



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE BABAHOYO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**



**CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

Componente práctico de carácter Complexivo, presentado al H.  
Consejo Directivo de la Facultad, como requisito previo a la  
obtención del título de:

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**TEMA:**

“Métodos usados en el diagnóstico de *Dirofilaria immitis* en caninos”

**AUTOR:**

Osmar Manuel Triviño Armache

**TUTOR:**

Dr. Javier Alberto Schuldt Cruz, Msc.

Babahoyo – Los Ríos – Ecuador

2022

## RESUMEN

Las técnicas de detección de *D. immitis* en el transcurso de los años han evolucionado, la más antigua es la técnica de Knott modificado, la cual permite visualizar las microfilarias sin embargo puede dar resultados negativos, cuando el conteo de microfilarias es muy bajo sin embargo, en estudios que conllevan una gran población, se la ha usado debido a que sus costos son bajos. Las técnicas serológicas son las comúnmente más usadas, debido a que proporcionan cierta especificidad que permite detectar el parásito, sin embargo se ve afectada por el conteo bajo de parásitos hembra o la ausencia de microfilaremia, lo cual es un limitante en el uso de las técnicas serológicas, es por esto que se emplean nuevas técnicas, como la PCR la cual se la usado desde hace treinta años, esta técnica permite que se detecte la enfermedad incluso en casos que no presente microfilaremia o conteo alto de hembras, además permite la identificación de la especie del parásito, lo cual permite un oportuna acción del médico para brindar el tratamiento; los costos son la principal limitante de esta técnica. Las técnicas serológicas seguirán avanzando, pero es muy aconsejable el uso de la PCR debido a que brinda información confiable, siempre y cuando se ejecute los procedimientos de forma correcta, evitando el error humano.

**Palabras clave:** Diagnostico, serológico, PCR, microfilaremia, técnica.

## SUMMARY

*D. immitis* detection techniques have evolved over the years, the oldest is the modified Knott technique, which allows microfilariae to be visualized, however it can give negative results when the microfilariae count is very low, however, in studies involving a large population, it has been used because its costs are low. Serological techniques are the most used, because a certain specificity that allows detecting the parasite, however, is affected by the low count of female parasites or the absence of microfilariaemia, which is a limitation in the use of serological techniques. This is why new techniques are used, such as PCR, which has been used for thirty years. This technique allows the disease to be detected even in cases that do not present microfilariaemia or a high count of females, and also allows the identification of the species of the parasite, which allows a timely action of the doctor to provide the treatment; costs are the main limitation of this technique. Serological techniques will continue to advance, but the use of PCR is highly recommended because it provides reliable information, as long as the procedures are carried out correctly, avoiding human error.

**Keywords:** Diagnosis, serological, PCR, microfilariaemia, technique.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	II
SUMMARY .....	III
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO I.....	2
MARCO METODOLÓGICO.....	2
1.1. Definición del tema caso de estudio .....	2
1.2. Planteamiento del problema .....	2
1.3. Justificación.....	2
1.4. Objetivos .....	2
1.4.1. General.....	2
1.4.2. Específicos .....	3
1.5. Fundamentación teórica .....	3
1.5.1. <i>Dirofilaria Immitis</i> .....	3
1.5.1.1. Ciclo de vida.....	3
1.5.1.2. Morfología .....	4
1.5.2. Patogenia.....	4
1.5.3. Síntomas.....	5
1.5.4. Diagnostico.....	6
1.5.4.1. Diagnóstico parasitológico.....	6
1.5.4.1.1. Método de Knott modificado.....	6
1.5.4.1.2. Técnica de la gota gruesa .....	7
1.5.4.2. Métodos serológicos.....	8
1.5.4.2.1. Prueba inmunocromatográfica o serológica (Alere Heartworm Ag Test Kit®) .....	8
1.5.4.2.2. Técnica con uso de estuche comercial tipo ELISA (Snap 4Dx) de IDEXXX laboratorios, Inc.....	9

1.5.4.2.3. Comparación de seis kits de antígenos comerciales para la detección de infecciones por <i>Dirofilaria immitis</i> en caninos .....	9
1.5.4.3. Técnicas moleculares .....	10
1.5.4.3.1. Diagnóstico de <i>Dirofilaria immitis</i> por PCR .....	10
1.5.4.4. Diferencias estadísticas entre los diferentes métodos de diagnóstico de <i>D. immitis</i> .....	12
1.5.5. Tratamiento .....	12
1.6. Hipótesis .....	13
1.7. Metodología de la investigación .....	13
CAPITULO II .....	14
2. RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN .....	14
2.1. Desarrollo del caso .....	14
2.2. Situaciones encontradas .....	14
2.3. Soluciones planteadas .....	14
2.4. Conclusiones .....	15
2.5. Recomendaciones .....	15
BIBLIOGRAFÍA .....	16
ANEXOS .....	20

## ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Gusanos adultos de <i>D. immitis</i> alojados en atrio derecho, que en gran número pueden causar el síndrome de vena cava.....	20
Imagen 2. Ciclo de vida de <i>D. Immitis</i> .....	20
Imagen 3. <i>Microfilaria</i> en gota gruesa, aumento de 10x .....	21
Imagen 4. Alere <i>Dirofilariose</i> Ag Teste Kit® .....	21
Imagen 5. Prueba de SNAP con tecnología ELISA .....	21
Imagen 6. Prueba de SNAP con resultado positivo .....	22
Imagen 7. Sensibilidad de los ensayos de PCR anidada de <i>Dirofilaria Immitis</i> (A) y PCR anidada de <i>Wolbachia</i> (B) .....	22

