

Infección por *Dirofilaria immitis* en felinos y caninos atendidos en clínicas veterinarias de Barranquilla-Atlántico.

Infection by *Dirofilaria immitis* in dogs and cats attended in veterinary clinics in Barranquilla-Atlántico.

¹Angarita Villarroel Eleonora, ¹Díaz Ortiz Diana, ²Badillo Viloría María.

¹ Estudiantes, programa de Microbiología. Facultad Ciencias Básicas y Biomédicas, Universidad Simón Bolívar.

² Profesor Investigador, programa de Microbiología. Facultad Ciencias Básicas y Biomédicas, Universidad Simón Bolívar.

RESUMEN

Introducción: la dirofilariasis, es una enfermedad zoonótica causada por *Dirofilaria immitis*, transmitida por mosquitos vectores como *Culex*, *Aedes*, *Anopheles*, *Mansonia* y *Psophora*, afecta principalmente perros y gatos, y otros. Los reportes en Colombia de Dirofilariasis canina son escasos y se han limitado a estudios de seroprevalencia y en felinos no existen estudios. **Objetivos:** establecer la prevalencia de *D. immitis* y su correlación con aspectos epidemiológicos, clínicos y de laboratorio, en caninos y felinos atendidos en clínicas veterinarias de Barranquilla. **Metodología:** estudio descriptivo de corte transversal. Se analizaron 185 caninos y 25 felinos que cumplieron con criterios de inclusión. Se confirmó la infección por técnicas de microscopía (Knott), inmunocromatografía (Speed Diro Virbac), y molecular; se realizó extracción de ADN y luego una PCR anidada utilizando cebadores del gen de la subunidad I de Citocromo Oxidasa de *D. immitis* y posterior corrido electroforético. **Resultados:** la prevalencia global por *D. immitis* fue de 127/185 (68,6%) caninos y 1/25 (4%) felinos, con base en la positividad de alguna de las técnicas utilizadas, 66,4% por inmunocromatografía, 29,8% por PCR por microscopía 29,1% de caninos positivos. El único felino positivo fue por PCR. **Conclusiones:** los hallazgos encontrados evidencian una alta prevalencia de Dirofilaria en Barranquilla, con respecto a lo reportado en otros estudios. Los datos clínicos y de laboratorio resultan útiles para el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad. La baja prevalencia en felinos hasta el momento podría deberse a la alta inmunidad frente al nematodo, por tanto, se hace necesario el diagnóstico confirmatorio molecular.

Palabras claves: Dirofilariasis, zoonosis, trastornos respiratorios, enfermedades del perro, enfermedades del gato. (Fuente: Decs).

ABSTRACT

Background: Dirofilariasis, is a zoonotic disease caused by *Dirofilaria immitis*, transmitted by mosquito vectors such as *Culex*, *Aedes*, *Anopheles*, *Mansonia* and *Psophora*, mainly affects dogs and cats, and others. Reports in Colombia of Canine Dirofilariasis are scarce and have been limited to seroprevalence studies and in felines there are no studies. **Objectives:** to establish the prevalence of *D. immitis* and its correlation with epidemiological, clinical and laboratory aspects, in dogs and cats treated in veterinary clinics in Barranquilla. **Methodology:** descriptive cross-sectional

study. 185 canines and 25 felines that met inclusion criteria were analyzed. Infection was confirmed by microscopy (Knott), immunochromatography (Speed Diro Virbac), and molecular techniques; DNA extraction was performed and then a nested PCR using primers of the subunit I gene of Cytochrome Oxidase of *D. immitis* and subsequent electrophoretic run. **Results:** the overall prevalence for *D. immitis* was 127/185 (68.6%) canines and 1/25 (4%) felines, based on the positivity of any of the techniques used, 66.4% by immunochromatography, 29.1% by microscopy and 29% by PCR of positive canines. The only positive feline was by PCR. **Conclusions:** the findings found show a high prevalence of *Dirofilaria* in Barranquilla, with respect to what was reported in other studies. Clinical and laboratory data are useful for the diagnosis and prognosis of the disease. The low prevalence in felines so far, could be due to the high immunity against the nematode, therefore, the molecular confirmatory diagnosis is necessary.

Key words: *Dirofilaria immitis*, Zoonoses, Respiration Disorders, Dog Diseases, Cat Diseases (Fuente: MeSH).

INTRODUCCIÓN

La dirofilariasis o enfermedad del gusano del corazón es causada por *Dirofilaria immitis* un nematodo de la familia *Onchocercidae*, es zoonótica, transmitida por mosquitos pertenecientes a los géneros *Aedes*, *Culex*, *Anopheles*, *Mansonia* (1) y afecta principalmente a caninos, felinos y otros mamíferos como lobos, zorro, coyotes, incluyendo el humano (2). La respuesta fisiopatológica a la infección se debe principalmente a la presencia de gusanos adultos que residen en las arterias pulmonares y ocasionalmente se encuentran en el ventrículo derecho del corazón (3). Los principales síntomas clínicos en la dirofilariasis en caninos y felinos incluyen tos persistente, dificultad para respirar, intolerancia al ejercicio, seguidos de ascitis, anorexia y pérdida de peso (1); en ocasiones convulsiones, ocasionando daños en el sistema cardiovascular e incluso causando la muerte del animal (4).

En cuanto al diagnóstico, muchas técnicas de laboratorio están disponibles, entre las que se destacan los métodos de microscopía que permiten la visualización de microfilarias en sangre, métodos serológicos basados en la detección de antígenos o anticuerpos de *D. immitis* y los métodos moleculares (Reacción en cadena de la polimerasa-PCR), que permiten la amplificación para una posterior secuenciación de fragmentos del ADN del parásito. Sin embargo, muchas de estas técnicas tienen limitaciones y pueden arrojar falsos negativos, en función de diversos factores inherentes al sexo, ciclo de vida del parásito, carga parasitaria y/o fase de la enfermedad. La falta de diagnósticos altamente sensibles y específicos de *D. immitis* complica en ocasiones la progresión de la enfermedad a un nivel crónico, afectando las arterias y parénquima pulmonar (1).

D. immitis está ampliamente distribuido a nivel mundial, en América Central y Latinoamérica, las tasas de prevalencia de *Dirofilaria immitis* varían; en México estudios han reportado prevalencias de 2.5 a 33.33 % en varios municipios, utilizando técnicas como microscopía (5) y 17,5% por PCR en 84 caninos para *D. immitis* (6); asimismo, en Brasil, Argentina, Ecuador utilizando técnicas microscópicas como Gota gruesa, Knott

modificado, ensayos inmunocromatográficos y PCR han hallado prevalencia de la enfermedad en caninos del 2,15%, 51,6% y 1,78% respectivamente(7-9).

