

Trabajo de grado para aspirar al título de Medicina veterinaria y Zootecnia.

Prevalencia de *Dirofilaria immitis* en perros de la Fundación Protectora de animales de Dosquebradas, Risaralda, Colombia.

Autores:

Kevin René Quintana Acuña

Daniel Andrés Osorio Gil

Asesor:

Juan Carlos González

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA

FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA M.V.Z. PEREIRA, RISARALDA

2019.

Prevalencia de *Dirofilaria immitis* en perros de la Fundación Protectora de animales de Dosquebradas, Risaralda, Colombia.

Daniel A Osorio Gil, Kevin Quintana Acuña.

Resumen:

Palabras claves: Heartworm, dirofilariasis, microfilaria, *Aedes*, Knott.

La *Dirofilaria immitis* causante de la dirofilariasis o de la enfermedad del corazón del perro es de distribución mundial, transmitida por mosquitos del género *Aedes sp.*, *Anopheles sp.*, *Culex sp.* La picadura de cualquier género de estos mosquitos sí es vector, introduce las larvas en el animal afectándolo internamente con problemas comúnmente cardíacos, cutáneos y pulmonares. Se han encontrado algunos casos de este parásito afectando humanos que, a diferencia del perro, no hay una filaremia. Los síntomas más comunes son: dolor retroesternal, tos y hemoptisis. Igualmente se ha encontrado en algunos estudios que estos casos en humanos se han ido extendiendo en lugares cada vez menos propensos, debido a sus vectores y al cambio climático por el que se ha pasado durante la última década. Como objetivo en este estudio se determinó la presencia de este parásito dentro de la 'Fundación Protectora de animales de Dosquebradas' con el fin de tener datos más concisos y reales de esta enfermedad, facilitar su diagnóstico, tratamiento y prevención. Igualmente se realizaron algunas correlaciones entre sexo, edad, condición corporal y lugar en el que provenían estos perros para hacer un análisis más adecuado de los afectados y los no afectados. En el estudio se utilizó un kit IDEXX Snap 4Dx plus® para *D. immitis* por cada muestra de sangre extraída en cada perro, la población muestreada fue de veinte animales.

A pesar de que la prevalencia de *Dirofilaria immitis* en nuestro estudio fue del 0% los resultados encontrados en un estudio realizado en tres ciudades del país: Medellín, Barranquilla y Cartagena, fueron similares en la ciudad de Medellín, teniendo como resultado una prevalencia del 0% a diferencia de Barranquilla y Cartagena, donde se encontró una prevalencia del 1% y 3% respectivamente.

Como conclusión para el estudio se determinó que los pacientes muestreados salieron negativos (100%) a *D. immitis*, al correlacionar resultados de los SNAP con el método de Knott modificado por medio de microscopía directa, se encontró semejanza en el resultado entregado por los Snap 4Dx de Idexx. Aunque no se puede realmente descartar la aparición de este nematodo en nuestro medio, este estudio puede dar pie a futuras investigaciones relacionadas con este parasito e igualmente incentivar al medio veterinario a tenerlo en cuenta a la hora de realizar diferenciales con esta enfermedad.

Abstract:

The *Dirofilaria immitis* cause of the dirofilariasis or also known as dog's heart disease is present globally, transmitted by mosquitoes of genus *Aedes* sp., *Anopheles* sp., *Culex* sp. The bite of any kind of these mosquitoes is vector, it introduces the larvae in the animal affecting it internally with commonly cardiac, cutaneous and pulmonary problems. Some cases of this parasite have been found affecting humans in which, unlike the dog, there is no phylloremia. The most common symptoms are: retrosternal pain, cough and hemoptysis. It has also been found in some studies that these cases in humans have been spreaded to places that are increasingly less prone due to their vectors and the climate change that has occurred over the last decade. The objective of this study is aimed to determine the presence of this parasite within the Dosquebradas Animal Protective Foundation in order to have more information about the rights of this disease, the ease of its diagnosis, treatment and prevention. Likewise, some correlations have been made between sex, age, body condition and the place where these dogs have been tested. The study describes an IDEXX Snap 4Dx plus® kit for *D. immitis* image for each sample of blood extracted in each dog, the population sampled was twenty animals.

