

**PREVALENCÍA DE DIROFILARIASIS CANINA EN LA ZONA URBANA DEL
MUNICIPIO DE BORDO – PATIA DEPARTAMENTO DEL CAUCA –
COLOMBIA 2008**

SANTIAGO REBELO HERNÁNDEZ

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
VICERRECTORIA DE INVESTIGACIONES, POSGRADOS Y RELACIONES
INTERNACIONALES
PASTO - COLOMBIA
2008**

**PREVALENCÍA DE DIROFILARIASIS CANINA EN LA ZONA URBANA DEL
MUNICIPIO DE BORDO – PATIA DEPARTAMENTO DEL CAUCA –
COLOMBIA 2008**

SANTIAGO REBELO HERNÁNDEZ

**Tesis de Grado presentada para optar el título de Especialista en Medicina
Interna de Pequeños Animales**

**ASESOR
Dra. KATA BENAVIDES ROMO**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
VICERRECTORIA DE INVESTIGACIONES, POSGRADOS Y RELACIONES
INTERNACIONALES
PASTO - COLOMBIA
2008**

Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado, son responsabilidad exclusiva del autor

Artículo 1 del Acuerdo No. 324 de octubre 11 de 1996, emanado por el honorable, Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

NOTA DE ACEPTACION

DRA. KATIA BENAVIDES R.
ASESORA

DRA. VIVIANA BENAVIDES B
JURADO

DR. WILLIAM ALBERTO CAÑON F
JURADO

San Juan de Pasto, Noviembre de 2008.

AGRADECIMIENTOS

Mis mas sinceros agradecimientos a la Dra. Katia Benavides R mi asesora, al personal de la Unidad municipal de Asistencia Técnica UMATA del Municipio del Bordo – Patia y a los propietarios de las mascotas que las facilitaron para llevar a cabo el presente trabajo de investigación.

DEDICATORIA

A mis padres

Mi esposa Luz Maria

Mis hijos: Gabriel, Sebastián, Angie, mis hermanos(as), familiares y amigos.

CONTENIDO

| | | Pág. |
|---------|---|------|
| 1 | INTRODUCCION | 17 |
| 2.1 | DEFINICION Y DELIMITACION DEL PROBLEMA | 17 |
| 3 | OBJETIVOS | 18 |
| 3.1 | OBJETIVO GENERAL | 18 |
| 3.2 | OBJETIVO ESPECIFICO | 18 |
| | | 19 |
| 4 | MARCO REFERENCIAL | 20 |
| 4.1 | GENERALIDADES | 20 |
| 4.2 | EPIDEMIOLOGÍA | 20 |
| 4.2.1 | Medio ambiente | 20 |
| 4.2.2 | Prevalencia | 21 |
| 4.2.2.1 | Prevalencia de Dimites a nivel mundial | 21 |
| 4.2.2.2 | Prevalencia en el hombre | 22 |
| 4.2.3 | Clasificación taxonómica | 22 |
| 4.2.4 | Ciclo biológico | 23 |
| 4.2.5 | Patogenia | 24 |
| 4.2.6 | Sintomatología | 25 |
| 4.2.7 | Diagnostico | 26 |
| 4.2.8 | Tratamiento | 27 |
| 5. | METODOLOGÍA | 29 |
| 5.1 | Localización | 29 |
| 5.2 | Población objeto y muestra | 29 |
| 5.3 | Técnicas para recolección y análisis de información | 30 |
| 5.4 | Materiales y métodos | 31 |
| 5.5 | Tes. de Elisa | 31 |
| 5.6 | Técnica microcapilar o Wood | 33 |

| | | |
|-------|---|----|
| 5.7 | Técnica de Knott modificado | 33 |
| 5.8 | Variables a evaluar | 33 |
| 5.9 | Intervalos de confianza | 34 |
| 5.9.1 | ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA COMPARACIÓN DE LAS VARIABLES | 34 |
| 6 | RESULTADOS | 37 |
| 6.1 | DISCUSIÓN | 41 |
| 7 | CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 67 |
| | BIBLIOGRAFÍA | 70 |

INDICE DE TABLAS

| | | Pág. |
|---------|---|-------------|
| Tabla 1 | Frecuencia de dirofilariosis | 38 |
| Tabla 2 | Frecuencia de caninos por técnica ELISA | 38 |
| Tabla 3 | Relación entre razas de perros | 38 |
| Tabla 4 | Relación entre edad de perros | 39 |
| Tabla 5 | Raza por sexo | 42 |
| Tabla 3 | Raza | 43 |

TABLA DE GRAFICAS

| | | Pág. |
|------------|--------------------------------|------|
| Grafica 1 | Raza por sexo | 42 |
| Grafica 2 | Raza | 43 |
| Grafica 3 | Raza – Basset – hound | 44 |
| Grafica 4 | Raza bóxer | 44 |
| Grafica 5 | Raza Caniche | 45 |
| Grafica 6 | Raza Chaw – chaw | 45 |
| Grafica 7 | Raza Criollo | 46 |
| Grafica 8 | Raza fox Terrier | 46 |
| Grafica 9 | Raza labrador | 47 |
| Grafica 10 | Raza P. alemán | 47 |
| Grafica 11 | Raza pequines | 48 |
| Grafica 12 | Raza Samoyedo | 48 |
| Grafica 13 | Raza Shit – zu | 49 |
| Grafica 14 | Raza Snawser | 49 |
| Grafica 15 | Raza fox Terrier | 50 |
| Grafica 16 | Diro total | 50 |
| Grafica 17 | Raza Basset- Hound | 51 |
| Grafica 18 | Raza bóxer | 51 |
| Grafica 19 | Raza caniche | 52 |
| Grafica 20 | Raza chaw - chaw | 52 |
| Grafica 21 | Raza Criollo | 53 |
| Grafica 22 | Raza fox Terrier | 53 |
| Grafica 23 | Raza labrador | 54 |
| Grafica 24 | Raza P. alemán | 54 |
| Grafica 25 | Raza pequines | 55 |
| Grafica 26 | Raza Samoyedo | 55 |
| Grafica 27 | Raza Shit – zu | 56 |
| Grafica 28 | Raza Snawser | 56 |
| Grafica 29 | Raza fox Terrier | 57 |
| Grafica 30 | Diagrama de barras knott total | 57 |
| Grafica 31 | Raza Basset- Hound | 58 |
| Grafica 32 | Raza bóxer | 58 |
| Grafica 33 | Raza caniche | 59 |
| Grafica 34 | Raza chaW- chaw | 59 |
| Grafica 35 | Raza Criollo | 60 |
| Grafica 36 | Raza fox Terrier | 60 |
| Grafica 37 | Raza labrador | 61 |
| Grafica 38 | Raza P. alemán | 61 |

| | | |
|------------|--------------------------------|----|
| Grafica 39 | Raza pequines | 62 |
| Grafica 40 | Raza Samoyedo | 62 |
| Grafica 41 | Raza Shit – zu | 63 |
| Grafica 42 | Raza Snawser | 63 |
| Grafica 43 | Raza fox Terrier | 64 |
| Grafica 44 | Diagrama de barras micro total | 64 |
| Grafica 45 | Diagrama de barras sexo | 65 |

TABLA DE ANEXOS

| | | Pág. |
|---------|----------------------------------|-------------|
| Anexo A | Clasificación | 42 |
| Anexo B | Diagrama de barras de micro-raza | 58 |

GLOSARIO

ANTIGENO: todo cuerpo extraño, microbio, toxina, que introducido a un organismo determina la aparición de un anticuerpo, mismo que tiende a destruirlo.

ANTICUERPO: sustancia elaborada por organismos sometidos a la acción de ciertos productos proteicos, glúcidos o lípidos llamados antígenos.

ATROFIA: disminución adquirida de volumen por defecto de nutrición; refierese a un órgano o porción de órgano.

.ANEURISMA: dilatación por pérdida del paralelismo de la aorta, una arteria cerebral o periférica, o del corazón mismo; en este último caso, subsiguiente a un infarto del miocardio.

ANGIOMA: tumor derivado de los vasos sanguíneos.

ASCITIS: acumulación de liquido en la cavidad abdominal.

BRADICARDIA: latido lento del corazón, con pulso lento.

EPIDEMIA: enfermedad accidental transitoria, casi siempre infecciosa que ataca al mismo tiempo y en el mismo país o región a gran número de individuos.

ENDEMIAS: enfermedad, generalmente infecciosa que reina de manera constante en épocas fijas en ciertos países por influencia de una causal local especial.

PREVALENCIA: frecuencia de una enfermedad en un momento dado, es decir, número de casos en una población.

ESPECIFICIDAD: que caracteriza y distingue una especie de otra.

RESUMEN

La Dirofilariasis canina, conocida como “gusano del corazón “, es una parasitosis ocasionada por el nematodo *Dirofilaria immitis*. Se localiza en el corazón de los caninos, ocasionando una enfermedad cardiopulmonar que repercute a nivel hepato-renal. Los hospederos intermediarios, son los mosquitos hembras del género *Culex*, *Aedes* y *Anopheles*.

La dirofilariasis es una enfermedad cosmopolita la cual se desarrolla en climas tropicales y subtropicales. El objetivo del presente estudio fue evaluar la prevalencia de la dirofilariasis en caninos del área urbana del Municipio Bordo-Patia, Dpto. del Cauca Colombia, utilizando las pruebas de diagnostico de laboratorio; el método de microcapilar, Knott modificado y la prueba enzimática de ELISA. Para el desarrollo del estudio se procedió a muestrear 44 perros escogidos al azar, sin distinción de sexo, raza y edad durante el mes de enero del 2008, encontrándose con los métodos de microcapilar y Knott modificado 4 perros positivos lo que representa una tasa de infección del 9,66; sin embargo por medio de la prueba de ELISA se encontraron 6 perros positivos lo que representa una tasa de prevalencia del 14,17%. La prevalencia encontrada con la prueba de ELISA es mayor debido a que es una prueba de alta sensibilidad y especificidad, la cual detecta antígenos de excreción y secreción de *Dirofilaria immitis*. Se concluye que esta enfermedad presenta una prevalencia alta en el área de estudio.

ABSTRACT

The dirofilariasis canine, well known of the “earthworm heart” is one parasitosis caused by the nematode *Dirofilaria immitis*. Is locate in the heart of the canines, making cardiopulmonary sicknes, that have a repercussions to level hepato-renal. The intermediary is the female mosquitos of kind Culex, Aedes y Anopheles.

The dirofilariasis is a cosmopolitan sicknes develop in tropical whether and subtropicals.

The purpose of this present study was the evaluation and continuation of this dirofilariasis in canines of the urban area of the municipality of bordo – Patia Department del Cauca, usending the diagnostic proof in the laboratory, the metodo of the microcapilar y Knott and the proof enzymatic the ELISA, to develop this study we procedure to take samples from 44 dogs study to choose by chance with out distintion of sex race and age, during January 2008, to finding with the metodo microcapilar y Knott modify from four dogs positives that represent our rate of infection of 9.66; but true tasting of ELISA we found 6 dogs positives that represent one rate of 14,17 % the evaluation faund in the proof of ELISA was meyor because was the high sensibility that let as now antigenos of excretion and secretion of *Dirofilaria immitis*. This finish that this sicknes present high.

INTRODUCCION

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La dirofilariasis es un problema común en muchas áreas del mundo, particularmente en regiones tropicales y subtropicales. Los índices de infestación en perros se aproximan al 50% en las costas del Atlántico y del golfo hasta 250 Kms tierra adentro en Norteamérica.(BIRCHARD y col 2002)

MARTINEZ Y LOPEZ (1988). Reportaron en el municipio de Cali una prevalencia de *D. immitis* del 2.89% en el año de 1998, NAVARRO Y TRIANA encontraron mediante la prueba de ELISA en la ciudad de Bucaramanga una prevalencia del 16% en perros callejeros a *D. immitis* en el año 2002. OROZCO col 2006 encontraron una prevalencia del parásito *D. immitis* en el área metropolitana del valle de Aburra –Antioquia del 0.35%¹

Los movimientos permanentes de mascotas, de regiones de clima frío, a cálido y viceversa pueden contribuir a difundir enfermedades, humanas y de animales a regiones o zonas donde eran desconocidas.

Debido a que el Municipio del Bordo-Patia en el Departamento del Cauca, por su condición climática, es un lugar donde existe la presencia de mosquitos que transmiten la forma inmadura de la enfermedad a los caninos y considerando el escaso reporte de estudios sobre dirofilariasis en esta región, se hace necesario determinar su prevalencia, para tomar las medidas apropiadas encaminadas a evitar y controlar la presencia de la enfermedad. Por consiguiente, cabe preguntarse ¿Cual es la prevalencia de dirofilariasis canina en la cabecera municipal del Bordo-Patia en el Departamento del Cauca?

¹ MARTINEZ Y LOPEZ (1988). Reportaron en el municipio de Cali una prevalencia de *D. immitis* del 2.89% en el año de 1998

1.2 FORMULACION DEL PROBLEMA

La Dirofilariosis canina es una enfermedad parasitaria potencialmente zoonótica, debido a que muchos de los vectores son antropofílicos, siendo importante el control y prevención de esta enfermedad en perros y humanos. Se estima que en los lugares donde la prevalencia de Dirofilariosis canina es superior al 10%, en la población humana este valor se aproxima al 5% (BIOLAWASKI y col., 2001). Así al desconocerse la prevalencia de la enfermedad en perros de una región, se contribuye al subdiagnóstico en el hombre, hecho reforzado por las características asintomáticas de la patología.

En Colombia, ha sido reportada la presencia de antígenos de *D immitis* en caninos en varios departamentos de la costa Atlántica, pacífica, región oriental, central (CARVALHO de MACEDO y col., 1998), en el Amazonas y en la ciudad de Cali (MARTENEZ y col., 1998)). En la población de Santa Fe de Antioquia (VELEZ y col., 1998) y en el Amazonas se han encontrado anticuerpos específicos contra este nematodo en la población humana (VIEIRA y col., 1998).

Para poder determinar o comprobar la situación de Dirofilariosis canina en la zona urbana del Mpio del Bordo Patia, se ve la necesidad de plantear el presente trabajo de investigación, para su estudio epidemiológico de este parásito en la población canina. Los resultados determinarán si es pertinente establecer protocolos profilácticos para los perros recién nacidos, adultos o que entren o salgan de esta región del departamento del Cauca..

