha confirmado mediante investigaciones que pueden transmitir la enfermedad. Las microfilarias ingresan al mosquito durante la alimentación de un perro infectado y llegan a la cabeza como larvas de tercer estadio (L3) donde pueden transmitirse a nuevos individuos. Al ser picado por un mosquito infectado, el L3, la etapa infecciosa de *D. immitis*, migra y puede convertirse en la etapa adulta en perros y gatos, que a menudo desarrollan la enfermedad clínica. (Scavo et al., 2022)

Varias especies de los géneros *Culex spp.*, *Aedes spp.* y *Anopheles spp.* intervienen en la transmisión de este parásito. Estas especies representan un riesgo constante de infección porque se alimentan tanto de huéspedes animales como humanos (Mendoza et al., 2020). Esta especie se da principalmente en climas tropicales y subtropicales, siendo la temperatura y la humedad los principales factores que favorecen la presencia y proliferación de mosquitos culícidos como vectores de la enfermedad (Mendoza et al., 2020).

No podemos descartar que en otros países haya otras especies de mosquitos vectores de la enfermedad, pues en un estudio realizado en el estado de Florida se realizó una encuesta a personas residentes de la zona para saber su conocimiento acerca de dirofilariosis y posteriormente se realizó la recolección de muestras de larvas de mosquitos en las propiedades de los propietarios encuestados. Los resultados del estudio mostraron que de las personas encuestadas no sabían que los mosquitos eran portadores de la infección ni mucho menos el alcance que pudiera llegar a tener. Sin embargo, de las 28 especies de mosquitos recolectadas, *Anopheles quadrimaculatus*, *Culex erraticus*, *Culex nigripalpus*, *Coquillettidia perturbans*, *Culiseta inornata*, *Aedes albopictus* y *Aedes aegypti* dieron positivo para la infección por *D. immitis* lo que sugiere que hay más mosquitos portadores de la enfermedad de los que se tiene conocimiento (Ledesma et al., 2019).

Un estudio reciente realizado en Chiang Mai en Tailandia observó casos de *D. immitis* en todas las clases de altitud (0 a >800 m), probablemente debido a la amplia gama de especies de mosquitos, que son vectores potenciales de transmisión, con ello podemos ampliar más el campo de investigación sobre esta enfermedad en zonas donde el clima y la altitud no son favorables para el desarrollo del mosquito transmisor (Kaikuntod et al., 2021).

### 3.7 Signos y síntomas

Los signos clínicos se desarrollan gradual y generalmente comienzan con una disminución de la tolerancia al ejercicio, tos crónica que progresa a disnea de moderada a severa, postración, ascitis, caquexia y síncope o excitación posterior al ejercicio (Bendas et al., 2022). La infección crónica conduce a la migración retrógrada de los adultos hacia la aurícula derecha y la vena cava, lo que provoca la desviación de la válvula tricúspide, lo que genera signos clínicos de insuficiencia cardíaca derecha (Jitsamai et al., 2021).

Aunque muchos perros infectados por *D. immitis* no presentan signos, si no se tratan, pueden desarrollar complicaciones cardiorrespiratorias inespecíficas y variadas que pueden ser mal diagnosticadas y confundidas con otras enfermedades (Lemos et al., 2022).

Los síndromes clínicos típicamente asociados con la infección por *D. repens* en perros son la dermatitis nodular multifocal, generalmente localizada en la cara, y la dermatitis prurigo papular (Simón et al., 2012). Los signos dermatológicos, como prurito, eritema, pápulas, alopecia focal/multifocal, hiperqueratosis, formación de costras, nódulos, acantosis, eczema, pioderma y edema, pueden aparecer y también reaparecer estacionalmente en asociación con la infección por *D. repens* (Barlozzari et al., 2021).

Las lesiones ultraestructurales descritas con mayor frecuencia son el engrosamiento y la vacuolización de la membrana basal glomerular (GBM), la proliferación de células mesangiales y el borramiento del proceso podal. Los depósitos de inmunocomplejos se encuentran con frecuencia en el GBM y el mesangio. Aunque las lesiones glomerulares pueden ser pronunciadas, la insuficiencia renal y la azotemia generalmente no están presentes. La albuminuria y la proteinuria son características de la disfunción glomerular y se asocian comúnmente con la enfermedad del gusano del corazón. Como la albuminuria a

menudo precede a la proteinuria, su medición puede ser útil en el reconocimiento temprano del daño glomerular (Falus et al., 2023).

### **3.8 Diagnóstico**

Si bien existe una prueba rápida para el gusano del corazón del perro *D. immitis*, no hay pruebas similares disponibles para detectar animales infectados con *D. repens*, lo que convierte a los perros no diagnosticados en la principal fuente de infección para otros perros y humanos (Capelli et al., 2018; Barlozzari et al., 2021).

Un hemograma completo puede confirmar el diagnóstico de anemia y otras enfermedades que pueden justificar el antecedente. La radiografía de tórax permite identificar anomalías en el parénquima pulmonar, la tráquea, los bronquios principales o incluso estructuras intratorácicas no relacionadas con los pulmones, que pueden causar tos, disnea, cansancio y cianosis. La radiografía de tórax también puede detectar cambios en la silueta del corazón, lo que puede sugerir la presencia de una enfermedad cardíaca (Lemos et al., 2022).

La ecocardiografía es el estándar de oro para diagnosticar anomalías cardíacas morfofuncionales. La enfermedad cardíaca es una causa común de tos, aunque la ecocardiografía puede identificar la presencia de *D. immitis* en la arteria pulmonar o en las cavidades derechas del corazón, tiene baja sensibilidad para el diagnóstico de infección. Por lo tanto, las pruebas de antígenos y microfilarias se consideran las ayudas estándar para el diagnóstico de infección (Lemos et al., 2022).

El diagnóstico de la infección por *D. immitis* en perros se basa en la detección del antígeno circulante producido en gran medida por gusanos hembra adultos junto con una prueba de detección de microfilarias (MFDT) (Negron et al., 2022). Hay una variedad de MFDT en uso con diferentes sensibilidades, incluido el frotis directo, la prueba del tubo de microhematocrito o el examen de capa leucocitaria, y la prueba modificada de Knott (MK). El frotis directo y la prueba del tubo de microhematocrito son métodos de prueba menos sensibles y no permiten la identificación a nivel de especie de las microfilarias (mf) presentes, pero se usan con más frecuencia en entornos de práctica. La prueba MK es un método más sensible para detectar mf, ya que es una técnica de concentración y permite evaluar la morfología de mf bajo microscopía, lo cual es necesario para diferenciar *D. immitis* de otros nematodos filarioides (Negron et al., 2022).