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Presencia de la microfilaria de <i>Dirofilaria immitis</i> (en porcentaje de positivo) según las pruebas de Microcapilar, Knott modificado y ELISA, en los distritos del río Chillón, Lima .....	23
---	----

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad *dirofilariasis* es causada por el parásito nemátodo filariforme *Dirofilaria immitis* (Pérez et al., 1995) este parásito tiene como hospederos definitivos como perros, gatos, zorro y el lobo. El parásito *D. immitis* se lo observó por primera vez en 1626, por Francesco Birago en la necropsia de un perro de caza de su propiedad. Posteriormente un médico francés J.B. Panthot publicó una reseña referente a la presencia de 31 vermes presentes en el ventrículo derecho de una perra usada en demostraciones anatómicas junto con el primer dibujo del parásito (Simón 2012).

La *dirofilariasis* por lo general se da en animales adultos, además estudios demuestran que la microfilaremia alcanzan sus niveles más altos en seis meses y medio posterior a la infección (Johnstone et al. 1997). Clínicamente, el proceso crónico es asintomático o caracterizarse por ser asintomático o tiene la característica de presentar fatiga, tos crónica o disnea. Visualizando un animal cansado en su tiempo de relajación y tranquilidad (Olson et al. 1982).

La primera forma de diagnosticar la infección es el examen clínico-parasitológico, el cual consiste en analizar los signos clínicos y observar las *microfilarias* en la sangre periférica (Johnstone et al. 1997). Cuando la visualización de *microfilarias* no es posible, se debe acudir a técnicas de concentración, usando una de las técnicas más comunes como lo es la Knott modificado observando gran número de muestras, permitiendo incluso observar la especie de filaria por su morfología (Knight 1987)

Se ha señalado que las técnicas moleculares (Reacción en cadena de la polimerasa, PCR) permiten discriminar entre *D. immitis* y otras 6 microfilarias en caninos, lo que es de gran importancia clínica, ya que en función de esto pueden tomarse decisiones adecuadas para la terapéutica oportuna. Las técnicas moleculares permiten en consecuencia, confirmar los casos de antigenemia negativa en casos con microfilaremia (Rishniw et al. 2006).

# CAPITULO I

## MARCO METODOLÓGICO

### 1.1. Definición del tema caso de estudio

En el presente documento se enfatiza en la temática de determinación de métodos de diagnóstico para comprobar la presencia de *Dirofilaria* en caninos, con lo que se permite identificar diferentes métodos de diagnosticar este parásito.

La importancia de desarrollar una buena técnica de diagnóstico es fundamental, debido a que sin la misma no es posible dar un tratamiento preciso, evidenciando falencias en el mismo o incluso empeorando la situación del paciente.

### 1.2. Planteamiento del problema

Por una falta de detección de la *Dirofilaria immitis* los pacientes caninos tienden a morir debido a que es una enfermedad enzootica de climas cálidos húmedos, debido a que se transmite por mosquitos y las personas no se percatan de la sintomatología hasta que el animal ya se encuentra en un estado desfavorable. Además, que la *Dirofilaria immitis* tiene un tratamiento, pero la falta de detección de la patología no permite realizarlo a tiempo.

### 1.3. Justificación

En el presente trabajo se enfatiza el determinar una comparativa de las diferentes técnicas de diagnóstico, para así poder establecer la *dirofilariasis* en el canino y ejecutar un correcto tratamiento a tiempo, evitando el deterioro de salud del paciente el cual puede terminar en la muerte.

### 1.4. Objetivos

#### 1.4.1. General

- Determinar los métodos de diagnóstico para comprobar la presencia de *Dirofilaria* en caninos

#### **1.4.2. Específicos**

- Determinar la prueba más específica en el diagnóstico de *Dirofilaria immitis*
- Describir las técnicas de diagnóstico más usadas para la detección de *Dirofilaria immitis*

#### **1.5. Fundamentación teórica**

##### **1.5.1. Dirofilaria Immitis**

Según (Sánchez Klinge et al. 2011:59) “La *Dirofilaria immitis* es un nemátodo común de los caninos en muchas partes del mundo, cuyo hospedador intermediario es el mosquito, siendo su distribución geográfica de tipo mundial, con mayor prevalencia en zonas tropicales y subtropicales”.

Para (Soto Castro 2007) en la forma adulta se ha encontrado que el parásito macho mide de 12 a 16 cm de longitud y la hembra de 24 a 30 cm. Se los ha identificado como vermes delgados y de color blanco (Véase imagen 1). En su morfología se observa que el extremo final del macho es curvo y en espiral y la cola posee alas laterales pequeñas.

Según Soto Castro (2007:5):

Las hembras son vivíparas y las *microfilarias* pueden encontrarse en cualquier momento, habiendo en mayor número por las noches y en los meses de verano. Las *microfilarias* miden 300  $\mu$  de largo y 6  $\mu$  de ancho y pueden vivir más allá de 2 años en la sangre del perro, pero sólo 1 mes en la sangre del gato.

