

SERPOSITIVIDAD PARA DIROFILARIA CANINA. MUNICIPIO DE SANTAFE DE ANTIOQUIA 1998

Luis Andrés Herrera M., Luis Felipe Mejía M., Luis Felipe Naquira E. *

RESUMEN

Objetivos: Estimar la seroprevalencia de *Dirofilaria Immitis* en una población canina en el municipio de Santa Fé de Antioquia en agosto de 1998. De igual forma estimar la seroprevalencia de *Dirofilaria* según zona urbana o rural, variedad de *Dirofilaria*, género del animal y oficio del mismo. Método: Estudio descriptivo, de tipo exploratorio con un universo de 40 muestras, de las cuales 20 son del área urbana y 20 del área rural. Se utilizaron 4 pruebas: el examen en fresco, el método de Knott de concentración y la prueba de E.L.I.S.A de diagnóstico para *Dirofilariasis Immitis* y Western Blot con lo cual se logró hacer la separación de los perros infestados y los no infestados asociándola a diferentes factores de riesgo obtenidos en la encuesta. Resultados: Se obtuvieron en fresco 5 muestras positivas para un 12.5% del total. Al método de Knott se obtuvieron 4 positivas (10%) y con el test de E.L.I.S.A se tuvo problemas para identificar entre ellas las positivas o negativas. Las 4 muestras positivas (al menos dos pruebas) pertenecían a perros del área rural (10%), de los cuales 3 pertenecían a la Vereda el Espinal y 1 a la vereda Paso Real. No se obtuvieron muestras positivas para el área urbana. Se realizó Western Blot, el cual mostraba unas bandas de 50, 66, 83 y 97 kDa para el control positivo siendo la de 66 kDa la más aparente en todas ellas. Conclusiones: Se obtuvo una prevalencia del 10% para el área rural de Santa Fe de Antioquia, pero se infravaloran los resultados ya que no se cuenta con un método serológico adecuado. El test de E.L.I.S.A. no es método diagnóstico adecuado para identificar *Dirofilaria Immitis* en población canina de nuestro país, debido a la cantidad de parasitosis que se encuentran en nuestro medio, lo que genera reacciones cruzadas con los anticuerpos utilizados en esta prueba. El Western Blot es una prueba diagnóstica importante que necesita ser más estudiada para definir claramente los criterios de positividad y negatividad.

ABSTRACT

Objectives: Estimate the seroprevalence of *Dirofilaria Immitis* in the canine population in the municipality of "Santa Fe de Antioquia" in August of 1998. Estimate the seroprevalence between urban and rural populations and study the different varieties of *Dirofilaria*, gender and activities of the animal. Method: Descriptive study; exploratory in nature, that initiated with a universe of 40 samples, 20 of which were from the urban area and the remaining 20 from the rural area. We utilized 4 different experimental tests to diagnose *Dirofilaria Immitis* species: Knott concentration method, E.L.I.S.A, fresh exam and western blot. With these exams we were able to separate the sample on two groups: The exposed group (Infected dogs) and non-exposed group (Healthy, non infected dogs). Using this we associated different risk factors that were obtained and studied during the survey. Results: We obtained after careful observation 5 positive samples at the fresh exam giving a proportion of 12.5% using the Knott test we obtained 4 positive samples with a proportion of 10%. Finally using the E.L.I.S.A test we encountered difficulties in identifying which samples were positive and which were negative.