Muchos kits comerciales, incluidos el ELISA y métodos rápidos con tiras reactivas, están disponibles para el serodiagnóstico de dirofilariasis en perros; sin embargo, el principal problema es la reactividad cruzada con otras infecciones parasitarias, comúnmente encontrada en perros domésticos (Khanmohammadi et al., 2020).

### **3.9 Tratamiento**

En cuestión de tratamiento y prevención, en un ensayo donde se estudiaron a 48 perros Beagle machos y hembras criados en instalaciones específicamente a prueba de mosquitos, se sometieron a un tratamiento con diferentes fármacos durante 11 meses a fin

de analizar su efectividad y prevención ante los mosquitos de *D. immitis*, donde el resultado fue que no se recuperaron gusanos del corazón de los perros tratados (McTier et al., 2019).

Se necesitan nuevas opciones de tratamiento para proteger eficazmente a los perros de esta amenaza. En estudios de eficacia de laboratorio, la moxidectina ha demostrado la mayor potencia de todos los medicamentos probados como preventivo oral contra *D. immitis*. La moxidectina administrada a una dosis de 0.5 µg/kg, 60 días después de la inoculación de L3 *D. immitis* fue 100 % eficaz. En comparación, en estudios separados, la ivermectina fue 100 % eficaz a una dosis de 2 µg/kg cuando se administró 30 días después de la inoculación, mientras que la milbemicina oxima proporcionó una eficacia del 100% a 0.5 mg/kg dosificados 60 días después de la inoculación (Kryda et al., 2019). Otros fármacos usados comúnmente como preventorios de la enfermedad incluyen milbemicina, ivermectina, selamectina, eprinomectina.

### **3.10 Factores de riesgo**

Muchos factores influyen en la transmisión del gusano del corazón, incluidos los que afectan a las poblaciones de mosquitos. Las precipitaciones, la vegetación y la humedad pueden afectar la reproducción y, en consecuencia, afectar la transmisión de *D. immitis*. Los mosquitos también requieren calor; las grandes ciudades pueden producir islas de calor creando condiciones más favorables para la reproducción de mosquitos en comparación con los entornos rurales (McGill et al., 2019).

Las infecciones naturales de dirofilariasis canina aumentan el riesgo de transmisión a humanos. Se ha encontrado que el riesgo relativo de dirofilariasis canina está relacionado

con varios factores, por ejemplo, la vida al aire libre, la falta de prevención del gusano del corazón y la exposición a vectores infectados (Kaikuntod et al., 2021). En humanos, la edad y el sexo pueden considerarse factores de riesgo de exposición a *D. immitis* (Mendoza et al., 2020).

El aumento de la temperatura y la humedad globales es una ventaja para la propagación de mosquitos y también mejora la eficacia de la transmisión de patógenos a través de enfermedades transmitidas por mosquitos, como el dengue, la malaria y la filariasis linfática (Jitsamai et al., 2021).



#### **IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Hasta donde sabemos, no se han reportado estudios sobre la prevalencia de *D. immitis* en muestras de suero de perros en diferentes municipios del Estado de Puebla.

#### **V. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Cuál es la prevalencia de nemátodos en perros de diferentes municipios de Puebla?.

## **VI. HIPÓTESIS**

El nemátodo *Dirofilaria immitis* presenta una baja prevalencia en perros de diferentes municipios del estado de Puebla.

## VII. OBJETIVOS

### 7.1 Objetivo general

Determinar la prevalencia de *Dirofilaria immitis* en perros de diferentes municipios del Estado de Puebla utilizando un ELISA directo empleando un anticuerpo anti-*D. immitis*.

### 7.2 Objetivos específicos

Obtener muestras séricas de perros de diferentes municipios de Puebla.

Determinar la seroprevalencia de anticuerpos anti- *D. immitis* en perros utilizando un ELISA directo.

Analizar si existe relación entre la prevalencia de nemátodos en perros de diferentes municipios de México.

## VIII. MATERIAL Y MÉTODOS

### 8.1 Obtención de muestras positivas y negativas de *D. immitis*

Se obtuvieron 50 muestras sanguíneas de un área endémica de la enfermedad, ubicadas en el Estado de Guerrero con clima tropical. Se tomaron muestras de sangre (hasta 10 ml por perro) por venopunción de la vena cefálica en tubos vacutainer con y sin anticoagulante EDTA (ácido etilendiaminotetraacético potásico). Las muestras fueron etiquetadas individualmente y almacenadas en viales hasta su análisis.

### 8.2 Prueba modificada de Knott

Se utilizó la prueba de Knott para detectar microfilarias circulantes en animales con una infección prepatente. Se mezcló un ml de sangre EDTA con 9 ml de formol al 2% en un tubo de 12ml y se centrifugó durante 5 minutos a 5,000 rpm. Se desecho el sobrenadante y se transfirieron dos gotas del sedimento a un portaobjetos cubierto con un cubreobjetos y se examinó mediante microscopía óptica (aumento de 100× o 400×) para la detección e identificación morfológica de las microfilarias utilizando claves morfométricas según (Genchi et al., 2007).

La positividad o negatividad de cada muestra fue confirmada mediante una prueba ELISA cualitativa (SNAP 4Dx Plus, Idexx Laboratory, Westbrook, Maine, USA) que utiliza antígenos producidos principalmente por hembras adultas, siguiendo las

instrucciones del fabricante. Esta prueba tiene una sensibilidad y especificidad de 99.2% and 100%, respectivamente.

### **8.3 Área de estudio y obtención de muestras a analizar**

Se obtuvieron un total de 136 sueros de perros de los municipios de Quecholac y Tecamachalco del Estado de Puebla, los cuales se ubican en la parte este-centro de la República Mexicana y tiene una superficie de 33,919 km<sup>2</sup>. El estado de Puebla (distrito de Tecamachalco) tiene un clima templado (Cw) según la clasificación climática de Köppen modificada por García (2004). La precipitación media anual es de 586.3 mm; la temperatura media anual es de 17.1°C, con una máxima de 22.4°C y una mínima de 11.3°C, y la temporada de lluvias va de mayo a septiembre (INEGI 2017).

