

DETECCIÓN DE *Dirofilaria immitis*. (SPIRURIDA: ONCHOCERCIDAE) EN LA COMUNIDAD DE MOSQUITOS (DIPTERA: CULICIDAE) DE CEMENTERIOS DE LA REGIÓN SOCONUSCO, SUR DE MÉXICO

Horacio Alvarado-Torres¹, Vicente Viveros-Santos¹, Jorge Aurelio Torres-Monzón¹, Teresa López-Ordóñez¹, Oswaldo Margarito Torres-Chable² y Mauricio Casas-Martínez¹✉

¹Centro Regional de Investigación en Salud Pública, Instituto Nacional de Salud Pública, 4^a Avenida Norte y 19 Calle Poniente s/n, Colonia Centro, C.P. 30700, Tapachula, Chiapas, México.

²Laboratorio de Enfermedades Tropicales y Transmitidas por Vector, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Villahermosa, Tabasco, México.

✉ Autor de correspondencia: mcasas@insp.mx

RESUMEN. La dirofilariosis es una enfermedad causada por el nematodo del género *Dirofilaria*, el cual es transmitido por mosquitos afecta a poblaciones caninas y felinas principalmente, siendo los humanos hospederos incidentales. A pesar de los reportes de estudios realizados en nuestro país el presente trabajo es el primero llevado a cabo en la región sur de Chiapas. En los meses de septiembre a octubre de 2018 se realizaron colectas en seis cementerios de cuatro municipios del Soconusco, Chiapas, en la temporada de lluvias. En total se colectaron 1573 mosquitos hembras pertenecientes a 9 géneros y 18 especies, los cuales se analizaron en grupos mediante PCR para la detección de nematodos. Seis grupos de mosquitos resultaron positivos a *D. immitis* para dos sitios de muestreo. Las especies infectadas fueron *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Ae. angustivittatus* y *Ae. taeniorhynchus* con tasa mínima de infección de 2.5, 4.6, 0.19 y 0.83, respectivamente, para el caso de *D. repens* el total de los grupos analizados fueron negativos. Por último, *Ae. albopictus* fue la especie dominante en todos los cementerios, mientras que, la mayor similitud de especies se encontró en los cementerios Tapachula y Huixtla.

Palabras clave: *Aedes albopictus*, *Dirofilaria immitis*, dirofilariosis, mosquitos, zoonosis.

Detection of *Dirofilaria immitis*. (Spirurida: Onchocercidae) in the mosquito community (Diptera: Culicidae) of cemeteries from Soconusco region, southern Mexico

ABSTRACT. Dirofilariosis is a disease caused by the nematode of the genus *Dirofilaria*, which is transmitted by mosquitoes and affects canine and feline populations mainly, with humans being incidental hosts. Despite the reports of studies conducted in our country, this work is the first carried out in the southern region of Chiapas. From September to October 2018, collections were made in six cemeteries of four municipalities of Soconusco, Chiapas, during the rainy season. A total of 1573 female mosquitoes belonging to 9 genera and 18 species were collected, which were analyzed in groups by PCR for the detection of nematodes. Six mosquito pools were positive for *D. immitis* for two sampling sites. The infected species were *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Ae. angustivittatus* and *Ae. taeniorhynchus* with a minimum infection rate of 2.5, 4.6, 0.19 and 0.83, respectively. in the case of *D. repens*, the total of the groups analyzed were negative. Finally, *Ae. albopictus* was the dominant species in all the cemeteries, whereas, the greater similarity of species were found in the cemeteries of Tapachula and Huixtla

Keywords: *Aedes albopictus*, *Dirofilaria immitis*, dirofilariosis, mosquitoes, zoonoses.

INTRODUCCIÓN

Los nematodos del género *Dirofilaria* se encuentra entre los agentes infecciosos más comunes que afectan tanto a poblaciones de caninos y felinos como al humano. Dentro de este grupo taxonómico las dos especies más importantes son *D. immitis*, causante de la enfermedad cardiopulmonar canina, y *D. repens*, la cual se encuentra comúnmente en tejidos subcutáneos de los reservorios (Otranto *et al.*, 2011). Como otras especies de la familia Onchocercidae, estos nematodos necesitan un artrópodo para cumplir su ciclo de vida, es así que los mosquitos de los géneros *Aedes*, *Anopheles* y *Culex* cumplen con la función de vector (Luck *et al.*, 2014). *Aedes*

albopictus (Skuse) ha sido reportado como vector principal de ambas especies de dirofilarias (Cancrini *et al.*, 2003). Este mosquito es capaz de adaptarse a los ambientes urbanos, periurbanos y rurales donde abundan los contenedores artificiales (Li *et al.*, 2014).

Las dirofilarias adultas sobreviven durante varios años en perros infectados produciendo microfilarias, sobre todo, cuando las condiciones ambientales son ideales para el incremento de las poblaciones de mosquitos que se encargan de la diseminación de los nematodos en áreas geográficas específicas. El riesgo de infección se incrementa considerablemente por la exposición de las poblaciones humanas con perros y mosquitos involucrados en la transmisión del nematodo (Simón *et al.*, 2009). En nuestro país, las tasas más altas de infección han sido reportadas en las zonas costeras del Golfo de México (Labarthe y Guerrero, 2005).

