

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Escuela Profesional de Medicina Veterinaria



Prevalencia de *Dirofilaria immitis* en caninos (*Canis lupus familiaris*) mediante el uso de las técnicas de Knott modificada e inmunocromatográfica en el distrito de Pacasmayo - La Libertad, 2024

T E S I S

Para Optar el Título Profesional de
MÉDICO VETERINARIO

Presentada por la Bachiller:
CLAUDYA VANESSA TORO TORO

Asesor:
Dr. GIUSSEPE MARTÍN REYNA COTRINA

Cajamarca - Perú

2025



Universidad
Nacional de
Cajamarca
"Núcleo de la Universidad Peruana"

CONSTANCIA DE INFORME DE ORIGINALIDAD

1. Investigador: Claudya Vanessa Toro Toro

DNI: 46643370

Escuela Profesional: Medicina Veterinaria

2. Asesor: Dr. Giuseppe Martín Reyna Cotrina

3. Facultad: Ciencias Veterinarias

4. Grado académico o título profesional: Título Profesional

5. Tipo de Investigación: Tesis

6. Título de Trabajo de Investigación: " Prevalencia de *Dirofilaria immitis* en caninos (*Canis lupus familiaris*) mediante el uso de las Técnicas de Knott modificada e inmunocromatografica en el distrito de Pacasmayo -La Libertad,2024"

7. Fecha de Evaluación: 19/01/2026

8. Software Anti plagio: Turnitin

9. Porcentaje de Informe de Similitud: 17%

10. Código del Documento: oid:::3117:547461301

11. Resultado de la Evaluación de Similitud: Aprobado



Universidad Nacional de Cajamarca
Facultad de Ciencias Veterinarias

Dr. Wilder Quispe Urteaga
Director de la Unidad de Investigación

Fecha Emisión: 19 de Enero del 2026



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En Cajamarca, siendo las once horas treinta minutos del día cinco de Noviembre del dos mil veinticinco, se reunieron los integrantes del jurado calificador, designados por el Consejo de Facultad, con el objeto de evaluar la sustentación de Tesis titulada: **“Prevalencia de *Dirofilaria immitis* en caninos (*Canis lupus familiaris*) mediante el uso de las Técnicas de Knott modificada e inmunocromatográfica en el distrito de Pacasmayo-La Libertad, 2024”**, asesorada por el docente Dr. Giuseppe Martín Reyna Cotrina y presentada por la Bachiller en Medicina Veterinaria: **CLAUDYA VANESSA TORO TORO**

Acto seguido el presidente del jurado procedió a dar por iniciada la sustentación y para los efectos del caso se invitó a la sustentante a exponer su trabajo.

Concluida la exposición de la Tesis, los miembros del jurado calificador formularon las preguntas que consideraron convenientes relacionadas con el trabajo presentado; asimismo, el presidente invitó al público asistente a formular preguntas concernientes al tema.

Después de realizar la calificación de acuerdo a las pautas de evaluación señaladas en el Reglamento de Tesis, el jurado calificador acordó: **APROBAR** la sustentación de Tesis para optar el Título Profesional de **MÉDICO VETERINARIO**, con el calificativo final obtenido de **DIECISIETE (17)**.

Siendo las doce horas y cuarenta y cinco minutos del mismo día, el presidente del jurado calificador dio por concluido el proceso de sustentación.


Dr. ABEL MELCHOR GARCÍA BAZÁN
PRESIDENTE


Dra. CECILIA ELIZABETH PAJARES ACOSTA
SECRETARIA


Dr. JUAN DE DIOS ROJAS MONCADA
VOCAL


Dr. GIUSEPPE MARTÍN REYNA COTRINA
ASESOR

DEDICATORIA

A mis hijas, Luana y Maricielo, porque todo esto es por ustedes. Son mi mayor motivo, mi inspiración diaria y la razón de cada esfuerzo. Que este logro les recuerde que los sueños se alcanzan con constancia y amor, y que la estabilidad que busco es también para su bienestar.

A mis padres, Pedro y Liliana, por ser mi ejemplo de vida y enseñarme que nunca hay que rendirse, que siempre se puede aspirar a más con humildad, trabajo y fe.

A mi querido hermano menor, José Fernando, para que vea que su hermana también puede ser un ejemplo y que con perseverancia todo es posible.

Y a Miguel, mi amor, por estar siempre a mi lado, escuchándome, acompañándome en cada desvelo y alentándome en los momentos difíciles.

Claudya Vanessa Toro Toro

AGRADECIMIENTO

A todos mis docentes universitarios, por haber contribuido con sus enseñanzas, valores y ejemplos a mi formación profesional. Guardo un profundo y bonito recuerdo de mi paso por la universidad gracias a cada uno de ustedes.

De manera especial, expreso mi sincero agradecimiento a mi asesor, Dr. Giuseppe Martín Reyna Cotrina, por su orientación, paciencia y valiosos aportes durante el desarrollo de esta tesis.

A mis tías Gloria y Chanito, por su apoyo incondicional y por cuidar con tanto cariño a mis hijas mientras yo dedicaba tiempo a la elaboración de mi trabajo y a los trámites académicos.

A todos quienes, de manera directa o indirecta, me brindaron su ayuda, comprensión y palabras de aliento, les expreso mi gratitud más sincera.

Claudya Vanessa Toro Toro

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|--|------|
| ÍNDICE DE CONTENIDO | vi |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | viii |
| RESUMEN | ix |
| ABSTRACT..... | x |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| CAPÍTULO I | 4 |
| MARCO TEÓRICO | 4 |
| 1.1. Antecedentes de la investigación..... | 4 |
| 1.2. Bases Teóricas..... | 7 |
| 1.3. Definición de términos básicos | 23 |
| CAPÍTULO II | 25 |
| MARCO METODOLÓGICO | 25 |
| 2.1. Ubicación Geográfica | 25 |
| 2.2. Diseño de la Investigación | 26 |
| 2.3. Métodos de Investigación | 28 |
| 2.4. Población, muestra y unidad de análisis | 29 |
| 2.5. Técnicas e instrumentos de recopilación de información | 30 |
| 2.6. Técnicas para el procesamiento y análisis de la información | 31 |
| 2.7. Equipos y materiales..... | 33 |
| CAPÍTULO III..... | 34 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 34 |
| 3.1. Presentación de Resultados | 34 |
| 3.1. Análisis, interpretación y discusión de resultados..... | 37 |
| 3.1. Contrastación de hipótesis | 42 |
| CAPÍTULO IV..... | 44 |
| CONCLUSIONES..... | 44 |

| | |
|------------------|----|
| CAPÍTULO V | 45 |
| SUGERENCIAS..... | 45 |
| REFERENCIAS..... | 46 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Prevalencia de <i>Dirofilaria immitis</i> en caninos mediante el uso de la técnica de inmunocromatografía en el distrito de Pacasmayo -La Libertad, 2024 (N=120)..... | 34 |
| Tabla 2. Prevalencia de <i>Dirofilaria immitis</i> en caninos mediante el uso de la técnica de Knott modificada en el distrito de Pacasmayo -La Libertad, 2024 (N=120)..... | 35 |
| Tabla 3. Resultados pareados de inmunocromatografía (filas) frente a Knott modificada (columnas) en la detección de <i>Dirofilaria immitis</i> en perros de Pacasmayo - La Libertad, 2024..... | 36 |
| Tabla 4. Índices de concordancia y contraste entre las Técnicas de Knott modificada e inmunocromatografía (n = 120)..... | 37 |

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo determinar la prevalencia de *Dirofilaria immitis* en caninos del distrito de Pacasmayo (La Libertad, Perú) mediante inmunocromatografía y técnica de Knott modificada, y evaluar la concordancia entre ambas pruebas. El diseño del estudio fue descriptivo, transversal, en el que se muestrearon aleatoriamente 120 muestras de sangre a 120 perros en distintos puntos del distrito. Se aplicó inmunocromatografía (Canine heartworm Ag®) para antígeno de *D. immitis* y Knott modificada para la detección de microfilarias. La prevalencia por inmunocromatografía fue 3,33% (IC95%: 0,92–8,31) y por Knott 0,83% (IC95%: 0,02–4,56). La distribución pareada mostró 117 coincidencias (1 positivo/positivo; 116 negativo/negativo) y 3 discordancias (Ag+/Knott–). Hubo acuerdo total = 97,5%, acuerdo positivo (PPA) = 40,0%, acuerdo negativo (NPA) = 98,7% e índice de concordancia de Kappa (κ) = 0,392 (concordancia aceptable). Se concluye que Pacasmayo muestra un escenario de baja prevalencia con mayor detección por antígeno que por métodos de concentración de microfilarias. La concordancia aceptable y el alto acuerdo negativo respaldan el uso complementario de la inmunocromatografía y la técnica de Knott para la vigilancia local de *D. immitis*.

Palabras clave: filariasis, microfilaremia, inmunocromatografía, Knott modificada, concordancia diagnóstica

ABSTRACT

This study aimed to determine the prevalence of *Dirofilaria immitis* in dogs from the Pacasmayo district (La Libertad, Peru) using immunochromatography and the modified Knott test, and to assess agreement between both assays. We conducted a descriptive, cross-sectional study in which venous blood samples were randomly collected from 120 dogs across multiple sites in the district. Immunochromatographic testing (Canine heartworm Ag®) was used to detect circulating *D. immitis* antigen, and the modified Knott test to detect microfilariae. Prevalence by immunochromatography was 3.33% (95% CI: 0.92–8.31) and by the Knott test 0.83% (95% CI: 0.02–4.56). Paired results showed 117 concordant findings (1 positive/positive; 116 negative/negative) and 3 discordant results (Ag+/Knott–). Overall agreement was 97.5%, positive percent agreement (PPA) 40.0%, negative percent agreement (NPA) 98.7%, and Cohen's kappa (κ) 0.392 (acceptable agreement). We conclude that Pacasmayo exhibits a low-prevalence scenario with greater detection by antigen testing than by microfilaria-concentration methods. The acceptable concordance and high negative agreement support the complementary use of immunochromatography and the modified Knott test for local surveillance of *D. immitis*.

Keywords: filariasis, microfilaremia, lateral flow immunoassay, modified Knott test, diagnostic concordance

INTRODUCCIÓN

La dirofilariosis es una enfermedad parasitaria producida por *Dirofilaria immitis* que afecta principalmente a los perros e infrecuentemente a los gatos (1). En Medicina Veterinaria, el perro constituye el principal hospedador definitivo, situando a la dirofilariosis como un problema importante en la parasitología clínica y salud pública (2). La enfermedad se produce por las formas adultas del parásito que provocan patología en las arterias pulmonares (3). Cuando existen infestaciones masivas se pueden encontrar vermes en el lado derecho del corazón, y es cuando mueren, que se dirigen hacia los pulmones, obstruyendo y ocasionando infartos (2). Los signos clínicos descritos van desde pérdida leve de peso e intolerancia al ejercicio, hasta anemia, fatiga durante el ejercicio, tos o insuficiencia cardiaca grave (4).

La situación problemática está ligada a la eco-epidemiología de la enfermedad, debido a que la transmisión depende de mosquitos hospedadores intermediarios obligatorios, que ingieren microfilarias. Tras la inoculación en el hospedador definitivo, las larvas maduran, migrando hacia las arterias pulmonares caudales, dando inicio a la liberación de microfilarias al torrente sanguíneo (5). La presencia de caninos infectados que albergan por años dirofilarias adultas productoras de microfilarias, junto a condiciones ambientales favorables para el vector, son determinantes de la distribución geográfica de la enfermedad y elevan el riesgo para la población humana (6).

Para el diagnóstico de la dirofilariosis, las pruebas de detección de antígeno han mostrado mayor rendimiento que la observación microscópica de microfilarias en sangre, la cual puede arrojar falsos negativos ante cargas parasitarias bajas. Por este motivo, se ha recomendado el uso de ambas técnicas (7). La prevalencia de *D. immitis* en caninos en diferentes áreas del mundo varía entre 0,24% y más de 50%, mientras

que en humanos se han reportado cerca de 300 casos de dirofilariosis pulmonar (6). En Perú, se han realizado algunos estudios sobre prevalencia de dirofilariosis: En el año 2021, en Huánuco se reportó una prevalencia de 3%; en Lima se realizaron varios estudios, reportando prevalencias de 5,5% en 2004 (8), 4,4% en 2003 (9), 4,7% en 2002 (10) y 7,3% también en 2002 (11).