Las muestras séricas de los perros fueron obtenidas por conveniencia en base a la disposición de los propietarios-encargados a participar. Como criterio de inclusión y exclusión se seleccionaron perros con más de un año de edad. Los animales fueron sujetados con la ayuda del propietario y de un veterinario experto. Se obtuvieron muestras de sangre individual de cada perro durante la visita a la clínica para cirugía de esterilización, revisión periódica, vacunación anual o inspección rutinaria. Se realizó la toma de muestra de sangre de cada animal mediante venopunción cefálica en tubos vacutainer sin anticoagulante y mantenidos a temperatura ambiente hasta la retracción visible del coágulo. Las muestras de suero se transportaron al laboratorio de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla en cajas isotérmicas. Los sueros obtenidos después de la coagulación se centrifugaron a 2000 x g durante 10 min, se dividieron en alícuotas y almacenaron a -80 °C hasta su uso. Para cada muestra de perro, se recopiló información

sobre la edad, sexo, raza y lugar de residencia en una hoja de cálculo de Excel y la información completa fue un criterio de inclusión, seleccionando a los perros con más de un año de edad.

#### **8.4 Optimización de la concentración de suero problema y anticuerpo secundario por ELISA directo**

Los antígenos del nemátodo *D. immitis* en muestras séricas fueron determinadas utilizando un ELISA indirecto empleando un anticuerpo policlonal comercial. Previamente, se realizó una titulación mediante el método checkerboard conocido como tablero de ajedrez, que consistió en diluciones seriadas, para determinar la dilución óptima del suero de perro y anticuerpo secundario. La absorbancia del ensayo se midió con el lector de ELISA BioTek ELx800.

#### **8.5 ELISA indirecto con muestras problema, controles positivos y negativos**

Las placas de ELISA (Costar, Corning, USA) fueron sensibilizadas con 100 µl por pozo con sueros problemas, controles positivos y negativos a una dilución 1:10 con PBS, durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente los pozos de las placas de ELISA fueron lavados en cuatro ocasiones con PBS-T al 0.05%. Los sitios inespecíficos se bloquearon con 200 µl de albumina sérica bovina (BSA) al 10% en PBS-T por 1 h a 37 °C. Después de tres lavados con PBS-T, las placas fueron incubadas con el anticuerpo policlonal de cabra

anti-*D. immitis* (MyBioSource, Catalogo MBS6009306) conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) a una dilución de 1:2,000 en PBS-BSA 1% e incubadas durante 1 h a 37 °C. Nuevamente se lavaron los pozos como se describió anteriormente y el color de la reacción fue desarrollada mediante la adición de 100 µl por pozo de sustrato 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB, Sigma USA). La reacción enzima-sustrato se paró con 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4 N. Se midió y registro la absorbancia a 450 nm en un lector de ELISA (Biotek ELx800).

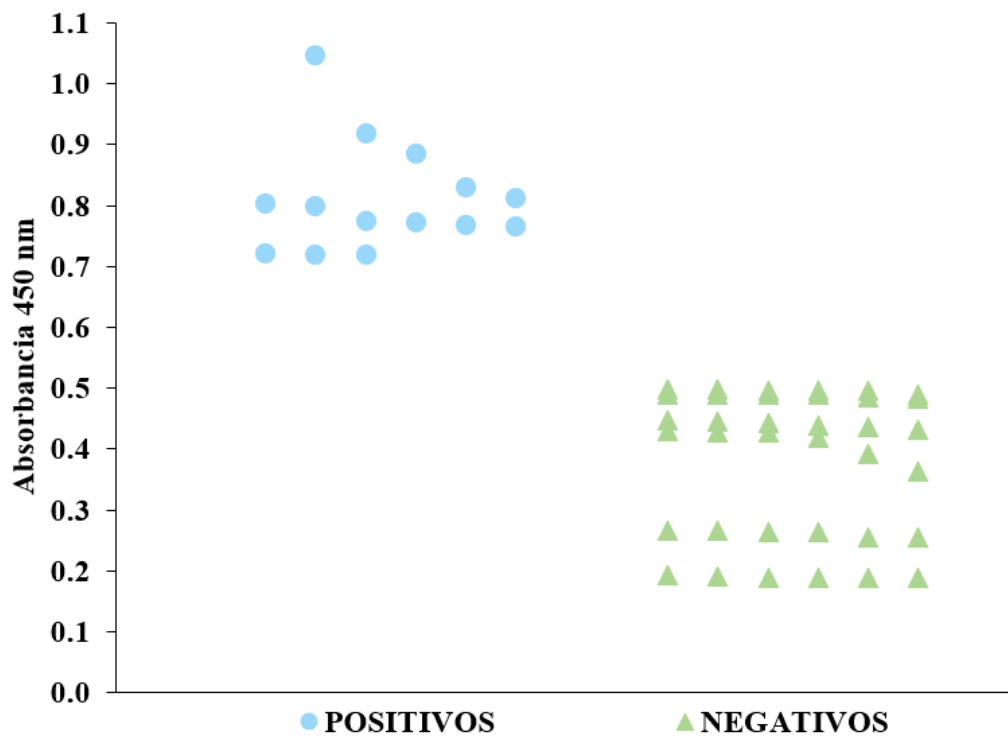
## 8.6 Análisis estadístico

El límite inferior de positividad (punto de corte) se estableció para una sensibilidad y especificidad óptimas utilizando la curva ROC (Receiver Operating Characteristic) con un intervalo de confianza (IC) del 95% para todas las muestras séricas de perro analizadas en el ELISA indirecto. El criterio para determinar el valor de corte utilizando la curva ROC consistió en seleccionar el punto que mostrara mayor sensibilidad y especificidad simultáneamente. La precisión de los valores del área bajo la curva (AUC) propuestos por (Swets, 1988) considera los siguientes intervalos: no informativa ( $AUC < 0.5$ ); precisión baja ( $0.5 < AUC < 0.7$ ), precisión moderada ( $0.7 < AUC < 0.9$ ); y precisión alta ( $0.9 < AUC < 1$ ). Para determinar si hay diferencias significativas entre la prevalencia de los diferentes municipios del Estado de Puebla, se utilizó una prueba de chi-cuadrado. Los datos fueron analizados utilizando el programa IBM SPSS 25 para Windows (SPSS Inc., Chicago, USA).

## IX. RESULTADOS

### 9.1 Determinación de muestras positivas y negativas

De las 50 muestras obtenidas del Estado de Guerrero, 14 muestras fueron positivas a la prueba modificada de Knott y confirmadas utilizando SNAP 4Dx Plus (Figura 1). El punto de corte se estableció (0.35) calculando el valor promedio + 3 desviaciones estándar (3SD) de 36 muestras negativas de suero obtenidas de perros del Estado de Guerrero que previamente fueron negativas a microfilarias utilizando la prueba modificada de Knott y confirmada mediante una prueba ELISA cualitativa (SNAP 4Dx Plus). 0.4



**Figura 1.** Distribución de las densidades ópticas (450 nm) de 50 sueros del Estado de Guerrero utilizando la prueba modificada de Knott y confirmada utilizando una prueba ELISA cualitativa (SNAP 4Dx Plus).