Por su parte los estudios en Colombia, son escasos y se han limitado a estudios en caninos, por técnicas serológicas y microscopia; en el 2015 se reportó la prevalencia de *D. immitis* en 0% de caninos en la ciudad de Medellín, el 3% en Cartagena y el 1% en Barranquilla, confirmando la infección por medio de la prueba SNAP® 4Dx® Test Kits(10). Otro estudio en Barranquilla y Cartagena también utilizaron prueba SNAP® 4Dx® Test Kits ELISA rápida para detectar antígenos de *D. immitis*, evidenció una prevalencia del 20,8% (11), en el 2017 en Barranquilla se realizó una revisión de los distintos métodos para la identificación de *D. immitis* en caninos, destacando las ventajas y desventajas de cada técnica, se determinó que el uso de la PCR es más confiable y preciso para lograr un diagnóstico (12). En los casos de felinos son pocos los reportes hallados, rara vez se encuentran en la literatura. En América del Sur la *Dirofilariasis* en felinos solo ha sido estudiado en Venezuela y Brasil (13) en Colombia no se ha reportado ningún estudio de *D. immitis* en felinos.

Dado que la salud de las personas está relacionada con la salud de los animales y a su vez con la del entorno, se requiere el control de las enfermedades zoonóticas, además de prevención y reducción; Por lo que se hace necesaria la interacción y cooperación de equipos multidisciplinarios en Salud Pública, Sanidad Animal y Salud Ambiental, tal como lo establece el concepto “One Health” (una sola salud) que busca el control integral y seguimiento de la salud animal y humana, para controlar las enfermedades zoonóticas (14). Teniendo en cuenta lo anterior, el objetivo de esta investigación es establecer la frecuencia de infección por *Dirofilaria immitis* en felinos y caninos atendidos en clínicas veterinarias de Barranquilla-Atlántico y su relación con aspectos epidemiológicos, clínicos y de laboratorio.

MATERIALES Y METODOS

Tipo y tiempo de estudio.

Este estudio es de tipo prospectivo, descriptivo de corte transversal que permite establecer la frecuencia de infección por *Dirofilaria immitis* en caninos felinos y relacionar la infección con variables epidemiológicas, clínicas y paraclínicas en los pacientes del estudio. El estudio se realizó desde Julio de 2016 a mayo del 2019, tiempo en el que se realizaron simultáneamente los trabajos de campo y laboratorio.

Sitio del estudio.

La ciudad de Barranquilla se encuentra situada al norte del territorio nacional, Barranquilla (latitud 10° 53' N, longitud 74° 46'47'W, con una elevación de 98 pies o 30 m.s.n.m) con una extensión territorial de 154 Km², compuesta por 328 barrios. El estudio se llevó a cabo en clínicas veterinarias ubicadas en barrios desde los diferentes puntos geográficos hacia al norte, sur, occidente, oriente y centro de la ciudad, se usaron las zonas de mayor demanda de atención veterinaria de pequeños animales.

Población y muestras.

La población de estudio fueron pacientes caninos y felinos compatibles con la enfermedad, que cumplieron con los criterios de inclusión: pacientes mayores de un año que presentaran signos y síntomas compatibles con la enfermedad (disnea, tos, vómitos intermitentes, signos neurológicos, ascitis, auscultación cardiaca anormal, hidrotórax, quilotórax, pérdida de peso) (15), que acudieran a las clínicas veterinarias durante el periodo del estudio con el consentimiento informado de sus propietarios y que no hubieran recibido tratamiento preventivo adulticida contra el parásito.

Toma y recolección de muestras.

La toma de muestra fue realizada por el veterinario o profesional encargado de las respectivas clínicas, estas muestras fueron obtenidas de la vena cefálica, yugular o safena, con previa asepsia y sujeción adecuada del animal, además del conocimiento del propietario y bajo las normas éticas establecidas (Ley 84 de 1989, en especial el capítulo VI, sobre el uso de animales vivos en experimentos e investigación, se tuvo en cuenta la Resolución N° 008430 de 1993 (4 de octubre de 1993) del Ministerio de Salud de la Republica de Colombia) por lo cual se establecen las normas técnicas y administrativas para la investigación en salud, concernientes a la investigación biomédica con animales, artículo 87, literales c, g y h). El estudio fue aprobado por comité de ética de la Universidad Simón Bolívar, código CEI-USB-CE-0182 acta 00131 del 6 julio de 2016. Las muestras de sangre obtenidas se depositaron en tubos con EDTA y se conservaron a -20 °C para su posterior análisis.

Procesamiento de las muestras.

Análisis por inmunocromatografía.

Las muestras de sangre fueron analizadas mediante el kit comercial Speed Diro (Virbac Colombia Ltda) para la detección cualitativa de antígenos de *Dirofilaria immitis*, siguiendo las especificaciones del fabricante. Las pruebas que fueron negativas para la prueba, fueron confirmadas realizando un tratamiento térmico a las muestras, para esto se calentó la muestra de sangre a 104 ° C durante 10 minutos, luego se centrifugo y se colocó 1 gota del sobrenadante resultante en un nuevo kit (16).

Observación directa de microfilarias en sangre, Prueba de Knott modificada.

La prueba de *Knott* modificada(17) se realizó con las muestras de sangre con EDTA (18), este método es utilizado para determinar la presencia de microfilarias en sangre, para esto se añadió 0,5 ml de sangre con EDTA a 4,5 ml de 2% de formalina, se mezcló por inversión y posterior centrifugación a 3.000 r.p.m. durante 5 minutos. El sedimento se mezcló con 35 ul de 0,1% de azul de metileno y se depositó 20 ul de esta mezcla en un portaobjetos para su observación en el microscopio de luz con aumento de 10x y 40x. Se realizó la distinción de las microfilarias

Extracción de ADN, Reacción en Cadena de la Polimerasa-PCR y corrido electroforético

El ADN se extrajo de las muestras de sangre completa; la extracción se realizó utilizando Kit comercial DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Austria) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN obtenido se conservó a -20°C. Se realizó una PCR anidada, utilizando los cebadores del gen de la subunidad I (COI) de citocromo oxidasa de *D. immitis* los prefijos Fil_COIclon y COIfel se asignaron a los cebadores externo e interno para *D. immitis* los cebadores utilizados aquí se enumeran en la Tabla 1.