Las pruebas serológicas para la dirofilariosis son de valor en perros con sospecha de padecer la infección, por lo que kits de ELISA para antígeno de dirofilarias adultas (DiroCHEK, UNI-TEC CHW y CITE) son de amplia utilización, caracterizados por su alta sensibilidad y especificidad en perros y gatos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Estimar la prevalencia de dirofilariasis canina en la zona urbana del municipio del Bordo-Patia departamento del Cauca. Colombia

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar la prevalencia de dirofilariasis canina mediante la prueba de ELISA “DiroCHEK” en el área de estudio
- Identificar microfilarias de *D. immitis* mediante la prueba microcapilar y de Knott modificada en la población canina en estudio.
- Comparar los valores de prevalencia con las técnicas; microcapilar y de Knott respecto a la prueba enzimática de ELISA, mediante las pruebas estadísticas de Kappa y Mc Nemar para determinar su concordancia y si estas son mutuamente reemplazables y determinar la influencia de las variables edad, sexo, y raza sobre la cantidad de animales positivos mediante la prueba estadística de Chi-cuadrado.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 GENERALIDADES.

La dirofilariasis es una enfermedad producida por el nematodo *D. immitis*, parasito que usualmente afecta a los perros, y a otros mamíferos tales como gatos, zorros, coyotes, lobos y hurones son también susceptibles a la infección.² (SANTHOME., 2001)

La filariosis, se extiende progresivamente a todas las regiones del mundo, junto con la expansión de sus vectores los mosquitos³.(SMITH., 1998).

La enfermedad por gusanos cardiacos en el perro no tiene predilección racial específica. Los animales menores de un año, (pero mayores de 6 meses), así como los gerontes, son los más diagnosticados; sin embargo la mayoría tiene entre 4 y 8 años. Los machos se afectan 2 a 4 veces más que las hembras⁴. (COUTO., 2003)

Los perros machos suelen infectarse con mayor frecuencia, talvez por la mayor exposición a los exteriores. Las razas grandes y medianas se infectan con mayor frecuencia, quizás por el incremento de exposición a los exteriores, comparando con las razas pequeñas o miniaturas⁵. (CALVERT, 1994)

Las razas expuestas con mayor regularidad como; Pastor Alemán, Pointer Ingles, Setter Irlandés, Retriever y Beagle son los que por lo común se infectan. Los Bóxer tendrían una incidencia inusualmente alta⁶ (RAWLINGS y col, 1997)

4.2 EPIDEMIOLOGIA

4.2.1 Medio Ambiente. Este parasito es prevalente en zonas templadas tropicales y subtropicales, estando su difusión estrechamente relacionado con la presencia y

² SANTHOME., 2001

³ SMITH., 1998

⁴ COUTO., 2003

⁵ CALVERT, 1994

⁶ RAWLINGS y col, 1997

distribución de los hospederos intermediarios. La dirofilariasis canina es un problema internacional, el cual ocurre en todos los continentes, excepto en la Antártida. (Leguia,1996)

Existen cuatro razones que pueden explicar, la viabilidad de la enfermedad en el tiempo:

- Población de hospederos susceptibles.
- Reservorios de la enfermedad
- Población de hospederos intermediarios
- Clima propicio para el desarrollo del parásito

El incremento de la presencia de *D. immitis* en los últimos años, se pudo haber originado por:

- Introducción de perros infectados a zonas no endémicas.
- Incremento de la población en áreas rurales, lo que permite el contacto entre los Vectores y las mascotas.
- Incremento de la población de perros.
- Presencia de vectores de *D. immitis*, los cuales tienen una mayor prevalencia en riberas de los ríos, aguas estancadas y pantanos.
- Mejores técnicas de diagnóstico.

4.2.2 Prevalencia. La prevalencia, P, se refiere a la cantidad de enfermedad presente en una población conocida durante un periodo de tiempo determinado, sin distinguir los casos antiguos. Así, se puede describir una prevalencia anual, mensual o de toda la vida. A pesar de que la prevalencia puede ser definida simplemente como el número de animales afectados, generalmente se expresa en términos del número de animales enfermos en relación con el número de animales existentes en la población en riesgo de desarrollar la enfermedad. Su cálculo se estima mediante la expresión:

$$P = \frac{\text{Numero de animales que presenta una enfermedad} \\ \text{En un periodo de tiempo completo.}}{\text{Número de individuos en riesgo de la población,} \\ \text{En ese mismo periodo de tiempo.}}$$

4.2.2.1 Prevalencia de *D. immitis* a nivel mundial. La dirofilariasis tiene una alta prevalencia en Brasil, estudios realizados en perros de Río de Janeiro se encontró una prevalencia de 21.3%, sin embargo en la costa de la ciudad de Niteroi la prevalencia observada es de 37,5% (Labarthe y col, 1998).

Bullman y Col (Grubissich 1999) en un estudio realizado entre 1987 y 1988 en la zona del litoral de Argentina encontraron una prevalencia del 12% en Formosa, 3,1% en Corrientes y 3,4% en Resistencia y posteriormente entre 1988 y 1989 encontraron una prevalencia de 36% en Formosa, 10.9% en Corrientes y 11.8% en Resistencia.

Samano y Col (Heartworm Symposium, 1988), estudiaron la prevalencia de *D. immitis* en perros de diversas ciudades de México encontrando una prevalencia de 13% en Tamaulipas, 0,4% en Cuernavaca y 2,7% en la ciudad de México, 3,8% en Guadalajara, 9.2% en Veracruz y 15,6% en Tabasco. La enfermedad ha sido endémica en el sureste de las costas Atlánticas y del Golfo de México así como en Texas.

En Alemania la dirofilariasis ha sido descubierta por medio de exámenes de sangre para microfilarias en 13% de perros con historia de viajes a Italia, Portugal y España; y 10% en perros importados de Italia, España y Portugal (Tarello, 2000).

Wang (Heartworm Symposium, 1989) estudio la filariasis canina en el norte de Taiwán utilizando muestras de sangre y suero las cuales fueron examinadas por medio de los test de Knott modificado y la prueba enzimática de ELISA, reportando 60,6% de infecciones por microfilarias 55% pertenecen a *D. immitis* y el resto a *Dipetalonema reconditum*.

En Colombia se ha reportado la presencia de *D. immitis* en caninos en los departamentos de la costa atlántica, la costa pacífica, las regiones oriental y central del país, en el amazonas y en la población de Santa Fe de Antioquia, con una prevalencia entre el 4,8 – 8,4 % (Guerrero y col 1989).

4.2.2.2 Prevalencia en el hombre. De Campos y col (Heartworm Symposium, 1998), realizaron un estudio retrospectivo en aspectos clínicos, radiológicos y patológicos en 24 casos humanos confirmados de Dirofilariosis pulmonar en la Universidad de Sao Paulo y el Hospital Albert Einstein en Brasil entre el periodo de 1982 a 1996.

El estudio se realizó en 17 pacientes hombres (70,1%) y 7 pacientes mujeres (29,9%) con un promedio de edad de 51,4 años; 54% de los pacientes eran asintomáticos y 75% presentaban un nódulo no calcificado subpleural pulmonar, el cual fue diagnosticado por scanner y radiografía torácica. El examen patológico reveló nódulos con necrosis central y tejido fibroso, los vasos sanguíneos demostraron endoarteritis.

En dos casos en Estados Unidos y uno en Brasil, se encontró el parásito en el corazón en el lado derecho, en los demás casos la dirofilaria se encontró alojada en el lóbulo del pulmón derecho donde este ocluía parcialmente una pequeña arteria y formaba un trombo (Acha, 1981).

En el Amazonas se han encontrado anticuerpos específicos contra este nematodo en la población humana (Vieria y col 1998)

4.2.3 Clasificación Taxonómica. La clasificación taxonómica de *D. immitis* corresponde a la siguiente:

NOMBRE COMÚN: Gusano del corazón del perro

| | |
|----------|--------------------|
| REINO: | Animal |
| PHYLUM: | Nematelmintos |
| CLASE: | Nematodo |
| ORDEN: | Spirurida |
| FAMILIA: | Filaridae |
| GENERO: | <i>Dirofilaria</i> |
| ESPECIE: | <i>immitis</i> |

4.2.4 Ciclo Biológico. El ciclo vital, puede implicar muchas especies de mosquitos como huéspedes intermediarios. Los principales mosquitos transmisores son las especies *Aedes scapularis*, *Aedes taeniorhynchus*, y *Culex quinquefasciatus*, los cuales están reportados en Colombia⁷. (Parker B M. 2000).

Las microfilarias son ingeridas por el mosquito mientras se alimenta. Dentro del mosquito, Las larvas (L1) migran al estomago y luego a la boca (L3) durante el desarrollo. Cuando el mosquito se alimenta nuevamente, los L3 infestantes se depositan sobre la piel del animal y penetran a través de la herida de la mordedura. Un único mosquito puede transmitir hasta 10-12 L3.

Los estadios L3 mudan en la piel y migran hacia las arterias pulmonares ± 100 días después de la infección, tiempo durante el cual se desarrolla hasta la L5 (1 -2 cm. de longitud). Los L5 se encuentran principalmente en las arterias pulmonares caudales y distales; durante los 2-3 meses siguientes, se desarrollan hasta gusanos cardiacos adultos maduros y migran retrógradamente hacia el ventrículo derecho. Si están presentes adultos de ambos sexos, las microfilarias se producen 6-7 meses después de que el animal fuera infectado con L3⁸.(Georgi,1982).

Los machos adultos alcanzan de 14 a 19 cm. de largo y las hembras de 23 a 31 cm, en un periodo de tiempo de 174 a 223 días. El periodo reproductivo del

⁷ Parker B M. 2000

⁸ Georgi,1982

parasito comprende entre los 2 a 5 años y el periodo de vida es de 5 a 7 años⁹. (Soulsby, 1987)

4.2.5 Patogenia

Respuesta a los parásitos vivos. Los vermes residen en las arterias pulmonares caudales, cuando la cantidad aumenta, los parásitos se movilizan contra corriente hacia el ventrículo derecho¹⁰. (Rawlings y col 1997)

Los gusanos adultos dentro las arterias pulmonares dañan la cobertura endotelial, la cual incrementa la permeabilidad a las proteínas séricas y agua. Las plaquetas y leucocitos parecen liberar factores tróficos como el factor de crecimiento o PDGF (factor de desarrollo de la miointima) lo cual estimula la migración y multiplicación de las células musculares lisas dentro de la túnica media dando lugar a la hiperplasia de la intima. Estas células y el colágeno que producen en la proliferación patognomónica de vellosidades las cuales recubren todo el endotelio de la arteria pulmonar ocasionando una endocarditis y endoarteritis fibrinosa. Cuando las arterias pulmonares son examinadas en la necropsia, la superficie normal de las arterias es remplazada por una superficie rugosa, aterciopelada y morada¹¹. (Rawlings y Calvert 1997)

La hipertensión pulmonar es la mayor consecuencia de la proliferación de parásitos, produciendo una mayor resistencia en la pared arterial debido al engrosamiento ocasionando aumento de la presión, el trabajo extra que genera el ventrículo derecho para mantener el normal flujo sanguíneo producen dilatación del ventrículo derecho la cual incrementa el volumen diastólico final, hipertrofia y fallo cardiaco¹². (Johnstone y col 1997)

Este parasito ejerce una acción mecánica por obstrucción principalmente de la arteria pulmonar y la cámara ventricular del corazón derecho, lo cual interfiere con el paso normal de la sangre y el cierre de las válvulas (Quiroz, 1990).

En infecciones masivas de más de 100 parásitos se da lugar a una interferencia mecánica en el bombeo de la sangre y cierre de las válvulas atrio ventricular derecha e izquierda, así como la obstrucción parcial o total de la vena cava.

BORCHET (1981), reporta que la localización de los vermes adultos y la intensidad de la infestación determinan los procesos patológicos. En el corazón se desarrolla

⁹ Soulsby, 1987

¹⁰ Rawlings y col 1997

¹¹ Ilibib

¹² Johnstone y col 1997

una endocarditis crónica con formación de trombos y embolias. La afección de las arterias pulmonares provoca su dilatación en casos leves en las cavidades cardiacas y en las arterias se han desarrollado hasta 50 vermes y en los casos graves varios centenares¹³.

ETINGER y FELDMAN (1997), concluyen que la lesión asienta en la proximidad de las arterias pulmonares con edema y exudados inflamatorios que se acumulan a causa de la mayor permeabilidad vascular a las proteínas sericas y líquidos¹⁴.

Respuesta a parásitos muertos. El peor estado de esta verminosis es el que se aprecia después de la muerte de los vermes adultos y el posterior arrastre de sus fragmentos distalmente hacia las arteriolas. La proliferación vellosa es exuberante produciendo una severa trombosis y una reacción inflamatoria granulomatosa en la pared vascular la cual se puede extender hacia el parénquima pulmonar cerca de los gusanos muertos lo cual deteriora el flujo sanguíneo (Rawlings y Clavert 1997).

4.2.6 Sintomatología. FERNANDEZ (2000), resalta que la tos y la dificultad respiratoria son los signos mas frecuentes, otras alteraciones son: la fiebre, falta de apetito, intolerancia al ejercicio, perdida de peso. En general estos síntomas son progresivos durante un lapso de pocas semanas hasta seis meses o más¹⁵.

En el síndrome cor pulmonale, en los primeros momentos de la enfermedad se puede observar intolerancia al ejercicio. Luego se aprecia, pérdida de peso gradual y tos esporádica. A menudo que la enfermedad progresa aumenta la tos y se desarrolla insuficiencia respiratoria, incluso en el perro en reposo. En la revisión clínica se puede auscultar soplos de grado variable el cual es un signo indicativo de la hipertensión pulmonar avanzada, mucosas pálidas y alteraciones en los sonidos pulmonares así como aumento del murmullo vesicular (Thrall, 2001)

La mayoría de los casos son asintomáticos, cuando estos aparecen podemos ver: perdida de la resistencia al ejercicio, fatiga, perdida de peso, anemia, dificultad respiratoria y tos al ejercicio, sincope, insuficiencia cardiaca congestiva, en casos severos y con ella ascitis y edema de los miembros. (LOIS y VECHIONE y col 2002).

En el síndrome de la vena cava, se presenta en forma aguda con signos clínicos de shock hipovolemico debido a la obstrucción y disminución del retorno venoso, mucosas pálidas, aumento del tiempo del llenado capilar, extremidades frías, taquicardia, pulso débil. La masa de parásitos interfiere en la función valvular con regurgitación tricuspídea junto a la hipertensión pulmonar, resultando una

¹³ BORCHET (1981

¹⁴ ETINGER y FELDMAN (1997),

¹⁵ FERNANDEZ (2000),

disminución del prellenado ventricular izquierdo y falla congestiva ventricular derecha. Existen grados variables de disnea, pulso yugular, soplos y hemoglobulinuria severa que se considera signo patognomónico debido a una hemólisis severa (Grubissich, 1999).