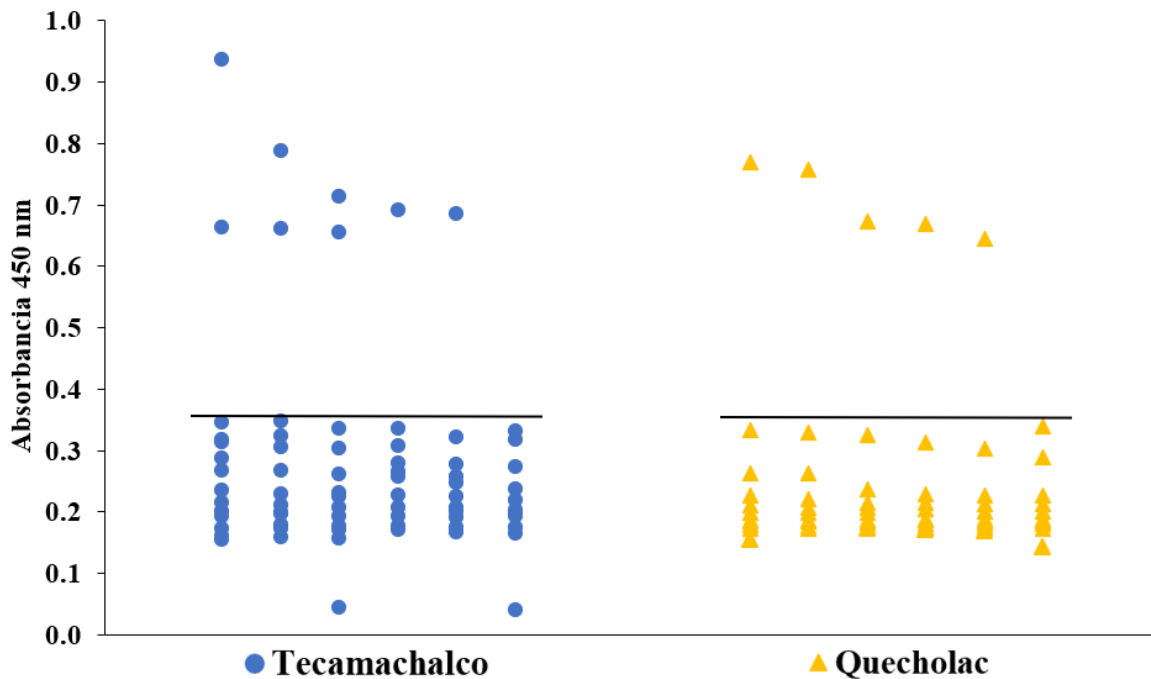
La media de la densidad óptica de los sueros positivos fue 0.80 con una desviación estándar de 0.08, siendo en valor más alto de 1.05 y el valor menor de 0.71.

Mientras que la media de la densidad óptica de los 36 sueros negativos fue de 0.38 con una desviación estándar de 0.11, la muestra con la mayor densidad óptica fue de 0.49, y la de menor valor fue de 0.18.

## **9.2 ELISA directo para muestras de perro de los municipios de Puebla**

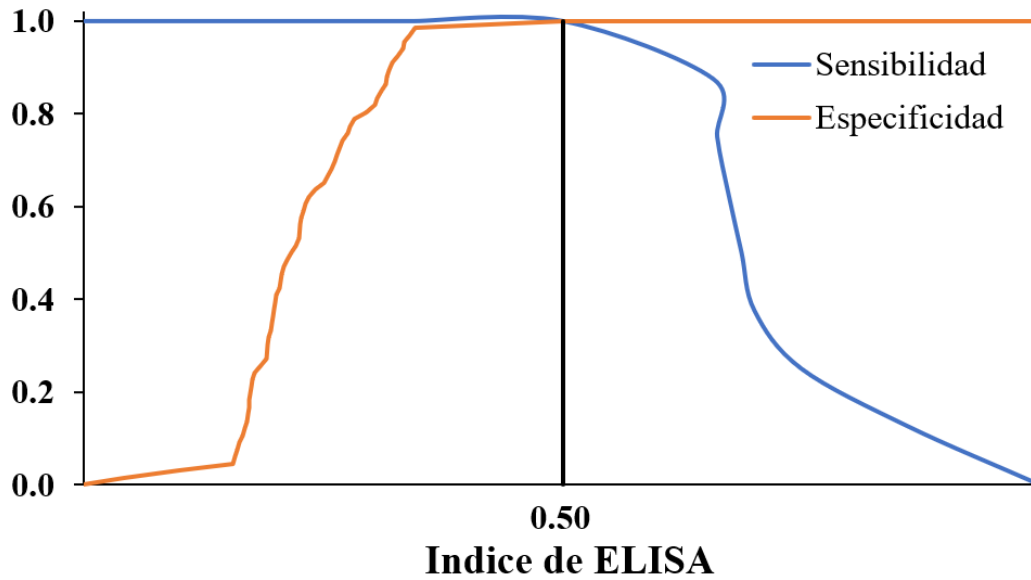
Se utilizó un ELISA directo para determinar la seropositividad de las muestras obtenidas de dos municipios del Estado de Puebla. Para este propósito, se utilizó un anticuerpo policlonal obtenido de cabras inmunizadas con *D. immitis* y unido a peroxidasa de rábano. De las 136 muestras recolectadas, 74 fueron del municipio de Tecamachalco, y 62 pertenecían al municipio de Quecholac (Figura 2). De un total de 74 muestras séricas de Tecamachalco, 8 fueron positivas a *D. immitis*, mientras que 66 fueron negativas a la enfermedad. Para los sueros obtenidos del municipio de Quecholac, de un total de 62 sueros, 5 fueron positivos y 57 negativos a *D. immitis*. El punto de corte fue de 0.35, el cual fue obtenido de las muestras negativas del Estado de Guerrero.

La prevalencia de *D. immitis* para el municipio de Tecamachalco Puebla fue de 10.81% (8 positivas de 74 muestras), y para el municipio de Quecholac fue de 8.06% (5 positivas de 62 muestras).

