



**Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza**



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Análisis Comparativo de Diferentes Tipos de Detección e Identificación de Microfilarias de la Filariosis Canina.

Comparative Analysis of Different Types of Detection and Identification of Microfilarias of the Canine Filariasis.

Autor/es

Clara Travé Alfaro

Director/es

Chelo Ferreira y Ana Muniesa

Facultad de Veterinaria

2016

Agradezco a todas aquellas personas que me han ayudado a realizar éste trabajo. En primer lugar, debo agradecer de manera especial y sincera a mis tutoras Chelo Ferreira y Ana Muniesa por asesorarme, enseñarme, resolverme dudas y confiar en mí. También quiero dar las gracias al equipo de Urgencias Veterinarias, a Mariano Morales, a Miguel A. Peribañez y a Cristina Travé; sin olvidarme de familiares y amigos quienes me han apoyado moralmente.

ÍNDICE

<u>RESUMEN</u>	1
<u>ABSTRACT</u>	2
1. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	3
1.1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	3
1.2. <u>HISTORIA DE LA DIROFILARIOSIS</u>	3
1.3. <u>EL PARÁSITO</u>	3
1.4. <u>EPIDEMIOLOGÍA</u>	5
1.5. <u>CICLO BIOLÓGICO DEL PARÁSITO</u>	8
1.6. <u>PATOLOGÍA</u>	9
1.7. <u>SIGNOS CLÍNICOS</u>	12
1.8. <u>EVOLUCIÓN CLÍNICA</u>	12
1.9. <u>ANALÍTICA CLÍNICA</u>	13
1.10. <u>DIAGNÓSTICO DE <i>D. IMMITIS</i> EN EL PERRO</u>	13
1.10.1. <u>CLÍNICO</u>	14
1.10.2. <u>ETIOLÓGICO</u>	14
1.11. <u>DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL</u>	18
1.12. <u>TRATAMIENTO</u>	19
1.13. <u>PREVENCIÓN Y CONTROL</u>	22
1.14. <u>CONSIDERACIONES EN SALUD PÚBLICA</u>	23
2. <u>ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA BASE DE DATOS</u>	23
2.1. <u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	23
2.2. <u>OBJETIVO</u>	24
2.3. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	24
2.4. <u>CONCLUSIONES FINALES</u>	30
3. <u>BIBLIOGRAFÍA Y WEBGRAFÍA</u>	31



RESUMEN

En el presente trabajo se ha realizado una revisión bibliográfica de la Dirofilariosis canina, además de analizar comparativamente diferentes tipos de detección e identificación de microfilarias, a partir de una base de datos cedida por el profesor Miguel Ángel Peribáñez.

La Dirofilariosis es una enfermedad parasitaria cardiopulmonar de distribución mundial, cuya incidencia va en aumento; además causa un problema importante para la salud del individuo afectado y produce infecciones zoonóticas. Existen varias especies de filarias que pueden vivir en el perro, pero la más importante clínicamente es *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856).

El objetivo del estudio es profundizar y adquirir más conocimientos respecto a la Dirofilariosis y analizar una muestra de datos obtenida en pueblos de la provincia de Zaragoza (Ejea, Pinsoro, Valareña, etc.), con objeto de extraer conclusiones relativas a razas afectadas, edades susceptibles, pruebas diagnósticas, etc. Además del uso y manejo con cierta soltura de un programa de software libre (*PSPP*) para tratamiento estadístico de datos.

La metodología a seguir para llevar a cabo el trabajo ha consistido en consultar bibliografía e internet para redactar la parte teórica y, una vez terminada, aprender a manejar el programa mencionado para poder trabajar la base de datos y, así, conseguir el objetivo propuesto.

Algunos de los resultados obtenidos al analizar las distintas variables de los datos recogidos, confirman que el “Test de Knott Modificado” es la prueba diagnóstica directa más eficaz tal y como destaca la bibliografía consultada, que los perros de caza son las razas menos protegidas y por lo tanto las más afectadas, y que la edad con más riesgo a enfermar está entorno a los 3 años.

La prevalencia e importancia de este nematodo parásito va en aumento por lo que es fundamental seguir realizando estudios estadísticos cuyos resultados sirvan para concienciar a la población acerca del uso de una prevención adecuada, mejorar los métodos diagnósticos menos eficaces y, en general, profundizar en la epidemiología.

Palabras clave: Dirofilariosis canina, *D. immitis*, Diagnóstico, Test Modificado de Knott.



ABSTRACT

In the present work, a theoretical revision about the canine Dirofilariasis has been realized, besides a comparative analysis of different types of detection and identification of microfilarias, working with a data base ceded by Professor Miguel Ángel Peribáñez.

The Dirofilariasis is a parasitic cardiopulmonary illness of worldwide distribution, whose incidence is increasing; it also causes an important problem to the affected individual's health and produces zoonotic infections. There are several species of filaria which can live in a dog, but, clinically, the most important one is the *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856).

The goal of this study is to get a deeper knowledge about the Dirofilariasis and analyze a sample of data obtained in some places of the province of Zaragoza (Ejea, Pinsoro, Valreña, etc.), with the objective of drawing conclusions related to affected breeds, sensitive ages, diagnostic tests, etc. Besides learning how to use with ease an open software program (*PSPP*) for the statistical treatment of data.

The methodology has consisted in checking bibliography and the internet to write the theoretical part and, once finished, learning how to use the mentioned program to be able to work with the data base so that the goal could be reached.

Some of the achieved goals after analyzing the different variables of the collected data, confirm that the "Modified Knott Test" is the most effective direct diagnostic test as the checked bibliography states, that the hunting dogs are the least protected breeds and therefore the most affected, and that the riskiest moment to become ill is around the age of 3.

The prevalence and importance of this nematode parasite is increasing so it is essential to continue doing statistical studies whose results can be used to raise awareness among the population about the use of an optimal prevention, to improve the least effective diagnostic methodologies and, in general, to get a deeper knowledge about the epidemiology.

Key words: Canine Dirofilariasis, *D. immitis*, Diagnóstico, Modified Knott Test.



1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. INTRODUCCIÓN

La Dirofilariosis canina es una enfermedad parasitaria cardiopulmonar producida por la especie *Dirofilaria immitis*, un nematodo cuya distribución es mundial; en Estados Unidos hay una gran incidencia y en Europa afecta con mayor frecuencia a los países Mediterráneos. Recalcamos que está incluida en la lista de enfermedades zoonóticas emergentes.

La filaria *D. immitis* puede causar infección en distintas especies, ya sean perros domésticos, lobos, zorros, coyotes, gatos domésticos, hurones, ratas, leones marinos, gatos salvajes, coatis y seres humanos (Stephen J. Ettinger y Edward C. Feldman, 2007). La clínica de las diversas especies es distinta, por lo que se tratan diferente. En este trabajo sólo se hace referencia al perro.

La gravedad de la infección es dispar, puede variar desde asintomática hasta producir una enfermedad pulmonar e incluso una cardiopatía. Si el curso es crónico también se han observado lesiones en otros órganos y alteraciones vasculares. La Dirofilariosis incluso puede llegar a ser letal.

1.2. HISTORIA DE LA DIROFILARIOISIS

Fernando Simón Martín (2012) relata en un artículo, incluido en la revista Argos, que en 1626 Francesco Birago describió en su “Tratado Cinegético” la primera observación de *Dirofilaria immitis*. Éste halló el verme en una necropsia, en el riñón de uno de sus perros de caza. Además, comenta que, en 1679, J.B. Panthot publicó otro escrito y dibujó el parásito. Panthot encontró 31 vermes en el ventrículo derecho de una perra usada para demostraciones anatómicas. Finaliza contando que entre 1806 y 1875 descubrieron la amplia distribución geográfica de esta especie. Constataron haberla detectado en Italia, Estados Unidos, Japón, China y Brasil. Sin embargo, en España la Dirofilariosis canina no se observó hasta los años 30 y 40 del siglo pasado (Cordero del Campillo y Aller Gancedo, 1974).

1.3. EL PARÁSITO

Tal y como se ha comentado en la introducción, la infección por el parásito *Dirofilaria* (o Filariosis)¹ es una enfermedad que afecta tanto a carnívoros domésticos como a salvajes,

¹

Utilizaremos Dirofilariosis y Filariosis para referirnos al mismo concepto.



principalmente a cánidos. También afecta al hombre, aunque, en éste, el parásito no puede completar el ciclo biológico (Theis, 2005; Simon et al., 2009, Morchón et al., 2010).

Varias especies de filarias² pueden parasitar a los animales mencionados, pero *D. immitis* es la causante de la Dirofilariosis canina. Es la especie más patógena y la que tiene mayor importancia en medicina veterinaria. La infección tiene varias denominaciones como por ejemplo Dirofilariosis, Verminosis cardiaca, enfermedad por gusanos cardiacos, enfermedad del gusano del corazón o “heartworm disease” (Rawlings y Calvert, 1997). *D. immitis* pertenece taxonómicamente al *Phylum Nemathelminthes*, Clase Nematoda, Orden Spirurida, Suborden Spirurina, Superfamilia Filarioidea, Familia Filariidae, Género Dirofilaria y Especie *immitis* (Borchert, 1964; Urquhart y col, 2001). Este filaroide necesita a los mosquitos quienes le hacen de vector transmisor y de hospedador intermediario. Más de 60 especies de mosquitos son capaces de infectarse con microfilarias (embriones vermiformes) (Stephen J. Ettinger y Edward C. Feldman, 2007), razón por la cual esta dolencia está extendida por todo el mundo. Las alteraciones que producen en el perro son a nivel del aparato cardiorespiratorio, siendo los pulmones los primeros en verse afectados.