Pese a la carga clínica en caninos y su importancia zoonótica, persisten vacíos en la información local, ya que no se dispone de estimaciones actualizadas y específicas para el distrito de Pacasmayo, a pesar de que la dinámica de transmisión puede variar con la ecología del vector y factores ambientales. Esta falta de datos limita la planificación de intervenciones basadas en el riesgo y limita la priorización de estrategias de prevención y control en la región.

Este estudio se justifica debido a que se requiere cuantificar la prevalencia local mediante un enfoque de diagnóstico que logre capturar tanto la infección por parásitos adultos como por la presencia de microfilarias circulantes. De este modo, la información permitirá orientar la vigilancia y la toma de decisiones clínicas y sanitarias en el distrito de Pacasmayo.

Se espera que los resultados obtenidos en este estudio aporten una evidencia epidemiológica local que resulte útil para la vigilancia de la dirofilariosis canina y por consiguiente la orientación de medidas de prevención y asistenciales en el distrito, contribuyendo a la comprensión de la distribución de la enfermedad y anticipando riesgos zoonóticos. En conjunto, estos resultados brindarán una base científica para fortalecer el control y la prevención de *D. immitis* en Pacasmayo.

Objetivo General:

- Determinar la prevalencia de *Dirofilaria immitis* en caninos mediante el uso de la técnica de Knott modificada y prueba de inmunocromatográfica en el distrito de Pacasmayo – La Libertad.

Objetivos Específicos

- Determinar la prevalencia de *Dirofilaria immitis* en caninos mediante el uso de la técnica de inmunocromatografía.
- Determinar la prevalencia de *Dirofilaria immitis* mediante prueba de i Knott modificada.
- Determinar si existe concordancia estadística entre la técnica de Knott modificada y la prueba de inmunocromatografía.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes de la investigación

1.1.1. Internacionales

En 2016 se realizó un estudio en México con la finalidad de determinar la prevalencia de *Anaplasma spp.*, *Borrelia burgdorferi*, *Dirofilaria immitis* y *Ehrlichia canis* en perros ubicados en diferentes estados del país. Se analizaron 1706 muestras de sangre mediante el SNAP 4DX® de IDEXX® Laboratories. La prevalencia de *D. immitis* fue de 5,3% (12).

Se desarrolló una investigación en Colombia en 2023 con el objetivo de determinar la prevalencia y las condiciones clínico epidemiológicas de *D. immitis* en perros de la ciudad de Bucaramanga. Para ello se utilizaron 501 muestras de sangre mediante la técnica de Woo, Knott e inmunocromatografía. Se encontró una prevalencia de 7,78% (39/501) y se determinó que, del total de animales positivos, solo el 12,82% (5/39) resultaron positivos al test de inmunocromatografía y presentaban microfilarias en sangre (13).

En 2023 se realizó un estudio en Ecuador que tuvo como objetivo determinar la prevalencia de *D. immitis* en un albergue ubicado en el cantón Sucre. Para ello se utilizaron 100 perros aparentemente sanos, se les extrajo una muestra de sangre y se analizó mediante el método de gota gruesa con tinción Wright para la observación microscópica. La prevalencia encontrada fue de 36% y no se encontraron asociaciones significativas entre la presentación de la enfermedad y las variables de edad, sexo, raza y peso (14).

Otro estudio realizado en Ecuador en 2023 tuvo como finalidad determinar la relación entre la presencia de microfilariasis y los parámetros hematológicos en perros de una clínica veterinaria docente de especialidades veterinarias. Con este fin se utilizaron 111 perros que llegaron a consulta a la clínica veterinaria. El análisis de las muestras de sangre se realizó mediante el test de Woo y el test de gota gruesa, encontrando prevalencias de 9,9% y 14,4% para cada método respectivamente (15).

En Colombia, se desarrolló un estudio en 2023 con el objetivo de determinar la frecuencia de *D. immitis* y sus factores de riesgo asociados en perros de compañía del norte de Colombia. Para ello se analizaron 173 muestras de sangre mediante una prueba de inmunocromatografía rápida (RIT) y una prueba de PCR anidada. La prevalencia encontrada mediante la prueba de RIT fue de 53,2% (92/173), mientras que para la prueba de PCR fue de 34,1% (59/173). La positividad a una o ambas pruebas de diagnóstico fue de 60,1% (IC 95%: 53,8 – 67,4). Los principales factores asociados a la presencia de la enfermedad fueron la intolerancia al ejercicio y la trombocitopenia (16).

1.1.2. Nacionales

Se realizó una investigación en 2002 con el objetivo de determinar la prevalencia de *D. immitis* en perros de los distritos de Cieneguilla, Pachacamac y Lurín, en el departamento de Lima. Se tomaron muestras de sangre de 177 perros, las cuales fueron analizadas mediante los métodos microcapilar, test de Knott y ELISA. La prevalencia encontrada fue de $2,8 \pm 2,4\%$ para el método microcapilar y test de Knott y de $7,3 \pm 3,8\%$ para ELISA (11).

En 2002 se realiza otro estudio en tres distritos del departamento de Lima: San Martín de Porres, Rímac y Cercado de Lima. El objetivo fue determinar la prevalencia de *D. immitis* usando tres técnicas de diagnóstico: El método microcapilar, el test de Knott modificado y la técnica de ELISA. Para ello se tomaron muestras de sangre de 124 perros. Las prevalencias halladas fueron de 0,8%, 0,8% y 4,7% para cada técnica respectivamente. Se realizó una prueba que indicó solo 33% de concordancia entre el método microcapilar y el test de Knott, en comparación con la técnica de ELISA; lo que muestra que los dos primeros métodos no pueden reemplazar a ELISA, siendo una técnica mucho más específica, con 100% de especificidad y 87,5% de sensibilidad (10).

En 2003 se realiza un estudio con la finalidad de determinar la prevalencia de *D. immitis* y *Ehrlichia canis* en tres distritos de la ciudad de Lima (Chorrillos, La Molina y San Juan de Miraflores). Se analizaron 140 muestras de sangre con un kit comercial basado en la técnica de ELISA. La prevalencia encontrada fue de 4,4% para *D. immitis* y 16,5% para *E. canis* (17).

En 2004 se desarrolló un estudio que tuvo como objetivo determinar la prevalencia de *D. immitis* en caninos del distrito de San Juan de Lurigancho en Lima. Para ello se tomaron 107 muestras de sangre, las cuales fueron analizadas mediante una prueba enzimática de ELISA (Dirocheck Synbiotic®). La prevalencia encontrada fue de $5,5 \pm 4,7\%$, y no se encontraron diferencias significativas entre las variables de sexo o el tiempo que los perros permanecían en el domicilio (9).

En 2021 se realizó un estudio en Huánuco con el objetivo de determinar la prevalencia de *D. immitis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* y *Ehrlichia canis* en perros de la ciudad de Huánuco. Para ello se tomaron muestras de sangre de 100 perros, y fueron analizadas mediante la prueba SNAP 4Dx PLUS IDEXX®. Las prevalencias encontradas fueron de 78% para ehrlichiosis, 41 % para anaplasmosis, 3% para dirofilariosis y 2% para borreliosis (8).

1.2. Bases Teóricas

1.2.1. Dirofilariosis

El parásito *Dirofilaria immitis* es responsable de la enfermedad ocasionada por estadios jóvenes y adultos que provocan patología en las arterias pulmonares de los perros (3). Los caninos actúan como huésped definitivo, por lo que la reproducción sexual ocurre en las arterias pulmonares y las microfilarias resultantes se liberan en el sistema circulatorio. La enfermedad clínica resulta de la lesión vascular e inflamatoria cardiopulmonar (18). Esta enfermedad también tiene como hospedadores menos adecuados a los humanos y gatos, en los cuales el desarrollo del parásito se modifica de una manera drástica en comparación con los patrones observados en los perros (19).

1.2.2. Clasificación taxonómica

El nemátodo *D. immitis*, agente causal de la dirofilariosis cardiopulmonar canina, se clasifica dentro del filo Nematoda, clase Secernentea, orden Spirurida, suborden Spirurina, superfamilia Filarioidea, familia Onchocercidae y subfamilia Dirofilarinae (18). Esta organización taxonómica, que establece las afinidades del género *Dirofilaria* a partir de criterios biológicos y morfológicos,

ha sido corroborada mediante estudios filogenéticos recientes basados en el gen del ARN ribosomal pequeño subunitario (ssu rRNA) (20).

La familia Onchocercidae está compuesta por aproximadamente 75 géneros que presentan microfilarias en la sangre o en la piel de sus hospederos. La transmisión ocurre a través de vectores hematófagos, los cuales, al alimentarse de sangre o tejidos dérmicos, ingieren las microfilarias. Este mecanismo permite que los parásitos adultos se establezcan en tejidos corporales sin conexión directa con el medio externo, como las meninges, el sistema linfático y los vasos sanguíneos, en lugar de hacerlo en órganos que se comunican con el exterior, tales como el tracto intestinal o el sistema traqueal (18).

1.2.3. Morfología

Los gusanos adultos de *D. immitis* presentan una forma filiforme característica. Las hembras alcanzan longitudes de 250 a 300 mm con un diámetro de 1 a 1,3 mm, mientras que los machos miden entre 120 y 200 mm de largo y poseen un diámetro de 0,7 a 0,9 mm (21).

Las microfilarias, correspondientes al primer estadio larval, circulan en el torrente sanguíneo y presentan dimensiones de 290 a 330 μm de longitud y 5 a 7 μm de diámetro. Morfológicamente, se caracterizan por poseer una cola recta y un extremo cefálico de forma fusiforme (22). Estas microfilarias no se encuentran envainadas, lo que resulta útil para diferenciarlas de otras filarias caninas en preparaciones de Knott (23).

1.2.4. Ciclo Biológico y transmisión

La dirofilariosis es una enfermedad parasitaria heteroxénica en la que el perro y otros cánidos actúan como hospedadores definitivos, y donde se alojan los adultos de *D. immitis*, produciendo microfilarias; y en donde los mosquitos culícidos son los hospedadores intermediarios o vectores en los que las microfilarias ingeridas con la sangre evolucionan hasta larvas infectantes de tercer estadio (L3). La transmisión al perro se da cuando una hembra de mosquito previamente infectada realiza hematofagia y deposita L3 que penetran a través de la lesión de la picadura en el hospedador definitivo. En la naturaleza, diversos géneros participan como vectores competentes, principalmente son hembras de las especies *Aedes*, *Culex* y *Anopheles*, aunque también se han reportado en especies como *Ochlerotatus*, *Coquillettidia*, *Armigeres*, *Mansonia* y *Psorophora*; y la competencia vectorial varía por especie, cepa y condiciones ambientales de cada localidad (24,25). Varios de estos vectores se alimentan indiscriminadamente de perros y humanos, lo que resulta en una ocurrencia zoonótica en áreas endémicas (26).

Un aspecto importante del ciclo biológico de la dirofilariosis es el lugar y cómo se desarrolla el parásito dentro del vector. Tras la ingestión, las microfilarias pasan a través del intestino y migran hacia los túbulos de Malpighi, en donde mudan hacia L1, L2 y L3. Llegadas a esta fase, abandonan los túbulos y migran hacia el aparato bucal desde donde se inocularán cuando el mosquito realice hematofagia en el hospedador definitivo (27).

1.2.4.1. Etapas del ciclo

Etapa extrínseca: Los mosquitos, al alimentarse de sangre de un huésped definitivo, ingieren las microfilarias, es decir, la etapa producida por dirofilarias hembra adultas, que circulan en el torrente sanguíneo de los animales infectados. Las microfilarias se desarrollan dentro del artrópodo a larvas de primer estadio (L1) y luego mudan dos veces, a larvas de segundo estadio (L2) y finalmente a larvas infecciosas de tercer estadio (L3). El periodo que toma el desarrollo de las larvas desde su ingestión depende de factores como la temperatura ambiental y la especie de mosquito (28). Entre 24 y 26 °C el periodo de desarrollo puede completarse en 10 a 12 días; mientras que, a 18°C, este puede tomar hasta 29 días (29).