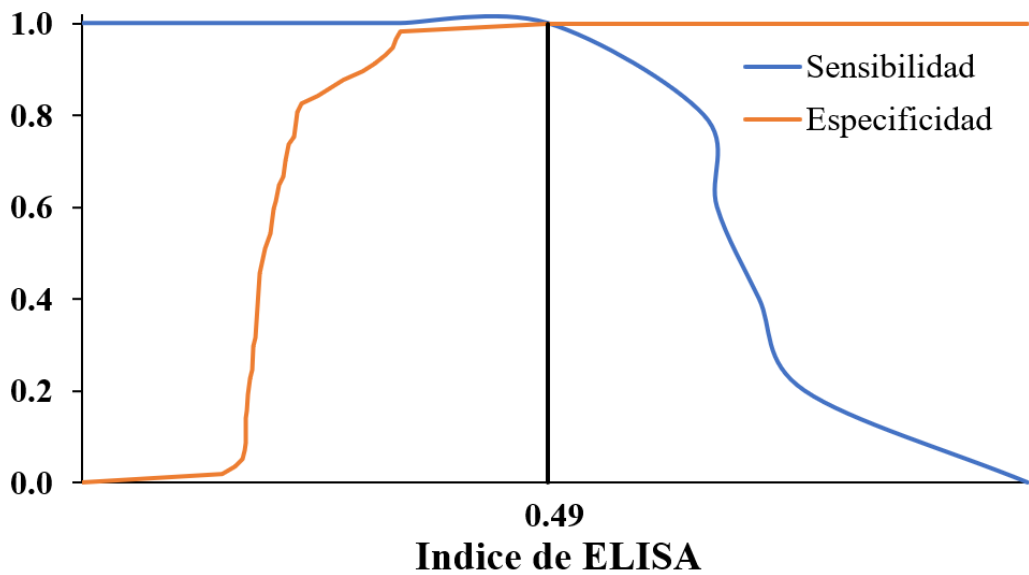


**Figura 2.** Comparación de la densidad óptica de sueros de perros positivos y negativos para antígenos de *D. immitis* utilizando una ELISA directo en dos municipios del Estado de Puebla. La línea horizontal muestra el punto de corte del ensayo (0.35).

Con la finalidad de obtener la sensibilidad y especificidad propia del ELISA directo, se utilizaron curvas ROC para determinar los valores óptimos del ensayo para los dos municipios (Figura 3 y 4). La sensibilidad y especificidad del ELISA para el municipio de Tecamachalco Puebla fue de 100% y 100%, respectivamente (Figura 3). Mientras que la sensibilidad y especificidad para el municipio de Quecholac fue de 100% y 100%, respectivamente (Figura 4). El punto de corte para el municipio de Tecamachalco fue de 0.50 y para Quecholac de 0.49. Para ambos municipios y ensayos, la AUC fue de 1, por lo que se considera una precisión alta.



**Figura 3.** Curva ROC construida con datos de densidad óptica del ELISA utilizando muestras de perro del Municipio de Tecamachalco. El área bajo la curva (AUC) muestra la sensibilidad y especificidad del ensayo.



**Figura 4.** Curva ROC construida con datos de densidad óptica del ELISA utilizando muestras de perro del Municipio de Quecholac. El área bajo la curva (AUC) muestra la sensibilidad y especificidad del ensayo.

Se utilizó una prueba de chi-cuadrada para determinar si existían diferencias significativas referente a la prevalencia para los municipios de Tecamachalco y Quecholac, siendo  $p = 0.587$  el resultado de la prueba estadística, concluyéndose que no existe diferencias entre ambos municipios.

## X. DISCUSIÓN

En este estudio, desarrollamos una prueba de ELISA directo para determinar antígenos en suero de perros de *D. immitis* basados en anticuerpos policlonales generados con antígenos de proteínas de hembras adultas de filarias. Inicialmente se obtuvieron 50 sueros para determinar su positividad o negatividad utilizando la prueba de Knott modificada para detectar el nematodo y un ELISA (SNAP™ 4Dx® IDEXX) para su confirmación, la cual detecta antígenos del parásito. De un total de 50 sueros obtenidos en el Estado de Guerrero, 36 muestras sanguíneas fueron positivas y 14 negativas al nematodo. La infección por *D. immitis* en perros suele diagnosticarse mediante ensayos parasitológicos y serológicos, y finalmente se confirma mediante análisis moleculares. La prueba de Knott modificada es el método parasitológico más popular entre las pruebas de concentración y se basa en la detección e identificación de microfilarias de *Dirofilaria spp.* en muestras de sangre. Sin embargo, los resultados de la prueba de Knott modificada pueden verse alterados por infecciones ocultas, como se ha observado en hasta el 67% de los perros positivos para *D. immitis* adultos (Panarese et al., 2020). Sin embargo, los

resultados de la prueba de Knott modificada pueden verse alterados por infecciones ocultas, como se ha observado en hasta el 67% de los perros positivos para *D. immitis* adultos (Otto, 1978).

Las pruebas serológicas como es el ELISA y las pruebas inmunocromatográficas para la detección de antígenos somáticos y femeninos de *D. immitis* adultos están disponibles para las pruebas en el punto de atención (POC) o para los laboratorios de diagnóstico de referencia. Las pruebas de antígenos son muy específicas para *D. immitis* (Panarese et al., 2020). No obstante, pueden producirse reacciones cruzadas con antígenos de otros nematodos como son *D. repens*, *Angiostrongylus vasorum* y *Spirocerca lupi*. Estas pruebas también son muy sensibles, especialmente cuando las muestras se someten a métodos de disociación de complejos inmunes (DCI) antes de la prueba (Venco et al., 2017; Henry et al., 2018). De hecho, se ha demostrado que el método de precalentamiento mejora la detección del antígeno tanto en infecciones experimentales como naturales por *D. immitis* al liberar el antígeno del nematodo que está unido a los anticuerpos del huésped (Beall et al., 2017).

La sensibilidad es la probabilidad de clasificar correctamente a un animal enfermo, es decir, la probabilidad de que para un animal enfermo se obtenga en la prueba un resultado positivo. Mientras que la especificidad, es la probabilidad de clasificar correctamente a un animal sano, en otras palabras, la probabilidad de que para un animal sano se obtenga un resultado negativo (Fletcher et al., 2012). En este ensayo, la sensibilidad y especificidad del ELISA indirecto utilizando un anticuerpo policlonal para detectar antígenos en suero de perros de *D. immitis* fue del 100% para los dos municipios del Estado de Puebla. Un estudio en Brasil comparo las técnicas de microscopía óptica parasitológica (MOP), serológicas y moleculares para diagnosticar la infección por filarias. Se utilizó la prueba de

Knott modificada para detectar microfilarias y ELISA (Snap™ 4Dx® IDEXX) para detectar antígenos y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar ADN. El 19.4% de las muestras fueron positivas según la microscopía. Mediante PCR, el 15.5% fueron positivas. Utilizando ELISA, el porcentaje de positividad fue del 29.1%. Demostrando que la sensibilidad del ELISA fue superior a la de la PCR o la microscopía (Trancoso et al., 2020). Se utilizaron 175 perros en Rumania, de los cuales 21.14% resultaron positivos a antígenos de *D. immitis* y cuando se utilizó la técnica de Knott modificada reveló un total de 16.57% de muestras positivas para microfilarias (Girdan et al., 2015).