Para poder diagnosticar el parásito, es importante conocer y diferenciar las distintas especies de filarias. Por ello a continuación se añade una tabla (Tabla1) para observar las diferencias en cuanto a periodo de incubación, longitud, localización en el hospedador y el tipo de vector que usan para reproducirse.

FILARIA	VECTORES	P.I.	LONGITUD ADULTOS	LOCALIZACIÓN ADULTOS
<i>Dirofilaria immitis</i>	Mosquitos (<i>Culicidae</i>)	120 - 180 días	M: 12 -18 cm H: 25 – 30 cm	Arterias Pulmonares / Ventrículo derecho
<i>Dirofilaria repens</i>	Mosquitos (<i>Culicidae</i>)	189 - 259 días	M: 5 – 7 cm H: 10 – 17 cm	Tejido Subcutáneo / fascia muscular
<i>Acanthocheilonema</i> (<i>Dipetalonema</i>)	Pulgas y garrapatas	427 – 476 días	M: 9 – 17 mm H: 21 – 25 mm	Tejido Subcutáneo / fascia muscular/ cavidad peritoneal riñón
<i>Acanthocheilonema</i> (<i>Dipetalonema dr</i>)	Pulgas y garrapatas (<i>R. Sanguineus</i>)	120 días	M: 15 – 31 mm H: 33 – 55 mm	Cavidad peritoneal
<i>Cercopithifilaria</i> (<i>Acanthocheilonema</i>)	Garrapatas (<i>R. sanguineus</i>)	Desconocido	M: desconocido H: 23 – 24 mm	Tejido subcutáneo/ fascia muscular

(Tabla 1) (Diferencias entre especies de filarias. Fuente: Guía ESCCAP nº 5; Gómez Bautista y Miró, 1997)

²

Las filarias son los parásitos (nematodos patógenos) causantes de la Dirofilariosis canina.



Aunque más tarde comentaremos el ciclo biológico, detallamos que los vermes adultos son alargados (12-15 cm los machos y 25-40 cm las hembras) y redondeados, y las microfilarias miden de 307 a 322 micrones de longitud.

1.4. EPIDEMIOLOGÍA

Los factores importantes en la expansión de la enfermedad pueden dividirse en aquellos que afectan al hospedador/reservorios y los que afectan al vector.

Reservorios/Hospedadores

Existen varios reservorios que ayudan a mantener y propagar la patología. Son los hospedadores silvestres los que más nos preocupan porque tenemos pocos datos sobre ellos y el control que se les puede aplicar es deficiente. El principal hospedador definitivo y reservorio de la Dirofilariosis es el perro, pero en zorros se han encontrado prevalencias de 28,2% y en coyotes entre 13-58%. Otros reservorios son los félidos, el hurón y el león marino de California, pero la incidencia de la infección y la intensidad de parasitación son muy bajas y suele cursar con amicrofilaremia (M. Cordero del Campillo – F.A. Rojo Vázquez, 1999). También encontramos hospedadores accidentales como son el hombre, algunos félidos silvestres, el oso y el mapache, en los que el desarrollo no se completa y la infección cursa sin microfilaremia.

Vectores

Los vectores que intervienen en el ciclo biológico de la Dirofilariosis canina son, por lo general, mosquitos hematófagos de los géneros *Culex*, *Aedes*, *Anopheles*, *Culiseta* y *Coquillettidia*. (Grieve et al., 1983; Cancrini et al., 2006). La capacidad de transmitir el parásito solamente ha sido demostrada en diez especies: siete de *Aedes*, dos de *Anopheles* y *Culex salinarius* (M. Cordero del Campillo – F.A. Rojo Vázquez, 1999). Recientemente ha aparecido el mosquito Tigre (*Aedes albopictus*), otro vector transmisor de la enfermedad. Hay que tener en cuenta que son vectores nocturnos excepto éste último, que es diurno, por lo que la transmisión de la enfermedad ya no sólo se establece de noche, sino también de día. Requieren un medio húmedo para el desarrollo de sus larvas y temperaturas medias superiores a los 14°C para completar su ciclo biológico. El tamaño de la población vectorial y la dispersión de la Dirofilariosis dependen de la temperatura, humedad relativa, lluvias, intensidad de luz y del viento.

A consecuencia de un incremento de las temperaturas (clima favorable), las áreas de riesgo se extienden ya que los vectores se reproducen a más velocidad. Además, este factor disminuye el



periodo de incubación, aumenta el período de infección y esto contribuye a un incremento de la prevalencia de la Dirofilariosis. Así, la prevención debe empezar antes del periodo de actividad del mosquito, en marzo, y continuar hasta noviembre.

Por último, cabe destacar que *D. immitis* puede sobrevivir en el mosquito hibernante y completar el desarrollo cuando las temperaturas sean adecuadas.

Factores que determinan la receptividad del perro y la frecuencia de transmisión.

A grosor modo, la frecuencia de transmisión de *D. immitis* y la propensión del perro a infectarse depende de varios factores ya comentados: factores ambientales, factores socioeconómicos (movimiento de animales y densidad) y por último el hábitat del perro.

Generalmente, un animal tiene mayor riesgo de infección cuanto más sometido esté a contacto constante con el mosquito vector. Asimismo, ciertas características como son el sexo, la raza, la aptitud y la edad de los hospedadores les hacen más propensos a contraer la patología. Los machos y determinadas razas son más utilizados para actividades de campo, por lo que éstos, inevitablemente, tienen más contacto con el vector.

La relación que puede establecerse entre la edad y la prevalencia-intensidad de esta parasitosis es la siguiente: las mayores prevalencias se presentan en perros de 3-7 años y las menores en animales con más de 10 años, ya que la vida media del parásito es de 5-7 años (M. Cordero del Campillo – F.A. Rojo Vázquez, 1999). Además, una vez han sido parasitados, adquieren cierta resistencia inmunológica.

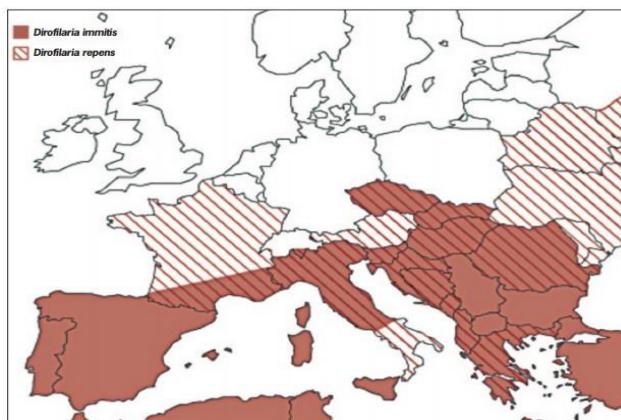
Distribución en EE.UU., Europa y España

En EE.UU. “la dirofilariosis se considera regionalmente endémica en cada uno de los 48 estados contiguos, Hawaii, Puerto Rico, las Islas Vírgenes de EE.UU. y Guam” (Bowman et al., 2009; Kozek et al., 1995; Ludlam et al, 1970). *D. immitis* es, sin lugar a dudas, el parásito filarioide más importante de los animales domésticos de Norteamérica. Se encuentra a lo largo de las costas del Atlántico, del golfo de México y cerca del río Mississippi. La incidencia global entre los perros es del 15 al 20%; pero en zonas donde la enfermedad es muy endémica, prácticamente todos los perros no protegidos se infestará.

Aunque las áreas endémicas europeas de *D. immitis* y *D. repens* se solapan en muchas regiones, la distribución no es exactamente la misma. Podemos encontrar *Dirofilaria immitis* en España, Portugal, sur de Francia, sur de Suiza, norte y centro de Italia, la costa Adriática desde Italia hasta Grecia, la República Checa, Eslovenia, Rumania y Bulgaria (Genchi et al., 2005). En



cambio, *D. repens* es la única especie presente en el sur de Italia, centro de Croacia y Hungría (Guadalupe Miró Corrales, Laia Solano Gallego, 2012) tal y como muestra la Figura 1. Recientemente, se han descrito infecciones por *D. repens* en Alemania y/o Austria (www.esccap.com).



(Fig. 1) (Distribución de la Dirofilariosis en Europa y Asia)

Gran parte de España es endémica a la Dirofilariosis canina (Fig. 2). Las comunidades autónomas con mayor riesgo son las situadas en la costa Mediterránea: Comunidad Valenciana, Baleares, Andalucía, Aragón y en especial las Islas Canarias (Pérez-Sánchez et al., 1989; Aranda et al., 1998; Cancrini et al., 2000; Solano-Gallego et al., 2006; Montoya et al., 2010). En ellas hay una prevalencia del 25-50% por lo que el riesgo es extremo. El delta del Ebro también destaca con una prevalencia del 35.8% (M. Cordero del Campillo – F.A. Rojo Vázquez, 1999). Contrariamente, en Barcelona y Tarragona no hay demasiado riesgo.