Etapa intrínseca: En el perro, una vez que las larvas son inoculadas en el tejido subcutáneo, las L3 permanecen cerca del punto de entrada y realizan la muda a L4 entre 4 a 23 días post infección. Las L4 migran por tejidos subcutáneos e intramusculares durante varias semanas y mudan a L5 (adultos jóvenes) en un periodo de 50 a 58 días. Los primeros parásitos alcanzan la arteria pulmonar hacia 70 días post infección, ubicándose en su sitio definitivo a los 120 días aproximadamente. La patencia (aparición de microfilarias en sangre) se observa en promedio a los 180 días post infección (18).

1.2.4.2. Factores que favorecen la transmisión

La transmisión efectiva del parásito requiere la coincidencia de perros microfilarémicos disponibles para la alimentación del mosquito vector, vectores competentes y en cantidad suficiente para completar la incubación extrínseca, y condiciones térmicas que permitan alcanzar el umbral de desarrollo a L3. En la

transmisión de *D. immitis* existe el concepto de Heartworm Development Units (HDU), que se utiliza para estimar el potencial de transmisión del parásito en función de la temperatura ambiental. Este se define a partir de la diferencia entre la temperatura media diaria y el umbral de 14°C, valor por debajo del cual no se produce un desarrollo larvario en el mosquito vector. La suma de estas diferencias a lo largo de los días permite calcular el total de HDU acumulados, y se ha establecido que, al alcanzar un aproximado de 130 HDU, las microfilarias ingeridas evolucionan hasta larvas L3 infectantes en el vector, posibilitando así la transmisión del parásito (30). En Sudamérica, modelos realizados para Argentina, Chile y Uruguay mostraron picos estacionales de riesgo durante fines de primavera y verano, con un declive en otoño, demostrando que HDU es aplicable para inferir ventanas de transmisión a escala local (31).

Otro de los factores que intervienen en la transmisión es la presencia de vectores de los géneros *Aedes*, *Culex* y *Anopheles*, y la competencia entre ellos, que puede ser alta en especies invasoras o locales adaptadas a medios urbanizados. Se han comprobado tasas de desarrollo altas en condiciones experimentales, y la llegada de L3 al probóscide en 8 a 16 días en especies receptivas (27). Asimismo, la presencia de fuentes de agua estancada, precipitación y humedad llegan a modular la densidad de mosquitos. A escala continental, en Europa, el cambio climático y la movilidad de perros se han asociado a la expansión de *Dirofilaria* en nuevas áreas (32). Finalmente, la alta proporción de perros sin quimioprofilaxis incrementa el número de fuentes de microfilarias, sosteniendo la transmisión (3).

1.2.5. Epidemiología

1.2.5.1. Distribución geográfica

La dirofilariosis presenta distribución cosmopolita en perros, con mayores prevalencias históricas en zonas tropicales y subtropicales, y expansión hacia regiones templadas impulsada por la movilidad de hospedadores y el cambio climático que favorece a los vectores culícidos (33). En América, la infección está ampliamente establecida en la franja de regiones cálidas y húmedas. Diferentes revisiones regionales localizan las infecciones desde Norteamérica hasta Sudamérica, con diferencias entre países atribuidas al clima, densidad de vectores, cobertura de profilaxis y diseño de medidas de vigilancia (34).

En Sudamérica, análisis realizados a gran escala muestran prevalencias relevantes en caninos ubicados en zonas costeras y ribereñas, con ventanas de transmisión concentradas en el verano y primavera (35). En países como Brasil, se han informado de prevalencias elevadas (23%), especialmente en zonas costeras y ambientes con disponibilidad de fuentes para los mosquitos, lo que confirma el peso de las condiciones ecológicas locales (36).

1.2.5.2. Factores de riesgo en caninos

El riesgo de infección es multifactorial e incluye características propias del hospedador, la exposición al vector y prácticas de prevención. A nivel ecológico, variables climáticas (temperatura, humedad y precipitación) influyen en la densidad vectorial y en la probabilidad de encuentro entre el perro y el mosquito (37).

Se ha demostrado que la edad es uno de los factores que influyen en la infección, ya que la probabilidad acumulada de exposición aumenta con la edad, debido al

mayor contacto con vectores. Existen estudios que han detectado una tendencia a mayores tasas en perros adultos o geriátricos, aunque este efecto suele atenuarse en poblaciones con alta cobertura de profilaxis. Otros estudios encontraron un mayor riesgo en machos y con mayor actividad exterior, lo que sugiere un componente conductual de exposición; sin embargo, efectos inconsistentes entre contextos obligan a interpretar al sexo como un factor débil frente a la exposición vectorial (37). El estilo de vida asociado a mayor exposición vectorial ha demostrado ser un factor importante, ya que el vivir al aire libre o con acceso prolongado al exterior incrementa el riesgo (36).

La ausencia de profilaxis con lactonas macrocíclicas también es un factor determinante importante a nivel individual y poblacional. Su implementación sostenida reduce la fracción de perros infectados y microfilarémicos, y por consiguiente la fuerza de infección a nivel comunitario (38). Otros factores reportados en análisis recientes incluyen asociaciones entre el hábitat local y rasgos fenotípicos como el tamaño del pelaje según la ecorregión y la comunidad de vectores (39).

1.2.5.3. Relevancia en la salud pública

La dirofilariosis es una zoonosis, en la que el humano actúa como hospedador accidental, y en el que *D. immitis* puede generar nodulaciones pulmonares (granulomas periféricos que simulan neoplasias) y *D. repens* puede llegar a producir nódulos subcutáneos u oculares. Como es lógico, el riesgo de infecciones humanas aumenta en lugares en donde existe una elevada circulación canina y abundancia de vectores (33). Algunos estudios realizados en regiones hiperendémicas han demostrado la co-ocurrencia de casos en perros, gatos y

humanos, reforzando la idea de que la carga parasitaria en perros funciona como un predictor de riesgo poblacional y que los programas de profilaxis canina y control vectorial representan medidas positivas para la salud pública (40).

1.2.6. Patogenia y presentación clínica

1.2.6.1. Mecanismos de lesión

En los perros, los adultos de *D. immitis* se localizan preferentemente en las arterias pulmonares y, en casos de infecciones avanzadas, pueden extenderse al ventrículo derecho y la vena cava caudal, en donde la acción física y el microambiente inflamatorio que se produce, induce un cuadro de arteritis proliferativa, remodelado vascular e hipertensión pulmonar. El daño endotelial producido por la fricción y movimiento del parásito favorece la trombosis in situ y microtromboembolismo, que reducen el lecho vascular funcional y aumentan la resistencia vascular pulmonar, con carga hemodinámica crónica sobre la región cardiaca derecha (41).

La bacteria endosimbionte *Wolbachia*, presente en *D. immitis*, actúa como cofactor inflamatorio. Sus moléculas de superficie y lipoproteínas activan vías TLR-dependientes en neutrófilos y monocitos, produciendo un efecto amplificador en la vasculitis y el daño tisular, incluso cuando los parásitos mueren y liberan antígenos endosimbiontes (3).

En fases aguda de muerte masiva (espontánea o debido al tratamiento), los émbolos de parásitos agravan el compromiso vascular y pueden precipitar una crisis respiratoria y descompensación cardiaca, razón por la cual el manejo clínico incluye la restricción de ejercicio y manejo del riesgo tromboembólico durante el tratamiento (3).

Se han descrito también lesiones renales como glomerulonefritis a causa de complejos inmunes asociados a antígenos filáridos y *Wolbachia* (33,42).

1.2.6.2. Formas clínicas de la enfermedad

El espectro clínico de la dirofilariosis varía desde una infección subclínica hasta un cuadro de insuficiencia cardíaca derecha, dependiendo de la carga parasitaria, el tiempo de infección y la respuesta del hospedador, por lo que signos clínicos como tos, intolerancia al ejercicio, disnea, pérdida de peso o síncope suelen aparecer ante cargas altas o muerte parasitaria (19).

La infección “oculta”, en la que existe la presencia de parásitos adultos sin microfilarias circulantes, ocurre en fases prepatentes de la enfermedad, infecciones monosexuales o bajo influencia de lactonas macrocíclicas, y puede coexistir un bloqueo de antígeno por complejos Ag-Ac que enmascaran la positividad serológica (33,43). Por otro lado, el síndrome de la vena cava representa la forma fulminante de la enfermedad, caracterizada por la migración retrógrada de numerosos parásitos a la aurícula derecha/vena cava, provocando hemólisis intravascular, ictericia, hemoglobinuria, soplo por insuficiencia tricúspide y shock, requiriendo extracción mecánica urgente y soporte hemodinámico (19,44).

1.2.7. Diagnóstico

El diagnóstico parasitológico de la dirofilariosis puede abordarse mediante métodos directos que muestran al parásito o sus larvas en la sangre (técnica de concentración de microfilarias con Knott modificada) y por métodos indirectos que detectan antígenos circulantes de adultos (principalmente hembras) mediante ELISA o por inmunocromatografía, siendo estas consideradas técnicas

complementarias por su ventana diagnóstica diferente y fuente de falsos negativos, considerando que no todos los estadios del parásito están presentes en un mismo momento de la infección (43).

1.2.7.1. Técnica de Knott

La técnica de Knott modificada sirve para la detección microscópica de filarias, y además facilita la diferenciación frente a otras filarias, como *Acanthocheilonema* spp. y *D. repens* (45). Sin embargo, su sensibilidad es limitada (alrededor de 80%), ya que puede verse afectada en infecciones mixtas, y no debe considerarse un resultado negativo al menos que se evalúe al menos 1 mL de sangre. El posible ritmo circadiano de la microfilaremia añade un factor a la variabilidad en el diagnóstico (3).

La técnica se basa en la concentración de microfilarias al hemolizar una alícuota de sangre con formol al 2% y centrifugarla, permitiendo examinar el sedimento teñido con azul de metileno e identificar larvas según su morfología y morfometría (46,47). En comparación con la técnica de frotis directo, que pierde sensibilidad cuando la microfilaremia es baja, la técnica de Knott es capaz de detectar cargas pequeñas (48).

El análisis morfométrico que se realiza tras la concentración de Knott permite diferenciar *D. immitis* de *D. repens* y distinguir del género *Acanthocheilonema*, con rangos validados de largo y ancho, y rasgos de los extremos craneal y caudal (23). Se ha descrito que la tinción histoquímica de fosfatasa ácida puede complementar a la técnica de Knott para lograr la diferenciación de las microfilarias (49).

La técnica de Knott presenta limitaciones y probables fuentes de error, ya que no detecta infecciones prepatentes ni casos en los que no exista presencia de microfilarias en sangre debido a profilaxis o infecciones monosexuales. Además, se requiere de lectura entrenada para evitar confusiones con otras filarias (33).

1.2.7.2.Pruebas de antígeno (ELISA e inmunocromatografía)

Este tipo de pruebas detectan al antígeno uterino liberado por hembras adultas de *Dirofilaria*, por lo que su positividad aparece luego de los 6 meses post infección, pudiendo ser negativa en fases tempranas de la infección, en infecciones monosexuales o cuando el antígeno es bloqueado por complejos Ag-Ac, en este último caso, los antígenos circulantes se unen a anticuerpos formando complejos inmunes, por lo que el antígeno, al estar “secuestrado” dentro de estos complejos, no se encuentra disponible para ser detectado por la prueba (33). Ante este problema, se ha propuesto la técnica de disociación térmica de estos complejos Ag-Ac (pretratamiento térmico), el cual aumenta la detección de antígeno en pacientes que habían resultado negativos previamente (50,51). Sin embargo, aunque el pretratamiento térmico mejora la sensibilidad, existen reportes de reactividad cruzada y falsos positivos en muestras con otras helmintiasis (*Angiostrongylus vasorum*, *D. repens* y *Acanthocheilonema dracunculoides*) (52,53).

Para que el antígeno sea detectable, se requiere al menos la presencia de una hembra adulta, de modo que infecciones con baja carga pueden pasar indetectables (54,55), aunque se ha demostrado que puede haber detecciones viables cuando existen dos o más hembras adultas (56).

Se ha indicado que combinar pruebas (antígeno + anticuerpos o antígeno + Knott) puede llegar a incrementar la sensibilidad del algoritmo respecto a una sola prueba, especialmente cuando se incorpora el pretratamiento térmico en muestras seleccionadas (57).

