

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 de tres zonas geográficas de México

Carlos Ramón Bautista Garfias ^{*,**}
Manuel Arroyo Rojas^{*}
Oscar Velasco Castrejón^{***}
Ligia Canto Ortiz^{*}

Abstract

The objective of this study was to compare three diagnostic tests: the quantitative buffy coat (QBC) analysis, thick blood smear (TBS) and direct observation (DO) to detect canine *Dirofilaria immitis* infection. Ninety four blood samples were taken from stray dogs from three states of Mexico (48 from Mexico City, 31 from the State of Puebla, and 15 from the State of Tabasco) and were analyzed by QBC, TBS and DO. Additionally, samples from the State of Puebla were also examined by IFAT and ELISA. All samples from Mexico City were negative to *D. immitis* by QBC, TBS and DO. Twelve samples (38.7%) from the State of Puebla were positive by QBC, 10 (32.3%) by TBS and two (6.4%) by DO. From the samples from the State of Tabasco, 11 (73.3%) were positive by QBC, and ELISA for the heartworm antigen, 10 (66.6%) by IFAT, nine (60%) by TBS, and five (33.3%) by DO. Prevalence rates obtained by QBC were 0%, 38.7%, and 73.3% for Mexico City, Puebla and Tabasco, respectively. In general, the sensitivity obtained was 100%, 82.6% and 30.4% for QBC, TBS, and DO, respectively, while the specificity was 100%, for the three tests. It is concluded that the QBC proved to be a relatively simple method for detecting *D. immitis* microfilariae in dogs' blood which could be also useful for the diagnosis of dirofilariosis in human beings.

Key words: QBC, ELISA, IFAT, *DIROFILARIA IMMITIS*, DOGS.

Resumen

El objetivo del presente estudio fue comparar el análisis quantitative buffy coat (QBC), frotis grueso de sangre (FGS) y observación directa (OD) para detectar la infección canina por *Dirofilaria immitis*. Noventa y cuatro muestras de sangre fueron obtenidas de perros de tres estados de México (48 de la ciudad de México, 31 de Puebla y 15 de Tabasco) y fueron examinadas por medio de QBC, FGS y OD; adicionalmente las muestras que tuvieron su origen en Puebla fueron también analizadas por medio de IFI y ELISA. Todas las muestras de la ciudad de México fueron negativas a *D. immitis* por medio de QBC, FGS y OD. Doce muestras (38.7%) de Puebla fueron positivas por medio de QBC, diez (32.3%) por FGS y dos (6.4%) por OD. Once muestras de Tabasco (73.3%) fueron positivas por medio de QBC y ELISA para antígeno del gusano del corazón, diez (66.6%) por IFI, nueve (60%) por FGS y cinco (33.3%) por OD. Las prevalencias obtenidas por medio de QBC fueron 0%, 38.7% y 73.3% para la ciudad de México, Puebla

Recibido el 25 de agosto de 2000 y aceptado el 24 de enero de 2001.

* Departamento de Parasitología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala, Col. Santo Tomás, 11340, México, D. F.

** Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Secretaría de Agricultura, Ganadería Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, Km 11.5 Carretera Federal Cuernavaca-Cuautla, Jiutepec 62550, Morelos, México.

*** Departamento de Parasitología, Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, Secretaría de Salud, Carpio 470, Col. Santo Tomás, 11340, México, D. F.

y Tabasco, respectivamente. En general, la sensibilidad obtenida fue de 100%, 82.6% y 30.4% para QBC, FGS y OD, respectivamente, mientras que la especificidad fue de 100%, para las tres pruebas. El análisis QBC mostró ser un método relativamente simple para detectar microfilarias de *D. immitis* en sangre de perro que podría ser también útil para el diagnóstico de dirofilariasis.

Palabras clave: QBC, ELISA, IFI, DIROFILARIA IMMITIS, PERROS.

Dirofilaria immitis, el gusano del corazón del perro, es también el agente de la dirofilariasis pulmonar en humanos.¹⁻⁴ Diferentes pruebas se han desarrollado para detectar microfilarias de *Dirofilaria immitis* en perros. Éstas incluyen frotis grueso de sangre (FGS), observación directa (OD), inmunofluorescencia indirecta (IFI), ensayo inmunoenzimático estándar (ELISA), entre otras. Más recientemente el análisis cuantitativo buffy coat (QBC) se ha usado para el diagnóstico rápido de parásitos sanguíneos como *Brugia malayi*, *Wuchereria bancrofti*^{5,6} y *Manzonella ozzardi*.⁷ En este contexto, los estudios con QBC para evaluar la detección de microfilarias de *D. immitis* en perros son escasos,^{8,9} dicho método no se ha comparado con más de una prueba.

