



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO
DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS



**Prevalencia y factores de riesgo en filariasis caninas diagnosticadas por
PCR en perros domiciliados de la ecorregión de Centro, Tabasco.**

TRABAJO RECEPCIONAL DE TESIS

Que para obtener el Título de

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Presentan:

**Andrés Manuel Torres Sánchez
Gonzalo Eduardo Santiago López**

Directores:

**M.C. Guadalupe Arjona Jiménez
M.C. Oswaldo Margarito Torres Chablé**

Villahermosa, Tabasco, septiembre de 2017.



UNIVERSIDAD JUÁREZ
AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



DIVISIÓN ACADÉMICA DE
CIENCIAS AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE ESTUDIOS TERMINALES

Asunto: Autorización de Impresión de
Trabajo Recepcional bajo la
Modalidad de: Tesis.

Fecha: 20 de septiembre de 2017.

LIC. MARIBEL VALENCIA THOMPSON,
JEFA DEL DEPARTAMENTO DE CERTIFICACIÓN Y
TITULACIÓN DE LA UJAT.
PRESENTE.

Por este conducto y de acuerdo a la solicitud correspondiente por parte del interesado(a), informo a usted, con base al artículo 86 del Reglamento de Titulación Vigente en esta Universidad, que la Dirección a mi cargo **autoriza** a los **CC. C. Andrés Manuel Torres Sánchez**, matrícula **112C13092**, y **Gonzalo Eduardo Santiago López**, matrícula **112C13117**, ambos egresados del Programa Educativo de **Medicina Veterinaria y Zootecnia**, de la División Académica de Ciencias Agropecuarias, **la impresión de su trabajo recepcional** bajo la modalidad de **Tesis**, Titulado: **"Prevalencia y factores de riesgo en filariosis caninas diagnosticadas por PCR en perros domiciliados en la ecoregión de Centro, Tabasco"**.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE


DR. ROBERTO FLORES BELLO
DIRECTOR

U.J.A.T.



DIVISIÓN ACADÉMICA DE
CIENCIAS AGROPECUARIAS
DIRECCIÓN

C.c.p.- Expediente Alumno.

Archivo
DR.RFB/MC.AMA 

Miembro CUMEX desde 2008

Consortio de
Universidades
Mexicanas

UNA ALIANZA DE CALIDAD POR LA EDUCACIÓN SUPERIOR

Km 25 de la carr. fed. 195, tramo Villahermosa-Teapa
Ra. La Huasteca, 2ª sección, 86298, Centro, Tabasco, México
Tel. (+52 993) 3581500-Ext. 6614
Correo electrónico: terminalesdaca@gmail.com

www.ujat.mx

www.facebook.com/ujat.mx | www.twitter.com/ujat | www.youtube.com/UJATmx

A quien corresponda:

Los que suscriben, autorizan por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto física como digitalmente la tesis de Licenciatura denominada "Prevalencia y factores de riesgo en filariosis caninas diagnosticadas por PCR en perros domiciliados de la ecorregion de Centro, Tabasco." De la cual somos autores y titulares de los Derechos de autor.

La finalidad del uso por parte de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de la tesis antes mencionada, será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa mas no limitativa para subirla a la Red Abierta de Bibliotecas Digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la Universidad tenga relación institucional.

Por lo antes manifestado, liberamos a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que se pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la tesis mencionada y para los fines estipulados en este documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Villahermosa, Tabasco a los días del mes de del año

Autorizan



Andrés Manuel Torres Sánchez



Gonzalo Eduardo Santiago López

Contenido

Contenido de Cuadros	IV
Contenido de Figuras	V
Abreviaturas	VI
Dedicatoria	VIII
Resumen	IX
1.- Introducción	1
1.1.- Justificación.....	3
1.2.- Objetivo general.....	3
1.3.- Objetivos específicos.....	3
2.- Revisión de literatura	4
2.1.- Filarias que infectan a caninos.....	4
2.2.- <i>Dirofilaria immitis</i>	5
2.2.1.- Clasificación taxonómica de <i>D. immitis</i>	6
2.2.2.- Ciclo evolutivo.....	6
2.3.- <i>Acantocheilonema reconditum</i>	8
2.3.1.- Taxonomía de <i>A. reconditum</i>	8
2.3.2.- Ciclo evolutivo de <i>A. reconditum</i> y su desarrollo en <i>Ctenocephalides felis</i>	8
2.4.- Métodos diagnósticos en la determinación de filarías en perros.....	9
2.4.1.- Frotis de gota gruesa.....	9
2.4.2.- Prueba de Knott modificada	10
2.4.3.- Prueba de quantitative buffy coat	10
2.4.4.- Uso de la PCR para la identificación de filarias.....	10
3.- Materiales y métodos	12
3.1.- Área de estudio.....	12
3.2.- Determinación del tamaño de muestra	13
3.3.-Determinación de la prevalencia de filarias en perros de la ecorregión Centro.....	15
3.4.-Determinación de los factores de riesgo epidemiológicos.....	16
3.5.- Análisis de los datos epidemiológicos recolectados en la encuesta.....	18
3.6.- Toma de la muestra de sangre para la identificación de microfilarias en perros.....	19
3.7.- Determinación de las especies de filarias por medio de PCR en sangre de perros.....	20
3.7.1.- Extracción del ADN.....	20

3.7.2.-Cebadores y reacción de PCR	21
4.0.- Resultados.....	23
5.0.- Discusión.....	26
6.0.- Conclusiones.....	29
7.0.- Literatura citada.....	30

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

Contenido de Cuadros

	Página
Cuadro 1. Censo canino 2014 del estado de Tabasco, México.....	13
Cuadro 2. Bases para la estimación de la condición corporal en caninos.....	18
Cuadro 3. Cebadores utilizados durante la PCR para identificación de filarias.....	21
Cuadro 4.- Variables evaluadas en los perros y su coeficiente de correlación con la infección de <i>D. immitis</i>	24

Contenido de Figuras

	Página
Figura 1. Ubicación geográfica de la ecorregión Centro en el estado de Tabasco.....	12
Figura 2. Encuesta aplicada a los dueños de las mascotas.....	16
Figura 3.- Productos de PCR de ADN de sangre canina positivos a <i>D. immitis</i> empleando los cebadores DIDR F1 y DIDR R1.....	23

Abreviaturas.

°C: Grados centígrados

µl: Microlitros

µm: Micra

A. dracunculoides: *Acanthocheilonema dracunculoides*

A. grassi: *Acanthocheilonema grassi*

A. reconditum: *Acanthocheilonema reconditum*

ADN: Acido desoxirribonucleico

C. canis: *Ctenocephalides canis*

C. felis: *Ctenocephalides felis felis*

D. immitis: *Dirofilaria immitis*

D. repens: *Dirofilaria repens*

dNTPs: Dinucleótidos

EDTA: Etileno Diamino Tetra Acético

g: gravedad

GBIF: Global Biodiversity Information Facility (Facilidad de Información Global sobre la Biodiversidad)

GPS: Geoposicionamiento Satelital

h: hora

H. spiniger: *Heterodoxus spiniger*

HCl: Ácido clorhídrico

INEGI: Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática

ITS2: Internal Transcribed Spacer, se refiere al ADN situado en entre la subunidad grande y la subunidad pequeña ribosomal (localizado entre los genes 16S y 23S que codifican para ARNr).

KCl: Cloruro de potasio

mg: Miligramos

MgCl₂: Cloruro de Magnesio

min: minutos

ml: Mililitros

mM: Milimolar

msnm: Metros sobre el nivel del mar

NaCl: Cloruro de Sodio

OR: Odds Ratio, Razón de momios.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

pH: Potencial de Hidrógeno.

s: segundos

SDS: Duodecil Sulfato de Sodio

SPSS: Statistical Package for the Social Sciences (software estadístico).

SSA: Secretaría de Salud.

Taq polimerasa: Polimerasa *Thermus Aquaticus*

u: Unidad enzimática

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

Dedicatoria Gonzalo.

En primer lugar quiero agradecer a mis profesores, personas de gran sabiduría, quienes se han esforzado por superarse y a su vez con dedicación, me transmitieron conocimientos, los cuales me han ayudado a llegar al punto en el que me encuentro.

Por sus justas y adecuadas palabras que enderezaban mi trayectoria como estudiante, sencillo no fue el proceso, pero gracias a eso he logrado importantes objetivos como culminar el desarrollo de mi tesis con éxito y obtener una afable titulación, por eso y más ¡MUCHAS GRACIAS!

A mis compañeros, con lo que compartí inolvidables experiencias, tanto buenas, como momentos de frustración, de los cuales aprendí que no importa que tan difícil este la situación, siempre se puede salir adelante.

Especialmente y con sincero afecto a mi amigo Andrés, quien me invito a formar parte de este proyecto, ha sido un gran compañero de estudios, un gran compañero de trabajo y ahora un compañero más de la vida.

A las personas que desde el comienzo de la carrera y hasta el final, me brindaron su confianza, misma que sirvió de motivación y por la cual realizo mis trabajos con ética y de la manera más profesional posible.

A mis amigos, por su apoyo incondicional, a los que tengo cerca y a los que a pesar de la distancia, siempre encuentran la forma de estar, más que amigos han sido hermanos.

A mis hermanas, por motivarme a salir adelante y por todo el apoyo que siempre me han brindado.

A mis padres

Gonzalo y Laura, por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad, muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que se incluye este.

Me formaron con reglas y algunas libertades, pero al final de cuentas, me motivaron constantemente para alcanzar mis anhelos. Con cariño e infinito agradecimiento, de ustedes es el mérito y espero haber dejado cumplida su más grande ilusión.