El desarrollo de la insuficiencia cardiaca derecha, trae como consecuencia, congestión del parénquima hepático. Se desarrolla anemia, azoemia y la muerte ocurre entre 1 a 3 días. Estos signos son más severos en los casos de síndrome post caval, llegando a provocar necrosis centrolobulillar.

La hemoptisis se presenta en la enfermedad grave acompañada de tromboembolia pulmonar e hipertensión pulmonar. Puede verse antes, pero se presenta con mayor frecuencia después del tratamiento adulticida¹⁶. (BIRCHARD y SHERDING, 2002)

4.2.7 Diagnostico. Las pruebas diagnosticas para dirofilariasis comprenden un recuento sanguíneo completo, la prueba de Knott modificado, radiografías de tórax, examen de las heces, ECG, antígenos por ELISA, lavado traqueal y arteriografía.

Las técnicas de concentración (modificada de Knott y las pruebas de filtro) han demostrado con éxito microfilarias en una muestra de sangre en $\pm 60\%$ de los perros. Debido a que las microfilarias sobreviven después de que los gusanos adultos han muerto, un pequeño porcentaje de los perros pueden tener microfilaremia, pero no gusanos adultos en el corazón. Además, los cachorros nacidos de perras con un recuento elevado de microfilarias pueden tener una microfilaremia transitoria que no puede transformarse en una infección por adultos. Las microfilarias de *D. immitis* deben diferenciarse de las filárides no patógenas, basándose en la morfología y características de tinción con fosfatasa ácida.

El diagnostico de la dirofilariosis se basa en una prueba positiva de inmunodiagnostico o en la presencia de microfilarias en la sangre periférica del perro, con o sin hallazgos clínicos o radiológicos, compatibles con la enfermedad.

Los estudios convencionales de laboratorio varían según la edad del animal, los signos clínicos y las preferencias de cada clínico.

Se debe incluir para el diagnostico de dirofilarias un hemograma, un recuento de plaquetas, un perfil bioquímico del suero y un análisis de orina. Se aconseja la radiografía de tórax porque evidencia gravedad de la enfermedad más que ninguna otra prueba concreta.

COUTO (2003) sugiere que la eosinofilia, basofilia y/o monocitosis son irregulares; menos del 50% de los casos exhibe eosinofilia. Una anemia regenerativa leve se presenta en menos del 30% de los pacientes, proveniente de la hemólisis. La

¹⁶ BIRCHARD y SHERDING, 2002

proteinuria se detecta en un 20 a 30% de los casos, sobre todo en aquellos de edad avanzada. GOMEZ y col (2006), encontraron actividad sérica elevada de la ALT y la AST.

Métodos serológicos: ELISA. El alto grado de especificidad y sensibilidad de las inmunovaloraciones enzimáticas actuales para antígeno circulante del gusano del corazón comparado para microfilarias, han hecho que estas pruebas sean el principal método de identificación a la infección en perros asintomáticos y a los que tienen signos de enfermedad escasos.

La sensibilidad de la prueba de ELISA para gusano del corazón depende de la duración de la infección y del número de gusanos adultos. Aunque es posible detectar antígenos tan temprano como 5 meses después de la infección, no suele ocurrir hasta que los gusanos comienzan a producir microfilarias alrededor de los seis meses y medio y quizás no se encuentren hasta después de los 7 meses. La mayor parte si no es que la totalidad del antígeno que se vierte a la circulación se atribuye a vermes hembras (Knight, 1997)

Detección de microfilarias

Método de microcapilar. El diagnóstico se basa en la demostración de microfilarias vivas en sangre mediante el volumen de paquete celular (VPC), lo cual se obtiene del examen del hematocrito. Las larvas se observan moviéndose activamente en la capa flogística, pero el diagnóstico no es concluyente debido a que se requiere la medición de las larvas para un diagnóstico definitivo¹⁷. (Soulsby, 1987; Maxine, 1991)

Test de Knott modificado. En esta prueba se produce hemólisis y fijación de las microfilarias (Rawlins y Calvert 1997) por lo que permite examinar una mayor cantidad de sangre que en el frotis sanguíneo. En el test de Knott se mezclan 1 ml de sangre y 9 ml de formalina al 2% y se centrifugan por 5 minutos. El sedimento se tiñe con azul de metileno y se observa al microscopio¹⁸ (Soulsby, 1987)

Las microfilarias de vermes cardiacos se pueden observar al microscopio al examinar los filtros a través de los cuales ha pasado la sangre no coagulada, mediante centrifugación de las muestras de sangre o en las extensiones del estrato leucocitario de la sangre centrifugada¹⁹. (SODIKOFF, 2002).

Dentro de las limitaciones del test de Knott están las restricciones en cuanto al horario de toma de muestras el cual se debe realizar a partir de las 18 horas debido

¹⁷ Soulsby, 1987; Maxine, 1991

¹⁸ Soulsby, 1987; Maxine, 1991

¹⁹ SODIKOFF, 2002

al ciclo circadiano del parásito, además de la dificultad en cuanto a la diferenciación de las larvas de *D. immitis* de las de *Dipetalonema reconditum*. (Santome, 2001)

4.2.8 Tratamiento. El objetivo del tratamiento es eliminar todas las dirofilarias adultas con un adulticida y todas las microfilarias con un microfilaricida, con la mínima toxicidad farmacológica y un grado tolerable de tromboembolia pulmonar debido a la muerte de los parásitos. (American Heartworm Society, 2000)

Terapia Adulticida. El tratamiento de vermes cardíacos adultos, se elige solo después de establecer un diagnóstico firme de infección.

LOIS y VECCHIONE (2002), reportan que previo al tratamiento se hace necesaria la realización de un perfil orgánico general y radiografías para evaluar, como incidirán las medicaciones suministradas (en ocasiones tóxicas para hígado y riñón) a más de los vermes adultos que al morir se desintegran y sus restos pueden llevar a oclusiones o taponamientos de los vasos menores pulmonares.

Las drogas para eliminación de parásitos adultos han sido aprobadas por la Food and Drug Administration (FDA) así:

TIACETARSAMIDA SODICA (Caparsolate ®) es un órgano arsenical muy utilizado, pero no mata con seguridad todos los vermes, debe ser administrado por vía endovenosa con gran cuidado para evitar la inflamación perivascular intensa y necrosis en el sitio de la inyección. La dosis EV de tiacetarsamida es de 1 ml de solución al 1% por c/ 5 Kg. de peso (2.2 mg/kg) dos veces al día por dos días (Knight, 1997).

En ocasiones ocurre hepatotoxicidad aguda durante el tratamiento, si se presenta anorexia total, vómitos recurrentes e ictericia debe suspenderse el tratamiento. Los signos clínicos de embolización por los vermes como fiebre, tos y hemoptisis suele ocurrir entre cinco y diez días después del tratamiento²⁰ (Knight, 1997, American Heartworm Society, 2000).

COUTO,(2003), resalta que un 2 a 24% de los perros tratados con Tiacertasamida sufren signos de hepatotoxicidad y/o nefrotoxicidad y la sintomatología abarca depresión aguda, anorexia, emesis repetida, ictericia, fiebre, diarrea e incluso la muerte. Las anomalías clínicas patológicas acompañantes son: azotemia, hiperactividad de enzimas hepáticas, cilindraría y bilirrubinemia.

Al respecto, COUTO (2003), manifiesta que si se sospecha una extravasación mínima durante la inyección, el área debe ser infiltrada con solución salina estéril y lidocaina para diluir el compuesto, acompañado de dimetil sulfoxido (DMSO) tópico en el sitio de la inyección cada 4 a 12 horas durante varios días

²⁰ Knight, 1997, American Heartworm Society, 2000

CLORHIDRATO de MELARSOMINA (Immiticide ®) es un nuevo adulticida órgano arsenical mucho más eficaz que la tiacetarsamida. La ventaja de este producto es la facilidad de administración por inyección intramuscular profunda en los músculos lumbares, entre el espacio de las vértebras lumbares L3 y L5, puede presentarse cierta tumefacción muscular y algunos días de molestia leve. El tratamiento consiste en dos dosis I.M de 2.5 mg/Kg. con diferencia de 24 horas, el cual se repite en cuatro meses²¹ (Knight, 1997).

Terapia Microfilaricida. El tratamiento microfilaricida puede iniciarse entre 3 a 4 semanas después de administrar el adulticida. Debe llevarse a cabo en esta etapa final para así evitar que los perros tratados con adulticida continúen como reservorios eficaces de la infección.

MILBEMICINA OXIMINA. (Interceptor ®) es un microfilaricida potente, La dosis recomendada es de 0.5 mg/kg mensual.

IVERMECTINA. Es un microfilaricida de alta eficacia, se administra una sola vez. La dosis recomendada es de 50µg/kg 0.05 mg/kg, (Rawlings y Calvert, 1997)

(COUTO, 2003) afirman que el empleo de otras drogas como levamisol o estibofeno como adulticida no se recomienda. El levamisol no tiene actividad vermícida constante, con rango de eficacia de cero al 100%, siendo las hembras jóvenes más resistentes, y afectando principalmente a machos y pudiendo esterilizar hembras adultas.

La Ivermectina y la milbemicina oximina son microfilaricidas muy eficaces; se acompañan de un menor número de complicaciones y son las más fáciles de utilizar. Sin embargo, ninguno de los dos está aprobado por la FDA para su uso como microfilaricida, aunque su empleo con este objeto se considera el tratamiento convencional²² (BIIRCHARD y SHERDING, 2002).

5. DISEÑO METODOLÓGICO

5.1 Localización. El estudio se realizó en la zona urbana del municipio del Bordo-Patia, Departamento del Cauca, localizado a 2 horas de la ciudad de Popayán vía al sur, limitando al norte por los municipios de Rosas y Timbio; al sur por los municipios de Bolívar y Balboa. Localizado a una altura de 1090 m.s.n.m, una temperatura promedio de 19 grados centígrados, humedad relativa del 48%, precipitación anual de 1400 mm cúbicos anuales y localizado en las coordenadas geográficas 2º 20 de latitud norte y 80º 25 de longitud oeste.

²¹ Knight, 1997

²² BIIRCHARD y SHERDING, 2002

5.2 Población Objeto y Muestra. Se obtuvieron muestras de sangre entera provenientes de caninos mayores de seis meses de edad, de diferentes barrios o sectores del perímetro urbano de la ciudad del bordo, independientemente de su estado de salud o enfermedad, plan de inmunización y de desparasitación, motivo de consulta, raza, sexo y permanencia o no en hogares.

Para establecer el tamaño de la muestra se empleó el muestreo aleatorio de proporciones con un nivel de confiabilidad del 95% y un error máximo permitido del 5%, se tuvo en cuenta los siguientes elementos:

- El margen de error de prevalencia del 5%
- Nivel de confianza para estimar la prevalencia del 95%
- Valor de la prevalencia esperada del 2.89% como referencia en estudios realizados en la ciudad de Cali en el año de 1998 y se la aproximó al 2.9%

De acuerdo con los anteriores elementos, el tamaño de la muestra fue calculada con la siguiente fórmula:

$$n = \frac{Z^2 pq}{E^2}$$

Donde:

- n = tamaño de la muestra
- Z = 1.96 (95% de confianza)
- p = proporción de positivos (0.029) Martínez y López, (1998)
- q = 1 – p (0.97)
- E = precisión de estimación (0.05)

$$n = \frac{(1.96)^2 \times 0.029 \times 0.97}{(0.05)^2} = 43.22$$

Para efectos de estudio, se realizó una aproximación a 44 animales. El muestreo se realizó sin restricciones para garantizar que todos los animales de la zona tuvieran iguales probabilidades de ser escogidos, muestreados y analizados.

5.3 Técnicas Para Recolección y Análisis de Información. Se recolectaron 6 ml de sangre con jeringas desechables, tomadas directamente de la vena cefálica, y

depositadas lentamente 3 ml de sangre sobre las paredes de tubos de ensayo estériles con y sin anticoagulante, para evitar alteraciones en los componentes sanguíneos; y rotulados con los datos de cada animal muestreado.

El muestreo se realizó en el mes de enero del año 2008, periodo durante el cual presentan las condiciones de humedad y temperatura favorables para la reproducción de los vectores de *Dirofilaria immitis* presentes en la zona de estudio.

El transporte de las muestras desde la población del Bordo hasta el sitio de análisis en la ciudad de Cali, realizada por el “LABORATORIO DE ANALISIS CLINICO DIVISION VETERINARIA” se realizó en una caja de icopor respetando la cadena de frío.

La frecuencia aparente (porcentaje de animales positivos), se obtuvo mediante la formula de (Daniel 1996). Por otro lado, la frecuencia corregida se calcula en base a la sensibilidad del 98% y la especificidad del 99.9% de la prueba enzimática de ELISA, (DiroCHEK, laboratorios Symbiotics 2002), obteniendo de esta forma la prevalencia real, con resultados además, expresados mediante el intervalo de confianza del 95%.

La prevalencia y su posterior análisis de resultados, del parasito *D. immitis* en la población canina del casco urbano del Municipio del Bordo-Patia se la realizaron mediante la correlación de proporciones.

5.4 Materiales y Métodos

Guantes desechables

Jeringas estériles

Tubos de ensayo estériles

Termómetro

Fonendoscopio

Caja de icopor

Algodón

Alcohol

Kit de diagnostico de ELISA- Dirocheck (Laboratorio Symbiotics)

Blusas

Laminas portaobjetos

Micropipetas de precisión

Microscopio de luz convencional

Formol al 2%

Tubos de ensayo con y sin anticoagulante

5.5 Test de Elisa. Para el desarrollo de esta prueba se utilizo el kit comercial “DiroCHEK” de laboratorios Symbiotics R, el cual es específico para la detección de antígenos de secreción y excreción de hembras adultas de *D. immitis* con uno o más parásitos hembras.

La prueba enzimática de ELISA es mucho más específica para diagnosticar la enfermedad, presentando un 100% de especificidad y 85.7% a 100% de sensibilidad (Knight, 1997), lo que permite un diagnóstico rápido y seguro, ya que no presenta reacción cruzada con otros parásitos, ni especificaciones en cuanto al horario de toma de muestra. (Acuña y col 2001).

