

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

**«Epidemiología de dirofilaria immitis en
la Isla de Tenerife»**

**Autor: Nelly del Carmen Sánchez Gamarro
Director: Dr. José Antonio del Castillo Remiro
Dr. Fernando de Armas Hernández**

Departamento de Parasitología, Ecología y Genética

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero hacer constar mi más sincero agradecimiento a los directores de este trabajo, D. Fernando de Armas Hernández y D. Antonio del Castillo Remiro, y también a D. Basilio Valladares Hernández, en quienes siempre he encontrado, además de los conocimientos propios del maestro, los consejos, ayuda continua y eficaz colaboración para poder realizar esta Tesis Doctoral.

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi marido por su gran ayuda, apoyo, tiempo robado, dedicación y colaboración constante en todo momento, así como en la toma de muestras, sin la cual no hubiera sido posible realizar este trabajo, permitiéndome superar los momentos de desánimo y haciendo posible que llegue este día.

No puedo dejar de expresar mi mayor y más profunda gratitud hacia mis padres, que con su continuo cariño, y siendo mi ejemplo de dedicación, estímulo y apoyo durante toda mi vida, han hecho posible que llegue este momento.

También he de agradecer a mis hermanas, el estar a mi lado brindándome su aliento, comprensión, cariño y apoyo en mis momentos de angustia.

Me gustaría hacer constar mi agradecimiento a mis suegros y a mis cuñados, los cuales han tenido conmigo muchísima paciencia y me han apoyado continuamente.

Quiero dar las gracias a José Enrique Piñero, Dácil Solá, Enrique Martínez, Antonio Ortega y Violeta Alonso, por su ayuda y asesoramiento prestado, así como a Elena Figueruelo, Javier Rodríguez, José Manuel de la Rosa (Chicho), José M^a Fernández-Palacios y José Ramón Arévalo por su ayuda y colaboración.

Asimismo quisiera reconocer a mis compañeros y amigos del laboratorio: Zulma, Emma, Ada, José Antonio, Nestor, Ricardo e Inmaculada por su apoyo durante este tiempo.

Quiero hacer constar mi gratitud, a la Clínica Veterinaria Cabrera Pinto y al Centro Veterinario San Cristóbal en La Laguna, por su inestimable ayuda y colaboración en cederme muestras de forma desinteresada.

Al Presidente D. José Manuel Pérez Rodríguez y asociados del Club de Caza el Podenco, por su colaboración prestada. A D. Aurelio Castro propietario de la perrera El Vallito. A las diferentes asociaciones de cazadores de Granadilla, Adeje, Valle de San Lorenzo, Igueste de Candelaria, Fasnia y a tantas otras de diversas partes de la isla.

También quiero hacer constar mi agradecimiento a D. Tomás Pacheco Sosa por su gran ayuda prestada.

ÍNDICE GENERAL

I.- INTRODUCCION

1.1- El parásito	18
1.1.1 Taxonomía	18
1.1.2 Morfología	19
1.1.3 Ciclo Biológico	21
1.1.4 Epidemiología	24
1.1.4- Patogenia	27
1.1.5- Diagnóstico	31
1.1.6- Tratamiento y profilaxis	36

II.- MATERIAL Y METODOS.

2.1- Toma de muestras	44
2.1.1- Obtención y conservación de adultos de <i>D. immitis</i>	44
2.1.2 Antígenos	44
2.1.3- Obtención y conservación de muestras de sangre	45
2.2- Técnicas de diagnóstico	45
2.2.1- Análisis directo	45
2.2.2- Técnica de ELISA	48
2.2.3- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	50
2.2.3.a) Extracción del DNA de adultos de <i>D. immitis</i>	51
1) Homogeneización del adulto con una solución de lisis	51
2) Rotura de membranas celulares	51
3) Extracción	52
4) Precipitación del DNA	53
5) Lavado, secado y disolución del DNA	53
2.2.3.b) Extracción del DNA de muestras de sangre	54
2.2.3.c) Método	54
2.2.3.d) Elección de cebadores	54
2.2.3.e) Componentes de la PCR	56
2.2.3.f) Montaje de la PCR	57
2.2.3.g) Visualización de los productos de PCR	58
1.- Preparación de los geles	58
2.- Preparación de muestras para electroforesis	59
3.- Preparación del marcador de peso molecular	59
4.- Electroforesis de DNA en geles de agarosa	59
5.- Visualización de resultados	59
2.2.3.h) Transferencia de DNA desde geles de agarosa a membranas de "nylon" cargadas positivamente	60
2.2.3.i) Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa de	

bajo punto de fusión.	61
2.2.3.j) Marcaje de sondas.	62
2.2.3.k) Hibridación de DNA fijado sobre membrana de “nylon” cargada positivamente.	63
2.2.3.l) Inmunodetección de la sonda.	66
2.2.3.ll) Investigación de <i>Dirofilaria repens</i>	66
2.2.3.m) Soluciones, tampones y aparatos empleados.	68
a) Técnica de ELISA.	68
b) Extracción de DNA.	69
c) Precipitación de DNA.	69
d) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	69
e) Electroforesis en geles de agarosa.	70
f) Transferencia de DNA.	70
g) Purificación de fragmentos de DNA.	70
h) Marcaje de sondas.	70
i) Hibridación.	71
j) Inmunodetección.	71
k) Equipos empleados.	72
2.3.- Análisis estadístico de los resultados.	74

III.- RESULTADOS Y DISCUSION.

3.1.- Edad.	81
3.2.- Sexo.	85
3.3.- Residencia.	87
3.4.- Tipo de pelaje.	89
3.5.- Habitat.	92
3.6.- Raza.	94
3.7.- Altitud.	96
3.8.- Orientación.	98
3.9.- Tratamiento preventivo.	100
3.10.- Estudio multivariante.	105
3.11.- Resultados de la aplicación de la PCR.	108

IV.-CONCLUSIONES

Anexo 1. Análisis de los datos con la variable “Directo”.	115
Anexo 2. Análisis de los datos con la variable “ELISA”.	121
Anexo 3. Resumen de los datos recogidos en las muestras.	127

V.-BIBLIOGRAFÍA

ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS, CUADROS, GRÁFICAS Y FOTOGRAFÍAS

<i>Fotografía 1.i. Dirofilaria immitis; macho y hembra</i>	20
<i>Fotografía 1.ii. Masa de adultos extraídos del corazón</i>	20
<i>Figura 1.i Esquema del ciclo biológico de Dirofilaria immitis</i>	23
<i>Tabla 1.i Resumen de encuestas de diversas partes del mundo</i>	26
<i>Fotografía 1. iii . Adultos en cavidad cardiaca</i>	28
<i>Tabla 1.ii Clasificación sintomática de la dirofilariosis</i>	39
<i>Figura 2.i Mapa de Tenerife indicando las zonas de muestreo</i>	46
<i>Figura 2.ii Ficha para recoger los datos de las muestras</i>	47
<i>Cuadro 3.i (a). Edad</i>	81
<i>Cuadro 3.i (b). Edad "Directo"</i>	83
<i>Cuadro 3.i (c). Edad ELISA</i>	84
<i>Cuadro 3.ii (a). Sexo</i>	85
<i>Cuadro 3.ii (b). Sexo "Directo"</i>	85
<i>Cuadro 3.ii (c). Sexo ELISA</i>	86
<i>Cuadro 3.iii (a). Residencia</i>	88
<i>Cuadro 3.iii (b). Residencia "Directo"</i>	88
<i>Cuadro 3.iii (c). Residencia ELISA</i>	89
<i>Cuadro 3.iv (a). Tipo de pelaje</i>	90
<i>Cuadro 3.iv (b). Tipo de pelaje "Directo"</i>	90
<i>Cuadro 3.iv (c). Tipo de pelaje ELISA</i>	91
<i>Cuadro 3.v (a). Habitat</i>	92
<i>Cuadro 3.v (b). Habitat "Directo"</i>	92
<i>Cuadro 3.v (c). Habitat ELISA</i>	93
<i>Cuadro 3.vi (a). Raza</i>	94
<i>Cuadro 3.vi (b). Raza "Directo"</i>	94
<i>Cuadro 3.vi (c). Raza ELISA</i>	95
<i>Cuadro 3.vii (a). Altitud</i>	96
<i>Cuadro 3.vii (b). Altitud "Directo"</i>	97
<i>Cuadro 3.vii (c). Altitud ELISA</i>	97
<i>Cuadro 3.viii (a). Orientación</i>	99
<i>Cuadro 3.viii (b). Orientación "Directo"</i>	99
<i>Cuadro 3.viii (c). Orientación ELISA</i>	99
<i>Cuadro 3.ix (a). Tratamiento preventivo</i>	101
<i>Cuadro 3.ix (b). Tratamiento preventivo "Directo"</i>	101
<i>Cuadro 3.ix (c). Tratamiento preventivo ELISA</i>	102
<i>Cuadro 3.ix (d). Tratamiento preventivo Zonas Rurales (Comparativa)</i>	103
<i>Cuadro 3.ix (e). Tratamiento preventivo Zonas no Rurales (Comparativa)</i> ..	103
<i>Cuadro 3.ix (f). Tratamiento preventivo (Comparativa)</i>	104
<i>Gráfica 3.i Representación gráfica del análisis multivariante</i>	106
<i>Cuadro 3.x Cantidades empleadas en la cuantificación (PCR)</i>	109

<i>Cuadro 3.xi Mezclas de sangre para determinar sensibilidad (PCR)</i>	<i>110</i>
<i>Cuadro 3.xii Resultados de PCR</i>	<i>110</i>
<i>Fotografía 3.i Electroforesis e hibridación producto amplificado.</i>	<i>111</i>

I.- INTRODUCCION

I.- INTRODUCCIÓN.

La filariosis canina es una parasitosis ampliamente difundida en nuestro Archipiélago, la cual tiene gran importancia tanto desde el punto de vista veterinario como de salud humana. En Canarias, sólo se ha citado a *Dirofilaria immitis*, que es un parásito frecuente de esta zona geográfica, como lo demuestran los trabajos que sobre esta parasitosis realizaron Valladares y col. (1987) en los que se pone de manifiesto que la dirofilariosis está ampliamente distribuida entre la población canina de la isla de Tenerife. En ese estudio, realizado entre octubre de 1983 y diciembre de 1985 se encontró, que de un total de 310 perros el 61,1% de los que habitaban zonas rurales y el 33,6% de los de zonas suburbanas presentaban microfilarias en sangre periférica. La parasitación media de la isla se situaba en el 41,8%. Estos datos, eran los índices de prevalencia más elevados del país y uno de los más elevados del mundo.

El perro puede estar parasitado por 4 especies de filarias: *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens*, *Dipetalonema reconditum* y *Dipetalonema dracunculoide*, todas ellas, en su ciclo vital, presentan estadíos larvarios (microfilarias) en sangre periférica, siendo la más importante la primera, por ser responsable de los procesos patológicos más graves y por su mayor incidencia en la población canina. El interés de las otras especies de filarias radica, principalmente, en las repercusiones que la presencia de las microfilarias en sangre pueden tener en el diagnóstico de la dirofilariosis.

Desde que Faust y sus colaboradores en 1957 denunciaron la primera dirofilariosis humana por *Dirofilaria immitis*, encontrando un verme en la vena cava de una mujer en Nueva Orleans, el número de casos diagnosticados de esta zoonosis ha ido en aumento, quedando de manifiesto la capacidad del parásito para alcanzar en el hombre diversos órganos en los que, generalmente muere en el interior de unas formaciones nodulares sin llegar

a su madurez sexual. En España se ha diagnosticado la infestación humana por *D. immitis* en diversas zonas geográficas, especialmente en áreas en las que la parasitosis tiene una elevada prevalencia en los perros. (Gómez Bautista y Rojo Vázquez, 1990; Muro y cols., 1989, 92; Simón M. y cols, 1991 Santamaría y cols, 1995).

Estos hechos, junto con su elevada patogenicidad en el perro, son suficientes para que se le preste una mayor atención. En países como Australia, Estados Unidos y Canadá se llevan a cabo campañas epidemiológicas periódicas y se siguen controles profilácticos y curativos sobre la dirofilariosis. En Canarias, y pese a la poca atención que las autoridades sanitarias prestan a este problema, se han realizado encuestas epidemiológicas que han permitido conocer la prevalencia y algunos otros datos de tipo epidemiológico y fisiopatológicos. (Valladares y cols., 1987; Rojo Vázquez y cols., 1990).

La importancia de la parasitosis, el alto grado de parasitación encontrado en 1985 en Tenerife y el uso generalizado de ciertos medicamentos, nos ha hecho pensar en la conveniencia de realizar una nueva encuesta epidemiológica de *D. immitis* en la isla de Tenerife.

Hemos planteado esta Tesis en dos vertientes perfectamente definidas. Por un lado y como fundamento principal de la Tesis, el estudio de la prevalencia y características epidemiológicas de esta parasitosis en la isla de Tenerife y por otro lado, la estandarización de técnicas de diagnóstico inmunológico y por Biología Molecular adecuadas, que puedan servir no sólo al laboratorio especializado, sino también al pequeño laboratorio.

1.1- EL PARÁSITO

1.1-a) Taxonomía.

Los filarioideos son probablemente el grupo peor clasificado entre los nematodos, debido a su enorme variedad morfológica y biológica.

El encuadramiento taxonómico de *D. immitis* es como sigue: (Kassais y cols., 1988).

Phylum:	Nemathelminthes.
Clase:	Nematoda.
Subclase:	Secermentea.
Superfamilia:	Filaroidea.
Familia:	Onchocerchidae.
Género:	<i>Dirofilaria</i> .
Especie:	<i>Dirofilaria immitis</i> .

La superfamilia Filaroidea comprende helmintos parásitos que se localizan en las cavidades corporales, el aparato circulatorio o el tejido conectivo de vertebrados, fundamentalmente aves y mamíferos. El ciclo biológico de estos nematodos es indirecto y depende de artrópodos hematófagos para su transmisión.

1.1-b) Morfología.

Dirofilaria immitis (Leidy 1856) es un nematode que parasita fundamentalmente cánidos domésticos y silvestres, aunque también se han encontrado infestando a félidos, mamíferos marinos y al hombre.

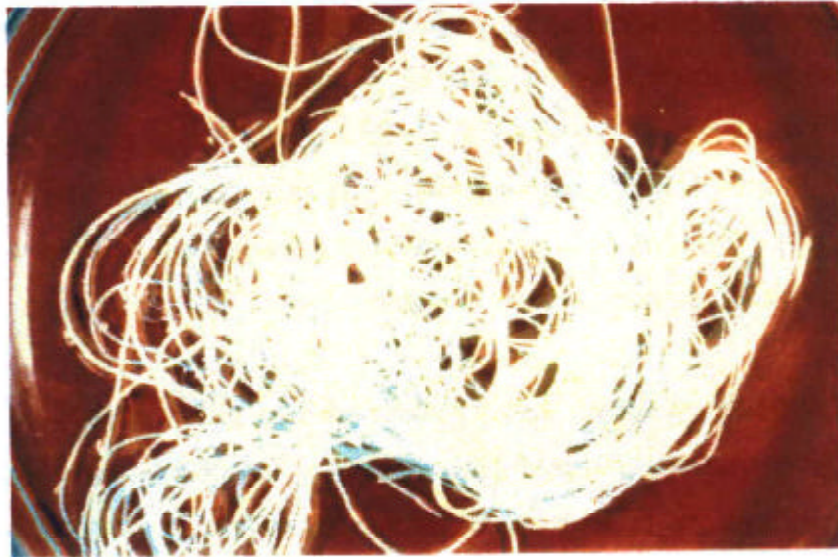
Su localización en el hospedador es muy diversa, encontrándose en el corazón derecho (especialmente en el perro), arteria pulmonar, y raramente en otros órganos, como la cavidad pleural, los bronquios y el tejido conjuntivo intramuscular y subcutáneo.

Son vermes blanquecinos, cilíndricos, sin extremo anterior adelgazado. La pequeña y circular abertura oral está rodeada de seis prominencias minúsculas. Esófago de 1,5 mm. Los machos miden de 12-18 cm \times 700-900 μ m. El extremo posterior es fuertemente adelgazado, enrollado en espiral y provisto de dos pequeñas aletas laterales y 4-5 pares de papilas preanales, un par de papilas grandes y 4-5 de papilas pequeñas postnatales. Con respecto a las espículas tenemos que la izquierda es larga y afilada midiendo 300-375 μ m de longitud y la derecha es corta y roma y mide 175-229 μ m. No existe gobernáculo. Las hembras de 25-30 cm \times 1-1,6 mm. Extremo posterior con dos papilas. Vulva con labios gruesos, situada a 2,5 mm de la abertura oral. (Fotografías 1. i y 1.ii

Las microfilarias carecen de vaina, miden 218-329 μ m \times 5-6 μ m y están provistas de un extremo cefálico romo y una parte caudal larga y delgada, terminada en punta. Los hospedadores intermediarios son mosquitos picadores (*Cúlex*, *Aedes* y *Anopheles spp.*).



Fotografía 1.i: Dirofilaria immitis, macho y hembra.



Fotografía 1.ii. Masa de adultos extraídos del corazón.

1.2.- CICLO BIOLÓGICO (Figura 1. i)

Los huevos de *Dirofilaria immitis* se desarrollan en el útero de las hembras adultas y se encuentran rodeados de una membrana vitelina delgada. A medida que crece el embrión la membrana se estira para conformar una membrana envolvente. Al nacer, desaparece la membrana, y el embrión se presenta en la sangre transformado en microfilaria carente de vaina. Las microfilarias son vertidas a la sangre en el corazón derecho y en la arteria pulmonar. Son transportadas por circulación pulmonar al corazón izquierdo, y de ahí a la circulación general. La presencia de microfilarias en la sangre está sometida a una determinada periodicidad. Por tanto, aunque las microfilarias pueden estar presentes en la circulación siempre, se ha encontrado un mayor número en sangre periférica en determinados momentos del día. Así, Catcott (1979) señala un máximo en las últimas horas de la tarde, mientras que en opinión de Grieve y Lauria (1983) el máximo se produce entre las 12 y 16 horas. La razón de la periodicidad no está relacionada con su producción, ya que se observan incluso después de la destrucción de los vermes adultos (Catcott, 1979). Cuando las microfilarias no se encuentran en la circulación periférica se concentran en el pulmón, bazo y en los grandes vasos. Existe también una periodicidad estacional, observándose un aumento en el número de microfilarias en sangre periférica en los meses de verano (Barriga, 1982).

Los mosquitos, particularmente *Cúlex pipiens*, *Anopheles quadrimaculatus* y *A. freeborni*, son vectores eficaces y actúan como hospedadores intermediarios. *Aedes vexans* y otros son transmisores menos eficaces. Los mosquitos ingieren las microfilarias con la sangre y éstas emigran en 24-36 horas desde el intestino a los túbulos de Malpighi, entrando en las células distales. En esta localización las larvas disminuyen de tamaño y aumentan su grosor. Se considera que el día 4º post-ingestión la larva es dos veces más corta y tres veces más ancha que la microfilaria original ($150 \pm 10 \mu\text{m}$ de largo y $21 \pm 1 \mu\text{m}$ de ancho), adoptando una forma parecida a una salchicha (sausage stage). A continuación, las larvas emergen a la luz de

los túbulos de Malpighi, donde tendrá lugar, en 4-5 días, el desarrollo completo de este estadio, con intestino completo,. En los días 6-7 regresan al lumen de los túbulos de Malpighi, y a partir del día 9 mudan y se transforman en larvas de segundo estadio (L2). Después de un período de crecimiento, las larvas de segundo estadio rompen la membrana de los tubúlos de Malpighi y pasan al hemocele abdominal para volver a mudar

Las larvas de tercer estadio (L3), fase infestante para el hospedador definitivo, miden unas 900 μm de largo, y aparecen a los 10-12 días después de su entrada en el mosquito. Estas larvas migran por el tórax, a lo largo del lado ventral, hacia la cabeza, alcanzando el labio 10 días después de la infestación en *Anopheles notoscriptus* y *Cúlex pipiens*, 12 días en *C. annulirostris*, 13 días en *C. quinquefasciatus*, 14 días en *A. quadrimaculatus* y *A. albopictus*, y 16 días en *Aedes aegypti*.(Russell y Geary, 1996).

La infestación de los perros se produce cuando el mosquito se alimenta y en su labio porta larvas de tercer estadio. Las larvas salen a través del labelo sobre la piel, la atraviesan por la punción hecha por las maxilas a través de los folículos pilosos o directamente a través de tejidos intactos. Las larvas permanecen en los tejidos subcutáneos y en los músculos durante 80 días aproximadamente, y allí mudan 9-12 días después de haber entrado. Durante este período tisular, la larva de cuarto estadio (L4) alcanza un tamaño de hasta 25 mm. Comienzan a realizar una migración subcutánea torácica y después de 50-70 días mudan a L5 o preadultos. Los preadultos tienen una gran movilidad y capacidad de penetración en los distintos tejidos, siendo frecuentes las localizaciones ectópicas (bazo, cámara anterior del ojo, arterias del cerebro, arterias de las extremidades posteriores). Después de 70-110 días de la infestación se encuentran en musculatura esquelética. Los parásitos que miden 2-3 cm, llegan al corazón por penetración en circulación venosa y pasan a las arterias pulmonares asentándose definitivamente. Cuando la infestación es muy elevada, también pueden

ventrículo y aurícula derechos, vena cava y hepáticas. A los 174-223 días alcanzan la madurez sexual. A los 5-6 meses de la infestación ya se

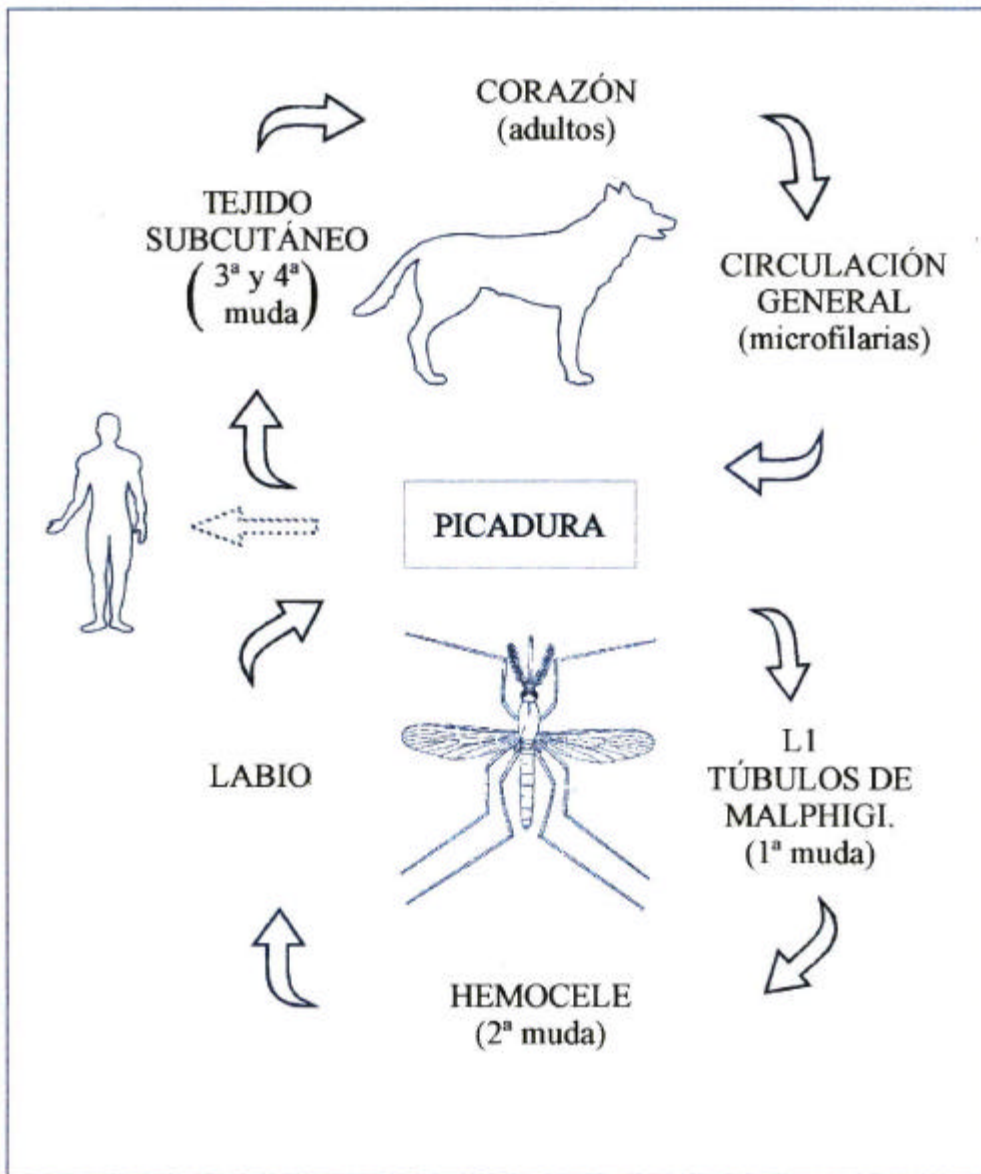


Figura 1. i. Esquema del ciclo biológico de *Dirofilaria immitis*

pueden observar microfilarias en el útero de las hembras adultas, apareciendo las microfilarias en sangre circulante 6-7 meses después de la inoculación de la fase infestante.