Con base en lo anterior los objetivos del presente estudio fueron: a) Comparar el análisis QBC, FGS y OD para el diagnóstico de la infección por *D. immitis* en perros; b) determinar la frecuencia de la infección por *D. immitis* en perros de la ciudad de México; Huauclilla, Puebla; y Cunduacán, Tabasco; c) comparar la sensibilidad y especificidad de estos métodos.

Noventa y cuatro muestras sanguíneas fueron colectadas de perros callejeros, de diferentes razas y sexos, provenientes de tres áreas geográficas de México (48 del Centro Antirrábico, en Culhuacán, ciudad de México; 31 de Huahuchinango, Puebla; y 15 de Cunduacán, Tabasco). La edad de los perros osciló desde uno hasta diez años. De la vena cefálica de cada animal se obtuvieron 10 ml de sangre completa: 5 ml de ésta en tubos conteniendo ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, Vacutainer) y los otros 5 ml en tubos sin anticoagulante. Cada muestra fue examinada usando un kit comercial para QBC,⁷ FGS^{10,11} y OD (prueba de Knott modificada).¹² Además de las pruebas anteriores, en el caso particular de las muestras de Cunduacán, Tabasco, también fueron analizadas por IFI¹³ y ELISA para antígeno del gusano del corazón.¹⁴ Esta última prueba fue usada como método de referencia para los otros ensayos con base en el hecho de que la detección de antígeno indica la

infección presente. Los datos fueron analizados para determinar la sensibilidad, y especificidad.^{15,16}

Se observó que todas las muestras de perros de la ciudad de México fueron negativas a microfilarias de *Dirofilaria immitis* por medio de QBC, FGS y OD. Doce (38.7%) muestras provenientes de Puebla fueron positivas por QBC, 10 (32.3%) por FGS y dos (6.4%) por OD. Once muestras de perros de Tabasco (73.3%) fueron positivas por QBC y ELISA, 10 (66.6%) por IFI, nueve (60%) por FGS y cinco (33.3%) por OD (Cuadro 1). Al considerar todas las muestras de las tres áreas geográficas, la sensibilidad fue de 100%, 82.6% y 30.4% para QBC, FGS y OD, respectivamente; mientras que la especificidad fue de 100% para las tres pruebas (Cuadro 2). Tomando en cuenta solamente las muestras de Tabasco, los valores de sensibilidad fueron de 100% para QBC y ELISA; 91% para IFI; y 81.8% y 45.4% para FGS y OD, respectivamente (datos no mostrados); mientras que la especificidad fue de 100% para las cinco pruebas (datos no mostrados).

De acuerdo con los resultados obtenidos por medio de QBC, la frecuencia de la infección por *D. immitis* fue de 0%, 38.7% y 73.3% para los perros de Culhuacán, ciudad de México; Huahuchinango, Puebla; y Cunduacán, Tabasco, respectivamente.

En otro estudio⁹ se demostró que de 99 perros infectados con *D. immitis*, 54.5% y 39.4% fueron detectados por medio de QBC y FGS, respectivamente. También se demostró que el análisis por QBC fue más sensible (55% vs 39%) y eficiente (79% vs 72%) que la prueba de FGS.

En este contexto, las frecuencias obtenidas en el presente estudio usando el análisis por QBC para perros de la ciudad de México (0%) y del municipio de Cunduacán, Tabasco (73.3%), contrastan con los de Sámano et al.,¹⁷ quienes utilizando la técnica de Knott encontraron frecuencias de 2.7% para la ciudad de México y 15.6% para Villahermosa, Tabasco. Estas diferencias pueden estar relacionadas con el método de detección empleado; esto es, el análisis QBC es más sensible y eficiente que la técnica de Knott, como han señalado otros investigadores.⁸ En este sentido, las 11 muestras de Cunduacán, Tabasco, que fueron positivas por ELISA para antígeno del gusano del corazón, también lo fueron por el QBC. Asimismo, la frecuencia fue mayor en los perros de clima cálido (73.3%,

* Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA.