La sensibilidad de la prueba de ELISA "DiroCHEK" para gusano del corazón depende de la duración de la infección y el número de gusanos adultos. Aunque es posible detectar antígenos tan temprano como cinco meses después de la infección, no suele ocurrir hasta que los gusanos comienzan a microfilarias, alrededor de los seis meses y medio y quizás no se encuentren hasta después de los siete meses. La mayor parte, si no es que la totalidad del antígeno que se vierte a la circulación se atribuye a vermes hembras²³(Knight, 1997).

Se realizó la técnica Elisa por el método convencional, utilizando el kit comercial denominado DiroCHEK el cual detecta antígeno de secreción y excreción de *Dirofilaria immitis*.

La prueba consta de una microplaca de ELISA con pozos cubiertos con anticuerpos específicos dirigidos contra antígenos de *Dirofilaria* los cuales son enfrentados a la muestra (suero o plasma).

Se realizan los controles agregando 50 µl de suero control positivo y 50 µl de suero control negativo al primer y segundo pozo respectivamente, luego se procede a utilizar 50 µl. de cada muestra de suero a partir del tercer pozo utilizando la micropipeta de precisión.

Una vez utilizadas todas las muestras se agrega una gota del reactivo número 1 el cual corresponde a un anticuerpo marcado con la enzima peroxidasa, luego de lo cual se procede a homogenizar la placa de ELISA y se deja en reposo por 15 minutos, en el caso de encontrarse el antígeno presente en la muestra, este se conjuga formando un complejo específico detectado posteriormente con la adición de un cromógeno.

En el siguiente paso, se elimina el exceso de la muestra de la batería por medio del vaciado de la placa en un recipiente adecuado y lavado con agua destilada (5 lavadas mínimo) así cualquier anticuerpo libre que no estuviese ligado a la enzima es eliminado.

Posteriormente se agrega el reactivo número 2, el cual es un sustrato cromógeno que permite el cambio de color hacia azul en el caso de la presencia de antígeno de *D. immitis*, y se mantiene transparente cuando no hay presencia del mismo. Se

²³ Knight, 1997

espera 5 minutos para realizar la lectura, determinándose como positivas todas las muestras que presentan coloración azul.

5.6 Técnica Microcapilar o Woo. Consiste en mezclar 1 ml de sangre con carbonato sódico al 0.1% a fin de producir lisis de los glóbulos rojos. Se pasa a través de un filtro con poros de 0.3 µm. Las microfilarias quedan sobre el filtro y son teñidas con azul de metileno al 0.1% procediéndose a la observación microscópica. (Máxime, 1991)

5.7 Técnica de Knott Modificado. En esta prueba se produce hemólisis y fijación de las microfilarias por lo que permite examinar una mayor cantidad de sangre que un frotis sanguíneo (Dunn, 1983).

En el test de Knott se mezclan 1 ml de sangre y 9 ml de formalina al 2% y se centrifugan por 5 minutos, el sedimento se tiñe con azul de metileno y se observa al microscopio. (Grubissich, 1999)

5.8 Variables a Evaluar. En este estudio se evalúa la prevalencia para *D. immitis* en la zona de estudio y la comparación de las pruebas diagnósticas de microfilarias y ELISA y además la relación entre edad, sexo y raza entre los animales positivos a *D. immitis*.

Prevalencia Aparente

$$p = \frac{N \text{ animales positivos}}{n} \times 100 \quad (\text{Ahlbom y Novell 1990})$$

Donde:

p = Prevalencia
N = animales positivos
n = tamaño muestral

$$p = \frac{6}{44} \times 100 = 13.6\%$$

Prevalencia Corregida. Para determinar la prevalencia real en el presente trabajo, se utiliza la siguiente fórmula estadística que corrige el resultado obtenido, tomando en cuenta la sensibilidad y especificidad de la prueba enzimática de ELISA

$$P = \frac{p + \beta - 1}{\alpha + \beta - 1} \quad (\text{Ahlbom y Novell, 1990})$$

Donde:

p = Prevalencia de la prueba

α = Sensibilidad (98 %) (Referencia de Jessica Carimanya P. et al 2004)

β = Especificidad (99.9 %) (Dirocheck Laboratorio Symbiotics, 2002)

$$P = \frac{13.6 + 99.9 - 1}{98 + 99.9 - 1} = 0.57$$

Prevalencia corregida = 13,6 + 0,57 = 14,17%

5.9 Intervalos de Confianza. Los resultados se expresaron con un intervalo de confianza de 95%, empleando la siguiente formula:

$$IC = p \pm Z \sqrt{(pq / n)} \quad (\text{Armitage y Berry, 1987})$$

Donde:

IC = intervalo de confianza

p = proporción hallada

Z = 1.96

q = (1 - p)

n = Tamaño muestral

= Raíz cuadrada (Saunders, 1985)

$$IC = 0.57 \pm 1.96 \sqrt{(0.57)(0.43)/44} = 0.07$$

ANALISIS ESTADISTICO PARA LA COMPARACION DE LAS VARIABLES.

Para determinar la concordancia entre los métodos de diagnósticos de Knott y Microcapilar con la prueba de ELISA se analizó mediante las pruebas estadísticas de Kappa y Mc Nemar, y para estimar la influencia entre las variables edad, raza y sexo se utilizó la prueba estadística de X^2 .

Test de Kappa

$$\text{Kappa} = \frac{(\text{Concordancia observada}) - (\text{Concordancia esperada})}{N - (\text{Concordancia esperada})}$$

$$\text{Kappa} = \frac{42 - 35}{44 - 35} = 0.775$$

Locuaz representa un nivel de concordancia importante según la escala propuesta por Landis y Koch en 1977:

- < 0.0 no concordancia
- 0,00 – 0,20 mínima concordancia
- 0,21 – 0,40 ligera concordancia
- 0,41 – 0,60 moderada concordancia
- 0,61 – 0,80 importante concordancia
- 0,81 – 1,00 casi concordancia completa

Para establecer las relaciones o dependencias entre las variables sexo, edad, y raza en la prevalencia para *D. immitis*, se utiliza la prueba de X^2

$$X^2 = \sum \frac{(f_o - f_e)^2}{f_e}$$

La hipótesis de independencia se rechaza si $X^2 > X^2_{1-\alpha, (r-1)(c-1)}$

En la prueba de X^2 debemos determinar el número de grados de libertad. En las tablas de contingencia se obtienen multiplicando el número de columnas menos una por el número de renglones menos uno.

$$v = (c - 1)(r - 1)$$

Para desarrollar la prueba de hipótesis se empieza por estimar las frecuencias esperadas.

$$\hat{E}_{ij} = \frac{O_i \cdot O_j}{n}$$

Ho : El parásito *D.immitis* es independiente del sexo del perro.

H1 : El parásito *D. immitis* no es independiente del sexo del perro.

Se fija $\alpha = 0,05$

$$\hat{E}(\text{macho, D. immitis}) = \frac{21 \times 44}{50} = 18.4$$

$$\hat{E}(\text{hembra, D. immitis}) = \frac{\quad}{50} = 25.5$$

HO se rechaza si $X^2 > X^2_{1-\alpha} (2-1) (2-1) = X^2_{0.95, 1} = 5.84$
 El valor del estadístico de prueba:

$$X^2 = \frac{(18 - 18.4)^2}{18.4} + \frac{(26 - 25.5)^2}{25.5} = 0,011$$

HO: El parasito *D. immitis* es independiente de la raza del perro (afecta por igual a todas las razas.)

H1: El parasito *D. immitis* no es independiente de la raza del perro (alguna(s) raza(s) son más susceptibles)

Se fija $\alpha = 0,05$

HO se rechaza si $X^2 > X^2_{1-\alpha} (12-1) (2-1) = X^2_{0.95, 11} = 24.72$

$$\hat{E}(\text{caniche, D. immitis}) = \frac{14 \times 44}{50} = 12,32$$

$$\hat{E}(\text{Labrador, D. immitis}) = \frac{8 \times 44}{50} = 7,04$$

$$\hat{E}(\text{criollo, D.immitis}) = \frac{15 \times 44}{50} = 13,2$$

$$X^2 = \frac{(11 - 12,32)^2}{12.32} + \frac{(8 - 7,04)^2}{7,04} + \frac{(14 - 13.2)^2}{12,32} = 0,32$$

HO : El parasito *D. immitis* es independiente de la edad del perro (afecta por igual a todas las edades)

H1 : El parasito *D. immitis* no es independiente de la edad de perro. (Alguna(s) edad(s) son más susceptibles)

Se fija $\alpha = 0.05$

H0 se rechaza si $X^2 > X^2_{1-\alpha} (10-1) (2-1) = X^2_{0,95, 9} = 19.68$

$$\hat{E}(1 \text{ año, D. immitis}) = \frac{7 \times 44}{50} = 6.16$$

$$\hat{E}(2 \text{ años, D.immitis}) = \frac{12 \times 44}{50} = 10.56$$

$$\hat{E}(8 \text{ años, D. immitis}) = \frac{5 \times 44}{50} = 4,4$$

$$\hat{E}(9 \text{ años, D.immitis}) = \frac{6 \times 44}{50} = 5.28$$

$$X^2 = \frac{(7 - 6.16)^2}{6.16} + \frac{(12 - 10,56)^2}{10.56} + \frac{(5 - 4.4)^2}{4.4} + \frac{(6 - 5,28)^2}{5.28} = 0.47$$

6. RESULTADOS

Al evaluar la muestra de 44 caninos del área urbana del Municipio del Bordo-Patia mediante la prueba enzimática de ELISA se encontró una prevalencia real, del $14,17 \pm 13,46\%$. Mediante las técnicas microcapilar y de Kott modificada se encontró una frecuencia de 9,66% del total de perros muestreados.

En la tabla número 1, se muestran comparativamente los tres métodos utilizados y se encontró una prevalencia del $14.17\% \pm 13.46\%$ al parásito *Dirofilaria immitis*. Asimismo se observa que de los 44 perros evaluados, se reportan 4 muestras positivas (9.1%), tanto a la técnica microcapilar o de Woo como a la técnica de Knott modificada y 6 animales positivos (14.17%) a la prueba de ELISA.

Del total de muestras evaluadas al azar, 26 correspondieron a caninos hembras, con el 59% y 18 a caninos machos con el 40.9%.

En el cuadro número 2 se muestra la distribución de animales positivos por género, donde se observa que los animales positivos machos, fueron igual al número de animales positivos hembras, 6.8% frente al 6.8% de caninos positivos machos. No se encontró diferencia significativa entre los sexos.

En el cuadro número 3, se muestra la distribución de animales positivos según la raza, donde se observa 11 razas de perros muestreados, de un total de 11 perros de raza caniche 3 resultaron positivos a *D. immitis*, de 7 perros de raza labrador 1 resulto positivo a *D. immitis*, y de 13 perros de raza criollo 2 caninos resultaron positivos a *D. immitis*. No se encontró diferencia significativa entre las razas.

En el cuadro número 4, se observa que de los 44 caninos en estudio 3 caninos de edades entre los 2 años resultaron positivos a *D. immitis*, 1 perro en edad de 8 años resulto positivo a *D. immitis*, 1 perro en edad entre 9 años resulto positivo a *D. immitis* y 1 perro en edad de 10 años resulto positivo a *D. immitis*. No se encontró diferencia significativa entre las edades.

Tabla 1. Frecuencia de dirofilariasis canina encontrada por medio de las pruebas de ELISA, Knott modificado y microcapilar, en los perros de la zona urbana del Municipio del Bordo-Patia -2008.

| No de perros evaluados | ELISA | | KNOTT | | MICROCAPILAR | |
|------------------------|-----------|------------|-----------|------------|--------------|------------|
| | Positivos | Frecuencia | Positivos | Frecuencia | Positivos | Frecuencia |
| | | | | | | |

| | | | | | | |
|-----------|----------|--------------|----------|-------------|----------|-------------|
| | | (%) | | (%) | | (%) |
| 44 | 6 | 14.17 | 4 | 9,66 | 4 | 9,66 |

Se encontró que la concordancia entre los métodos diagnósticos de Knott y Microcapilar con la prueba de ELISA fue de 0,775 considerada como importante concordancia. La prueba de Mc Nemar mostró que los métodos diagnósticos , de Knott y Microcapilar no pueden remplazar a ELISA (P < 0.05)

Tabla 2. Frecuencia de caninos positivos encontrados por medio de la técnica de ELISA según el genero.

| SEXO | PERROS | POSITIVOS | TOTAL |
|---------------|-----------|-----------|-----------|
| MACHO | 18 | 3 | 21 |
| HEMBRA | 26 | 3 | 29 |
| TOTAL | 44 | 6 | 50 |

Dado que $X^2 = 0,011 < X^2_{0,95. 1} = 5,84$, no se rechaza H_0 y por lo tanto se concluye, con un nivel de significancia del 5%, que el parásito *D. immitis* es independiente del sexo de los perros, es decir, el parásito afecta por igual a los machos y las hembras.

Tabla 3. Relación entre la raza de los perros y la presentación de los positivos a Al parásito *D. immitis*, por medio de la técnica de ELISA.

| RAZA | FRECUENCIA | POSITIVOS | TOTAL |
|----------------------|------------|-----------|-------|
| Categorías | | | |
| BASSET | 2 | 0 | 2 |
| BOXER | 2 | 0 | 2 |
| CANICHE | 11 | 3 | 14 |
| CHOWCHOW | 1 | 0 | 1 |
| FOXTERRIER | 3 | 0 | 3 |
| LABRADOR | 7 | 1 | 8 |
| PASTOR ALEMAN | 1 | 0 | 1 |
| PEQUINES | 1 | 0 | 1 |
| SAMOYEDO | 1 | 0 | 1 |
| SCHNAWZER | 1 | 0 | 1 |
| SHITZU | 1 | 0 | 1 |
| CRIOLLO | 13 | 2 | 15 |

| | | | |
|--------------|----|---|----|
| TOTAL | 44 | 6 | 50 |
|--------------|----|---|----|

Dado que $X^2 = 0,32 < X^2_{0.95, 11} = 24.72$, no se rechaza H_0 y por lo tanto se concluye, con un nivel de significancia del 5%, que el tipo de parasito *D. immitis* es independiente de la raza de los perros, es decir, el parasito afecta por igual a las razas: caniche, labrador y criollo.