Although the prevalence of *Dirofilaria immitis* in our study was 0%, the results found in a study conducted in three cities of the country, Medellín, Barranquilla and Cartagena were the following, presenting similarities with the city of Medellín, resulting in a prevalence of 0%, unlike Barranquilla and Cartagena, where a prevalence of 1% and 3% respectively was found.

As a conclusion for the study it was determined that the sampled patients were negative (100%) to *D. immitis*, when correlating SNAP results with the Knott method modified through direct microscopy, similarity was found in the result delivered by the Snap 4Dx of Idexx. Although we can not really rule out the appearance of this nematode in our environment, this study may lead to future research related to this parasite and also encourage the veterinary environment to take it into account when making differentials with this disease.

Introducción:

En la vida cotidiana nuestras mascotas están expuestas a muchos agentes que pueden causar gran variedad de problemas, entre estos se encuentran parásitos como la *Dirofilaria immitis* que al situarse en el ventrículo derecho y arteria pulmonar da presentación a signos clínicos como insuficiencia cardiaca, manifestaciones cutáneas y nerviosas; estos signos son similares a otras enfermedades causadas por parásitos o bacterias, enfermedades como la Ehrlichiosis, anaplasmosis y la enfermedad de Lyme.

Teniendo en cuenta que, aunque los parásitos son de presentación común, en el municipio de Dosquebradas no se tienen datos de este nematodo, dificultando su diagnóstico, un adecuado tratamiento y campañas para su prevención.

El lazo entre animales de compañía con el ser humano hoy en día es mayor al de décadas anteriores, gran parte de la población adopta sus mascotas en albergues donde puede haber presencia de este agente parasitario o de sus vectores. Debido a que estamos en una zona expuesta a la presencia de *Dirofilaria immitis* es necesario tener datos que den a entender aún más de qué manera podemos prevenir esta enfermedad y aumentar la expectativa de vida de nuestras mascotas, igualmente es de gran importancia para la salud pública debido a reportes de humanos afectados por filarias, algunos de estos casos se presentaron en Colombia.

La dirofilariosis es una enfermedad parasitaria causada por el nematodo *Dirofilaria immitis*, que taxonómicamente pertenece a la Familia: *Onchocercidae*, Superfamilia:

Filarioidea, Orden: *Spirurida*, Subclase: *Secernestacida*, Clase: *Nematoda*, Phylum: *Nemathelminthes*, Reino: *Animal*; este afecta perros, lobos, zorros, coyotes, al gato doméstico y salvaje, pandas rojos, osos, león marino, primates no humanos y al humano(1).

La dirofilariosis es transmitida indirectamente por mosquitos de la familia de los *Culicidae* (*Aedes sp*, *Anopheles sp.* y *Culex sp.*), ocasionalmente afecta a humanos (enfermedad zoonótica), quien actúa como un hospedero accidental. La transmisión es biológica por vectores, es decir, a través de invertebrados hacia animales vertebrados o hacia el hombre. El número de perros expuestos a la enfermedad del gusano del corazón en el mundo es cada vez mayor, y debido a que la *Dirofilaria* rara vez se reconoce en humanos, su prevención depende en gran parte de la reducción de la prevalencia de la enfermedad en los perros(2).

En general, la prevalencia de la dirofilariosis en Europa en los últimos cinco años ha aumentado en las regiones del sur ya consideradas endémicas, mientras que, en los países del Norte de Europa, anteriormente considerados no endémicos, se ha observado una mayor dispersión de dirofilariosis en estas regiones(3). En Colombia se ha reportado la presencia de *D. immitis* en caninos en los departamentos de la costa atlántica, la costa pacífica, las regiones oriental y central del país(4), también en el Amazonas y en la población de Santa Fe de Antioquia. En estas dos últimas regiones se han encontrado anticuerpos específicos contra este nemátodo en la población humana(4).