** DiroCheck, Synbiotic, USA.

Cuadro 1
COMPARACIÓN DE LAS PRUEBAS DE QBC, FGS Y OD PARA DETECTAR LA INFECCIÓN POR *Dirofilaria immitis* EN MUESTRAS SANGUÍNEAS DE 96 PERROS DE TRES ÁREAS GEOGRÁFICAS DE MÉXICO*

	Ciudad de México			Huahuchinango, Puebla			Cunduacán, Tabasco**				
	QBC	FGS	OD	QBC	FGS	OD	QBC	FGS	OD	IFI	ELISA
Positivos/total	0/48	0/48	0/48	12/31	10/31	2/31	11/15	9/15	5/15	10/15	11/15
(frecuencia, %)	0	0	0	(38.7)	(32.3)	(6.4)	(73.3)	(60)	(33.3)	(66.6)	(73.3)
Negativos/total	48/48	48/48	48/48	19/31	21/31	29/31	4/15	6/15	10/15	5/15	4/15
(frecuencia, %)	(100)	(100)	(100)	(61.3)	(67.7)	(93.6)	(26.6)	(40)	(66.6)	(33.3)	(26.6)

* Cuarenta y ocho de la ciudad de México; 31 de Huahuchinango, Puebla; y 15 de Cunduacán, Tabasco. QBC: Quantitative Buffy Coat, FGS: frotis grueso de sangre, OD: observación directa.

** En este municipio, además de las otras tres pruebas, también se evaluaron la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el ensayo inmunoenzimático (ELISA).

Cuadro 2
COMPARACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE LAS PRUEBAS DE QBC, FGS Y OD EN LA DETECCIÓN DE MICROFILARIAS DE *D. immitis* EN 96 PERROS DE TRES ÁREAS GEOGRÁFICAS DE MÉXICO.^a

	QBC	FGS	OD
Resultados positivos en perros infectados (n)	23 ^b	19	7
Resultados negativos en perros infectados (n)	0	4 ^c	16 ^d
Resultados positivos en perros no infectados (n)	0	0	0
Resultados negativos en perros no infectados (n)	71 ^e	71	71
Sensibilidad (%) ^f	100	82.6	30.4
Especificidad (%) ^g	100	100	100

^a Cuarenta y ocho de Culhuacán, ciudad de México; 31 de Huahuchinango, Puebla; y 15 de Cunduacán, Tabasco.

QBC: Quantitative Buffy Coat, FGS: frotis grueso de sangre; OD: observación directa.

^b Once perros de Cunduacán, Tabasco, dieron resultados positivos en el ELISA para antígeno del gusano del corazón; los otros 12 animales de Huahuchinango, Puebla, no fueron ni sacrificados ni examinados por el ELISA.

^c Dos perros de Cunduacán, Tabasco, y dos de Huahuchinango, Puebla.

^d Seis perros de Cunduacán, Tabasco, y diez de Huahuchinango, Puebla.

^e Se consideraron 52 animales como no parasitados negativos (48 perros de la ciudad de México que fueron sacrificados y a los que se les practicó la necropsia y cuatro perros de Cunduacán, Tabasco, que fueron negativos a la prueba de detección de antígeno del gusano del corazón por medio del ELISA); los otros 19 perros negativos de Huahuchinango, Puebla, no fueron ni sacrificados ni examinados por el ELISA.

^f Sensibilidad: Positivos verdaderos-falsos negativos/positivos verdaderos por 100.

^g Especificidad: Negativos verdaderos-falsos positivos/negativos verdaderos por 100.

Cunduacán, Tabasco) que en aquellos de clima templado (38.7%, Huahuchinango, Puebla; y 0%, Culhuacán, ciudad de México), esto último concuerda con lo señalado por Sámano et al.¹⁷

Cabe señalar que solamente los perros del Centro Antirrábico de Culhuacán, de la ciudad de México, fueron sacrificados y que en la necropsia no se encontró

ningún ejemplar de *Dirofilaria immitis*. Sin embargo, en una de la muestras sanguíneas de dichos animales se detectó una microfilaria por medio del método QBC, que, con base en sus características morfológicas, fue identificada como *Dipetalonema reconditum*.^{18,19} La información acerca de los estudios de dirofilariasis canina en México continúan siendo escasos y no se le da la aten-

ción necesaria, no obstante que *D. Immitis* representa un riesgo para la salud del hombre.^{20,21} En este contexto, se sabe que en aquellos lugares en los que la frecuencia de dirofilariosis canina es superior al 10% en la población humana este valor se aproxima al 5%.¹⁹

Los resultados preliminares del presente estudio indican que el uso del método QBC es adecuado para el diagnóstico de dirofilariosis canina y que eventualmente esta técnica podría utilizarse para el diagnóstico de dicha parasitosis en humanos.