La microfilaremia aumenta a lo largo de los siguientes 10 meses hasta alcanzar una fase de meseta que se mantiene aproximadamente cinco años. Transcurrido este período la microfilaremia desciende, llegando a desaparecer.

En perras gestantes infestadas por *D. immitis* se ha observado la migración transplacentaria de microfilarias (Mantovani y Jackson, 1966) y (Manda, 1989). Esta transferencia pasiva de microfilarias puede llevar a diagnósticos erróneos de dirofilariosis en cachorros. Desde un punto de vista práctico hay que considerar como posible la migración a través de la placenta hasta el feto de una pequeña proporción de larvas inmaduras en perras infestadas con L3, por lo que podrían encontrarse infestaciones patentes en perros menores de 6 meses.

1.3- EPIDEMIOLOGÍA.

Su distribución geográfica se circunscribe a zonas tropicales, subtropicales y algunas áreas templadas. Existe en Europa (Francia, Italia, España, Rumanía) y Asia. Se ha encontrado en Alemania en perros importados.

El análisis de los factores que influyen en la transmisión de la infestación por *Dirofilaria immitis* sólo es posible desde el conocimiento del ciclo biológico del parásito. Los reservorios, las especies de mosquitos que son adecuados vectores y los aspectos ecológicos y ambientales que regulan la biología del parásito y del vector son los principales factores que determinan los patrones de distribución de esta parasitosis.

Como el parásito depende de un hospedador intermediario para completar su ciclo de vida, la prevalencia de la enfermedad está directamente relacionada a la frecuencia de la transmisión del vector, alta densidad del mismo y al rango de vuelo.

No son muchas las especies de culícidos en las que se ha podido demostrar la capacidad vectorial a pesar de haberse investigado más de 80 especies de los tres géneros más importantes, *Aedes*, *Anopheles* y *Cúlex*. (Ludham y cols., 1970; Hendrix y cols., 1981 y Kume e Itagaki, 1955). La receptividad y la capacidad infestante de los mosquitos están controladas tanto genéticamente como por factores extracromosómicos (Grieve y cols.,1983).

En Inglaterra y otros países septentrionales europeos, la dirofilariosis es una enfermedad rara e incluso inexistente entre la población canina. Ocurre todo lo contrario en los países mediterráneos.

En la tabla *I.i* se indican entre otros, los resultados de los estudios realizados en diferentes localidades de España y en el mundo. Los datos se refieren a prevalencias de infestación por *D. immitis* detectadas por diagnóstico seroepidemiológico o por detección de microfilarias en sangre. La prevalencia de la dirofilariosis puede variar mucho . Así tenemos, los trabajos realizados por Valladares y cols. ,1984, que registran una prevalencia del 41,8%, en Tenerife, y Anguiano y cols. ,1985, en Córdoba registran índices de parasitación del 18%. Pérez Sánchez y cols. en 1987 estudiaron en Salamanca 293 perros de los cuales el 12,3% presentaban microfilarias y observaron que el índice de parasitación era mayor en las zonas irrigadas por los ríos Tormes y Almar (33,3%). Entre agosto de 1987 y enero de 1988 Gómez Bautista y Rojo Vázquez realizaron una encuesta a nivel nacional con el fin de diagnosticar microfilarias en sangre. Se recogieron 1723 muestras que representaban aproximadamente el 0,1% del censo en 34 provincias. Se identificaron microfilarias en 112 muestras y de éstas, 63 pertenecían a *D. immitis* (3,7%). Los índices más elevados se

encontraron en las Islas Canarias (20%) y Huelva (36,7%) seguida por Andalucía (8,5%), Extremadura (6,7%) y Baleares (6,3%).

Lugar / año	Muestra	Técnica analítica	% infestación	Autores
Tenerife / 1984	310	Directo y Knott	41.8	Valladares y cols
Córdoba / 1985	250	“	18.0	Arguiano y cols
Salamanca / 1987	293	“	12.0	Pérez Sánchez y cols.
Madrid / 1987	215	“	2.0	Ortega Mora y cols.
Madrid /1988-89	1.061	“	1.9	Rojo Vázquez y cols.
Cádiz-Málaga /1989	182	“	5.5	Rojo Vázquez y cols.
Alicante / 1989	184	“	1.6	Rojo Vázquez y cols.
Barcelona / 1989	256	“	1.2	Rojo Vázquez y cols.
Zaragoza / 1988-89	126	“	13.5	Castillo y cols
Shiga / 1983-84	215	Directo	47.0	Tada y cols
California / 1987	5.592	“	5.9	Deidrick y cols
Canadá / 1987	165.428	“	0.3	Slocombe y cols
Saô Paulo /1988	511	“	8.8	Larsson y cols
Formosa / 1988-89	225	Knott y ELISA	36.4	Bulman y cols
Bnos. Aires /88-89	177	“	1.1	Bulman y cols
Francia / 1989	609	ELISA	0.8	Ducos de Lahitte
Cuba / 1988	190	Directo	63.2	Duménigo y cols
Canadá / 1989	247.716	“	0.17	Slocombe, J.
Panamá / 1981-90	4.107	Knott ELISA	13.8 32.0	Ledezma y cols.
Colorado / 1988-90	1.010	ELISA	0.3	Macy y cols.
Indiana / 1990	3.424	Directo	2.3	Parke y cols.
Japón / 1990	310	Necropsia	58.7	Uga y cols
Tennessee / 1985-90	2.658	Knott ELISA	5.0 13.8	Patton, S. y cols
Canadá / 1990	360	Directo	5.5	Mackenzie, G. y col
Grecia / 1987-91	50	Knott	10.0	Papazahariadou, M
Boston	3.148	Directo	0.41	Roth, L y cols.
Italia / 1991	329	Filtración	48.6	Martini, M y cols
Australia / 1992	1.428	Directo	1.2	Copland, M. y cols
Turkia / 1993	50	Necropsia	12	Sahin, I. y cols.
Malasia / 1993	200	Directo	22.5	Dahaliwal, G. y cols.
N. Caledonia / 156	156	Filtración	87	Beugnet, F. y cols.
Taipei / 1994	150	Directo	53.8	Kuo, T. y cols.
Sydney / 1996	404	Directo ELISA	5.9 11.4	Bidgood, A. y cols.

Tabla 1.i. Resumen de encuestas realizadas en diversas partes del mundo.

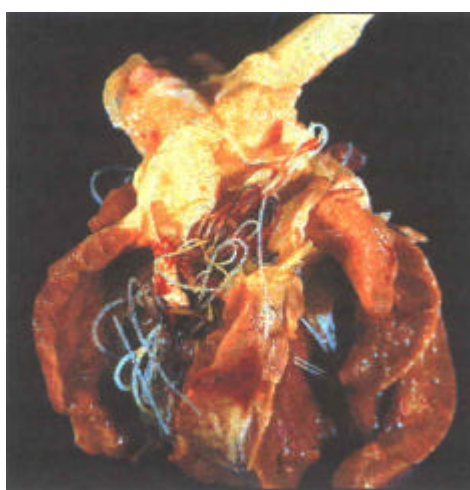
1.4- PATOGENIA.

La enfermedad por gusanos cardíacos en general progresa con lentitud, con signos clínicos que pueden ser evidentes después de tres años de infestación. La gravedad de la enfermedad (Munnell y cols., 1980; Thrall y cols., 1979) y la velocidad de su desarrollo (Knight, 1981) están principalmente relacionadas con la magnitud de la infestación. Los perros infestados artificialmente con una sólo inoculación de 100 a 300 larvas infestivas desarrollaron enfermedad avanzada entre los 10 y 12 meses (Knight, 1981). Sin embargo, la mayoría de los casos naturales son infestaciones graduales que se hacen patentes a lo largo de varios años.

Varios son los órganos que pueden verse afectados por la presencia de *Dirofilaria immitis* en el perro. La presencia de vermes adultos en arterias pulmonares y parénquima pulmonar, dan lugar a una endarteritis, que puede provocar hipertensión pulmonar o fallo congestivo del corazón derecho, dependiendo del grado de lesión y de la intensidad de parasitación. Clínicamente este proceso crónico puede ser asintomático o caracterizarse por fatiga, tos crónica y disnea. Taquicardia, anorexia y ascitis con aumento de la presión venosa y del pulso yugular son frecuentes en situación de fallo cardíaco congestivo. Esto es frecuente en infestaciones severas y en animales sometidos a ejercicio físico. El animal presenta aspecto cansado incluso en reposo. La dirofilariosis puede cursar de forma aguda cuando los vermes colonizan el ventrículo y la aurícula derechas. En un estudio realizado por Takemura y cols. (1989) realizando un electrocardiograma a perros infestados con *D. immitis* y no infestados, observaron que la amplitud y duración de la onda P era mayor en los perros infestados.

Aunque los vermes adultos en la luz de la arteria pulmonar principal pueden provocar una importante disminución del flujo de sangre e incluso pueden llegar a obstruir totalmente el paso de sangre, la principal causa de la hipertensión pulmonar son las alteraciones que se

totalmente el paso de sangre, la principal causa de la hipertensión pulmonar son las alteraciones que se producen en el endotelio (Olson y cols., 1982) La pared de la arteria pulmonar deja de ser lisa y blanca y presenta aspecto rugoso y tonalidad púrpura. Esta alteración morfológica que es debida a proliferación de la íntima hacia la luz se conoce como endarteritis pulmonar, aterosclerosis o hiperplasia de la íntima. Esta alteración se presenta en todos los perros con dirofilariosis y es consecuencia de la respuesta de la arteria a la presencia del parásito.



Fotografía 1.iii. Dirofilaria immitis en cavidad cardiaca.

La endarteritis provoca una importante pérdida de elasticidad de las paredes arteriales, no permitiendo la dilatación requerida para que se mantenga un flujo de sangre normal. En el intento de compensar la disminución de flujo sanguíneo se produce un aumento de la presión y del trabajo del ventrículo derecho y entra en fallo congestivo por incapacidad para mantener la elevada presión de perfusión que se requiere para mover la sangre por el pulmón. El número y complejidad de estas proliferaciones tiene estrecha relación con la intensidad y antigüedad de la infestación. Este tipo de alteración también es observable en las venas pulmonares, proliferaciones que son similares a válvulas cubiertas por endotelio morfológicamente normal. En áreas de lesiones arteriales severas algunos bronquiolos presentan

hipertrofia muscular (músculo de Reisesse) y suele presentarse fibrosis intersticial y hemosiderosis pulmonar. Este acúmulo de hemosiderina que también se presenta en los ganglios linfáticos y es atribuida a productos del catabolismo del parásito.

La neumonitis intersticial es apreciable principalmente en áreas con importantes lesiones vasculares y presenta abundante infiltrado de células plasmáticas y eosinófilos (Rawlings, 1986). Las alteraciones en venas, parénquima pulmonar y bronquiolos, lugares a donde no llegan los vermes, son atribuidas a la difusión de factores de crecimiento derivados de las plaquetas y a otros factores tróficos, de naturaleza desconocida, que difunden desde la arteria pulmonar lesionada (Ross, 1986).

En infestaciones muy elevadas, la localización de los vermes en la vena cava caudal y en las venas hepáticas, es causa de importantes alteraciones en el hígado.

El síndrome de vena cava o del fallo hepático es particularmente frecuente en animales muy jóvenes (menos de 3 años) y responde a infestaciones producidas por más de 100 vermes adultos (Rawlings, 1986). Aunque los animales con este síndrome también presentan cor pulmonale, los signos más importantes se deben a las lesiones hepáticas. La presencia del parásito en la aurícula derecha, vena cava caudal y en ocasiones venas hepáticas provoca obstrucción del flujo sanguíneo, principalmente a nivel de válvula tricúspide. La presión venosa central se eleva considerablemente y el hígado sufre una fuerte congestión y dilatación de los sinusoides que puede provocar la transformación cavernosa de todo el parénquima hepático. La disfunción hepática es apreciable por la elevación de todas las enzimas hepáticas y de la bilirrubina en sangre.

El hígado no es capaz de esterificar el colesterol libre, aumenta el cociente libre/esterificado y consecuentemente los eritrocitos acumulan en su pared colesterol libre.

Estos glóbulos rojos son muy frágiles, rompiéndose al contacto con los vermes. La hemólisis es constante, y el hígado no metaboliza la hemoglobina, por lo que rápidamente se produce hemoglobinemia y hemoglobinuria, signo que por su importancia y frecuencia en el síndrome de vena cava es responsable de la sustitución del apelativo de “fallo hepático” por el de “hemoglobinuria dirofilarial”. A consecuencia de la anormal fragilidad de los eritrocitos se produce anemia normocrómica y normocítica que es agravada por la anorexia (Buoro y Atwell, 1984). Las mucosas están pálidas o ictericas y el animal presenta gran debilidad y depresión. Las enzimas hepáticas, principalmente la ALT y AST, suelen estar elevadas en no más de un 10% de los perros con dirofilariosis.

La compleja y grave patología que hemos comentado hasta ahora es desencadenada por el parásito adulto. Sin embargo, también son frecuentes en los perros con dirofilariosis alteraciones debidas a la respuesta inmune.

Las IgM “in vitro” son capaces de promover la destrucción de las microfilarias por medio de los granulocitos. A los 6-11 meses, la respuesta es mediada por las IgG.

La inmunopatología más frecuente se produce en el riñón. Casi todos los perros con dirofilariosis crónica presentan glomerulonefritis membranosa por engrosamiento de la membrana basal de los capilares glomerulares. Esta glomerulopatía es debida a la adhesión de complejos inmunes, en los que están implicados los antígenos solubles de los adultos y de las microfilarias, las inmunoglobulinas G y M y el complemento (Abramowsky y cols., 1981). La glomerulonefritis puede dar paso a una nefrosis severa con proteinuria.

La neumonitis alérgica es una inmunopatología importante que podemos encontrar en un perro con dirofilariosis. Es debida a la hipersensibilización del perro a los antígenos de las microfilarias. En estos animales las larvas son rápidamente capturadas e inmovilizadas en la microcirculación del pulmón. La destrucción de gran número de microfilarias en los capilares

pulmonares y septos alveolares provoca un infiltrado granulomatoso denso apreciable radiológicamente. En esta intensa reacción granulomatosa están implicados los neutrófilos, eosinófilos y macrófagos y su adhesión a las microfilarias parece ser dependiente de los anticuerpos del hospedador y del complemento (Calvert y Losonsky, 1985).

La tromboembolización de los adultos y fragmentos de éstos es responsable de importantes lesiones. El parásito vivo parece ser resistente a la tromboembolización, pero cuando muere se produce una trombosis masiva e inflamación granulomatosa de la pared de las arterias.

Entre otros procesos provocados por *D. immitis* tenemos las lesiones intraoculares por presencia de vermes inmaduros que son descritas con relativa frecuencia y remiten tras la extracción quirúrgica del parásito. Los edemas de cornea que pueden ser transitorios o permanentes y las cegueras secundarias a glaucomas son las alteraciones oculares más frecuentes que se han descrito. Roze (1990) observó filariosis ocular en varios animales incluido el hombre. En los perros, la *Dirofilaria immitis* es la causa más frecuente de filariosis ocular. Entre la cadena de síntomas está: conjuntivitis a glaucoma, panoftalmia, y pérdida del ojo.

La extensa patología de esta enfermedad parasitaria es atribuible, principalmente, a los vermes adultos, teniendo las microfilarias una escasa participación, aunque éstas sean muy abundantes en la circulación sanguínea.

1.5-DIAGNÓSTICO.

No existen en la dirofilariosis signos clínicos que pueden considerarse patognomónicos, por lo que el diagnóstico clínico solamente tiene valor presuntivo, aunque

puede ser suficiente en caso de síndrome de vena cava o hemoglobinuria dirofilarial. Es, sin embargo, obligado el conocimiento del estado general del animal con dirofilariosis, la funcionalidad cardíaca, hepática y renal antes de instaurar un tratamiento curativo. Ante una sospecha de dirofilariosis, es la detección del parásito el único diagnóstico etiológico certero. La detección de microfilarias en muestras hemáticas y su identificación o la detección de antígenos o de anticuerpos en muestras séricas en casos de amicrofilaremia, son las pautas que se deben seguir en el diagnóstico de laboratorio. Un importante apoyo al diagnóstico etiológico son las imágenes radiográficas, los electrocardiogramas y la ecocardiografía. Esta última, es de gran ayuda en casos de síndrome de vena cava y en el diagnóstico de tromboembolización severa postratamiento adulticida.

La demostración de las microfilarias de *D. immitis* en la sangre es el método más simple para diagnosticar la infestación por gusanos cardíacos. La extracción de sangre de cualquier sitio es satisfactoria. Afortunadamente, la mayor parte de las infestaciones son patentes, y aquellas que se transforman en ocultas en general exhiben una variedad de aspectos clínicos y respuesta a las pruebas que ayudan a su identificación. Por lo común, las microfilarias de *D. immitis* son numerosas y su movimiento se detecta con facilidad mediante el examen microscópico de una gota de sangre fresca. No obstante un número importante de casos no serán acertados si no se emplea una técnica de concentración (Stein y Lawton, 1973; Wylie, 1970).

Los métodos clásicos utilizados para el diagnóstico de la dirofilariosis canina son:

a) Visualización de microfilarias:

a.1) En una gota de sangre entre porta y cubre. Esta técnica permite la observación del movimiento de las microfilarias en las preparaciones realizadas.

a.2) Preparaciones teñidas con Giemsa, que me permiten establecer diagnóstico diferencial, por la morfología de las microfilarias, entre *D. immitis* de *D. repens*, *Dipetalonema reconditum* y *Dipetalonema dracunculoides*.

La perioricidad nocturna (Tongson y Romero, 1962) y estacional (Sawyer, 1975; Kume, 1975) de las microfilarias circulantes de *D. immitis* puede afectar la facilidad de detección en la sangre. Ambos fenómenos ocurren independientemente de la presencia o ausencia de gusanos adultos. El recuento de las microfilarias no tiene valor para estimar el número de parásitos adultos o la gravedad de la enfermedad (Otto y cols., 1976) y por lo tanto la cuantificación no es un aspecto diferencial fiable.

b) Métodos de concentración de sangre:

b.1) La técnica modificada de Knott es el método clásico de concentración sanguínea (Acevedo y cols. 1981). Las microfilarias se concentran en la pequeña cantidad de sedimento que se compone fundamentalmente de leucocitos y restos de eritrocitos hemolizados. La técnica de Knott modificada continúa siendo el patrón con el cual todos los demás métodos de detección de las microfilarias se comparan. La prueba se realiza hemolizando 1 ml de sangre en 9 ml de formalina al 2%; se mezcla bien el contenido y tras centrifugación durante 5 minutos a 1.500 rpm, se elimina el sobrenadante (para conseguir un sedimento más libre de células sanguíneas se puede resuspender de nuevo con formaldehído al 2% y repetir la centrifugación) y el sedimento se mezcla con un volumen igual de azul de metileno 1:1000 y se examina como montaje húmedo. La sensibilidad de esta técnica es superior al 90%.

b.2) La concentración por filtración de la sangre hemolizada con formaldehído se realiza a través de membranas de policarbonato de 3-5 μm de diámetro de poro donde quedan retenidas las microfilarias. La filtración es más ventajosa que la sedimentación cuando

existen menos de 100 microfilarias por mililitro de sangre; además es un método de diagnóstico más rápido y de fácil lectura.(Feldmeier y cols.,1986). Sin embargo, la filtración provoca un acortamiento de las microfilarias que dificulta su identificación morfológica (Watson y cols., 1973).

La aplicación del método de Knott es mayoritariamente utilizado por los siguientes motivos:

1) Puede realizarse con mayor rapidez, particularmente cuando se procesan múltiples muestras.

2) Es significativamente menos costosa.

3) Preserva con mayor precisión la morfología de las microfilarias.

c) El empleo de técnicas inmunodiagnósticas en la dirofilariosis está recomendado en aquellos casos en que los animales presenten signos clínicos que hagan sospechar de la presencia de la enfermedad, pero que no se pueda poner en evidencia la presencia de microfilarias utilizando métodos microscópicos.

Las causas de la amicrofilaremia en presencia de adultos de *D. immitis* pueden ser las siguientes:

-Localizaciones ectópicas de los vermes adultos. Este tipo de infestaciones acontecen cuando los adultos de *D. immitis* no migran al corazón o a la arteria pulmonar, localizándose en otros órganos del animal. En estos casos, la infestación, puede o no ocasionar sintomatología, dependiendo de la localización de los vermes adultos.

-Infestaciones por vermes de un sólo sexo. En esos casos la fertilización no es posible y por tanto no existen microfilarias en la sangre circulante. Este hecho puede ocurrir como consecuencia de un tratamiento adulticida, ya que muchos fármacos tienen una mayor eficacia frente a los machos.

-Infestaciones en período de prepatencia. Los adultos están en el corazón, pero, al no haber alcanzado la madurez sexual, no producen microfilarias.

-Infestaciones tratadas con fármacos microfilaricidas, como el levamisol o ivermectina.

-Infestaciones estériles debido a la respuesta inmunitaria del perro que produce anticuerpos frente a la liberación de microfilarias por la hembra. Es la verdadera dirofilariosis oculta y la eliminación de las microfilarias se produce por la captura de las larvas en los capilares pulmonares; sin embargo, los adultos situados en el corazón no sufren ningún daño.

Entre las distintas pruebas que existen actualmente, están las de detección de anticuerpos y de antígenos circulantes específicos del parásito adulto.

La prueba de inmunofluorescencia indirecta se ha empleado para intentar detectar anticuerpos que reconocieran antígenos situados en la cutícula de la microfilaria. El enzimoanálisis es otra de las técnicas que se ha empleado, sobre todo para detectar anticuerpos frente a los adultos de *D. immitis*. Mediante esta técnica los resultados pueden ser positivos a partir de los 10-12 días después de la infestación por las L3.