A mis consentidos.

W.N.K.R.B.D.O.C.E.J.L.R.

PARA USTEDES.

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS ANDRES.

DEDICO ESTE TRABAJO A MI HIJO CON MUCHO AMOR, YA QUE DESDE SU LLEGADA HA SIDO MI INSPIRACIÓN DEL DÍA A DÍA Y PODER LOGRAR SER UN BUEN EJEMPLO Y GUÍA PARA EL.

AGRADEZCO A DIOS por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes.

A MI PADRE por apoyarme en todo momento, por los valores inculcados y la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida, pero sobre todo por ser un excelente ejemplo a seguir.

A MI MAMÁ, quien me regalo la dicha de vivir, siempre dando toda su confianza y amor incondicional para seguir adelante.

A mi COMPAÑERA DE VIDA que en todo momento me apoyo y me brindo su confianza y amor, siempre estuvo cuando la necesite, de principio a fin.

A MIS AMIGOS por confiar y creer en mí y haber hecho mi etapa universitaria un trayecto de vivencias que nunca olvidare.

GRACIAS A TODOS LOS MAESTROS Y EN ESPECIAL A LOS ASESORES, QUE ME BRINDARON LOS CONOCIMIENTOS NECESARIOS PARA EMPRENDER UN NUEVO CAMINO Y FORMACIÓN COMO MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Resumen.

Se realizó un estudio para estimar la prevalencia y los factores de riesgo en filariasis caninas identificadas por PCR en perros domiciliados de la ecorregión de Centro, Tabasco. Un total de 334 perros domiciliados fueron muestreados en el presente estudio. Se tomó una muestra de sangre de la vena cefálica de cada perro y se colocaron en tubos Vacutainer® de 4 ml con EDTA. Se recopilaron diversos datos referentes a las características de los perros y del ambiente peridomiciliario para identificar los factores de riesgo. Las muestras de sangre fueron inicialmente analizadas mediante las técnicas de frotis de gota gruesa y Knott modificada, y posteriormente se identificó la especie mediante PCR. Un total de seis perros resultaron positivos a la infección de *Dirofilaria immitis* mediante las tres técnicas. La variable desparasitación fue altamente correlacionada con la presentación de la infección ($\chi^2= 4.95$, $gl= 1$, $P= 0.02$). *D. immitis* fue la única especie de filaria encontrada en los perros de la ecorregión de Centro, Tabasco. La prevalencia de *D. immitis* en los perros estudiados fue baja (1.79 %). No desparasitar a los perros al menos una vez cada seis meses fue el único factor de riesgo relacionado con la infección de *D. immitis*. Ningún otro factor inherente a los perros o al ambiente domiciliario fue considerado factor de riesgo asociado a la infección por *D. immitis*, aunque estos resultados pueden estar influenciados por el bajo número de perros positivos.

1.- Introducción.

El estado de Tabasco se localiza en el trópico húmedo mexicano, lo cual le confiere un ambiente propicio para la proliferación de filarias debido a las condiciones climáticas de calor y humedad (Cancrini et al., 2003; Corimanya et al., 2004; Genchi et al., 2009), además de encontrarse en el mismo ambiente los hospedadores intermediarios y definitivos involucrados en los ciclos biológicos de esta familia de nemátodos (Otranto and Dantas-Torres, 2010).

Dirofilaria immitis (*D. immitis*) afecta a caninos principalmente, en menor medida a felinos, otras especies animales y al hombre (Sim et al., 2013). Aunque esta especie de filaria ha sido la más estudiada y relacionada con las infecciones en caninos, existen otras como *Acanthocheilonema reconditum* (*A. reconditum*), *Dirofilaria repens* (*D. repens*), *Acanthocheilonema dracunculoides* (*A. dracunculoides*) y *Acanthocheilonema grassi* (*A. grassi*) que también son capaces de ocasionar infecciones en caninos que pueden ser subdiagnósticadas o desconocidas (Bolio et al., 2002).

En México, algunos estudios han demostrado la presencia de estos nemátodos en caninos. Un estudio llevado a cabo en caninos en la ciudad de Mérida, Yucatán, reportó una prevalencia de 12.15% mediante las pruebas de frotis de gota gruesa y necropsia. De estos casos, 6.54% fueron positivos a *D. immitis* y 7.47% fueron infectados por *A. reconditum*. Además, reportaron dos casos de filariasis mixta y tres casos presentaron microfilaruria por *A. reconditum* (Rodríguez et al., 1994).

Otro estudio reportó la prevalencia de dirofilariasis canina en seis ciudades de México mediante la técnica de Knott modificada encontrando 64 casos positivos que representaron el 6.2% del total de muestras estudiadas. La frecuencia en perros de Ciudad Victoria, Cuernavaca, Ciudad de México, Guadalajara, Veracruz y Villahermosa fueron de: 13, 0.4, 2.7, 3.8, 9.2 y 15.6% respectivamente (Sámano et al., 1996).

Otros investigadores estudiaron 94 muestras de sangre obtenidas de perros de tres ciudades de México (48 de la ciudad de México, 31 del estado de Puebla y 15 de Cunduacán, Tabasco). Las frecuencias de infecciones en las muestras obtenidas por medio de Quantitative Buffy Coat (QBC) fueron 0, 38.7 y 73.3% para la ciudad de México, Puebla y Tabasco, respectivamente (Bautista et al., 2001).

Un estudio reciente realizado en Villahermosa, Tabasco, reportó una prevalencia general de 24.41% de la cual 19.76% fue debida a *D. immitis* y 4.65% a *A. reconditum*, utilizando las técnicas de frotis de gota gruesa y Knott modificada. En este estudio el color de pelaje blanco y el grado de pureza de raza fueron factores de riesgo de importancia en la epidemiología de estas infecciones en caninos (Torres-Chable et al., 2012).

A pesar de los estudios llevados a cabo en nuestro país y en el estado, la mayoría de los estudios han estado limitados al uso de técnicas microscópicas para la determinación de filariasis, con limitantes como baja sensibilidad y errores en la determinación de las especies de filarias encontradas. El diagnóstico mediante técnicas moleculares en especial la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha contribuido a mejorar el diagnóstico de las filariasis, principalmente en la identificación de especies (Mar et al., 2002, Rishniw et al., 2006). Por tanto, el objetivo del presente estudio fue determinar la prevalencia y las especies de filarias que infectan a perros en el municipio de Centro, Tabasco, mediante el uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

1.1.- Justificación

La importancia en la determinación de algunos parámetros epidemiológicos de estas infecciones en caninos de Tabasco, radica en la abundancia de perros domiciliados (261, 930 de acuerdo a la SSA del estado en 2014) considerados los principales hospedadores definitivos de estas especies de filarias, una elevada cantidad de artrópodos vectores (mosquitos, garrapatas, pulgas y piojos) presentes en el ambiente y en los perros. Además los crecientes reportes en otras regiones del mundo de personas infectadas con filariasis ocular, pulmonar y cardiaca

(Sathyan et al., 2006; Pampiglione et al., 2009) hace necesaria la generación de información confiable a fin de tomar medidas de control y prevención, contribuyendo de este modo a salvaguardar la salud pública en nuestra región.

1.2.- Objetivo general.

- Estimar la prevalencia y los factores de riesgo en filarías caninas identificadas por PCR en perros domiciliados de la ecorregión de Centro, Tabasco.

1.3.- Objetivos específicos.

- Identificar mediante PCR las especies de filarías que infectan a perros domiciliados en la ecorregión de Centro, Tabasco.
- Identificar factores de riesgo relacionados con los hospedadores caninos a estudiar.
- Identificar factores de riesgo relacionados al micro-ambiente de cada hogar que puedan intervenir en la presencia de perros infectados.
- Estimar la prevalencia general y por especie de filarías en la ecorregión de Centro, Tabasco.

2.- Revisión de literatura.

La presente revisión de literatura aborda aspectos generales de las filarias que afectan a caninos, su clasificación taxonómica, su ciclo biológico, estudios de distribución alrededor del mundo, en nuestro país y en el estado de Tabasco. Así también se discutirán algunos aspectos relacionados con las técnicas de diagnóstico y algunas ventajas que ofrece la técnica de PCR para identificación de filarias.

2.1.- Filarias que infectan a caninos.

Las filariasis son enfermedades distribuidas alrededor del mundo y son causadas por parásitos del género *Dirofilaria* de la familia *Onchocercidae* estos nemátodos pueden infectar a una gran variedad de mamíferos domésticos y silvestres de varios órdenes como son *Artiodactyla*, *Carnivora*, *Edentata*, *Lagomorfa*, *Perisodactyla*, *Primates* y *Rodentia* (Canestri et al., 1997; Genchi et al., 2011).

Diversas especies de filarias han sido diagnosticadas en caninos domésticos y salvajes, sin embargo, *D. immitis* y *D. repens* han sido consideradas las de mayor patogenicidad en caninos y humanos (Irwin and Jefferies, 2004). Otras especies como *Acanthocheilonema spp*, *Brugia malayi*, *Brugia pahangi*; *Brugia ceylonensis*, *Acanthocheilonema grassi* (*Cercopithifilaria grassi*), *Microfilaria auquieri*, *Microfilaria ochmanniy* y una nueva especie denominada *Novel spp.* han sido reportadas en perros de la India y a pesar de que son consideradas de menor patogenicidad se considera que estas filarias que afectan al perro son potencialmente zoonóticas (Szell et al., 2001; Megat Abd Rani et al., 2010).