Una prevalencia del 9.56% fue obtenida en el presente estudio en los dos municipios muestreados del Estado de Puebla, siendo caracterizado por un clima templado (Cw) según la clasificación climática de Köppen modificada por García (2004). La prevalencia de la infección por *D. immitis* en el continente Americano varía mucho de un lugar a otro. En las zonas con climas más fríos, como en Canadá, la prevalencia suele ser mucho menor, pero puede alcanzar hasta el 8.4%, como en el sur de Ontario. En Estados Unidos, la prevalencia suele oscilar entre el 1% y el 12%, pero puede alcanzar más del 40% en zonas altamente endémicas. Desde México hasta Sudamérica, la prevalencia puede ser extremadamente alta, como es 42% en la Costa del Golfo de México, 63.2% en el Caribe y 74% en Argentina (Dantas-Torres and Otranto, 2020).

En los municipios de Cuauhtépec y Acapulco de Juárez, Guerrero, se obtuvieron muestras sanguíneas de cáninos domésticos mayores de un año. En el estudio se encontró una prevalencia de *D. immitis* en el municipio de Cuauhtépec del 15.68% y en Acapulco de Juárez del 7.44% (Rodríguez et al., 2019). En la zona metropolitana de la ciudad de Puebla México, se recolectaron 283 sueros de perros callejeros, las cuales se utilizaron para detectar antígenos de *D. immitis* utilizando un kit comercial y la prueba de Knott para

detectar microfilarias. La prevalencia de *D. immitis* en la población canina callejera fue del 2.12% (Zumaquero et al., 2020). Un estudio realizado en ocho regiones geográficas de México, que incluyó 1706 perros, 37.6% fueron positivos a *D. immitis* (Movilla et al., 2016).

Los estudios indican que la prevalencia varía según los factores ambientales, el clima y las características de la población canina. Por ejemplo, la prevalencia suele ser de moderada a alta en las regiones cálidas y húmedas de Brasil (Mendes-de-Almeida et al., 2021). En un estudio realizado en el estado de Amazonas, norte de Brasil, los autores detectaron una prevalencia del 44% basada en la detección de ADN de *D. immitis* (Soares et al., 2014). Como corolario, un estudio sugirió que la prevalencia media era mayor en el nordeste (29.7%), en comparación con las regiones del sudeste (26.3%) y sur (13.2%) de Brasil (Labarthe et al., 2014).

En Alemania, Países Bajos y Francia la prevalencia de la infección es baja o los casos de gusano del corazón son esporádicos, disminuyendo la prevalencia de *D. immitis* sobre todo en las antiguas zonas endémicas, hiperendémicas. Por ejemplo, en el norte de Italia la prevalencia disminuyó en tres décadas de >40% en perros a alrededor del 8% en perros con dueño no tratados con fármacos preventivos y la mayoría de los veterinarios encuestados actualmente han informado que no diagnostican más de 5-20 casos clínicos anuales de *D. immitis* e infecciones por *D. repens* en zonas hiperendémicas anteriores (Genchi et al., 2019). En las Islas Canarias (España) el descenso fue del 30% al 19% (Montoya-Alonso et al., 2010) y Japón del 46% en 1999-2001 al 23% en 2009-2011 (Oi et al., 2014).

En Madrid España, la prevalencia de la infección por *D. repens* canina y felina es del 3% y 0.2%, respectivamente (Montoya-Alonso et al., 2017). En las regiones occidentales la prevalencia promedio es del 5.8% (Diosdado et al., 2018), y del 2.8% en el sureste del país

(Cataluña y área de Barcelona) Montoya-Alonso et al., 2015. En Portugal continental, la infección canina por dirofilarias endémica oscila entre el 4% en perros aparentemente sanos y el 9% en perros clínicamente sospechosos.

Los datos de un gran estudio serológico (>80,000 muestras de suero) realizado en Alemania han mostrado un 1.4% de resultados positivos para *D. immitis* en perros que procedían de países endémicos como España, Portugal y Grecia (Vrhovec et al., 2017). En Grecia, la prevalencia de la infección canina por nematodos oscila entre el 0.7% y el 25%, con los valores más altos en las zonas septentrionales (Diakou et al., 2019; Tsiouris et al., 2019). En Rumanía, se encontraron prevalencias en perros del 3.6%-14%, dependiendo de la zona encuestada, aunque la prevalencia de hasta el 42% se encontró en perros callejeros en el sureste del país. En Turquía, la prevalencia de *D. immitis* es del 0-18% (Genchi and Kramer, 2020).

Uno de los principales factores que ha influido en la propagación de la infección por *Dirofilaria* es el cambio climático, que ha provocado un aumento en la abundancia de las poblaciones de mosquitos, que ha acortado el desarrollo extrínseco de los estadios infecciosos y ha alargado la temporada de transmisión. Otros factores críticos son la introducción del régimen de transporte de animales de compañía en 2000, que ha facilitado el desplazamiento de animales de compañía por toda la Unión Europea, además de la introducción de nuevas especies de mosquitos invasores y competentes, como *Aedes albopictus* y *Ae. koreicus*, la presencia de perros callejeros con alta prevalencia de infección por dirofilarias (por ejemplo, 40% de prevalencia en Sofía, Bulgaria y 53.8% en Irán), y una prevención insuficiente en perros, principalmente en las nuevas áreas de colonización. Así pues, los datos anteriores proceden de estudios realizados con diferentes alcances (por ejemplo, evaluación de la prevalencia en diferentes grupos de edad, sexo o raza), en



diferentes zonas de un país y con diferentes métodos de diagnóstico (serología antigénica, análisis de sangre o métodos moleculares) (Genchi and Kramer, 2020).