Referencias

1. Simon F, Muro A, Cordero M, Martin J. A seroepidemiologic survey of human dirofilariosis in Western Spain. *Trop Med Parasitol* 1991;42:106-108.
2. Villanueva EJ, Rodriguez-Perez J. Immunodiagnosis of human dirofilariosis in Puerto Rico. *Am J Trop Med Hyg* 1993;48:536-541.
3. Simon F, Prieto G, Muro A, Cancrini G, Cordero M, Genchi C. Human humoral immune response to *Dirofilaria* species. *Parassitologia* 1997;39:397-400.
4. Milanes-de Campos JR, Barbas CS, Filomeno LT, Fernandez A, Minamoto H, Filho JV. Human pulmonary dirofilariosis: analysis of 24 cases from São Paulo, Brazil. *Chest* 1997;112:729-733.
5. Long GW, Rickman LS, Cross JH. Rapid diagnosis of *Brugia malayi* and *Wuchereria bancrofti* filariosis by an acridine orange/microhematocrit. *J Parasitol* 1990;76:278-281.
6. Freedman D, Berry RS. Rapid diagnosis of bancroftian filariosis by acridine orange staining of centrifuged parasites. *Am J Trop Med Hyg* 1992;47:787-793.
7. Bawden M, Staten D, Malone J. QBC: rapid filaria diagnoses from blood – *Manzonella ozzardi* and *Wuchereria bancrofti*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1994;88:66.
8. Brown SA, Barsanti JA. Quantitative buffy coat analysis for hematologic measurements of canine, feline, and equine blood samples and for detection of microfilaria in dogs. *Am J Vet Res* 1988;49:321-324.
9. Wang LC. Evaluation of quantitative buffy coat analysis in the detection of canine *Dirofilaria immitis* infection: a model to determine its effectiveness in the diagnosis of human filariosis. *Parasitol Res* 1998; 84:246-248.
10. Wardlaw SC, Levine RA. A new technique to blood examination. *Am Sci* 1988;76:592-598.
11. Spielman A, Perrone JB, Teklehaimanot A, Balcha F, Wardlaw SC, Levine RA. Malaria diagnosis by direct observation of centrifuged samples of blood. *Am J Trop Med Hyg* 1988;39:337-342.
12. Tamashiro WK, Powers KG, Levy DA, Scott AL. Quantitative and qualitative changes in the humoral response of dogs through the course of infection with *Dirofilaria immitis*. *Am J Trop Med Hyg* 1985;34:292-301.
13. Chanteau S, Guidi C, Durosoir L. Efficiency of papain-treated microfilariae of *Wuchereria bancrofti* (var. *pacifica*) as antigen for serodiagnosis of bancroftian filariosis in French Polynesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1986;80:795-799.
14. Roth L, Brown L, Foster L, Nelson M, Reczeck D, von Schantz D. Comparison of three diagnostic tests for *Dirofilaria immitis* in low-incidence area. *J Vet Diagn Invest* 1993;5:647.
15. Palmer DF, Cavallaro JJ. Some concepts of quality control in immunoserology. In: Rose NR, Friedman H, editors. *Manual of clinical immunology*. Washington (DC): American Society for Microbiology, 1980:1078-1082.
16. Tizard I. Serologic assays. *J Am Vet Med Assoc* 1982;181:1162-1165.
17. Sámano GRF, Nájera FR, Herrera RD, Quiroz RH. Frecuencia de *Dirofilaria immitis* en perros de seis ciudades de México. *Vet Méx* 1996;27:107-109.
18. Levine ND. *Nematode parasites of domestic animals and man*. Minneapolis (Mn): Burgess, 1985.
19. Gómez-Bautista M, Rojo-Vázquez FA, Guerrero J. Filariosis. En: Cordero-del Campillo M, Rojo-Vázquez FA, editores. *Parasitología veterinaria*. Madrid, España: McGraw-Hill- Interamericana, 1999:679-693.
20. Acha PN, Szyfres B. *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. 2ª ed. Publicación Científica No. 503. Washington (DC): Organización Panamericana de la Salud, 1986.
21. Cancrini G, Allende E, Favia G, Bornay F, Anton F, Simon F. Canine dirofilariosis in two cities of southeastern Spain. *Vet Parasitol* 2000;92:81-86.