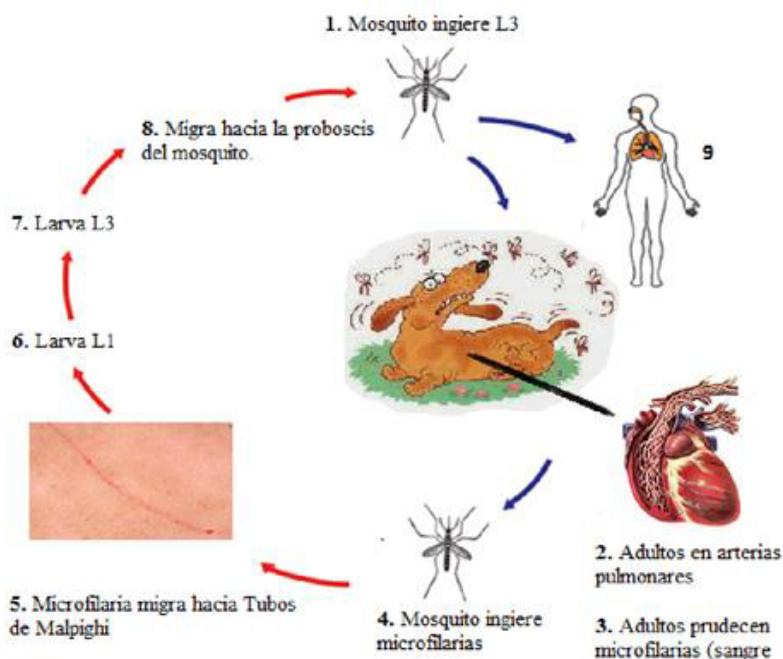


(Fig. 2) (Distribución de la Dirofilariosis en España. Fuente: www.cvpezunas.es.tl/Galer%Eda/pic-1000058.htm)



1.5. CICLO BIOLÓGICO DEL PARÁSITO

Es necesario conocer el ciclo biológico de *Dirofilaria immitis* (Fig.3) para comprender las medidas preventivas y el tratamiento contra este parásito. En cualquier caso, solamente desaparecen las filarias cuando las poblaciones de mosquitos se reducen lo suficiente.



(Fig. 3)³ (Ciclo biológico de *D. immitis*. Fuente: www.cdc.gov)

El ciclo biológico de *D. immitis* es indirecto y empieza cuando el perro es picado por un mosquito infectado de filarias. Para que pueda desarrollarse el parásito es necesaria la presencia de un vector, en este caso, un mosquito, y un hospedador definitivo (el perro). Abraham (1988) detalla el ciclo en una revisión.

La infestación comienza cuando las larvas infectantes L3 (larvas en fase 3), transportadas por los órganos bucales de un mosquito, penetran en la piel del hospedador (perro) a través de una picadura. Las larvas L3 sufren dos mudas: la primera, donde L3 pasa a L4 (1,5 mm de longitud), ocurre en el tejido subcutáneo y la musculatura abdominal o torácica entre 1 y 12 días post-inoculación y la segunda muda, en la cual L4 pasa a L5 (12-15 mm), se produce entre los días 60 y 70 después de la infección según Orihel (1961), o entre 50 y 58 días postinfección según Lichtenfels et al., (1985). Las larvas L5 penetran en las arterias pulmonares y en el corazón al

³

La imagen de la microfilaria ha sido cedida por el profesor Mariano Morales Amella.



cabo de 70 días de haber parasitado al perro (Kotani y Powers, 1982). En el aparato cardiopulmonar es donde mudan a filarias adultas y siguen creciendo hasta alcanzar 11 cm (Kume e Itagaki, 1955). Luego se reproducen (una única lombriz puede producir en un día 5000 microfilarias) durante más de 5 años. Es a los 6-9 meses post-infección cuando podemos encontrar microfilarias en sangre y así, diagnosticar el parásito en el perro.

Los mosquitos se infectan al picar a un perro con microfilarias. En los tubos de Malpighi es donde ocurre el paso a L2 y de L2 a L3. Finalmente, L3 migra hacia la proboscis y espera la ocasión para introducirse en un nuevo hospedador (Dwight D. Bowman, 2004).

Resumiendo, el paso de L4 a L5 y la formación de microfilarias, se producen en el organismo del perro, la transformación de las microfilarias a L2 y posteriormente a L3, se produce en el organismo del mosquito. L3 es el estadío infectante.

Durante el período de prepatencia (periodo transcurrido entre la infección y la primera aparición de microfilarias en sangre), de seis a siete meses, no se observan signos clínicos, pues los vermes en fase de desarrollo no provocan ningún trastorno.

1.6. PATOLOGÍA

La patogenia está asociada a los parásitos adultos (G.M. Urquhart et al., 1996). Aunque el nombre de la enfermedad solamente incluya al corazón, la lesión principal se manifiesta en los pulmones y las arterias pulmonares (Stephen J. Ettinger, Edward C. Feldman, 2007). Los vermes adultos y las larvas habitan en la porción caudal del pulmón y a veces emigran hacia las arterias pulmonares principales y al corazón derecho. La patología de la enfermedad empieza con lesiones tisulares en dichas arterias por parte de los vermes adultos. El corazón (ventrículo derecho) se ve afectado en estadios finales. Además del parásito, se ha comprobado que la bacteria del género Wolbachia (una Rickettsia) es necesaria para que las filarias sobrevivan lo que contribuye a empeorar la patogenia (Tabar et al., 2013). Wolbachia se encuentra en el interior del nematodo y cuando éste es destruido por los antihelmínticos, la bacteria se libera a la sangre y desempeña un proceso inflamatorio. Por lo tanto, el problema fundamental, no sólo son las lesiones y obstrucciones que causan las filarias sino también los procesos inflamatorios asociados.

La gravedad de la infección radica en la carga parasitaria, la respuesta individual del animal y el nivel de ejercicio físico al que esté expuesto. El daño arterial es siempre mayor en los perros que practican un ejercicio físico más intenso (Bowman y Atkins, 2009). Las microfilarias no son



tan importantes en cuanto a la patogenia, pero son las responsables de producir neumonitis y glomerulonefritis (Casey y Splitter, 1975; Aikawa et al., 1981).

Los síndromes que se observan en la “Heartworm disease” son los que se comentaran a continuación:

- Hipertensión pulmonar o “cor pulmonale”. Es la alteración funcional más significativa. Dependiendo de la intensidad de parasitación, de la respuesta del hospedador y del ejercicio realizado, puede pasar desapercibida o cursar con fatiga, tos crónica y disnea. Es debida a las alteraciones que causan los parásitos en el endotelio de la arteria y a su presencia. La pared de las arterias deja de ser lisa y blanca y adquiere aspecto rugoso y tonalidad púrpura, a causa de la proliferación de la túnica íntima por sustancias tóxicas, mecanismos inmunitarios y traumatismos. Además, hay edematización arterial ya que, al estar dañada la túnica íntima, pasan a través de ella proteínas y líquidos plasmáticos. Las células musculares lisas de la túnica media se multiplican y originan múltiples proliferaciones proyectadas hacia la luz, ocluyendo el paso vascular y causando hipertensión pulmonar. Las arterias que más gravemente se afectan son los vasos de los lóbulos pulmonares caudales. Macroscópicamente se observa fibrosis, engrosamiento e hipertrofia muscular. Todo ello genera hipoxia y gasto cardíaco reducido. La presión arterial pulmonar también aumenta debido a la presencia de vermes y a la tromboembolización. El animal puede llegar a sufrir una insuficiencia cardíaca.
- Fallo congestivo derecho del corazón. Suele ocurrir tras la hipertensión pulmonar; el corazón es incapaz de bombear el flujo de sangre normal ya que las paredes de las arterias están inflamadas y engrosadas. El corazón no dilata lo suficiente y para compensar la disminución del flujo, aumenta la presión y el trabajo del ventrículo derecho. Finalmente se produce una descompensación que da lugar al fallo congestivo derecho del corazón. Es frecuente en infecciones masivas y en animales sometidos a ejercicio físico. Provoca edemas periféricos superficiales y ascitis. Muchas veces se asocia a hepatomegalia por el aumento de la presión venosa y el pulso yugular.
- Síndrome de Vena Cava o del Fallo Hepático. Ocurre frecuentemente en animales muy jóvenes (menos de 3 años) y altamente parasitados, aunque existen excepciones. Es un proceso agudo de carácter mortal (Atkins et al., 1988; Strickland, 1998). Los animales con este síndrome también presentan hipertensión pulmonar, pero los signos más importantes se deben a las alteraciones hepáticas. La presencia del parásito en la aurícula derecha, vena cava caudal y, en ocasiones, en las venas hepáticas, provoca obstrucción del flujo sanguíneo



principalmente en torno a la válvula tricúspide (M. Cordero del Campillo – F.A. Rojo Vázquez, 1999). En resumen, una elevación de la presión venosa y la congestión y dilatación hepática es lo que produce el síndrome. La disfunción hepática impide esterificar el colesterol libre y en consecuencia los glóbulos rojos acumulan el lípido y se destruyen. Rápidamente se produce hemoglobinemia y hemoglobinuria. El tratamiento es quirúrgico: por venoctomía yugular se elimina el parásito.

- Neumonitis alérgica (dirofilariosis oculta). Es debida a la hipersensibilización del perro a los antígenos de las microfilarias. Éstas son capturadas, inmovilizadas y destruidas en los capilares del pulmón y septos alveolares, lo que provoca infiltración granulomatosa. El sistema inmune del animal reacciona ante los antígenos y se produce una respuesta inmunitaria en la que intervienen los neutrófilos, eosinófilos y macrófagos. Estos animales cursan con tos seca, disnea, intolerancia al ejercicio y crepitación bronquial (M. Cordero del Campillo – F.A. Rojo Vázquez, 1999).

- Tromboembolización. Cobra importancia cuando se provoca la muerte brusca del parásito por administración de un adulticida. Los parásitos muertos producen trombosis masiva e inflamación granulomatosa de la pared de las arterias. El endotelio de éstas se desorganiza, aumenta la permeabilidad, por lo que agrava el edema perivascular. Los fragmentos de parásitos son calcificados parcialmente e incorporados a la pared de la arteria que presenta gran cantidad de tejido conectivo fibroso (M. Cordero del Campillo – F.A. Rojo Vázquez, 1999). Todo ello empeora la hipertensión pulmonar, la insuficiencia cardiaca congestiva del lado derecho, llegando a ocasionar fallo congestivo o muerte del hospedador.

