

UNIVERSIDAD COOPERATIVA DE COLOMBIA
CENTRO DE INVESTIGACIONES
RESUMEN ANALÍTICO

- A. TIPO DE DOCUMENTO Proyecto de investigación
- B. TIPO DE IMPRESIÓN Procesador de texto
- C. NIVEL DE CIRCULACIÓN Biblioteca de la Universidad
Cooperativa de Colombia
2. **TÍTULO:**PREVALENCIA DE DIROFILARIOSIS (*Dirofilaria immitis*) EN LOS PERROS VAGABUNDOS CAPTURADOS POR EL CENTRO DE ZONOSIS EN LAS COMUNAS DE LA CIUDAD DE BUCARAMANGA
3. AUTORES **JOHEL ARTURO NAVARRO ARÉVALO**
JUAN ÁNGEL TRIANA HERNÁNDEZ
4. **PUBLICACIÓN:** Bucaramanga, Universidad Cooperativa de Colombia. 2003
88 Hojas
5. **UNIDAD PATROCINANTE.** Recursos propios con colaboración del Laboratorio Clínico Veterinario UCC y Secretaria de Salud y Medio Ambiente.
6. **TEMAS RELACIONADOS:** La *Dirofilariosis* o también llamada enfermedad del gusano del corazón es ocasionada por el nematodo *Dirofilaria immitis*, (del latín, *dirus*, terrible; *filum*, hilo e *immitis*, sin misericordia, cruel) que se aloja en el corazón derecho del huésped, definitivo de ahí el nombre de gusano del corazón.

6.1 PALABRAS CLAVES: Palabras clave: *microfilaria*, *Dirofilaria immitis*, prevalencia, técnica de Knott, Prueba de Elisa, nemátodo, infestación, estado adulto, mosquitos, temperatura, humedad, perros callejeros, Secretaria de Salud, Centro de Zoonosis.

7. DESCRIPCIÓN DE LA INVESTIGACIÓN: Este proyecto fue efectuado por estudiantes de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Cooperativa de Colombia, Seccional Bucaramanga, se seleccionaron perros callejeros del perímetro urbano de la ciudad que llegan al centro de zoonosis recogidos por la secretaria de salud, los cuales normalmente están en un mal estado sanitario

Se realizaron dos procedimientos de laboratorio: técnica Knott modificado y la prueba de ELISA para conocer la situación actual (prevalencia) de la Dirofilariosis canina y estimar el porcentaje real aproximado de los animales positivos a *Dirofilaria immitis*.

8. FUENTES: Trabajo de campo para coleccionar las muestras de sangre en el laboratorio Clínico Veterinario de la Universidad Cooperativa de Colombia Seccional Bucaramanga; para ser analizadas e interpretadas.

9. CONTENIDO

9.1 JUSTIFICACIÓN: siendo la Dirofilariosis una enfermedad parasitaria que varia desde una infección leve o asintomática, hasta una enfermedad aguda y fatal; cabe la posibilidad de que en los perros callejeros de la región se encuentre el parásito, pero al mantenerse en el medio sea un reservorio que repercuta en la salud pública.

Teniendo en cuenta que muchas de estas enfermedades son transmitidas a los humanos (zoonosis) y han sido motivo de discusión ya que hasta el momento no se ha determinado el grado que expone a la población humana a sufrir de esta grave enfermedad y en muchos casos no es diagnosticada o simplemente los programas de salud humana y animal las desconocen por la similitud de signos y síntomas que cursan con patrones semejantes de enfermedades de frecuente presentación.

9.2 ANTECEDENTES Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA:

Un estudio de la distribución del parásito del corazón del perro (*D. immitis*) fue realizado en Colombia, en el que participaron 84 veterinarios, de 32 ciudades, seleccionando al azar los perros a ser muestreados. De aquellos llevados al consultorio por razones sanitarias de rutina entre octubre de 1988 y agosto de 1989. Las muestras de sangre tomadas a los perros fueron examinadas por la prueba de Knott para determinar la presencia de microfilarias circulantes del parásito. Si no se detectaban las microfilarias, una segunda muestra del mismo perro era analizada para la presencia de antígeno circulante (infección oculta.) De los 1981 perros muestreados, 167 (40%) fueron positivos a *D. immitis* incluyendo 75 (3.8%) por la prueba de Knott y 92 (4.6%) con infección oculta.