Tabla Nro. 1. Cebadores usados en la PCR.

Cebador	Secuencia (5´ - 3´)	Amplificación
fil_COIclon_fwd	ATTGGTGGTTTTGGTAATTGGATGTTG	Primera ronda
fil_COIclon_R	CAGAAGTCCCCAATACAGCAATCC	PCR para <i>D. immitis</i> , 634 pb
COIfel_fwd	GGTCCTGGGAGTAGTTGAAC	Segunda ronda
COIfel_R	TTCACTAACAAATCCCAAACACCG	PCR para <i>D. immitis</i> , 406 pb

En cada reacción de la PCR para todos los ensayos se incluyó 2.5 µl de 10x buffer; 0.2 µl 1U de *Taq* polimerasa; 1.5 µl MgCl₂; 0.75 µl cebadores directos e inversos (cada uno); dNTP 0,625 µl; DNA 2 µl y agua destilada 16,675 µl con un volumen final de 25 µl (tabla 2). La PCR se llevó a cabo utilizando un termociclador con gradiente de EP (Eppendorf), las etapas de la PCR incluyeron una desnaturalización inicial a 95°C durante 4 min, seguido de 40 ciclos de 94°C durante 30 segundo, hibridación o anillamiento de 56.5°C durante 30 segundos y la etapa de extensión de 72 °C durante 45 segundo y un paso de extensión final de 72°C durante 5 minutos. La reacción de PCR de *D. immitis* anidada difiere solo con respecto a una temperatura de hibridación de 54.5°C y una etapa de extensión final de 72°C durante 30 segundos, realizando diluciones 1:10 para la segunda ronda. Los productos amplificados se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 2%(19).

Tabla Nro. 2. concentraciones y volúmenes de reactivos para una reacción de PCR.

Reactivo	Concentración inicial del reactivo	Concentración final Reactivo	Volumen por reacción
Buffer	10x	1X	2,5 µL
Taq polimerasa	5 unidades x µl	1 unidad (0,04 µ/µl)	0,2 µL
Cebadores	10 mM	300 mM	0,75 µL
Magnesio	25 mM	1,5 mM	1,5 µL
DNTPs	10 mM	250 mM	0,625 µL
ADN			2 µL
agua			16,675
Volumen total			25 µL

Análisis de datos.

Los datos se analizaron por medio del programa estadístico SPSS 25®, se empleó un análisis descriptivo, determinándose las medidas de tendencia central y dispersión, en el caso de las variables continuas; para las variables de tipo categórico, se mostraron proporciones. Para medir la asociación entre las variables epidemiológicas, clínicas y de laboratorio con la probabilidad de positividad de la infección por *D. immitis*, con un nivel de confianza del 95% y un valor de $p \leq 0.05$ se generaron los coeficientes de correlación Chi cuadrado de Pearson.

RESULTADOS

De un total de 185 caninos y 25 felinos, se confirmó la infección por *Dirofilaria immitis* en 127 (69%) caninos y 1 (4%) felinos estudiados, con base en la positividad de alguna de las técnicas utilizadas. La positividad más alta fue reportada a partir de la técnica de inmunocromatografía utilizando el kit comercial Speed Diro (Virbac Colombia Ltda) en 123 (66,4%) de los caninos estudiados, el único felino positivo fue por PCR (Tabla 3)

Tabla Nro. 3. Resultados de animales positivos a la infección por *Dirofilaria immitis* atendidos en clínicas veterinarias de Barranquilla- Atlántico.

Técnica	Nro. caninos positivos para <i>D. immitis</i> (%) n=185	Nro. felinos positivos para <i>D. immitis</i> (%) n= 25	*Total
Inmunocromatografía	123 (67)*	0	al Posit ivos inclu yend o el
Microscopia	54 (29)	0	
PCR	20 (30)**	1 (4%)	
Total positivos (1 o más técnicas)	127 (69)	1	

Tratamiento térmico de las muestras.

** n= 67 caninos

32/123 (26%) de los caninos que resultaron negativos para el antígeno de *D. immitis* utilizando el kit comercial Speed Diro (Virbac Colombia Ltda), se mostraron antígenicamente positivos después del calentamiento térmico de las muestras (Figura 1).

De las 67 muestras de caninos analizadas en la primera ronda de PCR utilizando los cebadores acoplados fil_COIclon, se observó la amplificación de una banda de 634 pb en una sola muestra (5%); en la segunda ronda de la PCR anidada utilizando los cebadores acoplados COIfel se observó una banda de 406pb en las 19 muestras restantes (28,3%). El control positivo también amplificó las dos bandas de los mismos pesos en ambas reacciones de PCR (Figura 1).