Tabla 4. Relación entre la edad de los perros y la presentación de los positivos al parasito *D. immitis*, mediante la técnica de ELISA.

| EDAD | FRECUENCIA | POSITIVOS | TOTAL |
|-------------------|-------------------|------------------|--------------|
| Categorías | | | |
| 1 | 6 | 1 | 7 |
| 2 | 9 | 3 | 12 |
| 3 | 4 | 0 | 4 |
| 4 | 3 | 0 | 3 |
| 5 | 6 | 0 | 6 |
| 6 | 3 | 0 | 3 |
| 7 | 2 | 0 | 2 |
| 8 | 4 | 1 | 5 |
| 9 | 2 | 0 | 2 |
| 10 | 5 | 1 | 6 |
| TOTAL | 44 | 6 | 50 |

Dado que $X^2 = 0,47 < X^2_{0.95, 9} = 19.68$, no se rechaza H_0 y por lo tanto se concluye, con un nivel de significancia del 5%, que el tipo de parasito *D. immitis* es independiente de la edad de los perros, es decir, *D. immitis* afecta por igual a las edades de los perros.

6.1 DISCUSION

El presente estudio permitió evaluar la prevalencia de *Dirofilaria immitis* en caninos del área urbana del Municipio del Bordo- Patia localizado en el Departamento del Cauca – Colombia en los meses de Enero y Febrero del año 2008.

Del total de 44 perros evaluados, mayores de 6 meses, de diferente raza, edad y sexo, 6 fueron positivos a *D.immitis* mediante la prueba enzimática de ELISA DiroCHECK®, con una prevalencia real del 14.17%

Es importante tomar en cuenta que el microclima que presenta la ciudad del Bordo se considera el óptimo para el desarrollo de la enfermedad y de los mosquitos que son sus vectores.

La prevalencia hallada en este estudio por medio de la técnica de ELISA (14.17%), es mayor que la determinada con los métodos microcapilar (9.1%) y de Knott modificado (9.1%). Esto se fundamenta en gran parte a que estos dos últimos métodos se basan en la observación de microfilarias, teniendo un mayor margen de error en el diagnóstico ya que se requiere de un entrenamiento adecuado tanto para la identificación como para la diferencia con otras filarias. Por otro lado estas pruebas presentan restricciones en cuanto al horario de toma de muestras, la cual debe ser ejecutada a partir de las 18 horas. A diferencia, la prueba enzimática de ELISA es mucho más específica para diagnosticar la enfermedad, presentando una especificidad del 99.9 % y una sensibilidad del 98%, lo que permite un diagnóstico rápido y seguro, ya que no presenta reacción cruzada con otros parásitos ni especificaciones en cuanto al horario de la toma de muestras.

La prevalencia encontrada en este estudio (14.17%), es superior a la reportada por Orozco y col (2006), del (0.35%), en el área metropolitana de Aburrá- Antioquia de una población muestreada de 300 caninos, con la técnica de detección de antígenos.

En otro estudio, Martínez y col.(1998), utilizando la prueba de detección de antígenos, encontraron una prevalencia de *Dirofilaria immitis* del 2.89% en la población canina de la ciudad de Cali, cifra por debajo a la encontrada en el presente trabajo.

Souza et al 1997 encontraron en un estudio en Brasil que los caninos más parasitados por *D. immitis*, estaban comprendidos entre las edades de 2 – 4 años, ellos utilizaron el test de diroCHECK; con lo que coincide con el presente trabajo de investigación

Navarro y col (2002), encontraron en la ciudad de Bucaramanga mediante la prueba de ELISA, una prevalencia del 16% a *D. immitis*, en perros callejeros, datos que están próximos a los obtenidos en la población del Bordo-Patia. En el estudio realizado en la población del Bordo-Patia los perros evaluados permanecían todo el tiempo en el interior de las casas de sus propietarios.

La información acerca de los estudios de Dirofilariasis canina en Colombia continúan siendo escasos y no se le da la atención necesaria, no obstante que *D. immitis* representa un riesgo para la salud del hombre

ANEXOS

ANEXO A

CLASIFICACION

Grafica 1. Raza por Sexo

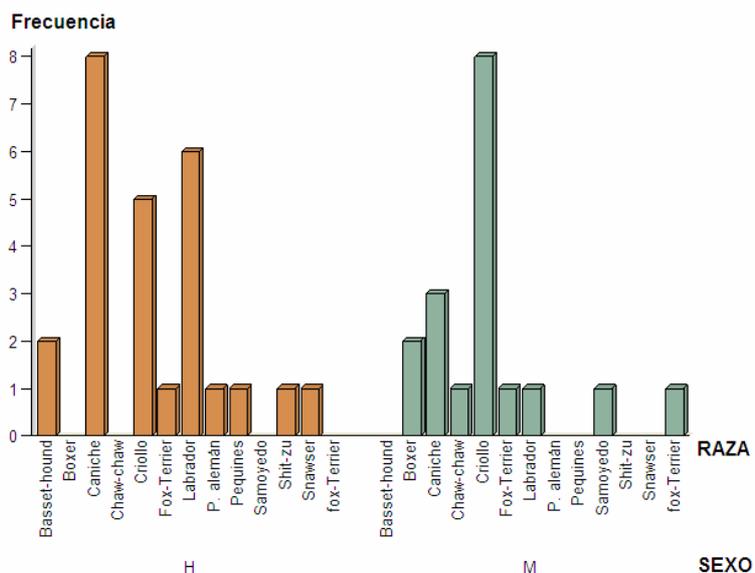


Tabla 5. Raza por sexo

| RAZA | SEXO | frequency value |
|--------------|------|-----------------|
| Basset-hound | H | 2 |
| Caniche | H | 8 |
| Criollo | H | 5 |
| Fox-Terrier | H | 1 |
| Labrador | H | 6 |
| P. alemán | H | 1 |
| Pequines | H | 1 |
| Shit-zu | H | 1 |
| Snawser | H | 1 |
| Boxer | M | 2 |
| Caniche | M | 3 |
| Chaw-chaw | M | 1 |
| Criollo | M | 8 |
| Fox-Terrier | M | 1 |
| Labrador | M | 1 |
| Samoyedo | M | 1 |
| fox-Terrier | M | 1 |

Grafica 2. Raza

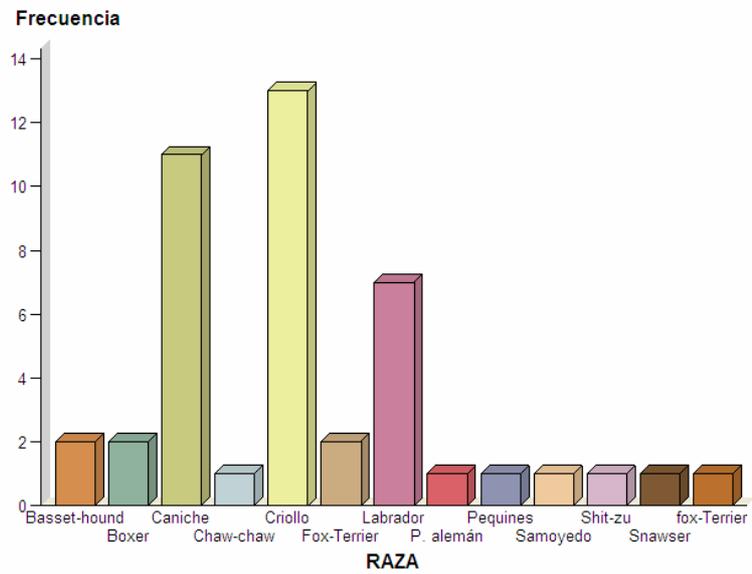
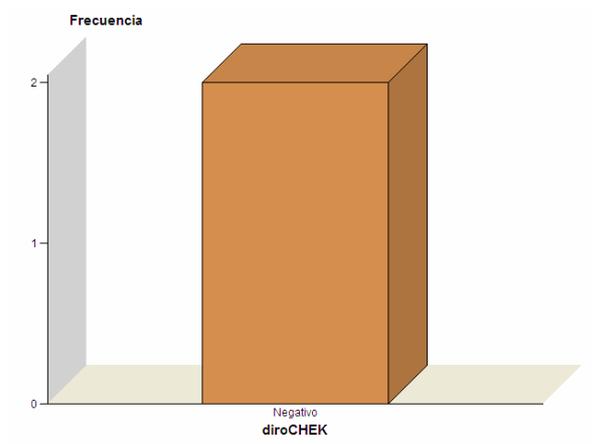


Tabla 6. Raza

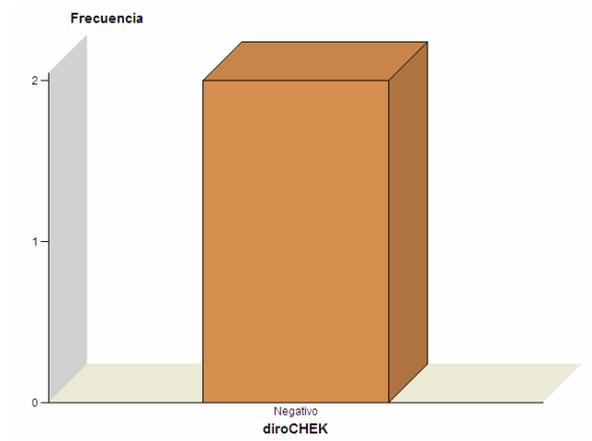
| RAZA | frequency value |
|--------------|-----------------|
| Basset-hound | 2 |
| Boxer | 2 |
| Caniche | 11 |
| Chaw-chaw | 1 |
| Criollo | 13 |
| Fox-Terrier | 2 |
| Labrador | 7 |
| P. alemán | 1 |
| Pequines | 1 |
| Samoyedo | 1 |
| Shit-zu | 1 |
| Snawser | 1 |
| fox-Terrier | 1 |

Grafica 3. RAZA=Basset-hound



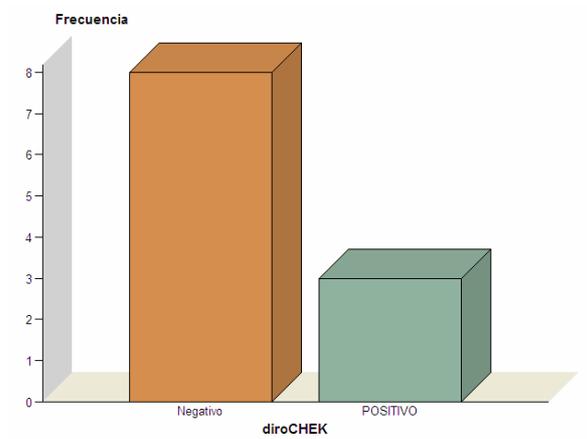
| diroCHEK | frequency value |
|----------|-----------------|
| Negativo | 2 |

Grafica 4. ÇAZA=Boxer



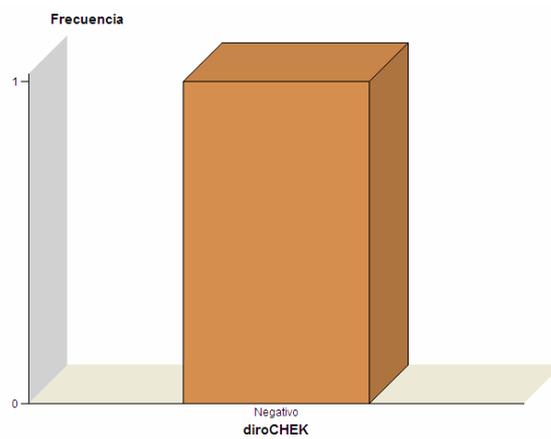
| diroCHEK | frequency value |
|----------|-----------------|
| Negativo | 2 |

Grafica 5. RAZA=Caniche



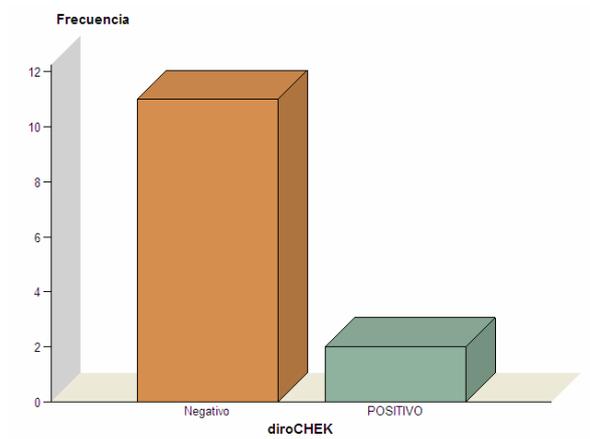
| diroCHEK | frequency value |
|----------|-----------------|
| Negativo | 8 |
| POSITIVO | 3 |

Grafica 6. RAZA=Chaw-chaw



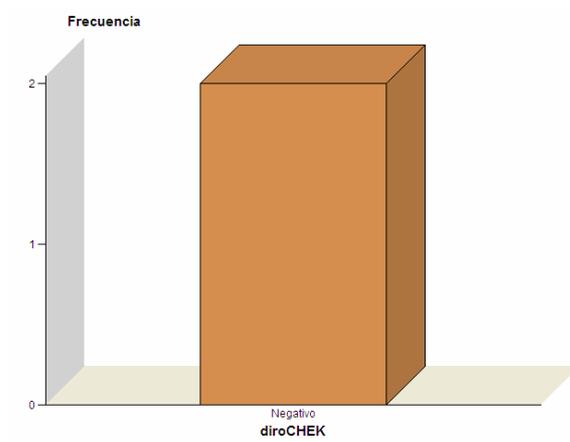
| diroCHEK | frequency value |
|----------|-----------------|
| Negativo | 1 |

Grafica 7. RAZA=Criollo



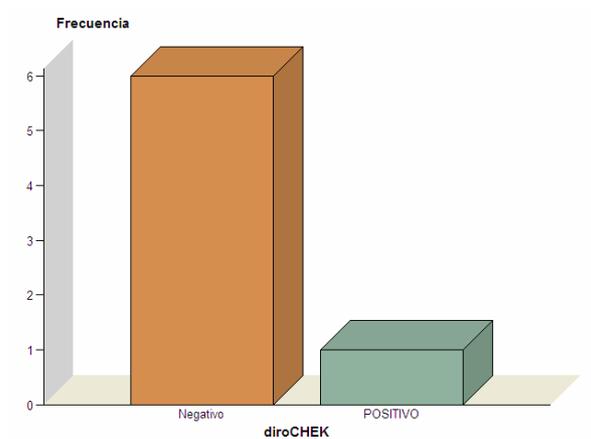
| diroCHEK | frequency value |
|----------|-----------------|
| Negativo | 11 |
| POSITIVO | 2 |