Geográficamente, el parásito se encontró ampliamente diseminado en Colombia. Los niveles más amplios fueron observados en los departamentos de Atlántico (22.3%) y Magdalena (15.6%). La infección oculta fue mas prevalente en Risaralda (18.1%)”.

Una mayor prevalencia del parásito fue observada en los perros adultos (>6 años). Sin embargo fue interesante observar que el 7.5% de los perros menores de un año se encontraban infectados con *D. immitis*, incluyendo 4.3% con infección oculta. Igualmente el parásito fue detectado en perros de ciudades localizadas a gran altura y clima frío (Ipiales, Pasto, Tunja, Bogotá, y Manizales)

Los resultados obtenidos indican que el parásito se encuentra más diseminado de lo que se creía en Colombia. Basados en esto se debieran implementar tácticas tendientes a informar a la comunidad veterinaria sobre la amplia distribución del parásito, así como divulgar entre ésta las diferentes pruebas disponibles para detectar la presencia del parásito y el uso apropiado de fármacos microfilaricidas, adulticidas y preventivos. (Patiño y col., 1989).

9.3 FUNDAMENTOS TEÓRICOS: La población canina de mayor riesgo es la sometida a repetidos contactos con los mosquitos vectores. Como los perros no controlados de las poblaciones (callejeros) que no tienen un cobijo permanente; entre otros.

Los perros machos suelen infectarse con mayor frecuencia, tal vez por la mayor exposición a los exteriores. Las razas grandes y medianas se infectan con mayor frecuencia, quizás por el incremento de exposición a los exteriores comparado con las razas miniatura (Calvert, y colaboradores 1994).

Las razas expuestas con mayor regularidad como Pastor alemán, Pointer inglés, Setter irlandés, Retrievers y Beagle son las que por lo común se infectan. Los Bóxer tendrían una incidencia inusualmente alta (Rawlings y Calvert, 1997).

El crecimiento de la población canina de la ciudad de Bucaramanga se ha estimado en sesenta mil (60.000) caninos aproximadamente, de los cuales treinta y cinco (35.000) se encuentran carnetizados, este siendo el último reporte de la secretaria de salud, factor que se convierte en un gran problema debido al descuido de casi veinticinco (25.000) propietarios que desconocen las posibles patologías que pueden portar los animales de compañía y el riesgo que pueden generar para la salud humana, a esto debemos sumarle los caninos que por otras razones se encuentran deambulando en las calles generando un problema que es responsabilidad de empresas estatales y privadas de salud las cuales deben establecer planes institucionales de educación para la tenencia de mascotas; campañas de esterilizaciones y otras, pues estos animales generan focos o reservorios, hospederos de enfermedades zoonóticas para el hombre.

Por esta razón se seleccionaron perros callejeros del perímetro urbano de la ciudad de Bucaramanga que llegan al centro de zoonosis recogidos por la secretaria de salud, los cuales normalmente están en un mal estado sanitario y expuestos a vectores como mosquitos del género *Aedes*, *Culex*, entre otros, que proliferan en la ciudad y son causales de múltiples enfermedades de interés en salud pública, motivo por el cual se realizó este estudio mediante dos técnicas de diagnóstico de laboratorio: técnica Knott modificado y la prueba de ELISA para conocer la situación actual (prevalencia) de la Dirofilariosis canina en los perros callejeros y estimar el porcentaje real aproximado de los animales positivos a *Dirofilaria immitis* correlacionando la presencia de los vectores con la positividad de los perros callejeros.

9.4 METODOLOGÍA: el tipo de estudio es descriptivo transversal para la determinación de la prevalencia de *D. immitis* basado en datos recogidos en el centro de zoonosis de la ciudad de Bucaramanga (libro de registro de capturas de perros años 2002-2003) en el último año de funcionamiento. Se hace descripción de la muestra selectiva de todos los perros callejeros llevados a este lugar.

El estudio incluye 62 perros (unidades experimentales) a examinar de una población aproximada de 600 perros callejeros recogidos por el centro de zoonosis en el último año, realizado un muestreo en un lapso de 24 semanas, sin tener en cuenta factores como: edad, sexo, raza, propósito, estado corporal, estado reproductivo (hembras) y otros.