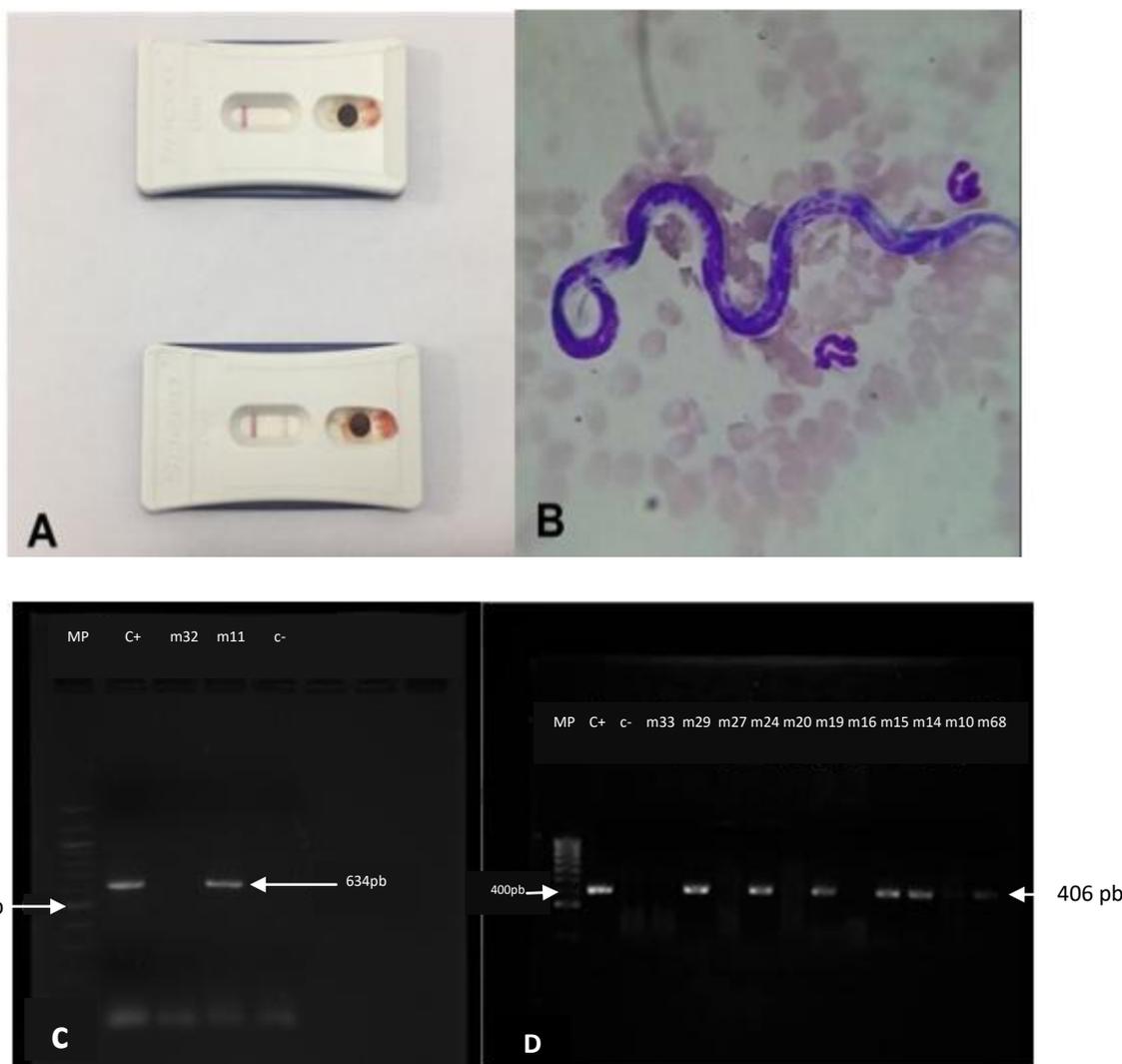


Figura Nro.1. Resultados positivos de infección por *D. immitis*. A) Muestra positiva para *D. immitis* Speed Diro antes y después de tratamiento térmico de la muestra; B) Microfilaria en Extendido de Sangre Periférica, técnica de Knott modificada, vista a 40X; C) Electroforesis en gel de agarosa 2%, PCR amplificación externa del gen Citocromo Oxidasa subunidad I (COI) *D. immitis* 634 pb (carril 1: marcador de peso molecular 500 pb, carril 2: control positivo, carril 3: control negativo, carril 4: muestra positiva, carril 5: muestra negativa; D) PCR amplificación interna 406 pb, carril 1: marcador de peso molecular 100 pb, carril 2: control positivo, carril 3: control negativo, carril 4,6,8,10,13: muestras negativas, carril 5,7,9,11,12,14 muestras positivas.

Resultados de aspectos epidemiológicos.

La infección por *D. immitis* en caninos se presentó con una media en la edad de 73 meses (± 36 DE; rango 1-156 meses), en su mayoría 85 (65,9%), de los caninos positivos estuvieron entre 13 y 84 meses, evidenciando la asociación estadística significativa entre la edad y el resultado a la infección o no por *D. immitis* ($p < 0,05$); 69 (54,3%) de los caninos eran machos y 85 (66,9%) eran caninos de raza pequeña entre los 0-20 kg predominando la raza Mestiza con 52 (40,9%) y Labrador 14 (11%) de los caninos positivos (Tabla 4).

Tabla Nro. 4. Datos epidemiológicos en caninos y felinos con infección por *D. immitis*

Caninos			
Variable	No. de positivos (%) con infección a <i>Dirofilaria immitis</i> n= 127	No. de negativos (%) con infección a <i>Dirofilaria immitis</i> n= 58	p= Valor*
Edad			
(0 a 12 meses)	6 (4,7)	9 (15,1)	0,04
(13 a 84 meses)	85 (65,9)	34 (58,6)	
(> 84 meses)	36 (27,9)	15 (25,8)	
Sexo			
Hembra	58 (45,6)	29 (50)	0,58
Macho	69 (54,3)	29 (50)	
Raza			
Grandes (Mayores de 40 Kg)	1 (0,7)	1 (1,7)	0,61
Medianos (20 a 40 Kg)	41 (32,2)	22 (37,9)	
Pequeños (0 a 20 Kg)	85 (66,9)	35 (60,3)	

* La correlación es significativa al nivel 0,05.

Resultados de aspectos clínicos.

Los signos clínicos más relevantes en los caninos positivos para *D. immitis* fueron decaimiento en 48 (37%), afecciones respiratorias en 46 (36%) inapetencia 34 (26%) y fiebre en 41 (32%) (Figura 2). Dentro de las afecciones cardiorrespiratorias estaban el síndrome de vena cava, reflujo yugular, hipertensión pulmonar, disnea tos y síncope. El felino positivo presentó vómito, problemas de piel y decaimiento.

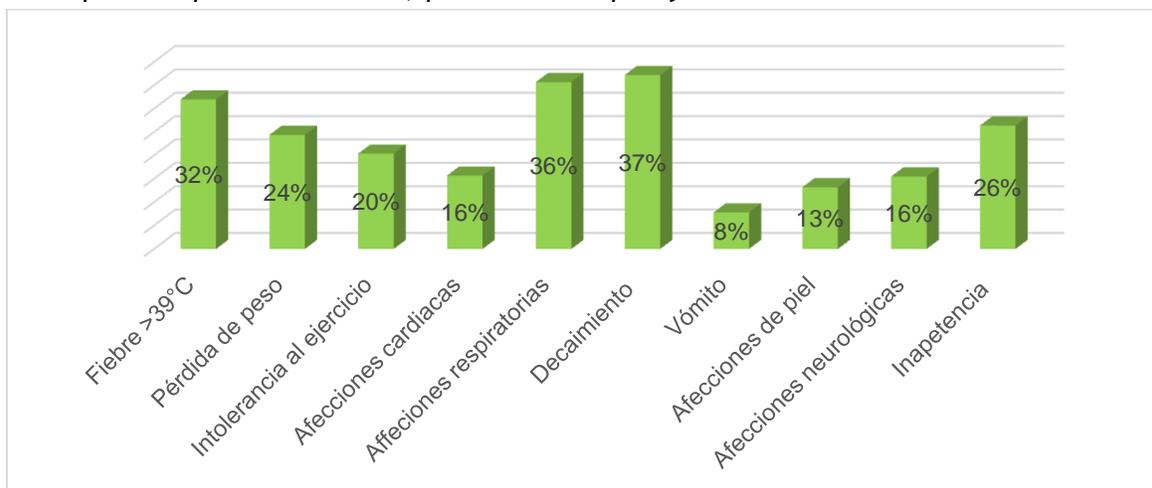


Figura Nro. 2. Manifestaciones clínicas en caninos positivos para *D. immitis*.