Grafica 8. RAZA=Fox-Terrier



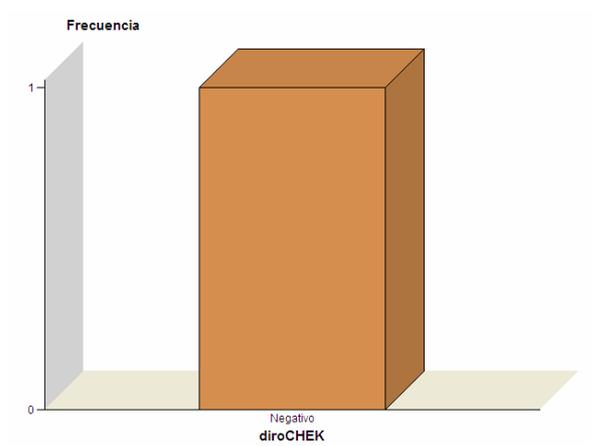
| diroCHEK | frequency value |
|----------|-----------------|
| Negativo | 2 |

Grafica 9. RAZA=Labrador



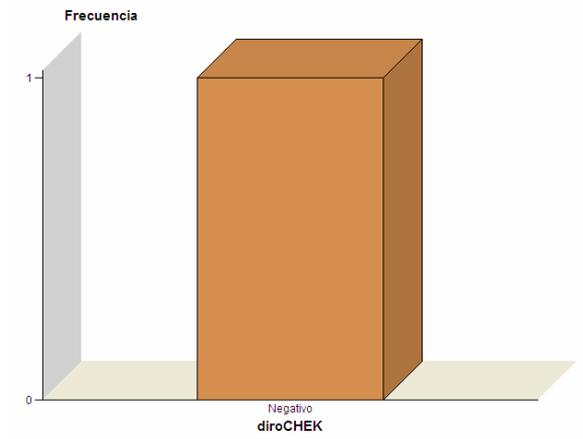
| diroCHEK | frequency value |
|----------|-----------------|
| Negativo | 6 |
| POSITIVO | 1 |

Grafica 10. RAZA=P. alemán



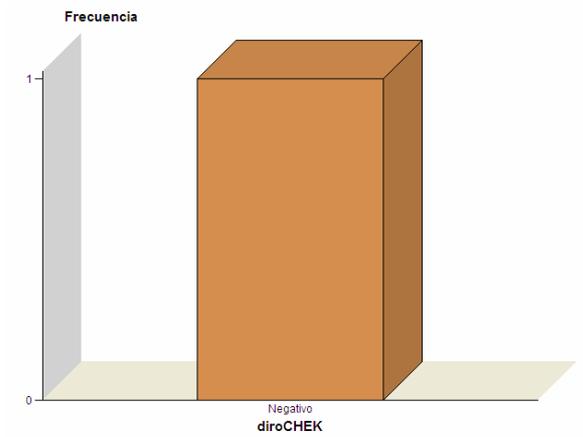
| diroCHEK | frequency value |
|----------|-----------------|
| Negativo | 1 |

Grafica 11. RAZA=Pequines



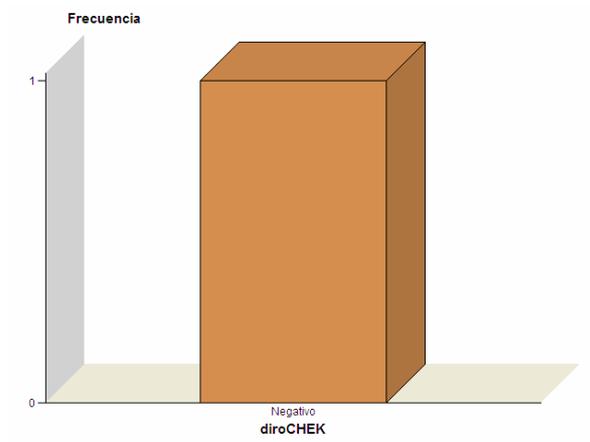
| diroCHEK | frequency value |
|----------|-----------------|
| Negativo | 1 |

Grafica 12. RAZA=Samoyedo



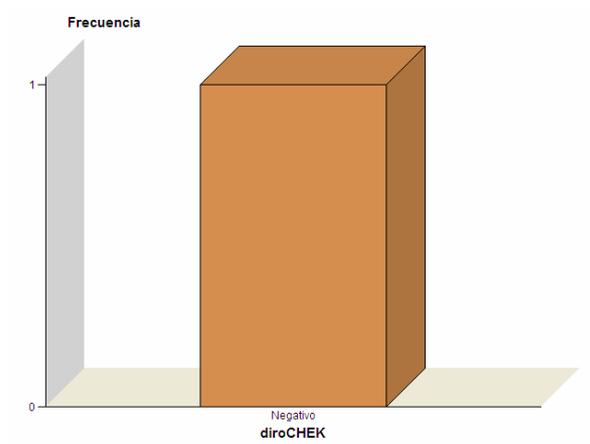
| diroCHEK | frequency value |
|----------|-----------------|
| Negativo | 1 |

Grafica 13. RAZA=Shit-zu



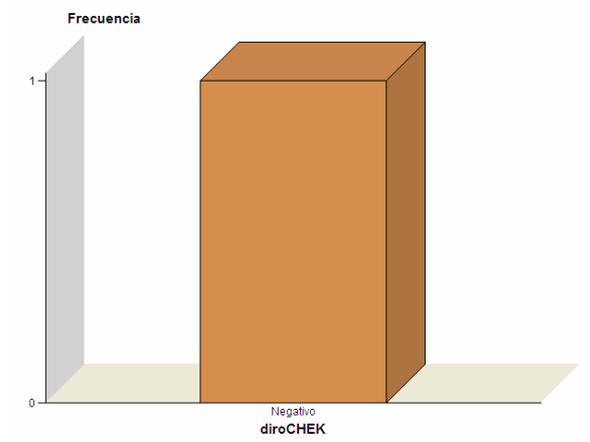
| iroCHEK | frequency value |
|----------|-----------------|
| Negativo | 1 |

Grafica 14. RAZA=Snawser



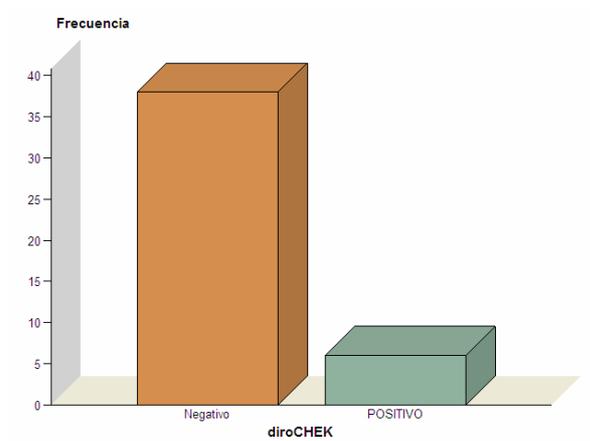
| diroCHEK | frequency value |
|----------|-----------------|
| Negativo | 1 |

Grafica 15. RAZA=fox-Terrier



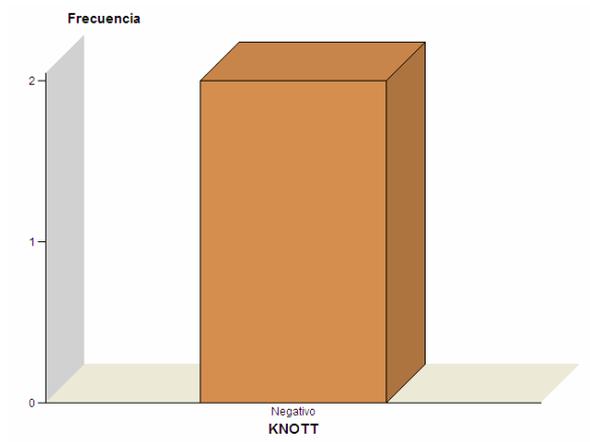
| diroCHEK | frequency value |
|-----------------|------------------------|
| Negativo | 1 |

Grafica 16. Diro Total



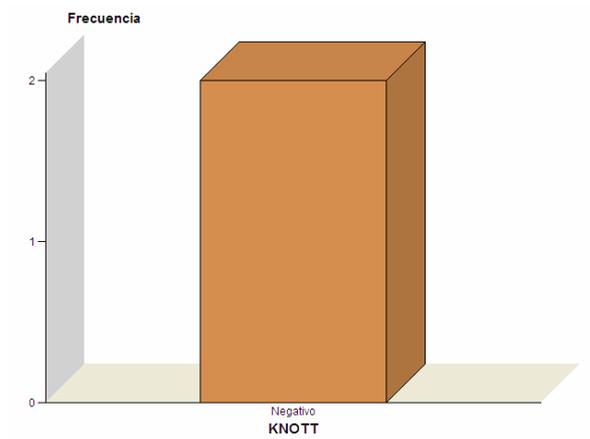
| diroCHEK | frequency value |
|-----------------|------------------------|
| Negativo | 38 |
| POSITIVO | 6 |

Grafica 17. RAZA=Basset-hound



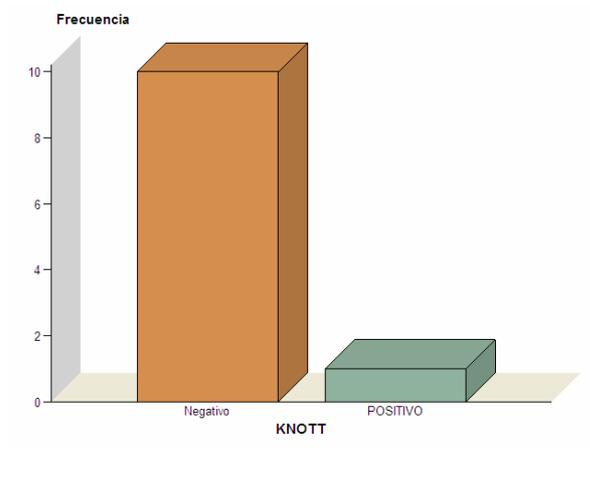
| KNOTT | frequency value |
|----------|-----------------|
| Negativo | 2 |

Grafica 18. RAZA=Boxer



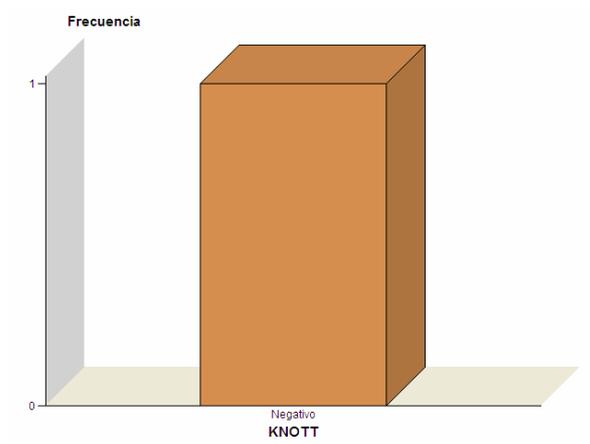
| KNOTT | frequency value |
|----------|-----------------|
| Negativo | 2 |

Grafica 19. RAZA=Caniche



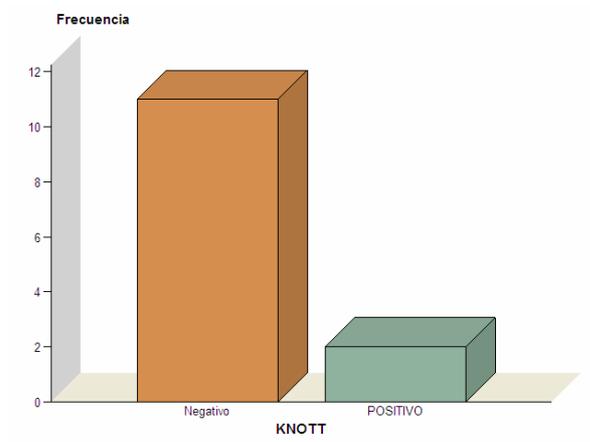
| KNOTT | frequency value |
|----------|-----------------|
| Negativo | 10 |
| POSITIVO | 1 |

Grafica 20. RAZA=Chaw-chaw



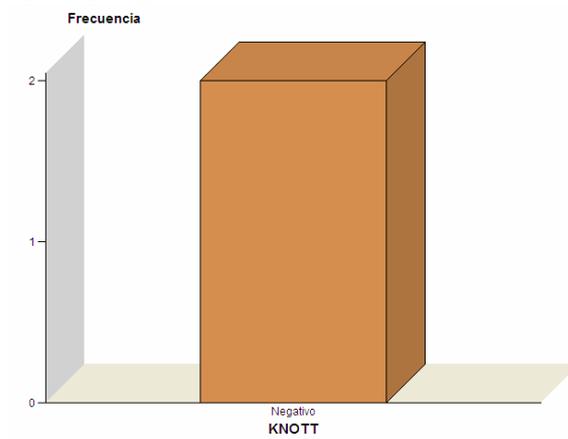
| KNOTT | frequency value |
|----------|-----------------|
| Negativo | 1 |

Grafica 21. RAZA=Criollo



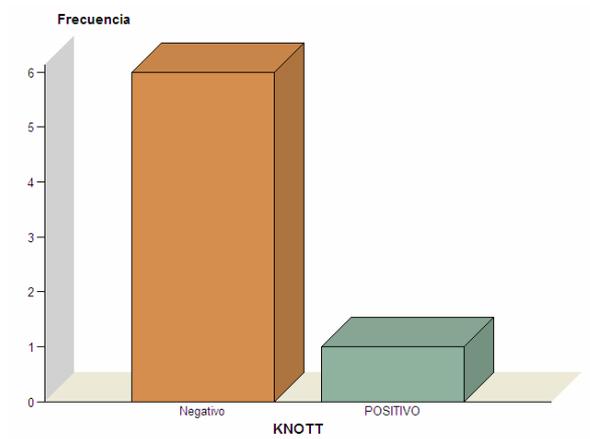
| KNOTT | frequency value |
|----------|-----------------|
| Negativo | 11 |
| POSITIVO | 2 |

Grafica 22. RAZA=Fox-Terrier



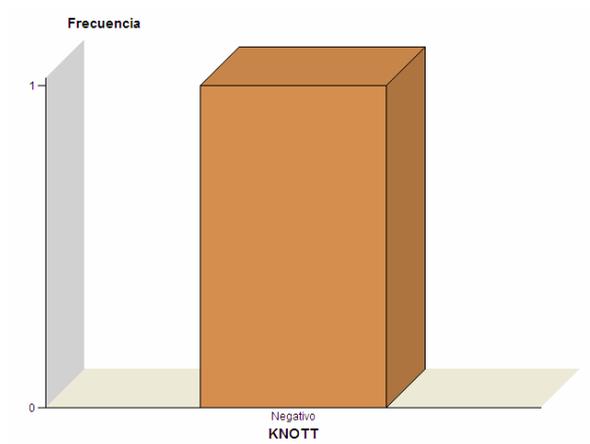
| KNOTT | frequency value |
|----------|-----------------|
| Negativo | 2 |