En perros con sospecha clínica pero negativos a microfilarias en pruebas de antígeno, la PCR multiplex ha demostrado utilidad al identificar correctamente muestras con tan solo cuatro microfilarias/mL y logrando diferenciar entre *D. immitis* y *D. repens* (58,59). Finalmente, métodos de imagen como la radiografía y la ecocardiografía contribuyen al diagnóstico y a la evaluación de la severidad de la enfermedad (60).

1.2.8. Tratamiento

1.2.8.1. Tratamiento quirúrgico

Este tipo de tratamiento está reservado para casos graves o complicados de la dirofilariosis (18). Revisiones recientes indican que la extracción mecánica de gusanos adultos se indica principalmente en perros con síndrome de la vena cava (clase IV) y en situaciones de carga parasitaria masiva o localizaciones ectópicas, donde el antiparasitario resulta insuficiente o peligroso (18,61).

El síndrome de vena cava se caracteriza por la migración masiva y abrupta de numerosos adultos hacia la aurícula derecha, ventrículo derecho y vena cava caudal, por lo que la extracción mecánica transvenosa o la cirugía abierta son el tratamiento de elección en la mayoría de casos (3). Sin la extracción de los parásitos en el síndrome de vena cava, la mortalidad es elevada, mientras que los perros que se someten a la extracción y sobreviven al postoperatorio inmediato pueden tener un buen pronóstico a largo plazo (62). Asimismo, la migración de

adultos a localizaciones ectópicas (arteria femoral, aorta abdominal distal, ramas ilíacas, etc.) puede producir cuadros de isquemia aguda y necrosis de extremidades, requiriendo arteriotomía y extracción directa de los gusanos (63).

La extracción transvenosa por venotomía yugular representa en la actualidad la técnica de elección en perros con síndrome de la vena cava o con cargas masivas de *D. immitis* alojadas en las cavidades derechas debido a su elevada eficacia y menor necesidad de abordajes quirúrgicos más invasivos (64–67). De manera general, el procedimiento inicia con una incisión cervical que permite realizar una venotomía yugular para la colocación de una vaina o introductor, luego se ingresa un catéter guía hacia la aurícula y ventrículo derechos, así como hacia la arteria pulmonar principal, utilizando fluoroscopia y ecocardiografía para una adecuada navegación. Una vez en posición, se introduce un dispositivo de recuperación, que pueden ser fórceps flexibles, lazos tipo snare, cestas de nitinol o instrumentos con diseño tipo cepillo, cuyo objetivo es atrapar y extraer los gusanos adultos mediante maniobras controladas bajo guía imagenológica (64–66).

En una serie retrospectiva de 42 perros con síndrome de la vena cava reportada por Bové et al. (62), 21 animales fueron sometidos a extracción transvenosa mínimamente invasiva; de ellos, 2 murieron durante el procedimiento y 4 en el postoperatorio, mientras que la extracción se completó con éxito en 14 perros, los cuales fueron dados de alta y mantuvieron una supervivencia prolongada, con un seguimiento medio de 2 años y evolución favorable. Estos resultados indican que, pese a una mortalidad perioperatoria considerable, los individuos que superan la hospitalización tras una extracción efectiva pueden alcanzar un

pronóstico aceptable a mediano y largo plazo. En concordancia con esta idea, la revisión anestésica de Quandt (67) señala que las tasas globales de éxito en la extracción de gusanos en casos de síndrome de la vena cava oscilan entre 50–67%, con una mortalidad estimada de 30–40%, lo que refleja la gravedad clínica propia de estos pacientes.

Aunque la literatura se centra predominantemente en técnicas transvenosas, se han descrito abordajes de cirugía abierta como la toracotomía lateral con atriectomía y embolectomía directa de las cavidades derechas y de la arteria pulmonar como alternativas en perros con cargas parasitarias muy elevadas o cuando la extracción transvenosa no es factible o ha fracasado (66). Estos procedimientos abiertos implican un grado mayor de invasividad, demandan infraestructura más compleja y se reservan para escenarios excepcionales, ya que el riesgo de hemorragia, descompensación anestésica y mortalidad es considerable en animales que, de por sí, ya suelen encontrarse hemodinámicamente inestables (18,61).

1.2.8.2.Tratamiento profiláctico

La profilaxis frente a *D. immitis* en perros se basa casi exclusivamente en el uso de lactonas macrocíclicas, capaces de eliminar las larvas L3 y L4 (3). Estos fármacos actúan de manera retroactiva, es decir, que se administran una sola vez al mes, pero eliminan larvas tisulares infectantes adquiridas en las semanas anteriores, interrumpiendo el ciclo antes de que las larvas alcancen la circulación pulmonar y maduren a adultos (18,68). El objetivo de la profilaxis no es tratar infecciones adultas establecidas, sino evitar la progresión larvaria, la forma cardiopulmonar crónica y sus complicaciones (3).

Las guías de la American Heartworm Society (AHS) señalan que todos los fármacos profilácticos de uso actual pertenecen a la familia de las lactonas macrocíclicas como la ivermectina y milbemicina oxima por vía oral mensual; moxidectina y selamectina en formulaciones tópicas mensuales; y moxidectina de liberación sostenida como formulación inyectable subcutánea de larga duración (60). Aunque estudios recientes han evaluado formulaciones de moxidectina con protección prolongada hasta 18 meses en perros en zonas hiperendémicas, demostrando la ausencia de nuevas infecciones durante el periodo de seguimiento en animales inicialmente negativos (69). Las guías de la AHS recomiendan también iniciar la profilaxis en cachorros a partir de las 6 a 8 semanas de edad, utilizando un producto aprobado y ajustando la dosis según el peso, manteniendo la administración durante todo el año, incluso en zonas con climas templados, cubriendo así las variaciones en la estacionalidad del vector (60).

Ensayos controlados han demostrado que las lactonas macrocíclicas administradas mensualmente alcanzan casi un 100% de eficacia preventiva frente a infecciones experimentales por *D. immitis* (18). Bowman et al. (70) confirmaron la protección al observar que cuatro aplicaciones mensuales de imidacloprid + moxidectina (Advantage Multi®) evitaron completamente la infección, incluso 28 días después de la última dosis. Asimismo, las formulaciones de moxidectina de liberación sostenida han logrado prevenir infecciones durante una temporada completa con eficacias superiores al 95–100% (71,72). En áreas hiperendémicas, se demostró que la aplicación única de moxidectina evitó nuevas infecciones durante 18 meses, lo que refuerza su utilidad en animales de alto riesgo y baja adherencia al tratamiento mensual (69).

1.2.9. Control y prevención

Las estrategias de prevención a nivel de paciente individual comprenden tres pilares básicos: la quimioprofilaxis continua con lactonas macrocíclicas, el diagnóstico anual mediante test de antígeno o prueba de microfilarias, y la reducción de la exposición a mosquitos con medidas ambientales y repelentes (60).

La AHS aconseja realizar screening anual en todos los perros mayores de 7 meses mediante prueba de antígeno y la detección de microfilarias para garantizar que los animales en profilaxis no desarrollan infecciones subclínicas y para identificar reservorios potenciales (60). En perros ya infectados y en tratamiento adulticida, las lactonas macrocíclicas se deben mantener como medida de prevención de nuevas infecciones y como parte del protocolo “triple” (macrolicto, doxiciclina, melarsomina) propuesto por AHS para cerrar el “gap de susceptibilidad” y reducir la cardiopatía tromboembólica (3).

Se recomienda además complementar la profilaxis farmacológica con la aplicación de repelentes o ectoparasiticidas registrados capaces de reducir la alimentación de mosquitos sobre el perro, lo que ha demostrado incrementar la eficacia global del programa preventivo. Además del uso de repelentes, se aconseja reducir la exposición a mosquitos mediante el control ambiental de criaderos (eliminación de aguas estancadas y mejora de drenajes), el empleo de mallas y mosquiteros, y evitar en lo posible que los perros permanezcan al aire libre durante los picos de actividad del vector (60).

1.3. Definición de términos básicos

- ***D. immitis***: es un nematodo filarial de la superfamilia Filarioidea (orden Spirurida, clase Chromadorea). Los mosquitos transmiten la dirofilariosis canina, que ocupa las arterias pulmonares y el ventrículo derecho del corazón (73).
- **Microfilaria**: Las microfilarias son las larvas de primera etapa de nematodos filariales, principalmente responsables de diversas infecciones parasitarias en humanos y animales. Estas larvas son típicamente liberadas por gusanos hembras en el torrente sanguíneo de un huésped (74).
- **Microfilaremia**: Presencia de microfilarias en el torrente sanguíneo del hospedador (74).
- **Vector**: Es un organismo que posee vida, que transmite una enfermedad desde un animal infectado a un humano o a otro animal (75).
- **Periodo prepatente**: intervalo entre la inoculación de larvas L3 por el mosquito vector hasta la aparición de adultos maduros capaces de producir microfilarias o antígeno detectable. En *D. immitis* suele abarcar entre 6 a 7 meses, motivo por el cual las pruebas de antígeno y la microfilaremia pueden ser negativas en fases tempranas (19).
- **Infección “oculta”**: presencia de adultos en arterias pulmonares sin microfilarias circulantes, observadas en infecciones prepatentes, monosexuales, con baja fertilidad o bajo profilaxis con lactonas, y que pueden acompañarse de bloqueo de antígeno por complejos Ag-Ac que reducen la sensibilidad serológica (33).

- **Concordancia diagnóstica (coeficiente Kappa):** medida del acuerdo más allá del azar entre dos clasificaciones binarias aplicadas al mismo individuo, con valores entre -1 y 1, donde 0 indica acuerdo equiparable al azar (76).

CAPÍTULO II

MARCO METODOLÓGICO

2.1. Ubicación Geográfica

La presente investigación se desarrolló en el distrito de Pacasmayo, provincia de Pacasmayo, Región La Libertad. La fase de laboratorio se desarrolló en la Clínica Veterinaria “Huesitos” EIRL, ubicada en calle Lima # 49, ubicada en el distrito de Pacasmayo.

2.1.1 Características geográficas y meteorológicas (*)

Las características geográficas y meteorológicas de la Provincia de Pacasmayo son (*):

- Altitud: : 8 msnm
- Latitud: : 7° 24' 4" S
- Longitud : 79° 34' 20" W
- Temperatura máximo promedio : 27,1 °C
- Temperatura mínima promedio : 16,5 °C
- Precipitación pluvial anual : 10,1 mm
- Clima: El distrito de Pacasmayo presenta un clima desértico, caracterizado por precipitaciones mínimas o prácticamente inexistentes a lo largo del año.

(*) FUENTE: SERVICIO NACIONAL DE METEOROLOGÍA E HIDROLOGÍA DEL PERÚ – 2024

2.2. Diseño de la Investigación

El presente estudio correspondió a un diseño descriptivo y corte transversal, cuyo propósito fue determinar la prevalencia de *Dirofilaria immitis* en caninos mediante el uso de las Técnicas de Knott modificada y prueba de inmunocromatografía, durante el periodo comprendido entre noviembre de 2024 y enero de 2025. La ejecución de la investigación se dividió en las siguientes fases:

2.2.1. Toma de muestras

Las muestras sanguíneas se recolectaron a las 18:00 horas, considerando la periodicidad circadiana de la microfilaremia. Se extrajeron 2–3 mL de sangre de la vena cefálica mediante sistema Vacutainer®, luego de rasurar y desinfectar el área con alcohol al 70%. Las muestras se conservaron en tubos con EDTA, debidamente rotulados con nombre del canino, edad, sexo, raza y fecha de recolección.

2.2.2. Prueba de inmunocromatografía

El procedimiento para la prueba inmunocromatográfica Canine Heartworm Ag® se detalla a continuación:

- a. Preparación de la muestra: se utilizó sangre total anticoagulada con EDTA, siguiendo las especificaciones del fabricante para la prueba Canine Heartworm Ag® (S&C Biotech, Corea).
- b. Carga de la muestra en el cassette: se depositaron 20 µL de sangre total en la zona indicada del cassette de reacción (Figura 1).
- c. Adición del diluyente: a continuación, se añadieron tres gotas del diluyente provisto por el fabricante, dejando que este fluyera a través de la membrana del dispositivo.

- d. Tiempo de prueba: el cassette se mantuvo en reposo a temperatura ambiente por 5 a 10 minutos, sin manipulación.