Además, la trombosis y la lisis de los coágulos pueden provocar un déficit local de los factores de coagulación y/o CID (coagulopatía intravascular diseminada). Estos animales suelen presentar una elevación de la temperatura, taquicardia, debilidad, mucosas pálidas, hemoptisis y epistaxis.

-Alteraciones hepáticas y renales. Los perros con hipertensión pulmonar suelen presentar congestión pasiva leve. En el fallo congestivo del corazón aparece hepatomegalia y alteración de la funcionalidad de los hepatocitos. El riñón se ve afectado por la formación de inmunocomplejos. Los perros con Dirofilariosis crónica suelen presentar glomerulonefritis membranosa por engrosamiento de la membrana basal de los capilares glomerulares. Otra alteración inmunopatológica es la nefritis intersticial con infiltrado de células plasmáticas, linfocitos y macrófagos en el intersticio medular y cortical.



1.7. SIGNOS CLÍNICOS

Las infecciones causadas por *D. immitis* pueden ser leves, graves o incluso mortales y de ello depende la presencia de más o menos signos clínicos. Es importante señalar que los perros pueden presentar un síntoma, varios o ninguno, aunque la mayoría son asintomáticos (Stephen J. Ettinger et al., 2007).

En la exploración frecuentemente observamos pérdida de peso, cansancio, apatía, mal estado en general. Asimismo, la tos, la disnea y la distensión abdominal por ascitis pueden ser detectadas en el reconocimiento médico. La ascitis es debida a la insuficiencia cardíaca congestiva. A la auscultación podemos apreciar un aumento de la frecuencia cardíaca a causa de la fibrilación auriculo-ventricular, soplos en el lado derecho y/o desdoblamiento del segundo ruido cardíaco, entre otros (Guadalupe Miró Corrales y Laia Solano Gallego, 2012). Cuando el paciente está grave, es posible detectar fiebre, hemoptisis, inclusive palpar el pulso yugular o notar la distensión de la vena. La Dirofilariosis incluso puede provocar síncope. “La muerte súbita es rara, pero puede producirse por un cuadro de insuficiencia respiratoria aguda” (Nelson et al., 2005; Bowman y Atkins, 2009). Especies distintas a *D. immitis* presentan signos clínicos y síntomas distintos a los descritos.

Realizando una pequeña mención al Síndrome de la Vena Cava, es destacable que el animal manifieste soplo tricúspide, ritmo de galope, aumento de la sonoridad del 2º tono cardíaco (con frecuencia está desdoblado), pulso yugular y pulso femoral débil. Además de tos o hemoptisis, ascitis, ...

1.8. EVOLUCIÓN CLÍNICA

El doctor Alberto Montoya Alonso y su equipo dividen la clínica en cuatro clases:

La clase I incluye a la mayoría de los perros infectados. Éstos no demuestran ningún signo clínico durante años. En clase II (moderada) encontramos aquellos animales únicamente fatigados. En la radiografía se observa un corazón agrandado y vasos pulmonares marcados. En clase III (grave) el paciente está disneico y presenta ascitis abdominal. Al sacarle una gota de sangre y observarla al microscopio se ven los nematodos. Finalmente, en clase IV (Síndrome Vena Cava) observamos pérdida de peso, ascitis y frecuentemente hemoglobinuria. Éstos últimos tienen un pronóstico malo.

Como se ha explicado anteriormente, la evolución depende de la carga parasitaria, la respuesta inmune y el nivel de ejercicio físico al que esté expuesto, pero el progreso es crónico si no se



trata. Cabe mencionar que durante la evolución crónica pueden aparecer cuadros agudos que cursan con disnea y hemoptisis a consecuencia de un tromboembolismo. Los perros de pequeño tamaño suelen tener peor pronóstico, ya que habitualmente los parásitos adultos migran desde la arteria pulmonar al ventrículo derecho, causando hipertensión pulmonar.

1.9. ANALÍTICA CLÍNICA

Una analítica no es concluyente para afirmar que un animal está infectado por dirofilarias, pero nos aporta algo de información para sospechar de dicha infección siempre y cuando el paciente presente signos clínicos (Calvert et al., 1999).

La anemia normocítica-normocrómica y la eosinofilia son las alteraciones que aparecen con mayor frecuencia en una analítica realizada a un perro infectado. M. Cordero del Campillo y F.A. Rojo Vázquez, (1999) han descrito que un 10% de los perros presentan anemia normocrómica-normocítica y valor hematocrito del 10-30%. El proteinograma no suele estar alterado, pero cuando lo está se aprecia hipoalbuminemia y aumento de las proteínas beta y gamma (Guadalupe Miró Corrales y Laia Solano Gallego, 2012). Si el hígado o los riñones se ven afectados, también puede presentarse hipoalbuminemia; a veces se ve un aumento de las enzimas hepatocitarias ALT y AST y proteinuria. En caso de darse tromboembolización postratamiento, el perfil de coagulación puede verse alterado. Observamos bilirrubinuria y hemoglobinuria de aparición brusca y previa a cualquier otro signo cuando tenemos un Síndrome de Vena Cava.

Es importante valorar los parámetros renales antes de instaurar un tratamiento porque los fármacos a administrar son nefrotóxicos y podrían empeorar la situación renal.

1.10. DIAGNÓSTICO DE *D. IMMITIS* EN EL PERRO

Para diagnosticar la infección, además del diagnóstico clínico, se realizan test sanguíneos para detectar microfilarias (“Wet Blood Smear, Hematocrit Capillary Tube, Modified knott Test, Filter”), se puede cuantificar el número de microfilarias en sangre y también diferenciar especies de microfilarias. Asimismo, se utilizan tests inmunodiagnósticos como son: “Indirect Fluorescent Antibody” (IFA), “Antibody Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” (Ab-ELISA), “Antigen Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” (Ag-ELISA), “Indirect Hemagglutination” (IHA), “Passive Cutaneus Anaphylaxis” (PCA), “Counterimmunolectroforesis” (CIE) y otros (Rawlings, 1986).



A continuación, hablaremos sobre algunas de estas pruebas; concretamente nos centraremos en el “Test de Knott”, “Filter” y en “Wet Blood Smear”, que son las pruebas diagnósticas analizadas en la base de datos.

Es importante diferenciar para el diagnóstico las microfilarias circulantes de *A. Reconditum* y *A. Dracunculoides* de las microfilarias de *D. immitis* y de *D. repens*. También hay que tener en cuenta que la Dirofilariosis puede cursar con microfilaremia o amicrofilaremia. Las infecciones amicrofilarémicas pueden presentarse por hipersensibilización a las larvas, por infección con vermes de un sólo sexo o por inmadurez de los vermes. Se describe una posible microfilaremia en perros menores de un año debido a la transmisión transplacentaria.

1.10.1. CLÍNICO

Lo ideal sería detectar la Dirofilariosis antes del inicio de los síntomas mediante una exploración sistemática, sin embargo, esto no puede ser así siempre. Las pruebas que nos pueden aproximar al diagnóstico, además de la hematología y la bioquímica, son la radiología, la ecocardiografía y la electrocardiografía.

Las pruebas radiográficas ofrecen detectar la Dirofilariosis, determinan la gravedad de la infección y evalúan los cambios del parénquima pulmonar (Stephen J. Ettinger, Edward C. Feldman, 2007). Las proyecciones necesarias para el diagnóstico son la ventrodorsal y la lateral. Las alteraciones que indican posibilidad de infección son dilatación y tortuosidad de las arterias pulmonares, anomalías en el patrón pulmonar (opacidades alveolares o patrón intersticial peribronquial) y cardiomegalia derecha. En caso de insuficiencia cardíaca, también se observa ascitis y pleuritis. En cuanto a la ecocardiografía, permite una visualización directa de las cavidades cardíacas y los vasos anexos. Igualmente, permite la detección de posibles parásitos adultos en el corazón, en las arterias pulmonares o en la porción caudal de la vena cava. Lo que se observa es dilatación de la aurícula y ventrículo derecho, movimiento plano o paradójico del tabique, agrandamiento de la arteria pulmonar principal y, algunas veces, derrame pleural o pericárdico. Por último, damos una pincelada sobre la electrocardiografía. Esta prueba es útil en los perros con arritmia cuando se encuentran en fase terminal o con lesión grave en el ventrículo derecho; detecta desviaciones del vector eléctrico, del ritmo y fibrilaciones atriales.

1.10.2. ETIOLÓGICO

Debido a la inespecificidad de los datos clínicos, se aconseja el diagnóstico etiológico. Cabe recordar que la infección con Dirofilariosis suele causar microfilaremia pero existe un porcentaje que puede cursar con amicrofilaremia. Esto puede observarse en infecciones



preclínicas, en infecciones de un único sexo, en caso de destrucción inmunológica de microfilarias y con fármacos que inducen amicrofilaremia (Stephen J. Ettinger y Edward C. Feldman, 2007, pg. 1120-1124). Dicho esto, el diagnóstico etiológico incluye detección de microfilarias circulantes, cuantificación y su identificación específica.

Detección de Microfilarias

“La intensidad de microfilaremia no se correlaciona con la carga parasitaria de vermes adultos” (Guadalupe Miró Corrales y Laia Solano Gallego, 2012, p.176). Las microfilarias pueden estar presentes en perros que han sido tratados y han eliminado los adultos, en perros donde los vermes se han muerto naturalmente, en animales que se les ha transfundido sangre con microfilarias, en perros jóvenes con transferencia placentaria y en perros infectados por otros filaroides. También pueden persistir microfilarias si han sido tratados, pero no han conseguido eliminar los adultos. Los casos en los que pueden aparecer infecciones ocultas ya los hemos comentado anteriormente. A continuación, explicaremos las pruebas que permiten detectar los parásitos.