El problema principal con esta técnica surgió al ser menor su especificidad de la que se pensaba (Calvert, 1987; Courtney y col., 1989). En este sentido, hay una gran cantidad

inaceptable de falsos positivos y reacciones cruzadas con *D. reconditum* particularmente en la fase de prepatencia y con helmintos intestinales (*Toxocara canis*, *Toxascaris leonina*, *Ancylostoma caninum* y *Uncinaria stenocephala*). Por otra parte, los perros tratados frente a las microfilarias de *D. immitis* con ivermectina también resultan positivos (Calvert, 1987).

Todo ello ha hecho posible que este tipo de pruebas hayan sido sustituidas por pruebas encaminadas a la detección de antígenos parasitarios en el suero. En contraste con las pruebas encaminadas a detectar anticuerpos, la detección de antígenos es mucho más específica y no se encuentran falsos positivos debidos al reconocimiento de antígenos de las otras tres especies de filarias que son prevalentes en España y en otros países.

Las técnicas inmunológicas, por su parte, también pueden dar lugar a falsos negativos, incluso en perros muy parasitados, debido a la alteración que en estos animales, sufre la respuesta inmune.

En este apartado, dedicado al diagnóstico de la dirofilariosis canina, no podemos dejar de hacer referencia a las grandes posibilidades que tiene la técnica de PCR. Esta técnica puede poner en evidencia la presencia del parásito a través de la detección del DNA de éste. La principal ventaja de la PCR reside en su extraordinaria sensibilidad; una sólo microfilaria en la muestra es suficiente para dar lugar a un resultado positivo.

1.6- TRATAMIENTO Y PROFILAXIS.

La dirofilariosis requiere un tratamiento complejo pero puede llevarse a cabo en la mayor parte de los casos con éxito si se realizan de forma correcta.

Existen fármacos adulticidas de gran eficacia. Son arsenicales pentavalentes de elevada hepato y nefrotoxicidad, por lo que es necesario realizar una evaluación de la funcionalidad de éstos órganos, además de la cardiopulmonar, e instaurar un tratamiento sintomático previo al curativo si fuera necesario. El reposo y el ácido acetilsalicílico ayudan a evitar complicaciones por tromboembolización postratamiento.

Un mes después del tratamiento adulticida debe realizarse el tratamiento microfilaricida aún cuando se hubiera realizado previamente. El fármaco a emplear en el tratamiento microfilaricida es a criterio del veterinario, pues algunos de los más eficaces no se comercializan para tal fin, siendo necesario el empleo de preparados para otras especies parásitas. La dirofilariosis tiene tratamiento quimioproláctico de elevada eficacia. La conveniencia de su empleo, el período de administración y el fármaco a emplear será llevado a cabo según criterio clínico.

Son muchos los clínicos que consideran que la eliminación de las microfilarias circulantes favorece una mayor tolerancia del tratamiento adulticida. Otros, por el contrario, no creen necesario el tratamiento microfilaricida previo. El reposo antes y durante el tratamiento, el empleo de ácido acetilsalicílico o corticoides, (Rawlings, 1990) son aspectos que también crean controversias entre los especialistas en dirofilariosis.

Tratamiento sintomático: Las pautas a seguir en el tratamiento de la dirofilariosis son dependientes de la severidad del proceso. Es necesaria la evaluación clínica pretratamiento adulticida, que debe evitarse en caso de:

- Fallo cardíaco congestivo.
- Síndrome de vena cava.
- Signos de tromboembolizaciones.
- Coagulación intravascular diseminada.

- Neumonitis alérgica.
- Cirrosis hepática.
- Azotemia.
- Nefropatías con proteinuria.

Si el perro muestra signos de severa enfermedad vascular o hipertensión pulmonar se recomienda el tratamiento previo con ácido acetilsalicílico (Aspirina[®]) a razón de 5mg/kg. durante 7-14 días antes del tratamiento adulticida, durante el mismo y hasta 3-4 semanas postratamiento adulticida. Esta práctica ha demostrado ser muy eficaz en la prevención de complicaciones por tromboembolización de los fragmentos de los vermes muertos y está demostrado que reduce la enfermedad arterial pulmonar por inhibición de la reacción inflamatoria y de la adhesión de las plaquetas a la íntima, principales causas de la endarteritis (Rawlings, 1986). Algunos clínicos utilizan esta pauta siempre que realizan un tratamiento adulticida, con independencia del grado de alteración cardiopulmonar que presente el animal. Se prescribe rutinariamente para animales enfermos de grado moderado o severo, es decir, con intolerancia al ejercicio, tos, pérdida de peso, evidencia radiológica de alteraciones arteriales pulmonares, signos electrocardiográficos de hipertrofia ventricular derecha o ascitis (Jackson, 1989). En caso de que existan signos de coagulación intravascular diseminada, antes del tratamiento adulticida debe administrarse heparina sódica (150 UI/kg cada 8 horas).

Si el animal muestra signos de fallo cardíaco congestivo se administrarán diuréticos como la furosemida a razón de 3-5 mg/kg cada 8 horas. También pueden administrarse vasodilatadores mixtos como el captopril o enalapril, aunque su utilidad es discutible.

Los glucocorticoides han sido empleados con gran frecuencia en animales con dirofilariosis y solamente deben ser administrados cuando existan evidentes signos de alteración en el parénquima pulmonar, principalmente neumonitis intersticial. Estos fármacos

pueden agravar la tromboembolización y la fibrosis periarterial, interfieren en la eliminación de los fragmentos de los vermes muertos y consecuentemente en la resolución de las lesiones arteriales. A su vez, activan la adhesión de las plaquetas y la proliferación de la íntima. Aunque los antiinflamatorios reducen la acumulación de fluido en intersticio y alvéolos, también reducen el flujo de sangre arterial, agravando la hipertensión pulmonar y favoreciendo el fallo congestivo.

Tratamiento adulticida: En general, es de gran utilidad la clasificación realizada por Reynaud (1990) en diferentes clases clínicas para la aplicación del tratamiento adulticida que se muestra a continuación en la Tabla 1.ii.

	Clínica	Tratamiento
Clase I	Asintomático	Adulticida Reposo (1 mes)
Clase II	Enfermedad moderada (tos esporádica)	Adulticida Reposo (1 mes)
Clase III	Sintomático	Adulticida Tratamiento sintomático Reposo (1 mes)
Clase IV	Síndrome vena cava	Extirpación quirúrgica Adulticida Reposo (1 mes)

Tabla 1. ii. Clasificación sintomática de la dirofilariosis. (Reynaud, 1990).

Una vez realizado el tratamiento adulticida debe mantenerse al animal bajo control para observar las posibles complicaciones por tromboembolización. Suelen aparecer 2-3 semanas después del tratamiento adulticida y su presencia requiere de reposo absoluto, ayuda a la ventilación pulmonar con oxígeno y administración de broncodilatadores (Calvert y col., 1993). Si se presenta hemoptisis se debe intentar evitar la pérdida de sangre administrando antitusígeno.

En el síndrome de vena cava, el único tratamiento que puede practicarse es la extracción quirúrgica del parásito. Se realiza con un fórceps alligator rígido o flexible introducido vía vena yugular externa. Se suele realizar con anestesia local, pues el estado del animal puede ser crítico para la anestesia general. Una vez realizada la extracción se recomienda el tratamiento adulticida 2-4 semanas después de la intervención quirúrgica (American Heartworm Society, 1992).

Dentro de los fármacos con eficacia adulticida los más utilizados son:

a) Tiacetarsamida sódica (Caparsolate[®], Filaramide[®]): arsenical pentavalente de administración endovenosa. Es eficaz a la dosis de 2,2 mg/kg cada 12 horas durante dos días seguidos. Cada dosis debe administrarse después de la observación del estado general del perro. Conviene que sea alimentado 30 minutos antes de cada inyección. Si se extravasa es muy irritante y tóxico, provoca flebitis y necrosis de tejidos blandos. Deben evitarse estas complicaciones por aplicación en área de extravasación de un fluido isotónico diluyente, inyección en la zona afectada de dexametasona o por aplicación de un antiinflamatorio uso tópico. Los principales órganos excretores de la tiacetarsamida son el hígado y los riñones (Drudge, 1952).

b) Melarsamina sódica (Immiticide[®]): arsenical pentavalente de administración intramuscular. Se utiliza a la dosis de 2,2 mg/kg (dos inyecciones) con un intervalo de tres horas en los perros con dirofilariosis clase I. Su efecto fue valorado por Reynaud, 1990; Rawlings y col., 1996. Reynaud valoró el efecto del hidrocloreto de melarsamina en 1990 y consideró que era más eficaz frente a la dirofilariosis canina, menos tóxico y más fácil de usar por vía intramuscular, que la tiacetarsamida sódica.

Las reacciones tóxicas más frecuentes se caracterizan por presencia de vómitos, letargia y anorexia. Si ocurriera esto se debe procurar un tratamiento de soporte con perfusión de soluciones parenterales, dieta rica en carbohidratos y baja en grasas durante 4 semanas, al final de las cuales se intentará de nuevo el tratamiento adulticida. La aparición de bilirrubina en orina con valores 2+, 3+ ó 4+ y sobre todo la aparición de ictericia sugiere una fuerte acción tóxica del fármaco.

Tratamiento microfilaricida: Los arsenicales pentavalentes no tienen eficacia frente a las microfilarias, que no parecen contribuir de forma notoria a la patología de la dirofilariosis, pero que deben ser eliminadas, pues son las responsables de la transmisión de la enfermedad.

Son muchos los fármacos con actividad microfilaricida, aunque en la actualidad solamente se suelen emplear la ivermectina y la milbemicina.

En cuanto a la ivermectina tenemos que es eficaz frente a las microfilarias en circulación sanguínea y en útero a la dosis de 50 mg/kg subcutánea u oral. Los posibles efectos adversos, son infrecuentes y parecen ser debidos a la muerte de gran cantidad de las microfilarias. Esta reacción adversa generalizada puede ser variable y presentarse como depresión, anorexia hipotensión y shock tipo colapso. Otros efectos secundarios referenciados solamente se presentan tras administración de dosis muy elevadas: midriasis (2,5 mg/kg), tremor (5 mg/kg), coma y colapso (10-20 mg/kg) (Campbell, 1987). Es importante considerar la toxicidad que puede presentarse en algunos perros de raza Collie a partir de dosis de 100 µg/kg.

Uno de los productos más utilizados es el Cardotek 30[®], administrando una única dosis vía oral cada mes elaborado por Merck, Sharp y Dohme de España, S. A..

La milbemicina es un macrólido al igual que la ivermectina y sólo se comercializa para la prevención de la dirofilariosis. A la dosis profiláctica (0,5 mg/kg) también tiene acción microfilaricida (Blagburn y cols., 1992). Al igual que la ivermectina, las ocasionales reacciones adversas son debidas a la respuesta por la muerte de gran cantidad de microfilarias y son raros los efectos por toxicidad del fármaco, salvo en el caso de ciertos perros de raza Collie, en los que la dosis está muy por debajo de la DL50. Puede apreciarse colapso circulatorio 6-8 horas postratamiento que responde bien a corticosteroides y fluido parenteral. Anorexia y letargo también pueden aparecer a las 24 horas de la administración de milbemicina o ivermectina.

Tratamiento preventivo: La infestación por *Dirofilaria immitis* puede prevenirse con una quimioprofilaxis adecuada. El éxito de este tratamiento es dependiente de la correcta actuación en dosis y período de administración.

Es aconsejable el diagnóstico previo al tratamiento preventivo. Si el animal presentara infestación, realizar el tratamiento curativo antes. Ante cualquier eventualidad como la imposibilidad de tratamiento curativo por ausencia del producto y siempre que el animal no presente grave sintomatología, puede realizarse el tratamiento preventivo. En estas circunstancias debe realizarse con un macrólido y nunca con la dietilcarbamacina. La administración de estos fármacos evita la reinfestación y reduce la carga de microfilarias, que siempre es favorable para el perro parasitado. Sin embargo, las posibilidades de reacciones adversas postratamiento son mayores cuando existe microfilaremia (Calvert y col., 1993; Kitagawa y cols., 1993).

Los tratamientos preventivos son muy eficaces, pero es recomendable que en estos animales se realice diagnóstico cada 1-2 años, sobre todo si es un área de alto riesgo. El

tratamiento preventivo se debe realizar desde el comienzo de la época de vuelo de los mosquitos vectores hasta 1-2 meses después de su desaparición. Este período puede ser muy diferente de unas zonas a otras. En Canarias es durante todo el año, y en el resto de España el período se extiende desde marzo-abril hasta octubre-noviembre.

Entre los fármacos más utilizados en el tratamiento preventivo están:

a) La dietilcarbamacina: que se administra a la dosis de 5,5-6,5 mg/kg. todos los días durante el período de vuelo de los mosquitos. Este medicamento se cree que inhibe el desarrollo de las larvas de cuarto estadio en los procesos de muda de L3 a L4 (9-12 días postinfestación) o de L4 a L5 (60 días postinfestación). Sin embargo este medicamento ha caído en desuso por sus muchos efectos secundarios.

b) El más utilizado es la ivermectina (Cardotek[®]). En comprimidos dosificadas a 6-12 µg/kg se administra mensualmente durante el período de vuelo de los mosquitos. Es totalmente eficaz siempre que se administre en los 30 días siguientes a la posible infestación. Actúa frente a las larvas de tercer y cuarto estadio. A estas dosis no se han descrito efectos adversos.

c) Combinación ivermectina y pamoato de pirantel (Cardotek plus[®]). El pirantel contribuye a ampliar el espectro antihelmintico de la especialidad farmacéutica.

II.- MATERIAL Y METODOS.

II.- MATERIAL Y MÉTODOS.

2.1- Toma de muestras.

2.1.1-Obtención y conservación de adultos de *D. immitis*.

Los parásitos adultos se recolectaron de necropsias de perros, extraídos del corazón y pulmón en el momento de su sacrificio.

2.1.2.- Antígenos.

De los machos y hembras adultos de *D. immitis* se obtuvo el antígeno somático. Como paso previo a la preparación del antígeno se procedió a una cuidadosa limpieza de los parásitos lavando varias veces con solución salina para eliminar cualquier resto de sangre del hospedador. Estos adultos posteriormente se almacenaron en tubos de ensayo sellados con papel de parafina (“Parafilm”) a -80 °C hasta su utilización.

A partir de aquí, se trituraron los adultos de *D. immitis* en un homogeneizador en tampón PBS 10mM, pH 7,2 al que se le había añadido un inhibidor de proteasas (Sigma PO787 0,075 U/mg). La suspensión obtenida se dejó toda la noche a 4°C. Posteriormente se centrifugó a 100.000 g, recogiendo el sobrenadante, que, se filtró con filtros Millipore (Milles G-S estériles de 0,22 µ. de diámetro de poro). Al filtrado resultante del proceso anterior, se le valoraron las proteínas totales por el método de Lowry, utilizando como blanco PBS. Luego se guardó a -80°C hasta su utilización.

2.1.3-Obtención y conservación de muestras de sangre.

Se han investigado 1919 muestras de perros en la isla de Tenerife, obtenidas de distintas zonas de la misma, como se muestra en el Figura 2.i .

Siempre que se pudo se extrajeron 5 ml de sangre por punción venosa, dividiéndola en dos fracciones iguales. La primera con anticoagulante (EDTA-K₂) se utilizó para investigar la presencia de microfilarias y de la segunda se obtuvo suero para la determinación de anticuerpos. Una vez obtenidos los sueros, se conservaron a -20°C hasta su utilización. La otra fracción de las muestras también se conservó en las mismas condiciones tras la observación directa en el microscopio.

De cada muestra se recogieron una serie de datos como se muestra en la ficha confeccionada al efecto.(Figura 2.i).

2.2-Técnicas de diagnóstico.

2.2.1- Análisis directo.

Visualización al microscopio de una pequeña cantidad de sangre (aproximadamente 20 µl) colocada entre porta y cubre

Cuando la cantidad de sangre obtenida era suficiente además del examen directo se aplicaba el método de concentración de Knott. Sin embargo, es necesario poner de manifiesto que en muchas ocasiones y por diversos motivos no se pudo obtener la cantidad de sangre deseada. En estos casos se prefirió utilizar la muestra para el inmunoensayo,

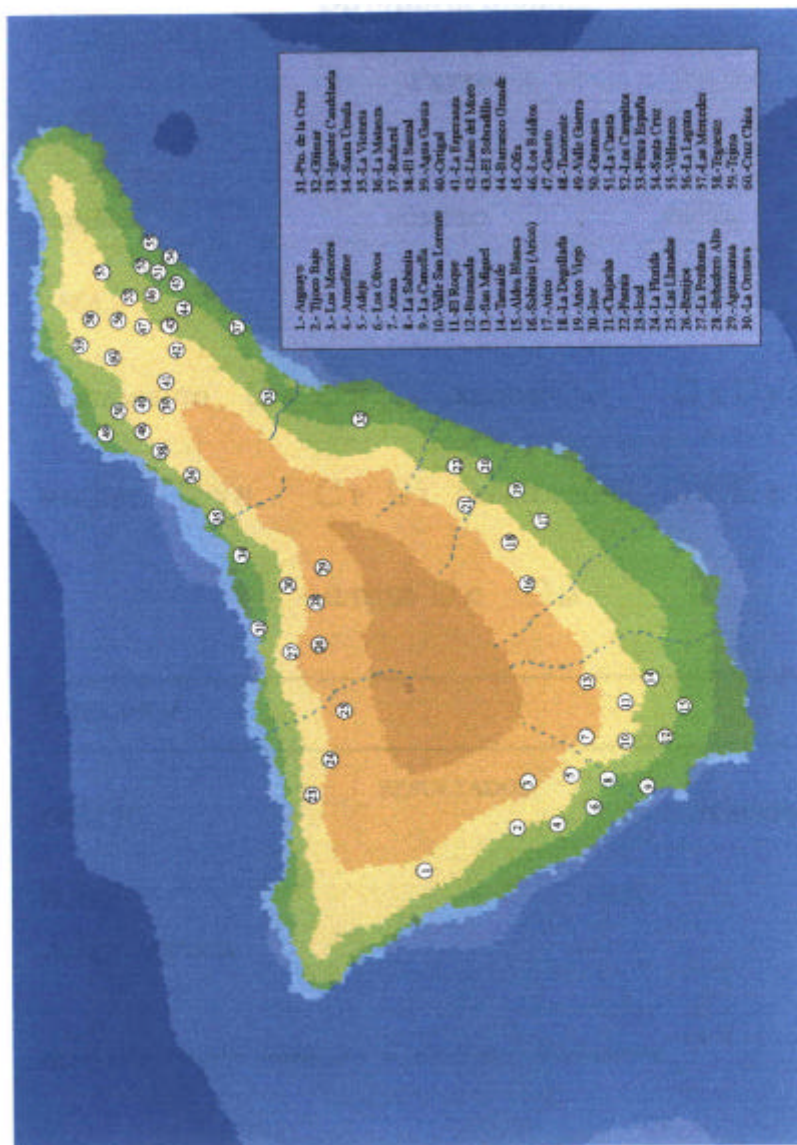


Figura 2. i. Mapa de Tenerife donde se indican los lugares de las tomas de muestras.

sacrificando en esos casos el método de concentración. Motivo por el cual en el análisis estadístico de los resultados están incluidos sólo los del análisis directo y ELISA que abarcan toda la muestra.

Al mismo tiempo, se prepararon frotis de sangre que fueron fijados y teñidos con Giemsa . Estas preparaciones fueron guardadas para posteriores estudios

2.2.2- Técnica de ELISA.

Dentro de las distintas variantes de la técnica de ELISA, nosotros hemos empleado el método indirecto para la detección de anticuerpos circulantes según la modificación de Ambrois-Thomás (comunicación oral). Como soportes se utilizaron placas de microtitulación de 96 pocillos, marca Geiner (Labor-Technik) con fondo en U.

La sensibilización de las placas se realizó con el antígeno diluido en tampón carbonato 0,05M, pH 9,6. Se probaron distintas concentraciones antigénicas (10, 15 y 20 µg/ml) observando que la concentración idónea de antígeno para la sensibilización de las placas era de 10 µg/ml.

La sensibilización de la placa se realizó a 4°C toda la noche, atemperándola al día siguiente a 37°C durante una hora. También se pueden guardar las placas sensibilizadas a -80°C, selladas con “Parafilm”.hasta su uso.

Inicialmente se probaron las diluciones de sueros, 1/25, 1/50, 1/100 y 1/200 y

posteriormente se comprobó que 1/400 y 1/800 eran las diluciones a las que no se presentaban reacciones cruzadas con otros parásitos como *Toxocara canis* que pudieran poseer componentes antigénicos comunes al antígeno somático de *D.immitis* utilizado por nosotros. Las diluciones de los sueros se realizaron en PBS+Tween 20 0,05%+ seroalbúmina bovina de Sigma Fracción V al 1%.

El conjugado enzimático se preparó con Anti Ig G marcada con peroxidasa (Rad/Ig G (H+L) de la casa Miles a una dilución 1/1.500 en PBS+Tween 20 0,05%+ seroalbúmina bovina al 1%. El revelado se llevó a cabo con 25 ml de tampón citrato 0,07M pH 5,15 + 0,075 ml de H₂O₂ + 75 µg de ortofenilendiamina de Sigma como cromógeno. Añadiendo SO₄H₂ 2N se paró la reacción enzimática.

Finalmente, se realizó la lectura de la densidad óptica (D. O) en un lector controlado por un microprocesador EASY BEAM (ATOM), a una longitud de onda de 492 nm. Para la interpretación de los resultados, se tuvo en cuenta en primer lugar, los resultados obtenidos por diluciones seriadas de sueros de referencia positivos, confirmando de esta forma, la bondad de la técnica empleada. En segundo lugar, se tomaron como sueros positivos, aquellos cuya D.O. era superior a la media más 4 desviaciones standard (D.S). Criterio este seguido por diversos autores, (Riera y col., 1988).

Se tomaron como sueros negativos, aquellos cuya D.O. era inferior a la media más 2 D.S. y sueros dudosos eran los que tenían su D.O. comprendida entre la media más 2 D.S. y la media más 4 D.S.

Hay que tener en cuenta, que la cantidad de anticuerpos circulantes, es mayor en el período prepatente, disminuyendo cuando se cronifica la enfermedad y aparece la microfilaremia. Así lo han hecho ver también Pacheco, 1966; Wilkins y cols, 1978; Scholtens y col., 1983 entre otros. Grieve y col., 1985 en infestación experimental, observó que hacia la semana 34, la concentración de anticuerpos circulantes es mayor, decreciendo a continuación con la aparición de las microfilarias. De ahí que los sueros con dirofilariosis oculta, tengan de promedio, unos títulos superiores al de los perros que presentan microfilaremia.

2.2.3- Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Los métodos inmunológicos, aunque sensibles y útiles, presentan algunos inconvenientes, como la aparición de respuesta tras concluir la infestación (ya que siguen circulando anticuerpos) o la necesidad de un período de tiempo entre la entrada del parásito en el organismo y el comienzo de la producción de anticuerpos, la variación de la respuesta inmune de los distintos individuos, etc.

Todo esto ha desembocado en la aparición de un nuevo tipo de técnicas que permiten la detección directa de fragmentos del genoma, es decir la puesta en evidencia de una parte del parásito, tanto en tejidos o células aisladas, como en fluidos biológicos. La importancia de la PCR reside en su capacidad para amplificar DNA (ya sea puro o impuro, esté entero o fragmentado) por un método de proliferación químico. De esta manera es posible amplificar secuencias de DNA específicas (de un tamaño comprendido entre 50-2.000 pares de bases) más de un millón de veces en sólo unas pocas horas.