No hubo ninguna asociación estadísticamente significativa entre las características clínicas con los resultados positivos o negativos a la infección por *D. immitis* en los caninos estudiados.

Hallazgos de laboratorio.

Los hallazgos anormales más importantes en los caninos positivos fueron, disminución en los valores de hemoglobina en 50 (38,5%) (media=12.7±4.2 g/dL). 39 (30,7%) de los caninos positivos presentaron leucocitosis, con neutrofilia 46 (36,2%). La trombocitopenia se presentó en 65 (50,4%) (Tabla 5).

Tabla Nro. 5. Resultados de laboratorio en caninos con infección por *D. immitis*

Variable	Caninos		p= Valor*
	No. de positivos (%) con infección a <i>D. immitis</i> n= 127	No. de negativos (%) con infección a <i>D. immitis</i> n= 58	
Hematocrito (%) Media=44,3±14.2; Min=11,2; Máx= 92.1	30 (23,3)	17 (29,3)	0,70
Hemoglobina (g/dL) Media=12,4±3.8; Min=2.8; Máx=23.2	50 (38,5)	21 (36,6)	0,82
Globulos rojos (10⁶) Media =6,804±6.3 Min=1.5; Max= 72.4	41 (32,2)	18 (31)	0,40
Leucocitos (10³ xmm³) Media=17,9±20.4; Min=1.9; Máx=172.9	39 (30,7)	14 (24)	0,23
Neutrofilos (10³ xmm³) Media=15,8±20.4; Min=1.6; Máx=152.7	46 (36,2)	19 (32,7)	0,80
Monocitos (10³ xmm³) Media=15,8±20.4; Min=1.6; Máx=152.7	18 (14,1)	7 (12)	0,78
Linfocitos (10³ xmm³) Media=1,0±1.5; Min=0.0; Máx=11.0	24 (18,6)	5 (3,9)	0,39
Plaquetas (10³ xmm³) Media=246,8±211,8; Min=10,000; Máx=1541,000	65 (50,4)	21 (8,6)	0,15

Min: Mínimo, Max: Máximo. * La correlación es significativa al nivel 0,05.

No hubo ninguna asociación estadísticamente significativa entre los hallazgos de laboratorio con los resultados positivos o negativos a la infección por *D. immitis* en los caninos estudiados.

DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó la frecuencia de *Dirofilaria immitis* en felinos y caninos atendidos en clínicas veterinarias de Barranquilla, la prevalencia global fue de 68,6% (127 caninos) usando tres técnicas (microscopia, inmunocromatografía y PCR). Hasta la fecha esta ha sido la prevalencia mayormente reportada en el país; en cuanto a las técnicas utilizadas, el mayor número de positivos en este estudio fue detectado por el kit comercial Speed Diro, con 123 caninos (66,4%), evidenciando igualmente una alta frecuencia de *D. immitis* en caninos en contraste con otros estudios reportados; en el Valle de Aburra, Antioquia hallaron una prevalencia del 0,35% (20) en la ciudad de Medellín (0%), Cartagena (3%), Barranquilla (1%) en el que utilizaron el kit comercial

SNAP® 4Dx® (10). Más recientemente, otro estudio reportó de igual forma prevalencias más bajas, en Barranquilla (24%) y Cartagena (21,5%) utilizando la misma ELISA comercial (21) que el estudio anterior.

Comparando estos resultados y técnicas utilizadas, es importante recalcar que el kit utilizado en el presente estudio, detecta principalmente antígenos circulantes de *D. immitis*, que junto a su alta sensibilidad es posible detectar *Dirofilariasis* oculta (22), mientras que el Kit SNAP® 4Dx®, está diseñado para la detección de cuatro patógenos transmitidos por vectores, simultáneamente, por tanto la coinfección de dos o más enfermedades es muy inespecífica para un diagnóstico de *D. immitis*, trayendo consigo reactividad cruzada y reportes de falsos negativos. Siendo la inmunocromatografía, la técnica de oro para el diagnóstico de *D. immitis*, hay varios factores que pueden influir en sus resultados; la técnica solo puede detectar infecciones a partir de los 6 meses, tiene una sensibilidad de 85,7% a 100% (23), sólo entre el 70 y el 80% de los perros infectados tienen microfilarias circulantes, por lo tanto, las pruebas de antígeno son superiores en la detección de parásitos adultos y tienen casi el 100% de especificidad (24).

Otro aspecto para agregar, que pudiera argumentar la alta frecuencia de *D. immitis* reportada en este estudio, se basa en el tratamiento térmico de las muestras que inicialmente dieron negativos en la prueba de antígeno y después se confirmó su positividad. No se ha identificado el mecanismo por el cual el tratamiento térmico mejora la detección de antígeno, se consideran varias hipótesis; el antígeno se encuentra presente en circulación, pero aparentemente está atrapado en complejos inmunes, lo que impide la detección en ensayos comerciales, al contacto con el calor se altera el complejo inmune (antígeno-anticuerpo) causando su liberación o interrupción, lo que cambia la prueba de falso negativo a positiva para *D. immitis* (17).

Estudios sugieren que el calentamiento de las muestras antes de la prueba, mejora la sensibilidad, sobre todo en caninos infectados con bajo número de gusanos adultos (26). En la Universidad Estatal de Oklahoma, reportaron un trabajo en el que 5/6 (83,3%) de felinos resultaron positivos a la prueba de antígeno, luego del calentamiento de las muestras; en Rumania, antes del calentamiento de las muestras hallaron antígenos circulantes de *D. immitis* en 8,2% de caninos, después del tratamiento térmico aumentó la positividad al 26,8% revirtiendo el resultado, aparentemente las microfilarias se encontraban ocultas en circulación (27); en Alabama, Estados Unidos 154 muestras fueron negativas utilizando el Kit SNAP4 antes del calentamiento, pero 11/154 (7,1%) se volvieron positivas después del tratamiento térmico (28), otro estudio en EE.UU, reportó 15 perros tratados con lactonas macrocíclicas y doxiciclina, fueron negativos antes del calentamiento en un ensayo comercial (DiroCHEK®, Zoetis), pero después del tratamiento térmico, 8/15 (53,3%) resultaron positivos (29).