Grafica 23. RAZA=Labrador



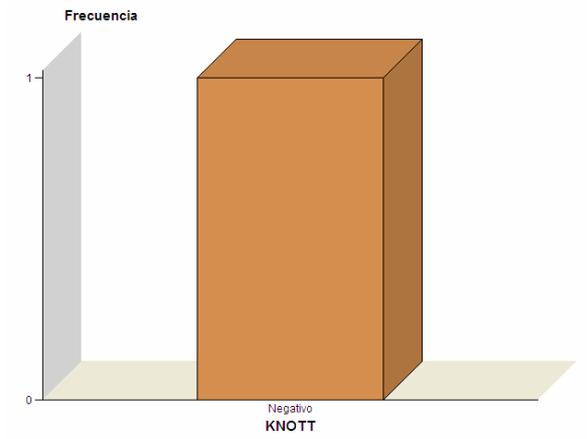
| KNOTT | frequency value |
|----------|-----------------|
| Negativo | 6 |
| POSITIVO | 1 |

Grafica 24. RAZA=P. alemán



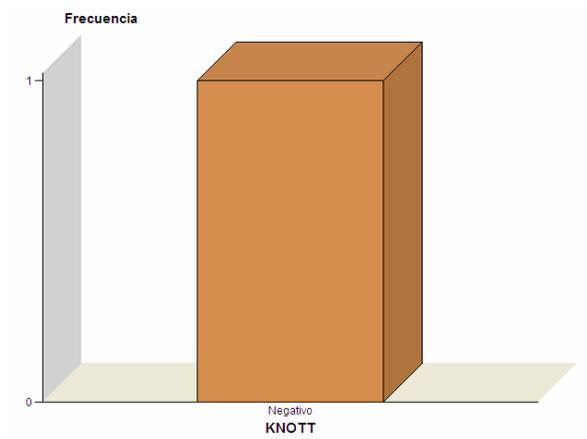
| KNOTT | frequency value |
|----------|-----------------|
| Negativo | 1 |

Grafica 25. RAZA=Pequines



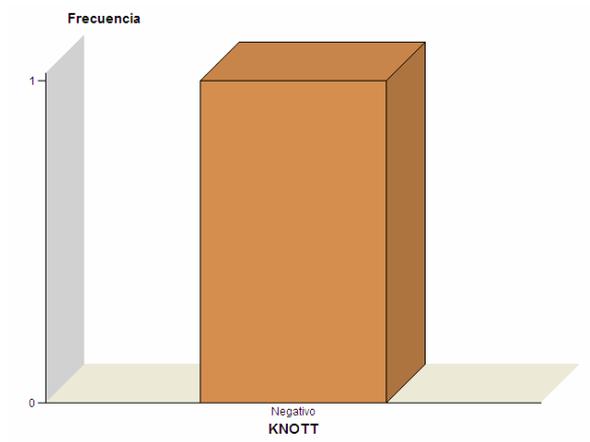
| KNOTT | frequency value |
|----------|-----------------|
| Negativo | 1 |

Grafica 26. RAZA=Samoyedo



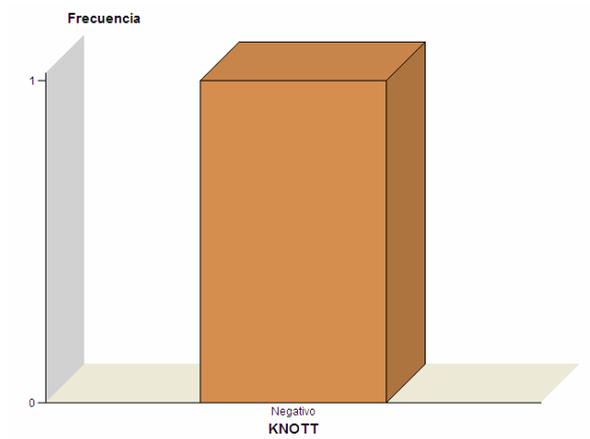
| KNOTT | frequency value |
|----------|-----------------|
| Negativo | 1 |

Grafica 27. RAZA=Shit-zu



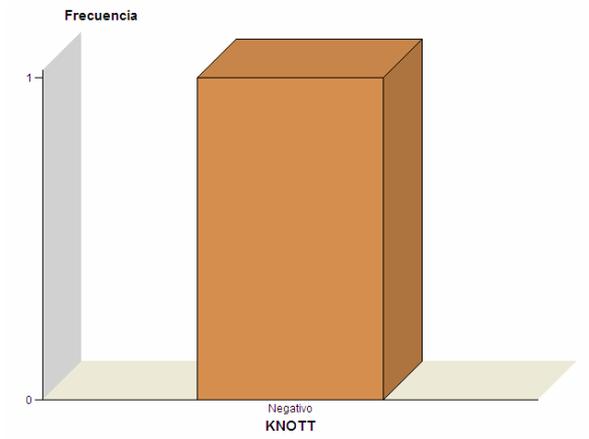
| KNOTT | frequency value |
|----------|-----------------|
| Negativo | 1 |

Grafica 28. RAZA=Snawser



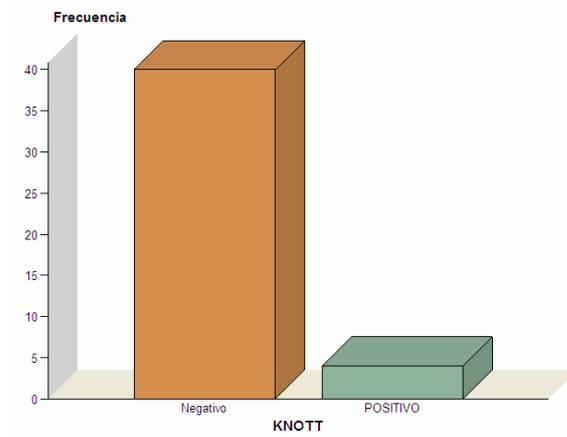
| KNOTT | frequency value |
|----------|-----------------|
| Negativo | 1 |

Grafica 29. RAZA=fox-Terrier



| KNOTT | frequency value |
|----------|-----------------|
| Negativo | 1 |

Grafica 30. Diagrama de barras knot total

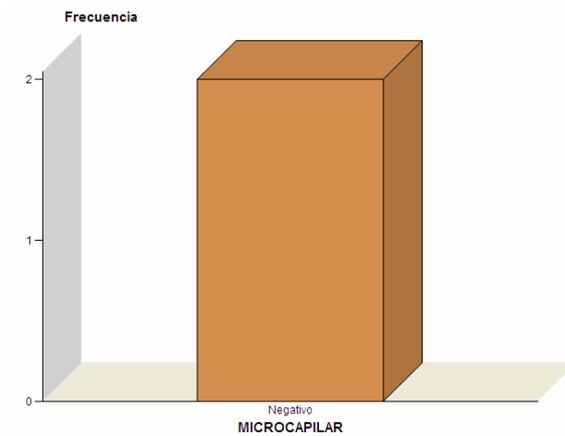


| KNOTT | frequency value |
|----------|-----------------|
| Negativo | 40 |
| POSITIVO | 4 |

ANEXO B

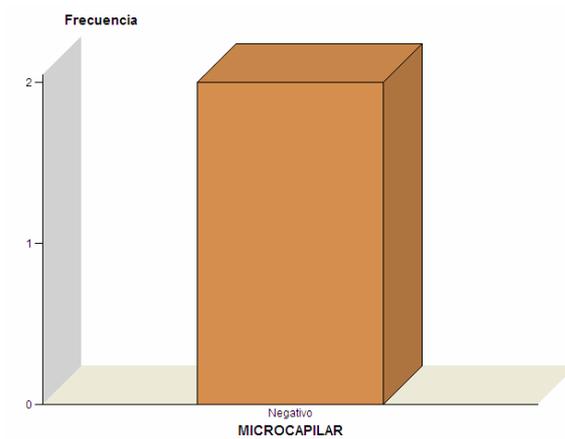
DIAGRAMA DE BARRAS DE MICRO-- RAZA

Grafica 31. RAZA=Basset-hound



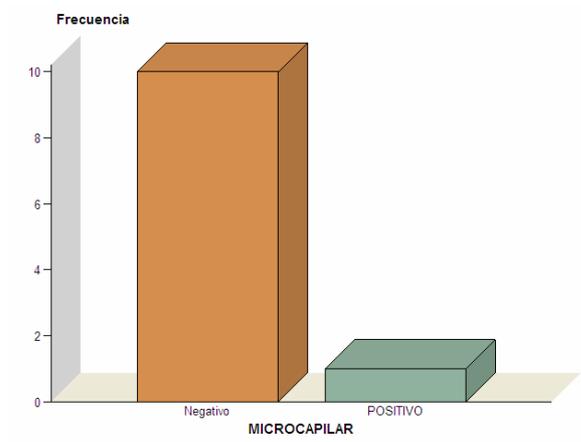
| MICROCAPILAR | frequency value |
|--------------|-----------------|
| Negativo | 2 |

Grafica 32. RAZA=Boxer



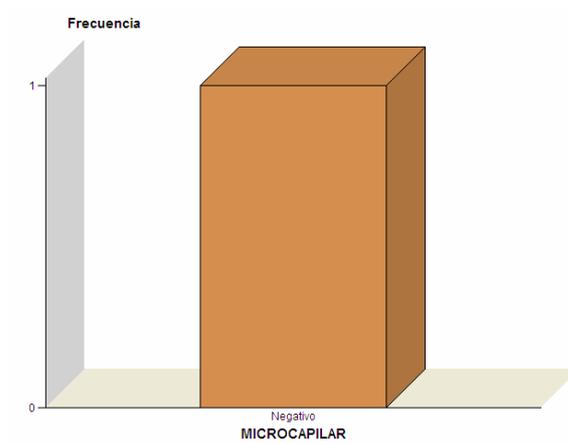
| MICROCAPILAR | frequency value |
|--------------|-----------------|
| Negativo | 2 |

Grafica 33. RAZA=Caniche



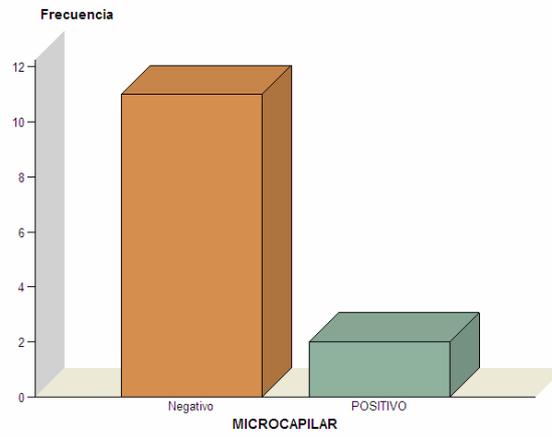
| MICROCAPILAR | frequency value |
|--------------|-----------------|
| Negativo | 10 |
| POSITIVO | 1 |

Grafica 34. RAZA=Chaw-chaw



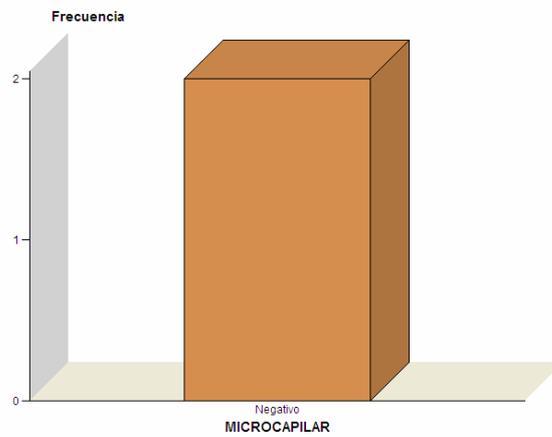
| MICROCAPILAR | frequency value |
|--------------|-----------------|
| Negativo | 1 |

Grafica 35. RAZA=Criollo



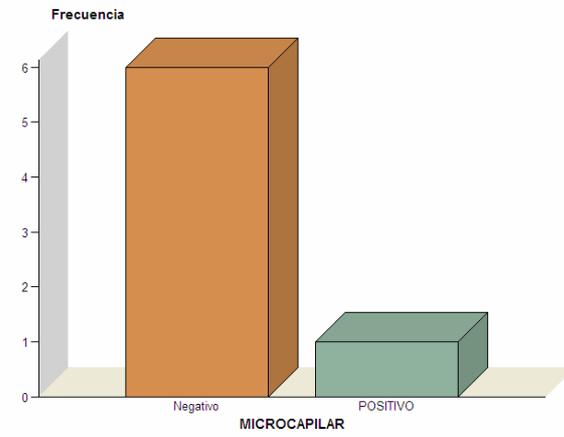
| MICROCAPILAR | frequency value |
|--------------|-----------------|
| Negativo | 11 |
| POSITIVO | 2 |

Grafica 36. RAZA=Fox-Terrier



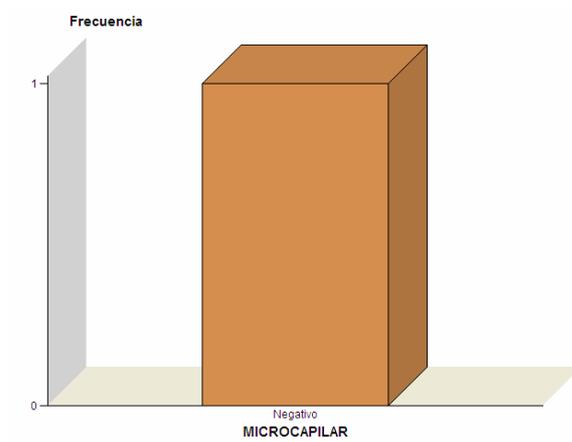
| MICROCAPILAR | frequency value |
|--------------|-----------------|
| Negativo | 2 |

Grafica 37. RAZA=Labrador



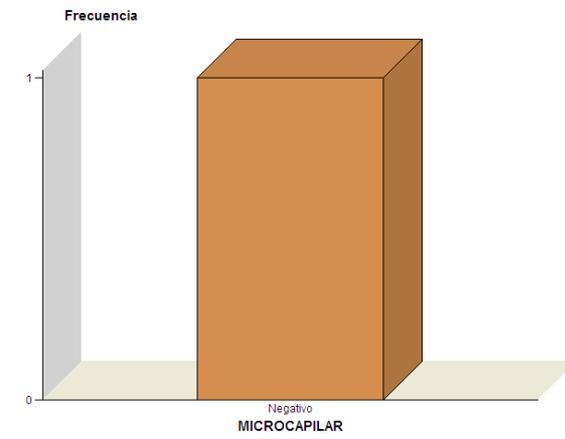
| MICROCAPILAR | frequency value |
|--------------|-----------------|
| Negativo | 6 |
| POSITIVO | 1 |