Por otro lado, la capacidad de amplificar DNA “crudo“, desde cantidades demasiado pequeñas para una clonación, da a esta técnica una extraordinaria importancia como herramienta de trabajo en Biología Molecular.

Este método fue descrito por Mullis en 1984. Consiste en copiar (amplificar) repetidamente un determinado fragmento de DNA que se encuentra flanqueado por una determinada secuencia de nucleótidos. Para ello es necesaria la intervención de una enzima, una DNA polimerasa, que a partir de una secuencia molde monocatenaria y en presencia de unos cebadores que indicarán la región de comienzo, es capaz de fabricar la cadena complementaria a dicha cadena en dirección 5’-3’.

2.2.3. a) Extracción del DNA de adultos de *D. immitis*.

1) Homogeneización del adulto con una solución de lisis. Para ello se usaron 3 ml de dicha solución por cada 100 mg de muestra. La composición de la solución de lisis es la siguiente:

SDS.....	0,5 %
TRIS. HCL pH 7,4	10mM
NaCl	50mM
EDTA	1mM

Esta disolución se esterilizó en autoclave y de ella se tomó el volumen necesario para la homogeneización. La solución de lisis se conservó a temperatura ambiente.

2) Rotura de membranas celulares. Después de la homogeneización se colocaron alícuotas en tubos eppendorf y se añadió proteinasa K hasta una concentración final de 0,30 mg/ml. La proteinasa K presenta actividad proteasa y es usada para digerir las proteínas presentes en el medio. Para su conservación se disolvió en una disolución 10mM de CaCl_2 hasta una concentración de 10 mg/ml y se conserva a -20°C hasta su uso.

Para dejar actuar a la proteinasa K se tomaron los tubos eppendorf y, tras agitación en el “vortex”, se colocaron al baño María a 56°C durante una hora.

Pasado este tiempo se retiraron los tubos eppendorf del baño y se dejaron a temperatura ambiente durante toda la noche, con lo cual se digieren las proteínas presentes en la muestra asociadas al DNA.

3) Extracción. Las extracciones se realizaron con diferentes disolventes que tienen como objetivo eliminar todos los restos proteicos y lipídicos.

Se adicionó fenol equilibrado (v/v), se agitó en el “vortex” y se centrifugó a 4°C y 13.000 rpm. durante 5 minutos.

En la fase acuosa, fase superior, quedan sales y DNA. En la inferior, la fase orgánica, queda todo lo que se desecha. Se tomó la fase superior y se realizó otro lavado con fenol equilibrado. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo eppendorf donde se le añadió un volumen de mezcla de fenol/cloroformo/isoamílico (25:24:1) y se volvió a centrifugar. El cloroformo aumenta la hidrofobicidad de la fase orgánica.

Por último, se agregó a la fase superior, cloroformo/isoamílico (v/v) preparado en una relación 24:1, se agitó con el “vortex” y se centrifugó a 4°C y 13.000 rpm durante 5 minutos. Con este paso se pretende eliminar las trazas de fenol presentes. El alcohol isoamílico reduce la formación de espuma. Tras este proceso se consiguió aislar el DNA de la muestra en la fase acuosa final. Se recogió la fase superior y se colocó en otro tubo eppendorf.

4) Precipitación del DNA. En esta etapa se altera la constante dieléctrica del medio donde se encuentra disuelto el DNA para que éste precipite. Lo que se quiere conseguir es concentrar y purificar el DNA, precipitándolo. Para ello se añadió al tubo eppendorf con la última fase superior 0,1v de acetato sódico 3M pH 5,2 y 1v de isopropanol.

Para este trabajo se eligió isopropanol, dado que el RNA es más soluble en isopropanol que en etanol y lo que interesa en este caso es el DNA. Se invierte el tubo eppendorf suavemente durante 4-5 minutos y se observa como comienza a precipitar el DNA (aparecen unas hebras blanquecinas muy finas y, si la cantidad es grande, una masa compacta). Para aumentar el rendimiento y la velocidad de precipitación se dejó a -20°C toda la noche (3 horas como mínimo) y pasado este tiempo se centrifugó a 4°C y 13.000 rpm durante 10 minutos, se retiró el máximo de alcohol posible conservando el precipitado.

5) Lavado, secado y disolución del DNA. Estos son los pasos finales de la extracción del DNA que se realizaron lavando el precipitado de DNA con etanol frío al 70% y se centrifugó a 4°C y 13.000 rpm durante 5 minutos. Se lavó con etanol frío al 70% para eliminar los posibles restos de sales que hayan precipitado con el DNA de la muestra. Se eliminó el sobrenadante y se

secó el precipitado en una estufa a 37°C, durante 30 minutos.

Se resuspendió el DNA en 50 µl de agua bidestilada estéril templada y se dejó en el baño como una media hora para facilitar la disolución del DNA, así se dejó a temperatura ambiente durante toda la noche. Al día siguiente y antes de guardarlo a -20°C, se cuantificó su concentración en un espectrofotómetro (Gene-Quant de Pharmacia Biotech), a una longitud de onda de 260 nm.

2.2.3.b) Extracción del DNA de muestras de sangre .

La extracción del DNA de las muestras de sangre siguió básicamente el mismo esquema que para el adulto, sin embargo existen algunas diferencias que es preciso resaltar. Se tomaron 2,5 ml de sangre total con EDTA-K₂ como anticoagulante y se centrifugaron a 8.000 rpm durante 8 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el plasma y se lavó dos veces con agua destilada para hemolizar los hematíes y se centrifugó a 3.000 rpm durante 5 a 10 minutos, eliminando la hemoglobina (importante inhibidor de la PCR).

Todos los demás pasos de la extracción de DNA son similares al descrito anteriormente.

2.2.3.c) Método.

Se realizó la PCR según el método descrito por Mullis en 1984.

2.2.3. d) Elección de cebadores.

Para proceder a la elección de cebadores se consultó el Software informático GCG, ubicado en el Centro de Biología Molecular de Madrid, solicitando información sobre las secuencias conocidas del genoma de *D. immitis* y el tipo de proteína que expresan. Por otro lado también se buscaron las referencias existentes conteniendo información al respecto.

Los cebadores consisten en secuencias, normalmente de 17 a 22 nucleótidos, complementarios al extremo 5' de cada cadena del fragmento de DNA motivo de estudio,

dejando libre el extremo 3' donde la polimerasa se encargará de ir incorporando los nucleótidos complementarios a la cadena molde. El correcto diseño de estos cebadores es clave en la especificidad del proceso.

Una vez elegida la secuencia con la que se iba a trabajar se comenzó a estudiar en ella los posibles cebadores, que debían tener una longitud de 20 nucleótidos y no formar dímeros. Los dos cebadores que se escogieron se denominaron NEL 1 y NEL 2 respectivamente y su secuencia se muestra a continuación:

NEL 1: 5'-ACG TAT CTG AGC TGG CTC AC-3'

NEL 2: 5'-ATG ATC ATT CCG CTT ACG CC-3'

Estos cebadores seleccionados, amplifican un fragmento de un gen, que expresa una proteína de 133 aminoácidos de longitud y de un tamaño aproximado de 15 kd. (Scoles y col., 1995).

La composición de nucleótidos de los cebadores es como sigue:

NEL 1:

Nucleótidos	Número	%
ADENINA	4	20.0
CITOCINA	6	30.0
GUANINA	5	25.0
TIMINA	5	25.0
ADENINA+TIMINA	9	45.0
CITOCINA+GUANINA	11	55.0

NEL2:

Nucleótidos	Número	%
ADENINA	4	20.0
CITOCINA	7	35.0

GUANINA	3	15.0
TIMINA	6	30.0
ADENINA+TIMINA	10	50.0
CITOCINA+GUANINA	10	50.0

Los cebadores fueron servidos liofilizados por Pharmacia Biotech, y se llevaron hasta una concentración final de 1 μ M con la que se trabajó, Se encontró que a la concentración a la que existía mejor respuesta era a la dilución 1/16 de ambos cebadores..

2.2.3. e) Componentes de la PCR.

Los componentes de la PCR son la muestra, (a la que se le ha hecho la cuantificación del DNA), los nucleótidos, los cebadores y la Taq polimerasa. Este último componente debe ser disuelto en un tampón “Buffer“ que contiene (Tris-HCl 10mM pH 8,3 KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM) suministrado por Perkin Elmer y crea las condiciones óptimas de trabajo de la enzima.

Los nucleótidos (dNTP) nos lo suministraron la casa Boehringer Mannheim a una concentración de 4mM y como para nuestro ensayo se necesitan a 200mM entonces tomamos 5 μ l de la mezcla para un volumen final de PCR de 100 μ l. En nuestro caso la PCR se hizo con un volumen final de 50 μ l.

La preparación de una disolución llamada “Master“ es necesaria para evitar posibles contaminaciones de los componentes de la reacción y ahorrar tiempo en el montaje de la técnica.

El “Master” que se conserva a -20°C, contiene todos los componentes de la PCR

(“Buffer” 10 x, cebadores (1 y 2), nucleótidos y agua bidestilada estéril) excepto la Taq polimerasa y la muestra.

La Taq polimerasa utilizada en estos ensayos fue suministrada por Perkin Elmer de la casa Roche a una concentración de 5 unidades por μl . La temperatura óptima de amplificación de la Taq polimerasa es de 72°C y se conservó a -20°C hasta su uso.

2.2.3. f) Montaje de la PCR.

Se usaron las siguientes condiciones:

Volumen total reacción:	50 μl .
Muestra:	50 ng de DNA de las muestras sanguíneas. 0,93 ng de DNA del adulto de <i>D. immitis</i> .
Cebadores:	32,2 nmoles de cebador 1. 38,7 nmoles de cebador 2.
Nucleótidos (dNTP):	200 μM de cada nucleótido.
Medio de reacción:	5 μl de tampón PCR 1x
Taq polimerasa:	2,5 U.

La reacción que tuvo lugar en nuestros ensayos se corresponde con el esquema extraído de las condiciones de amplificación que estudiaron Scoles y col., 1995 con una serie de

modificaciones.

Esta mezcla se sometió al siguiente tratamiento térmico:

1°) Desnaturalización previa: 94°C durante 4 minutos.

2°) 40 ciclos de:

90°C durante 1 minuto (desnaturalización).

62°C durante 1 minuto (anillamiento).

72°C durante 1 minuto (reacción de polimerización).

3°) Polimerización final: 72°C durante 5 minutos.

Después del paso de elongación final se mantuvieron las muestras a 4°C.

2.2.3. g) Visualización de los productos de PCR.

1.-Preparación de los geles. Para visualizar los productos de la reacción, es necesario someterlos a una electroforesis en geles, que están compuestos por agarosa disuelta en tampón TAE 50x (tampón Tris 0,04M, acetato 0,04M y EDTA 0,001M, ajustando el pH a 8,0 con ácido acético glacial) incorporando posteriormente el agente intercalante y fluorescente, bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/ml. El bromuro de etidio es una sustancia que se intercala entre las hebras de DNA y las hace visibles en presencia de luz ultravioleta. La electroforesis se llevó a cabo en cubetas submarinas donde el gel queda completamente cubierto por el tampón de electroforesis (TAE 1x), evitando así el sobrecalentamiento del mismo. Esto obliga a mezclar la muestra con un tampón de carga que contiene glicerol al 30%, que impide que

la muestra se diluya en el tampón de electroforesis. Este tampón de carga está compuesto además por azul de bromofenol al 0,25%, colorante que permite seguir la evolución de la electroforesis.

Para el tamaño del producto de amplificación obtenido a partir de la reacción de PCR, fragmento de DNA de 378 pb repetido en tandem, la concentración de agarosa recomendado para la resolución de DNA lineal de 200-3,000 pb fue del 1,5%.

2.- Preparación de muestras para electroforesis. Las muestras para la electroforesis se prepararon mezclando 15 μ l de la muestra de DNA amplificado con 3 μ l de tampón de carga. Al cargar el gel de agarosa, se usó un blanco, constituido por 15 μ l de muestra de agua bidestilada estéril sometida a amplificación más 3 μ l del tampón de carga..

3.-Preparación del marcador de peso molecular. Para comprobar el tamaño de los fragmentos de DNA amplificado se usaron como marcadores de peso molecular el “100 Base-Pair Leader” de Pharmacia Biotech, a la dilución 1/20 de la solución madre.

4.- Electroforesis de DNA en geles de agarosa. Las electroforesis se llevaron a cabo en cubetas horizontales, de la marca PHARMACIA L. K. B. modelo GNA 100, con geles sumergidos de 76 x 100 mm. y 32 (76 mm., dependiendo del número de muestras. Se aplicaron intensidades de corriente constantes generadas por una fuente de alimentación, de la marca PHARMACIA Biotech, modelo Electrophoresis Power Supply-EPS 3500, que osciló en 90-100 voltios (voltaje de 9-10 voltios/cm de gel) para los geles grandes, y 150 mA durante 30 minutos, a temperatura ambiente.

5.- Visualización de resultados. Tras la electroforesis, y para visualizar los resultados, se expusieron los geles a luz ultravioleta de 340 nm. en un transiluminador (marca Ultralum Dual Light_{TM} Transiluminator), y se fotografiaron con una cámara Polaroid modelo MP-4, provista de película instantánea de la misma marca, tipo 667, o se digitalizó la imagen mediante el sistema de captación de imágenes “Gelprinter by TDI”.

2.2.3. h) Transferencia de DNA desde geles de agarosa a membranas de “nylon” cargadas positivamente.

El método empleado fue el de Southern blot en solución alcalina. Se basa en arrastrar el DNA desde un gel de agarosa hasta una membrana donde queda retenido o inmovilizado. Para ello, se crea un flujo constante de hidróxido sódico 0,4N (transferencia alcalina) desde el gel hacia la membrana. Para crear este flujo se hace una torre con trozos de papel de filtro del mismo tamaño que el gel y de unos 2 ó 3 cms de altura sobre los cuales se ponen 5 papeles de Whatman 3MM, el último, humedecido con tampón de transferencia. Sobre éste se coloca la membrana de nylon cargada positivamente (Boehringer Mannheim) también impregnada con hidróxido sódico 0,4N. Seguidamente se pone sobre la membrana el gel de agarosa que previamente se ha sumergido en hidróxido sódico 0,4N unos minutos. Para evitar que el tampón fluya por fuera de la membrana y no pase a través de ella, hay que enmarcar la membrana con unas tiras de plástico. Sobre el gel se colocan otros 3 papeles Whatman 3MM también mojados en hidróxido sódico 0,4N y por último se coloca un puente de papel Whatman 3MM que vaya desde un recipiente que contenga el tampón de transferencia, hidróxido sódico 0,4N, hasta la parte superior de la torre. Se cubre con un trozo de plástico para evitar evaporaciones y se pone un pequeño peso para que haya un contacto más íntimo entre los componentes.

Al cabo de una hora, el tampón de transferencia habrá atravesado el gel y la membrana, arrastrando el DNA desde el gel, quedando el DNA retenido en la membrana. Se retiran todos los papeles y los restos del gel y se lava la membrana durante 3 minutos con tampón SSC 2x. Si el DNA a transferir es de gran tamaño, antes de la transferencia se sumerge el gel en ácido clorhídrico 0,25N durante 30 minutos en suave agitación, con la finalidad de facilitar luego la

transferencia, y luego se neutraliza con hidróxido sódico 0,4N durante 20 minutos. Si el DNA motivo de transferencia, es producto de PCR, que es nuestro caso, esto no es necesario.

Una vez pasado este tiempo, se deposita la membrana, con la zona donde teóricamente se encuentra el DNA, en un transiluminador de luz ultravioleta, y se somete a su acción durante 3 minutos. A partir de este paso, la membrana se puede guardar entre papel Whatman 3MM hasta la posterior hibridación.

2.2.3. i) Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión.

1.- Al correr el producto amplificado del adulto en un gel de agarosa “low-melting” al 0,7% y utilizando el marcador de peso molecular λ -Hind III se obtuvieron dos bandas en tandem, una de 378 pb y otra de 800 pb. Estas bandas de interés se localizaron bajo luz ultravioleta.

2.- Utilizando un bisturí, se cortaron los trozos de agarosa que contenían la banda de interés y se transfirió a un eppendorf, cada uno de los trocitos por separado.

3.- Se añadieron 5 volúmenes de: Tris-Cl (pH 8,0) 20 mM y EDTA (pH 8,0) 1 mM a cada trozo de agarosa. Se cerraron cada uno de los tubos y se incubaron durante 20 minutos a 65°C para fundir la agarosa del gel.

4.- Se enfrió la solución a temperatura ambiente y se añadió un volumen de fenol equilibrado a pH 8,0 con Tris-Cl 0,1M. Se mezcló durante 20 segundos y se centrifugó a 4000 g durante 10

minutos a 20°C. Se realizó una preextracción de la fase acuosa una vez con fenol:cloroformo y otra vez con cloroformo.

5.- Se transfirió la fase acuosa a un eppendorf y se le añadió 0,2 volúmenes de CILi 4M y 2 volúmenes de etanol a 4°C. Se dejó la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente y se recogió el DNA por centrifugación. Se seca y se disuelve en 12-20 μ de agua bidestilada estéril. (Sambrook y cols, 1989).

2.2.3. j) Marcaje de sondas.

Existen diferentes métodos de marcaje de sondas, con moléculas marcadas radioactivamente, detectables radiográficamente y con moléculas no radioactivas detectables químicamente.

En el presente trabajo se ha empleado un método de marcaje que utiliza como marcador un esteroide, la digoxigenina, unido a moléculas de deoxiuridil trifosfato (dUTP) por medio de enlaces estables en medio alcalino (DIG-11-dUTP). En función del tipo de sonda a utilizar, se pueden establecer diferentes estrategias de marcaje. Para el marcaje de nuestras sondas se llevó a cabo un método que es capaz de producir suficiente cantidad de sonda de DNA marcada en poco más de una hora de reacción. Dicha reacción es mediada por la acción de la enzima Klenow, y la presencia del nucleótido responsable del marcaje, DIG-11-dUTP. La enzima Klenow tiene capacidad de actuar como polimerasa en condiciones de baja concentración de sal o como hexonucleasa cuando la concentración de sal es alta.

En nuestro experimento se usó como polimerasa utilizando el extremo 3'OH terminal de unos hexanucleótidos fabricados al azar como cebadores, dado que desconocíamos la secuencia del fragmento a marcar. Como nucleótidos se utilizó una mezcla entre los que se encuentra el DIG-11-dUTP.

Así, el producto resultante contenía una porción de nucleótidos marcados y homólogos a las cadenas molde. Este método está recomendado para fragmentos desde 200 hasta 2.000 pares de bases, en nuestro caso un fragmento tenía 800 pb y otro 378 pb. (Sambrook y cols., 1989)

El procedimiento seguido es el siguiente:

Se partió de 15 µl de muestra que contengan entre 0,5-3 µg de DNA. Lo calentamos a 95°C durante 10 minutos para su desnaturalización, e inmediatamente se pone el eppendorf donde tenemos la muestra en hielo picado, para evitar la renaturalización. Lo mismo se hace con el DNA control.

Se preparamos la mezcla de reacción donde va a tener lugar el marcaje, añadiendo los reactivos en el siguiente orden:

El volumen total de reacción	20 µl.
DNA muestra.....	10 ng-3 µg (volumen variable)
Hexanucleótidos (10x).....	2 µl
dNTP marcados (10x)	2 µl
Agua csp.....	19 µl

Enzima Klenow.....1 μ l

La mezcla de dinucleótidos marcados 10x está constituida por: 1 mM de dATP, 1mM de dCTP, 1mM de dGTP, 0,65 mM de dTTP y 0,35 mM de DIG-dUTP.

La mezcla de reacción se sometió a 37°C durante 4 horas. Transcurrido este tiempo, se procedió a parar la reacción con 2 μ l de EDTA 0,2M pH 8,0 y a precipitar la sonda marcada con 75 μ l de etanol frío en presencia de 2,5 μ l de LiCl 4M que se mantuvo a -20°C durante toda la noche. Se centrifugó y el precipitado se lavó con etanol al 70%. Por último se secó y disolvió en 20 μ l de agua bidestilada.

Para la cuantificación, se realizaron soluciones seriadas de un DNA control (Boehringer Mannheim) marcado con digoxigenina con concentraciones que van desde 100 pg/ μ l hasta 0,1 pg/ μ l. Se colocó una gota de 1 μ l de cada uno de los controles sobre una membrana de nylon cargada positivamente, igual volumen de la muestra problema y del control de marcaje. Una vez seca procedimos a la reacción de inmunodetección.

2.2.3. k) Hibridación de DNA fijado sobre membrana de “nylon” cargada positivamente.
(Sambrook y cols. 1989).

Permite asegurar que determinado DNA genómico o un fragmento de DNA producto de PCR, coincide con el esperado, o bien localizar un determinado fragmento de DNA o gen del producto de una digestión enzimática tras una separación de los fragmentos por electroforesis

(Southern blot) o de determinado RNA (Northern blot).

La especificidad de unión entre la sonda y el DNA o RNA a estudio dependerá de los siguientes factores:

- a) Temperatura de hibridación.
- b) Tiempo de hibridación.
- c) Composición del tampón de hibridación.
- d) Composición del tampón de prehibridación.
- e) Temperatura de lavado.
- f) Tiempos de lavado.
- g) Composición del líquido de lavado.

El protocolo seguido fue el siguiente:

Se colocó el tampón de prehibridación en el tubo de reacción del horno de hibridación (Hybridizer HB-2D) calentándolo hasta la temperatura de hibridación (68°C). Se introdujo la membrana con unas pinzas y se mantuvo en continua agitación durante una hora como mínimo, tras lo cual se eliminó el tampón y se sustituyó por 3 ml de tampón de hibridación previamente calentado a 95°C durante 5 minutos y se dejó toda la noche a 68°C en continua agitación. Al día siguiente, se retiró la sonda y se guarda para ser reutilizada. La membrana se lavó 2 veces con 20 ml de SSC 2x, SDS 0,1% durante 5 minutos a temperatura ambiente. Durante este tiempo se calienta en el mismo tubo de hibridación limpio, 10 ml de SSC 0,1x, SDS 0,1% A 68°C.

Una vez realizados los dos primeros lavados, se transfirió la membrana al tubo de hibridación con el segundo líquido de lavado y se dejó durante 15 minutos a 68°C tras lo cual se sustituyó el líquido por otra porción del mismo dejándolo otros 15 minutos. Una vez terminados los lavados se procedió al revelado de la membrana por inmunodetección.

2.2.3. l) Inmunodetección de la sonda.

La membrana tras ser hibridada, se lavó durante 2 minutos con tampón de ácido maleico, tras eliminar todo el tampón, se añadieron entre 10-30 ml de tampón de bloqueo durante 30 minutos en suave agitación. Una vez eliminado este tampón, se añadió el anticuerpo, en 20 ml de tampón de bloqueo que contenía anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (anti-DIG-AP) en una concentración de 150 mU/ml y se mantuvo durante 30 minutos en agitación.

Se eliminó la solución con el anticuerpo y se lavó 2 veces con 20 ml de tampón ácido maleico durante 15 minutos, para quitar los restos de anticuerpo que no se hayan unido específicamente a la digoxigenina. Se equilibró la membrana lavando con 20 ml de tampón de revelado durante 2 minutos. Por último, se añadieron 15 ml de tampón de revelado que contenía los sustratos NBT/BCIP (Boehringer Mannheim), manteniéndolo en la oscuridad e inmóvil hasta que apareció un precipitado de color en el lugar de la membrana donde la sonda estaba presente, para lo cual puede transcurrir desde 5 minutos hasta 1 día.