Otra especie de filaria que ha sido reportada principalmente en infecciones oculares en perros y humanos ha sido *Onchocerca lupi* aunque no se encuentra estudiado a detalle el papel del perro como hospedador o reservorio de esta especie de filaria se han realizado reportes de casos en varias partes del mundo por lo que se ha considerado que el perro integra un papel importante en la diseminación de esta zoonosis (Komnenou et al., 2002; Otranto et al., 2011).

A. dracunculoides es otra filaria diagnosticada en perros domésticos de Asia, Europa y África (Wolfe et al., 1971; Schwan and Schroter, 2006). Por su parte, *A. reconditum* ha sido reportada en perros en varias regiones del mundo incluyendo nuestro país (Rodríguez et al., 1994); la pulga del gato, *Ctenocephalides felis* (*C. felis*) ha sido considerada el hospedador intermediario de esta filaria (Napoli et al., 2014).

Como se puede ver, existe una variedad de especies de filarias que afectan al perro doméstico, y algunas de ellas tienen un potencial zoonótico elevado, por lo que el estudio de estas filariasis debe enfocarse principalmente a la identificación de zonas endémicas y un enfoque relevante deberá otorgarse al estudio de los artrópodos considerados vectores de estos nemátodos (mosquitos, pulgas y piojos) quienes pueden estar ocasionando infecciones en humanos.

En México han sido reportadas *D. immitis* y *A. reconditum* por lo cual en la siguiente revisión se dará mayor énfasis a estas filarias.

2.2.-*Dirofilaria immitis*.

Este nemátodo causa la enfermedad conocida como “Heartworm” o gusano del corazón del perro en sus hospedadores definitivos que son principalmente el perro doméstico (*Canis familiaris*) y canidos silvestres como el coyote (*Canis latrans*) y el lobo (*Canis lupus*), aunque puede infectar a una gran cantidad de mamíferos que incluyen zorros, osos, leones marinos, primates no humanos y humanos (Magalhães, 1887; Gómez, 2006; Lee et al., 2010).

Los primeros reportes de *D. immitis* se atribuyen a las observaciones realizadas por Birago en 1626 en el norte de Italia, sin embargo fue hasta 1856 cuando Leydi realizó una descripción morfológica del nemátodo y asignó el nombre de especie *immitis* (Furtado et al., 2010). El primer reporte de infecciones humanas probablemente fue realizado en 1887 cuando dos nemátodos fueron recobrados del ventrículo derecho de un niño en Brasil (Magalhães, 1887).

2.2.1.- Clasificación taxonómica de *D. immitis*.

La clasificación taxonómica de *D. immitis* de acuerdo a López-Neyra (1947) ha sido descrita de la siguiente forma:

Reino: *Animalia*

Phylum: *Nemathelminthes*

Clase: *Nematoda*

Subclase: *Secernestacida*

Orden: *Spirurida*

Superfamilia: *Filarioidea*

Familia: *Onchocercidae*

Género: *Dirofilaria*

Especie: *immitis*

2.2.2.- Ciclo evolutivo.

Los parásitos de *D. immitis* se encuentran en su estado adulto (L₅) en el ventrículo derecho y la arteria pulmonar de sus hospedadores definitivos (López-Neyra, 1947) especialmente en el perro doméstico (*Canis lupus familiaris*). La hembra de este nemátodo después de reproducirse desarrolla los huevos en el útero, estos se encuentran envueltos en una membrana vitelina, cuando el embrión se extiende, la membrana que lo rodea se alarga y forma una vaina que lo cubre. Al nacimiento esta membrana se pierde y se libera el embrión directamente en la sangre llamado microfilaria (L₁). Estas microfilarias son depositadas en la sangre desde la arteria pulmonar posteriormente son llevadas a los pulmones, a la cámara izquierda del corazón y a todo el sistema circulatorio. Algunos investigadores han mencionado que esta especie de filaria tiene marcada periodicidad nocturna en la sangre periférica, otros investigadores afirman que tiene periodicidad en sangre periférica en horas crepusculares para tener mayor relación con los mosquitos que son sus hospedadores intermediarios. En regiones de una elevada prevalencia los diagnósticos más precoces se hacen hacia el primer año de vida, mientras que en

muchas áreas el diagnóstico se hace entre los tres y 15 años de edad (Quiroz, 1990; Taylor et al., 2007).

Los mosquitos (hembras) al alimentarse de un animal infectado, ingieren sangre conteniendo microfilarias circulantes L₁, estas migran al intestino y después de un lapso de 24 a 35 horas a los túbulos de Malpighi para desarrollar el segundo estado juvenil L₂. Después de nueve días se desarrolla la larva L₃ y mide alrededor de 900 µm de largo y aparece entre los 10 a 20 días después de haber ingresado al mosquito, en la última fase infectiva las microfilarias (L₃) migran a las partes bucales de su hospedador intermediario para poder infectar a un mamífero cuando el mosquito vuelva a alimentarse (Quiroz, 1990).

El desarrollo de la forma infectiva o larva L₃, requiere una temperatura ambiente de 27 °C, y el desarrollo no se lleva a cabo a una temperatura de 14 °C, como resultado se cree que la dirofilariasis causada por *D. immitis* tiene ciertas limitaciones geográficas, además de poder presentar cierto nivel de estacionalidad, lo cual puede ser importante consideración en un programa profiláctico. Sin embargo, el calentamiento global parece estar incrementando las zonas geográficas en las cuales las infecciones caninas o humanas causadas por *D. immitis* se presentan (Brown et al., 2012).

Cuando el mosquito ingiere sangre, la larva L₃ penetra en el hospedero definitivo por el sitio de la picadura para completar su desarrollo, 9 a 12 días después de ingresar, se realiza el tercer cambio a L₄ en los tejidos, que regularmente son tejido subcutáneos o serosas (Kotani and Powers, 1982). El cuarto estadio juvenil mide 25 mm, estos empiezan a migrar al lado derecho del corazón como L₅ después de 60 a 70 días (Taylor et al., 2007).

Los machos adultos alcanzan de 14 a 19 cm de largo y las hembras de 23 a 31 cm en un periodo de tiempo 174 a 223 días. El período reproductivo del parásito comprende entre los 2 a 5 años y el período de vida es de 5 a 7 años (Kotani and Powers, 1982).

2.3.- *Acantocheilonema reconditum*.

A. reconditum es un nemátodo filarioideo que causa infecciones principalmente en tejido subcutáneo de perros domésticos. Se ha considerado como hospedadores intermediarios y vectores a las pulgas del perro, *Ctenocephalides canis* (*C. canis*) y del gato, *Ctenocephalides felis* (*C. felis*). Algunos estudios señalan que este nemátodo tiene una amplia distribución mundial, además se ha reportado como un parásito zoonótico capaz de causar infecciones en diversos tejidos de seres humanos (Brianti et al., 2012).

2.3.1.- Taxonomía de *A. reconditum*.

La clasificación taxonómica de *A. reconditum* de acuerdo con la Global Biodiversity Information Facility (GBIF) y la descripción de acuerdo Soulsby (1987) en donde se ha reemplazado el subgénero *Dipetalonema* por *Acanthocheilonema* (Soulsby, 1987) quedando de la siguiente manera:

Reino: *Animalia*

Phylum: *Nemathelminthes*

Clase: *Nematoda*

Orden: *Spirurida*

Superfamilia: *Filaroidea*

Familia: *Setariidae*

Género: *Acantocheilonema*

Especie: *Reconditum*

2.3.2.- Ciclo evolutivo de *A. reconditum* y su desarrollo en *Ctenocephalides felis*.

Los parásitos adultos se encuentran en el tejido subcutáneo de perros infectados, la hembras grávidas producen miles de microfilarias las cuales entran a la circulación sanguínea y permanecen allí hasta que un vector competente las

ingiere al alimentarse (Grassi and Calandruccio, 1890). Diferentes especies de artrópodos han sido reconocidos como vectores competentes de esta filaria, larvas infectivas han sido encontradas en los piojos *Heterodoxus spiniger* (*H. spiniger*) y *Linognathus setosus* (Nelson, 1962); en las pulgas *C. canis*, *C. felis*, *Echidnophaga gallinacea*, *Pulex irritans* y *Pulex simulans* (Nelson, 1962). La pulga del gato *C. felis* es considerada el vector principal de esta filaria (Grassi and Calandruccio, 1890); en esta especie se desarrollan hasta alcanzar sus estadios infectantes.

El ciclo evolutivo de este nemátodo en la pulga *C. felis* ha demostrado el desarrollo de las microfilarias hasta alcanzar la larva infectante L₃. Las pulgas infectadas de forma experimental mostraron que puede observarse una L₁ viable el segundo día post-infección (275 µm de longitud y 5.6 µm de ancho), el día 13 post-infección se encontró el estadio L₂ (950 µm de longitud y 26 µm de diámetro) y finalmente, el tercer estadio larvario L₃ fue recuperado el día 15 post-infección (1150 µm de longitud y 28 µm de diámetro) lo que posiciona a *C. felis* como un hospedador intermediario de *A. reconditum* (Napoli et al., 2014).

2.4.- Métodos diagnósticos en la determinación de filarías en perros.

Existen diversos métodos y pruebas diagnósticas para realizar la determinación de las infecciones causadas por filarias en perros y gatos. Los métodos van desde la microscopía directa hasta técnicas avanzadas como la PCR y secuenciación genética para identificar especies. Existen métodos con diferentes porcentajes de sensibilidad y especificidad, costos y dificultad en su empleo y con diferentes resultados debido al complejo entendimiento del ciclo biológico de este nemátodo.

2.4.1.- Frotis de gota gruesa.