Figura 1. Se colocan 20 μ L de sangre en la zona indicada en el cassette del test y se añaden 2 gotas de diluyente.

- e. Lectura e interpretación: la interpretación de resultados se realizó conforme a las indicaciones del kit. La coloración en la línea de control (C) y en la línea de prueba (T) = positivo; coloración solo en C = negativo; ausencia de C o coloración exclusiva en T = inválido (ver Figura 2).

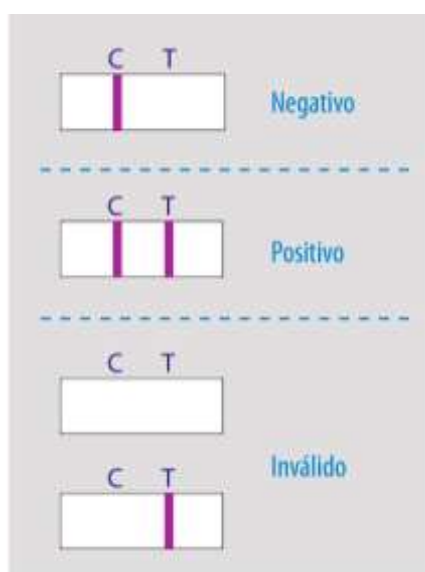


Fig. 2. Interpretación de resultados del test de inmunocromatografía Canine Heartworm Ag®.

2.2.3. Análisis microscópico de las muestras

El análisis microscópico de las muestras sanguíneas se llevó a cabo mediante la técnica de Knott modificada, siguiendo la metodología descrita por Zajac et al.

(77). El procedimiento consistió en los siguientes pasos:

- a. Se extrajo 1 mL de sangre total conservada en tubo con EDTA.
- b. Se mezcló la muestra con 9 mL de una solución de formalina al 2%.
- c. La mezcla se centrifugó a 1,200 rpm durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante.
- d. Al sedimento obtenido se le añadió una gota de azul de metileno al 0,1%.
Tras homogenizar, se transfirió al portaobjetos con ayuda de una pipeta Pasteur.
- e. Finalmente, las preparaciones se examinaron en un microscopio óptico con objetivo de 10x, identificándose microfilarias en posición extendida y con los núcleos teñidos de azul.

2.3. Métodos de Investigación

- *Método hipotético – deductivo*: Este método se fundamenta en la formulación de hipótesis que posteriormente son sometidas a verificación, deduciendo conclusiones con hechos observados (78). En el presente estudio, el método se aplicó para confrontar los resultados obtenidos mediante las pruebas diagnósticas con la hipótesis inicial sobre la presencia de *D. immitis* en la población canina evaluada. De esta manera, los hallazgos permitieron aceptar o rechazar la hipótesis planteada.
- *Analítico – sintético*: Este método implica descomponer el objeto de estudio en sus elementos constitutivos para analizarlos de forma individual, integrando posteriormente los resultados en una visión global (78). En este estudio se

procedió inicialmente al análisis desagregado de la prevalencia general y luego de la distribución según variables como el sexo y edad. Asimismo, se evaluaron de manera independiente los resultados de cada método de diagnóstico y se integraron bajo un análisis comparativo. Finalmente, la síntesis de estos componentes permitió obtener una interpretación epidemiológica del comportamiento de *D. immitis* en la población estudiada.

2.4. Población, muestra y unidad de análisis

2.4.1. Población

La población estuvo constituida por todos los caninos residentes en el distrito de Pacasmayo.

- *Criterio de inclusión:* Fueron incluidos aquellos caninos de cualquier raza y sexo, con edad igual o mayor a 1 año y que se encontraban clínicamente sanos.
- *Criterio de exclusión:* Se excluyeron los caninos menores de 1 año y aquellos que presentaban signos de enfermedad o que se encontraban bajo tratamiento farmacológico.

2.4.2. Muestra

El marco poblacional se definió a partir de un censo canino no publicado, que fue proporcionado por el Centro de Salud del distrito de Pacasmayo (año 2019) y que reportó un total de 284 perros en el ámbito urbano del distrito. Sobre esta base se realizó un muestreo aleatorio simple.

El tamaño muestral se estimó utilizando la fórmula para una sola proporción con corrección por población finita (79):

$$n_0 = \frac{Z_{1-\alpha/2}^2 p(1-p)}{d^2}, \quad n = \frac{n_0}{1 + \frac{n_0-1}{N}}$$

Donde:

p = *prevalencia esperada*

d = *precisión absoluta deseada*

$Z_{1-\alpha/2}^2$ = *valor crítico para un 95% de confianza*

Con una prevalencia esperada de 3% y asumiendo una precisión de 0,05, se obtuvo un $n_0 = 44,4$ y $n = 39$, tras la corrección por $N=284$. Aún considerando una precisión de 0,03, el cálculo arrojó un valor de $n = 86$. En ambos escenarios, el tamaño operativo de 120 perros adoptado en el protocolo excede el mínimo requerido. La elección de un tamaño muestral superior al calculado reduce la amplitud de los intervalos de confianza, mitiga pérdidas por no respuesta o exclusiones de calidad de muestra y limita el impacto de eventuales violaciones menores del supuesto de un muestreo aleatorio simple.

En consecuencia, la muestra final estuvo conformada por 120 caninos, seleccionados mediante muestreo aleatorio simple en diferentes sectores del distrito. Todos los propietarios firmaron un consentimiento informado autorizando la participación de sus mascotas en el estudio. Los procedimientos siguieron normas de bienestar animal y bioseguridad establecidas en el protocolo.

2.4.3. Unidad de Análisis

La unidad de análisis correspondió a las muestras de sangre total con anticoagulante EDTA obtenidas de los 120 caninos seleccionados.

2.5. Técnicas e instrumentos de recopilación de información

- Técnicas: Observación, técnica de Knott modificada y mediante la prueba de inmunocromatografía.

- Instrumento: Registro de datos, registros clínicos, base de datos en Microsoft Excel, Software estadístico SPSS v.27.

2.6. Técnicas para el procesamiento y análisis de la información

2.6.1. Análisis estadístico

a. Estimación de prevalencia por técnica

Los datos se registraron en una base de Microsoft Excel y se analizaron en SPSS v.27. Todas las estimaciones se reportaron con intervalos de confianza al 95% (IC95%) y un nivel de significancia $\alpha = 0,05$.

Para cada técnica (inmunocromatografía y Knott modificada) se calculó la prevalencia puntual como proporción de positivos respecto del total examinado, mediante la siguiente fórmula:

$$Prevalencia = \frac{N^{\circ} \text{ de perros positivos a } D. \text{ immitis}}{N^{\circ} \text{ total de perros muestreados}} \times 100$$

Los IC95% de la prevalencia se estimaron con el método binomial exacto de Clopper–Pearson.

b. Concordancia entre técnicas

Para el cálculo de la concordancia entre técnicas, se construyó una tabla de contingencia 2×2 con los resultados pareados (positivos/negativos) de ambas pruebas. A partir de esta tabla se calcularon:

- Acuerdo total (P_0):

$$P_0 = \frac{a + d}{n}$$

- Acuerdo positivo (PPA):

$$PPA = \frac{2a}{2a + b + c}$$

- **Acuerdo negativo (NPA):**

$$NPA = \frac{2d}{2d + b + c}$$

Donde “a” es el número de concordantes positivos, “d” los concordantes negativos y “b, c” los discordantes.

- **Índice Kappa de Cohen (κ):**

$$\kappa = \frac{P_o - P_e}{1 - P_e}, \quad P_e = \frac{(a + b)(a + c) + (c + d)(b + d)}{n^2}$$

El grado de concordancia de Kappa fue clasificado según la escala de Landis y Koch (80):

| Valor de Kappa (k) | Grado de concordancia |
|--------------------|-----------------------|
| 0,00 | Pobre |
| 0,00 – 0,20 | Leve |
| 0,21 – 0,40 | Aceptable |
| 0,41 – 0,60 | Moderado |
| 0,61 -,0.80 | Sustancial |
| 0,81 – 1,00 | Casi perfecto |

2.6.2. Organización de la información

Los resultados se procesarán en el software SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) para calcular la prevalencia e intervalos de confianza; así mismo, se realizará la prueba de Kappa para calcular el índice de concordancia entre las dos técnicas de diagnóstico.

2.7. Equipos y materiales

2.7.1. Equipos

- Centrífuga, microscopio óptico, computadora portátil

2.7.2. Materiales de laboratorio

- Sistema Vacutainer®, tubos con EDTA, alcohol 70°C, guantes de látex, mascarillas, nevera portátil y geles refrigerantes, formalina al 2%, azul de metileno al 0,1%, pipetas Pasteur, portaobjetos, cubreobjetos, test de inmunocromatografía Canine Heartworm Ag®, guías de observación y fichas de registro

CAPÍTULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Presentación de Resultados

3.1.1. Prevalencia de *Dirofilaria immitis*

Tabla 1. Prevalencia de *Dirofilaria immitis* en caninos mediante el uso de la técnica de inmunocromatográfica en el distrito de Pacasmayo -La Libertad, 2024 (N=120).

| Muestra | Casos Positivos (n) | Prevalencia (%) | IC-95% |
|---------|---------------------|-----------------|-----------|
| 120 | 4 | 3,33 | 0,92–8,31 |

Nota. IC95 % calculados con el método exacto binomial de Clopper–Pearson.

Tabla 2. Prevalencia de *Dirofilaria immitis* en caninos mediante el uso de la técnica de Knott modificada en el distrito de Pacasmayo -La Libertad, 2024 (N=120).

| Muestra | Casos Positivos (n) | Prevalencia (%) | IC-95% |
|---------|---------------------|-----------------|-----------|
| 120 | 1 | 0,83 | 0,02–4,56 |

Nota. IC95 % calculados con el método exacto binomial de Clopper–Pearson.

En la Tabla 1 y 2 se muestra la distribución de resultados mediante el uso de las técnicas inmunocromatografía y Knott modificada en 120 caninos. En la prueba de inmunocromatografía se registraron 4 resultados positivos (3,33%), mientras que con la técnica de Knott modificada se observó 1 resultado positivo (0,83%).

3.1.2. Concordancia entre técnicas

Tabla 3. Resultados pareados de inmunocromatografía (filas) frente a Knott modificada (columnas) en la detección de *Dirofilaria immitis* en perros de Pacasmayo - La Libertad, 2024.

| Técnica/Resultado | Knott Positivo | Knott Negativo | Total |
|------------------------------|----------------|----------------|-------|
| Inmunocromatografía Positivo | 1 | 3 | 4 |
| Inmunocromatografía Negativo | 0 | 116 | 116 |
| Total | 1 | 119 | 120 |

Nota. Distribución de resultados pareados entre técnicas (n = 120).

En los 120 emparejamientos (Tabla 3) se observaron 117 coincidencias: 1 coincidencia positiva entre ambas pruebas (0,83%) y 116 coincidencias negativas (96,67%). Hubo 3 discordancias (2,50%), todas correspondientes a inmunocromatografía positiva / Knott negativa. No se registraron casos inmunocromatografía negativa / Knott positiva (0%).

Tabla 4. Índices de concordancia y contraste entre las Técnicas de Knott modificada e inmunocromatografía (n = 120).

| Medida | Valor |
|-----------------------------|----------------|
| Acuerdo total | 0,975 (97,5 %) |
| Acuerdo positivo (PPA) | 0,400 (40,0 %) |
| Acuerdo negativo (NPA) | 0,987 (98,7 %) |
| Kappa de Cohen (κ) | 0,392 |

Con base en la tabla 2×2, se realizó el cálculo de los índices de concordancia (Tabla 4). El acuerdo total fue 97,5% (117/120), entendido como la proporción de resultados iguales entre ambas técnicas. El acuerdo positivo (PPA) fue 40,0%, reflejando la coincidencia entre ambas pruebas en la categoría positiva. El acuerdo negativo (NPA) fue 98,7%, y expresa la coincidencia de las pruebas en la categoría negativa. El índice de kappa de Cohen fue 0,392, lo que corresponde a un grado de concordancia “aceptable” según la clasificación de Landis y Koch (80).