Una vez terminada la reacción se detuvo con tampón de parada y se secó en la estufa para ser guardado.

2.2.3. m) Investigación de *Dirofilaria repens*.

Las muestras sin microfilaremia , positivas a ELISA y negativas a la PCR e hibridación fueron sometidas a otra PCR utilizando cebadores específicos de *D. Repens*.

Estos cebadores que denominamos R1 y R2 amplifican un fragmento de 176 pb altamente repetitivo del genoma de *D. repens*, correspondiente aproximadamente a un 3% del mismo. (Chandrasekharan y cols., 1994)

La secuencia de nucleótidos de dichos cebadores se muestra a continuación:

R1: 5'- GGTAATCAAATGCCCAAGAACCG-3'

R2: 5'- CATCATTTTCATGGTCTACCGG-3'

La composición en nucleótidos de los cebadores es como sigue:

R 1:

Nucleótidos	Número	%
ADENINA	10	41.7
CITOCINA	6	25.0
GUANINA	5	20.8
TIMINA	3	12.5
ADENINA+TIMINA	13	54.2
CITOCINA+GUANINA	11	45.8

R2:

Nucleótidos	Número	%
ADENINA	4	19.0
CITOCINA	6	28.6
GUANINA	4	19.0
TIMINA	7	33.4
ADENINA+TIMINA	11	52.4
CITOCINA+GUANINA	10	47.6

Estos cebadores fueron servidos liofilizados por Pharmacia Biotech. Estos se llevaron hasta una concentración final de 1,0 μ M con la que se trabajó, obteniéndose la mejor respuesta a dilución 1/16 de ambos cebadores. El montaje de la PCR se hizo igual que con *D. immitis* pero con las siguientes condiciones:

Volumen de reacción:	50 μ l.
Muestra:	50 ng de DNA de las muestras sanguíneas. 0,93 ng de DNA de adulto de <i>D. immitis</i>
Cebadores:	R1: 18,7 n moles R2: 18,7 n moles.
Nucleótidos (dNTP):	200 μ M de cada nucleótido.
Medio de reacción:	5 μ l.tampon PCR 1x.
Taq polimerasa:	2,5 U.

2.2.3.n) Soluciones, tampones.y aparatos empleados.

a)Técnica de ELISA.

* Tampón Carbonato pH 9,6.

Está constituido por una solución A y una solución B. Se vertió A en B hasta la obtención de pH. Se conservó a temperatura ambiente.

Solución A: Na_2CO_3 : 5,3 g/l en 1 litro de agua destilada.

Solución B: NaHCO_3 : 4,2 g/l en 1 litro de agua destilada

* Tampón citrato pH 5,15

Está compuesto por:

A) Ac. Cítrico 0.1M

B) Na_2HPO_4 0.2M

* Tampón fosfato pH 7,2 + 1% BSA + 0,05% Tween 20

b)Extracción de DNA.

* Tampón de lisis: EDTA 0,5M, 10 g/l de Sarkosyl.

* Sarkosyl 10%.

* EDTA 1M pH 8,0.

* Proteinasa K: 20 mg/ml en agua destilada.

* Fenol: Fenol equilibrado y saturado con Tris HCl 0,1M pH 8,0

* Cloroformo:Isoamílico (24:1).

* Fenol:Cloroformo:Isoamílico (25:24:1).

c)Precipitación de DNA.

* Acetato sódico 3M.

* Acetato amónico 10M.

* CILi, 4M

* Isopropanol.

* Etanol al 70%.

d)Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

- * DNA polimerasa: Perkin Elmer 5 U/ μ l.
- * Tampón PCR 10x Perkin Elmer: Tris-HCl 100mM pH 8,3; KCl 0,5M; MgCl₂ 15mM; 0,01% p/v de gelatina.
- * dNTP 10x: mezcla de dATP, dTTP, dGTP, dCTP a una concentración 4 mM de cada uno.

e)Electroforesis en geles de agarosa.

- * Agarosa (ECOGEN).
- * Agarosa Low Melting.
- * Tampón de carga 6x: glicerol 30% (v/v); azul de bromofenol 0,25% (p/v); pH 8,0.
- * Tampón TAE 50x: Tris-HCl 2M pH 7,2; EDTA 50mM pH 8,0.
- * Tampón TAE 1x:
- * Bromuro de etidio: 20 mg/ml.
- * Marcador de peso molecular: 100 Base-Pair Ladder. Pharmacia Biotech.
- * Marcador de peso molecular: λ - Hind III

f)Tranferencia de DNA.

- * Membrana de “nylon” cargada positivamente (Boehringer Mannheim).
- * Papel Whatman 3 MM.
- * Na OH 0,4N.
- * HCl 0,25N.
- * Tampón SSC 20x: NaCl 3M, citrato sódico 0,3M; pH 7,2.
- * SDS 10%.

g) Purificación de fragmentos de DNA

* Tris- Cl, pH = 8,0; 20 mM

* EDTA pH= 8,0; 1mM

h) Marcaje de sondas.

* Hexanucleótidos mix 10x (Boehringer Mannheim).

* Mezcla de dNTP marcados 10x: 1mM dATP, 1mM dCTP, 1mM dGTP, 0,65 mM dTTP y 0,35 mM de 11-DIG-dUTP (Boehringer Mannheim).

* DIG-11-dUTP: Digoxigenina 11-2',3'-deoxiuridin 5'trifosfato 1nmol/ μ l (Boehringer Mannheim).

* Transferasa 3'terminal: 25U/ μ l (Boehringer Mannheim).

* Tampón de transferasa terminal 5x: cacodylate potásico 1M, tris HCl 125 mM, albúmina de suero bovino 1,25 mg/ml pH 6,6 a 25°C.

* Cloruro de cobalto 25 mM.

* DNA control de marcaje: 200 μ g/ml de DNA de homogeneizado de adulto.

i) Hibridación.

* Tampón de hibridación: 5x SSC, 1% solución de bloqueo (p/v), 0,1% N-lauril-sarcosina (p/v), 0,02% SDS (p/v)

* Tampón SSC 20x: NaCl 3M, citrato sódico 0,3M; pH 7,2.

* SDS 10%.

* Sarkosyl 10%.

* Solución de bloqueo 10x en tampón ácido maleico (Boehringer Mannheim).

j) Inmunodetección.

- * DNA marcado control con Digoxigenina.
- * Tampón de ácido maleico o tampón nº 1: ácido maleico 0,1M, NaCl 0,15M; pH 7,5.
- * Solución de bloqueo inmunodetección 10%: Reactivo de bloqueo (BSA) en tampón nº 1 al 10%. (Boehringer Mannheim).
- * Tampón de lavado inmunodetección: tampón nº 1 + Tween 20 al 0,3%.
- * Tampón de bloqueo inmunodetección: solución de bloqueo 10% diluída en tampón nº 1 al 1%.
- * Anti Dig-AP: fragmento Fab de anticuerpos policlonales de oveja anti-digoxigenina 750 U/ml.
- * Tampón de revelado de inmunodetección: tris-HCl 0,1M; NaCl 0,1M; MgCl₂ 0,05M; pH 9,5.
- * Tampón de parada: tris-HCl 10mmol/l; EDTA, 1mmol/l; pH 8,0 NBT nitroblue tetrazolium 75 mg/ml de dimetilformamida al 70% (v/v).
- * x-phosphate: toluidin 5 bromo 4 cloro 3 indolyl fosfato 50 mg/ml en dimetilformamida, 70%.
- * NBT: sal de nitroblue tetrazolium 75 mg/ml en dimetilformamida, 70%.

k) Equipos empleados.

*Termocicladores:

Perkin Elmer 9600

* Suministradores de corriente:

Electrophoresis Power Supply EPS 3500 (Pharmacia Biotech).

Electrophoresis Constant Power Supply ECPS 3000 (Pharmacia Biotech).

*Transiluminador:

ULTRA LUM. Dualight transiluminator.

* Equipo de fotografía:

Gelprinter TDI.

Polaroid.

*Horno de hibridación:

Hybridizer HB-2D Tech.

*Cuantificador de proteínas y ácidos nucleicos:

Gene Quant RNA/DNA Calculator (Pharmacia Biotech) y cubeta de cuarzo de 5 μ l.

* Centrífugas:

Hettich Zentrifugen Universal 16 R. refrigerada.

Micro Centaur. MSE. SANYO.

*Autoclave:

Microclave s-477. P Selecta.

SP32 Yamato.

*PH-metro:

CRISON micropH 2001.

*Balanza de precisión:

Mettler Toledo PB 602.

* Agitadores:

Termolyne Maximix. Sybron.

Vibrosnaker SBS AOS-2001.

*Microondas:

Ignis. AKL IS8. Double emission system.

2.3.- Análisis estadístico de los resultados.

Para realizar este estudio se utilizó una prueba de significación estadística cuyo objetivo es determinar si un estadístico muestral y un parámetro poblacional son o no coherentes o si los resultados de dos o más muestras son o no coherentes. Ello se ve comprobando hipótesis. Se utilizó una prueba no paramétrica por excelencia que es la prueba de χ^2 (Chi- Cuadrado). En términos generales la χ^2 es una medida de la diferencia global entre las frecuencias observadas y las esperadas (las frecuencias que deberían esperarse si no existiera diferencia entre ambas técnicas). Si las frecuencias observadas y esperadas de cada celda son iguales, el valor de χ^2 será cero, y se llega a la conclusión de que no existe diferencia significativa entre las variables cualitativas y la existencia o no de enfermedad y se acepta la hipótesis nula. Cuanto mayores sean las diferencias relativas entre las frecuencias observadas y las esperadas, mayor será el valor de χ^2 y se rechaza la hipótesis nula aceptando la alternativa.

La hipótesis nula asociada a este test afirma que existe independencia entre las variables enfrentadas, mientras que la alternativa afirma la existencia de dependencia, bien de asociación o de rechazo. El desarrollo de χ^2 de contingencias exige una serie de requisitos:

- 1) Las frecuencias esperadas, bajo la hipótesis nula de independencia, han de ser todas superiores a 5.

- 2) En el caso que se quieran estudiar más de dos grupos, al menos el 20% de los datos ha de tener un valor de frecuencia esperada superior a 5. En caso contrario, hay que combinar categorías o aumentar el tamaño del muestreo.

En el cálculo del χ^2 se utilizó la siguiente ecuación:

En dicha ecuación, “O” son los valores o frecuencias observadas y “E” son las esperadas.

El valor de χ^2 es comparado con el de la tabla de distribución de χ^2 para saber si el valor es o no significativo, dado el número de grados de libertad con el que hemos trabajado, teniendo en cuenta que éste es (nº columnas-1) x (nº filas-1). Por otra parte normalmente el valor de χ^2 se expresa con su correspondiente valor de p (probabilidad de que ocurra al azar), cuando se alcanza la significación estadística. Esta significación estadística puede ser significativa (*) cuando p es mayor o igual que 0,01 y menor o igual que 0,05 y muy significativa (**) cuando p es inferior a 0,01. Cuando el valor de la probabilidad de que ocurra al azar (p) es superior a 0,05 entonces nos encontramos con una diferencia estadísticamente no significativa.

Lógicamente, cuantos más compartimentos haya en la tabla, mayor será el número de comparaciones entre frecuencias observadas y esperadas y mayor será el valor de χ^2 . Por esta razón, el hecho de que la diferencia entre las frecuencias observadas y las esperadas sea o no significativa depende no sólo del valor de χ^2 , sino también del número de comparaciones independientes entre las frecuencias observadas y las esperadas.

El número de comparaciones independientes realizadas son los grados de libertad de la prueba. Así pues, una vez calculado el valor de χ^2 , se consulta la tabla de distribución para saber si el valor obtenido es o no significativo, dado el número de grados de libertad con que hemos

trabajado.

Para una mayor precisión de los resultados, se ha usado el programa de análisis epidemiológico EPI-INFO versión 5.01, octubre 1990 (CDC, Atlanta, Georgia, EEUU). Este a su vez contiene el programa STAT CALC el cual está constituido por una calculadora estadística para tablas simples y estratificadas, permitiéndonos determinar el valor de χ^2 (sin corrección) y su correspondiente valor p. Estos datos son suficientes para saber si existe o no asociación entre las variables cualitativas y la presencia o no de enfermedad.

Análisis preliminares bivariantes ponen de manifiesto la importancia de algunas de estas variables en la probabilidad de que el perro esté infestado o no, pero el estudio multivariante de ordenación ofrece una información adicional sobre la importancia relativa de unas variables con respecto a otras en la determinación de la infestación de los perros.

Se pretende además determinar si las muestras de perros que presentan las pruebas analíticas positivas vienen determinadas por unas características ambientales y sociales, con el fin de poner de manifiesto cuáles de estas características van a condicionar a un perro para estar infestado, es decir, el perro con ciertas características como por ejemplo pelaje o hábitat será identificado como un perro con mayor o menor predisponibilidad para estar infestado.

Dado el alto número de datos, una ordenación estadística puede ofrecer información de grupos (que son obtenidos de las variables), los cuales podemos relacionar con una mayor predisponibilidad de estar o no estar infestado.

De todos los datos que tenemos se analizaron los siguientes (todas las variables son categóricas, la mayoría de ellas siguiendo el método de presencia-ausencia):

- Altitud: 1 ó 2 para costa y medianías
- Orientación: 1 para barlovento y 0 para sotavento.
- Pelaje: 1,2 ó 3 para corto, medio o largo.
- Vivienda: 1 si el perro se encuentra en vivienda humana.
- Intemperie: 1 si el perro se encuentra a la intemperie.
- Perrera: 1 si el perro se encuentra en perrera.
- Tratamiento: 1 si el perro sigue algún tratamiento y 0 si no lo sigue.
- Edad: 1,2 ó 3 para cachorro, adulto o viejo.
- Sexo: 1 macho y 0 hembra.
- Residencia: 1 para no rural (semirural y urbano) y 0 para rural.
- “Directo”: 1 si el análisis es positivo y 0 si es negativo.
- ELISA: 1 si el análisis es positivo y 0 si es negativo.

Si lo que estamos buscando es revelar y ordenar las características de los perros que estén infestados, esa ordenación hemos de hacerla con respecto a las variables determinantes de la infestación que son “Directo” y ELISA (variables explicatorias de la variación de los datos). Para ello la ordenación del resto de las variables estará regida por los resultados de las dos pruebas analíticas.

El Análisis de Correspondencia Canónico (CCA, ter Braak 1986) se desarrolló con este fin, para relacionar la variación de un grupo de variables características de los datos con otras

variables conocidas. El resultado es una gráfica con tantos ejes como variables con las cuales queremos relacionar la variación en los datos, pero que en sus primeros ejes absorberá la máxima variación que permita el análisis, dejando el denominado “ruido” (variación natural de los datos o variación no controlada en los métodos de medida) de los datos para el resto de las dimensiones (cada dimensión se relaciona con un eje).

Este análisis ha sido evaluado con respecto a otras pruebas de análisis multivariante y los resultados obtenidos han sido considerados los más satisfactorios a la hora de ordenar datos y recoger más variación (Palmer 1993). Los ejes de esta gráfica pueden ser evaluados con el método de Montecarlo con “x” iteraciones (Sóbol 1983). Este análisis distribuye al azar los datos de las variables y calcula el valor propio de cada iteración. Al final se puede determinar si el valor de los datos reales difiere del valor de los datos distribuidos al azar. De esta manera podremos saber si la ordenación obtenida es fruto del azar o de las variables condicionantes de la ordenación, que jugarían un papel estadísticamente significativo en los resultados. Para estos análisis se usó el programa CANOCO (ter Braak 1987).

En el presente trabajo se utilizó como matriz biótica las características de los perros (matriz donde aparecen los valores de las variables que vamos a analizar) y como matrices ambientales la prueba de “Directo” y la prueba de ELISA (siguiendo la terminología usada por el programa). Estas dos matrices recogen cada una la información de las pruebas analíticas, siendo 1 para el caso de que fuera positiva y 0 en el caso de que fuera negativa. Puesto que tenemos tan sólo una variable explicatoria (“Directo” o ELISA), sólo se obtuvo un eje en la ordenación (los demás ejes que aporta el programa por defecto son información residual). En cada eje se dispusieron las variables según su coordenada obtenida en la ordenación. Puesto que se

realizaron dos análisis, obtuvimos dos ejes diferentes que hemos representado conjuntamente para facilitar el estudio conjunto.

Una vez obtenidos los resultados de las coordenadas de las variables en los dos análisis, determinamos el coeficiente de correlación entre las coordenadas de las variables de ambos ejes utilizando un análisis de correlación no paramétrico, el coeficiente de correlación de Kendall (Zar, 1984), puesto que estamos interesados más en el orden de las variables en el eje que de su valor en sí.

III.- RESULTADOS Y DISCUSION.

III. - RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Con el fin de expresar más claramente los resultados, se han elaborado unos cuadros donde se expone detalladamente lo obtenido, teniendo en cuenta las variables de edad, sexo, residencia, pelaje, hábitat, tratamiento, raza, altitud y orientación, de las 1919 muestras, tanto con el diagnóstico microscópico (el que denominamos “Directo”) como por el diagnóstico inmunológico (ELISA) y por la técnica de PCR. Así mismo, se exponen los datos del estudio estadístico realizado.

En los Anexos 1 y 2 se presentan los datos extraídos del programa estadístico empleado, y en el Anexo 3, los resultados y datos obtenidos de cada uno de los perros analizados.

3.1 Edad

En el cuadro 3.i (a) se puede ver que el 15,8% del total de perros analizados por la técnica microscópica, presentaban microfilarias en sangre periférica, mientras que por el diagnóstico inmunológico, el 60,8% de los analizados, presentaron anticuerpos frente a *Dirofilaria immitis*.

	Nº TOTAL MUESTRAS	POSITIVOS DIRECTO	POSITIVOS ELISA
CACHORRO	266	8 (3,0%)	136 (51,1%)
ADULTO	1322	208 (15,7%)	835 (63,2%)
VIEJO	331	87 (26,3%)	197 (59,5%)
TOTAL	1919	303 (15,8%)	1168 (60,8%)

Cuadro 3.i (a). Edad.

Es de resaltar, que de las 303 muestras que presentaban microfilaremia, sólo a 199 (65,7%) se le detectaron anticuerpos circulantes y 104 (34,3%) dieron negativo a la técnica de ELISA.

El diagnóstico microscópico tanto directo como con los métodos de concentración (Knott y filtración) son relativamente sencillos pero de dudosa sensibilidad (Martini y cols., 1991). Las parasitaciones por vermes de un solo sexo, los períodos de incubación, en general las dirofilariosis ocultas y las bajas parasitemias, son frecuentes causas de falsos negativos. El diagnóstico inmunológico encaminado a la búsqueda de anticuerpos frente a *D. immitis*, no ha sido la solución definitiva. En primer lugar, las posibles reacciones cruzadas con parásitos intestinales del perro y con otras filarias (Konno y col., 1995, Grieve, 1990) obliga a una cuidadosa selección del antígeno y de las diluciones del suero. En segundo lugar, la respuesta inmune del hospedador varía a lo largo del tiempo pudiendo incluso llegar a suprimirse. La cantidad de anticuerpos circulantes es mayor en los perros con dirofilariosis oculta y en período de prepatencia que en los que presentan microfilaremia. (Scholtens y cols., 1983). La presencia de una importante cantidad de antígeno, permanentemente en contacto con el sistema inmune, hace que disminuyan los anticuerpos circulantes, llegando a negativizarse la reacción. (Wong, 1964; Weiner y Bradley, 1972; Weil y cols., 1981; Pacheco, 1966). Independientemente de las posibles deficiencias que en el sistema inmune pudiera tener el animal, esto explica que mientras la presencia de microfilarias en sangre periférica aumenta con la edad, (cuadro 3.i), los perros viejos dan menos positivos a ELISA que los adultos. Redundando en el tema, se ha observado que del total de perros analizados, con presencia de microfilarias en sangre periférica y sin presentar respuesta de anticuerpos, el 1,1% eran cachorros, el 5,3% adultos y el 8,7% viejos, lo que confirma lo expuesto anteriormente.

OBSERVADO (DIRECTO)

	Positivo	Negativo	Total
Cachorro	8	258	266
Adulto	208	1114	1322
Viejo	87	244	331
Total	303	1616	1919

ESPERADO (DIRECTO)

	Positivo	Negativo	Total
Cachorro	42	224	266
Adulto	209	1113	1322
Viejo	52	279	331
Total	303	1616	1919

Cuadro 3.i (b). Edad "Directo"

En la edad, con respecto a la visualización directa de las microfilarias tenemos que, de 266 cachorros estudiados, 8 (3%) presentaban microfilarias en sangre periférica. De 1322 perros adultos estudiados presentaban microfilarias, 208 (15,7%). De 331 perros catalogados como viejos, tenían microfilaremia 87 (26,3%)

Se obtuvo un valor de $\chi^2=60,10$ con 2 grados de libertad y un valor de $p=0,00000000$ siendo por tanto significativo (**), demostrándose la dependencia de la edad con la posibilidad de ser infestado.

Esto es lógico ya que la maduración sexual del parásito no se alcanza hasta después de los 6 meses, de haber sido inoculado por el mosquito, no presentándose hasta entonces microfilaremia.

OBSERVADO (ELISA)

	Positivo	Negativo	Total
Cachorro	136	136	266
Adulto	835	487	1322
Viejo	197	134	331

ESPERADO (ELISA)

Total	1168	751	1919
	Positivo	Negativo	Total
Cachorro	161,9	104,1	266
Adulto	804,6	517,4	1322

Viejo		201,5		129,5		331	Total		1168		751		1919
-------	--	-------	--	-------	--	-----	-------	--	------	--	-----	--	------

Cuadro 3.i c. Edad ELISA

De 266 cachorros, 136 (51,1%) presentaban anticuerpos contra *D. immitis*. De 1322 adultos, 835 (63,2%) eran seropositivos. Y por último, de 331 perros viejos, 197 (59,5%) eran positivos.

Se obtuvo un valor de $\chi^2=13,77$ con dos grados de libertad y un valor de la probabilidad de que ocurra al azar de $p= 0,00102368$ siendo por tanto significativo (**), estadísticamente significativo, rechazándose la hipótesis nula y aceptándose la alternativa donde existe dependencia de la edad del perro también con la respuesta inmunológica.

La edad representa para diversos investigadores, un factor muy importante (Selby y cols., 1980). En animales menores de un año es raro que se detecte la infestación. Considerando que de esta parasitosis el vector es estacional, con un período de vuelo limitado a las épocas cálidas, y que el parásito tiene una prepatencia de 6 a 7 meses, un perro menor de un año es muy infrecuente que pueda albergar vermes adultos, sin embargo, sí es posible que tenga microfilarias en su sangre si la madre estaba infestada en la gestación. Transmisión transplacentaria de las microfilarias que fue demostrada por Mantovani y Jackson (1966) y que, aunque parece producirse raramente, convierte al cachorro en un portador de estas microfilarias.

Beugnet y cols., (1994) también encontraron correlación entre la edad de los perros y la prevalencia, 7,7% (de perros de 6 meses-1 año), 33,3% (perros de 1-2 años), 53% (perros de 2-3 años), 77,4% (perros 3-5 años) y 80% (perros con más de 5 años). Los estudios de regresión mostraron que la relación no era lineal, y la edad no tenía un simple efecto acumulativo.

3.2., Sexo

Respecto al sexo, se puede ver que las hembras dan un índice de parasitación (16,6%) ligeramente superior al que dan los machos (13,6%).