##### **1.5.1.1. Ciclo de vida**

Este parásito es diseminado por varias especies de mosquitos. Sin embargo, puede haber transmisión transplacentaria, pudiéndose encontrar microfilarias en pequeños cachorros. El ciclo de vida inicia en el momento que el mosquito pica a un perro contagiado con el parásito y el vector (el mosquito) lo adquiere y sirve para el desarrollo de los parásitos. Posteriormente a 10 o 15

días la microfilaria se ubica en la saliva del mosquito denominándose la larva infecciosa, la misma que será la que madure en el interior de su hospedero definitivo como lo es el canino, luego el mosquito pica a un perro y las larvas ingresan por medio de la herida del pinchazo y posteriormente de tres a cuatro meses, migran al corazón (ventrículo derecho) y se desarrollan hasta alcanzar la adultes (Sánchez Klinge et al. 2011) (Véase imagen 2).

#### **1.5.1.2. Morfología**

El parásito adulto macho mide de 12 a 16 cm de largo y las hembras de 25 a 30 cm. Son vermes delgados de color blanco, el esófago mide de 1.25 a 1.50 mm. El extremo final de los machos es curvo y en espiral y la cola tiene unas alas laterales pequeñas. Posee de 4 a 6 papilas ovales, en las hembras, la vulva se sitúa justo detrás del esófago (Johnstone 1988)

Microfilarias: En promedio miden alrededor de 308  $\mu\text{m}$ , de largo (con un rango de 295 a 325  $\mu\text{m}$ .) y 5 a 7.5  $\mu\text{m}$ , de ancho, fusiformes, el extremo cefálico es agudo y el extremo caudal puntiagudo y recto, no poseen vaina (Muñoz 2003).

#### **1.5.2. Patogenia**

Según (Kahn y Line 2007: 98):

La gravedad de la enfermedad cardiopulmonar en los perros está determinada por el número de vermes, la respuesta inmunitaria del huésped, la duración de la infección y el nivel de actividad del huésped. Las dirofilarias adultas vivas producen irritación mecánica de la íntima y las paredes de las arterias pulmonares, dando lugar a engrosamiento perivascular con células inflamatorias, incluyendo la infiltración de un alto número de eosinófilos.

Para (Kahn y Line 2007: 98):

Los vermes vivos parecen tener un efecto inmunodepresor. Sin embargo, la presencia de vermes muertos conlleva reacciones inmunes y la subsiguiente enfermedad pulmonar en áreas del pulmón no relacionadas directamente con las dirofilarias muertas. Las infecciones a largo plazo dan lugar a lesiones crónicas y a la subsecuente cicatriz, debido a todos los factores mencionados (es decir, irritación directa, muerte del verme y respuesta inmunitaria).

Menciona (Kahn y Line 2007: 98):

Los perros activos tienden a desarrollar una enfermedad más grave que los inactivos para una misma carga parasitaria. El esfuerzo frecuente incrementa la patología arterial pulmonar y puede precipitar la presencia de síntomas clínicos observables incluyendo insuficiencia cardíaca congestiva (ICC). Las altas cargas parasitarias suelen ser consecuencia de infecciones adquiridas a partir de numerosas exposiciones a mosquitos

### **1.5.3. Síntomas**

Para (Venco 2007) en el gran número de los casos los daños se limitan al sistema cardiorrespiratorio, se observan manifestaciones clínicas como disnea e insuficiencia cardíaca congestiva. Según la patogénesis, la evolución de la enfermedad en perros es frecuentemente crónica. En la mayoría de los casos los pacientes no presentan ningún síntoma, lo cual dura bastante tiempo (meses o años). Los signos de la dirofilariasis se desarrollan gradualmente, en la auscultación se sienten sonidos pulmonares anormales en los lóbulos caudales. Posteriormente cuando se presenta el fallo cardíaco congestivo, se presenta: edema en patas, ascitis, anorexia, pérdida de peso y deshidratación. Durante este tiempo se ausculta un soplo cardíaco debido a insuficiencia de la válvula tricúspide y arritmias cardíacas por fibrilación atrial. Puede ocurrir muerte súbita después de angustia respiratoria o caquexia

#### **1.5.4. Diagnostico**

Existen múltiples formas de diagnosticar *Dirofilaria immitis* y la primera que se tiene que realizar es el examen físico, realizando indagaciones en la anamnesis, confirmando los signos y el área donde habita el paciente (Gispert 2007).

El diagnostico de laboratorio consiste en la detección e identificación específica de las microfilarias y también por ayudas diagnosticas para la detección de antígenos circulantes. Entre las pruebas tenemos el Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA), prueba de inmunocromatografía, son los métodos que permiten identificar antígenos de dirofilaria en circulación. Las pruebas de ELISA usan anticuerpos monoclonales para lograr la detección de antígenos circulantes de *D. immitis*. Las pruebas serológicas funcionan identificando anticuerpos anti-*D. immitis*, mientras que el diagnóstico por PCR es posible a través de la amplificación del ADN de la microfilarias. Ayudas visuales como la radiografía de tórax, ecocardiografía y electrocardiografía los cuales permiten evaluar el estado clínico del paciente (Kahn y Line 2007, Simón 2012).

##### **1.5.4.1. Diagnóstico parasitológico**

Según (Johnstone et al. 1997) ha considerado que es la primera línea de diagnóstico para la infección, fundamentándose en los signos clínicos y la detección directa de las microfilarias en sangre periférica de los caninos.

Sin embargo, cuando el conteo de microfilarias es bajo, se requiere el uso de las técnicas de concentración, siendo la principalmente usada la de Knott modificado, la cual permite evaluar grandes cantidades de muestras y es más precisa la identificación de las especies de filaria por su aspecto morfológico (Knight 1987).