Esta alteración de la epidemiología de la dirofilariosis puede explicarse sobre la base de diversos factores como: 1) el cambio climático y el calentamiento global que crean condiciones para que los vectores, artrópodos de sangre fría, se puedan desarrollar en áreas donde antes no conseguían; 2) el aumento de los desplazamientos de animales de compañía, que pueden ser portadores de microfiliarias; 3) el aumento del número de animales abandonados; 4) las resistencias a los insecticidas; 5) la vacunación de zorros contra la rabia que aumenta el número de zorros, que son hospederos reservorio de

Dirofilaria spp. En determinadas regiones; 6) la reducción del control y la prevención de la dirofilariosis debido a la economía actual(3).

En general, y dependiendo de la región, la infección guarda relación con la raza, el sexo y la edad. La prevalencia suele ser mayor en machos y en perros de raza grande y pelo corto. Respecto de la edad, los perros más afectados se encuentran entre los 4 y 8 años, aunque puede ser diagnosticada eventualmente en perros menores de 1 año (pero mayores de 6 meses debido al período prepatente relativamente largo), así como en animales geriátricos(5).

Este nematodo afecta al huésped generando daño endotelial de las arterias pulmonares, hipertensión pulmonar y neumonitis alérgica. De igual manera se presentan alteraciones renales. El asentamiento de gran cantidad de vermes en la vena cava caudal causa un proceso agudo mortal, denominado síndrome de la vena cava(4).

El ciclo de vida de este parásito tiene una duración entre los cinco y nueve meses, y empieza con la picadura de cualquiera de los vectores mencionados hacia un animal infectado con *D. immitis*, ingiriendo con esto las Microfilarías que se encuentran ubicadas en circulación sanguínea. Estas microfilarías ingeridas migran al intestino medio del culicideo y de aquí desplazándose a los túbulos de Malpighi penetrando en el citoplasma de las células primarias. Aquí permanecen cerca de 5 días, en condiciones óptimas, y regresan al lumen de los túbulos de Malpighi donde 10 días después de la infección cambian al estadio L2. La fase larvaria L3 surge, cerca de los 13 días de haber sido infectado el culicideo con microfilarías. Es en esta fase que las larvas se dirigen a la probóscide, y posteriormente, en una nueva comida sanguínea, deposita en la piel del huésped definitivo en una gota de hemolinfa(3).

Los signos clínicos se clasifican en la siguiente tabla(6).

Tabla1.

Signos clínicos representativos de la dirofilariosis canina		
<u>Infestación Temprana</u>	Clase 1	Asintomática, con signos inespecíficos
<u>Enfermedad Moderada</u>	Clase 1	Pérdida de peso e intolerancia al ejercicio
<u>Enfermedad Moderada</u>	Clase 2	Pronóstico reservado. Anemia, caquexia, tos, intolerancia al ejercicio, sonidos pulmonares anormales.
<u>Enfermedad Severa</u>	Clase 3	Pronóstico reservado. Fatiga, tos persistente, soplos, anemia grave, disnea, sonidos pulmonares y cardiacos anormales, hepatomegalia, síncope, ascitis.

Este nematodo en estado adulto usualmente se encuentra principalmente en arteria pulmonar y en el ventrículo derecho. De las especies que ataca el perro es el más infectado por estos, la presencia de este parásito se da más en zonas geográficas tropicales y subtropicales, aunque igualmente se pueden encontrar en zonas templadas(7).

La dirofilariosis fue originalmente considerada una enfermedad de estricta importancia veterinaria, ha sido reconocida como una zoonosis emergente por varios autores. De los trece países suramericanos, la información actual sobre la presencia o ausencia de *D. immitis* sólo están disponibles para Argentina, Brasil, Perú, Colombia y Chile(8).

El diagnóstico de la infección en perros se basa por lo general en la identificación de microfilarias en una muestra de sangre o en la detección de antígenos del parásito adulto en la sangre, suero o plasma, incluyendo siempre un examen físico. Ocasionalmente se llega al diagnóstico gracias a la detección de cambios radiográficos típicos o mediante identificación de filarias en la ecografía, especialmente en casos de síndrome de la vena cava. Un resultado positivo en cualquiera de estas pruebas lleva a un diagnóstico positivo de la enfermedad(9).