Para la realización de esta prueba se toma sangre periférica, se coloca una pequeña gota de sangre en un portaobjetos, posteriormente se coloca un cubreobjetos y se observa al microscopio para identificar las microfilarias. Existe una pequeña variación de este método que es el añadir una gota de solución salina

fisiológica, para diluir un poco la gota de sangre y observar con mayor claridad la morfología y movilidad de las microfilarias.

2.4.2.- Prueba de Knott modificada.

Esta prueba consiste en la concentración de microfilarias por centrifugación mediante hemólisis con formol al 2%. Primero se colocan 9 ml de sangre con Etileno Diamino Tetra Acético (EDTA) y 1 ml de formol al 2%, posteriormente se centrifugan por 3 minutos a 1500 rpm. Después de centrifugar se elimina el sobrenadante y se obtiene el sedimento, al cual se le añaden 2 o 3 gotas de azul de metileno se mezclan perfectamente y se observan al microscopio para determinar la presencia de microfilarias y determinar su especie mediante su morfología (Hendrix y Sirois, 2007).

2.4.3.- Prueba de quantitative buffy coat (QBC).

Para realizar la detección de microfilarias circulantes en sangre periférica por medio de la técnica del QBC, se requiere de igual forma tomar una muestra de sangre con EDTA, posteriormente se toma una muestra con un tubo capilar de QBC, el cual contiene naranja de acridina (colorante fluorescente), posteriormente la muestra es centrifugada empleando para tal efecto la centrifuga del QBC (IDEXX Vet Autoread), al centrifugar la sangre los parásitos se tiñen con el colorante y se concentran en la capa leucoplaquetaria (buffy coat), las microfilarias fluorescen y pueden entonces ser observadas con un microscopio de luz ultravioleta (Hendrix y Sirois, 2007).

2.4.4.- Uso de la PCR para la identificación de filarias.

La identificación de cada especie de filaria es importante para poder determinar los daños patológicos en los animales y tomar las medidas de precaución relacionados con la capacidad zoonótica de cada especie (Genchi et al., 2001). Así por ejemplo, mientras que infecciones causadas por *A. reconditum* y *A. dracunculoides* tienen muy pocas o ninguna relevancia clínica conocida, las

infecciones causadas por *D. immitis* y *D. repens* suelen ser de consecuencias patológicas más graves causando daño pulmonar, cardiaco, ocular y sistémico (Tarello, 2002; Cancrini et al., 2003; McCall et al., 2008).

Las técnicas de diagnóstico que involucran el uso de microscopía (frotis de gota gruesa, Knott modificado y quantitative buffy coat) tienen el inconveniente de que la identificación de especie es difícil y ocasionalmente se torna imposible el poder diferenciar la especie. Otro de los factores que disminuyen la especificidad de las técnicas de microscopía son las infecciones mixtas, en donde dos o más especies de filarias pueden encontrarse en un mismo hospedador (Genchi et al., 1992).

En la clínica el diagnóstico de *D. immitis* es regularmente llevado a cabo por medio de pruebas rápidas que determinan antígenos, sin embargo otras especies de filarias no pueden ser identificadas e inclusive es conocido que aproximadamente el 1% de las infecciones causadas por *D. immitis* pueden ser infecciones caracterizadas por presentar microfilaremias persistentes y ser negativas a pruebas antigénicas (Watier-Grillot et al., 2011).

La PCR ha demostrado ser una técnica capaz de identificar la especie de filaria a partir de una muestra de ADN (la muestra biológica de elección es en su mayoría sangre entera debido a que las filarias envían microfilarias al torrente sanguíneo). En este sentido, múltiples cebadores han sido desarrollados para poder llevar a cabo la reacción de PCR y poder identificar la especie de filaria (Rishniw et al., 2006).

3.- Materiales y métodos.

3.1.- Área de estudio.

El presente estudio se llevó a cabo de enero de 2016 a enero de 2017 en la ecorregión del "Centro" en el estado de Tabasco, México, ubicado entre las coordenadas 18° 39' - 17° 19' de latitud Norte, 90° 57' - 94° 8' longitud Oeste y una altura de 10 msnm. El clima es tropical húmedo con abundantes lluvias en verano (af), la temperatura promedio en la zona es de 26° C, con mínimas de 15 y máximas de 44° C y una humedad relativa de 80% (INEGI, 2015).



Figura 1.- Ubicación geográfica de la ecorregión Centro en el estado de Tabasco.

La región de Centro cuenta con una extensión de 2,572.8 km² y comprende los municipios de Centro (cuya cabecera municipal es Villahermosa, la capital del estado) Jalpa de Méndez y Nacajuca. La vegetación predominante es de pastizales con escasa presencia de selva subperennifolia cerca de las zonas con suelos inundables antes destinados a agricultura de temporal pero que debido al crecimiento poblacional de la ciudad de Villahermosa han sido destinados para asentamientos humanos. El comercio y la ganadería bovina son las principales actividades económicas (Ramos-Hernández, 2013).

3.2.- Determinación del tamaño de muestra.

Para determinar el tamaño de muestra de la población canina se utilizó el Censo Canino 2014 (Cuadro 1), el cual fue proporcionado por la Secretaría de Salud (SSA) del Estado de Tabasco.

Cuadro 1.- Censo canino 2014 del estado de Tabasco, México.

N°	Municipio	N
1.	Balancán	13, 350
2.	Cárdenas	32, 146
3.	Centla	12, 126
4.	Centro	47, 289
5.	Comalcalco	27, 961
6.	Cunduacán	12, 336
7.	Emiliano Zapata	3, 341
8.	Huimanguillo	30, 483
9.	Jalapa	3, 940
10.	Jalpa de Méndez	11, 659
11.	Jonuta	4, 846
12.	Macuspana	21, 485
13.	Nacajuca	7, 882
14.	Paraíso	12, 165
15.	Tacotalpa	5, 359
16.	Teapa	4, 135
17.	Tenosique	11, 427
Total		261,930

SSA del estado de Tabasco. N: Población total de perros por municipio.

Se utilizó una prevalencia esperada del 50% debido que se desconoce este dato en el lugar de estudio y este valor se considera el más conservador, indicando que existe la misma posibilidad de encontrar o no el objeto de estudio en la

población, y se utilizó la fórmula para determinación de un tamaño de muestra de poblaciones finitas y conocidas (Murray and Larry, 2009).

$$n = \frac{N}{1 + \frac{e^2(N-1)}{Z^2 pq}}$$

Donde:

n= Tamaño de muestra.

N= Tamaño de la población.

e= Error admitido (3%)

Z= Valor de tabla para el nivel de confianza 1- α otorgado (97%).

P= Frecuencia esperada del factor a estudiar (50% = 0.5).

q= 1-p

Sustituyendo los valores en la formula estadística se obtiene:

$$n = \frac{261930}{1 + \frac{0.03^2 (261930 - 1)}{2.17^2 (0.5)(0.5)}} = 1302$$

La cantidad de perros para todo el estado de Tabasco es de 1302 perros, sin embargo, para obtener la muestra de la ecorregión Centro se decidió realizar un muestreo estratificado con asignación de tipo proporcional empleando la formula siguiente:

$$ni = n \frac{Ni}{N}$$

Donde:

n_i = Muestra representativa del estrato.

n = Muestra total.

N_i = Población total dentro del estrato.

N = Población total.

De tal forma que al sustituir los datos se obtiene lo siguiente:

$$n_i = 1302 + \frac{66830}{261930} = 332$$

Un total de 332 perros fueron muestreados al azar en la ecorregión de Centro, la asignación proporcional y al azar fue realizada colocando los nombres de todas las localidades de la ecorregion del Centro y seleccionando localidades de forma aleatoria mediante el programa estadístico IBM SPSS versión 22 (IBM Corporation, Armonk, NY).

3.3.- Determinación de la prevalencia de filarias en perros de la ecorregión Centro.

Para determinar la prevalencia de perros infectados por las microfilarias en estudio se utilizó la fórmula general de prevalencia:

$$P_t = \frac{C_t}{N_t}$$

Donde:

P_t = La prevalencia estimada en el tiempo justo en que se realiza el estudio.

C_t = El número total de casos que resultan positivos durante ese período.

N_t = El número total de individuos estudiados durante ese período de tiempo.

3.4.- Determinación de los factores de riesgo epidemiológicos.

Para determinar los factores de riesgo involucrados en la infección de filarias con capacidad zoonótica y perros se aplicó una encuesta (Figura 3) a los dueños de los perros para recopilar datos relacionados con los perros, el lugar de muestreo (casas y patios) y las personas que habitan la casa. Los datos fueron capturados mediante la hoja de encuesta y posteriormente en una hoja de cálculo de Excel para su análisis mediante el programa estadístico.