##### **1.5.4.1.1. Método de Knott modificado**

El objetivo es demostrar la presencia de microfilarias circulantes, específicamente cuando la densidad de ésta es muy baja. Con formol a una

concentración del 2% hemolisa los glóbulos rojos, siendo muy fácil observar las microfilarias inmóviles (Girard 2003).

Para realización del método de Knott es necesario 1 ml de sangre obtenida por punción venosa y colocando la muestra en un tubo de 10 ml, preparado con 9 ml de formol al 2% y se realiza una mezcla para homogenizar el formol con la sangre y por medio de esta forma garantizar que la muestra quede fijada con el formol al 2% (Girard 2003).

Posteriormente la muestra se centrifuga a 1500 rpm en un tiempo de 15 minutos, se debe descartar el sobrenadante y teñir el sedimento con azul de metileno. Se utiliza una gota del sedimento teñido para poder observar al microscopio a 40x y 100x y así lograr la identificación morfológica de las microfilarias (Véase imagen 3) (Magnis et al. 2013, Genchi et al. 2009).

Se han identificado varias ventajas en este método como que es fácil de realizar, rápido y económico, permite conservar la morfología y el tamaño de las microfilarias e incrementa la sensibilidad en la detección de microfilarias en muestras de sangre (Magnis et al. 2013, Genchi et al. 2009).

En la observación de microfilarias de *D. immitis* basándose en su morfología se lo considera un resultado 100% confirmativo. Una de las desventajas es que del 30% al 50% de los caninos no presentan microfilaria circulantes, a pesar de tener presencia de los parásitos adultos, estos son de un mismo sexo, siendo eficaz en análisis de un gran número de muestras y es más precisa la identificación de las especies de filaria por su aspecto morfológico (del Valle et al. 2011).

#### **1.5.4.1.2. Técnica de la gota gruesa**

Lo primero en realizar es la colocación de una gota de sangre entre lámina y laminilla, la cual se visualiza en el microscopio con un objetivo de 10X, observando o no las microfilarias (Véase imagen 3). En el mismo tiempo se debe realizar extendidos sanguíneos, fijados con metanos por 1 minuto y

teñido con Giemsa por 2 minutos, permitiendo la observación microscópica de la morfología del parásito (del Valle et al. 2011).

Para (Mylonakis et al. 2004) la técnica de la gota gruesa posee una sensibilidad del 100% solo en microfilaremiás superiores a 400 microfilarias por ml, sin embargo, (Courtney y Zeng 2001) informan que muestras con microfilaremia por encima de 50 microfilarias por ml, la técnica de gota gruesa resulta con una sensibilidad del 100%.

#### **1.5.4.2. Métodos serológicos**

Se fundamentan en la detección de antígenos de *D. immitis* o anticuerpos presentes en el organismo parasitado. La especificidad y sensibilidad de las inmuno-valoraciones enzimáticas actuales son comparadas con el examen directo de microfilarias, han permitido que estos exámenes sean el principal método de identificación prospectivo de la infección en perros asintomáticos y en perros que presentan signos ambiguos de la enfermedad (Johnstone et al. 1997).

Pero se han identificado casos de caninos con bajas cargas parasitarias, en los cuales la detección del antígeno es negativa, a pesar de la identificación de la microfilaremia por el diagnóstico (Knight 1987).

##### **1.5.4.2.1. Prueba inmunocromatográfica o serológica (Alere Heartworm Ag Test Kit®)**

Se debe retirar del paquete de aluminio el dispositivo y se lo coloca sobre una superficie que sea plana, seca y limpia. Se añade dos gotas de suero con la pipeta al pocillo de la muestra. Se visualiza una coloración rosada deslizándose a través de la ventana de resultados en el centro del dispositivo de prueba, en lo cual se interpretan los resultados de 10 a 15 minutos después de iniciar la técnica (Véase imagen 4). Alere Heartworm Ag Test Kit® es un inmunoensayo cromatográfico para la detección cualitativa del antígeno de Heartworm immitis en suero, plasma o sangre canina (Pegado y Andrade 2019).

(Silva y Langoni 2009) mencionan que los falsos negativos pueden ocurrir en casos con baja carga parasitaria y/o baja concentración de antígenos circulantes, supresión por la presencia de antígenos circulantes por tratamiento profiláctico con lactonas macrocíclicas, muerte de parásitos y ausencia o bajo número de hembras maduras, en caso de que todos los parásitos sean machos los resultados son negativos.

#### **1.5.4.2.2. Técnica con uso de estuche comercial tipo ELISA (Snap 4Dx) de IDEXX laboratorios, Inc.**

Según (del Valle et al. 2011) en el procedimiento se usan sueros preservados a  $-20^{\circ}\text{C}$ , los cuales son previamente descongelados y equilibrados a temperatura ambiente durante 30 minutos y se centrifugaron a 550 g por 10 minutos (Véase imagen 5). En el transcurso de 8 minutos están los resultados, como lo indica el fabricante. Se visualiza una coloración azul en la mancha de la muestra que contiene antígenos de *D. immitis* (Véase imagen 6).

#### **1.5.4.2.3. Comparación de seis kits de antígenos comerciales para la detección de infecciones por *Dirofilaria immitis* en caninos**

En opinión a (Henry et al. 2018) el uso de kits de prueba en pacientes, para la detección de antigenemia asociada a *Dirofilaria immitis* se han presentado desde hace treinta años, las cuales se actualizan y mejoran constantemente, de esta forma se define la sensibilidad (Se) y la especificidad (Sp). Se han evaluado cinco kits de detección de antígenos realizando los protocolos solicitados por el fabricante: Anigen Rapid One Step® (nota bio), SNAP® 4Dx Plus Test Kit (IDEXX), WITNESS® Heartworm Canine Heartworm Antigen Antigen Test Kit (Zoetis), VetScan® Canine Heartworm Rapid Test (Abaxis) y Solo Step® CH Canine Heartworm Antigen Antigen Test (Heska), y una microplaca ELISA (DiroCHEK®; Zoetis).