Con respecto al método molecular en lo reportado en la literatura a saber, este es el primer estudio que ha empleado la PCR para la detección de *D. immitis* en caninos y

felinos en el país, dada la importancia de la infección por el nemátodo en Colombia, sobre todo en zonas costeras como Barranquilla, confirma la endemicidad del parásito y amplia el uso de técnicas diagnósticas más allá de la serología y microscopia. La PCR anidada implementada, evidenció igualmente una alta frecuencia 20/69 (29,8%) en caninos y 1/20 (4%) en felinos, utilizando genes específicos (COX1) (30), este es un gen mitocondrial sensible de la especie *D. immitis*.

Las diferencias observadas entre los resultados obtenidos por PCR con respecto a la serología, podrían deberse, a los límites de detención del nemátodo en sangre o al riesgo de contaminación de los productos de PCR en la apertura de tubos en cada ronda de la PCR anidada al exponer el primer producto amplificado puede contaminarse con enzimas que degraden la integridad del ADN presente (31).

Al ser la Dirofilariasis endémica y común en muchos países, en Latinoamérica el diagnóstico molecular es raro, los resultados encontrados mediante PCR anidada (30) en el presente estudio en contraste con lo reportado en otros países reflejan diferencias; son similares a lo hallado en Costa Rica en el que 9/40 (22,5%) de perros fueron positivos para *D. immitis* utilizando rARN 5.8S por PCR convencional (32), en México se reportó una positividad más baja del 8% en caninos, utilizando cebadores pan-filariales que amplifican una región de ADN ribosomal de 430-664 pb y adicionalmente cebadores específicos de especie - COI, amplificando regiones de 203-208 pb (6).

En contraste con otros estudios en felinos, usando PCR anidada, la prevalencia de *D. immitis* en felinos es similar a lo encontrado en el presente trabajo 1/25(4%); en Corea 4/50 (8%) de los gatos fueron positivos para *D. immitis*, amplificando el gen de la subunidad I de la Citocromo Oxidasa I (COI)(33). Estos resultados podrían estar relacionados con la resistencia natural de los gatos a *D. immitis*, los gatos, frecuentemente son parasitados por pocos nematodos y en muchas ocasiones son parásitos adultos machos; la microfilaremia es baja y su presencia es transitoria debido a la fuerte respuesta inmune de los gatos (34,35).

Los resultados más bajos en el presente estudio, se obtuvieron por la técnica microscópica (29,1%) caninos positivos, esto es coherente, teniendo en cuenta las limitaciones de la técnica de Knott, entre estos aspectos se encuentran, la experticia que requiere analista del laboratorio, para observar las microfilarias moviéndose activamente en forma giratoria entre los hematíes, este método sólo permite la detección de microfilarias por encima de 0,7 mf/l (23). En Colombia, el municipio de Corralillo, Antioquia, una investigación mostró una prevalencia del 33,3% utilizando la técnica de Knott, de los 126 perros investigados, 26 resultaron positivos con la técnica de Knott y 25 por la técnica de sedimentación modificada (36); en el municipio de Sucre, Venezuela 65 caninos estudiados mostraron una prevalencia 7,70% con la técnica de Knott modificada, de los tres caninos con *D. immitis* solo uno presentó dificultad respiratoria y tos, los cuales son signos específicos característicos de la enfermedad del

gusano del corazón (37). En México en el 2019 se encontró el 15.68% de caninos positivos a microfilarias, por medio de frotis sanguíneo y Knott (38).

En cuanto a las variables epidemiológicas, los caninos positivos estuvieron entre 13 y 84 meses, presentando mayor prevalencia en la edad adulta en comparación con perros menores de un año, se ha encontrado en otros estudios asociaciones estadísticas significativas entre la seropositividad y la edad al igual que este estudio fue la única variable estadísticamente significativa (30), en una prueba piloto en la ciudad de Barranquilla y Cartagena con respecto a la edad de la infección de *D. immitis*, en perro adultos mayores 2 a 6 años (23,5-27,1%) respectivamente (11), la incidencia de infección aumenta con la edad, lo que podría deberse a la acumulación de vermes, pero esta tendencia se invierte con edad avanzada, encontrándose las menores tasas de parasitación en perros de más de 10 años, como lo presenta este estudio los caninos positivos mayores de 84 meses solo fueron el 20% puede estar relacionado quizás con la vida media del parásito, muerte de la población susceptible o al desarrollo de inmunidad tras exposiciones repetidas (39).

En lo referido al sexo los machos presentaron una mayor prevalencia de (56,6%) en comparación con las hembras (43,3%), en la actualidad no existe evidencia de susceptibilidad clínica de infecciones relacionadas con el sexo de los caninos en el país, pero en Argentina un estudio demostró que los perros machos tendrían una probabilidad más alta de infectarse que las hembras, puede deberse por su tendencia a vagar, o por su uso para deportes, buscadores, recobradores o caza teniendo una mayor exposición al mosquito (37).

En cuanto a la relación de la infección con parámetros hematológicos, son pocos los estudios reportados, en el presente estudio los hallazgos más importantes fueron la disminución de la hemoglobina en 38,5% y trombocitopenia en el 50,4% de los caninos, esto último se relaciona con el hecho que las plaquetas se adhieren a las superficies subendotelial lesionadas, conllevando a una disminución en sangre periférica (24).

Entre los signos clínicos más importante encontrados estuvieron fiebre, pérdida de peso, intolerancia al ejercicio, trastornos cardíacos y trastornos respiratorios; estos signos clínicos suelen estar asociados al ciclo de vida de nematodo durante la microfilaremia, el número de adultos son bajos y todavía migran; entonces, la mayoría de los pacientes son asintomáticos o tienen signos clínicos inespecíficos. Durante la fase adulta, los parásitos se localizan en la aurícula y el ventrículo derechos, lo que lleva a hipertensión pulmonar, hipertrofia miocárdica y corazón fracaso. En consecuencia, el animal desarrolla insuficiencia cardíaca congestiva crónica derecha (41).