The 4 positive samples obtained that at least were positives in two tests belonged to dogs from the rural area. 3 of which belonged to "Vereda el Espinal" and 1 from the "Vereda Paso Real". We did not obtain any

* Estudiantes décimo semestre Facultad de Medicina
Asesoría Dr. Iván Dario Vélez MD, Director PECET U de A, María de los Angeles Rodríguez, Epidemióloga Docente CES.

positive samples from the urban areas. Using Western Blot we identified 50, 66, 83, 97 kDa bands of which 66 kDa was the most apparent of all the samples for the positive control. Conclusions: We obtain a prevalence of 10% for the rural areas of Santa Fe de Antioquia, but the results were under estimated due to the inadequate serological test method. The E.L.I.S.A test is not an adequate diagnostic exam for the identification of *Dirofilaria Immitis* in the canine population in our country. Due to the variety and number of different parasites that are present in our work environment, which generates a number of cross-reactions with the antibodies used in this E.L.I.S.A exam. Finally we can state, that even through the Western Blot is of great diagnostic importance, it needs to be studied more so that clear criteria may be established to identify what is truly positive or negative

INTRODUCCIÓN

A diario, durante la práctica médica, nos vemos enfrentados a una serie de patologías infecciosas y neoclásicas que afectan al ser humano de una manera diferente; paralelamente, se nos olvida que existe una variada cantidad de parásitos que pueden invadir al organismo y producir signos y síntomas similares a los generados por las enfermedades infecciosas y neoclásicas anteriormente mencionadas. Esta similitud conlleva a que se produzcan errores en el enfoque y posterior tratamiento de una patología determinada, lo que acarrea consecuencias como el aumento de costos, la pérdida de un tiempo valioso para la recuperación del paciente, y lo más grave de todo, se puede terminar con la vida del paciente. Como ejemplo de este tipo de patologías, tenemos la infección por *Dirofilaria Immitis* el cual es un parásito que produce una enfermedad que afecta principalmente a perros y gatos, pudiendo afectar al hombre produciendo en este nódulos subcutáneos y pulmonares, estos últimos llevan frecuentemente a errores de diagnóstico a nivel radiológico al

confundirlos con CA pulmonar. El hombre se afecta debido a la picadura de un vector que pueden ser de tres tipos, *Aedes*, *Anopheles* y *Culex* y que tenga sangre contaminada con el parásito.

El centro y norte de Colombia por sus características geográficas y sociales es considerado zona endémica para el desarrollo de *Dirofilaria Immitis* canina, lo cual es paso indispensable para su presentación en humanos. Ante esto el PECET (Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales) de la Universidad de Antioquia inició estudios zonales sobre la incidencia de la *Dirofilaria Immitis* canina, e igualmente desarrollaron estudios sobre la incidencia de *Dirofilaria Immitis* humana en zonas tanto urbanas como rurales encontrándose 11 de 74 sueros positivos en agosto de 1998. Estos resultados motivaron la continuación de estudios para tratar de determinar la incidencia real de *Dirofilaria Immitis* canina en Colombia. Con el siguiente estudio se buscó colaborar con esta meta, realizándose una investigación en Santa Fe de Antioquia en agosto de 1998.

METODOLOGÍA

- **Tipo de estudio:** Descriptivo transversal, de tipo exploratorio.
- **Población y muestra:** El universo estuvo compuesto por toda la población canina del municipio de Santa Fe de Antioquia. Por conveniencia se tomó 20 muestras en el área urbana, y un número igual en el área rural. Se tomarán las muestras de acuerdo con los siguientes criterios de inclusión: Todo perro mayor o igual a

7 meses. Se necesita de 6 meses para que la *Dirofilaria Immitis* se convierta en adulta y a partir de la fecha comienza a aumentar la microfilaremia por un periodo aproximado de 10 meses. La ocupación del animal fue definida de la siguiente forma: Compañía, Perro que pase las noches dentro de la casa; Guardia, Perro que pase las noches fuera de la casa y Cazador, Perro que pase la mayoría del tiempo fuera de la casa y de los límites de la finca.