	Nº TOTAL MUESTRAS	POSITIVOS DIRECTO	POSITIVOS ELISA
MACHO	530	72 (13,6%)	292 (55,1%)
HEMBRA	1389	231 (16,6%)	876 (63,1%)
TOTAL	1919	303 (15,8%)	1168 (60,8%)

Cuadro 3.ii (a). Sexo

OBSERVADO (DIRECTO)

	Positivo	Negativo	Total
Macho	72	458	530
Hembra	231	1158	1389
Total	303	1616	1919

ESPERADO (DIRECTO)

	Positivo	Negativo	Total
Macho	83,7	446,3	530
Hembra	219,3	1169,7	1389
Total	303	1616	1919

Cuadro 3.ii (b). Sexo "Directo".

En la visualización directa se encontró que de un total de 530 machos estudiados, 72 (13,6%) fueron positivos. De un total de 1389 hembras estudiadas, 231 (16,6%) tenían microfilarias en sangre periférica.

Se obtuvo un χ^2 (no corregido)=2,68 con un grado de libertad y un valor de p=0,1018416 siendo por tanto no significativo estadísticamente.

OBSERVADO (ELISA)

	Positivo	Negativo	Total
Macho	292	238	530
Hembra	876	513	1389
Total	1168	751	1919

ESPERADO (ELISA)

	Positivo	Negativo	Total
Macho	322,6	207,4	530
Hembra	845,4	543,6	1389
Total	1168	751	1919

Cuadro 3.ii (c). Sexo ELISA

Con respecto a la respuesta inmunológica, de 530 perros machos, 292 (55,1%) dieron positivo. De 1389 hembras analizadas, tenían anticuerpos contra *D. immitis* 876 (63,1%).

Se obtuvo un $\chi^2=10,24$ con un grado de libertad y un $p= 0,0013765$, siendo por tanto significativo (**), rechazándose la hipótesis nula y aceptando la alternativa, en la que existe dependencia del sexo con respecto a la respuesta inmunológica.

En repetidas ocasiones se ha observado que en los machos la incidencia de la dirofilariosis es mayor que en las hembras. La influencia del sexo en la receptividad a esta infestación ha sido investigada pero no se han podido establecer causas concluyentes. La mayor prevalencia en los machos, indicada en algunos estudios, puede ser debida a una mayor exposición de los machos al vector por su mayor tendencia a vagar o por una mayor utilización de éstos para competición y caza (Selby y cols.,1980). Aunque en el tema de la caza, en Canarias las cuadrillas de perros de caza están compuestas más comunmente por hembras. Wright y col. (1989) observaron en su estudio que se infestaron un 16% más de machos que de hembras. Los trabajos realizados por Nzabanita y cols. (1982) y por Walters y Lavoipierre (1984) sugieren que los estrógenos podrían conferir un cierto grado de

protección a las hembras, al detectar prevalencias significativamente mayores en machos y en hembras histerectomizadas que en hembras con un desarrollo sexual normal. En opinión de estos autores, estas hormonas podrían ser responsables de una activación de la respuesta inmune y/o de un retraso importante en el desarrollo del parásito, como se ha demostrado en infestaciones por otros nematodos (Dobson, 1964).

Los resultados obtenidos por nosotros contradicen en parte lo manifestado por los mencionados autores. En nuestro estudio las hembras están ligeramente más parasitadas que los machos, aunque los resultados no sean significativos estadísticamente en un estudio por microscopía y si lo sean en la respuesta inmune. Quizás intervenga de forma importante el mayor uso que en Canarias se realiza de las hembras en determinadas tareas. De todas formas, salvo por lo manifestado sobre el desarrollo hormonal, no parece coherente el que se presenten diferencias importantes en cuanto a los índices de parasitación respecto al sexo.

Nuestros estudios están más acordes a lo manifestado por Okamoto y cols., que estudiaron la prevalencia de *D. immitis* entre 1988 y 1994. De los perros examinados, 227 (59%) se infestaron con *D. immitis*. Ambos sexos se infestaron igualmente y no se observaron cambios significativos en el porcentaje de prevalencia anual. Así mismo, la prevalencia aumentó con la edad del hospedador, en concordancia con el primer apartado expuesto por nosotros.

3.3.- Residencia

En el estudio de esta variable se ha tenido en cuenta el carácter rural y no rural de la residencia de los animales analizados. En la residencia no rural, se ha incluido la semirural y urbana, ya que las particularidades geográficas urbanísticas de Tenerife, en muchos casos impedía diferenciar claramente entre ambas”.

A continuación se muestran los resultados obtenidos considerando esta variable.

	N° TOTAL MUESTRAS	POSITIVOS DIRECTO	POSITIVOS ELISA
RURAL	187	23 (12,3%)	122 (65,2%)
NO RURAL	1732	280 (16,2%)	1046 (60,4%)
TOTAL	1919	303 (15,8%)	1168 (60,8%)

Cuadro 3.iii (a). Residencia.

OBSERVADO (DIRECTO)

	Positivo	Negativo	Total
Rural	23	164	187
No rural	280	1452	1732
Total	303	1616	1919

ESPERADO (DIRECTO)

	Positivo	Negativo	Total
Rural	29,5	157,5	187
No rural	273,5	1458,5	1732
Total	303	1616	1919

Cuadro 3.iii (b). Residencia "Directo".

De 187 perros a los que se tomaron muestras en zona rural, 23 (12,3%) presentaban microfilaremia. De 1732 perros analizados en zona no rural 280 (16,2%) presentaban microfilarias en sangre periférica y 1452 (83,8%) no las presentaban.

Se obtuvo un $\chi^2=1,90$ con dos grados de libertad y un valor de $p=0,1683066$ siendo no significativo y en consecuencia se acepta la hipótesis nula, rechazándose la alternativa. no existiendo, según estos resultados, dependencia de la residencia en la parasitosis. Esto contradice la mayoría de los trabajos consultados, pero en nuestros resultados debemos de destacar que el 31,5% de los perros en zona rural se les había administrado tratamiento

preventivo mientras que de los perros ubicados en zonas no rurales, sólo el 13,8% habían recibido dicho tratamiento.

OBSERVADO (ELISA)

	Positivo	Negativo	Total
Rural	122	65	187
No rural	1046	686	1732
Total	1168	751	1919

ESPERADO (ELISA)

	Positivo	Negativo	Total
Rural	113,8	73,2	187
No rural	1054,2	677,8	1732
Total	1168	751	1919

Cuadro 3.iii (c). Residencia ELISA

Con respecto a los resultados obtenidos con la aplicación de la técnica de ELISA tenemos que de 187 perros investigados en zona rural, 122 (65,2%) presentaron anticuerpos. De los analizados en zona no rural, que fueron 1732, 1046 (60,4%) tenían anticuerpos positivos.

Se obtuvo un valor de $\chi^2=1,67$ con dos grados de libertad y un valor de $p=0,19688788$, demostrándose con ello no ser significativo por lo que no existe una dependencia de la residencia del perro en la respuesta inmunitaria.

Estos datos no contradicen lo anterior, pues el tratamiento preventivo no impide el contacto con el parásito sino el desarrollo del mismo, creándose por tanto la respuesta inmune.

3.4.-Tipo de Pelaje.

Para el estudio de esta variable se han clasificado los animales en tres categorías dependiendo del tipo de capa, pelo largo, medio y corto.

En este cuadro se expresan los resultados obtenidos con relación al pelaje de los animales.

	N° TOTAL MUESTRAS	POSITIVOS DIRECTO	POSITIVOS ELISA
CORTO	1399	232 (16,6%)	868 (62,0%)
LARGO	244	41 (16,8%)	144 (59,0%)
MEDIO	276	30 (10,9%)	156 (56,5%)
TOTAL	1919	303 (15,8%)	1168 (60,8%)

Cuadro 3.iv (a). Tipo de pelaje.

OBSERVADO (DIRECTO)

	Positivo	Negativo	Total
Corto	232	1167	1399
Largo	41	203	244
Medio	30	246	276
Total	303	1616	1919

ESPERADO (DIRECTO)

	Positivo	Negativo	Total
Corto	220,9	1178,1	1399
Largo	38,5	205,5	244
Medio	43,6	232,4	276
Total	303	1616	1919

Cuadro 3.iv (b). Tipo de pelaje "Directo".

De 1399 perros analizados con pelo corto, 232 (16,6%) presentaban microfilaremia., de 244 con pelo largo, la presentaban 41(16,8%) y en lo referente a los de pelo medio, tenemos que de 276 perros, 30 (10,9%) eran positivos al análisis.

Se calculó el χ^2 obteniéndose un valor de 5,88 con dos grados de libertad y una probabilidad de que ocurra al azar de $p=0,05297011$ siendo por lo tanto no significativo.

OBSERVADO (ELISA)				ESPERADO (ELISA)			
	Positivo	Negativo	Total		Positivo	Negativo	Total
Corto	868	531	1399	Corto	851,5	547,5	1399
Largo	144	100	244	Largo	148,5	95,5	244
Medio	156	120	276	Medio	168	108	276
Total	1168	751	1919	Total	1168	751	1919

Cuadro 3.iv (c). Tipo de pelaje ELISA.

Con respecto a los resultados del pelaje en ELISA, tenemos que de 1399 perros con pelaje corto, 868 (62,0%) presentaban anticuerpos frente al parásito, de 244 perros de pelo largo, 144 (59,0%) eran seropositivos y por último de 276 con pelo medio, 156 (56,5%) tenían anticuerpos.

Se obtuvo un valor para χ^2 de 3,35 con dos grados de libertad y un valor de $p=0,18705469$ siendo por tanto no significativo. Con esto concluimos que el tamaño del pelo de los animales analizados no influye de manera significativa en el porcentaje de infestación.

Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en otros trabajos (Grieve y cols., 1983; Walters y Lavoipierre, 1984) y a primera vista pueden resultar contrarios a lo esperado ya que el pelo largo podría resultar un obstáculo para la picadura de los vectores. No hemos encontrado una explicación totalmente satisfactoria, sin embargo hay que tener en cuenta que probablemente gran parte de las transmisiones de la parasitosis ocurren en horas nocturnas cuando los animales duermen y exponen su vientre que es pobre en pelo en casi cualquier tipo de perro.

3.5.- Habitat.

Esta variable está referida a las condiciones donde los animales pernoctan y en general llevan a cabo su actividad normal.

En el cuadro 3v (a) se presentan los resultados de los porcentajes de parasitación según el hábitat del perro, ubicándolos en vivienda humana, intemperie y perrera, sin tener en cuenta la ubicación rural o no rural del animal.

	N° TOTAL MUESTRAS	POSITIVOS DIRECTO	POSITIVOS ELISA
VIVIENDA HUMANA	182	3 (1,6%)	81 (44,5%)
INTEMPERIE	183	26 (14,2%)	90 (49,2%)
PERRERA	1554	274 (17,6%)	997 (64,2%)
TOTAL	1919	303 (15,8%)	1168 (60,8%)

Cuadro 3.v (a). Habitat

OBSERVADO (DIRECTO)

	Positivo	Negativo	Total
V. humana	3	179	182
Intemperie	26	157	183
Perrera	274	1280	1554
Total	303	1616	1919

ESPERADO (DIRECTO)

	Positivo	Negativo	Total
V. humana	28,7	153,3	182
Intemperie	28,9	154,1	183
Perrera	245,4	1308,6	1554
Total	303	1616	1919

Cuadro 3.v (b). Habitat "Directo".

Con respecto a los resultados obtenidos por visualización directa, tenemos que de 182 perros estudiados que vivían en vivienda humana, 3 (1,6%) estaban parasitados, de 183

que se encontraban en la intemperie, 26 (14,2%) estaban parasitados y de los 1554 perros que se encontraban en perreras, estaban parasitados 274 (17,6%).

Se obtuvo un valor de $\chi^2=31,68$ con dos grados de libertad y un valor de probabilidad de que ocurra al azar $p= 0,00000013$ rechazándose entonces la hipótesis nula y aceptando la alternativa de que existe dependencia del hábitat con la parasitosis.

OBSERVADO (ELISA)

	Positivo	Negativo	Total
V. humana	81	101	182
Intemperie	90	93	183
Perrera	997	557	1554
Total	1168	751	1919

ESPERADO (ELISA)

	Positivo	Negativo	Total
V. humana	110,8	71,2	182
Intemperie	111,4	71,6	183
Perrera	945,8	608,2	1554
Total	1168	751	1919

Cuadro 3.v (c). Habitat ELISA.

Con respecto a la técnica de ELISA tenemos que de 182 perros estudiados, habitando en vivienda humana, 81 (44,5%) dieron anticuerpos positivos. De 183 perros que se encontraban en la intemperie, 90 (49,2%) eran positivos. De 1554 perros que habitaban en perreras, 997 (64,2%) dieron respuesta positiva a los anticuerpos. Se obtuvo un valor de $\chi^2=38,01$ con dos grados de libertad y un valor $p= 0,00000001$ siendo por tanto significativo (**), existiendo dependencia del hábitat del perro en los resultados observados de la respuesta inmunológica.

Se pone de manifiesto la importancia que tiene la vivienda en la prevalencia de la parasitosis. El vivir en perrera, es un factor de riesgo superior a vivir a la intemperie, hecho

que está en concordancia con el corto radio de acción de los posibles vectores voladores que tienen facilidades de repetir alimentación en un espacio reducido.

3.6.- Raza

Dado que considerar cada una de las razas representadas en la muestra supondría una gran variabilidad y considerando que gran parte de la muestra está constituida por animales mestizos se optó por agrupar los perros analizados por el tamaño del animal según la clasificación hecha por Goldston (1989).

Es de resaltar en el cuadro 3.vi (a), que del total de animales muestreados de raza pequeña (73), ninguno presentaba microfilarias en sangre periférica y 17 (23,3%) daban positividad en ELISA. De estos 17 animales con “Directo” negativo y ELISA positivo, ninguno estaba en tratamiento, la mayoría vivía en vivienda humana(10), 5 a la intemperie y 2 en perrera, todos pertenecen a zona no rural, que precisamente como ya habíamos comentado son los menos que habían recibido tratamiento preventivo.

	Nº TOTAL MUESTRAS	POSITIVOS DIRECTO	POSITIVOS ELISA
GRANDE	25	2 (8%)	16 (64%)
MEDIANA	1821	301 (16,5%)	1135 (62,3%)
PEQUEÑA	73	0 (0%)	17 (23,3%)
TOTAL	1919	303 (15,8%)	1168 (60,8%)

Cuadro 3.vi (a). Raza.

OBSERVADO (DIRECTO)

	Positivo	Negativo	Total
Grande	2	23	25
Mediana	301	1520	1821
Pequeña	0	73	73

ESPERADO (DIRECTO)

Total	303	1616	1919
	Positivo	Negativo	Total
Grande	4,0	21,0	25
Mediana	287,5	1533,5	1821

Pequeña		11,5		51,5		73		Total		303		1616		1919
---------	--	------	--	------	--	----	--	-------	--	-----	--	------	--	------

Cuadro 3.vi (b). Raza "Directo".

De un total de 25 perros grandes, se les observó microfilarias en sangre periférica a 2 (8%). De los 1821 perros de raza mediana, 301 (16,5%) presentaban microfilaremia, de los 73 perros analizados de raza pequeña no se les observó microfilarias a ninguno. Se obtuvo $\chi^2=15,58$ con dos grados de libertad y un valor de $p=0,00041425$ siendo por consiguiente muy significativo (**), existiendo entonces una dependencia de la raza con la incidencia en la parasitación.

OBSERVADO (ELISA)

	Positivo	Negativo	Total
Grande	16	9	25
Mediana	1135	686	1821
Pequeña	17	56	73
Total	1168	751	1919

ESPERADO (ELISA)

	Positivo	Negativo	Total
Grande	15,2	9,8	25
Mediana	1108,4	712,6	1821
Pequeña	44,4	28,6	73
Total	1168	751	1919

Cuadro 3.vi (c). Raza ELISA.

Con respecto a la técnica de ELISA se encontró que de 25 perros grandes, 16 (64%) eran seropositivos, de 1821 perros de raza mediana 1135 (62,3%) tenían anticuerpos y de los 73 perros de raza pequeña estudiados, 17 (23,3%) tenían anticuerpos. El valor obtenido de χ^2 fue 45,02 con dos grados de libertad y un valor $p=0,00000000$ siendo por tanto significativo (**).

La significación encontrada en cuanto al tamaño del animal, tiene una explicación clara teniendo en cuenta el tipo de vivienda. El perro pequeño suele ser el animal de compañía y además precisamente por su tamaño habitan en vivienda humana.

Podría pensarse que dada la multiplicidad de tipos de perros, determinados factores relativos a ella podrían tener alguna influencia en la receptividad a la infestación. Sin embargo, las investigaciones de diversos autores indican que la raza o factores relativos a ella, como el tipo de capa o el tamaño del animal, no tienen ninguna influencia en el riesgo de infestación (Grieve y cols., 1983; Walters y Lavoipierre, 1984). Sin embargo en el estudio realizado por nosotros reflejamos la dependencia de la raza con la incidencia en la parasitación, tanto a nivel de visualización directa como respuesta inmunológica por parte del perro. Así, las altas prevalencias que pueden encontrarse en determinadas razas de perros (ej: galgo, pastor alemán, podenco, presa canario, etc.) están relacionadas con un mayor riesgo de exposición al mosquito vector debido al tipo de actividad que realizan (caza, competición, guardia, pastoreo, etc.) y a los frecuentes desplazamientos a que son sometidos.

3.7. Altitud.

Tenerife, a diferencia de otras islas del Archipiélago, como es sabido, tiene un gran gradiente de altitud, de tal manera que en pocos kilómetros se pasa de 0 a más de 3.000 m. Para determinar las posibles variaciones de la prevalencia de la dirofilariosis con respecto a la altitud se clasificó la muestra en dos categorías: costa (muestras recogidas aproximadamente entre 0 y 100 m) y medianías (correspondientes a cotas entre 100 y 1.500 m aproximadamente).

	Nº TOTAL MUESTRAS	POSITIVOS DIRECTO	POSITIVOS ELISA
COSTA	269	48 (17,8%)	163 (60,6%)
MEDIANIAS	1650	255 (15,5%)	1005 (60,9%)
TOTAL	1919	303 (15,8%)	1168 (60,9%)

Cuadro 3.vii (a). Altitud.

OBSERVADO (DIRECTO)

	Positivo	Negativo	Total
Costa	48	221	269
Medianías	255	1395	1650
Total	303	1616	1919

ESPERADO (DIRECTO)

	Positivo	Negativo	Total
Costa	42,5	226,5	269
Medianías	260,5	1389,5	1650
Total	303	1616	1919

Cuadro 3.vii (b). Altitud "Directo".

En el cuadro 3. Vii b se observa que de 269 perros que estaban ubicados en zona de costa, 48 de ellos (17,8%) presentaban microfilaremia. De 1650 perros ubicados en la zona de medianías 255 (15,5%) eran positivos a este análisis.

Al efectuar el cálculo de χ^2 teniendo en cuenta 1 grado de libertad se obtuvo: $\chi^2=0,99$ con un valor-p= 0,3189 por lo que con este resultado se concluye que no es significativo, no existiendo dependencia de la altitud con la parasitosis.

OBSERVADO (ELISA)

	Positivo	Negativo	Total
Costa	163	106	269
Medianías	1005	645	1650
Total	1168	751	1919

ESPERADO (ELISA)

	Positivo	Negativo	Total
Costa	163,7	105,3	269
Medianías	1004,3	645,7	1650
Total	1168	751	1919

Cuadro 3.vii (c). Altitud ELISA.

Con respecto a los resultados observados con la técnica de ELISA tenemos, que de 269 perros en zona de costa, 163 (60,6%) presentaban anticuerpos y de 1650 situados en medianías, 1005 (60,9%) eran positivos.

El valor obtenido en las tablas referentes a ELISA de χ^2 fue de 0,01, un grado de libertad y el valor de $p= 0,9219814$, no siendo estadísticamente significativo, aceptándose la hipótesis nula, no existiendo por tanto, dependencia entre la altitud y la seropositividad.

Estos resultados son totalmente inesperados, ya que es sabido que en toda la isla diferencias considerables de altitud conllevan variaciones importantes en una serie de condiciones como temperatura y humedad que deben incidir tanto en los vectores como en el desarrollo del parásito en los mismos. No obstante, de las once especies de culícidos aceptadas como residentes en Canarias (Baez y Fernández, 1980) son muchas de las que se han capturado ejemplares en muy diferentes cotas de altitud en la isla de Tenerife, tanto en barlovento como en sotavento: *Culex (Culex) theileri*; (0-2.100 m); *C.(C.) pipiens* (0-1.900 m); *C.(C.) laticintus* (0-2.100 m) ; *C.(Maillotia) arbieeni* (0-1.100 m); *Culiseta (Allotheobaldia) longiareolata* (0-2.000 m); y *Anopheles (Cellia) cinereus hispaniola* (0.2.100 m) (Baez, 1987). Por tanto, el papel de vector de la dirofilariosis canina en Tenerife puede otorgarse a una o más de estas especies. De cualquier manera para justificar los resultados obtenidos referentes a la altitud será necesario realizar estudios complementarios que determinen la especie o especies responsables de la transmisión, así como la densidad de población y hábitos de picadura de estos dípteros.

3.8.- Orientación.

La situación (orientación) del lugar donde viven los animales analizados es una variable con cierta relación con la anterior. Se han agrupado las muestras dependiendo de que procedan de zonas expuestas a los vientos alizos, predominantes en Canarias (barlovento) o de zonas protegidas a dichos vientos (sotavento). Aunque no es general en todo el Archipiélago, esas zonas corresponden en Tenerife respectivamente, a la vertiente Norte y Sur de la isla.

	N° TOTAL MUESTRAS	POSITIVOS DIRECTO	POSITIVOS ELISA
BARLOVENTO	1434	185 (12,9%)	863 (60,2%)
SOTAVENTO	485	118 (24,3%)	305 (62,9%)
TOTAL	1919	303 (15,8%)	1168 (60,8%)

Cuadro 3.viii (a). Orientación.

OBSERVADO (DIRECTO)

	Positivo	Negativo	Total
Barlovento	185	1249	1434
Sotavento	118	367	485
Total	303	1616	1919

ESPERADO (DIRECTO)

	Positivo	Negativo	Total
Barlovento	226,4	1207,6	1434
Sotavento	76,6	408,4	485
Total	303	1616	1919

Cuadro 3.viii (b). Orientación "Directo".

Con respecto a la orientación, tenemos que de 1434 perros de barlovento, 185 (12,9%) presentaban microfilarias en sangre. En la zona de sotavento, de un total de 485 perros, 118 (24,3%) presentaban microfilarias. Se obtuvo un $\chi^2=35,60$, un grado de libertad y un valor de $p= 0,00000000$ con lo que se demuestra que es esta diferencia altamente significativa (**). Existe clara dependencia de barlovento y sotavento con respecto a la parasitosis.

OBSERVADO (ELISA)

	Positivo	Negativo	Total
Barlovento	863	571	1434
Sotavento	305	180	485

ESPERADO (ELISA)

Total	1168	751	1919
	Positivo	Negativo	Total
Barlovento	872,8	561,2	1434

Sotavento		295,2		189,8		485	Total		1168		751		1919
-----------	--	-------	--	-------	--	-----	-------	--	------	--	-----	--	------

Cuadro 3.viii (c). Orientación ELISA.