Para (Henry et al. (2018: 2)

Utilizando sueros caninos archivados divididos en cinco subclases de gusanos hembra (0, 1–5, 6–20, 21–40 y >40). Las pruebas del lado del paciente se realizaron una vez, una al lado de la otra, de acuerdo con el protocolo de cada fabricante, por personal que desconocía el estado de *D. immitis* de cada perro. La Se y la Sp globales de los kits del lado del paciente fueron  $\geq 97,5$  y  $=94,0$  %, respectivamente. Para muestras de perros con 1–5, 6–20 y 21–40 *D. immitis*, el Se estaba entre 96 y 100 %, con un ligero aumento en perros con  $\geq 41$  gusanos. La concordancia entre las pruebas para todas las subclases de *D. immitis* la carga estuvo entre el 99 y el 100%. La Se y la Sp del ELISA en comparación con los resultados de la necropsia de los perros fue del 99 y el 96 %, respectivamente. La concordancia entre cada prueba del lado del paciente y el ELISA estuvo entre 97 y 100%. Todas las pruebas disponibles en el mercado pueden brindar a los profesionales una excelente información del lado del paciente, lo que les permite tomar decisiones informadas sobre la necesidad de un estudio de diagnóstico adicional antes de instituir una profilaxis nueva o continua de *D. immitis*.

#### **1.5.4.3. Técnicas moleculares**

Se ha señalado a las técnicas moleculares (reacción en cadena de polimerasa, PCR) facilitan la detección entre *D. immitis* y otras 6 microfilarias caninas, lo cual tiene mucha importancia clínica, debido a que tomando en cuenta esto se puede tomar decisiones adecuadas para la terapéutica oportuna. En conclusión, permiten confirmar los casos de antigenemia negativa en casos con microfilaremia.

##### **1.5.4.3.1. Diagnóstico de *Dirofilaria immitis* por PCR**

Menciona Soares et al. (2022:200)

Actualmente se recomienda la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como prueba específica de especie en la detección de *D.*

immitis. Los métodos moleculares presentan alta sensibilidad, permiten una mejor caracterización y diferenciación de filarias, y pueden detectar animales con baja parasitemia, confirmar casos verdaderos negativos y la prevalencia real del parásito (Véase imagen 7). La asociación de diferentes pruebas diagnósticas para *D. immitis* es una estrategia epidemiológica importante en la detección de animales parasitados en una población y región, ayudando a realizar un diagnóstico certero y consecuentemente reducir la transmisión de este parásito a otros animales y humanos.

Para (Oh et al. 2017) lo primero que se tiene que realizar es la extracción de la sangre en el paciente canino, posteriormente la mezcla de PCR se la procede a preparar con Master Mix 1x (Alphagene, República de Corea), 50 ng de ADN genómico y cebadores 500 nM. El protocolo de PCR incluye un paso inicial de desnaturalización a 95 °C durante 5 min; 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 20 seg, recocido a 60 °C por 20 seg y extensión a 72 °C por 40 seg; y elongación final por 7 min a 72 °C. Todas las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador Veriti™ Dx de 96 pocillos (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) en un volumen total de 20 µL. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 2%.

Oh et al. (2017: 436)

Para confirmar la actividad del cebador, se secuenciaron los productos de la PCR (Bionics, República de Corea). Después de la confirmación de las secuencias, los productos de PCR se purificaron y se insertaron en vectores de clonación pLUG-Prime®<sup>TA</sup> (iNtRON Biotechnology, República de Corea). El plásmido de ADN (pDNA) fue clonado y utilizado como control positivo para la reacción de PCR.

#### **1.5.4.4. Diferencias estadísticas entre los diferentes métodos de diagnóstico de *D. immitis***

Menciona Atas et al. (2018: 130):

Se obtuvieron muestras de sangre entera y suero de 306 perros mayores de 7 meses. Se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el método de Knott modificado (Knott) para detectar las microfilarias y se aplicó el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para detectar la presencia de antígenos de *D. immitis*. La prevalencia de *D. immitis* en perros se detectó en un 2,9% (9/306) por PCR y ELISA y en un 1,3% (4/306) por Knott. Todas las muestras positivas para Knott también resultaron positivas tanto por PCR como por ELISA. Según los resultados de ELISA y PCR, no se encontró diferencia estadísticamente significativa.