Otro factor fundamental es la presencia de mosquitos capaces de actuar como vectores de *Dirofilaria*. La distribución geográfica de la dirofilariosis está directamente relacionada con la de las poblaciones de mosquitos susceptibles. Varias especies de mosquitos, principalmente de los géneros *Culex*, *Aedes* y *Anopheles*, han estado implicadas en la transmisión de *D. immitis*. Muchos de ellos se alimentan indistintamente de reservorios animales y humanos, por lo que donde hay caninos con dirofilariosis canina, siempre existe el riesgo de que se transmita a humanos y otras especies (Simón et al., 2017). Se han encontrado *A. taeniorhynchus* y *A. crucians* en México, lo que coincide con los datos notificados en los Estados Unidos (Dantas-Torres and Otranto, 2020).

## **XI. CONCLUSIONES**

Los resultados comunicados en este estudio demuestran la gran utilidad serodiagnóstica de un ELISA directo basado en un anticuerpo policlonal para la detección de antígenos en suero de *D. immitis* en perros de dos municipios del Estado de Puebla. Este estudio proporciona información epidemiológica valiosa sobre la actual situación de *D. immitis* en Puebla. Los profesionales en el área veterinaria tienen un papel clave en la detección para generar estrategias de control y medidas preventivas contra la enfermedad en perros.

## XII. LITERATURA CITADA

- Barlozzari Giulia, Felice Tiziana, Salvato Laura, Conti Raffaella, De Liberato Claudio, Furzi Federica, Gabrielli Simona, Scarpulla Manuela. 2021. Usual or unusual presentations of *Dirofilaria repens* in two sibling dogs: a case report. *Parasitol Res* 120:109–115.
- Beall, M. J., A. Arguello-Marin, J. Drexel, J. Liu, R. Chandrashekar, A. R. J. P. Alleman, and vectors. 2017. Validation of immune complex dissociation methods for use with heartworm antigen tests. 10:115-121.
- Bendas, A. J. R.; Alberigi, B.; Galardo, S.; Labarthe, N.; & Mendes-de-Almeida, F. 2022. Clinical and blood count findings in dogs naturally infected with *Dirofilaria immitis*. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine* 44.
- Capelli Glola; Genchi Claudio; Baneth Gad; Bourdeau Patrick; Briant Emanuele; Cardoso Luis; Danesi Patrizia; Fuehrer Hans Peter; Giannell Alessio; Ionica Angela Monica; Maia Carla; Modrý David; Montarsi Fabrizio; Krücken Jürgen; Papadopoulos Elias; Petric Dušan; Pfeiffer Martin; Savic Sara; Otranto Domenico; Poppert Sven; Silagh Comelia. 2018. Recent advances on *Dirofilaria repens* in dogs and humans in Europe. *Parasites&vectors* 11:663.
- Culda, C.A.; Dionnet, R.; Barbu, A.C.; Cârstolovean, A.S.; Dan, T.; Grijalva, J.; Espin, P.; Vinueza, R.L.; Cruz, M.; Páez-Rosas, D.; et al. The Presence of *Dirofilaria immitis* in Domestic Dogs on San Cristobal Island, Galapagos. *Pathogens* 2022, 11, 1287.
- Dantas-Torres, F., and D. J. V. p. Otranto. 2020. Overview on *Dirofilaria immitis* in the Americas, with notes on other filarial worms infecting dogs. 282:109113.
- Diakou, A., N. Soubasis, T. Chochlios, I. L. Oikonomidis, D. Tselekis, C. Koutinas, R. Karaiosif, E. Psaralexi, T. K. Tsouloufi, and G. J. P. r. Brellou. 2019. Canine and feline dirofilariosis in a highly enzootic area: first report of feline dirofilariosis in Greece. 118:677-682.
- Falus F. A., Szabo K.E., Becker Z., Müller L., Fok E., Balogh N., Manczur F. 2023. Albuminuria and proteinuria in dogs infected with *Dirofilaria repens*: A cross-sectional study. *J Vet Intern Med* 37:992–997.
- Fletcher, R., S. Fletcher, and G. Fletcher. 2012. *Clinical Epidemiology: The Essentials*. Fifth. Lippincott Williams & Wilkins.

- Genchi, C., and L. H. J. V. p. Kramer. 2020. The prevalence of *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in the Old World. 280:108995.
- Genchi, C., L. Venco, M. J. G. f. t. l. d. o. c. Genchi, and f. D. infections. 2007. Guideline for the laboratory diagnosis of canine and feline *Dirofilaria* infections. 8:137-144.
- Genchi, M., L. Rinaldi, L. Venco, G. Cringoli, A. Vismarra, and L. J. V. p. Kramer. 2019. *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat: a questionnaire study in Italy. 267:26-31.
- Girdan, G., R. G. Anghel, M. Ioniță, and I. L. J. S. W. C. S. V. M. Mitrea. 2015. Data on canine heartworm *Dirofilaria immitis* infection and other vector-borne pathogens in dogs in Bucharest area, Romania. 61:146-151.
- Henry, L. G., K. J. Brunson, H. S. Walden, N. Wenzlow, S. E. Beachboard, K. L. Barr, and M. T. J. V. p. Long. 2018. Comparison of six commercial antigen kits for detection of *Dirofilaria immitis* infections in canines with necropsy-confirmed heartworm status. 254:178-182.
- Jitsamai Wanarit, Piromkij Pimsiri, Kamkong Patchana, Chungpivat Sudchit, Taweethavonsawat Piyanan. 2021. Seasonal distribution and environmental parameters associated with *Brugia pahangi* and *Dirofilaria immitis* in naturally infected dogs in Bangkok and vicinity, Thailand. *Scientific Reports*. 11:4594.
- Kaikuntod, M.; Arjkumpa, O.; Kladkempetch, D.; Fukumoto, S.; Thongkorn, K.; Boonyapakorn, C.; Punyapornwithaya, V.; Tiwananthagorn, S. 2021 Geographic Spatial Distribution Patterns of *Dirofilaria immitis* and *Brugia pahangi* Infection in Community Dogs in Chiang Mai, Thailand. *Animals* 11: 33.
- Khanmohammadi M., Akhlaghi L., Razmjou E., Falak R., Zolfaghari emameh R., Mokhtarian K., Arshadi M., Tasbihi M., Meamar A. R., 2020. Morphological Description, Phylogenetic and Molecular Analysis of *Dirofilaria immitis* Isolated from Dogs in the Northwest of Iran. *Iran J Parasitol* 15:57-66.
- Kryda Kristina, Six Robert H., Walsh Kelly F., Holzmer Susan J., Chapin Sara, Mahabir Sean P., Myers Melanie, Inskeep Tammy, Rugg Jady, Cundiff Blair, Pullins Aleah, Ulrich Michael, McCall John W., McTier Tom L., Maede Steven J. 2019. Laboratory and field studies to investigate the efficacy of a novel, orally administered combination product containing moxidectin, sarolaner and pyrantel for the prevention of heartworm disease (*Dirofilaria immitis*) in dogs. *Parasites & Vectors* 12:445.
- Ledesma Nicholas A., Kaufman Phillip E., Xue Rui-De, Leye Christopher, Macapagal Mark J., Winokur Olivia C., Harrington Laura C. 2019. Entomological and sociobehavioral components of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in two

Florida communities with a high or low prevalence of dogs with heartworm infection. *Small Animals* 254:1.