3.1. Análisis, interpretación y discusión de resultados

3.1.1. Sobre la prevalencia de *Dirofilaria immitis*

La prevalencia de *Dirofilaria immitis* en perros del distrito de Pacasmayo fue de 3,33% (4/120; IC95%: 0,92–8,31) mediante inmunocromatografía y 0,83% (1/120; IC95%: 0,02–4,56) mediante Knott modificada (Tabla 1 y 2). Aunque la estimación puntual fue mayor mediante inmunocromatografía, los IC95% se superponen, por lo que no se demuestra una diferencia estadísticamente significativa entre técnicas. Sin embargo, la diferencia en la estimación puntual de la prevalencia en ambas técnicas es esperable, debido a que la técnica de inmunocromatografía detecta el antígeno circulante asociado a las hembras

adultas de *D. immitis*, mientras que la técnica de Knott identifica a las microfilarias en la sangre periférica; por esta razón, pueden encontrarse infecciones “ocultas” con antígeno positivo y no detectarse microfilarias en la sangre (43). Se conoce que la microfilaremia puede estar ausente debido a fases prepatentes de la infección o a bajas cargas, eliminación inmunitaria de microfilarias o efectos de tratamientos (macrocíclicos/doxiciclina), escenarios en los que el antígeno permanece detectable (81,82). Además, la microfilaremia presenta sub - periodicidad circadiana con picos nocturnos, por lo que un muestreo realizado fuera del pico de microfilaremia reduce la probabilidad de detectar microfilarias (83,84). Por lo tanto, la diferencia observada en las prevalencias puntuales estimadas mediante la prueba de inmunocromatografía y Knott se deben al estado del ciclo de parásito y a factores técnicos propios de cada metodología que pueden llegar a afectar la detección de microfilarias.

A nivel nacional, los resultados obtenidos en el presente estudio, concuerdan con los de Meza-Domínguez et al. (8), quienes reportaron una prevalencia de *D. immitis* de 3% en la ciudad de Huánuco mediante la prueba SNAP 4Dx PLUS IDEXX®, así como con Corimanya et al. (9), quienes observaron una prevalencia de 5,5% en la región Lima mediante ELISA de antígeno (Dirochek®). Del mismo modo, Acuña et al. (10) reportaron una prevalencia de 4,7% mediante ELISA de antígeno y 0,8% mediante la técnica de Knott modificada y microcapilar, replicando el patrón de mayor detección por antígeno frente a técnicas de concentración observado en nuestro estudio. En el ámbito internacional se observa consistentemente esa relación, en la que existe una mayor detección por pruebas de antígeno (ELISA o flujo lateral) que por métodos de concentración de microfilarias en sangre (Knott, microhematocrito), aunque las frecuencias encontradas son superiores a las del presente estudio: en

Argentina se encontraron frecuencias de 14,41%, 3,65% y 1,63% mediante las pruebas de antígeno, Knott y microhematocrito, respectivamente (35); en Colombia se reportaron frecuencias de 10,82% y 5,12% mediante inmunocromatografía y Knott, respectivamente (38); y en México se demostró que realizar un pretratamiento térmico previo a la prueba de ELISA incrementó la positividad en 7,1% adicional al disociar complejos inmunes (85).

Las pruebas de ELISA de antígeno son comparables con los resultados de inmunocromatografía del presente estudio puesto que ambos métodos detectan el mismo analito (antígeno circulante). Sin embargo, las diferencias de plataforma de diagnóstico (ELISA en microplaca vs. flujo lateral) y el tipo de muestra (suero/plasma, sangre total) pueden generar variaciones en la sensibilidad de las pruebas. Por esta razón, las comparaciones se deben interpretar en términos de orden de magnitud entre técnicas y no como equivalencias estrictas entre los valores de prevalencia. Dentro de las pruebas de antígeno, ELISA de microplaca suelen mostrar sensibilidades superiores a los test rápidos de flujo lateral, por lo que metodologías en las que se emplea ELISA tienden a reportar prevalencias mayores que las basadas en test inmunocromatográficos (54,55). Además, técnicas como el pre tratamiento térmico elevan la positividad por antígeno, logrando estimar prevalencias más altas (85,86). Otros factores que afectan los resultados son las diferencias en la exposición y profilaxis, el marco muestral elegido (perros con propietario, perros callejeros, perros refugiados, zona urbana, zona costera), el tamaño muestral y el año de estudio en el que se realizaron; dado que, se observó que los trabajos realizados a nivel nacional se concentraron a inicios del 2000, con muestras relativamente pequeñas; mientras que, estudios recientes en otros países se realizaron en poblaciones más grandes, en una mayor extensión geográfica y

teniendo en cuenta la variación temporal en la transmisión. Finalmente, se deben tener en cuenta las condiciones climáticas en las que se desarrollaron los estudios, ya que se ha demostrado que la idoneidad climática condiciona el desarrollo larvario del mosquito vector (umbral aproximado de 14°C), por lo que regiones con estas condiciones sostienen transmisiones y prevalencias mayores (31). Las diferencias entre zonas de costa tropical o subtropical, áreas más frías o altas, explican parte de la brecha entre los resultados entre los estudios.

En conjunto, se observó una baja circulación de *D. immitis* en el distrito de Pacasmayo, con mayor detección por inmunocromatografía que por Knott, en concordancia con lo descrito a nivel nacional e internacional. Las diferencias entre estudios se explican principalmente por diferencias metodológicas, el marco muestral, y por la idoneidad climática local.

3.1.1. Sobre la concordancia entre técnicas de diagnóstico

En las 120 muestras analizadas en el presente estudio, se observaron 117 coincidencias (1 positivo/positivo y 116 negativo/negativo) y 3 discordancias (inmunocromatografía positivo/Knott negativo) (ver Tabla 3). El acuerdo total entre pruebas fue de 97,5% y el índice de concordancia de Kappa fue 0,392, clasificado como aceptable (ver Tabla 4). Las discordancias entre ambas pruebas se deben a que la prueba de inmunocromatografía detecta el antígeno de hembras adultas, incluso en el caso de ausencia de microfilaremia, mientras que la técnica de Knott depende de la presencia de microfilarias circulantes (43).

De acuerdo con estudios comparativos, la técnica de Knott detecta menos infecciones que los ensayos con antígeno, lo que se traduce en acuerdos moderados entre métodos (87). En un estudio realizado en Estados Unidos encontró un grado de concordancia moderado entre una prueba de ELISA de antígeno y la técnica de Knott, confirmando que ambas pruebas capturan

fracciones distintas de la infección (88). Es por estas discordancias que las guías de la American Heartworm Society (60) recomiendan el uso de ambas pruebas de manera complementaria.

Ante las discordancias en las pruebas (inmunocromatografía positiva / Knott negativa), las guías sugieren considerar un pretratamiento térmico de suero/plasma para disociar complejos Ag–Ac cuando el contexto clínico o epidemiológico lo justifique (60). Por este motivo, en futuras investigaciones, se debería mantener el diagnóstico mediante la aplicación de ambas pruebas, y ante la presencia de discrepancias, se podría aplicar la técnica de pretratamiento térmico, además de documentar los índices de concordancia y acuerdo correspondientes.

Debe tenerse en cuenta que el índice de concordancia de Kappa puede verse reducido en contextos de baja prevalencia o con marginales desequilibrados, aun cuando el acuerdo observado sea alto; en esos casos, la interpretación de la concordancia debe apoyarse también en medidas de acuerdo positivos y negativos (PPA/NPA) y no solo en el índice de Kappa (89,90). En el presente estudio, el índice de concordancia aceptable ($\kappa = 0,392$) y el alto nivel de acuerdo negativo (98,7%) reflejan una fuerte coincidencia en resultados negativos y discordancias esperables en las muestras positivas por diferencias en las dianas de diagnóstico (antígeno circulante, microfilarias). Por este motivo, para la toma de decisiones clínicas y la vigilancia poblacional se justifica el uso complementario de inmunocromatografía y Knott, priorizando la primera para el tamizaje de infecciones que pueden estar ocultas y la segunda para documentar la microfilaremia y el potencial de transmisión. En este contexto, la técnica de Knott aporta información importante que no brinda una prueba inmunocromatográfica, ya que confirma la microfilaremia, que es un marcador

de reservorio efectivo y permite la diferenciación morfológica frente a otras filarias, permitiendo planificar el tratamiento, realizar un seguimiento del mismo y ofreciendo una alternativa de bajo costo cuando la serología no se encuentra disponible. En consecuencia, su uso es recomendado en tamizajes combinados, antes del inicio de tratamiento, ante resultados discordantes, estudios epidemiológicos, entornos con recursos limitados o con circulación de otro tipo de filarias.

3.1. Contrastación de hipótesis

3.1.1. Hipótesis

- **Hipótesis de investigación (Hi)**

La prevalencia de *Dirofilaria immitis* en caninos, mediante el uso de la técnica de Knott modificada y prueba de inmunocromatográfica en el distrito de Pacasmayo- La Libertad, es mayor a 3%.

- **Hipótesis nula (Ho):**

La prevalencia de *Dirofilaria immitis* en caninos, mediante el uso de la técnica de Knott modificada y prueba de inmunocromatográfica en el distrito de Pacasmayo- La Libertad, es menor o igual a 3%.

3.1.2. Contraste estadístico

Se aplicó la prueba Z de proporciones para contrastar $H_0: p \leq 0,03$ frente a $H_1: p > 0,03$ (unilateral, $\alpha = 0,05$), considerando la prevalencia hallada mediante inmunocromatografía (3,33%; 4/120). El estadístico Z fue de 0,214 con un valor de $p = 0,415$ (unilateral). Dado que el número esperado de aciertos fue menor a 5, el resultado se corroboró con la prueba binomial exacta (unilateral), obteniendo un valor de $p = 0,487$ ($p > 0,05$), consistente con la misma conclusión.

3.1.3. Decisión

Bajo una significancia de $\alpha=0,05$ y con un tamaño muestral de 120 caninos, no se rechaza la hipótesis nula que indica que la prevalencia es $\leq 3\%$. En consecuencia, se concluye que no existe evidencia estadística suficiente para afirmar que la prevalencia de *D. immitis* en caninos del distrito de Pacasmayo sea $> 3\%$.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES

1. La prevalencia de *Dirofilaria immitis* en caninos del distrito de Pacasmayo mediante la prueba de inmunocromatografía fue 3,33% (IC95%: 0,92–8,31), lo que confirma un rendimiento de detección similar al de la técnica de Knott modificada.
2. La prevalencia de *D. immitis* mediante la técnica de Knott modificada fue 0,83% (IC95%: 0,02–4,56), evidenciando una baja prevalencia de microfilaremia en el periodo y ámbito estudiados.
3. Ambas pruebas tuvieron un acuerdo total de 97,5% y un índice de concordancia aceptable ($\kappa = 0,392$), lo que respalda su uso complementario con fines clínicos y de vigilancia epidemiológica.
4. Los resultados indicaron un escenario de baja prevalencia de *D. immitis* con mayor detección en la prevalencia puntual por antígeno que por microfilarias y una concordancia aceptable entre ambas pruebas, sustentando la aplicación combinada de inmunocromatografía y Knott como estrategia metodológica para la vigilancia de *D. immitis* en el distrito de Pacasmayo.

CAPÍTULO V

SUGERENCIAS

- Se sugiere estandarizar un protocolo diagnóstico combinado que utilice la inmunocromatografía y la técnica de Knott de manera complementaria, incorporando la repetición de pruebas discordantes, el uso de controles positivos y negativos, y la lectura por duplicado de los resultados para asegurar la confiabilidad.
- Se sugiere, en estudios futuros, ampliar el tamaño y representatividad de la muestra mediante un muestreo estratificado por zonas y tipo de canes, estandarizando la hora de toma de muestra (vespertino–nocturno) para aumentar la detección de microfilarias. Además, se recomienda incluir rondas de muestreo estacionales y registrar variables adicionales (edad, sexo, historial de profilaxis, procedencia) que permitan realizar análisis comparativos más completos en estudios futuros.