DATOS DEL PERRO			
Nombre:	Raza:	CC (1-5):	Edad:
Talla: CH <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> G <input type="checkbox"/>	Pelaje: Corto <input type="checkbox"/> Medio <input type="checkbox"/> Largo <input type="checkbox"/>	Color:	
Visitas al veterinario: Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	Vacunas: No <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> ¿Cuáles? _____	Desparasitaciones: No <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> Ivermectina <input type="checkbox"/> Otros <input type="checkbox"/> ¿Cuál?	
Alimentación: Comida comercial <input type="checkbox"/> Comida casera <input type="checkbox"/> Restos <input type="checkbox"/> Otro <input type="checkbox"/> ¿Qué? _____	Convivencia con otros animales: No <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> Perro _____ Gato _____ Vaca _____ Caballo _____ Borrego _____ Ave _____ Cerdo _____ Roedores _____	Presencia de Ectoparásitos: No <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> Garrapatas <input type="checkbox"/> Pulgas <input type="checkbox"/> Chinches <input type="checkbox"/> Piojos <input type="checkbox"/> Mosquitos <input type="checkbox"/> Cucarachas <input type="checkbox"/> Roedores <input type="checkbox"/>	
Dormitorio del perro: Dentro de casa <input type="checkbox"/> Fuera de casa <input type="checkbox"/> Ambos <input type="checkbox"/>			
DATOS DEL LUGAR			
Municipio:	Colonia:	Calle:	
Número de casa:	Georeferenciación:		
Tipo de zona: Rural <input type="checkbox"/> Sub-urbana <input type="checkbox"/> Urbana <input type="checkbox"/>			
Tipo de material de construcción: Concreto <input type="checkbox"/> Madera <input type="checkbox"/> Lámina <input type="checkbox"/> Otro: _____	Fuentes de agua cercanas: No <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> Río <input type="checkbox"/> Laguna <input type="checkbox"/> Jagüey <input type="checkbox"/> Otro _____	Presencia de basura: No <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> Hojas <input type="checkbox"/> Plásticos <input type="checkbox"/> Llantas <input type="checkbox"/> Cristales <input type="checkbox"/> Otros: _____	
DATOS DEL PROPIETARIO			
Número de personas en la casa: Niños: _____ Hombres: _____ Mujeres: _____ Adultos mayores: _____	Edad: Niños: _____ Hombres: _____ Mujeres: _____ Adultos mayores: _____	Condición física: Delgados: _____ Normales: _____ Obesos: _____	

Figura 2.- Encuesta que será aplicada a los dueños de los perros muestreados.





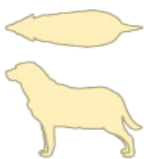
Las variables que presentaron más de dos respuestas fueron convertidas a variables dicotómicas para ser analizadas estadísticamente, las variables inherentes al hospedador canino fueron: 1) Raza (puras no puras), 2) Condición corporal (< 3 y ≥ 3), 3) Edad (≤ 3 o > 3), 4) Visitas al veterinario al menos una vez al año (si, no), 5) Aplicación de vacunas cada seis meses (si, no), 6) Desparasitaciones cada seis meses (si, no) 7) Talla; (chica, grande), 8) Tipo de pelaje (corto, largo), 9) Color del pelaje (claro, oscuro), 10) Presencia de ectoparásitos en los perros (pulgas, garrapatas, piojos, etc.).

Las variables inherentes al domicilio fueron: 1) Tipo de zona (rural o urbana), 2) Tipo de construcción de la casa (concreto, material orgánico de la región), 3) Presencia de basura en el domicilio y peridomicilio (si, no), 4) Presencia de vegetación en el peridomicilio, 5) Presencia de una fuente de agua cercana al peridomicilio (río, laguna, lago etc., dentro de un radio aproximado de 100 m).

La condición corporal de los perros fue estimada de acuerdo a la valoración física del perro de acuerdo a la metodología brevemente descrita en el Cuadro 2, la cual hace referencia a diversos sitios anatómicos del animal, los cuales han sido tomados en consideración para establecer la escala que va desde 1, que es un animal emaciado hasta 5, que es un animal obeso, considerándose 3 la condición óptima (Laflamme, 1997).

Adicionalmente, se realizará la ubicación de las viviendas de los perros muestreados por medio de geoposicionamiento satelital (GPS) con la finalidad de poder ubicar las viviendas en donde se presenten casos positivos. Lo anterior con la finalidad de poder regresar a las localidades y proporcionar a los dueños de los perros el resultado del diagnóstico realizado a su mascota, así como también ofrecer ayuda voluntaria para el restablecimiento de la salud de los perros afectados. Lo anterior fue realizado por consideraciones bioéticas (el presente estudio forma parte de un proyecto, el cual fue avalado por la Comisión de Bioética de Ciencias de la Salud de la UJAT, mediante el oficio 175/DACA emitido el día 17 de septiembre de 2015).

Cuadro 2.- Bases para la estimación de la condición corporal en caninos.

Condición	Características	Silueta
1	Emaciado: Costillas, columna vertebral y pelvis fácilmente visible. Pérdida obvia de masa muscular. No palpable grasa subcutánea en área pélvica.	
2	Delgado: Costillas, apófisis espinosas de las vértebras y pelvis visible, abdomen plegado y grasa subcutánea en área torácica no palpable.	
3	Condición ideal: Costillas, y apófisis espinosas de las vértebras no visibles, pelvis visible ligeramente visible, grasa subcutánea en caja torácica ligeramente palpable.	
4	Sobrepeso: Costillas, apófisis espinosas de las vértebras y pelvis no visibles y difícilmente palpables. Depósitos de grasa en dorso y base de la cola fácilmente visibles.	
5	Obeso: Gran cantidad de depósitos de grasa en tórax, dorso y base de la cola. Abdomen ampliamente distendido.	

Adaptado de Laflamme (1997).

3.5.- Análisis de los datos epidemiológicos recolectados en la encuesta.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa estadístico IBM SPSS versión 22 (IBM Corporation, Armonk, NY). Con las variables consideradas factores de riesgo se construyó un modelo de regresión logística binomial para explicar la presencia de los perros infectados. Las variables sexo, raza, edad, pelaje,

color, tamaño, procedencia, alimentación, visitas al veterinario y todas las demás descritas anteriormente en la encuesta fueron consideradas las variables independientes, mientras que la presencia o ausencia de perros infectados con filarias fue la variable dependiente o de respuesta. El modelo fue realizado con un nivel de confianza del 95 %, calculó los Odds Ratio (OR) y fue considerado significativo cuando $P < 0.05$.

De acuerdo a lo anterior, el modelo de regresión logística binomial fue basado en la explicación de la variable dependiente, categórica y dicotómica (perro infectado vs perro no infectado) bajo el siguiente modelo:

$$\ln\left(\frac{p}{1-p}\right) = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \dots + \beta_K X_K$$

Donde:

$\ln\left(\frac{p}{1-p}\right)$ = Logaritmo natural del OR de la variable dependiente.

β_0 = Se refiere a la intercepción o el valor esperado de la variable, cuando la variable dependiente es igual a cero.

β_1, β_2, \dots = Se refieren a los coeficientes de regresión para las variables independientes X_1, X_2, \dots y se interpretan como el aumento esperado de la variable dependiente, con cada aumento de las variables independientes X_1, X_2, \dots .

3.6.- Toma de la muestra de sangre para la identificación de microfilarias en perros.

Las muestras de sangre fueron obtenidas de la vena cefálica empleando tubos Vacutainer® de 4 ml con EDTA, posteriormente serán identificadas utilizando un número de expediente por cada animal muestreado y preservadas en refrigeración durante su transporte al laboratorio. Cada una de las muestras de sangre canina fué examinada microscópicamente por medio de frotis grueso de sangre y Knott modificado (Hendrix and Sirois, 2007) para determinar positividad o

negatividad a microfilarias, la determinación morfológica de las mismas empleando Knott no se llevó a cabo debido a las múltiples fallas que se han reportado cuando se diagnostican especies de filarias por métodos microscópicos (en su lugar la identificación de especie se llevó a cabo mediante PCR). Posteriormente, las muestras de sangre fueron congeladas y almacenadas a -20°C . Las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente hasta el día de su procesamiento en el laboratorio para la realización de las extracciones de ADN.

3.7.- Determinación de las especies de filarias por medio de PCR en sangre de perros.

Para determinar la presencia de filarias en la sangre de los perros muestreados primero se realizó el descongelamiento de las muestras a temperatura ambiente y posteriormente se procedió a la extracción del ADN de la muestra biológica.

3.7.1.- Extracción del ADN.

La extracción de ADN se llevó cabo utilizando una técnica de sales (Salting-out modificada). Para lo cual 100 μl de sangre anti-coagulada se resuspendieron en 180 μl de solución de lisis de eritrocitos (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, Triton X - 100 al 1% y sacarosa al 11%), la mezcla se incubó cinco minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 18, 000 x g cinco minutos y se descartó el sobrenadante, este paso fue repetido tres veces. Después, 60 μl de solución de lisis de leucocitos (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, NaCl 400 mM y EDTA 2 mM), 10 μl de proteinasa K solución (proteínasa K 1 mg / ml, SDS al 1% y EDTA 2 mM) y 2 μl de SDS al 20 % fueron añadidos. La mezcla se incubó a 65°C por una hora. Posteriormente, fueron añadidos 30 μl de acetato de potasio y se incubaron en hielo húmedo durante 30 minutos. Después, la mezcla fue centrifugada a 18.000 x g quince minutos y el sobrenadante fue recuperado y se colocó en un nuevo tubo de serología (Eppendorf® de 1.5 ml). Posteriormente, se agregaron 200 μl de isopropanol absoluto para precipitar sales de la muestra durante una hora. Después, la muestra fue centrifugada a 18.000 x g durante 15 minutos y se descartó el

isopropanol sobrenadante. Finalmente, la muestra fue lavada con 200 µl de etanol al 70%, se centrifugó 18.000 x g y el etanol fué desechado. El sedimento de ADN obtenido fue secado durante 30 minutos y posteriormente fue resuspendido usando 50 µl de solución de TE (10 mM Tris-HCl, EDTA 1 mM, pH 8.0) este método de extracción fue adecuado de esta manera tomando como base diferente literatura basada en extracción de ADN por el método de Salting-out (Sambrook and Russell, 2001a; Ausubel et al., 2002; Nasiri et al., 2005).

3.7.2.- Cebadores y reacción de PCR.