Los objetivos de cualquier tratamiento contra la dirofilariosis son los de mejorar la condición médica del animal y eliminar todos los estadios de las dirofilarias (microfilarias, fases larvarias, juveniles y adultas) con un mínimo de complicaciones posteriores al tratamiento(10). Los perros que presenten signos clínicos intensos derivados de esta microfilariosis deben ser estabilizados, antes de administrarles el

adulticida, con medicación complementaria (glucocorticosteroides, diuréticos, vasodilatadores, inotrópicos positivos y fluidoterapia). Se debe limitar el ejercicio al perro e instaurar un tratamiento mensual con una lactona macrocíclica inyectable y doxiciclina (10 mg/kg dos veces al día durante 4 semanas) dos meses antes de la primera administración de diclorhidrato de melarsomina. La melarsomina se debe administrar en dosis de 2,5 mg/kg mediante inyección intramuscular profunda en los músculos epiaxiales (lumbares). Al cabo de un mes se administrarán una segunda y una tercera dosis con una diferencia de 24 horas entre sí. A los 6 meses del comienzo del tratamiento conviene hacer la prueba del antígeno del gusano del corazón y después debe repetirse cada 3 meses. Se considera que el perro no tiene el gusano del corazón cuando se han obtenido resultados negativos en dos pruebas antigénicas consecutivas. Si sigue dando positivo, debe repetirse el tratamiento con doxiciclina. Debe recordarse a los veterinarios que durante todo el tratamiento de efecto lento puede seguir avanzando la enfermedad mientras los gusanos adultos sigan vivos. También se pueden producir complicaciones o incluso la muerte repentina del animal por émbolos pulmonares causados por la muerte de gusanos adultos. En todo ese periodo se recomienda mantener la restricción del ejercicio físico(11).

La dirofilariosis canina es una enfermedad parasitaria potencialmente zoonótica, debido que muchos de los vectores son antropofílicos, siendo importante el control y prevención de esta enfermedad en perros para que no repercutan en la salud humana. Tanto la dirofilariosis y la Ehrlichiosis son enfermedades que debemos de prevenir mediante el adecuado manejo profiláctico indicado en cada caso; estas enfermedades no confieren al paciente una inmunidad protectora contra nuevas infestaciones, siendo crucial evitar lesiones repetidas en los órganos que afectan(12).

El control y la prevención de parasitosis en animales de compañía y seres humanos requiere la adopción de medidas para prevenir la transmisión entre animales y hacia los seres humanos, así como para reducir la contaminación ambiental con huevos, quistes y larvas. Las medidas recomendadas por lo general son: Desparasitación de perros con tratamientos preventivos apropiados, reducción del número de animales sin dueño, así

como de animales de compañía mal cuidados, prevención de la defecación de los animales de compañía en pavimentos o áreas públicas, fomentar el concepto de responsabilidad de los dueños de animales de compañía, educar al dueño de mascota sobre el potencial zoonótico de los parásitos de perros y gatos(13).

Cómo objetivo general de este estudio se determinó la prevalencia de *Dirofilaria immitis* en perros de la Fundación protectora de animales del municipio de Dosquebradas, Colombia.

Materiales y métodos.

Se incluyeron en el estudio muestras de sangre que fueron recolectadas de la vena cefálica, con previa desinfección de la zona con alcohol en cada uno de los caninos muestreados. Se excluyeron las muestras de sangre hemolisadas, lipémicas, o con más de un mes de haber sido recolectadas. Las muestras de sangre obtenida en los caninos se catalogaron en diferentes edades de la siguiente manera: cachorros (1 a 12 meses), adultos (1 a 7 años) y geriatras (7 años en adelante) este estudio se realizó en la Fundación Protectora de animales de Dosquebradas, Risaralda. Los animales fueron escogidos independientemente de su estado de salud, plan de inmunización, raza y sexo, por último se diferenciaron según el índice de condición corporal de la tabla de Purina en una escala del 1 al 9 (14), para así hacer las respectivas correlaciones. El tamaño definitivo de la población fue de 20 animales, basándonos en un promedio entregado por la clínica de setenta caninos muestreados mensualmente para hemogramas.