En este estudio la mayoría de los caninos y felinos muestreados eran domésticos con propietarios, con pocos hábitos o estilo de vida al aire libre, a diferencia del estudio realizado en Cartagena y Barranquilla en el 2018 donde la mayoría de los caninos muestreados vivían al aire libre con la exposición constante a vectores, asumiendo que estos tienen una mayor prevalencia de *D. immitis* (11). Lo anterior, recalca la

importancia de implementar adecuadas técnicas de diagnóstico confirmatorio de la enfermedad, siendo Barranquilla una ciudad costera de clima tropical húmedo y caliente durante todo el año y evidentemente este tipo de clima proporciona un ambiente adecuado para la presencia de vectores mosquitos que transmiten de *D. immitis*, los cuales son ampliamente reportados en Colombia y Ecuador (42).

Conclusiones

Los resultados del presente estudio demuestran una prevalencia alta de *D. immitis* con respecto a lo reportado en otros estudios realizados en Colombia, se amplió y complementó el uso de técnicas diagnósticas y por primera vez se realiza un estudio utilizando además de ensayos comerciales y microscopia, el uso de la PCR. Los resultados indicaron la alta sensibilidad del Kit comercial y la PCR. El pre-tratamiento térmico de las muestras demostró ser efectivo para aumentar la sensibilidad del ensayo comercial. La baja frecuencia reportada en felinos hasta el momento evidencia la necesidad del diagnóstico confirmatorio molecular frente a las otras pruebas.

Dentro de las características epidemiológicas más importantes estuvo que el mayor número de positivos para *D. immitis* fueron caninos entre 3 y 7 años, se presentaron cuadros clínicos típicos como afecciones cardiorrespiratorias, decaimiento y fiebre; en los resultados de laboratorio, se halló trombocitopenia y anemia todos los anteriores son signos y síntomas propios de infección por *D. immitis* según lo reportado en la literatura. Con los resultados de este estudio se sugiere empezar una vigilancia epidemiológica de la presencia de la *D. immitis* en Barranquilla que, por su clima tropical, brinda las condiciones para el desarrollo de los mosquitos que sirven como vectores para la transmisión de la enfermedad y quedo demostrado con la alta tasa de infección hallada. La dirofilariasis no solo afecta animales sino también a humanos lo que la convierte en un problema de salud pública.

Referencias

1. Simón F, Siles-Lucas M, Morchón R, González-Miguel J, Mellado I, Carretón E, et al. Human and Animal Dirofilariasis: the Emergence of a Zoonotic Mosaic. Clin Microbiol Rev. julio de 2012;25(3):507-44.
2. Genchi C, Guerrero JRH, McCall JW, Venco L. Epidemiology and prevention of Dirofilaria infections in dogs and cats. En 2007.
3. Prevention C-C for DC and. CDC - Dirofilariasis - Biology - Life Cycle of *D. immitis* [Internet]. 2019 [citado 4 de mayo de 2019]. Disponible en: https://www.cdc.gov/parasites/dirofilariasis/biology_d_immitis.html
4. Borthakur SK, Deka D, Sarma D, Sarmah P. Prevalence and Molecular Epidemiological Data on Dirofilaria immitis in Dogs from Northeastern States of India. ScientificWorldJournal. 21 de enero de 2015;2015:265385.

5. González-Morteo C, de la Cruz-Moreno O, Álvarez-Guerrero C, Peña-Parra B, Carrillo-Díaz F, Borrayo-González J, et al. Prevalencia de *Dirofilaria immitis* en 11 municipios de Nayarit. *Abanico Vet.* diciembre de 2015;5(3):42-8.
6. Torres-Chable OM, Baak-Baak CM, Cigarroa-Toledo N, Blitvich BJ, Brito-Argaez LG, Alvarado-Kantun YN, et al. Molecular detection of *Dirofilaria immitis* in dogs and mosquitoes in Tabasco, Mexico. *J Vector Borne Dis.* 4 de enero de 2018;55(2):151.
7. de Argôlo EGG, Reis T, Fontes DAT, Gonçalves EC, Giese EG, Melo FT de V, et al. Canine filariasis in the Amazon: Species diversity and epidemiology of these emergent and neglected zoonoses. *PloS One.* 2018;13(7):e0200419.
8. *Dirofilariasis canina en zona árida de la provincia de Mendoza, Argentina. Canine dirofilariasis in arid región from Mendoza province, Argentina - PDF [Internet]. [citado 21 de agosto de 2019]. Disponible en: <https://docplayer.es/17738328-Dirofilariasis-canina-en-zona-arida-de-la-provincia-de-mendoza-argentina-canine-dirofilariasis-in-arid-region-from-mendoza-province-argentina.html>*
9. Lara M, Narcila D. Prevalencia de dirofilaria immitis en perros atendidos en el GAD de Durán. 2019 [citado 21 de agosto de 2019]; Disponible en: <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/39280>
10. McCown ME, Monterroso VH, Cardona W. Monitoreo de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, y *Dirofilaria immitis* en perros de tres ciudades en Colombia. *CES Med Vet Zootec.* 16 de diciembre de 2015;10(2):224-31.
11. Labarthe N, Rodriguez N, Couto G, Mendes-de-Almeida F, Guerrero J. A Pilot Survey of Vector-Transmitted Diseases in Cartagena and Barranquilla, Colombia. 16(1):11.
12. Balaguera-Contreras J, Gaviria-Páez G, Marenco-Mercado C. Diagnóstico de laboratorio de *Dirofilaria immitis*: un análisis sobre los distintos métodos. 1 de mayo de 2017 [citado 11 de noviembre de 2019]; Disponible en: <https://bonga.unisimon.edu.co/handle/20.500.12442/1515>
13. Filoni C, Pena HF de J, Gennari SM, Cristo DS, Torres LN, Catão-Dias JL. Heartworm (*Dirofilaria immitis*) disease in a Brazilian oncilla (*Leopardus tigrinus*). *Pesqui Veterinária Bras.* junio de 2009;29(6):474-8.
14. OMS | El enfoque multisectorial de la OMS «Una salud» [Internet]. [citado 22 de agosto de 2019]. Disponible en: <https://www.who.int/features/qa/one-health/es/>
15. Martín FS, Genchi C. *Dirofilariasis and other zoonotic filariases: an emerging public health problem in developed countries.* En 2000.
16. Little SE, Munzing C, Heise SR, Allen KE, Starkey LA, Johnson EM, et al. Pre-treatment with heat facilitates detection of antigen of *Dirofilaria immitis* in canine samples. *Vet Parasitol.* junio de 2014;203(1-2):250-2.
17. Rodríguez Vivas RI. Rodríguez Vivas, R.I. (editor), (2015). *Técnicas para el diagnóstico de parásitos con importancia en salud pública y veterinaria.* Rodríguez-Vivas R.I. Editor. AMPAVE-CONASA. México, D.F. 2015.