Se utilizaron cebadores para la identificación de filarias que amplifican la región espaciadora transcrita 2 (ITS2) del ADN ribosomal tanto para *D. immitis* como para *A. reconditum*. Este cebador denominado panfilarial *DIDR-F1* y *DIDR-R1* (forward y reverse respectivamente) es capaz de producir diferentes amplicones dependiendo de la especie de filaria (Cuadro 3). Los cebadores fueron diseñados tomando como base para su elaboración secuencias de cebadores publicadas con anterioridad (Sambrook and Russell, 2001b; Mar et al., 2002; Rishniw et al., 2006).

Cuadro 3.- Cebadores que serán usados durante la PCR para la identificación de las especies de filarias.

Cebador	Secuencia	Región	Origen	Amplicón (pb)
DIDR F1	AGT GCG AAT TGC AGA CGC ATT GAG	5.8S-ITS2-28S	DI-AR	DI= 542 AR= 578 DR= 484 AD= 584 BP= 664 BM= 615 BT= 625 OV= 470
DIDR R1	AGC GGG TAA TCA CGA CTG AGT TGA			

DIDR F1: Cebador forward, DIDR R1: Cebador reverse, DI: *Dirofilaria immitis*, AR: *Acantocheilonema reconditum*, DR: *Dirofilaria repens*, AD: *Acantocheilonema dracunculoides*, BP: *Brugia pahangi*, BM: *Brugia malayi*, BT: *Brugia timori*; OV: *Onchocerca volvulus* (Mar et al., 2002; Rishniw et al., 2006).

Cada reacción de PCR fue realizada usando 1.5 mM MgCl₂, 250 mM dNTPs, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 2.5 U de *Taq* polimerasa y 1 µl de solución de ADN para un volumen total de 20 µl. El procedimiento se realizó iniciando con un paso de desnaturalización a 94°C por 2 min y 32 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s, alineando la muestra 30 s a 60°C, posteriormente, el paso de extensión de 30 s a 72°C y una extensión final de 7 min a 72°C en el termociclador (Eppendorf Mastercycler® Thermalcycler, Brinkmann Instruments Inc., Westbury, NY), el producto obtenido de la PCR (10 µl), se examinó en gel de agarosa a 1.5% y el amplicón obtenido se comparó con controles positivos y negativos para determinar el resultado de la prueba.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

4.0.- Resultados.

Un total de 334 perros fueron muestreados en diferentes localidades de la ecorregión de Centro en el estado de Tabasco. Seis perros fueron diagnosticados positivos a *D. immitis* mediante las técnicas de Frotis de gota gruesa, Knott modificada y PCR. Dos perros tuvieron una carga de microfilarias leve (20 y 90 mf/ml) y cuatro de ellos tuvieron una carga moderada (480 a 690 mf/ml). La prevalencia de perros infectados por *D. immitis* fue de 1.79 %. Tres de los perros positivos fueron encontrados en la ranchería Corregidora Ortiz a orillas del río Mezcalapa, dos perros positivos fueron encontrados en la ranchería Río tinto 3ª sección también en las cercanías al río Mezcalapa y un perro fue encontrado en la colonia Atasta en la ciudad de Villahermosa.

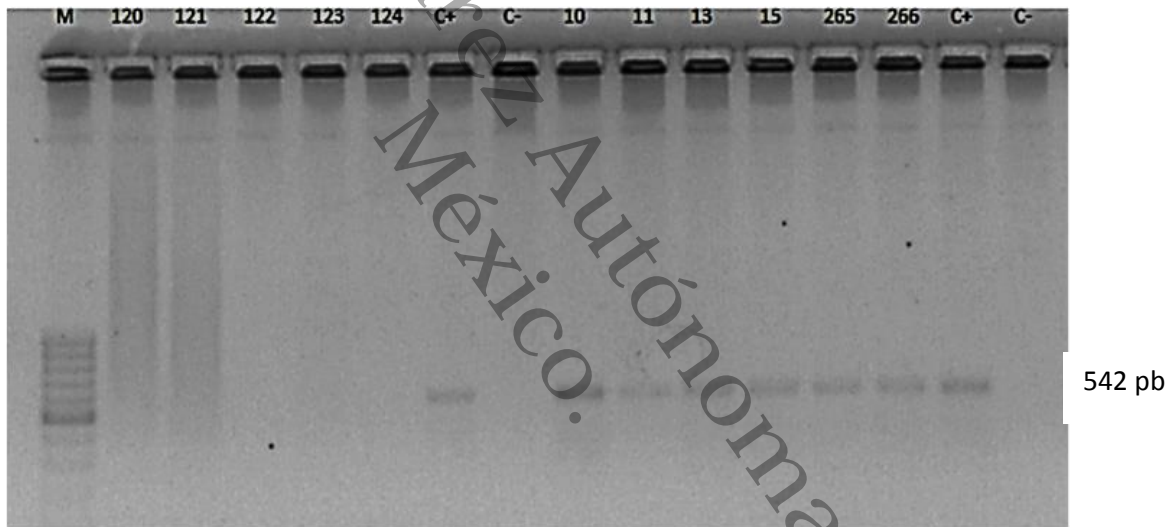


Figura 3.- Productos de PCR de ADN de sangre canina positivos a *D. immitis* empleando los cebadores DIDR F1 y DIDR R1. Se observa el amplicón esperado a aproximadamente 542 pb. M= Marcador de peso molecular Gene Ruler® 100pb DNA Ladder. Fermentas Life Sciences. Carriles 132-148 ADN de muestras de sangre canina. C- = Control canino negativo. C+ = Control canino positivo.

La frecuencia en la que se presentaron las variables estudiadas se pueden observar en el Cuadro 4.

Cuadro 4.- Variables evaluadas en los perros y su coeficiente de correlación con la infección de *D. immitis*.

Variable			R ²
Raza	Cruza 190 (57 %)	Pura 144 (43 %)	-0.97 ^{ns}
CC	1 a 2 (250= 75 %)	3 a 4 (84= 25 %)	-0.74 ^{ns}
Edad	< 3 años (207= 60 %)	>3 años (127= 40 %)	0.025 ^{ns}
Talla	Chica (114= 34 %)	Grande (220= 66 %)	-0.056 ^{ns}
Pelaje	Corto (233= 70 %)	Largo (101= 30 %)	-0.056 ^{ns}
Desparasitación	Si (212= 63 %)	No (122= 37 %)	0.144*
Ectoparásitos	Si (232= 70 %)	No (102= 30 %)	-0.006 ^{ns}
Dormitorio	Dentro (34= 10 %)	Fuera (300= 90 %)	0.05 ^{ns}
Color	Claros (160= 48 %)	Oscuros (174= 52 %)	0.059 ^{ns}

* La correlación es significativa con $P < 0.05$ de dos colas. ns= no significativa. R²= Coeficiente de correlación bivariada de Pearson.

A pesar de que el número de casos positivos fue muy bajo se intentó realizar el análisis de regresión logística binomial si se observaba alguna relación entre las variables independientes y la variable de respuesta.

Se realizaron inicialmente correlaciones bivariadas para seleccionar las variables independientes que serían introducidas en el modelo de regresión logística binaria, sin embargo, únicamente la variable desparasitar (si/no) a los perros se relacionó con la variable dependiente perros infectados o no infectados.

Al no encontrar asociación entre las demás variables independientes y la variable de respuesta debido al bajo número de perros infectados, no fue posible realizar un análisis de regresión logística binomial. Por tanto, se decidió realizar un análisis de χ^2 para determinar directamente la relación entre la variable independiente desparasitación (la única variable que presentó asociación mediante el análisis de correlaciones bivariadas) y la variable dependiente perros infectados o no infectados. La variable desparasitación fue altamente correlacionada con la presentación de la infección ($\chi^2 = 4.95$, gl= 1, $P = 0.02$). Así también, los datos

obtenidos mediante la encuesta aplicada a los dueños de las mascotas mostraron que de los 212 perros que fueron desparasitados dentro de los últimos seis meses previos al muestreo, en 44 de ellos se confirmó el uso de ivermectina. Sin embargo, es destacable que de los seis animales positivos 5 de ellos no tenían historia de desparasitación previa.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

5.0.- Discusión.

La prevalencia obtenida en el presente estudio fue baja comparada con reportes previos en el estado (Sámamo et al., 1996; Torres-Chable et al., 2012) y los reportes en otros estado del sureste de México (Rodríguez et al., 1994; Bolio-Gonzalez et al., 2007). Un factor que podría estar involucrado en la disminución de la prevalencia obtenida es el hecho de que en el presente estudio fueron muestreados únicamente perros domiciliados a diferencia de otros estudios que involucran perros callejeros la cual es una población canina que regularmente presenta prevalencias más elevadas de filariasis (Rodríguez et al., 1994).

Otro factor relevante que pudo haber disminuido drásticamente la prevalencia de *D. immitis* en la ecorregión de Centro puede estar relacionado con el hecho de desparasitar o no al perro al menos una vez cada seis meses (la única variable independiente asociada a la infección) aunque idóneamente se considera que en zonas vulnerables los calendarios de desparasitación deberían de tener una duración menor de alrededor de 3 a 4 meses para mantener protegidos a los perros de la infección. Al respecto, es conocido que los fármacos que pertenecen a la familia de las lactonas macrocíclicas principalmente la ivermectina y más recientemente la selamectina poseen acción en contra de las microfilarias de *D. immitis* (microfilaricida), por tanto su uso continuo interrumpe el ciclo de vida del nemátodo contribuyendo así a disminuir su prevalencia (Shanks et al., 2003), además estos fármacos se caracterizan por tener un efecto de larga duración y controlar las infestaciones de pulgas, garrapatas y otros ectoparásitos que son considerados vectores de otras filarias como *A. reconditum*.