Métodos diagnósticos utilizados:

Para realizar nuestro estudio se utilizó una prueba (SNAP® 4Dx® Plus Test IDEXX 2016)(15), para Filarias que permite diagnosticar la filariosis (antígeno de *Dirofilaria immitis*) en menos de 10 minutos utilizando tres gotas de sangre de cada animal con cuatro gotas del reactivo. Este test presenta una sensibilidad del 98% y especificidad del 99,9%(15).

Los hallazgos encontrados en la prueba SNAP 4dx Idexx serán correlacionados por visualización directa por medio de microscopia, el método de Knott modificado se realizará en las horas próximas después de haberse tomado muestra de sangre, se realizarán en el Laboratorio pedagógico multifuncional de la universidad Tecnológica de la Ciudad de Pereira.

Los implementos utilizados para el estudio fueron: Test 4DX IDEXX plus, pipetas Pasteur desechables, tubos Falcon de 15ml terminados en punta cónica, laminas porta objetos, laminas cubre objetos, una centrifuga, para la tinción se usó azul de metileno y se requirió de un microscopio para la visualización. Las muestras se mezclaron con formalina al 2% para la fijación de las Filarias.

Test de Knot modificado.

Preparación de la muestra: En un tubo Falcon de punta cónica se agregó 9 ml de formalina al 2% junto con 1 ml de sangre extraída del paciente. Se agitó hasta obtener un color vinoso traslucido y se procede a centrifugar durante ocho minutos a 2000 RPM. Una vez centrifugado se desechó el sobrenadante, el contenido restante se extrajo por medio de una pipeta Pasteur y se procedió a colocar una pequeña gota sobre una lámina portaobjetos, con otra pipeta Pasteur se le agregó una gota de azul de metileno para finalmente, cubrir las gotas con la lámina cubreobjetos y se visualizó en el microscopio. Para cada muestra se utilizó implementos nuevos(16).

Resultados.

De los veinte caninos muestreados se encontró una proporción de 3:1 hembras por macho muestreado; la procedencia de los caninos estudiados es del 55% de origen urbano y del 45% de origen rural; el 85% de los perros son mestizos indefinidos, el resto son razas diversas como Pastor Alemán, Rottweiler y American Pitbull. Cabe destacar que la mayoría de los animales de zona urbana son animales en situaciones de calle con una alta exposición a otros animales.

En las veinte muestras del SNAP 4DX plus IDEXX realizadas dentro de la Fundación Protectora de Animales se obtuvo un resultado de 20 caninos negativos a la presencia

de *Dirofilaria immitis*. Al momento de hacer la correlación por medio del Knott modificado se apreció una semejanza del 100% con los resultados dados por el test.

Tabla 2. **Tabla con información de cada uno de los pacientes en el orden al cual se realizaron los estudios.**