REFERENCIAS

1. Cordero M, Rojo F, Martínez A, Sánchez M, Hernández S, Navarrete I, Diez P, Quiróz H, Carvalho M. *Parasitología Veterinaria*. Madrid: McGraw-Hill Interamericana. 1999. 968 p.
2. Bowman DD. *Georgis' Parasitology for Veterinarians*. 11th ed. Missouri: Elsevier. 2021. 1-519 p. <https://doi.org/10.1016/C2016-0-02298-2>.
3. Noack S, Harrington J, Carithers DS, Kaminsky R, Selzer PM. Heartworm disease – Overview, intervention, and industry perspective. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 2021. 16:65-89. <https://doi.org/10.1016/J.IJPDDR.2021.03.004>.
4. Muñoz P, Morgaz J, Galán A. *Manual clínico del perro y el gato*. vol. 1. Barcelona: Elsevier. 2015. 1-448 p.
5. Nelson R, Couto CG. *Medicina interna en pequeños animales*. 4th ed. Barcelona: Elsevier España. 2010. 1504 p.
6. Simón F, Morchón R, González-Miguel J, Marcos-Atxutegi C, Siles-Lucas M. What is new about animal and human dirofilariosis? *Trends in Parasitology*. 2009. 25:404-9. <https://doi.org/10.1016/J.PT.2009.06.003>.
7. Bowman DD, Fogarty EA. *Parasitology: diagnostics in dogs and cats*. Missouri: The Gloyd Group. 2003. 81 p.
8. Meza-Domínguez J, Aliaga Zevallos KF. Prevalencia de enfermedades transmitidas por vectores de importancia zoonótica en caninos de áreas periurbanas de Huánuco–2021. [Tesis de Pregrado]. Huánuco: Universidad Nacional Helmirio Valdizán . 2021. 108 p.
9. Corimanya J, Chávez A, Casas E, Díaz D. Frecuencia de *Dirofilaria immitis* en caninos del distrito de San Juan de Lurigancho. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 2004. 15:141-4.
10. Acuña P, Chávez A. Determinación de la prevalencia de *Dirofilaria immitis* en los distritos de San Martín de Porres, Rímac y Cercado de Lima. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 2002. 13:108-10.

11. Bravo R, Chávez A, Casas E, Suárez F. Dirofilariosis canina en los distritos colindantes con la ribera del río Lurín. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 2002. 13:80-3.
12. Movilla R, García C, Siebert S, Roura X. Countrywide serological evaluation of canine prevalence for *Anaplasma* spp., *Borrelia burgdorferi* (sensu lato), *Dirofilaria immitis* and *Ehrlichia canis* in Mexico. *Parasites & Vectors*. 2016. 9. <https://doi.org/10.1186/S13071-016-1686-Z>.
13. Albarracín-Navas JH. Determinación de la prevalencia y caracterización clínico epidemiológica de la *Dirofilaria immitis* en perros del área metropolitana de Bucaramanga. [Tesis de Maestría]. Bucaramanga - Colombia: Universidad Cooperativa de Colombia. 2023. 90 p.
14. López-Rauschenberg MK, Macías-Vera FG, Zambrano-Chávez DJ, Fimia-Duarte R, Zambrano-Gavilanes MP. Presencia de *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856) en perros de un albergue del Cantón Sucre, Ecuador. *Neotropical Helminthology*. 2023. 17:53-60. <https://doi.org/10.24039/RNH20231711573>.
15. Ramirez-Calberto MS. Relación entre la presencia de microfilariasis y parámetros hematológicos en perros atendidos en clínica docente de especialidades veterinarias “UTMACH, 2023”. [Tesis de Grado]. Machala - Ecuador: Universidad Técnica de Machala. 2023. 69 p.
16. Badillo-Viloria MA, García-Bocanegra I, de Lavallo-Galvis RJ, Martínez R, de la Rosa-Jaramillo S, Castillo-Castañeda A, Ramírez JD, Cano-Terriza D. *Dirofilaria immitis* in pet dogs from the metropolitan area of the Colombian Caribbean. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2023. 102:102064. <https://doi.org/10.1016/J.CIMID.2023.102064>.
17. Adrianzén J, Chávez A, Casas E, Li O. Seroprevalencia de la dirofilariosis y ehrlichiosis canina en tres distritos de Lima. *Revista de investigaciones Veterinarias del Perú*. 2003. 14:43-8.
18. Bowman DD, Atkins CE. Heartworm Biology, Treatment, and Control. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*. 2009. 39:1127-58. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2009.06.003>.

19. McCall JW, Genchi C, Kramer LH, Guerrero J, Venco L. Chapter 4 Heartworm Disease in Animals and Humans. *Advances in Parasitology*. 2008. 66:193-285. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)00204-2](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)00204-2),.
20. Smythe AB, Sanderson MJ, Nadler SA. Nematode small subunit phylogeny correlates with alignment parameters. *Systematic Biology*. 2006. 55:972-92. <https://doi.org/10.1080/10635150601089001>,.
21. Manfredi MT, Cerbo A di, Genchi M. Biology of filarial worms parasitizing dogs and cats. 2007.
22. Venco L, Genchi C, Simón F. La filariosis cardiopulmonar (*Dirofilaria immitis*) en el perro. *La filariosis en las especies domésticas y en el hombre*. Barcelona, Spain: Merial Laboratorios. 2011:19-60.
23. Magnis J, Lorentz S, Guardone L, Grimm F, Magi M, Naucke TJ, Deplazes P. Morphometric analyses of canine blood microfilariae isolated by the Knott's test enables *Dirofilaria immitis* and *D. repens* species-specific and Acanthocheilonema (syn. Dipetalonema) genus-specific diagnosis. *Parasites & Vectors*. 2013. 6:48. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-48>.
24. Aonuma H, Yoshimura A, Perera N, Shinzawa N, Bando H, Oshiro S, Nelson B, Fukumoto S, Kanuka H. Loop-mediated isothermal amplification applied to filarial parasites detection in the mosquito vectors: *Dirofilaria immitis* as a study model. *Parasites and Vectors*. 2009. 2:1-7. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-2-15/FIGURES/4>.
25. Younes L, Barré-Cardi H, Bedjaoui S, Ayhan N, Varloud M, Mediannikov O, Otranto D, Davoust B. *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in mosquitoes from Corsica Island, France. *Parasites and Vectors*. 2021. 14:1-7. <https://doi.org/10.1186/S13071-021-04931-Y/TABLES/1>.
26. Perchoux C, Enaud C, Oppert JM, Menai M, Charreire H, Salze P, Weber C, Hercberg S, Feuillet T, Hess F, Roda C, Simon C, Nazare JA. Individual, Social, and Environmental Correlates of Active Transportation Patterns in French Women. *BioMed Research International*. 2017. 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9069730>,.

27. Montarsi F, Ciocchetta S, Devine G, Ravagnan S, Mutinelli F, Frangipane Di Regalbono A, Otranto D, Capelli G. Development of *Dirofilaria immitis* within the mosquito *Aedes (Finlaya) koreicus*, a new invasive species for Europe. *Parasites and Vectors*. 2015. 8:1-9. <https://doi.org/10.1186/S13071-015-0800-Y/TABLES/3>.
28. Diakou A, Prichard RK. Concern for *Dirofilaria immitis* and Macrocyclic Lactone Loss of Efficacy: Current Situation in the USA and Europe, and Future Scenarios. *Pathogens*. 2021. 10:1323. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS10101323>.
29. Silaghi C, Beck R, Capelli G, Montarsi F, Mathis A. Development of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in *Aedes japonicus* and *Aedes geniculatus*. *Parasites & Vectors*. 2017. 10:94. <https://doi.org/10.1186/S13071-017-2015-X>.
30. Brown HE, Harrington LC, Kaufman PE, McKay T, Bowman DD, Nelson CT, Wang D, Lund R. Key factors influencing canine heartworm, *Dirofilaria immitis*, in the United States. *Parasites and Vectors*. 2012. 5:1-9. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-245/TABLES/1>.
31. Cuervo PF, Fantozzi MC, Di Cataldo S, Cringoli G, Mera y Sierra R, Rinaldi L. Analysis of climate and extrinsic incubation of *Dirofilaria immitis* in southern South America. *Geospatial health*. 2013. 8:175-81. <https://doi.org/10.4081/GH.2013.64>.
32. Genchi C, Rinaldi L, Mortarino M, Genchi M, Cringoli G. Climate and *Dirofilaria* infection in Europe. *Veterinary parasitology*. 2009. 163:286-92. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2009.03.026>.
33. Simón F, Siles-Lucas M, Morchón R, González-Miguel J, Mellado I, Carretón E, Montoya-Alonso JA. Human and animal dirofilariasis: The emergence of a zoonotic mosaic. *Clinical Microbiology Reviews*. 2012. 25:507-44. https://doi.org/10.1128/CMR.00012-12/SUPPL_FILE/ZCM999092388SO4.PDF.

34. Dantas-Torres F, Otranto D. Overview on *Dirofilaria immitis* in the Americas, with notes on other filarial worms infecting dogs. *Veterinary Parasitology*. 2020. 282:109113. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2020.109113>.
35. Vezzani D, Carbajo AE, Fontanarrosa MF, Scodellaro CF, Basabe J, Cangiano G, Eiras DF. Epidemiology of canine heartworm in its southern distribution limit in South America: Risk factors, inter-annual trend and spatial patterns. *Veterinary parasitology*. 2011. 176:240-9. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2010.10.046>.
36. Labarthe NV, Paiva JP, Reifur L, Mendes-De-Almeida F, Merlo A, Pinto CJC, Juliani PS, De Almeida MAO, Alves LC. Updated canine infection rates for *Dirofilaria immitis* in areas of Brazil previously identified as having a high incidence of heartworm-infected dogs. *Parasites and Vectors*. 2014. 7:1-8. <https://doi.org/10.1186/S13071-014-0493-7/TABLES/3>.
37. Wang D, Bowman DD, Brown HE, Harrington LC, Kaufman PE, McKay T, Nelson CT, Sharp JL, Lund R. Factors influencing U.S. canine heartworm (*Dirofilaria immitis*) prevalence. *Parasites and Vectors*. 2014. 7:1-18. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-264/FIGURES/20>.
38. Esteban-Mendoza MV, Arcila-Quiceno V, Albarracín-Navas J, Hernández I, Flechas-Alarcón MC, Morchón R. Current Situation of the Presence of *Dirofilaria immitis* in Dogs and Humans in Bucaramanga, Colombia. *Frontiers in Veterinary Science*. 2020. 7:562232. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2020.00488/BIBTEX>.
39. Guedes M, Gomes T, Alberigi B, Prudente E, Bendas A, Souza T, Mendes-de-Almeida F, Knackfuss FB, Merlo A, Labarthe N. Evaluation of Seroprevalence and Risk Factors of Heartworm Infection for Dogs in Rio de Janeiro with Access to Veterinary Care. *Acta Parasitologica*. 2024. 69:1364. <https://doi.org/10.1007/S11686-024-00859-2>.
40. Montoya-Alonso JA, García-Rodríguez SN, Matos JI, Costa-Rodríguez N, Falcón-Cordón Y, Carretón E, Morchón R. Change in the Distribution Pattern of *Dirofilaria immitis* in Gran Canaria (Hyperendemic Island) between 1994

- and 2020. *Animals* 2024, Vol. 14, Page 2037. 2024. 14:2037. <https://doi.org/10.3390/ANI14142037>.
41. McCall JW, Genchi C, Kramer LH, Guerrero J, Venco L. Chapter 4 Heartworm Disease in Animals and Humans. *Advances in Parasitology*. 2008. 66:193-285. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)00204-2](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)00204-2).
 42. Simpson CF, Gebhardt BM, Bradley RE, Jackson RF. Glomerulosclerosis in Canine Heartworm Infection. *Veterinary Pathology*. 1974. 11:506-14. <https://doi.org/10.1177/030098587401100605>.
 43. Little S, Saleh M, Wohltjen M, Nagamori Y. Prime detection of *Dirofilaria immitis*: Understanding the influence of blocked antigen on heartworm test performance. *Parasites and Vectors*. 2018. 11:1-10. <https://doi.org/10.1186/S13071-018-2736-5/TABLES/8>.
 44. Romano AE, Saunders AB, Gordon SG, Wesselowski S. Intracardiac heartworms in dogs: Clinical and echocardiographic characteristics in 72 cases (2010-2019). *Journal of veterinary internal medicine*. 2021. 35:88-97. <https://doi.org/10.1111/JVIM.15985>.
 45. Magnis J, Lorentz S, Guardone L, Grimm F, Magi M, Naucke TJ, Deplazes P. Morphometric analyses of canine blood microfilariae isolated by the Knott's test enables *Dirofilaria immitis* and *D. repens* species-specific and *Acanthocheilonema* (syn. *Dipetalonema*) genus-specific diagnosis. *Parasites & vectors*. 2013. 6. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-48>.
 46. Knott J. A method for making microfilarial surveys on day blood. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1939. 33:191-6. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(39\)90101-X](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(39)90101-X).
 47. Kelly JD. Detection and differentiation of microfilariae in canine blood. *Australian veterinary journal*. 1973. 49:23-7. <https://doi.org/10.1111/J.1751-0813.1973.TB14671.X>.
 48. Courtney CH, Zeng QY. Relationship between microfilaria count and sensitivity of the direct smear for diagnosis of canine dirofilariosis. *Veterinary parasitology*. 2001. 94:199-204. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00377-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00377-0).