- **Métodos:** Inicialmente se habló con los propietarios de los perros seleccionados, a los que se les explicó el tipo e importancia de la investigación para la salud de su perro y su comunidad. Luego de obtener su consentimiento y apoyo, se les pidió firmar un documento de autorización, en el que permitían tomar la muestra en el animal. Luego de obtener el permiso del propietario, se procedió a inmovilizar el perro y colocar el bozal. Se realizó asepsia de la pata derecha y se tomó muestra de sangre con jeringa de 5ml. La sangre fue transportada en 2 tipos de tubos por cada animal, uno con K3-EDTA y el otro sin ningún aditivo y con una refrigeración a 4°C, para luego ser enviada al laboratorio de parasitología de la Universidad de Antioquia, en

donde se practicaron los respectivos exámenes. Luego de obtener los resultados, estos se esquematizaron en tablas que permitieron correlacionar variables para buscar factores de riesgo, y principales zonas afectadas.

- **Medición del efecto:** Se utilizaron 3 pruebas: el examen en fresco, el método de Knott de concentración y la prueba de E.L.I.S.A de diagnóstico para *Dirofilariasis Immitis* con lo cual se logro hacer la separación de los perros infestados y los no infestados asociándola a diferentes factores de riesgo obtenidos en la encuesta. Las técnicas diagnosticas fueron definidas en la sección de métodos de diagnóstico en el marco teórico.

Objetivos	Variables	Plan de tabulación
Evaluar evolución de la <i>Dirofilariasis</i> canina y su relación con la <i>Dirofilariasis</i> humana	ELISA + o -	Incidencia de <i>Dirofilaria</i> diagnosticada por método de ELISA en perros de Santa Fe de Antioquía
	Perro en zona rural o urbana	Incidencia de <i>Dirofilaria</i> en perros según su procedencia sea rural o urbana

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

La forma más común para diagnosticar la infección por *Dirofilaria* es:

A) Examen en fresco: Se deposita una gota de sangre fresca (con anticoagulante) entre el porta y cubre objetos, examinándose al microscopio con luz poco intensa. La existencia de microfilarias (larvas tipo 1) es observada por los activos movimientos de éstas entre los elementos formes. La diferenciación entre las clases de *Dirofilaria* requiere de un observador experimentado y aun teniendo a este muchas veces es imposible diferenciarlas por este método.

Es una técnica fácil y que no requiere prácticamente de material. Es importante ver varias preparaciones debido a la poca cantidad de sangre que es observada. La no observación de microfilarias no es excluyente, habiendo de recurrir a otros métodos más fiables (métodos de concentración).

B) Método de Knott: Se trata de un método de concentración de microfilarias.

Se mezcla 1 ml. de sangre con 9 ml. de formalina al 2%. Luego se centrifuga por 8 minutos a 1500 rpm. Posteriormente, se desecha el sobrenadante y se examina el sedimento al microscopio.

C) Prueba de E.L.I.S.A para *Dirofilariasis Immitis* Canina:

Materiales y reactivos:

- Microplatos de 96 pozos con fondo plano
- Pipetas automáticas de 5 a 10 ul y de 50 a 200 ul
- Puntas para micropipetas
- Antígeno de *Dirofilaria Immitis* diluido en tampón carbonato/bicarbonato a un pH 9.6
- PBS (Solución salina tamponada con fosfato) a pH 7.2 con 0.05% de Tween 20

- Seroalbumina bovina (BSA) o leche descremada
- Conjugado antigamaglobulina marcada con peroxidasa (Sigma)
- Sustrato para la peroxidasa: Ortofenildiamina (ODP) (Sigma)
- Tampón para parada de la reacción
- Sueros de los perros y controles positivos y negativos

Procedimiento:

- 1) Se toma antígeno somático de *Dirofilariasis Immitis*. Se toman 776 microgramos y se diluyen en 150 ul de agua destilada. Se toman de esta solución 29.4 ul.
- 2) Se preparan 50 ml de una solución de tampón carbonato/bicarbonato para dar un pH de 9.6
- 3) De esos 50 ml se toman 38.4ml y se mezclan con los 29.4 ul de la solución del antígeno. Esto nos da una concentración del antígeno por pozo de 0.00395 microgramos por cada 200 ul de solución
- 4) La mezcla se deja 1 hora a 37°C para sensibilizar y luego toda la noche a 4°C toda la noche.
- 5) Se preparan 60 ml tampón tris-citrato con un pH de 5.
- 6) Se prepara un litro de PBS-Tween.
- 7) Se matriculan los sueros que estuvieron a 4°C por 3 meses aproximadamente. Se matriculan en formatos del PECET (Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales) para el test E.L.I.S.A.
- 8) Luego de 24 horas se toman los pozos que habían sido sensibilizados con el antígeno y se descarta todo. Se lava 3 veces con PBS- Tween cada 5 minutos.
- 9) Se satura cada pozo con 150 ul de leche descremada al 3% y se incuba por 1 hora a 37°C.

- 10) Se descarta el sobrenadante y se lava 3 veces con PBS- Tween cada 5 minutos.
- 11) Se realizan diluciones de 1:100 y 1:200 de los sueros con PBS pH de 7.2 y Tween. En cada pozo se dispensa 100 ul. Cada suero se procesa por duplicado. Se procesan 3 sueros con controles negativos y 1 positivo.
- 12) Se incuba por 1 hora a 37°C.
- 13) Se descarta el sobrenadante y se lava 3 veces con PBS- Tween cada 5 minutos.
- 14) Se dispensa en cada pozo 100 ul de conjugado de IgG antiperro marcada con peroxidasa.
- 15) Se incuba por 1 hora a 37°C.
- 16) Se descarta el sobrenadante y se lava 3 veces con PBS-Tween cada 5 minutos.
- 17) Dispense en cada pozo 100 ul de sustrato OPD diluido en tampón tris-citrato
- 18) Incube por 30 minutos a 37°C.
- 19) Se agrega en cada pozo 50 ul de solución de parada de la reacción.
- 20) Se esperan 15 minutos.
- 21) Se leen a 490 nm y se obtienen las densidades ópticas

Interpretación:

Se considera positiva toda densidad óptica igual o superior a la media de las densidades ópticas de los controles negativos, más 2 desviaciones estándar.

Los anteriores estudios se realizaron en el PECET (Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales) de la Universidad de Antioquia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se tomó muestra serológica a 40 perros, 50% eran del área urbana y 5% del área rural, el 63% de los perros eran machos. El promedio de edad de los perros fue de 4 años.

Luego de analizar las muestras se obtuvieron los siguientes resultados, teniendo en cuenta que para nuestro trabajo una prueba era aceptada como positiva, si en dos de las tres pruebas como mínimo se lograba confirmar la presencia de *Dirofilariasis*. Obtuvimos a la observación en fresco 5 muestras positivas para un 12.5% del total. Al método de Knott obtuvimos 4 positivas (10%) y con el test de ELISA se tuvo problemas para identificar cuales para discriminar entre ellas las positivas o negativas.

Teniendo en cuenta que mediante el método de Knott y la observación en fresco, tan solo 4 de las 5 resultaban positivas. Las 4 muestras positivas pertenecían a perros del área rural (10%), de los cuales 3 pertenecían a la Vereda el Espinal y 1 a la vereda Paso Real. No se obtuvieron muestras positivas para el área urbana.

De las muestras positivas al método de Knott y a la observación en fresco tenemos que 3 de los 4 perros tenían como función ser guardias de la casa, y el otro era un perro de caza.

De las 15 muestras de hembras, 3 estaban en embarazo y de estas tan solo una de dos meses y medio fue positiva tanto para Knott como para observación en fresco.