#### **1.5.5. Tratamiento**

Según (Nelson y Couto 2010):

El adúlticida de elección es el dihidrocloruro de malarsomina. Es efectivo frente a ambos, tanto formas inmaduras como maduras; los machos de las filarias son más susceptibles que las hembras. La muerte de los gusanos puede ser controlada ajustando la dosis. En perros con una enfermedad más grave es aconsejable emplear un protocolo de dosificación alternativo para provocar muerte gradual en los gusanos. Con este fármaco se presentan con menor frecuencia los embolismos parasitarios después del tratamiento y no es hepatotóxico. La tiacetarsamida es un fármaco derivado de los compuestos arsenicales que es altamente efectivo en contra de los 4 estadios larvarios de *D. immitis* y es el tratamiento de elección en dirofiliariasis felina. Se ha demostrado que la eficacia del fármaco en contra de parásitos hembra en estado larvario es inconsistente, por lo que a veces no es un tratamiento definitivo

La ivermectina es el medicamento más eficaz contra las microfilarias en circulación sanguínea y en útero a la dosis de 50µg/kg SC o PO. Es importante tener en observación al paciente para evidenciar efectos de intoxicación o efectos adversos. Éstos son poco frecuentes y suelen ser por la muerte de una gran cantidad de microfilarias. Puede observarse vómitos, diarrea, depresión, anorexia, hipotensión y choque. Si se sospecha de inestabilidad cardiovascular, se administra solución Ringer Lactato con un corticosteroide soluble (dexametasona, 2mg/kg IV) (Rawlings y Calvert 1997).

### **1.6. Hipótesis**

Ho= No es fundamental la investigación sobre los métodos usados en el diagnóstico de *Dirofilaria immitis* en caninos

Ha= Es fundamental la investigación sobre los métodos usados en el diagnóstico de *Dirofilaria immitis* en caninos

### **1.7. Metodología de la investigación**

Para el desarrollo de la presente investigación se apoyará en el método de investigación de tipo cualitativo, el mismo que se verá fundamentada en la recolección de la información de libros, datos de revistas, artículos científicos, Scielo revistas, las mismas que serán referidas a la identificación de *Dirofilaria*.

## CAPITULO II

### RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN

#### 2.1. Desarrollo del caso

La presente tesina se la desarrolló con el objetivo principal de determinar los métodos de diagnóstico para comprobar la presencia de *Dirofilaria* en caninos, lo cual permite realizar un oportuno tratamiento para evitar el desarrollo prolongado de la enfermedad, sin embargo esto rara vez se da debido a que la enfermedad no presenta signos en sus primeros estadios y se la evidencia cuando se ha desarrollado en el hospedero definitivo.

#### 2.2. Situaciones encontradas

El desarrollo de cada técnica tiene su confiabilidad, es por esto que las técnicas PCR son la mejor elección para poder identificar esta enfermedad, incluso en sus estadios más tempranos lo cual permite dar un tratamiento oportuno, pero el costo de la técnica de Knott y las pruebas inmunocromatográfica o serológica tienen un costo inferior, es por esto que en estudios que conllevan una población grande, se sigue usando la técnica de Knott a pesar que su especificidad es baja comparada a las demás técnicas y un factor importante es que los clientes en la mayoría de los casos, lo que optan es el precio más bajo. Dejando a los kits de antígenos, como una buena medida, no obstante no da la especificidad de una PCR, pero si brinda una mayor confiabilidad que la técnica de Knott modificado y la técnica de gota gruesa.

#### 2.3. Soluciones planteadas

La solución que se a planteado es el uso de la prueba inmunocromatográfica o serológica las cuales dan resultados rápidos, sin embargo su especificidad no es tan precisa, debido a que tiene que existir hembras de filarias en el torrente sanguíneo, una alta carga parasitaria y al presentar una baja concentración de antígenos circulantes lo que causan es falsos negativos en la pruebas. El costo se reduce mucho en comparación a el uso de Snap, pero los resultados no son confiables.

## **2.4. Conclusiones**

El uso de las diferentes técnicas de diagnóstico ha tenido sus beneficios y complicaciones en el transcurso de los años, en definitiva es indispensable cada una, debido a que tiene un grado de confiabilidad cada una, destacando a las técnicas PCR como el siguiente paso en las pruebas diagnósticas, debido a sus resultados precisos los cuales permiten tratar incluso dependiendo la familia del parásito.

## **2.5. Recomendaciones**

Se recomienda el uso de técnicas PCR, debido a que dan excelentes resultados a pesar del costo en el desarrollo de la misma, es muy beneficiosa permitiendo al médico dar un tratamiento oportuno, el cual va a evitar que la enfermedad siga desarrollándose, caso contrario en pacientes que dan resultados falso negativo las *D. Filarias* seguirán desarrollándose e incluso se puede tener que llegar a operar.

## BIBLIOGRAFÍA

Atas, AD; Altay, K; Alim, A; Özkan, E. 2018. Survey of *Dirofilaria immitis* in dogs from Sivas Province in the Central Anatolia Region of Turkey. Turkish journal of veterinary and animal sciences 42(2):130–134. DOI: <https://doi.org/10.3906/vet-1707-93>.

CDC. 2019. CDC - DPDx - Dirofilariasis (en línea, sitio web). Consultado 4 Apr. 2022. Available at <https://www.cdc.gov/dpdx/dirofilariasis/index.html>.

Courtney, CH; Zeng, QY. 2001. Relationship between microfilaria count and sensitivity of the direct smear for diagnosis of canine dirofilariosis. Veterinary parasitology 94(3):199–204. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(00\)00377-0](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(00)00377-0).

Genchi, C; Rinaldi, L; Mortarino, M; Genchi, M; Cringoli, G. 2009. Climate and *Dirofilaria* infection in Europe. Veterinary Parasitology 163(4):286–292. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.03.026>.

Girard, R. 2003. Manual de Parasitología. Segunda. Nueva Orleans, s.e.

Gispert, C. 2007. Parásitos del corazón en perros. Gispert C (Ed). s.l., Editorial Océano.