- Lemos Marquez De Oliveira Nathalia, Alberigi, Bruno., Labarthe Norma, Knacfuss, Fabiana Batalha, Baldani Cristiane Divan, Silva, M. F. A. 2022. How does *Dirofilaria immitis* infection impact the health of dogs referred to cardiology care. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine* 44.
- McGill Erin, Berke Olaf, Peregrine Andrew S., Weese J. Scott. 2019. Epidemiology of canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in domestic dogs in Ontario, Canada: Geographic distribution, risk factors and effects of climate. *Geospatial Health* 14:741.
- McTier Tom L, Six Robert H., Pullins Aleah, Chapin Sara, Kryda Kristina, Mahabir Sean P., Woods Debra J., and Maeder Steven J. 2019. Preventive efficacy of oral moxidectin at various doses and dosage regimens against macrocyclic lactone-resistant heartworm (*Dirofilaria immitis*) strains in dogs. *Parasites & Vectors*. 12:444.
- Mendes-de-Almeida, F., L. C. Alves, P. do Amaral Fernandes, R. de Menezes Leivas, and N. Labarthe. 2021. Infection with *Dirofilaria immitis* and Other Infections in Cats and Dogs from Rio de Janeiro, Brazil: The Need for Prophylactic Enforcement. *Acta parasitologica* 66(3):962-968. doi: 10.1007/s11686-021-00345-z.
- Mendoza Esteban MV, Arcila-Quiceno V, Albarracín-Navas J, Hernández I, Flechas-Alarcón MC and Morchón R. 2020. Current Situation of the Presence of *Dirofilaria immitis* in Dogs and Humans in Bucaramanga, Colombia. *Front. Vet. Sci.* 7:488
- Montoya-Alonso, J. A., E. Carretón, M. Juste, I. Mellado, R. Morchón, and F. J. V. p. Simón. 2010. Epidemiological survey of canine heartworm disease on the island of Gran Canaria (Canary Islands–Spain) between 2000 and 2008. *173(1-2):165-168.*
- Movilla, R., C. García, S. Siebert, X. J. P. Roura, and vectors. 2016. Countrywide serological evaluation of canine prevalence for *Anaplasma* spp., *Borrelia burgdorferi* (sensu lato), *Dirofilaria immitis* and *Ehrlichia canis* in Mexico. 9:1-12.
- Negron V., Saleh M.N., Sobotyck C., Luksovsky J. L., Harvey T. V., Verocai G. G. 2022. Probe-based qPCR as an alternative to modified Knott's test when screening dogs for heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in combination with antigen detection tests. *Parasites & Vectors* 15:306.

- Oi, M., S. Yoshikawa, Y. Ichikawa, K. Nakagaki, J. Matsumoto, and S. J. P. Nogami. 2014. Prevalence of *Dirofilaria immitis* among shelter dogs in Tokyo, Japan, after a decade: comparison of 1999–2001 and 2009–2011. 21.
- Otto, G. 1978. The significance of microfilaremia in the diagnosis of heartworm infection. In: Proceedings of the heartworm symposium. p 22-30.
- Panarese, R., R. Iatta, J. A. Mendoza-Roldan, D. Szlosek, J. Braff, J. Liu, F. Beugnet, F. Dantas-Torres, M. J. Beall, and D. J. P. Otranto. 2020. Comparison of diagnostic tools for the detection of *Dirofilaria immitis* infection in dogs. 9(6):499.
- Rodríguez, P. R., E. García, M. C. Santos, B. P. Burgos, G. O. Valladolid, P. H. Ruiz, and J. J. A. v. Ponce-Covarrubias. 2019. Prevalencia de *Dirofilaria immitis* en caninos domésticos de dos municipios del trópico de Guerrero, México. 9(1):15
- Scavo N.A., Zecca I. V., Sobotyck C., Saleh M. N., Lane S. K., Olson M. F., Hamer S. A., Verocai G. G., Hamer G. L., 2022. High prevalence of canine heartworm, *Dirofilaria immitis*, in pet dogs in south Texas, USA, with evidence of *Aedes aegypti* mosquitoes contributing to transmisión. *Parasites & Vectors* 15:407
- Simón, F., J. González-Miguel, A. Diosdado, P. J. Gómez, R. Morchón, and V. J. B. R. I. Kartashev. 2017. The complexity of zoonotic filariasis episytem and its consequences: a multidisciplinary view. 2017
- Swets, J. A. 1988. Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science* 240(4857):1285-1293.
- Trancoso, T. A. L., N. D. C. Lima, A. S. Barbosa, D. Leles, A. B. M. Fonseca, N. V. Labarthe, O. M. P. Bastos, and C. M. A. Uchoa. 2020. Detection of *Dirofilaria immitis* using microscopic, serological and molecular techniques among dogs in Cabo Frio, RJ, Brazil. *Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary parasitology : Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria* 29(1):e017219. doi: 10.1590/S1984-29612020009.
- Tsiouris, V., A. Starras, I. Georgopoulou, A. Angelou, and E. Papadopoulos. 2019. A case of Amidostomosis in a racing pigeon (*Columba livia*) in Greece. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society* 70(1):1443. doi: 10.12681/jhvms.20353.
- Venco, L., S. Manzocchi, M. Genchi, L. H. J. P. Kramer, and vectors. 2017. Heat treatment and false-positive heartworm antigen testing in ex vivo parasites and dogs naturally infected by *Dirofilaria repens* and *Angiostrongylus vasorum*. 10(2):129-134.
- Vrhovec, M. G., N. Pantchev, K. Failing, C. Bauer, N. Travers-Martin, and H. J. P. R. Zahner. 2017. Retrospective analysis of canine vector-borne diseases (CVBD) in

Germany with emphasis on the endemicity and risk factors of leishmaniosis. 116(Suppl 1):131-144.

- Zumaquero, L., F. Simón, E. Carretón, I. Hernández, C. Sandoval, and R. J. V. p. Morchón. 2020. Prevalence of canine and human dirofilariosis in Puebla, Mexico. 282:109098.