En la actualidad, una gran cantidad de desparasitantes empleados para perros y gatos se basan en el uso de bencimidazoles (febantel, fenbendazol, albendazol), pamoato de pirantel y oxantel combinados con ivermectina (Traversa, 2012), además del uso común de ivermectina inyectable en la práctica clínica veterinaria y el creciente uso de selamectina en pour on (Moraes-da-Silva et al., 2016) con lo cual sería lógico que la prevalencia de *D. immitis* disminuyera en la región del Centro.

Otro hecho importante es que la región de Centro contiene a la capital del estado, la ciudad de Villahermosa y varias villas como Luis Gil Pérez y Ocuitzapotlan que a pesar de que cuentan con grandes poblaciones humanas y caninas, también es donde se concentra el mayor número de clínicas veterinarias. Una búsqueda rápida en internet ([https://veterinario.cybo.com/MX/villahermosa-\(tabasco\)/veterinarios-y-cl%C3%ADnicas-para-animales/?p=3](https://veterinario.cybo.com/MX/villahermosa-(tabasco)/veterinarios-y-cl%C3%ADnicas-para-animales/?p=3)) arroja al menos 100 clínicas veterinarias disponibles para la atención de perros y gatos en Villahermosa y se sabe que muchas más clínicas que no aparecen en internet brindan servicios en la ecorregión de Centro.

Lo anterior, podría posiblemente influenciar a las personas para acudir con el veterinario y llevar a cabo la desparasitación, vacunación, otros cuidados profilácticos y sobretodo recibir educación acerca del manejo y cuidado preventivo de sus mascotas, a diferencia de zonas rurales en otras regiones del estado donde generalmente no hay clínicas veterinarias y su lejanía hacia la ciudad de Villahermosa hace difícil el traslado de las mascotas a una clínica veterinaria y por consiguiente las mascotas no llevan un calendario de desparasitación adecuada quedando más expuestos que aquellos perros que si la reciben.

Por otro lado, cabe destacar que cinco de los seis perros positivos a la infección por *D. immitis* en el presente estudio fueron encontrados en localidades donde las casas se encuentran en las cercanías de los márgenes del río Mezcalapa y Río viejo. Este hecho podría estar directamente correlacionado con una mayor presencia de mosquitos vectores de *D. immitis* que requieren de mantos acuíferos de forma permanente y asociados a materia orgánica. En este sentido algunos mosquitos considerados vectores de *D. immitis* pueden jugar un papel importante. En general varias especies de mosquitos del genero *Anopheles spp.* y especialmente *Anopheles quadrimaculatus* así como *Culex quinquefasciatus* los cuales se encuentran presentes en Tabasco son vectores de *D. immitis* y pueden fácilmente alimentarse de caninos y seres humanos (Brito et al., 1999; Ahid et al., 2000; Fernández et al., 2014).

Con respecto a los factores de riesgo evaluados (variables evaluadas) el bajo número de perros infectados por *D. immitis* en el presente estudio no permite

realizar una determinación estadística correcta. Sin embargo, estudios previos han reportado diferentes resultados. En Mérida, Yucatán un estudio reportó no haber encontrado diferencias entre perros de raza pura y perros no puros (Bolio-Gonzalez et al., 2007) pero contrariamente un estudio realizado en Taiwán reportó una prevalencia mayor en perros no puros (Yuasa et al., 2012). Este factor puede estar relacionado con la forma de vida de estos perros que involucra en muchas ocasiones acceso directo a la vía pública en donde pueden interaccionar con otros animales infectados. La edad ha sido un factor de importancia en otros estudios y se encuentra relacionada con el largo periodo de incubación de *D. immitis*, generalmente perros mayores a dos o tres años tienen mayor riesgo que perros menores a 2 años de edad (Bolio-Gonzalez et al., 2007; Caro-Gonzalez et al., 2011).

Un estudio llevado a cabo en Turquía reportó que los perros de talla grande y que no reciben atención veterinaria se encuentran con un mayor riesgo (Yildirim et al., 2007).

En Villahermosa, Tabasco un estudio previo reportó que el lugar de dormitorio del perro (fuera o dentro de la casa) no influyó sobre la presentación de casos positivos, y los perros de color blanco mostraron un mayor riesgo de contraer la infección (Torres-Chable et al., 2012).

La determinación de los factores de riesgo para filariasis canina causada por *D. immitis* contribuye a comprender el ciclo natural de la enfermedad en cada zona geográfica estudiada y la información generada puede ser usada para generar sistemas de intervención que disminuyan o prevengan la infección causada por este parásito con capacidad zoonótica.

6.0.- Conclusiones.

D. immitis fue la única especie de filaria encontrada en los perros de la ecorregión de Centro, Tabasco. La prevalencia de *D. immitis* en los perros estudiados fue baja (1.79 %). No desparasitar a los perros al menos una vez cada seis meses fue el único factor de riesgo relacionado con la infección de *D. immitis*. Ningún otro factor inherente a los perros o al ambiente domiciliario fue considerado factor de riesgo asociado a la infección por *D. immitis*, aunque estos resultados pueden estar influenciados por el bajo número de perros positivos.

México.

Autónoma de Tabasco.

7.0.- Literatura citada.

- Ahid, S.M.M., Vasconcelos, P.S.d.S., Lourenço-de-Oliveira, R., 2000. Vector competence of *Culex quinquefasciatus* say from different regions of Brazil to *Dirofilaria immitis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 95, 769-775.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J., Struhl, K., 2002. *Short Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing and Wiley-Interscience New York.
- Bautista, G., Arroyo, R., Velasco, C., Canto, O., 2001. Comparación de las pruebas Quantitative Buffy Coat, Frotis Grueso de Sangre y Observación Directa para el diagnóstico de la infección por *Dirofilaria immitis* en perros. *Veterinaria México* 32, 153-156.
- Bolio-Gonzalez, M.E., Rodriguez-Vivas, R.I., Sauri-Arceo, C.H., Gutierrez-Blanco, E., Ortega-Pacheco, A., Colin-Flores, R.F., 2007. Prevalence of the *Dirofilaria immitis* infection in dogs from Merida, Yucatan, Mexico. *Vet Parasitol* 148, 166-169.
- Bolio, M., Montes, A., Gutierrez, C., Alonso, F., Bernal, L., Sauri, C., Rodríguez-Vivas, R., 2002. Hallazgos clínicos en perros parasitados por *Dipetalonema dracunculoides*. *Archivos de medicina veterinaria* 34, 283-286.
- Brianti, E., Gaglio, G., Napoli, E., Giannetto, S., Dantas-Torres, F., Bain, O., Otranto, D., 2012. New insights into the ecology and biology of *Acanthocheilonema reconditum* (Grassi, 1889) causing canine subcutaneous filariasis. *Parasitology* 139, 530-536.
- Brito, A.C., Fontes, G., da Rocha, E.M., Rocha, D.A., Regis, L., 1999. Development of *Dirofilaria immitis* (Leidy) in *Aedes aegypti* (L.) and *Culex quinquefasciatus* (say) from Maceio, Alagoas, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94, 575-576.
- Brown, H.E., Harrington, L.C., Kaufman, P.E., McKay, T., Bowman, D.D., Nelson, C.T., Wang, D., Lund, R., 2012. Key factors influencing canine heartworm, *Dirofilaria immitis*, in the United States. *Parasites & vectors* 5, 245.

- Cancrini, G., Romi, R., Gabrielli, S., Toma, L., M, D.I.P., Scaramozzino, P., 2003. First finding of *Dirofilaria repens* in a natural population of *Aedes albopictus*. *Medical and veterinary entomology* 17, 448-451.
- Canestri, T., Pampiglione, S., Rivasi, F., 1997. The species of the genus *Dirofilaria*, Railliet & Henry, 1911. *Parassitologia* 39, 369-374.
- Caro-Gonzalez, J.A., Bolio-Gonzalez, M.E., Escobedo-Ortegon, F.J., Manrique-Saide, P., Rodriguez-Vivas, R.I., Rodriguez-Buenfil, J.C., Sauri-Arceo, C.H., 2011. Prevalence of *Dirofilaria immitis* infection in dogs from Celestun, Mexico, using polymerase chain reaction test. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)* 11, 193-196.
- Corimanya, P., Chávez, V., Casas, A., Díaz, C., 2004. Frecuencia de *Dirofilaria immitis* en caninos del distrito de San Juan de Lurigancho. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* 15, 141-144.
- Fernández, R., Vera, H., Calderón, G., 2014. Revisión histórica de la distribución de *Anopheles (Nyssorhynchus) darlingi* (Diptera: Culicidae) en la amazonía peruana. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica* 31, 310-318.
- Furtado, A.P., Melo, F.T., Giese, E.G., dos Santos, J.N., 2010. Morphological redescription of *Dirofilaria immitis*. *The Journal of parasitology* 96, 499-504.
- Genchi, C., Di Sacco, B., Cancrini, G., 1992. Epizology of canine and feline heartworm infection in Northern Italy: possible mosquito vectors. . *Proceedings of Heartworm Symposium*, 39-46.
- Genchi, C., Kramer, L., Prieto, G., 2001. Epidemiology of canine and feline dirofilariasis: a global view. In: Simón, F., Genchi, C. (Eds.), *Heartworm infection in humans and animals*. Ediciones Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain, 121-134.
- Genchi, C., Kramer, L.H., Rivasi, F., 2011. *Dirofilaria* infections in Europe. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)* 11, 1307-1317.
- Genchi, C., Rinaldi, L., Mortarino, M., Genchi, M., Cringoli, G., 2009. Climate and *Dirofilaria* infection in Europe. *Veterinary parasitology* 163, 286-292.