En lo referente al ELISA, obtuvimos resultados contradictorios con los cuales era imposible definir con certeza si las muestras eran positivas o negativas. Como se puede apreciar en el anexo 2. La media de los controles negativos era superior a la media de los

controles positivos (1.781 vs 0.440 respectivamente, siendo 1:100 la concentración y 0.788 vs 0.245 siendo la concentración 1:200). Cabe agregar que los controles negativos de perro 1 y perro 2 pertenecen a perros colombianos y el S1 pertenece a perros españoles al igual que el control positivo S15. Si se mira con cuidado se puede observar que el control negativo español (S1) tiene una media mucho menor a la de los controles negativos colombianos (Media de S1= 0.2915 vs Media de Perro 1= 2.94 y 2.10 para Perro 2 siendo la concentración 1:100). Y esa misma media es menor a la media de controles positivos españoles. Esto nos indica aparentemente que existen reacciones cruzadas con los controles negativos colombianos que elevan los títulos. Por este motivo se concluye que el test de ELISA no es un buen método para separar los perros positivos de los negativos.

Al obtener resultados contradictorios con el ELISA, nos vimos forzados a probar con el Western Blot, el cual mostraba unas bandas de 50, 66, 83 y 97 kd para el control positivo. Esas mismas bandas se encontraron en las siguientes muestras, la 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 y 24 siendo la de 66 kd la más aparente en todas ellas (Ver figura # 1).

Relacionando estos resultados con las demás pruebas, encontramos que tan solo una de las muestras que era positiva tanto para la observación en fresco como para el método de Knott no aparecía al Western Blot. Si se mira bien, puede verse que los títulos en el ELISA de ésta muestra tampoco son tan altos como los títulos de las demás pruebas positivas. Aun se tienen problemas en la interpretación de estos resultados y es tan solo un primer paso para encontrar una prueba serológica lo suficientemente específica y sensible para detectar *Dirofilariasis Immitis* en población canina.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. Teniendo en cuenta las pruebas positivas tanto con el método de Knott como con la observación en fresco, obtenemos una prevalencia del 10% para

el área rural de Santa Fé de Antioquia, pero se infravaloran los resultados ya que no se cuenta con un método serológico adecuado. El test de

E.L.I.S.A. no es método diagnóstico adecuado para identificar *Dirofilaria Immitis* en nuestro país debido a la cantidad de parasitosis que se encuentran en nuestro medio lo que genera reacciones cruzadas con los anticuerpos utilizados en esta prueba.

2. Se debe evaluar el papel de la prevención de las patologías transmitidas por vectores, en especial el Anopheles, Culex y Aedes, en Santa fe de Antioquia, priorizando las acciones en la vereda el espinal en donde la prevalencia fue del 42% (de 7 muestras tomadas, 3 fueron positivas)
3. El Western Blot es una prueba diagnóstica importante que necesita ser mas estudiada para definir claramente los criterios de positividad y negatividad.

4. El test de E.L.I.S.A. no es método diagnóstico adecuado para identificar *Dirofilaria Immitis* en población canina de nuestro país, debido a la cantidad de parasitosis que se encuentran en nuestro medio, lo que genera reacciones cruzadas con los anticuerpos utilizados en esta prueba.

5. Consideramos que deben hacerse estudios sobre la prevalencia de *Dirofilarias Immitis* en humanos y en especial en aquellas zonas en donde se obtuvieron mayores muestras positivas ya que la infestación humana esta determinada por la prevalencia de *Dirofilarias Immitis* y por la exposición a los vectores, lo cual se cumple para la vereda el espinal.