NOMBRE	EDAD	PROCEDENCIA	SEXO	C.C	DIROFILARIA	OTROS (+)
Mono	Adulto	Rural	M	7	NEGATIVO	<i>E. canis/ E. ewingii</i>
Lulú	Adulto	Rural	H	5	NEGATIVO	<i>E. canis/ E. ewingii</i> <i>A.phagocytophilum</i> / <i>A. platys</i>
Angie	Adulto	Rural	H	7	NEGATIVO	<i>E. canis/ E. ewingii</i>
Perla	Adulto	Urbana	H	6	NEGATIVO	
Princesa	Geriatra	Rural	H	6	NEGATIVO	<i>E. canis/ E. ewingii</i>
Robbie	Adulto	Urbana	M	6	NEGATIVO	<i>E. canis/ E. ewingii</i>
Bambie	Adulto	Rural	H	7	NEGATIVO	
Alana	Adulto	Urbana	H	5	NEGATIVO	
Lucero	Joven	Urbana	H	6	NEGATIVO	
Tina	Adulto	Urbana	H	6	NEGATIVO	
Negro	Adulto	Rural	M	6	NEGATIVO	
Danna	Adulto	Urbana	H	6	NEGATIVO	
Mona	Adulto	Rural	H	6	NEGATIVO	
Luna C	Adulto	Urbana	H	7	NEGATIVO	<i>E. canis/ E. ewingii</i>
Nina	Adulto	Rural	H	5	NEGATIVO	<i>E. canis/ E. ewingii</i>
Luna M	Adulto	Urbana	H	3	NEGATIVO	<i>E. canis/ E. ewingii</i>
Zeus	Adulto	Urbana	M	7	NEGATIVO	
Kira	Geriatra	Urbana	H	9	NEGATIVO	
Lucrecia	Adulto	Urbana	H	8	NEGATIVO	<i>A.phagocytophilum</i> / <i>A. platys</i>
Sally	Juvenil	Rural	H	7	NEGATIVO	<i>E. canis/ E. ewingii</i>

No se puede descartar la prevalencia total de este nematodo debido a que estamos en épocas de cambios climáticos, aumentando la exposición a los vectores, lo que se ve reflejado en otros estudios realizados en el país. Igualmente, la población total es muy alta y se necesitaría un muestreo mayor al que se realizó en este trabajo para determinar en la totalidad la presencia de *Dirofilaria immitis*.

Adicional a los resultados de *D. immitis*, el test 4Dx de Idexx nos entrega resultados a anticuerpos de *E.canis/E.ewingii*, *A.phagocytophilum/A.platys* y *B. burgdorferi* los cuales fueron entregados para los intereses de la Fundación protectora de animales.

Población total: 20.

Otras enfermedades.	Positivos	%
<i>Ehrlichia canis/ E. ewingii</i>	8	40%
<i>Anaplasma phagocytophilu/ A. platys.</i>	1	5%
<i>Borrelia burgdorferi</i>	0	0
<i>Ehrlichia sp. / Anaplasma sp.</i>	1	5%

El 50% de los animales da como resultado negativo.

Discusión

A pesar de que la prevalencia de *Dirofilaria immitis* en nuestro estudio fue del 0% los resultados encontrados en un estudio realizado en tres ciudades del país: Medellín, Barranquilla y Cartagena, fueron similares en la ciudad de Medellín, teniendo como

resultado una prevalencia del 0% a diferencia de Barranquilla y Cartagena, donde se encontró una prevalencia del 1% y 3% respectivamente. No se puede descartar la posible presencia de este nematodo en el municipio de Dosquebradas ya que en comparación a este estudio hay una diferencia en cuanto al número de individuos muestreados(17).

Conclusiones y recomendaciones.

Para determinar la presencia de una *Dirofilaria immitis* en las muestras que procesamos es necesario realizar un estudio más específico y conciso frente a la presencia de anticuerpos sobre este parásito o sus diferentes especies.

Cómo recomendación para futuros trabajos proponemos el abarcar una población más grande y no solo una parte específica del municipio, teniendo en cuenta más los animales de procedencia rural que de procedencia urbana, al igual, se recomienda seguir trabajando con el test IDEXX que nos ofrece una mayor especificidad y sensibilidad frente a otros test.

Agradecimientos.

Agradecemos primordialmente a la Fundación Protectora de animales de Dosquebradas por su apoyo y su entrega total a la hora de realizar nuestro estudio, al doctor Cesar Ospina por prestarnos su tiempo, por su buena voluntad y por el interés que mostraba hacia nuestro estudio. Al tutor, Juan Carlos Gonzales, por guiarnos en el camino correcto a la hora de realizar este trabajo y a todas las personas que hicieron que nuestro trabajo fuera posible.