- Gómez, G., 2006. Reporte de un caso de *Dirofilaria immitis* en un perro. Hallazgo de antígenos y confirmación del parásito a la necropsia. Universidad de Antioquia: Facultad de Ciencias Agrarias.
- Grassi, B., Calandruccio, S., 1890. Über haematozoon lewis entwicklungscyclus einer filaria (*F. recondita*) des hudes. . Central Bakt Parasitenk Infectionsk 7, 8-16.
- Hendrix, M., Siros, M., 2007. Laboratory Procedures for Veterinary Technicians. Mosby Elsevier.
- INEGI, I.N.d.E., Geográfica e Informática., 2015. Instituto Nacional De Estadistica Geográfica e Informatica. Mexico.
- Irwin, P.J., Jefferies, R., 2004. Arthropod-transmitted diseases of companion animals in Southeast Asia. Trends in Parasitology 20, 27-34.
- Kommenou, A., Eberhard, M.L., Kaldrymidou, E., Tsalie, E., Dessiris, A., 2002. Subconjunctival filariasis due to *Onchocerca* sp. in dogs: report of 23 cases in Greece. Veterinary ophthalmology 5, 119-126.
- Kotani, T., Powers, K.G., 1982. Developmental stages of *Dirofilaria immitis* in the dog. American journal of veterinary research 43, 2199-2206.
- Laflamme, D., 1997. Development and validation of a body condition score system for dogs. Canine Practice 22, 10-15.
- Lee, A.C., Montgomery, S.P., Theis, J.H., Blagburn, B.L., Eberhard, M.L., 2010. Public health issues concerning the widespread distribution of canine heartworm disease. Trends Parasitol 26, 168-173.
- López-Neyra, C., 1947. Helmintos de los Vertebrados Ibericos.
- Magalhães, P., 1887. Descrição de uma espécie de filarias encontradas no coração humano. Revista dos cursos práticos e theoreticos da Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro 3, 129-215.
- Mar, P.H., Yang, I.C., Chang, G.N., Fei, A.C., 2002. Specific polymerase chain reaction for differential diagnosis of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* using primers derived from internal transcribed spacer region 2 (ITS2). Vet Parasitol 106, 243-252.
- McCall, J.W., Genchi, C., Kramer, L.H., Guerrero, J., Venco, L., 2008. Heartworm disease in animals and humans. Advances in parasitology 66, 193-285.

- Megat Abd Rani, P.A., Irwin, P.J., Gatne, M., Coleman, G.T., McInnes, L.M., Traub, R.J., 2010. A survey of canine filarial diseases of veterinary and public health significance in India. *Parasites & vectors* 3, 30.
- Moraes-da-Silva, M.d.F.C.V., Mendes-de-Almeida, F., Abdalla, L., Merlo, A., Paiva, J.P., Labarthe, N.V., 2016. Selamectin for the prevention of canine *Dirofilaria immitis* infection: field efficacy in client-owned dogs in a high risk area. *Parasites & vectors* 9, 407.
- Murray, R., Larry, 2009. *Estadística*. Mc Graw- Hill México, DF.
- Napoli, E., Brianti, E., Falsone, L., Gaglio, G., Foit, S., Abramo, F., Annoscia, G., Dantas-Torres, F., Giannetto, S., Otranto, D., 2014. Development of *Acanthocheilonema reconditum* (Spirurida, Onchocercidae) in the cat flea *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera, Pulicidae). *Parasitology* 141, 1718-1725.
- Nasiri, H., Forouzandeh, M., Rasaei, M.J., Rahbarizadeh, F., 2005. Modified salting-out method: high-yield, high-quality genomic DNA extraction from whole blood using laundry detergent. *Journal of clinical laboratory analysis* 19, 229-232.
- Nelson, G.S., 1962. *Dipetalonema reconditum* (Grassi, 1889) from the dog with a note on its development in the flea *Ctenocephalides felis* and the louse *Heterodoxus spiniger*. *Journal of helminthology* 36.
- Otranto, D., Dantas-Torres, F., 2010. Canine and feline vector-borne diseases in Italy: current situation and perspectives. *Parasites & vectors* 3, 2.
- Otranto, D., Sakru, N., Testini, G., Gurlu, V.P., Yakar, K., Lia, R.P., Dantas-Torres, F., Bain, O., 2011. Case report: First evidence of human zoonotic infection by *Onchocerca lupi* (Spirurida, Onchocercidae). *The American journal of tropical medicine and hygiene* 84, 55-58.
- Pampiglione, S., Rivasi, F., Gustinelli, A., 2009. *Dirofilaria immitis* human cases in the Old World, attributed to *Dirofilaria immitis*: a critical analysis. *Histopathology* 54, 192-204.
- Quiroz, R., 1990. *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos*. .

- Ramos-Hernández, J., 2013. Plan hídrico integral del estado de Tabasco. In: CONAGUA (Ed.) SEMARNAT, Mexico, 574.
- Rishniw, M., Barr, S.C., Simpson, K.W., Frongillo, M.F., Franz, M., Dominguez Alpizar, J.L., 2006. Discrimination between six species of canine microfilariae by a single polymerase chain reaction. *Veterinary Parasitology* 135, 303-314.
- Rodríguez, V., Domínguez, A., Solís, R., Cob, G., 1994. Prevalencia de *Dirofilaria immitis* en perros callejeros de Mérida, Yucatán, México. *Veterinaria México* 25, 145-148.
- Sámamo, G., Nájera, P., Herrera, R., Quiróz, R., 1996. Frecuencia de *Dirofilaria immitis* en perros de seis ciudades de México. *Veterinaria México* 27, 107-109.
- Sambrook, J., Russell, D., 2001a. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.
- Sambrook, J., Russell, D., 2001b. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*.
- Sathyan, P., Manikandan, P., Bhaskar, M., Padma, S., Singh, G., Appalaraju, B., 2006. Subtenons infection by *Dirofilaria repens*. *Indian journal of medical microbiology* 24, 61-62.
- Schwan, E.V., Schroter, F.G., 2006. First record of *Acanthocheilonema dracunculoides* from domestic dogs in Namibia. *Journal of the South African Veterinary Association* 77, 220-221.
- Shanks, D.J., Gautier, P., McTier, T.L., Evans, N.A., Pengo, G., Rowan, T.G., 2003. Efficacy of selamectin against biting lice on dogs and cats. *The Veterinary record* 152, 234-237.
- Sim, C., Kim, H., Son, H., Jung, J., Ryu, S., Park, B., 2013. Description of peritoneal cavity dirofilariosis caused by *Dirofilaria immitis* (Filarioidea: Onchocercidae) in a dog: a case report. *Veterinari Medicina* 58, 105-108.
- Soulsby, E., 1987. *Parasitología y Enfermedades Parasitarias en los Animales Domésticos*. Interamericana.
- Szell, Z., Erdelyi, I., Sreter, T., Albert, M., Varga, I., 2001. Canine ocular onchocercosis in Hungary. *Vet Parasitol* 97, 243-249.

- Tarello, W., 2002. Cutaneous lesions in dogs with *Dirofilaria (Nochtiella) repens* infestation and concurrent tick-borne transmitted diseases. *Veterinary dermatology* 13, 267-274.
- Taylor, M., Coop, R., Wall, R., 2007. *Veterinary Parasitology*.
- Torres-Chable, O., Garcia-Herrera, R., Peralta-Torres, I., Hernandez-Hernandez, M., Ojeda-Robertos, N., 2012. Prevalence and Risk Factors Associated with Microfilarias Infection in Dogs from Villahermosa, Tabasco, Mexico. *Agricultural Journal* 7, 198-202.
- Traversa, D., 2012. Pet roundworms and hookworms: A continuing need for global worming. *Parasites & vectors* 5, 91-91.
- Watier-Grillot, S., Mari, J.-L., Cabre, O., Davoust, B., 2011. Survey of Canine *Dirofilaria immitis* Infection in New Caledonia. *Veterinary Medicine International* 2011.
- Wolfe, M.S., Aslamkhan, M., Sharif, M., Pervez, E., 1971. *Acanthocheilonema dracunculoides* (Cobbold, 1870) in dogs in Lahore, West Pakistan. *Journal of helminthology* 45, 171-176.
- Yildirim, A., Ica, A., Atalay, O., Duzlu, O., Inci, A., 2007. Prevalence and epidemiological aspects of *Dirofilaria immitis* in dogs from Kayseri Province, Turkey. *Research in Veterinary Science* 82, 358-363.
- Yuasa, Y., Hsu, T.-H., Chou, C.-C., Huang, C.-C., Huang, W.-C., Chang, C.-C., 2012. The comparison of spatial variation and risk factors between mosquito-borne and tick-borne diseases: Seroepidemiology of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma* species, and *Dirofilaria immitis* in dogs. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 35, 599-606.

Prevalencia y factores de riesgo en filariasis caninas diagnosticadas por PCR en perros domiciliados de la ecorregión de Centro, Tabasco

INFORME DE ORIGINALIDAD

6%

ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	docplayer.es Internet	136 palabras — 2%
2	ri.ujat.mx Internet	64 palabras — 1%
3	ri2.bib.udo.edu.ve Internet	47 palabras — 1%
4	www.oalib.com Internet	44 palabras — 1%
5	www.coursehero.com Internet	31 palabras — 1%

EXCLUIR CITAS

ACTIVADO

EXCLUIR FUENTES

DESACTIVADO

EXCLUIR BIBLIOGRAFÍA

ACTIVADO

EXCLUIR COINCIDENCIAS

< 20 PALABRAS