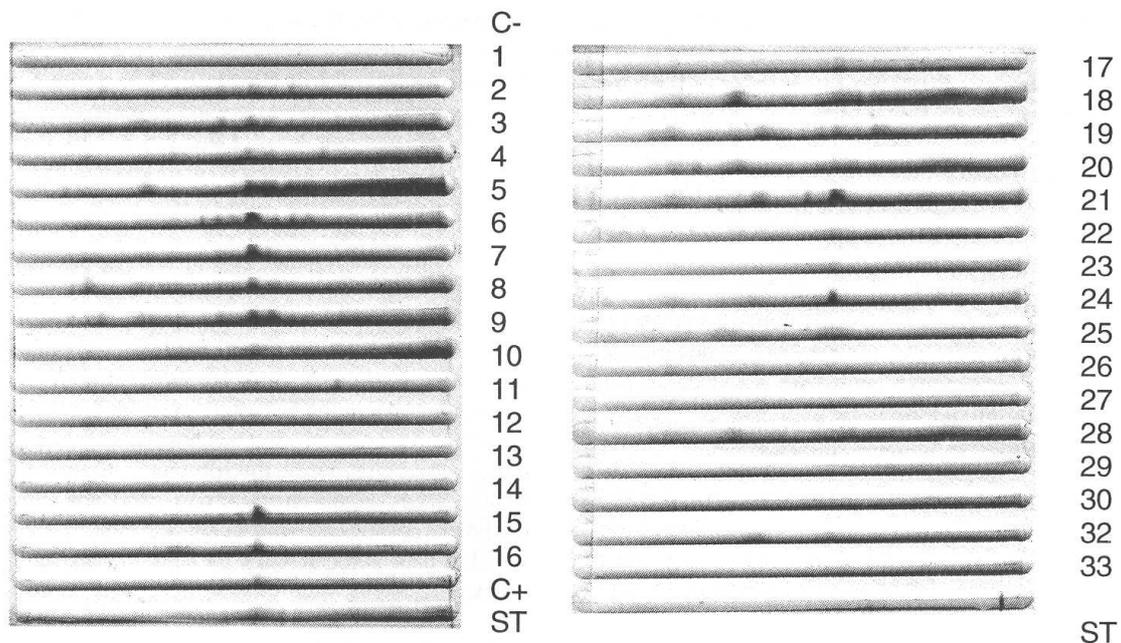


Fig.1 Western -blot para dirofilariasis Immitis

BIBLIOGRAFÍA

1. S. Pampiglione, G. Canestri Trotti, F. Rivasi *Human Dirofilariasis due to Dirofilaria (Nochtiella) Repens: a review of world literature. Parasitología* 37: 149-193 1995
2. M.M Deren MD, Bruce Feinberg B.S. *Human pulmonary Dirofilariasis: Two case reports. Connecticut medicine, February 1984 Volume 48, N°2 Pag 87-88*
3. Kitagawa H. Kubota A. Yasuda-K, Hirano-Y Sasaki Y *Cardiopulmonary function in dogs with serious chronic heart worm disease. Laboratory of internal medicine, Faculty of agriculture, Gifu University, Japan. J-Vet-Med-Sci. 1992 Aug 751-756*
4. <http://www.homevet.com/petcare/heartwor.html> *Canine heartworm disease. Dr. Jeffrey Feinman. 1996*
5. <http://hammock.ifas.ufl.edu/txt/fairs/11527> *Mosquito-borne Dog Heartworm Disease. Dr. Jai K. Nayar. 1991*
6. <http://www.pathfinder.com/PetPath/VetPedia/Dogs/Doglists/Dogfiles/57.html> *Internal parasites (Endoparasites) Reproducido con el permiso de The Well Dog Book por Terri McGinnis, D.V.M. © 1974, 1991*
7. <http://mosquito.lanminds.com/Treehole.html#anchor75062> *Tree hole mosquitoes. Alameda County Mosquito Abatement District. Hayward, California. 1996*
8. Vieira, C. Villar, E. Simón, F. *Biología y bioquímica de las especies del genero Dirofilaria Laboratorio de parasitología, facultad de farmacia, Universidad de Salamanca. Departamento de Bioquímica y biología molecular, Universidad de Salamanca 1° edición. 1996*
9. <http://ucdnema.ucdavis.edu/imagemap/nemmap/ent156html/E156dirb> *Biology of parasitism- Lecture notes. College of Agricultural & Environmental Science, University of California, Davis. 1997*
10. S. Pampiglione, G Canestry Trotti, F. Rivasi, N. Vakalis *Human Dirofilariasis in Greece: a review of reported cases and a description of a new, subcutaneous case Annals of Tropical Medicine and Parasitology Volume 90 Number 3, June 1996*
11. Martini-M, Capelli-G; Poglayen-G; Bertotti-F, Turilli C. *The validity of some haematological and ELISA methods for the diagnosis of canine heartworm disease. Dipartimento di Sanita Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Universita di Bologna, Italy. Vet-Res-Commun. 1996; 20(4): 331-9*
12. <http://muextension.missouri.edu/xplor/agguides/pets/g09930.htm>. *Canine Heartworm Disease. Elizabeth L. Settles, DVM. Octubre 1, 1993*
13. DJM Haldane, BL Johnston, NMG Walsh. *Subcutaneous Dirofilariasis in Nova Scotia. The Canadian Journal of Infectious Diseases. 1996; 7(1):67-69*
14. Pampiglione-S, Rivasi- F, Paolino S. *Human pulmonary Dirofilariasis Cattedra di Parassitologia Veterinaria, Universita di Bologna, Italy Histopathology, 1996 Jul; 29(1): 67-72*
15. <http://www.medscape.com/SCP/IIM/1998/v15.n02/m3390.sandin/m3390.sandin.html> *A Lung Nodule: Malignancy or the Dog Heartworm?. J. Gregory Thomas, MD, Darren Sundman, BS, John N. Greene, MD, Domenico Coppola, MD, Li Lu, MD, PhD, Lary A. Robinson, MD, Ramon L. Sandin, MD, MS. 1998*
16. <http://www.wyomnavaccine.com/canine.htm>, *Canine/Feline Heartworm Vaccine. Wyoming Dna Vaccine Company. 1997*