En los resultados observados en ELISA, de 1434 perros de la zona de barlovento se ve que 863 (60,2%) presentaban anticuerpos y de 485 de la zona de sotavento presentaban dichos anticuerpos 305 (62,9%). Se obtuvo un $\chi^2=1,11$ con un grado de libertad y un valor de $p= 0,2913115$ demostrándose que no es estadísticamente significativo, aceptándose la hipótesis nula, por lo que no existe dependencia con las variables estudiadas (barlovento y sotavento).

La isla aunque de pequeñas dimensiones, tiene una considerable diversidad climática que presentan diferencias máximas entre las zonas expuestas a los vientos predominantes del noreste (barlovento) y las zonas protegidas (sotavento). Esto hace que las zonas de sotavento disfruten de temperaturas más elevadas durante todo el año. La mayor escasez de lluvia en esta zona está compensada por la existencia de gran cantidad de pequeños y grandes embalses que garantizan las necesidades de ciertas especies de culícidos que pueden estar involucrados en la transmisión de la dirofilariosis canina.

Todo ello puede justificar mayor prevalencia de microfilaremia en las zonas de sotavento con respecto a las de barlovento. No hemos encontrado ninguna evidencia que explique de manera totalmente satisfactoria la independencia de la zona muestreada (sotavento o barlovento) cuando la técnica analítica utilizada es ELISA. No obstante, hay que señalar que existe una diferencia importante entre los porcentajes de perros que reciben tratamiento preventivo en ambas zonas de la isla, que puede provocar parte de esta diferencia.

3.9.-Tratamiento preventivo.

El uso de ciertos medicamentos en el tratamiento preventivo de la dirofilariosis canina es cada vez mayor. Sin embargo, no está totalmente generalizado y dado que es un tratamiento de relativo alto costo no está distribuido homogéneamente entre la población canina de la isla de Tenerife. Esto puede provocar sesgos en el muestreo que serán corregidos cuando se estudien todas las variables conjuntamente.

	Nº TOTAL MUESTRAS	POSITIVOS DIRECTO	POSITIVOS ELISA
CON TRATAMIENTO	299	9 (3,0%)	172 (57,5%)
SIN TRATAMIENTO	1620	294 (18,1%)	96 (61,5%)
TOTAL	1919	303 (15,8%)	1168 (60,8%)

Cuadro 3.ix (a). Tratamiento Preventivo.

OBSERVADO (DIRECTO)

	Positivo	Negativo	Total
Con trat	9	290	299
Sin trat.	294	1326	1620
Total	303	1616	1919

ESPERADO (DIRECTO)

	Positivo	Negativo	Total
Con trat.	47,2	251,8	299
Sin trat	255,8	1364,2	620
Total	303	1616	1919

Cuadro 3.ix (b). Tratamiento Preventivo "Directo".

Con respecto al tratamiento vemos que de los perros estudiados, 299 que estaban tratados, 9 (3%) presentaban microfilarias en sangre periférica. De 1620 perros que no estaban tratados, 294 (18,1%) eran positivos.

Se obtuvo un valor de χ^2 (no corregido)=43,50 para un grado de libertad y un valor $p= 0,00000000$ siendo por tanto significativo (**) y existiendo por tanto influencia del tratamiento preventivo en la parasitación.

OBSERVADO (ELISA)				ESPERADO (ELISA)			
	Positivo	Negativo	Total		Positivo	Negativo	Total
Con trat	172	127	299	Con trat	181,9	117	299
Sin trat	996	624	1620	Sin trat	986,1	634	1620
Total	1168	751	1919	Total	1168	751	1919

Cuadro 3.ix (c). Tratamiento Preventivo. ELISA

En ELISA observamos que de 299 perros tratados dan respuesta de anticuerpos 172 (57,5%) y de los 1620 perros no tratados, dan la respuesta 996 (61,5%).

Se obtuvo un valor de $\chi^2=1,66$ con un grado de libertad y un valor de $p= 0,1977735$ viéndose que no es significativo, por lo que se acepta la hipótesis nula, no existiendo entonces influencia del tratamiento en la presencia de anticuerpos detectados por la técnica de ELISA.

Entre 1985-87 se realizó un estudio sobre *Dirofilaria immitis* en la isla de Tenerife (Valladares y cols., 1987). Dado que una diferencia importante entre aquel año y la actualidad es la aplicación del tratamiento preventivo, hemos querido ver la influencia que éste ha tenido sobre la enfermedad separando las zonas rurales y zona no rurales para hacer comparables los muestreos .

ZONAS RURALES (OBSERVADO)

	Positivo	Negativo	Total
1985-87	96	61	157
1995-97	23	164	187
TOTAL	119	225	344

ZONAS RURALES (ESPERADO)

	Positivo	Negativo	Total
1985-87	54,3	102,7	157
1995-97	64,7	122,3	187
TOTAL	119	225	344

Cuadro 3.ix (d). Tratamiento Preventivo. Zonas Rurales (Comparativa).

Se observa que en el año 1985-87 de un total de 157 perros que se estudiaron en zonas rurales, 96 (61,15%) presentaban microfilarias en sangre periférica. En el año 1995-97, de 187 perros estudiados en zonas rurales, 23 (12,3%) presentaban las microfilarias. Se obtuvo el valor χ^2 (no corregido)= 90 y un valor de $p= 0,00000000$ siendo estadísticamente significativo (**), observándose una clara disminución de la infestación en las zonas rurales desde el año 1985 hasta nuestros días, pasándose de un 61,1% de parasitación a un 12,3%, siendo notoria la disminución de la parasitación, con la profilaxis realizada a un 31,5% de los perros.

ZONAS NO RURALES (OBSERVADO)

	Positivo	Negativo	Total
1985-87	34	119	153
1995-97	280	1452	1732
TOTAL	314	1571	1885

ZONAS NO RURALES (ESPERADO)

	Positivo	Negativo	Total
1985-87	25,5	127,5	153
1995-97	288,5	1443,5	1732
TOTAL	314	1571	1885

Cuadro 3.ix (e). Tratamiento Preventivo. Zonas no Rurales. (Comparativa).

En zonas no rurales en 1985-87 se estudiaron a 153 perros, de los cuales 34 (22,2%) eran positivos de microfilarias. En 1995-97 se estudiaron en zonas no rurales a 1732 perros,

de los que 280 (16,2%) tenían microfilaremia. Se obtuvo un $\chi^2= 3,71$ y un valor de $p= 0,0539673$ siendo por tanto estadísticamente significativo (*), se vió que la diferencia de parasitación de ambas épocas era estadísticamente significativa.

Además es de tener en cuenta, que con respecto al examen “Directo” en zonas rurales se ha visto que hay más perros tratados (31,5%) que en zonas no rurales (13,8%).

TOTAL (OBSERVADO)				°TOTAL (ESPERADO)			
	Positivo	Negativo	Total		Positivo	Negativo	Total
1985-87	130	180	310	1985-87	60,2	249,8	310
1995-97	303	1616	1919	1995-97	372,8	1546,2	1919
TOTAL	433	1796	2229	TOTAL	433	1796	2229

Cuadro 3.ix (f). Tratamiento Preventivo. (Comparativa).

En 1985-87 se estudiaron 310 perros tanto de zonas rurales como no rurales, de los que 130 (41,9%) estaban parasitados por microfilarias comprobado por visualización directa y en 1995-97 de 1919 perros, 303 (15,8%) dieron positiva la visualización directa. Se obtuvo un valor de $\chi^2(\text{no corregido}) = 116,56$ y un valor de $p=0,00000000$ siendo por lo tanto estadísticamente significativo (**). Nos encontramos con diferencias significativas en la infestación desde 1985-87 hasta 1995-97. Se ha pasado de un 41,9% de parasitación a un 15,8%. La única variación existente en el tiempo es la introducción, de medidas profilácticas como es el tratamiento principalmente con ivermectina. Este tratamiento había sido aplicado al 15,5% de los perros estudiados. Este hecho ha influido en la disminución de un 26% en el índice de parasitación. El tratamiento no sólo influye en los tratados sino también en disminuir la prevalencia al reducir el número de fuentes de infestación.

3.10.- Estudio multivariante.

Pero el estudio estadístico (bivariante) realizado, donde comparamos los resultados dos a dos, puede ser engañoso en algunos aspectos pues en la realidad, la influencia de los distintos factores en la enfermedad puede ser mucho más compleja. El hecho de que un perro macho viva a la intemperie, en zona no rural y reciba tratamiento puede condicionar el que pueda presentar la microfilaremia negativa y la ELISA positiva, de una forma completamente distinta a un perro macho que viva en vivienda sin recibir tratamiento, en zona rural. Por ello, la realización de un estudio multivariante, nos va a permitir relacionar todas las variantes a la vez, tal y como se desarrolla en la naturaleza. Ello nos va a permitir dar lo que se podría llamar “gradiente de peligro”, indicando tras la aplicación del programa Canoco (ter Braak, 1987), en un eje los resultados correspondientes.

En la Gráfica 3.i aparecen los dos ejes de los dos análisis realizados, indicando a la derecha de la gráfica, la variable explicatoria (“Directo” o ELISA) que relacionamos con la variación de los datos en el eje. El eje lo podemos interpretar de derecha a izquierda como un “gradiente de peligro”, es decir, perros con más posibilidad de estar infestados estarán caracterizados por valores altos o presencia positiva de las variables que aparecen a la derecha de la gráfica. Así, ambas pruebas han revelado de forma significativa como un positivo en la variable “perrera” (esta variable tendrá el valor 1 cuando el perro del que procede el análisis se encuentra en perrera) puede interpretarse como un alto condicionante para que el perro se encuentre infestado. Lo mismo se puede interpretar de la variable “edad”, pero en este caso, el análisis que utiliza la variable explicatoria “Directo” mostró una mayor importancia de la variable “edad” en los perros infestados que los resultados obtenidos en el análisis cuando se utiliza la variable explicatoria ELISA. Mientras en el primer caso, la

variable “edad” toma un valor similar al de la variable “perrera”, en el segundo caso, su desplazamiento hacia la

derecha del eje (relacionado este desplazamiento con una mayor importancia de la variable en perros infestados) es menos significativo. Los perros viejos y que vivan en perreras, estarán más predispuestos a estar parasitados tanto en lo obtenido en “Directo” como en ELISA pero con mayor importancia en “Directo”.

VARIABLES QUE CONDICIONABAN UNA BAJA PREDISPONIBILIDAD PARA LA INFESTACIÓN SE DISPONÍAN A LA IZQUIERDA DEL EJE. CUANTO MÁS NEGATIVA LA COORDENADA, MAYOR IMPORTANCIA DE LA VARIABLE PARA CONDICIONAR LA BAJA PREDISPONIBILIDAD DE UN PERRO DE ESTAR INFESTADO. LA VARIABLE “VIVIENDA” HA SIDO REVELADA EN AMBOS ANÁLISIS COMO LA MÁS SIGNIFICATIVA EN LOS PERROS NO INFESTADOS (ESTA VARIABLE INDICA PERROS QUE SE ENCUENTRAN EN VIVIENDAS HUMANAS). CUANDO SE UTILIZA LA VARIABLE EXPLICATORIA “DIRECTO” EN EL ANÁLISIS, SE REVELA DE FORMA CONTUNDENTE LA VARIABLE “TRATAMIENTO” PARA DETERMINAR PERROS NO INFESTADOS. EL RESTO DE LAS VARIABLES NO SE REVELABAN TAN BUENAS DISCRIMINADORAS COMO LAS QUE DETERMINABAN PERROS INFESTADOS (PERRERA Y EDAD) Y NO INFESTADOS (VIVIENDA HUMANA, TRATAMIENTO E INTEMPERIE, ÉSTA ÚLTIMA SOLAMENTE EN EL CASO DE LA PRUEBA QUE UTILIZA LA VARIABLE EXPLICATORIA ELISA).

También se pone de manifiesto que las variables que determinan una baja infestación son más importantes que las que determinan una alta infestación de los perros, ya que sus coordenadas se desplazan en las primeras de manera contundente hacia la izquierda y no tanto las segundas a la derecha (indicando que no son tan buenas discriminadoras de los perros infestados-no infestados como las primeras).

El test de Montecarlo de los valores propios obtenidos para cada eje indicó que ambas variables explicatorias (“Directo” y ELISA) son significativas ($p < 0.001$) para explicar la variación de los datos.

La correlación de Kendall entre las variables de ambos ejes determinó una alta significación del coeficiente de correlación obtenido ($r=0.78$, $p<0.001$), con lo que el orden de las variables a lo largo del eje de ambos no mostró diferencias significativas. Por tanto, ambas pruebas determinaron un orden similar en las variables condicionantes de que un perro se encuentre infestado o no infestado.

El anexo 1, muestra la salida del programa CANOCO para el análisis de los datos con la variable “Directo”. En él podemos ver el valor propio del eje y el porcentaje de variación explicado. También aparece la prueba de Montecarlo y sus resultados.

En un segundo apartado tenemos las coordenadas de las variables en el eje, su tolerancia y el centroide de la variable “Directo”. Lo mismo para la variable ELISA en el anexo 2. Los valores propios y el porcentaje de variación explicado en cada eje son bajos, pero la prueba de Montecarlo fue significativa en ambos. El valor propio del eje con la prueba “Directo” como variable explicativa de la varianza de la prueba es 0.005 y el porcentaje de variación que explica es 1.2. Para la prueba de ELISA el valor propio es 0.002 y la variación que explica es 0.6. Todo indica que hay una alta variación en los datos, pero que podría responder más a problemas de colinearidad (correlación entre variables) y ruido a explicaciones biológicas.

3.11.-Resultados de la aplicación de la PCR.

La puesta a punto del diagnóstico por PCR, se complementó con la realización de unas curvas con el fin de saber cual era el número mínimo de microfilarias y la cantidad

mínima de DNA que esta técnica es capaz de detectar. Para ello, se realizó una cuantificación y posterior curva , utilizando la PCR, con una muestra con parásitos.

Como patrón positivo se partió de una muestra comprobada por visualización directa y por la técnica de ELISA. Se cuantificó el contenido de microfilarias/ml, observándose la presencia en dicha muestra de 135.000 microfilarias/ml. En el cuadro 3.x se observan las cantidades empleadas en la cuantificación.

Sangre total muestra positiva (μ l)	Sangre total muestra negativa (μ l)
300	0
200	100
100	200
50	250
25	275
10	290
5	295
1	299

Cuadro 3.x. Cantidades empleadas en la cuantificación.

Se amplificaron 50 ng de DNA de cada mezcla a volumen final de 50 μ l. La mezcla a la que se obtuvo mejor respuesta en la PCR (se obtuvieron las dos bandas) fue la constituida por 25 μ l de sangre total de muestra positiva + 275 μ l de sangre total de muestra negativa.(A esta mezcla la denominé X₂₅ y se prepara a una concentración de 5ng/ μ l).

Con la muestra X₂₅ y un “pool” de muestras negativas (negativas “Directo” y negativas ELISA) preparadas a concentración de 5 ng/ml se realizó una curva para determinar cantidad mínima de microfilarias o bien el DNA correspondiente a esas microfilarias que es capaz de detectar la PCR partiendo de 300 μ l de sangre total. (Cuadro 3.xi)

X ₂₅ (μl)	“Pool” negativo (μl)	Nº de microfilarias
50	0	562
10	40	112
4	46	45
2	48	22
10 dilución 1/10	40	11
5 dilución 1/10	45	5
2 dilución 1/10	48	2
10 dilución 1/10	40	1
5 dilución 1/100	45	0,5
2 dilución 1/100	48	0,2
1 dilución 1/100	49	0,1
5 dilución 1/1000	45	0,05
2 dilución 1/1000	48	0,02
0	50	0

Cuadro 3.xi. Mezclas de diluciones de sangre + y – para determinar sensibilidad de PCR..

Se amplificaron 100 ng de cada mezcla y se comprobó que se podía detectar el DNA contenido en 0,5 microfilarias, pero al transferir e hibridar se aumentó la sensibilidad de la técnica, puesto que se llega a detectar el DNA contenido en 0,2 microfilarias. Por otra parte se consigue asegurar una mayor especificidad, ya que la hibridación elimina cualquier posibilidad de amplificaciones inespecíficas.(Fotografías 3.i a), b) y c).

Con las condiciones en las que se llevaron a cabo estos experimentos, se obtuvo un mejor rendimiento que Favia y cols. (1996) que sólo fueron capaces de detectar hasta una microfilaria (el DNA correspondiente a una microfilaria).

Los resultados que se obtuvieron amplificando con los cebadores de *D. immitis* se presentan en el Cuadro 3.xii.

Nº MUESTRAS	DIRECTO	ELISA	PCR	% DETECTADO
26	POSITIVO	POSITIVO	26	100
31	NEGATIVO	NEGATIVO	0	0
12	POSITIVO	NEGATIVO	12	100

27	NEGATIVO	POSITIVO	6	22,2
----	----------	----------	---	------

Cuadro 3xii . Resultado de la PCR realizada en cuatro grupos de muestras.

La Biología Molecular y en particular la PCR, es una herramienta analítica de primer orden que ha irrumpido de forma importante en los laboratorios de investigación.

El diagnóstico microscópico es sencillo y económico pero proporciona falsos negativos en los casos de dirofilariosis ocultas, bajas microfíletrias, parasitación por un solo sexo y períodos prepatentes. El diagnóstico inmunológico puede resolver los falsos negativos anteriores, pero como ya se expuso, la respuesta inmune del hospedador varía con el tiempo pudiendo llegar a negativizarse, y también puede dar falsos positivos en los casos en los que los animales hayan estado en contacto con el parásito sin haber adquirido la parasitosis (postratamiento, quimioprofilaxis).

En los resultados obtenidos amplificando con los cebadores de *Dirofilaria immitis* (Cuadro 3. xii), se puede ver que la PCR, detecta todos los casos diagnosticados por los métodos convencionales. En el grupo de los que seropositivos sin microfíletria ha resultado positiva en 6 de 27 muestras. Por tanto, se ha logrado confirmar sólo un 22,2% de parasitosis y queda la duda si el 77,8% restante, son falsos positivos o parasitados sin microfíletria. Visto esto, y dada la complejidad que aún tiene la aplicación en los laboratorios de rutina el diagnóstico por PCR, hay que plantearse si esta mejora en el diagnóstico confirmatorio, compensa el esfuerzo humano y económico que es necesario realizar.

Sin embargo la puesta a punto de estas técnicas para detectar fragmentos específicos de *Dirofilaria immitis*, aporta una herramienta de extraordinario valor para establecer diagnósticos diferenciales con el resto de filarias que parasitan a los perros (Favia. y cols., 1996) , en especial cuando se tratan de diferenciar estadios larvarios en el vector.(Scoles, G., 1995).

IV.-CONCLUSIONES

IV- CONCLUSIONES.

1.- La prevalencia de la microfilaremia producida por *Dirofilaria immitis* de la población canina de Tenerife es del 15,8%.

2.- La seroprevalencia de la dirofilariosis canina en Tenerife es del 60,8%.

3.- El pelaje, el sexo, el tamaño, el lugar de residencia, así como la altitud y orientación son variables que no influyen significativamente en la prevalencia de la dirofilariosis canina en Tenerife.

4.-El residir en vivienda humana es el factor más significativo en la protección de los perros frente a la infestación. Los perros reclusos en perreras, están más expuestos a la infestación que los que viven solos a la intemperie .

5.-La introducción de la ivermectina en Tenerife para el tratamiento preventivo de la dirofilariosis canina, además de proteger a los perros tratados, ha provocado una disminución de la parasitosis en los perros sin tratamiento.

6.- La combinación de las tres técnicas de diagnóstico utilizadas (examen “Directo”, ELISA y PCR) no garantiza al 100% la exactitud del resultado del laboratorio, ya que la PCR en el diagnóstico de dirofilariosis canina, sólo confirma el 22,2% de las muestras seropositivas sin microfilaremia.

V-BIBLIOGRAFÍA

V.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Abramowsky, C. R.; Masamichi, A. y Powers, K. G. "Immunopathology of filaria nephropathy in dogs". *Laboratory Investigation* (1981) **44**: 1A.

Acevedo, R. A.; Theis, J. H.; Kraus, J. F. y Longhurst, W. M. "Combination of filtration and histochemical stain for the detection of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* in the dog". *American Journal of Veterinary Research* (1981) **42** 537-540.

Anguiano, A.; Martínez-Cruz, S. y Gutiérrez, P. N. "Epidemiología de la dirofilariasis canina en la provincia de Córdoba". *IV Congreso Nacional de Parasitología, Tenerife* (1985) 37.

Barriga, O. "Dirofilariasis. Handbook series in zoonoses". *Parasitic Zoonoses*, vol. II. Steele, M. G. (Ed.). CRC Press. (1982).

Báez, M. "Atlas preliminar de los mosquitos de las Islas Canarias (Diptera, Culicidae). *Vieraea* (1987) **17**: 193:202

Báez, M. y Fernández, J.M. "Notes on the Mosquito Fauna of Canary Islands. (Diptera: Culicidae). *Mosquito Systematics*, (1980) 12 (3): 349-355.

Beugnet, F.; Bima-Blum, S. y Chardonnet, L. "Epidemiological study of canine cardiac dirofilariosis in New Caledonia: choice of diagnostic method". *Revue de Médecine Vétérinaire* (1993) **144** (11) 891-897.

Beugnet, F.; Rous, V.; Leurs, M. y Chardonnet, L. "Effect of age in cardiopulmonary canine dirofilariasis. Choice of date for commencement of chemoprophylaxis". *Revue de Médecine Vétérinaire* (1994) **145** (1) 59-64.

Bidgood, A. y Collins, G. H. "The prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs in Sydney". *Australian Veterinary Journal* (1996) **73** (3) 103-104.

Blagburn, B. L.; Hendrix, C. M.; Lindsay, D. S.; Vaughan, J. L. y Hepler, D. I.; "Post-adulticide, milbemycin oxime microfilaricidal activity in dogs naturally infected with *Dirofilaria immitis*". *Proceedings of the Heartworm Symposium'92. Veterinary Medicine* Publ. Edwardsville (1992).

Bulman, G. M.; González, G.; Santamaría, P. E.; Pampillo, F. E.; Ambrústolo, R. R. y Fiel, C. A. "Prevalencia de *Dirofilaria immitis* en una inspección utilizando la técnica de Knott modificada, en 1043 perros domésticos en la Argentina Mesopotamia, Gran Buenos Aires y la ciudad de Buenos Aires". *Veterinaria Argentina* (1989) **6** (52) 144-151.

Bulman, G. M.; González, G.; Mancebo, O. A.; Santamaría, P. E.; Ambrústolo, R. R. y Guerrero, J. "Prevalencia de *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856), mediante el test de Knott modificado y un inmunoensayo enzimático, en 914 perros domésticos de la Mesopotamia, Gran Buenos Aires y Capital Federal (Argentina)". *Veterinaria Argentina* (1989) **6** (60) 668-675.

Buoro, I. B. J. y Atwell, R. B. "Development of a model of caval syndrome in dogs infected with *Dirofilaria immitis*". *Australian Veterinary Journal* (1984) **61** 267-268.

Calvert, C. A. y Losonsky, J. M. "Pneumonitis associated with occult heartworm disease in dogs". *Journal American of Veterinary Medicine Association* (1985) **186** 1097-1098.

Calvert, C. A. "Confirming a diagnosis of heartworm infection in dog". *Veterinary Medicine* (1987) 232-237.

Calvert, C. A. y Rawling, C. A. "Treatment of heartworm disease in dogs". *Canine Practice* (1993) **18** 13-28.

Campbell, W. C. "Ivermectin and heartworm". *Veterinary Medicine and Surgery* (1987) **2** 48-55.