Las muestras obtenidas son tomadas al azar y analizadas mediante dos tipos de pruebas así:

- ✓ Prueba predictiva: Knott modificada
- ✓ Prueba confirmativa: Prueba de ELISA

Con los datos obtenidos se hace una estimación del verdadero intervalo de positividad con un nivel de confianza del 95% y con un margen de error del 10% considerando un estudio anterior donde se determinó un 20% de positivos, realizado en Barrancabermeja. (Reyes Nova. 2000)

Bucaramanga limita: al norte, Rionegro, al oriente con Matanza, Charta y Tona, por el sur con Floridablanca y al occidente con Girón.

Bucaramanga

Ubicación geográfica:	Latitud: 7° 08'	longitud: 73° 08'
Temperatura promedio	23°	
Altura máxima	929 metros	
Población actual	549.263 habitantes	

El tamaño de la muestra fue de 62 perros seleccionados al azar, de una población aproximada de 600 perros callejeros capturados por la Secretaria de Salud y Medio Ambiente y llevados al Centro de Zoonosis de la ciudad Bucaramanga en el año 2002.

Con los datos se estimó el intervalo con un nivel de confianza del 95% y con un error de estimación del 10%.

Para cada uno de los perros muestreado se tomó aproximadamente 5 ml de sangre por medio de venopunción aséptica de la vena safena, o de la vena cefálica dividiendo la muestra en dos tubos, uno con anticoagulante (EDTA) para técnica de Knott modificada y el otro con sangre entera para obtener el suero utilizado para la prueba de ELISA.

Las muestras fueron colectadas durante las horas de la noche (6 p.m. a 8 p.m.) momento en el cual las microfilarias se encuentran circulantes en sangre de acuerdo con reportes de la literatura internacional.

Para la detección de microfilarias circulantes se realizó la técnica de Knott modificada.

El test de Knott modificado sirve solamente para la detección de microfilarias en sangre. En esta prueba se produce hemólisis y fijación de las microfilarias (Rawlings y Calvert 1997) por lo que permite examinar una mayor cantidad de sangre que en el frotis sanguíneo (Dunn, 1983).

- ✓ Se deposita 1 ml de sangre en un tubo de ensayo con EDTA.
- ✓ Se agrega 9 cc de formaldehído al 2 %.
- ✓ Se centrifuga a 2 000 r.p.m. durante 10 minutos.
- ✓ Se elimina el sobrenadante.
- ✓ Al sedimento se le agrega 1 gota de azul de metileno al 1% y se mezcla.
- ✓ Se toma una gota del fondo con una pipeta de Pasteur.
- ✓ Se deposita una gota en una lamina portaobjeto.
- ✓ Se cubre con una laminilla.
- ✓ Se observa en un microscopio óptico con aumento 10x y 40x.

Una vez realizada la prueba de Knott modificada a cada perro para detectar la presencia de microfilarias circulantes, la contramuestra del mismo canino se sometió a análisis por medio de la prueba de ELISA, capaz de detectar los antígenos de *Dirofilaria immitis* adulta en suero o plasma del perro. Completados todos los procedimientos de laboratorio, los resultados de todas las muestras se tabularon con el fin de poder evaluar la prevalencia de *D. immitis* en la ciudad de Bucaramanga.

PRUEBA DE ELISA. Descripción y Fundamento

PetCheck - Antígeno del gusano del corazón en caninos - es un inmunoensayo enzimático creado para detectar la presencia de antígeno circulante de gusanos adultos de *Dirofilaria Immitis* en suero o plasma. Se ha diseñado un formato de micro titulación en el cual los anticuerpos contra el antígeno de *Dirofilaria Immitis* se han adherido a los pozos de la placa de micro titulación. Al incubar la muestra en los pozos cubiertos, los antígenos presentes forman complejos con los anticuerpos adheridos.

Tras la remoción de la muestra, un anticuerpo conjugado con enzima es adicionado y unido al antígeno capturado en el pozo. En el paso final del ensayo los anticuerpos conjugados no unidos son removidos y el sustrato cromógeno de la enzima es adicionado. El desarrollo subsiguiente de color indica la presencia del Antígeno de gusano del corazón en la muestra.