Grafica 38. RAZA=P. alemán



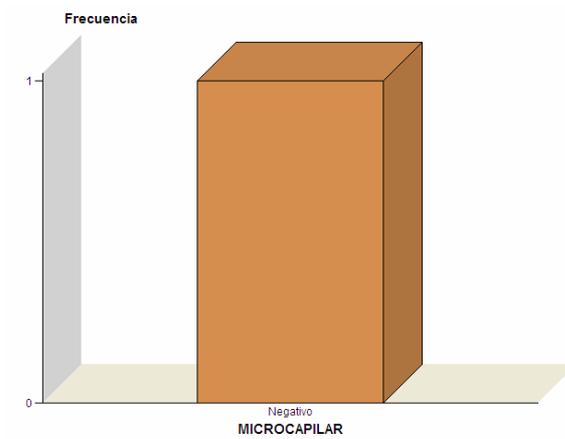
| MICROCAPILAR | frequency value |
|--------------|-----------------|
| Negativo | 1 |

Grafica 39. RAZA=Pequines



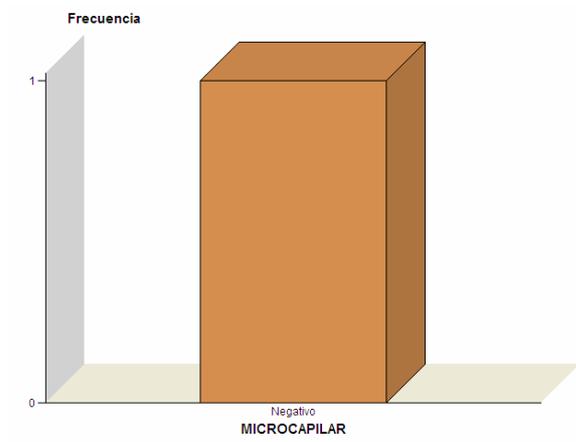
| MICROCAPILAR | frequency value |
|--------------|-----------------|
| Negativo | 1 |

Grafica 40. RAZA=Samoyedo



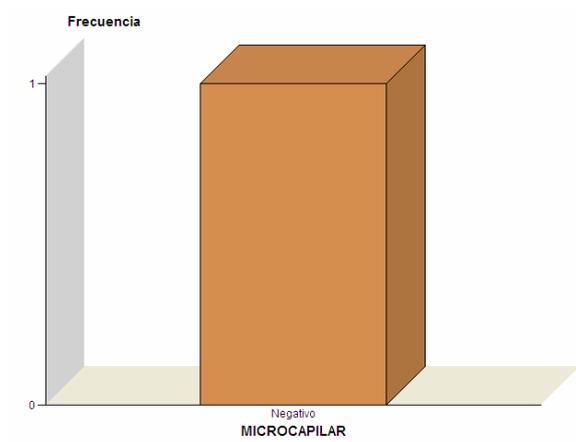
| MICROCAPILAR | frequency value |
|--------------|-----------------|
| Negativo | 1 |

Grafica 41. RAZA=Shit-zu



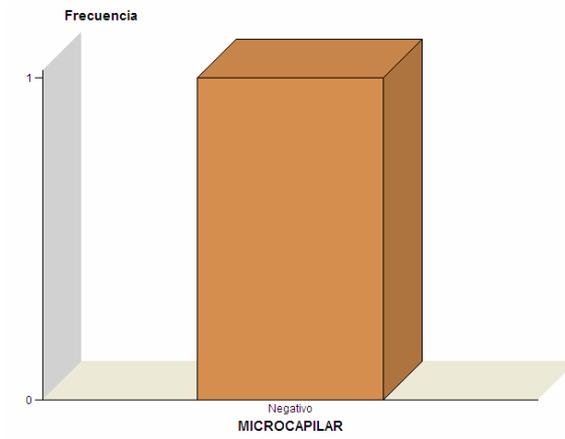
| MICROCAPILAR | frequency value |
|--------------|-----------------|
| Negativo | 1 |

Grafica 42. RAZA=Snawser



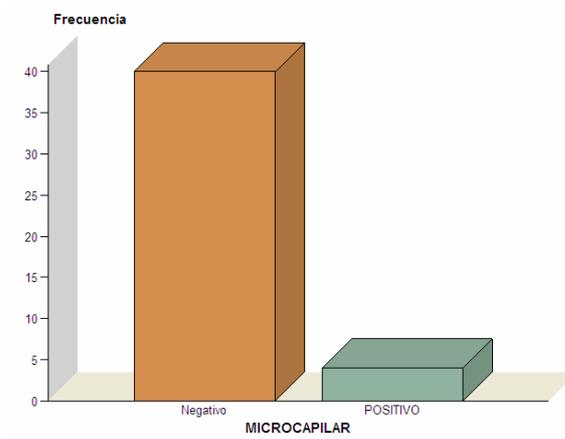
| MICROCAPILAR | frequency value |
|--------------|-----------------|
| Negativo | 1 |

Grafica 43. RAZA=fox-Terrier



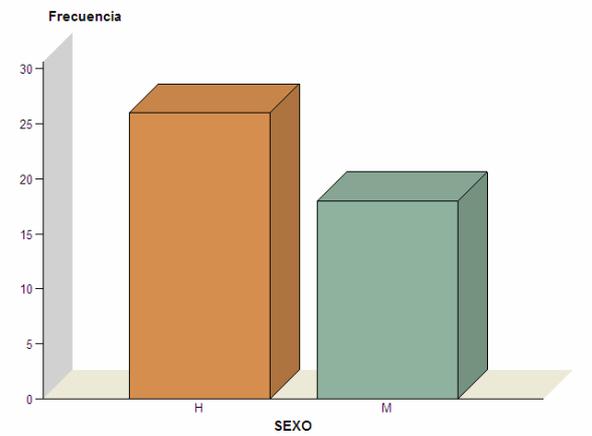
| MICROCAPILAR | frequency value |
|--------------|-----------------|
| Negativo | 1 |

Grafica 44. Diagrama de barras micro total.



| MICROCAPILAR | frequency value |
|--------------|-----------------|
| Negativo | 40 |
| POSITIVO | 4 |

Grafica 45. Diagrama de barras sexo.



| SEXO | frequency value |
|------|-----------------|
| H | 26 |
| M | 18 |

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- La prevalencia de dirofilariosis canina en al área urbana de la ciudad del Bordo fue del 14.17% mediante la prueba enzimática de ELISA, (DiroCHEK)® y del 9.1% con los métodos de microcapilar y Knott modificado.
- Estos valores permiten concluir que la dirofilariosis canina en la zona de estudio, si no se toma medidas encaminadas a su control puede constituir un problema de salud pública.
- Es indispensable continuar la vigilancia epidemiológica de la presencia de *D. immitis* en el área de estudio, para así poder tomar medidas sanitarias, de manejo y profilácticas para detener y controlar la presencia de este parásito y sus vectores.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- **STEPHEN J. BIRCHARD y ROBERT G.SHERDING.** Manual Clínico de Procedimientos en Pequeñas Especies. Segunda edición. 2002.
- 2.- **MARTÍNEZ, C, LILIANA Y LÓPEZ, O, ORLANDO.** Prevalencia de *Dirofilaria Immitis* en el Municipio de Cali. Tesis de grado. U. de Caldas. 1998.
- 3.- **ARANGO M,M, CARDONA Y W, OROZCO SC.** Detección de antígenos de *Dirofilaria immitis* en sangre de caninos del área metropolitana del Valle de Aburra mediante la Técnica de inmunocromatografía de flujo lateral. Rev. Col. Ciencias Pecuarias. 2006.
- 4.- **BIOLAWASKI BC, HARRINGTON D, JOSEPH E.** Asolitary pulmonary nodule with zoonotic implications. Chest 2001.
- 5.- **CARVALHO DE MACEDO F, LABERTHE N, LAURENCE DE OLIVEIRA R.** Susceptibility of *Aedes scapularis* (Rondan, 1848) to *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856), an Emerging zoonosis. Mon Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 1998.
- 6.- **VÉLEZ I, RODRÍGUEZ MA, HERRERA LA, MEJIA LF, NAQUIRA LF.** Seropositividad para *Dirofilaria immitis* en Población canina. Municipio de Santa Fe de Antioquia. 1998.
- 7.- **VIEIRA. C, VELEZ ID, MONTOYA MN, AGUDELO S, ALVAREZ MI, GENCHI C, SIMON F.** *Dirofilaria immitis* in Tikuna Indians and their Dogs in the Colombian Amazon. Ann trop Med Parasitol. 1998.
- 8.- **SANTOME, VÍCTOR MANUEL,** *Dirofilariasis canina.* Lima (Perú). 2001
- 9- **SMITH, R.D:** Decisión analysis of heartworm diagnostic test and management option. Proceeding of heartworm. Symposium 1995
- 10- **COUTO C, NELSON R,** *Small animal internal Medicine.* Third edition. 2003.
11. - **BOSCAN, PEDRO. ET AL.** Análisis Microbiológico de la *Dirofilaria immitis.* Microbiology study of *Dirofilaria immitis.* 2001.
12. – HEARTWORM SYMPOSIUM, 1998, Hyatt Regency Westshore Hotel, Tampa – Florida . May 1- 3 1998
13. - **PARKER B.M.** Density and distribution of *D. immitis.* (Nematoda: filarioidea) third stage larvae in *Andes sollicans* and *Aedes taenorinchus* (Diptera: culicidae). J. Med. Entomology 2000

- 14.- **JAY R. GEORGI.** Parasitología Animal. Tercera edición 2000.
- 15.- **LOIS, ÁNGEL Y VECCHIONE, SANDRA.** Consejos: Parasitosis. Nueva Enfermedad Zonal. Dirofilariasis o “lombriz del corazón” 2002.
- 16.- **KIRK, ROBERT.** Terapéutica Veterinaria. Exitodinámica. 1995.
- 17.- **MERCK.** El Manual Merck de Veterinaria; Quinta edición. 2000.
- 18.- **BORCHET, ALFRED.** Parasitología Veterinaria. Zaragoza. Acribia. 1981.
- 19.- **SCRHEY, CRISTIAN F. ET AL,** Dirofilariasis canina y felina, revista vol 8 No 2 1998.
- 20.- **ETTINGER, STEPHEN J. FELDMAN, EDUARD C.** Tratado de Medicina Interna Veterinaria, enfermedades del perro y gato. Cuarta edición. Buenos Aires: Intermedia 1997.
- 21.- **JOHNSTONE, COLIN. Et al.** Parasitology 4001. Heartworm. Pathophysiology of Cardiopulmonary Disease. Pensilvanilla. 1997.
- 22.- **LEONARDO, C. GÓMEZ, GIRALDO J, ÁLZATE., SONIA OROZCO. P.** Reporte de un Caso de *D. immitis* en un perro. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias U. de Antioquia. 2006.
- 23.- **FERNÁNDEZ, MÓNICA.** La Enfermedad del Gusano del Corazón. Asociación Civil Ovejero Alemán Blanco. Argentina. 2000.
- 24.- **CHARLES H. SODIKOFF.** Pruebas Diagnosticas y de Laboratorio en Pequeños Animales. Tercera edición. Harcourt. 2002.
- 25.- Laboratorios Symbiotics. Inserto de la Prueba. “Dirocheck” 2002.
- 26.- **PITA FERNÁNDEZ S. PERTEGAS DÍAZ Z, VALDEZ CAÑEDO.** Medidas de Frecuencia de Enfermedad. Unidad de Epidemiología clínica y Bioestadística. Complejo Universitario, Juan Canalejo. A.Coruña (ESPAÑA). 2004.Fistterra.com
- 27.- **ALONSO FERNÁNDEZ, A.M., COMAS TIZON,T.D.** Mediciones en Epidemiología. Medidas de Frecuencia de Asociación y de Impacto Potencial. Revista Ciencia Pedriatika. 2002.
- 28.- **FLETCHER R H, FLETCHER SW, WAGBER EH,** Epidemiología Clínica. Aspectos Fundamentales. Madrid, 1998.

- 29.- **ABRARA, V.** Medidas de Frecuencia en Epidemiología. Hospital Ramón y Cajal. Madrid España. 2002.
- 30.- **URQUART, GM. AMOUR, J .., DUCAN, JI.** Parasitología Veterinaria. Acriba. Primera edición. 2003.
- 31.- **GRUBISSICH JA.** Dirofilariasis Canina. Rev. Holliday News. 1999. 2 No Bs As, Argentina ,pp 8-12
- 32.- **CARLOS SOLARTE PORTILLA, HERNAN A, GARCIA, MARCO ANTONIO IMUEZ.** Bioestadística. Aplicaciones en Producción y Salud Animal. Universidad de Nariño. 2005.
- 33.- **MICHAEL THRUSFIELD.** Epidemiología Veterinaria. Editorial Acribilla, 1990
- 34.- **FERNANDO HOLGUIN QUIÑONES, LAUREANO HAYASHI MARTINEZ.** Estadística. Elementos de Muestreo y Correlación. Editorial Diana, Mexico 1987
- 35.- **KNIGHT, D** Heartworm infection. Vet Clin North Am Small Animal Practice, 1987 17: 463-519
- 36.- **DILLON R,** Dirofilariasis un Dogs and Cats. [http://WWW.vetmed.aubur.edu/distance/cardio/aello htm.](http://WWW.vetmed.aubur.edu/distance/cardio/aello.htm)
- 37.- UCDAVIS, 1998. Dirofilaria immitis [on line] Despoil. <http://ucdnema.ucdavis.edu/imagemap/nemmap/ent156html/nemas/98filari>
38. TARELLO W.2001 Importance en the Dogs of Concentration Test for the Diagnosis of Heartworm Disease in Non Endemic Areas [on line] Disponible: [http://www.priory.com/vet/cardio/worm,htm.](http://www.priory.com/vet/cardio/worm,htm)
- 39.- SOULSBY, E.J.L. 1987. Parasitología y Enfermedades Parasitarias en los Animales Domésticos. 7ma Ed. Interamericana.Mexico 300p
- 40.- AMERICAN HEARTWORM SOCIETY (2008). Canine Heartworm Disease. [on line] disponible [http:// www.heartwormsociety.org/dec97htm.](http://www.heartwormsociety.org/dec97htm)