Castillo-Hernández, J. A.; Lucientes Curdi, J.; Estévez Sánchez, C. y Gortazar Smith, C. "Epidemiología de la dirofilariosis en Zaragoza. I. Estudio de la prevalencia en perros y zorros y su interrelación". *VI Congreso Nacional y I Ibérico de Parasitología*. Cáceres (1989) 128.

Catcott, E. J. "Dirofilariosis". *Canine Medicine* Catcott, E. J. (Ed.). *American Veterinary Publication, Inc.* (1979).

Chandrasekharan, N. V.; Karunanayake, Eric. H.; Franzen, Lena; Abeyewick-reme W. y Pettersson Ulf. "*Dirofilaria repens*: Cloning and Characterization of a Repeated DNA Sequence for the Diagnosis of Dirofilariosis in Dogs, *Canis familiaris*". *Experimental Parasitology* (1994) **78** 279-286.

Copland, M. D.; O'Callaghan, M. G.; Hajduk, P. y O'Donoghue, P. J. "The occurrence of *Dirofilaria immitis* in dogs in South Australia". *Australian Veterinary Journal* (1992) **69** (2) 31-32.

Cordero, M.; Muñoz, M. R.; Muro, A.; Simón, F. y Perera, M. L. "Small calcified nodule: an undescribed radiologic manifestation of human pulmonary dirofilariasis". *Journal of Infectious Diseases* (1992) **165** (2) 398-399.

Courtney, Ch. H. y Zeng, Q. "Applications of heartworm immunodiagnostic tests". *Proceedings of the heartworm symposium* '89 (1989) 167-172. Charleston, South Carolina.

Courtney, C. H. y Cornel, J. A. "Evaluation of heartworm immunodiagnostic tests". *Journal of the American Veterinary Medical Association* (1990) **197** (6) 724-729.

Dean, A. G.; Dean, J. A.; Burton, A. H. y Dicker, R. C. "Epi Info Versión 5 a word processor and database and statistic". *Program for epidemiology on microcomputer*. Stone Mountain. Georgia: USD Inc; 1990.

Deidrick, C. y Boyce, K. "Geographic distribution and incidence of canine heartworm in a six county area of northern California". *Proceedings and Papers of the Annual Conference of the California Mosquito and Vector Control Association* (1986) **53** 33-36.

Dhaliwal, G. K. y Sani, R. A. "The prevalence of canine dirofilariasis in Kuala Lumpur and host risk factors". *Tropical Biomedicine* (1993) **10** (1) 73-76.

Dobson, C. "Host endocrine interactions with nematode infections. I Effects of sex, gonadectomy, and thyroidectomy on experimental infections in lambs". *Experimental Parasitology* (1964) **15** 200-212.

Drudge, J. H. "Arsenamides in the treatment of canine filariasis". *American Journal of Veterinary Research*. (1952) **13** 220-235.

Ducos de Lahitte, J. "Epidemiology of filariases in France". *Pratique Médicale & Chirurgicale de l'Animal de Compagnie* (1990) **25** (3) 305-310.

Ducos de Lahitte, J. "Pathogenesis of *Dirofilaria immitis* filariasis". *Pratique Médicale & Chirurgicale de l'Animal de Compagnie* (1990) **25** (3) 317-322.

Duménigo, B. E.; Espino, A. M. y Bouza, M. "Prevalencia de filariasis canina en la Isla de la Juventud". *Revista de Salud Animal* (1988) **10** (3) 247-250.

Faust, E. C.; Russel, P. F. y Jung, R. C. "Parasitología clínica". Editorial Salvat.(1982) 361-393.

Favia, G.; Lanfrancotti, A.; Della Torre, A.; Cancrini, G. y Coluzzi, M. "Polymerase chain reaction-identification of *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis*". *Parasitology* (1996) **113** 567-571.

Feldmeier, H.; Bienzle, U.; Schuh, D.; Geister, J. y Guggenmoos-Holzmann, I. "Detection of *Dirofilaria immitis* microfilariae in peripheral blood". *Acta Trópica* (1986) **43** 131-138.

Goldston, R. T. "Preface". *Veterinary Clinical of North American*. (1989). **19**: 1.

Gómez Bautista, M. y Rojo Vázquez, F. "Dirofilariosis canina y humana en España". *Medicina Veterinaria* (1990) **7** (2) 71-74.

Guerrero, J., Rojo Vázquez, F. A. y Ródenas, A. "Estudio de la incidencia de la enfermedad del gusano del corazón en la población canina española". Ensayo nr. TS-SP-006-87. *Medicina Veterinaria* (1989) **6** 217-220.

Grieve, R. B. y Lauria, S. "Periodicity of *Dirofilaria immitis* microfilariae in canine and murine hosts". *Acta Trópica*, (1983) **40** 121-127.

Grieve, R. B.; Lok, J. B. y Glickman, L. T. "Epidemiology of canine heartworm infection". *Epidemiologic Reviews* (1983) **5** 220-246.

Grieve, R. y Knight, D. "Anti-*Dirofilaria immitis* antibody levels before and after anthelmintic treatment of experimentally infected dogs". *Journal Parasitology* (1985) **71** 56-61.

Grieve, R. B. "Immunologic relevance of the cuticle and epicuticle of larval *Dirofilaria immitis* and *Toxocara canis*". *Acta Trópica* (1990) **47** (5-6) 399-402.

Hendrix, C. M.; Schlotthauer, J. C.; Bemrick, W. J. y Averbek, G. A. "Temperature Effects on the Development of *Dirofilaria immitis* in *Aedes vexans*". In Otto, G. F. Proceedings of the Heartworm Symposium' 80. *Veterinary Medicine Publishing Co.*, Bonner Springs, Kansas, (1981) 9-12.

Jackson, R. F. "Treatment of heartworm disease". *California Veterinarian* (1989) Vol. 26-30.

Kassais, T.; Cordero del Campillo, M.; Euzebi, J.; Grafar, S.; Hiepe, Th...."Standardized nomenclature of animal parasitic diseases (SNOAPAD)". *Veterinary Parasitology* (1988) **29** 299-326.

Kitagawa, H.; Sasaki, Y.; Kumasaka, J.; Mikami, C.; Kitoh, K. y Kusano, K. "Clinical and laboratory changes after administration of milbemycin oxime in heartworm-free and heartworm-infected dogs". *American Journal of Veterinary Research* (1993) **54** 520-526.

Knight, D. H. "Evolution of Pulmonary Artery Disease in Canine *Dirofilariasis*. Evaluation by Blood Pressure Measurements and Angiography". In Otto, G. F. Proceedings of the Heartworm Symposium' 80. *Veterinary Medicine* Publishing Co., Bonner Springs, Kansas, (1981) 55-62.

Konno, K. y Hayasaki, M. "Antigenic cross reactivity among *Dirofilaria immitis* and four intestinal parasite-species in the dog". *Japanese Journal of Parasitology* (1995) **44** (2) 161-164.

Kume, S. e Itagaki, S. "On the life cycle of *Dirofilaria immitis* in the dog as the final host". *British Veterinary Journal* (1955) **111** 16-24.

Kume, S. "Supplemental Report on Diethylcarbamazine as a Prophylactic Agent". In Morgan, H. C. Proceedings of the Heartworm Symposium' 74. *Veterinary Medicine* Publishing Co., Bonner Springs, Kansas, (1975) 73-74.

Kuo, T. F.; Yang, C. Y. y Yau, C. F. "Study on the incidence of pounds dogs infected with heartworms and a comparison of different methods of detection during the summer season in Taipei". *Journal of the Chinese Society of Veterinary Science* (1995) **21** (2) 97-104.

Larsson, M. H. M. A. "Prevalence of microfilariae of *Dirofilaria immitis* in dogs in Sao Paulo State". *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* (1990) **27** (2) 183-186.

Larsson, M. H. M. A.; Preterote, M. y Mirandola, R. M. S. "Diagnosis of occult dirofilariasis by the ELISA test in dogs in the state of Sao Paulo". *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* (1992) **29** (1) 93-96.

Larsson, M. H. M. A.; Meng, M. C.; Reche Júnior, A.; Larsson, C. E.; Iwasaki, M. y Dutra, L. F. "Study of periodicity of microfilaraemia in dogs infected with *Dirofilaria immitis*". *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* (1995) **32** (2) 114-119.

Ledezma, C.; Licon, M. DE y Ciniglio, M. "Dirofilariasis. I . Retrospective pidemiological study in a dog population in Panama city". *Notas Veterinarias* (1991) **1** (3) 9-11.

Ludham, K. W.; Jachowski, L. A. y Otto, G. F. "Potential vectors of *Dirofilaria immitis*". *Journal American of Veterinary Medicine Association* (1970) **157** 1354-1359.

Macy, D. W.; Cheney, J. y Taton-Allen, G. "Prevalence of circulating heartworm antigen in dogs in northeastern Colorado". *Cornell Veterinarian* (1991) **81** (4) 379-387.

Mackenzie, G. W. y Waldie, J. M. "Heartworms in dogs in British Columbia". *Canadian Veterinary Journal* (1991) **32** (8) 501.

Manda, J. A. "Transplacental migration of *Dirofilaria immitis* microfilariae". *Companion Animal Practice* (1989) **19** (6-7) 18-20.

Mantovani, A. y Jackson, R. F. "Transplacental transmission of microfilariae of *Dirofilaria immitis* in the dog". *Journal of Parasitology* (1966) **52** 116.

Martini, M.; Poglayen, G.; Capelli, G. y Roda, R. "Diagnosis of canine filariasis: relative sensitivity and specificity of some haematological techniques". *Angewandte Parasitologie* (1991) **32** (3) 133-136.

Medeiros, F. "Survey for *Dirofilaria sp.* and for antibodies to *Brucella abortus* in dogs on S. Miguel Island". *Veterinária Técnica* (1995) **5** (6) 24-26.

Munnell, J. F.; Weldon, J. S.; Lewis, R. F.; Thrall, D. E. y McCall, J. W. "Intimal lesions of the pulmonary artery in dogs with experimental dirofilariasis". *American Journal of Veterinary Research* (1980) **41** 1108-1112.

Muro Alvarez, A., Cordero Sánchez, M. y Simón Martín, F. "Epidemiología de la dirofilariosis pulmonar humana (DPH) en un área endémica de dirofilariosis canina". *VI Congreso Nacional y I Ibérico de Parasitología*. Cáceres (1989) 221.

Muro, A.; Cordero, M. y Simón, F. “Differential recognition of *Dirofilaria immitis* antigens by human Ig G and Ig M positive sera. Preliminary data based on EITB analysis”. *Tropical Medicine and Parasitology* (1992).

Nzabanita, E.; Priester, W. y Farver, T. “Distribution of canine dirofilariasis”. *California Veterinarian* (1982) **36** 24-28.

Okamoto, M.; Nogami, S.; Shibuya, S.; Inohue, Y. y Asanome, K. “Prevalence of *Dirofilaria immitis* infection in stray dogs in Saitama, Japan”. *Japanese Journal of Parasitology* (1995) **44** (4) 325-327.

Olson, N. C.; Scott, J. B. y Robinson, N. E. “Central blood volume and the lung extravascular thermal volume in dogs with dirofilariasis”. *American Journal of Veterinary Research* (1982) **43** 1019-1022.

Ortega-Mora, L. M.; Ferré, I.; Gómez-Bautista, M. y Rojo-Vázquez, F. A. “Prevalencia de la infestación por filarias en galgos en la zona centro de España”. *Medicina Veterinaria* (1988) **5** 433-442.

Ortega-Mora, L. M.; Gómez-Bautista, M.; Rojo-Vázquez, F. A.; Rodenas, A. y Guerrero, J. “A survey of the prevalence of canine filariasis in Spain”. *Preventive Veterinary Medicine* (1991) **11** (1) 63-68.

Otto, G. F.; Jackson, R. F.; Bauman, P. M.; Peacock, F.; Hinrichs, L. y Maltby, J. H. “Variability in the ratio between the number of microfilaria and adult heartworms”. *Journal American of Veterinary Medicine Association* (1976), **168** 605-607.

Pacheco, G. "Progressive changes in certain serological responses to *Dirofilaria immitis* infection in the dog". *Journal Parasitology* (1966) **52** 311-317.

Palmer, W. "Putting things even in better order: The advantage of canonical correspondence analysis". *Ecology* 78 (1993) 2215-2230.

Papazahariadou, M. G.; Koutinas, A. F.; Rallis, T. S. y Haralabidis, S. T. "Prevalence of microfilaraemia in episodic weakness and clinically normal dogs belonging to hunting breeds". *Journal of Helminthology* (1994) **68** (3) 243-245.

Patton, S. y McCracken, M. D. "Prevalence of *Dirofilaria immitis* in cats and dogs in eastern Tennessee". *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* (1991) **3** (1) 79-80.

Parke, N. J. y Mays, C. E. "Canine dirofilariasis in central Indiana". *Proceedings of the Indiana Academy of Science* (1984) **94** 645-648.

Pérez Sánchez, R.; Gómez Bautista, M. y Encinas Grandes, A. "Canine filariasis in Salamanca (northwest Spain)". *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* (1989) **83** (2) 143-150.

Piédrola Gil G.; del Rey Calero J.; Domínguez Carmona M.; Cortina Greus P.; Gálvez Vargas R.; Sierra López A.; Sáenz González M. C.; Gómez López L. I.; Fernández-Crehuet Navajas J.; Salleras SanMartí L.; Cueto Espinar A. y Gestal Otero J. J. "Medicina preventiva y Salud pública " 9ª Edición. Masson-Salvat Medicina (1991). 57-78.

Poole, Catherine.B.; Grandea III, Andres, G.; Maina, Claude. V.; Jenkins, Rosalind. E.; Selkirk, Murray. E. y McReynolds, Larry. A. "Cloning of a cuticular antigen that contains

multiple tandem repeats from the filarial parasite *Dirofilaria immitis*". *Proceedings of the National Academy Science USA*. (1992) **89** 5986-5990 .

Rawlings, C. A. "Heartworm disease in dogs and cats". *WB Saunders Company, Philadelphia, London*. (1986) 325.

Rawlings, C. A. "Corticosteroids and aspirin for treatment of dogs with heartworm disease". *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* (1990) **12** (9) 1272-1276.

Rawlings, C. A. y McCall, J. W. "Melarsomine: a new heartworm adulticide". *Compendium on Continuing Education for Practicing Veterinarian* (1996) **18** (4) 373-379.

Reynaud, J. P. "La melarsamine (R.M.340) a nouveau macrofilaricide dans le traitement des infestations du chiens pour *Dirofilaria immitis*". *Pratique Médicale & Chirurgicale de l'Animal de Compagnie* (1990) **25** 369-374.

Riera, C. y Portus, M. "Diagnóstico de la Toxocariasis humana mediante ELISA, con antígeno secretor-excretor de larvas II de *Toxocara canis*". *Revista Ibérica de Parasitología* (1988) **48** (1) 95-100.

Rojo Vázquez, F. A.; Valcarcel, F.; Guerrero, J. y Gómez Bautista, M. "Prevalencia de dirofilariosis canina en cuatro áreas geográficas de España". *Medicina Veterinaria* (1990) **7** (5) 297-305.

Rojo Vázquez, F. A. y Gómez Bautista, M. "Monografía. Dirofilariosis". (1993) 7-25.

Ross, R. "The pathogenesis of atherosclerosis: An update". *New England Journal of Medicine* (1986) **314** 488-500.

Roth, L.; Brown, L.; Brum, S.; Foster, L.; Nelson, M.; Reczeck, D. y Schantz, D. VON. "Comparison of three diagnostic tests for *Dirofilaria immitis* in a low-incidence area". *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* (1993) **5** (4) 647-648.

Roze, M. "Ocular localization of filariae". *Pratique Médicale & Chirurgicale de l'Animal de Compagnie* (1990) **25** (3) 329-331.

Russell, R.C. y Geary, M. J. "The influence of microfilarial density of the dog heartworm *Dirofilaria immitis* on infection rate and survival of *Aedes notoscriptus* and *Culex annulirostris* from Australia." *Medical and Veterinary Entomology* (1996) 10 (1) 29-34.

Sahin, I. Gödekmerdan, A.; Ekinçi, N.; Özcan, M. y Sen, I. "The distribution and prevalence of *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786) and other parasites of dogs in Kayseri region. 1. The prevalence of species of *Dirofilaria* and health importance". *Türkiye Parazitoloji Dergisi* (1993) **17** (3/4) 77-82.

Sambrook, J.; Fritsch, E. y Maniatis, T. "Molecular cloning: a laboratory manual". In C. S. H. L. Press (ed.), Cold Spring Harbor, New York. (1989).

Santamaría, B.; Cordero, M.; Muro, A. y Simón, F. "Evaluation of *Dirofilaria immitis* excretory/secretory products for seroepidemiological studies on human dirofilariosis". *Parasite* (1995) **2** (3) 269-273.

Santamaría, B.; Sacco, B. DI; Muro, A.; Genchi, C.; Simón, F. y Cordero, M. "Serological diagnosis of subcutaneous dirofilariosis". *Clinical and Experimental Dermatology* (1995) **20** (1) 19-21.

Sawyer, T. K. "Seasonal Fluctuations of Microfilariae in Two Dogs Naturally Infected with *Dirofilaria immitis*". In Morgan, H. C. (ed.). Proceedings of the Heartworm Symposium' 74 *Veterinary Medicine* Publishing Co., Bonner Springs, Kansas, (1975) 23-25.

Scholtens, Robert G.; DVM, y Patton, Sharon; PhD. "Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for occult dirofilariosis in a population of naturally exposed dogs". *American Journal of Veterinary Research* (1983) **44** (5) 861-864.

Scoles, G. A. y Kambhampati, S. "Polymerase chain reaction based method for the detection of canine heartworm (Filarioidea: Onchocercidae) in mosquitoes (Diptera: Culicidae) and vertebrate hosts". *Journal of Medical Entomology* (1995) **32** 864-869.

Selby, L. A.; Corwin, R. M. y Hayes, H. M. "Risk factors associated with canine heartworm infection". *Journal American of Veterinary Medical Association* (1980) **176** 33-35.

Simón, M.; Muro, A.; Cordero, M. y Martín, J. “A seroepidemiologic survey of human dirofilariasis in Western Spain”. *Tropical Medicine and Parasitology* (1991) **42** (2) 106-108.

Slocombe, J. O. D. y McMillán, I. “Heartworm in dogs in Canadá in 1987”. *Canadian Veterinary Journal* (1988) **29** (8) 641-646.

Slocombe, J. O. D. y McMillán, I. “Heartworm in dogs in Canadá in 1988”. *Canadian Veterinary Journal* (1989) **30** (6) 504-508.

Slocombe, J. O. D. “Heartworm in dogs in Canadá in 1989”. *Canadian Veterinary Journal* (1990) **31** (7) 499-505.

Sóbol, I. M. “Método de Montecarlo”. Editorial Mir. Moscú. (1983) 85.

Stein, F. J. y Lawton, G. W. “Comparison of methods for diagnosis and differentiation of canine filariasis”. *Journal American of Veterinary Medical Association* (1973) **163** 140-141.

Stephen, J. Ettinger, D. V. M. “Tratado de Medicina Interna Veterinaria. Enfermedades del perro y el gato”. Los Angeles, California, U. S. A. (1989) **2** (54) 1035-1059.

Tada, Y.; Ohta, T.; Soohara, S. y Suzuki, Y. “Helminth infections of dogs in Shiga, Japan with reference to occult infection of *Dirofilaria immitis*”. *Journal of Veterinary Medical Science* (1991) **53** (2) 359-360.

Takemura, N.; Koyama, H.; Sako, T.; Tagawa, M. y Motoyoshi, S. "Effects of the initial stage of filariasis on cardiac function". *Journal of the Japan Veterinary Medical Association* (1989) **42** (11) 771-773.

Ter Braak, C. J. F. "Canonical correspondence analysis: a new eigenvector technique for multivariate direct gradient analysis". *Ecology* 67 (1986) 1167-1179.

Ter Braak, C. J. F. "CANOCO a FORTRAN program for canonical community ordination by (partial) (detrended) (canonical) correspondence analysis and redundancy analysis. (Versión 3.1)". (1987) 95. Ministry of Agriculture and Fisheries. Wageningen.

Thrall, D. E.; Badertscher, R. R.; II. McCall, J. W. y Lewis, R. E. "The pulmonary arterial circulation in dogs experimentally infected with *Dirofilaria immitis*. Its angiographic evaluation". *J. Am. Vet. Rad. Soc.* (1979) **20** 74-78.

Tongson, M. S. y Romero, F. R. "Observations on the periodicity of *Dirofilaria immitis* in the peripheral circulation of the dog". *British Veterinary Journal* (1962) **118**: 299-304.

Uga, S.; Matsumura, T.; Ishibashi, K.; Yatomi, K.; Yoda, Y. y Kataoka, N. "Occult infection of *Dirofilaria immitis* in stray dogs captured in Hyogo Prefecture, Japan". *Japanese Journal of Parasitology* (1990) **39** (5) 425-430.

Valladares, B.; Gijón, H. y López-Román, R. "Presencia de *Dirofilaria immitis* en la Isla de Tenerife". *IV Reunión Anual de Parasitólogos Españoles*. Madrid, (1984) 78.

Valladares, B. y López-Román, R. “Diagnóstico inmunológico de dirofilariasis canina”. *Revista Ibérica de Parasitología*, Volumen Extraordinario (1987) 225-228.

Valladares, B.; Gijón, H. y López-Román, R. “*Dirofilaria immitis* en la Isla de Tenerife. Algunos datos de su fisiopatología”. *Revista Ibérica de Parasitología*, (1987) **47** (4) 377-380.

Walters, L. L. y Lavoipierre, M. M. J. “Landscape epidemiology of mosquito-borne canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) in northern California, USA. I. community-based surveys of domestic dogs in three landscapes”. *Journal Medical of Entomology* (1984) **21** 1-16.

Watson, A. D. J.; Testoni, F. J. y Porges, W. L. A. “A comparison of microfilariae from canine blood by the modified Knott test and a filter method”. *Australian Veterinary Journal* (1973) **9** 28-30.

Weil, G. J.; Ottesen, E. A. and Powers, K. G. *Dirofilaria immitis*: parasite-specific-humoral and cellular immune responses in experimentally infected dogs. *Experimental Parasitology* (1981) **51** 80-86.

Weiner, D. J. y Bradley, R. E. “Serologic Changes in Primary and Secondary Infections of Beagle Dogs with *Dirofilaria immitis*”. In Bradley, R. E. *Canine Heartworm Disease*. The Current Knowledge. University of Florida Press. Gainesville. (1972) 77-86.

Wilkins, R. J.; Hurvitz, A. I.; Gula, I. “Clinical experience with a fluorescen antibody test in dogs with occult dirofilariasis”. *Med. Publis. Co*, (1978) 45-50.

Wong, M. M. "Studies on microfilaremia in dogs. II. Levels of microfilaremia in relation to immunologic responses of the host". *American Journal Tropical Medicine and Hygiene* (1964) **13** 66-77.

Wright, S. A. y Boyce, K. W. "Epizootiology of canine cardiovascular dirofilariasis in six northern California counties". *Proceedings and Papers of the Annual Conference of the California Mosquito and Vector Control Association, Inc.* (1989) **57** 37-43.

Wright, J. C.; Hendrix, C. M. y Brown, R. G. "Dirofilariasis. (Zoonosis update)". *Journal of the American Veterinary Medical Association* (1989) **194** (5) 644-648.

Wylie, J. P. "Detection of microfilariae by a filter technique". *Journal American of Veterinary Medicine Association* (1970) **156** 1403-1405.

Zar, J. H. "Biostatistical analysis". 2nd ed. (1984). Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N J. 718.