Test Sanguíneos

“Wet Blood Smear”: consiste en extraer sangre venosa fresca con anticoagulante y colocarla sobre un portaobjetos, cubrirla con un cubre y observar al microscopio. También se pueden realizar preparaciones en seco teñidas con Giemsa. Con esta técnica podemos diferenciar las microfilarias de *D. immitis* de *Dipetalonema reconditum*. La eficacia de la prueba depende de la concentración de microfilarias en la muestra de sangre. Si se detectan microfilarias *D. immitis* podemos afirmar que es positivo a la infección, en caso contrario deberíamos hacer más pruebas.

“Hematocrit Capillary Tube”: consiste en centrifugar dos capilares de hematocrito para separar el plasma, el cual contendrá las microfilarias. Después se observa el movimiento de éstas en el microscopio. Dependiendo de la rapidez con la que se mueven, se puede distinguir entre especies. Resultado negativo a esta prueba, no permite descartar la enfermedad porque no todos los animales presentan microfilarias circulantes.

“Modified Knott Test”: según Rawlings (Clarence A. Rawlings, 1986) se mezcla 1ml de sangre venosa con 10mL de Formalina tamponada al 2% y se centrifuga durante 3-5 minutos a 1500rpm. Se decanta el sobrenadante y se mezcla el sedimento con azul de metileno para finalmente ser observado al microscopio.



“Filter”: se inyecta sangre venosa mezclada con anticoagulante a través de membranas de policarbonato de 3-5 µm de diámetro de poro. Se recoge lo que se ha obtenido en dicho filtro y se observa al microscopio. Hay quien prefiere la filtración cuando existen menos de 100 microfilarias por mililitro de sangre.

Ambos métodos (filtración y Test de Knott Modificado) son pruebas de concentración e inducen hemólisis, fijan cualquier microfilaria existente y diferencian *D. immitis* de *Dipetalonema reconditum*. El primero tiene una cola recta y una cabeza cónica y el segundo muestra ganchos en la cola y una cabeza embotada.

Comparación de test

Se compara la prueba de Knott y la de filtración respecto al frotis con sangre húmeda. Las pruebas de comparación son útiles cuando las muestras contienen pocas microfilarias. La prueba que induce a más error es la de filtración. Ésta puede dar falsos positivos por contaminación del lisado con microfilarias que contienen sangre, etc. Asimismo, no existe el test perfecto, pues todos ellos pueden fallar; se pueden perder microfilarias durante la decantación, puede fallar la centrifugación... Noyes redactó un informe sobre los problemas con las técnicas de concentración (Rawlings, 1986, p.214). Para escoger un test u otro nos basamos en las preferencias personales más que en las diferencias científicas de precisión. La prueba de Knott es más barata que la de filtración, pero requiere más tiempo para conocer el resultado. Si fuera necesario realizar múltiples test simultáneamente, sería más eficaz la prueba de Knott. También sería la ideal para la diferenciación de especies, pero para medir la longitud y examinar la forma de la cola, se puede hacer con la filtración.

Test de Inmunodiagnóstico

En la Figura 4 se aprecia un ejemplo de test: se trata del “SNAP RT Heartworm Antigen kit”.



(Fig. 4) (SNAP RT Heartworm Antigen kit. Fuente: <https://www.idexx.com/small-animal-health/products-and-services/snap-heartworm-rt-test.html>)



Estos test tienen valor cuando los animales son amicrofilarémicos con sospecha de padecer la infección. Los resultados deben interpretarse teniendo en cuenta los otros datos obtenidos y la prevalencia de la parasitosis. Se detectan antígenos solubles específicos de filarias hembras mediante pruebas comerciales basadas, principalmente, en el enzimoinmunoensayo o la aglutinación. Existen varios fabricantes de test comerciales y varios productos.

Las pruebas de detección de antígenos son menos sensibles que las de anticuerpos en infecciones recientes ya que las primeras pueden dar falsos negativos si el animal ha sido infectado recientemente, en infecciones bajas o cuando únicamente contiene vermes machos (Martini et al., 1996; Ranjbar-Bahadori et al., 2007). Por contra, los métodos que detectan anticuerpos frente a filarias no son específicos y por lo tanto no tienen valor diagnóstico en perros (Nelson et al., 2005).

Cuando el resultado del test rápido es dudoso podemos recurrir a pruebas como “Indirect Fluorescent Antibody”, “Antibody Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”, “Antigen Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”, “Indirect Hemagglutination” (IHA), “Passive Cutaneous Anaphylaxis” (PCA) y Counterimmunoelectrophoresis” (CIE). A continuación, explicamos en qué consisten dos de ellas.

“Indirect Fluorescent Antibody” (IFA): es un ensayo serológico que usa dos anticuerpos (anticuerpo y anti-anticuerpo teñido con isiotiocianato de fluoresceína). El anticuerpo se añade a la molécula diana y el anti-anticuerpo fluorescente, si hay unión antígeno-anticuerpo, se une a ellos (<http://epidemiologiamolecular.com/inmunofluorescencia/>).

“Antibody Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” (Ab-ELISA): usa anticuerpos monoclonales contra el antígeno circulante de las filarias y parece ser más sensible y específica que otras pruebas, aunque puede dar falsos negativos y positivos. No hay reactividad cruzada con *Dipetalonema* o parásitos intestinales (Richard W. Nelson – C. Guillermo Couto, 2006).

Actualmente se está investigando en PCR (en el “Journal of Small Animal Practice” (2013) 54, 174-178, se puede leer más acerca del tema).

Cuantificación de Microfilarias

Cuantificar las microfilarias puede ser útil para instaurar el tratamiento y para predecir el pronóstico.



Identificación de las microfilarias basada en datos morfológicos

Es importante diferenciar las distintas microfilarias para instaurar un tratamiento apropiado. Además de poder identificar las diferentes especies con los tests ya mencionados, la tinción de fosfatasa ácida⁴ es una tinción citoquímica que se usa para identificar específicamente las distintas especies de microfilarias (Willians et al., 1977). Se observa la distribución somática de las zonas de actividad de fosfatasas ácidas que presentan las microfilarias. La tinción se puede realizar sobre extensiones sanguíneas o en microfilarias obtenidas por filtración/Knott. Cada especie presenta actividad en una zona o zonas concretas y ésta se ve reflejada mediante color rojo. En *D. immitis* la actividad de la fosfatasa ácida se localiza en los poros excretor y anal.

Otros parámetros a analizar son: longitud, anchura en torno al anillo nervioso, localización y disposición del poro excretor, poro anal y espaciocefálico. En la Tabla 2 indicamos algunas de las características morfológicas de las microfilarias de las cuatro especies de filarias del perro, detectadas por el Método de Knott Modificado.

Especie	Longitud (μm)	Anchura (μm)	Otras características
<i>D. immitis</i>	(218-340)	(4.5-7.3)	Extremo anterior cónico, posterior recto
<i>D. repens</i>	(200-360)	(5-8)	Extremo anterior cónico, posterior recto y largo
<i>Dip. Reconditum</i>	(240-293)	(3.5-6.5)	Extremo anterior globoso. Posterior en gancho
<i>Dip. Dracunculoides</i>	(145-233)	(5-6.4)	Cuerpo interno muy patente

(Tabla 2) (Características morfológicas detectadas por el Método de Knott Modificado. Fuente: Parasitología Veterinaria pg. 687 de M. Cordero del Campillo y F.A. Rojo Vázquez)

1.11. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Según Michael Schaer (2006), el diagnóstico diferencial básicamente incluye angioestrongilosis y otras causas de insuficiencia cardíaca congestiva derecha, enfermedad pericárdica (derrame pericárdico y pericarditis constrictiva), enfermedad valvular (válvula tricúspide o válvula pulmonar), enfermedad miocárdica (miocardiopatía dilatada, miocardiopatía hipertrófica,

⁴ Peribáñez, M.A. et al., publican una comunicación en "Veterinary Parasitology" acerca de la diferenciación de microfilarias de *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* y *Acanthocheilonema dracunculoides* usando la tinción fosfatasa ácida.



miocardiopatía restrictiva, enfermedad miocárdica secundaria), hipertensión pulmonar y arritmias.

1.12. TRATAMIENTO

El éxito del tratamiento radica en la eliminación total de los parásitos adultos con un adulticida y de las microfilarias con un microfilaricida utilizando drogas de baja toxicidad y evitando las complicaciones ocasionadas por la muerte de los parásitos (American Heartworm Society, 2000). Se utilizan diferentes antihelmínticos para atacar tres fases parasitarias distintas de *D. immitis*: microfilarias en la sangre circulante, larvas migratorias por los tejidos que se dirigen hacia el corazón, y vermes adultos en las arterias pulmonares y el corazón derecho. Los fármacos adulticidas son hepato y nefrotóxicos, siendo necesario conocer la funcionalidad de estos órganos antes de su administración (M. Cordero del Campillo – F.A. Rojo Vázquez, 1999). El tratamiento debe evitarse en caso de fallo cardíaco congestivo, Síndrome de Vena Cava, signos de tromboembolización, coagulación intravascular diseminada, neumonitis alérgica, cirrosis hepática, hiperazoemia y nefropatías con proteinuria.

Evaluación pretratamiento

Las enfermedades no relacionadas deben ser controladas antes de iniciar la terapia adulticida. Hay que confirmar el diagnóstico y evaluar al animal en general para prevenir complicaciones. Se recomienda realizar un hemograma completo, análisis de orina, perfil bioquímico y radiografías torácicas.

Terapia adulticida

1. La Tiacetarsamida sódica (Caparsolate) era un organoarsenical que fue muy utilizado, pero además de ser hepatotóxico, no mataba con seguridad a todos los vermes. Se administraba por vía endovenosa con cuidado para evitar la inflamación perivascular intensa y la necrosis en el sitio de la inyección. Urquhart, Armour, Duncan, Dunn y Jennings (Urquhart, J. Armour, J.L. Duncan, A.M. Dunn y F.W. Jennings (1996), “Veterinary Parasitology” p. 90) cuentan que este fármaco se administraba dos veces al día durante 3 días. Durante y después de su administración era necesario mantener reposo.