18. Rojas A, Rojas D, Montenegro VM, Baneth G. Detection of *Dirofilaria immitis* and other arthropod-borne filarioids by an HRM real-time qPCR, blood-concentrating techniques and a serological assay in dogs from Costa Rica. *Parasit Vectors*. 23 de marzo de 2015;8:170.
19. Oi M, Sato Y, Nakagaki K, Nogami S. Detection of *Dirofilaria immitis* DNA in host serum by nested PCR. *Parasitol Res*. 1 de octubre de 2015;114(10):3645-8.
20. Orozco SC, Arango M, Cardona W. Detección de antígenos de *Dirofilaria immitis* en caninos del Área Metropolitana del Valle de Aburrá. *Rev Colomb Cienc Pecu*. septiembre de 2006;19(3):280-90.
21. Labarthe N, Rodriguez N, Couto G, Mendes-de-Almeida F, Guerrero J. A pilot survey of vector-transmitted diseases in Cartagena and Barranquilla, Colombia. *Int J Appl Res Vet Med*. 1 de enero de 2018;16:63-73.
22. Virbac BVT - Speed Diro [Internet]. [citado 10 de noviembre de 2019]. Disponible en: <https://bvt.virbac.com/en/home/diagnostic-solutions/pour-le-veterinaire-praticien/vector-borne-and-parasitic-disea/main/produits/speed-diro.html>
23. Acuña U P, Chávez V A. Determinación de la prevalencia de *Dirofilaria immitis* en los distritos de San Martín de Porres, Rímac y Cercado de Lima. *Rev Investig Vet Perú*. julio de 2002;13(2):108-10.
24. Gajardo MPM. ENFERMEDAD DEL GUSANO DEL CORAZÓN. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA. :70.
25. Little S, Saleh M, Wohltjen M, Nagamori Y. Prime detection of *Dirofilaria immitis*: Understanding the influence of blocked antigen on heartworm test performance. *Parasit Vectors*. 20 de marzo de 2018;11:186.
26. Little SE, Raymond MR, Thomas JE, Gruntmeir J, Hostetler JA, Meinkoth JH, et al. Heat treatment prior to testing allows detection of antigen of *Dirofilaria immitis* in feline serum. *Parasit Vectors*. 13 de enero de 2014;7(1):1.
27. Ciucă L, Genchi M, Kramer L, Mangia C, Miron LD, Prete LD, et al. Heat treatment of serum samples from stray dogs naturally exposed to *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in Romania. *Vet Parasitol*. 30 de julio de 2016;225:81-5.
28. Velasquez L, Blagburn BL, Duncan-Decoq R, Johnson EM, Allen KE, Meinkoth J, et al. Increased prevalence of *Dirofilaria immitis* antigen in canine samples after heat treatment. *Vet Parasitol*. noviembre de 2014;206(1-2):67-70.
29. Drake J, Gruntmeir J, Merritt H, Allen L, Little SE. False negative antigen tests in dogs infected with heartworm and placed on macrocyclic lactone preventives. *Parasit Vectors* [Internet]. 4 de febrero de 2015 [citado 10 de noviembre de 2019];8. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4336501/>
30. OH IY, KIM KT, SUNG HJ. Molecular Detection of *Dirofilaria immitis* Specific Gene from Infected Dog Blood Sample Using Polymerase Chain Reaction. *Iran J Parasitol*. 2017;12(3):433-40.

31. Georgis' Parasitology for Veterinarians - 10th Edition [Internet]. [citado 29 de octubre de 2019]. Disponible en: <https://www.elsevier.com/books/georgis-parasitology-for-veterinarians/bowman/978-1-4557-4006-2>
32. Wei L, Kelly P, Ackerson K, El-Mahallawy HS, Kaltenboeck B, Wang C. Molecular detection of *Dirofilaria immitis*, *Hepatozoon canis*, *Babesia* spp., *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs on Costa Rica. *Acta Parasitol.* marzo de 2014;60(1):21-5.
33. Park H-J, Lee S-E, Lee W-J, Oh J-H, Maheswaran E, Seo K-W, et al. Prevalence of *Dirofilaria immitis* Infection in Stray Cats by Nested PCR in Korea. *Korean J Parasitol.* diciembre de 2014;52(6):691-4.
34. Litster AL, Atwell RB. Feline heartworm disease: a clinical review. *J Feline Med Surg.* abril de 2008;10(2):137-44.
35. Kramer L, Genchi C. Feline heartworm infection: serological survey of asymptomatic cats living in northern Italy. *Vet Parasitol.* 27 de febrero de 2002;104(1):43-50.
36. Sánchez Klinge ME, Calvo Robayo P, Mutis Barreto CA. *Dirofilaria Immitis*: A Zoonoses Present on a Global Level. *Rev Med Vet.* diciembre de 2011;(22):57-68.
37. Gómez Martínez E, Del Valle G, Toledo J, Simoni Z, Díaz A, Henríquez A, et al. Hallazgo de *Hepatozoon* y otros hemotrópicos en caninos domésticos del municipio Sucre, estado Sucre, Venezuela. *Bol Malariol Salud Ambient.* julio de 2015;55(1):94-104.
38. Romero-Rodríguez P, García-y-González E, Santos-Sotomaior C, Pineda-Burgos B, Olivar-Valladolid G, Hernández-Ruiz P, et al. Prevalencia de *Dirofilaria immitis* en caninos domésticos de dos municipios del trópico de Guerrero, México. *Abanico Vet* [Internet]. 30 de julio de 2019 [citado 11 de noviembre de 2019];9(1). Disponible en: <https://abanicoacademico.mx/revistasabanico/index.php/abanico-veterinario/article/view/195>
39. Kittleson MD. *Medicina cardiovascular de pequeños animales.* Multimédica; 2000. 1 p.
40. Adriana R, Ribicich M, Betti A, Kistermann J, Cardillo N, Basso N, et al. Prevalence of canine dirofilariosis in the City of Buenos Aires and its outskirts (Argentina). *Vet Parasitol.* 1 de noviembre de 2002;109:261-4.
41. Kaewthamasorn M, Assarasakorn S, Niwetpathomwat A. Microfilaruria caused by canine dirofilariosis (*Dirofilaria immitis*): An unusual clinical presence. *Comp Clin Pathol.* 1 de febrero de 2008;17:61-5.
42. *Disease Vector Ecology Profile: Colombia.* :89.