1. Adicionar dos gotas (100 μ l) de control positivo en el primer pozo y dos gotas (100 μ l) de control negativo en el segundo pozo.
2. Use una pipeta de precisión (micropipeta) y una punta de pipeta para cada punta, adicionar 100 μ l de suero o plasma a cada pozo.
3. Incubar la muestra 30 minutos a temperatura ambiente. Aspirar y descartar el contenido de los pozos.
4. Lavar cada pozo cinco veces con aproximadamente 0.30 ml de la solución de lavado diluida. Aspirar el contenido de cada pozo después de cada lavado. Después del lavado final golpee firmemente sobre papel absorbente para sacar el fluido de agua residual de los pozos. Antes de adicionar el siguiente reactivo cerciórese que la placa este seca.
5. Adicionar 3 gotas de 100 μ l de la solución conjugada de enzima- anticuerpo a cada pozo. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
6. Lavar como en paso 4.
7. Adicionar una gota de 50 μ l de la solución sustrato TMB a cada pozo e incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Adicionar una gota de 50 μ l de solución stop a cada pozo.
9. Ponga el espectrofotometro en cero con blanco de aire.
10. Medir y registrar los valores de absorbancia de las muestras y los controles a 650 nm de longitud de onda.
11. Calcular los resultados de la siguiente manera:

Calcular $P - N$: Absorbancia del control positivo – absorbancia del control negativo
Para que la prueba sea valida $P - N$ debe ser mayor que 0.15 ademas la absorbancia del control negativo debe ser menor que 0.15.

Calcular el Cutoff: absorbancia del control negativo + 0.05.

Interpretación de los resultados.

Si la absorbancia de la muestra es menor que el Cutoff la muestra es negativa.

Si la absorbancia de la muestra es mayor o igual que el Cutoff la muestra es positiva.

9.6 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- ✚ La situación actual de *Dirofilariosis (dirofilaria immitis)* en los perros callejeros de la ciudad de Bucaramanga fue significativa, arrojando una prevalencia relativamente alta en comparación con estudios realizados anteriormente.
- ✚ El porcentaje de los perros portadores de *Dirofilariosis* fue del 16.12% identificado por medio de la prueba de ELISA, siendo los machos los más afectados de la población entre edades de 4 a 5 años.
- ✚ La presencia del gusano del corazón en los perros callejeros está asociada con el alto índice de vectores existentes en la ciudad de Bucaramanga. Otra causa son las características epidemiológicas de la enfermedad y los factores medioambientales de la zona de estudio.
- ✚ Se determinó que la técnica de Knott modificada tiene un margen de especificidad bajo en el diagnóstico, ya que se requiere que las muestras sean tomadas en un tiempo específico y de un entrenamiento adecuado tanto para la identificación como para la diferenciación entre las larvas. En cuanto a la prueba de ELISA se confirma su eficiencia para el diagnóstico de formas adultas de *Dirofilaria immitis* por su alto grado de sensibilidad y especificidad.
- ✚ Los perros callejeros son un reservorio potencial de *Dirofilaria immitis* que puede ocasionar un riesgo en salud pública tanto en animales como en humanos, debido a su alto grado de transmisión zoonótica.
- ✚ Crear conciencia en los médicos veterinarios de la necesidad de incorporar nuevas pruebas diagnósticas, que lleven a confirmar una patología definitiva. En el caso particular la presencia de la *Dirofilaria*, que pasa inadvertida en muchos de los casos debido a que los animales son tratados contra otras enfermedades.
- ✚ Tomar en cuenta medidas preventivas en el medio ambiente como la eliminación de depósitos de agua, control de los estadios inmaduros de los mosquitos por medio de tratamientos con larvicidas, control dentro de los hogares contra mosquitos, mantener a los perros en el interior de las casas entre 5 p.m. a 8 a.m. del día siguiente

- ✚ Se recomiendan campañas profilácticas y terapéuticas contra la Dirofilariosis en los perros de zonas endémicas; y previamente realizar prueba de ELISA cuando se sospeche de la enfermedad.

- ✚ Eliminación de los parásitos en forma permanente e intensiva. Disminución de las poblaciones de insectos vectores mediante la aplicación de agentes químicos, biológicos y físicos. Difusión del saneamiento básico entre la población para disminuir así el contacto con vectores.

- ✚ En este proyecto de investigación, no pretendemos complicar el diagnóstico, sino ajustarlo a la realidad existente y sobre todo hacer pensar al veterinario, que la seguridad, haciendo una sola prueba no existe y que hay que hacer otras pruebas complementarias, teniendo muy en cuenta la anamnesis y la historia clínica para poder realizar un buen pronóstico y tratamiento.

10. LUGAR: Centro de zoonosis de Bucaramanga y Laboratorio Clínico Veterinario UCC.