2. Diclorhidrato de melarsomina (Immiticide). Es un organoarsenical mucho más eficaz que el anterior y muy utilizado actualmente. De hecho, es el único principio activo eficaz disponible contra nematodos adultos (Guadalupe Miró Corrales y Laia Solano Gallego, 2012). Existen varios protocolos de administración, todos ellos se basan en inyecciones y se usa uno u otro en



función de la carga parasitaria. Este fármaco es menos irritante que la tiacetarsamida y no causa hepatotoxicidad. Es muy importante la restricción del ejercicio durante el tratamiento y durante el mes post tratamiento para reducir la consecuencia inevitable del tromboembolismo. Asimismo, podemos administrar heparina y corticoides para reducir los signos clínicos asociados (tromboembolización, ...) a este fenómeno.

3. Levamisol. Primero se administra el medicamento oral durante 7-14 días y a la semana se realiza una prueba de concentración. En el caso de continuar siendo positivo a *D. immitis*, se alarga el tratamiento. La émesis es la reacción adversa más común, pero también puede dar letargia, diarrea, nerviosismo, rigidez, convulsiones, etc. Se recomienda una segunda dosis a las 2-6 semanas posterapia. Este fármaco no suele emplearse debido a su toxicidad.

Terapia microfilaricida

Podemos empezar la terapia microfilaricida 4 o 5 semanas después de que hayamos tratado con adulticidas. Seguidamente explicaremos los fármacos que se empleaban anteriormente y los que se usan en la actualidad.

1. Yoduro de ditiazanina. Era la única droga aprobada por la FDA (Food and Drug Administration, E.E.U.U.) años atrás. Se daba a dosis de 4-11mg/kg durante 7-10 días. A la semana de haber iniciado el tratamiento se realizaba una prueba de concentración para microfilarias, si era positiva y no había manifestaciones tóxicas renales o hepáticas, se seguía dando ditiazanina a igual o mayor dosis durante otros 7 días. Los efectos adversos incluyen la no eliminación de las microfilarias, émesis, diarrea, anorexia y a veces, debilidad. También produce coloración en las heces y el vómito. Por último, se realizaba una segunda prueba de concentración, 2-6 semanas posterapia para ver si aún persistían hembras adultas.

2. Ivermectina. Es una lactona macrocíclica que estimula la liberación de GABA y así inhibe las neuronas presinápticas de los parásitos, produciendo la muerte por parálisis flácida. Actualmente es el medicamento más utilizado contra microfilarias. Varias personas han realizado estudios sobre la dosis a administrar y se ha llegado a la conclusión que funciona tanto a 0,2 mg/kg como a 0,05 mg/kg por vía oral (Rawlings, 1986, p.276). Cabe destacar que ésta droga no se puede administrar a según qué razas: Collies, Antiguo pastor ovejero, Pastor Shetland y otros que tengan en su ADN el gen MDR1 ya que les puede causar el coma e incluso la muerte por cruzar la barrera hematoencefálica. En este caso deberíamos administrar otros macrólidos como la Moxiciclina, la Milbemicina Oxima (Interceptor) o la Selamectina.



Los efectos adversos de la Ivermectina son la hipersensibilidad inmediata o retardada que cursa con vómitos, diarrea, depresión, anorexia, incluso con taquicardia, taquipnea, palidez, temblores, muerte. El animal debe mantenerse en observación durante 6-8 horas después del tratamiento para asegurarnos que no se desencadena un colapso circulatorio.

Fármacos coadyuvantes

1. Buprenorfina hidrocloruro (Buprex). Se utiliza como analgésico ya que la inyección de Melarsomina produce dolor.
2. Metilprednisolona (Urbason). Se usan dosis antiinflamatorias para prevenir una reacción anafiláctica, una neumonitis intersticial y la fibrosis periarterial debido a la muerte de los parásitos adultos.
3. Ácido acetil salicílico (Aspirina) o Heparina sódica. Uso antitrombótico. El ácido acetil salicílico es motivo de controversia. La American Heratworm Society nunca ha apoyado su uso como tratamiento pre-adulticida o post-adulticida. Por contra, hay veterinarios que lo usan pre y post tratamiento si el perro muestra signos de enfermedad vascular o hipertensión pulmonar graves.
4. Doxiciclina. Elimina la bacteria Wolbachia a una dosis de 5 mg/kg/12h. Menozzi, A. et al., (2015) han plasmado en un artículo publicado en la revista "Veterinary Parasitology" la eficacia de la combinación de la Ivermectina y la Doxiciclina.

Reposo

Es importantísimo un reposo absoluto mientras se está tratando de Dirofilariosis para evitar el tromboembolismo.

Ejemplo de tratamiento

DÍA 0	Ivermectina (5-6 µg/kg) y Doxiciclina durante 6 semanas, cada día (5mg/kg/12h)	DÍA 60	Ivermectina
DÍA 30	Repetir Ivermectina	DÍA 61	Immiticide
DÍA 31	Immiticide	DÍA 62	Immiticide



Tratamiento quirúrgico

“Sasaki, Kitagawa e Ishihara han descrito un método de eliminación mecánica de parásitos utilizando pinzas de cocodrilo flexibles” (Stephen J. Ettinger et al., 2007). La cirugía se recomienda si el ventrículo derecho del perro contiene varios vermes produciendo el Síndrome de la Vena Cava ya que en este caso el Immiticide está contraindicado. Es necesario aplicar anestesia general para poder introducir, a través de la vena yugular, unos fórceps flexibles tipo “alligator” con ayuda de un fluoroscopio que da acceso a las cavidades del corazón derecho y a las arterias pulmonares principales. Después de la operación, tras 2-4 semanas, se recomienda el tratamiento adulticida.

1.13. PREVENCIÓN Y CONTROL

La profilaxis es deficitaria en nuestro país; menos de un tercio de la población recibe prevención adecuada (Stephen J. Ettinger et al., 2007). Este hecho demuestra que los veterinarios no educamos suficientemente a los propietarios.

El uso de insecticidas o repelentes de mosquitos ayuda en el control y prevención de la enfermedad, pero es imprescindible elaborar un plan de prevención específico para cada individuo. En áreas endémicas sobretodo, se recomienda examinar a los perros al inicio del periodo de la actividad de los mosquitos con el objetivo de identificar infecciones por vermes adultos ya que para iniciar la profilaxis debemos asegurarnos de que el animal esté libre de parásitos. Para que el tratamiento preventivo sea efectivo, debe mantenerse en el tiempo durante todo el periodo de actividad del vector. Han existido y existen varios fármacos para prevenir la Dirofilariosis: uno de ellos es la Dietilcarbamacina (actualmente reemplazado) que actúa frente larvas en estadío 3 y si se administrara a perros microfilarémicos puede provocar shock anafiláctico (Levine y Diamond, 1967; Kume, 1970). Otro fármaco es la Ivermectina (un derivado químico de avermectina B₁) que es un microfilaricida a dosis preventivas capaz de destruir las microfilarias gradualmente. Estudios recientes demuestran que además es un adulticida parcial con una administración mantenida en el tiempo (Stephen J. Ettinger, 2007). También existe la Milbemicina Oxima combinada con Lufenuron, la Selamectina, la Moxidectina, ...

Estudios de campo han demostrado que la Moxidectina, a cierta dosis y administrada mensualmente durante el período de riesgo, es 100% eficaz en la prevención de la infección (M. Cordero del Campillo – F.A. Rojo Vázquez, 1999).



Otro punto muy importante a tener en cuenta es que la eliminación de las bacterias Wolbachia mediante antibióticos (Doxiciclina) parece prevenir el desarrollo de las larvas infectantes.

Estrategias de control para viajar con perros

Antes de viajar de áreas endémicas a áreas no endémicas, se debe confirmar si están infectados por dirofilarias, tratarse frente a vermes adultos y estar libres de microfilarias de *D. immitis* y *D. repens*. Los animales que se desplazan de zonas no endémicas a áreas endémicas deben protegerse frente a filarias adultas.

1.14. CONSIDERACIONES EN SALUD PÚBLICA

En Europa, *D. repens* es el agente productor de filariosis más importante en humanos. Probablemente la infección está infradiagnosticada ya que la presencia de dirofilaria no es considerada por los médicos.

2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA BASE DE DATOS

2.1. MATERIAL Y MÉTODOS

A partir de una base de datos cedida por el profesor Miguel Ángel Peribañez correspondiente a 501 registros, cuyas variables son: el sexo, la edad, la aptitud, la raza, el hábitat, la localidad, la prevención, tres pruebas de detección directa de filarias (Knott, Gota y Filtración), cantidad de microfilarias en sangre y la especie patógena, y con ayuda de una aplicación gratuita multiplataforma con versiones para Microsoft Windows, MacOs y Linux en continua actualización y con la misma estructura que IBM SPSS Statistics, se ha realizado un análisis comparativo de diferentes técnicas de detección directa de microfilarias. La versión utilizada es 0.10.1-g1082b8 (PSPP_0.10.1_2016-04-01_32bits.exe), descargada gratuitamente en la siguiente dirección: <https://www.gnu.org/software/pspp/>.

Los datos incluidos en la base se han obtenido tras estudiar la funcionalidad de las tres pruebas diagnósticas en muchos animales con distintas características las cuales hemos nombrado como variables. Una vez recogidos los datos, se han agrupado según características similares para ver diferencias, en caso de que las haya.