BIBLIOGRAFIA:

1. Mircean M, Ionică AM, Mircean V, Györke A, Codea AR, Tăbăran FA, et al. Clinical and pathological effects of *Dirofilaria repens* and *Dirofilaria immitis* in a dog with a natural co-infection. *Parasitol Int* [Internet]. 2017;66(3):331–4. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S138357691730065X>
2. Elena M, Klinge S, Calvo P, Claudia R, Mutis A. Una zoonosis presente en el mundo. *Vet Dermatol*. 2011;
3. Meireles J, Paulos F, Serrão I. *Dirofiliose canina e felina*. *Rcpv*. 2014;109:591–2.
4. G Alzate SOL gomez. Detección de antígenos de *Dirofilaria immitis* en caninos del Área Metropolitana del Valle de Aburrá. 2006;19(47):280–90.
5. Olaya E. Diagnostico hematológico y caracterizacion de patógenos transmitidos por vectores en caninos de la ciudad de Guayaquil. 2015;34. Available from: http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/51384/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=3
6. Fernández De Araoz S, Uceda PV, Gallegos González J. Caso clínico : *Dirofilaria immitis* . Sintomatología y alteraciones laboratoriales. *Canis et Felis*. 2015;105–21.
7. Acu P, Ch A, Mart S, Mart S, Mart S. Determinación de la prevalencia de *Dirofilaria immitis* en los distritos de San martin de Porres, Rimac y cercado de Lima. 2002;13(2):108–10.
8. Vezzani D, Eiras DF, Wisnivesky C. *Dirofilariasis* in Argentina: Historical review and first report of *Dirofilaria immitis* in a natural mosquito population. *Vet Parasitol*. 2006;136(3–4):259–73.
9. Fernandez K, Ayora P. Diagnóstico de *Dirofilaria inmitis* en perros de la ciudad de Guayaquil mediante tres métodos de laboratorio. *Univ Nac Loja*. 2017;6:41–7.

10. Actuales DC. Directrices Caninas Actuales para la Prevención, Diagnóstico y Gestión de la Infección de *Dirofilaria immitis* en Perros.
11. TroCCAP © 2017. Directrices para el diagnóstico, tratamiento y control de endoparásitos caninos en los trópicos. 2017;1:1–46. Available from: <http://www.troccap.com/2017press/wp-content/uploads/2018/05/TroCCAP-Canine-Endo-Guidelines-Spanish.pdf>
12. Gomez LF, Alzate GJ, Orozco SC. Reporte de un caso de *Dirofilaria immitis* en un perro. Hallazgo de antígenos y confirmación del parásito a la necropsia. Rev Col Cienc Pec [Internet]. 2006;19(1):10. Available from: http://bibliotecadigital.udea.edu.co/dspace/bitstream/10495/7837/1/Gomez_L_2006_Dirofilaria_immitis_necropsia.pdf
13. Sixtos C. Procedimientos y técnicas para la realización de estudios coproparasitológicos. 2014;No 24(24):1–12. Available from: <http://www.webveterinaria.com/virbac/news25/compania.pdf>
14. Jw B, Dp L. Body Condition System fue desarrollado en Nestlé Purina Pet Care Center. 2002;23(August 1997):8–9. Available from: <http://vhc.missouri.edu/wp-content/uploads/2015/07/BodyConditionScoreCharts.pdf>
15. Inc. IL. SNAP 4Dx Plus Test. IDEXX Lab [Internet]. 2014;80924. Available from: http://www.idexx.ca//view/xhtml/en_ca/smallanimal/inhouse/snap/4dx.jsf?SSOTOKEN=0
16. Bastidas, Zoleida; Colmenarez D, García, Martha; Saldivia J, Perdomo, Carmen; D León L. *Dirofilaria immitis* en Caninos del Barrio “Las Clavellinas” en Barquisimeto – estado Lara. Univ Centroccidental “Lisandro Alvarado” Decanato Ciencias Vet Hosp Vet Cabudare, Estado Lara Venez [Internet]. Available from: <https://revistacmvl.jimdo.com/suscripción/volumen-13/dirofilaria-inmitis/>
17. Mccown ME, Monterroso VH, Cardona W. Monitoreo de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, y *Dirofilaria immitis* en perros

de tres ciudades en Colombia. 2015;224–31.