Gómez G, LF; Alzate G, GJ; Orozco P, SC. 2006. Reporte de un caso de *Dirofilaria immitis* en un perro. Hallazgo de antígenos y confirmación del parásito a la necropsia (online). Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias 19(1):70–79. Consultado 4 Apr. 2022. Available at [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-06902006000100009&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902006000100009&lng=en&nrm=iso&tlng=es).

Henry, LG; Brunson, KJ; Walden, HS; Wenzlow, N; Beachboard, SE; L Barr, K; Long, MT. 2018. Comparison of six commercial antigen kits for detection of *Dirofilaria immitis* infections in canines with necropsy-confirmed

heartworm status. *Veterinary Parasitology* 254:178–182. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2018.02.037>.

Johnstone, C. 1988. *Parásitos y enfermedades parasitarias de los animales domésticos*. . .

Johnstone, C; Knight, D; Lok J. 1997. *Parasitology-Dirofilaria immitis*.

Johnstone, C; Knight, D; Lok, J. 1997. *Parasitology-Dirofilaria immitis*. s.l., s.e.

Kahn, CM; Line, S. 2007. *Manual Merck de Veterinaria*. Sexta. Barcelona, Oceano.

Knight, D. 1987. Heartworm infection. *Clínica Veterinaria North American* 17:1463–1519.

Magnis, J; Lorentz, S; Guardone, L; Grimm, F; Magi, M; Naucke, TJ; Deplazes, P. 2013. Morphometric analyses of canine blood microfilariae isolated by the Knott's test enables *Dirofilaria immitis* and *D. repens* species-specific and *Acanthocheilonema* (syn. *Dipetalonema*) genus-specific diagnosis. *Parasites & Vectors* 6(1):48. DOI: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-48>.

Muñoz, M. 2003. *Enfermedad del gusano del corazón*. Valdivia, s.e. .

Mylonakis, ME; Papadopoulos, E; Koutinas, AF; Paitaki, C; Leontides, L. 2004. Comparative methodology for the detection and differentiation of circulating microfilariae of *Dirofilaria immitis* in the dog. *Journal of Helminthology* 78(2):137–140. DOI: <https://doi.org/10.1079/JOH2003210>.

Nelson, W; Couto, C. 2010. *Medicina Interna de Pequeños Animales*. ELSEVIER. Barcelona, ELSEVIER.

Oh, IY; Kim, KT; Sung, HJ. 2017. Molecular Detection of *Dirofilaria immitis* Specific Gene from Infected Dog Blood Sample Using Polymerase Chain Reaction. *Iranian journal of parasitology* 12(3):433–440.

Olson, N; Scout, J; Robinson, N. 1982. Central blood volumen and the lung extravascular termal volumen in dogs with dirofilariasis. *Am. J. Vet. Res.* 43:1019–1022.

Pegado, IMP; Andrade, PAA. 2019. Incidência de *Dirofilaria immitis* (LEIDY, 1856) por meio dos métodos de Knott modificado, Gota espessa e Imunocromatografia em cães atendidos no hospital veterinário Prof. Mário Dias Teixeira (HOVET-UFRA). Belém, s.e. 1–43 p.

Pereira, Á; Pérez, M. 2002. Toxoplasmosis. *Ambito farmaceutico* 21:123–129.

Pruebas SNAP con tecnología ELISA - IDEXX Spain. 2022. (en línea, sitio web). Consultado 4 Apr. 2022. Available at <https://www.idexx.es/es/veterinary/snap-tests/snap-tests-technology/>.

Rawlings, C; Calvert, C. 1997. *Verminosis cardiaca*. Buenos Aires, s.e.

Rishniw, M; Barr, SC; Simpson, KW; Frongillo, MF; Franz, M; Dominguez Alpizar, JL. 2006. Discrimination between six species of canine microfilariae by a single polymerase chain reaction. *Veterinary Parasitology* 135(3–4):303–314. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.10.013>.

Sánchez Klinge, ME; Calvo Robayo, P; Mutis Barreto, CA. 2011. *Dirofilaria immitis*: una zoonosis presente en el mundo. *Revista de Medicina Veterinaria* (22). DOI: <https://doi.org/10.19052/mv.560>.

Silva, RC da; Langoni, H. 2009. *Dirofilariose*: zoonose emergente negligenciada. *Ciência Rural* 39(5):1615–1624. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782009005000062>.

Simón, F. 2012. La dirofilariosis animal y humana en España | PortalVeterinaria (en línea, sitio web). Consultado 2 Apr. 2022. Available at <https://www.portalveterinaria.com/articoli/articulos/22035/la-dirofilariosis-animal-y-humana-en-espana.html#>.

Soares, LA; Matias, IC; Silva, SS; Ramos, MEO; Silva, AP; Barretto, MLM; Brasil, AWL; Silva, MLCR; Galiza, GJN; Maia, LA. 2022. Parasitological, serological and molecular diagnosis of *Dirofilaria immitis* in dogs in Northeastern Brazil. *Experimental Parasitology* 236–237:108–233. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2022.108233>.

Soto Castro, SJ. 2007. Determinación de la incidencia de la dirofilaria immitis por medio del método de Knott, en el municipio de roatán, islas de la bahía. Guatemala, s.e. 1–43 p.

Turba, ME; Zambon, E; Zannoni, A; Russo, S; Gentilini, F. 2012. Detection of Wolbachia DNA in Blood for Diagnosing Filaria-Associated Syndromes in Cats. *Journal of Clinical Microbiology* 50(8):2624–2630. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.00528-12>.

del Valle, G; Gómez Martínez, E; el Hen, F; Guzmán, R; Blondell, D; Díaz, MT; Santiago, J. 2011. Boletín de malariología y salud ambiental. (online). s.l., Instituto de Altos Estudios en Salud Pública Dr. Arnoldo Gabaldon, vol.51. 51–58 p. Consultado 3 Apr. 2022. Available at [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1690-46482011000100006&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1690-46482011000100006&lng=es&nrm=iso&tlng=es).