49. Ferreira C, Afonso A, Calado M, Maurício I, Alho AM, Meireles J, Madeira de Carvalho L, Belo S. Molecular characterization of *Dirofilaria* spp. circulating in Portugal. *Parasites and Vectors*. 2017. 10:1-8.
<https://doi.org/10.1186/S13071-017-2180-Y/FIGURES/2>.
50. Digangi BA, Dworkin C, Stull JW, O'Quin J, Elser M, Marsh AE, Groshong L, Wolfson W, Duhon B, Broaddus K, Gingrich EN, Swiniarski E, Berliner EA. Impact of heat treatment on *Dirofilaria immitis* antigen detection in shelter dogs. *Parasites and Vectors*. 2017. 10:123-8. <https://doi.org/10.1186/S13071-017-2443-7/TABLES/1>.
51. Little SE, Munzing C, Heise SR, Allen KE, Starkey LA, Johnson EM, Meinkoth J, Reichard M V. Pre-treatment with heat facilitates detection of antigen of *Dirofilaria immitis* in canine samples. *Veterinary Parasitology*. 2014. 203:250-2. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2014.01.007>.
52. Gruntmeir JM, Thompson NM, Long MT, Blagburn BL, Walden HDS. Detection of heartworm antigen without cross-reactivity to helminths and protozoa following heat treatment of canine serum. *Parasites & vectors*. 2021. 14. <https://doi.org/10.1186/S13071-020-04573-6>.
53. Szatmári V, Van Leeuwen MW, Piek CJ, Venco L. False positive antigen test for *Dirofilaria immitis* after heat treatment of the blood sample in a microfilaremic dog infected with *Acanthocheilonema dracunculoides*. *Parasites and Vectors*. 2020. 13:1-6. <https://doi.org/10.1186/S13071-020-04376-9/FIGURES/1>.
54. Courtney CH, Zeng QY. Comparison of heartworm antigen test kit performance in dogs having low heartworm burdens. *Veterinary Parasitology*. 2001. 96:317-22. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00374-0](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00374-0).
55. Atkins CE. Comparison of results of three commercial heartworm antigen test kits in dogs with low heartworm burdens. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2003. 222:1221-3.
<https://doi.org/10.2460/JAVMA.2003.222.1221>.
56. Genchi M, Mangia C, Ferrari N, Loukeri S. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for the detection of low burden *Dirofilaria*

- immitis* (heartworm) in dogs and cats. *Parasitology Research*. 2018. 117:31-4. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5709-2>.
57. Lane JN, Litster A, Little SE, Rodriguez JY, Mwacalimba KK, Sundstrom KD, Amirian ES, Guerios SD, Serrano MA, Hays KM, Levy JK. Optimizing heartworm diagnosis in dogs using multiple test combinations. *Parasites & Vectors*. 2021. 14:224. <https://doi.org/10.1186/S13071-021-04715-4>.
 58. Gioia G, Lecová L, Genchi M, Ferri E, Genchi C, Mortarino M. Highly sensitive multiplex PCR for simultaneous detection and discrimination of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in canine peripheral blood. *Veterinary Parasitology*. 2010. 172:160-3. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.04.027>.
 59. Ferreira C, Afonso A, Calado M, Maurício I, Alho AM, Meireles J, Madeira de Carvalho L, Belo S. Molecular characterization of *Dirofilaria* spp. circulating in Portugal. *Parasites and Vectors*. 2017. 10. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2180-y>.
 60. American Heartworm Society. Canine guidelines for the prevention, diagnosis, and management of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs. North Carolina: 2024. 1-46 p.
 61. Ames MK, Atkins CE. Treatment of dogs with severe heartworm disease. *Veterinary Parasitology*. 2020. 283. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109131>.
 62. Bové CM, Gordon SG, Saunders AB, Miller MW, Roland RM, Achen SE, Drourr LT, Boggess MM. Outcome of minimally invasive surgical treatment of heartworm caval syndrome in dogs: 42 cases (1999-2007). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2010. 236:187-92. <https://doi.org/10.2460/JAVMA.236.2.187>.
 63. Taweethavonsawat P, Rattanapinyopituk K, Tachampa K, Kiertkrittikhon S, Jitsamai W, Klomkleaw W, Choisunirachon N, Komin K. Case report: Thromboembolic heartworm induced lower limb necrosis in a dog. *Frontiers in Veterinary Science*. 2022. 9:868115. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2022.868115/FULL>.

64. Lee SG, Moon HS, Hyun C. Percutaneous heartworm removal from dogs with severe heart worm (*Dirofilaria immitis*) infestation. *Journal of Veterinary Science*. 2008. 9:197. <https://doi.org/10.4142/JVS.2008.9.2.197>.
65. Alho AM, Fiarresga A, Landum M, Lima C, Gamboa Ó, Meireles J, Sales Luís J, Madeira De Carvalho L. A Homemade Snare: An Alternative Method for Mechanical Removal of *Dirofilaria immitis* in Dogs. *Veterinary Medicine International*. 2016. 2016:5780408. <https://doi.org/10.1155/2016/5780408>.
66. Kim J, Jeong J, Park K, Shin K, Jang IS, Yoon H. Evaluation of improved transvenous heartworm extraction brush in dogs with caval syndrome. *Journal of Veterinary Science*. 2023. 24:e46. <https://doi.org/10.4142/JVS.23003>.
67. Quandt J. Anesthesia for the dog with heartworm disease: a brief, practical review. *Parasites & Vectors* 2023 16:1. 2023. 16:151-. <https://doi.org/10.1186/S13071-023-05722-3>.
68. Bourguinat C, Lee ACY, Lizundia R, Blagburn BL, Liotta JL, Kraus MS, Keller K, Epe C, Letourneau L, Kleinman CL, Paterson T, Carretón E, Montoya-Alonso JA, Smith H, Bhan A, Peregrine AS, Carmichael J, Drake J, et al. Macrocyclic lactone resistance in *Dirofilaria immitis*: Failure of heartworm preventives and investigation of genetic markers for resistance. *Veterinary Parasitology*. 2015. 210:167-78. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2015.04.002>.
69. Quintana-Mayor AI, Carretón E, Montoya-Alonso JA. Efficacy of Sustained-Release Formulation of Moxidectin (Guardian SR) in Preventing Heartworm Infection over 18 Months in Dogs Living in a Hyperendemic Area. *Animals* 2024, Vol. 14, Page 3001. 2024. 14:3001. <https://doi.org/10.3390/ANI14203001>.
70. Bowman DD, Grazette AR, Basel C, Wang Y, Hostetler JA. Protection of dogs against canine heartworm infection 28 days after four monthly treatments with Advantage Multi® for Dogs. *Parasites & Vectors* 2016 9:1. 2016. 9:12-. <https://doi.org/10.1186/S13071-016-1293-Z>.
71. Holm-Martin M, Atwell R. Evaluation of a single injection of a sustained-release formulation of moxidectin for prevention of experimental heartworm

- infection after 12 months in dogs. *American journal of veterinary research*. 2004. 65:1596-9. <https://doi.org/10.2460/AJVR.2004.65.1596>.
72. Genchi C, Rossi L, Cardini G, Kramer LH, Venco L, Casiraghi M, Genchi M, Agostini A. Full season efficacy of moxidectin microsphere sustained release formulation for the prevention of heartworm (*Dirofilaria immitis*) infection in dogs. *Veterinary Parasitology*. 2002. 110:85-91. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00325-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00325-4).
 73. Platzer EG. Dog Heartworm. *Encyclopedia of Insects*. 2009:299-300. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374144-8.00087-4>.
 74. Saari S, Näreaho A, Nikander S. Nematoda (Roundworms). *Canine Parasites and Parasitic Diseases*. 2019:83-149. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814112-0.00005-2>.
 75. Shapiro Leland, Mandel Patricia, Shapiro Leland. Pathology & parasitology for veterinary technicians. Delmar Cengage Learning. 2010. 302 p.
 76. Cohen J. A Coefficient of Agreement for Nominal Scales. *Educational and Psychological Measurement*. 1960. 20:37-46. <https://doi.org/10.1177/001316446002000104>.
 77. Zajac AM, Conboy GA, Little SE, Reichard M v. Veterinary clinical parasitology. 9th ed. Hoboken: John Wiley & Sons. 2021. 429 p.
 78. Bernal CA. Metodología de la Investigación. 3rd ed. Bogotá - Colombia: Pearson. 2010. 58-61 p.
 79. Daniel W. Bioestadística base para el análisis de las ciencias de la salud. 5ta ed. Mexico: Limusa Wiley. 1996. 878 p.
 80. Landis JR, Koch GG. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics*. 1977. 33:159. <https://doi.org/10.2307/2529310>.
 81. Drake J, Gruntmeir J, Merritt H, Allen L, Little SE. False negative antigen tests in dogs infected with heartworm and placed on macrocyclic lactone preventives. *Parasites & Vectors*. 2015. 8:68. <https://doi.org/10.1186/S13071-015-0698-4>.

82. McCall JW, Kramer L, Genchi C, Guerrero J, Dzimirski MT, Mansour A, McCall SD, Carson B. Effects of doxycycline on heartworm embryogenesis, transmission, circulating microfilaria, and adult worms in microfilaremic dogs. *Veterinary Parasitology*. 2014. 206:5-13.
<https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2014.09.023>.
83. Rhee JK, Yang SS, Kim HC. Periodicity exhibited by *Dirofilaria immitis* microfilariae identified in dogs of Korea. *The Korean Journal of Parasitology*. 1998. 36:235. <https://doi.org/10.3347/KJP.1998.36.4.235>.
84. Ionică AM, Matei IA, D'Amico G, Bel LV, Dumitrache MO, Modrý D, Mihalca AD. *Dirofilaria immitis* and *D. repens* show circadian co-periodicity in naturally co-infected dogs. *Parasites & Vectors*. 2017. 10:116.
<https://doi.org/10.1186/S13071-017-2055-2>.
85. Hay-Parker S, Rodriguez-Vivas RI, Tobias E, Beugnet F, Montes N, García E, Bazaldua D. Prevalence and risk factors of *Dirofilaria immitis* infection in dogs from Mexico, including serum pre-heat treatment for the dissociation of immune complexes. *Current Research in Parasitology & Vector-borne Diseases*. 2025. 8:100289. <https://doi.org/10.1016/J.CRPVBD.2025.100289>.
86. Velásquez L, Blagburn BL, Duncan-Decoq R, Johnson EM, Allen KE, Meinkoth J, Gruntmeir J, Little SE. Increased prevalence of *Dirofilaria immitis* antigen in canine samples after heat treatment. *Veterinary Parasitology*. 2014. 206:67-70. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.021>.
87. Panarese R, Iatta R, Mendoza-Roldan JA, Szlosek D, Braff J, Liu J, Beugnet F, Dantas-Torres F, Beall MJ, Otranto D. Comparison of Diagnostic Tools for the Detection of *Dirofilaria immitis* Infection in Dogs. *Pathogens*. 2020. 9:499.
<https://doi.org/10.3390/PATHOGENS9060499>.
88. Donnett U, Hubbard K, Woodruff K, Varela-Stokes A. Prevalence of canine heartworm infection in Mississippi animal shelters. *Veterinary Parasitology*. 2018. 259:68-73. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2018.07.007>.
89. Viera AJ, Garrett JM. Understanding interobserver agreement: the kappa statistic. *Family Medicine*. 2005. 37:360-3.

90. U.S. Food and Drug Administration. Statistical Guidance on Reporting Results from Studies Evaluating Diagnostic Tests: Guidance for Industry and FDA Staff. Silver Spring, MD: 2007. 1-39 p.