17. Rodrigues- Silva-R, Moura-H, Dreyer-G, Rey-L Human pulmonary *Dirofilariasis*: a review. *Departamento de Helminthologia IOC/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil*
Rev-Inst-Med-Trop-Sao-Paulo 1995 Nov-Dec, 37(6): 523-30

18. J.M. Conly, MD, L.H. Sekla, MB, B CH , D.E. Low, MD FRCP(C) *Dirofilariasis presenting as a breast lump. Can Med Assoc J. Vol 130, June 15, 1984 1575-1578*

19. <http://cal.vet.upenn.edu/parasit/heartworm.indexhw.html>
Heartworm - Dirofilaria Immitis. Drs. veterinarios Colin Johnstone, David H. Knight, y James B. Lok. 1997

20. Perera Madrazo, Lorena *Identificación y evaluación de antígenos de Dirofilaria Immitis para el diagnostico de Dirofilariasis pulmonar humana 1a.Ed Universidad de Salamanca- Facultad de Biología, Departamento de Parasitología 1995*

21. <http://ascaris.med.tmd.ac.jp/Images/9601/Parasite9601.html>

22. <http://www.vethospital.com/heartworm.htm>
Heartworm disease and prevention. Randy Walker DVM 10/12/96

23. Steele, James H. *Handbook series in Zoonoses Volumen II Ed. Press 1989*

Almacén

deblanco®

ESPECIALIZADO EN DOTACION MEDICA HOSPITALARIA
Vestuario, Calzado y Accesorios para
Médicos, Odontólogos, Enfermeras, Laboratoristas
y Estudiantes del Area de la Salud.

Tarjetas de Crédito y Débito - Club

MEDELLIN: Centro Comercial Almacentro - Local 204
Teléfono: 381 01 09 - Telefax: 232 36 31 - Carrera 43A No. 34-95

SANTAFE DE BOGOTA:
Principal: PBX: 317 83 83 - Fax 217 73 37
Calle 74 No. 15-42

Sucursal: 215 05 56 - 213 54 21
Avenida 7ª No. 121-49