Trabajando con PSPP⁵, primero fue necesario importar el fichero Excel elaborado previamente por el profesor Miguel Ángel Peribañez, donde se encuentran los datos necesarios para extraer

⁵

Una aplicación de software libre para el análisis de datos.



conclusiones y aplicarlas a la población de perros en general. Después se revisó y se prepararon las variables para poder trabajar con ellas, lo que implicó recodificarlas en la mayoría de los casos. Por último, se usaron dos de las técnicas estadísticas que existen para obtener dichas conclusiones: descriptiva e inferencial.

La descriptiva o análisis de datos sirve para describir los datos. Es importante diferenciar entre datos cualitativos y cuantitativos, puesto que, en un caso u otro, se utilizarán unas medidas u otras. Además de las medidas, se obtienen representaciones gráficas adecuadas, de modo que el resultado sea visual. En el caso de variables cualitativas, obtenemos fundamentalmente las frecuencias. Para las cuantitativas, calcularemos la media, la mediana, la desviación estándar, el error estándar de la media, la curtosis, la asimetría, etc. de las distintas variables para caracterizar el conjunto con la menor distorsión o pérdida de información posible.

La inferencia es la técnica estadística que nos permite sacar conclusiones o predecir (inferir) sobre la población inicial; permite generalizar. La inferencia puede hacerse a través de estimaciones o bien con test de hipótesis. En este caso, se ha trabajado con test de hipótesis. A partir de una hipótesis nula, se obtiene una probabilidad (p-valor). Si p-valor es menor de 0,05 se rechaza la hipótesis nula, y en caso contrario se acepta. Por ejemplo, un test muy conocido es el test de independencia de dos variables (Chi-cuadrado). Si p-valor es mayor o igual a 0,05 se acepta la hipótesis de independencia entre variables. En caso contrario, se rechaza. En este último caso, para ver donde se pierde la independencia observamos los residuos corregidos.

2.2. OBJETIVO

El principal objetivo de este estudio es realizar un análisis comparativo de diferentes tipos de detección e identificación de microfilarias para determinar qué técnicas empleadas son las más adecuadas en el diagnóstico de la Dirofilariosis canina y, así, agilizar la valoración del animal y mejorar la Salud Pública.

Además, otro de los objetivos es aprender a manejar el programa estadístico *PSPP* y poder interpretar los resultados obtenidos.

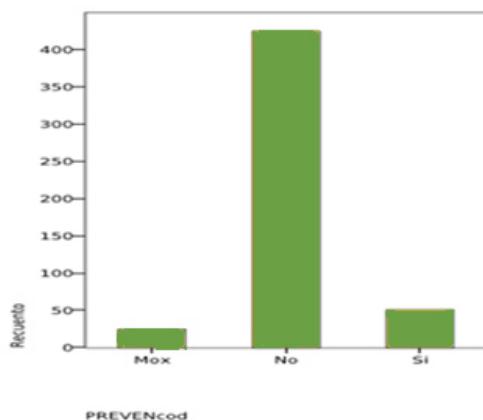
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En cuanto a los aspectos descriptivos, se observan los siguientes resultados:

El primer aspecto descriptivo relevante es la edad media de presentación de la enfermedad; ésta es de 3,25 años. La distribución para esta variable es leptocúrtica y asimétrica positiva.



Otro resultado obtenido mediante esta técnica estadística es la constatación de la falta de prevención de los animales por parte de los propietarios. (Ver Gráfica 1).



(Gráfica 1) (Frecuencia de prevención)

Además, cabe destacar que el análisis de la frecuencia de aparición de la especie *D. Immitis* o *Dracunculoides* indica que aparece en 88 de los 501 datos y en 2 de los 501 datos respectivamente. Por último, podemos aportar, según el estudio realizado, que las 6 razas que manifiestan más cantidad de microfilarias en sangre son: el Mastín, seguido del Ratonero, el Bretón, Braco, Cruce con sabueso y, por último, el Podenco.

Las inferencias realizadas nos llevan a los siguientes resultados:

1. Inferencia Raza – Pruebas diagnósticas (Filtración, GOTA, Test de Knott Modificado)

Para facilitar la comprensión de este test de hipótesis, se muestra una tabla (Tabla 3 de la siguiente página) en la cual comparamos la cantidad de animales positivos/negativos a la enfermedad según la prueba diagnóstica realizada.

Aparecen las razas cuyos porcentajes positivos/negativos son significativos para alguna de las tres pruebas.

Como se puede ver, todas las razas afectadas son de caza o perros guardianes. Cabe destacar que sumando los porcentajes positivos y negativos obtenidos con la filtración no suma 100% ya que hay un porcentaje de animales sin evaluar.



RAZA	+	GOTA (%)	+	FILTER (%)	+	KNOTT (%)	-	GOTA (%)	-	FILTER (%)	-	KNOTT (%)
<i>Azul g.</i>	0		0		100		100		0		0	
<i>Sabuesa</i>	100				100		0				0	
<i>C. Grifón</i>	100		0		100		0		50		0	
<i>Braco</i>	7,69		7,69		19,23		92,31		34,62		80,77	
<i>Bretón</i>	16,67		6,67		20		83,33		23,33		80	
<i>Bruno de J.</i>	33,33		0		33,33		66,67		33,33		66,67	
<i>Conejero</i>	20		0		20		80		20		80	
<i>Galgo</i>	5,88		5,88		5,88		94,12		11,76		94,12	
<i>Grifón</i>	20		20		60		80		0		40	
<i>Mastín</i>	28,57		14,29		28,57		71,43		57,14		71,43	
<i>P. Alemán</i>	3,57		0		3,57		96,43		25		96,43	
<i>Podenco</i>	17,39		0		26,09		82,61		0		73,91	
<i>Pointer</i>	8,33		4,17		12,5		91,67		33,33		87,5	
<i>Ratonero</i>	14,81		7,41		18,52		85,19		22,22		81,48	
<i>Sabueso</i>	14,61		3,37		16,85		85,39		7,87		83,15	
<i>Setter</i>	28,57		21,43		28,57		71,43		28,57		71,43	
<i>C. Podenco</i>	27,27		0		27,27		72,73		33,36		72,73	
<i>C. Sabueso</i>	41,67		0		41,67		58,33		16,67		58,33	
<i>C. Setter</i>	50		0		50		50		0		50	
<i>Sabx Doberman</i>	50		21,43		50		50		28,57		50	

(Tabla 3) (Comparación de la positividad/negatividad a las pruebas diagnósticas respecto a las razas)

- Raza-Filtración: observamos que la filtración es la prueba que menos positivos detecta, confirmando lo que dice la bibliografía acerca de esta técnica. Si nos fijamos por ejemplo en el Setter, vemos que la filtración tan sólo ha detectado el 21,43% de positivos frente a las otras dos pruebas que han detectado un 28,57% en los mismos animales. Esto indica que si un animal sale positivo para la prueba de filtración lo será seguro, pero puede dar falsos negativos. También cabe destacar que el Test de Knott, según la inferencia, es el que mejor detecta a los positivos, seguido de la prueba de GOTA.
- Raza-GOTA: las razas Azul Gascoigne, Sabuesa y cruce con Grifón siempre resultan positivas a la prueba diagnóstica GOTA. El cruce con Setter y el Sabx Doberman presentan 50% positivos y 50% negativos. Las 12 razas que más predispuestas están a padecer la enfermedad son: Azul Gascoigne, Sabuesa, Cruces con Grifón, Cruces con Setter, Sabx Doberman, Cruce con Sabueso, Bruno de J., Setter, Mastín, Cruce con Podenco, Grifón y Conejero.
- Raza-Test de Knott Modificado: se contempla que la raza Azul Gascoigne, Sabuesa y cruce con Grifón siempre dan positivo a la dirofilariosis (igual que en GOTA). El cruce con Setter y el Sabx Doberman presentan 50% positivos y 50% negativos. La raza Grifón destaca por su

elevado porcentaje de positivos (60%) respecto el (40%) de negativos. Las 12 razas con mayor afección siguiendo este orden son: Azul Gascoigne, Sabuesa, Cruce por Grifón, Grifón, Cruce por Setter, Sabx Doberman, Cruce con Sabueso, Bruno J, Mastín, Setter, Cruce Podenco, Podenco. En cuanto a las hembras de algunas razas, es curioso observar que la Sabuesa es 100% positiva y la Ratonera y la Podenca 100% negativas. Tanto en la prueba GOTA como en la Knott (Tabla 4) hay más número de hembras negativas a la prueba que machos. Parece ser que los machos son más propensos a sufrir la enfermedad que las hembras.

	GOTA +	GOTA -	KNOTT +	KNOTT -
HEMBRA	11,11	88,89	12,76	87,24
MACHO	18,60	81,40	22,87	77,13

(Tabla 4) (Comparación de % positivos y negativos según sexos a pruebas diagnósticas GOTA y Knott)

Mediante la prueba Chi-cuadrado, el p-valor (Tabla 5) para la inferencia de la raza con cualquiera de las tres pruebas diagnósticas es menor de 0,05 en los 3 casos, por lo que rechazamos la hipótesis nula. Al rechazar la hipótesis de independencia entre variables, nos fijamos en los residuos ajustados para verificar que sean variables dependientes y además para obtener información sobre la variable que más dependiente resulta. En este caso como los residuos corregidos no están entre $[-1,96] - [+1,96]$, confirman que hay dependencia estadística. En el análisis comparativo de razas positivas o negativas a la prueba GOTA, la dependencia se ve reflejada en la raza Sabueso que da positivo al test. Respecto a la inferencia de las razas con el test de Knott modificado, también son los positivos los que más dependen, en concreto la raza Grifón. Contrariamente a las otras dos pruebas diagnósticas, la filtración muestra más dependencia en los resultados negativos, aunque los positivos también dependen.