Venco, L. 2007. Enfermedad del gusano del corazón (*Dirofilaria immitis*) en perros. Rolando Editore. s.l., s.e.

## ANEXOS



Imagen 1. Gusanos adultos de *D. immitis* alojados en atrio derecho, que en gran número pueden causar el síndrome de vena cava.

Fuente: Gómez G et al. (2006).

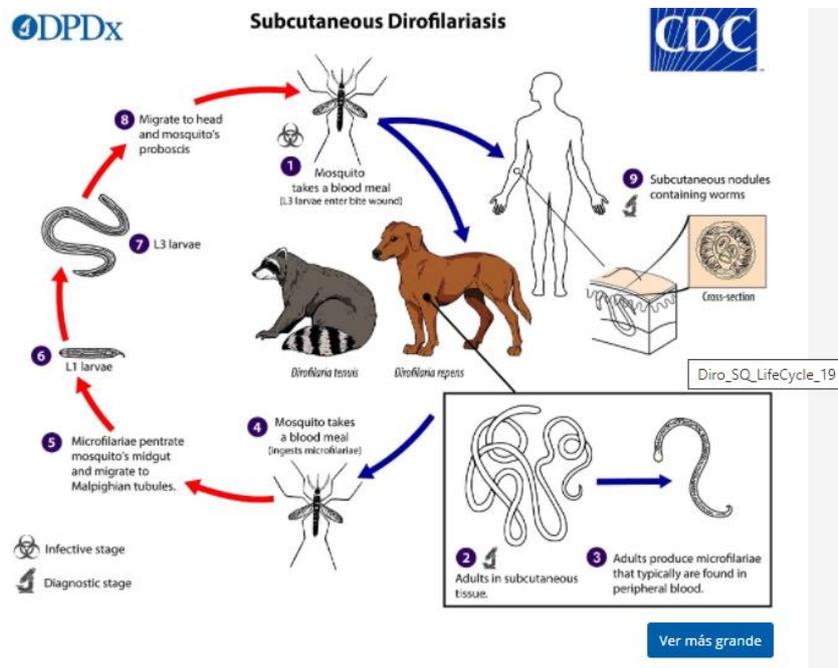


Imagen 2. Ciclo de vida de *D. Immitis*

Fuente: CDC (2019)



Imagen 3. Microfilaria en gota gruesa, aumento de 10x

**Fuente:** Pegado y Andrade (2019).



Imagen 4. Alere Dirofilariose Ag Teste Kit®

**Fuente:** Pegado y Andrade (2019).



Imagen 5. Prueba de SNAP con tecnología ELISA

**Fuente:** IDEXX Spain (n.d.)



Imagen 6. Prueba de SNAP con resultado positivo

**Fuente:** IDEXX Spain (n.d.)

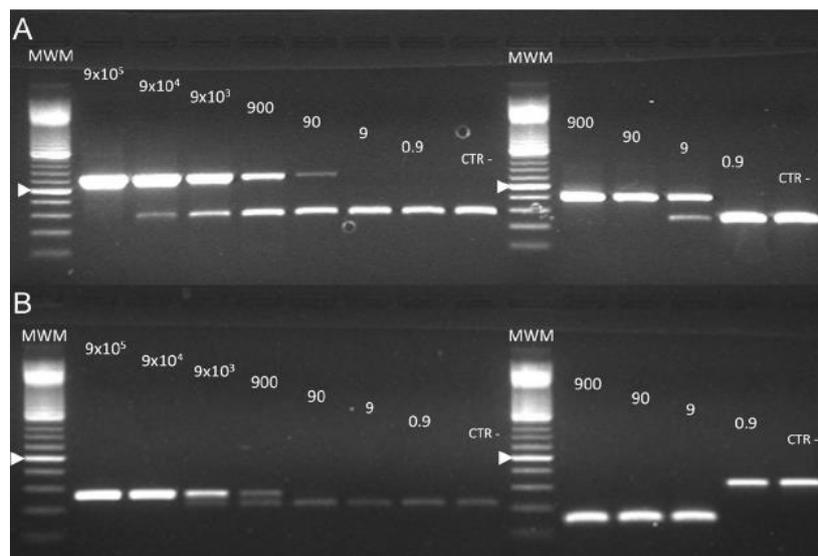


Imagen 7. Sensibilidad de los ensayos de PCR anidada de *Dirofilaria immitis* (A) y PCR anidada de *Wolbachia* (B)

**Fuente:** Turba et al. (2012)

Tabla 1. Presencia de la microfilaria de *Dirofilaria immitis* (en porcentaje de positivo) según las pruebas de Microcapilar, Knott modificado y ELISA, en los distritos del río Chillón, Lima

Distritos	Total de perros	Técnicas		
		Microcapilar	Knott modificado	Elisa
Puente Piedra	45	4.4	4.4	4.4
Comas	40	2.5	2.5	2.5
Carabayillo	35	0	0	0
Los olivos	40	0	0	0
Ventanillas	40	0	0	2.5
				5
Total	200	1.5 ± 1.7	1.5 ± 1.7	3.0 ± 2.4

Fuente: Pereira y Pérez (2002)