INFERENCIA	P-VALOR
RAZA-GOTA	0,026
RAZA-FILTRACIÓN	0,015
RAZA-KNOTT	0,018

(Tabla 5) (p-valor)



2. Inferencia Hábitat – Pruebas Diagnósticas

- Analizando la inferencia del tipo de hábitat con la positividad al Test de Knott, obtenemos que el 80% de los animales que viven en la perrera son positivos. En cambio, los que viven en casa son 100% negativos a la infección. P-valor, en este caso, es $< 0,001$ entonces aceptamos que son variables dependientes. Algunos de los residuos ajustados no se encuentran dentro del rango $[(-1,96) - (+1,96)]$, por lo que se verifica que hay dependencia estadística entre variables. La gran dependencia se ve reflejada en los animales positivos al test.

- Para la inferencia del tipo de hábitat con la prueba GOTA nos indica lo mismo que la inferencia anterior. Aunque el porcentaje de animales positivos a la Dirofilariosis sea menor que con la prueba de Knott modificada, son los animales que viven en la perrera los que más afectados se encuentran (25,61%). En este caso el p-valor también es $< 0,001$ entonces rechazamos la hipótesis nula. Según los residuos ajustados, la dependencia entre variables se halla tanto en los negativos como en los positivos, pero destaca en estos últimos.

- Por último, con el test de hipótesis analizamos la relación entre el hábitat y la prueba de filtración. En este caso p-valor da 0,02 por lo que volvemos a rechazar la hipótesis de que sean variables independientes y observamos que la dependencia se encuentra en aquellos animales positivos a la Dirofilariosis. Aunque en éste caso el porcentaje de animales positivos que viven en la perrera es del 10,16%, sigue siendo en la perrera donde se encuentra más número de perros positivos.

3. Inferencia Aptitud – Pruebas diagnósticas

Relacionando los porcentajes positivos a las tres pruebas diagnósticas con la aptitud de los animales, aparecen más afectados aquellos que se dedican a la caza (Tabla 6).

	+ A KNOTT	+A GOTA	+ A FILTRACIÓN
CAZA	24,01%	20,34%	8,19%
GUARDIA	6,67%	6,67%	0%
COMPAÑÍA	3,03%	1,52%	0,76%

(Tabla 6) (Comparación de la positividad a las tres pruebas diagnósticas respecto a la aptitud de los animales)



P-valor es < a 0,001 para la inferencia Aptitud – Knott y para la de Aptitud – GOTA. En cambio, para Aptitud – Filtración es de 0,002. En los tres casos aceptamos que son variables dependientes. Según los residuos ajustados, la dependencia se halla, sobre todo, en los perros positivos.

4. Inferencia Localidad – Sexo

Aceptamos que ambas variables son dependientes, pues p-valor es de 0,004. Los residuos ajustados reflejan que la dependencia entre variables únicamente se encuentra en las localidades de Biota y Valareña. En 8 de las 17 localidades estudiadas han usado más hembras que machos para el estudio, pero en las otras 9 zonas se han utilizado más machos. En total el 48,50% son hembras respecto al 51,50% de machos. Con ello descartamos la posible duda sobre el motivo por el cual hay más número de machos afectados que de hembras. No hay más número de machos enfermos porque se haya estudiado un gran porcentaje de ellos. Esto indica que las hembras son más resistentes que los machos por alguna razón que desconocemos, como ya habíamos dicho anteriormente.

5. Inferencia Prevención – Aptitud

Entre estas dos variables existe la probabilidad de ser dependientes ya que p-valor es < 0,001. Alguno de los residuos corregidos no se encuentra entre los valores [(-1,96) – (+1,96)]. Los perros guardianes son los menos protegidos.

6. Inferencia Prevención – Raza

Las razas más protegidas en orden descendente son: Basset, Pastor Alsaciano, Podenca, Ratonera, Westie, Sabx Doberman, Schnauzer, Yorkshire, Cruce con Pequinés, Samoyedo, Cruce Setter, Husky, Alaskan, P. Alemán, Cruce con Pointer, etc. Rechazamos la hipótesis de independencia puesto que el p-valor obtenido es < 0,001. Observando los residuos ajustados, la dependencia se encuentra en los que hacen uso de la prevención.

7. Inferencia Aptitud – Sexo

Para estos dos caracteres el valor de p es de 0,069, entonces podemos afirmar que son variables independientes. Sin embargo, al observar los residuos ajustados, algún valor no se encuentra dentro del intervalo [(-1,96) – (+1,96)], pensamos que al haber más datos acerca de machos que de hembras, de algún modo distorsiona el estudio.



A continuación, añadimos una lista con los resultados obtenidos:

- La prueba diagnóstica directa más útil es el Test de Knott Modificado ya que es la técnica que menos falsos negativos da. Contrariamente a ésta, tenemos la filtración.
- Los perros de caza son los más afectados por el parásito; ya sea porque tienen mayor contacto con el vector o porque son los menos protegidos.
- La hembra de raza Sabuesa es la que más padece la enfermedad.
- Las hembras en general son más resistentes a la Dirofilariosis.
- Los animales que viven en la perrera tienen más probabilidades de ser picados por el mosquito que los que viven en casa.
- La edad media de presentación de la enfermedad es de 3,25 años.
- Hay más propietarios que no previenen frente a los que sí que lo hacen. La prevención se utiliza en mayor medida con las mascotas que viven en casa.
- Curiosamente, el hábitat y las pruebas diagnósticas son variables dependientes.

2.4. CONCLUSIONES FINALES

La evidencia de la presencia actual de la Dirofilariosis en los perros y otros animales requiere que se continúen realizando estudios epidemiológicos para tener más información al respecto. Además de ser necesaria una mejora de las pruebas de detección directa del parásito, la importancia de una buena prevención y control es crucial y debe ser transmitida a todo el mundo, tanto para proteger a nuestras mascotas como para salvaguardar la Salud Pública ya que los vectores son mucho más complicados de vigilar.



3. BIBLIOGRAFÍA Y WEBGRAFÍA

LIBROS

Bowman, D. (2004). Georgis Parasitología para veterinarios (8^a Ed.). Madrid: Elsevier.

Cordero del Campillo, M. y Rojo Vázquez, F.A. (1999). Parasitología veterinaria. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España, S.A.U.

Ettinger, Stephen J., Feldman y Edward C. (2007). Medicina Interna Veterinaria (6^a Ed.). Madrid: Elsevier.

Giffin, James M., Carlson y Liisa D. (2002). Manual práctico de veterinaria canina: El Drac.

Miró Corrales, G. y Solano Gallego, L. (2012). Enfermedades vectoriales del Perro y el Gato. Madrid: Acalanthis.

Nelson, Richard W., Couto y Guillermo C. (1995). Medicina Interna en Animales Pequeños. Buenos Aires: Inter-Médica

Rawlings y Clarence A. (1986). Heartworm Disease in Dogs and Cats. Philadelphia: W. B. Saunders Company.

Schaer, M. (2006). Medicina Clínica del Perro y el Gato. Barcelona: Masson.

Urquhart, M.G., Armour, J., Duncan, L.J., Dunn.M.A. y Jennings, W.F. (1996). Veterinary Parasitology (2^a Ed.). Harlow, United Kingdom: Blackwell Science, Ltd.

ARTÍCULOS

Bowman, D.D. y Atkins, C.E. (2009). *Heartworm biology, treatment and control*. Vet Clin North Anim: Small Animal Practice 39:1127–58.

Menozzi, A. et al., (2015). Doxycycline levels and anti-Wolbachia antibodies in sera for dogs experimentally infected with *Dirodilaria immitis* and treated with a combination of ivermectine/doxycycline. *Veterinary Parasitology*, 209, 281-284.



Noyes, J.D. (1979). *Comparisons of Knott and filter techniques*. Proc Heartworm Symp 77:34-37.

Peribañez, M.A., Lucientes, J., Arce, S., Morales, M., Castillo, Juan A. y Gracia, M.J. (2001). Histochemical differentiation of *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* and *Acanthocheilonema dracunculoides* microfilariae by staining with a commercial kit, Leucognost-SP®. *Veterinary Parasitology*, 102, 173-175.

Tabar, M.D., Altet, L., Martínez, V. y Roura, X. (2013, abril). Wolbachia, filariae and Leishmania coinfection in dogs from Mediterranean area. *Journal of Small animal practice*, 54, 174-178.

WEBGRAFÍA

American Heartworm Society (2014). *Directrices Caninas Actuales para la Prevención, Diagnóstico y Gestión de la infección de Dirofilaria (*Dirofilaria immitis*) en perros*. Recuperado el 17 de julio, 2016, de:

https://www.heartwormsociety.org/images/documents/2014_AHS_Canine_Guidelines.Spanish.Investigable.pdf

ESCCAP. (2011). *Control de enfermedades transmitidas por vectores en perros y gatos*. [Documento electrónico] ESCCAP. Recuperado el 20 de agosto, 2016, de:

http://www.esccap.org/uploads/docs/a2wchx2h_2012_G5.pdf

GNU Operating System. (2013). Recuperado el 17 de mayo, 2016, de:

<https://www.gnu.org/software/pspp/>

Resino García, S. *Epidemiología molecular de enfermedades infecciosas*. Blog de EMEI: [Documento electrónico]. Recuperado el 23 de agosto, 2016, de:

<http://epidemiologiamolecular.com/inmunofluorescencia/>

Simón, F. (2012). *La dirofilariosis animal y humana en España*. ARGOS, Portal Veterinario. Recuperado el 14 de agosto, 2016, de:

<http://argos.portalveterinaria.com/noticia/7338/ARTICULOS-ARCHIVO/La-dirofilariosis-animal-y-humana-en-Espana.html>