Debido a la escasa información sobre la presencia de *Dirofilaria* en la vertiente del Pacífico, el objetivo del trabajo fue determinar la prevalencia de *Dirofilaria immitis* y la composición de especies en la comunidad de mosquitos presentes en los cementerios del sur de Chiapas mediante PCR. por ser considerados estos sitios extradomiciliarios como fuentes importantes de reinfestación de mosquitos en los paisajes antropizados.

MATERIALES Y MÉTODO

El muestreo de mosquitos se llevó a cabo durante la temporada de lluvias (septiembre-octubre de 2018) en seis cementerios de cuatro municipios (Huixtla, Suchiate, Tapachula y Unión Juárez) pertenecientes a la región Soconusco, Chiapas (Figura 1). Los mosquitos fueron capturados con redes entomológicas, aspiradores manuales y trampas BG-Sentinel entre las 8:00-11:00 h. Todos los ejemplares fueron depositados en contenedores de plástico y transportados vivos al Laboratorio de Taxonomía y Biogeografía de Vectores en el Centro Regional de Investigación en Salud Pública (CRISP). En el laboratorio, se sacrificaron a una temperatura de -20°C para evitar la degradación del ADN. Después, se realizó la identificación taxonómica y separación por sexo de los individuos en base a los caracteres morfológicos y las claves dicotómicas de Clark-Gil y Darsie (1983).

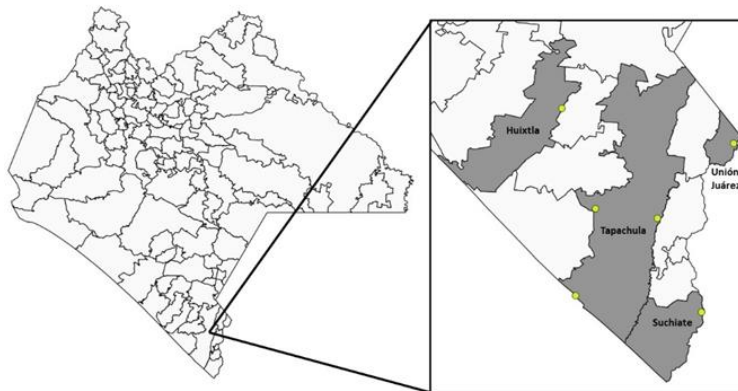


Figura 1. Localización de los sitios de colecta de mosquitos en la región Soconusco, Chiapas.

Una vez identificados los individuos se conformaron grupos de 1 a 5 mosquitos por especie y se mantuvieron a -20°C hasta la extracción del ADN.

Extracción y detección de ADN de *Dirofilaria immitis*. La extracción del ADN de los grupos de mosquitos se realizó mediante el método del DNazol. Posteriormente, la detección de *Dirofilaria*, se llevó a cabo de la siguiente manera, primeramente, se amplificó un fragmento del gen ribosomal 12S utilizando iniciadores genéricos para la detección de nematodos de 450 pb.

12SF (5'-GTTCCAGAATAATCGGCTA-3') y 12SR (5'ATTGACGGATG(AG)TTTGTACC-3') (Casiraghi *et al.*, 2004). Aquellas muestras que resultaron positivas fueron analizadas por PCR multiplex para la detección de *D. immitis* y *D. repens*. Lo anterior, consistió de la amplificación de un fragmento de la enzima citocromo C oxidasa (COX1) para la diferenciación entre especies considerando el tamaño del segmento amplificado: 170 pb para *D. immitis* y 479 pb para *D. repens* (Latrofa *et al.*, 2012). La visualización de los productos de PCR se llevó a cabo por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2.0%.

Análisis de datos. Se calculó la tasa mínima de infección (TMI) con el número de grupos positivos/Total de mosquitos analizados X 1000 (Walter *et al.*, 1980). Al mismo tiempo, se realizó un análisis de diversidad para determinar la dominancia y comparar la riqueza de especies entre las comunidades de mosquitos de cada cementerio. Por último, se generó un dendograma de similitud por medio de un análisis de clúster multivariado, usando el índice de Morisita con el programa PAST 3.16 (Moreno, 2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En total se colectaron 2532 mosquitos pertenecientes a 9 géneros y 18 especies de la familia Culicidae (Cuadro 1). Únicamente, 1573 hembras fueron utilizadas para la extracción de ADN distribuidas en 106 grupos.

Cuadro 1. Abundancia de mosquitos en los sitios de colecta.

Especies	Cementerio												Subtotal	
	HU		SU		TA		AO		PM		UJ			
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
<i>Aedes aegypti</i>	2		36	3	19	6	7	4	55	17			119	30
<i>Aedes albopictus</i>	96	121	68	129	299	276	247	588	36	124	15	31	761	1269
<i>Aedes angustivittatus</i>		1				1	7	52					7	54
<i>Aedes quadrivittatus</i>												60		60
<i>Aedes podographicus</i>								1						1
<i>Aedes serratus</i>								6						6
<i>Aedes taeniorynchus</i>						2		12		74				88
<i>Anopheles parapunctipennis</i>												5		5
<i>Culex quinquefasciatus</i>			14	4			32	16	10	1			56	21
<i>Culex conservator</i>								1						1
<i>Haemagogus equinus</i>												1		1
<i>Limatus durhamii</i>						2		2						4
<i>Mansonia dyari</i>				1				1						2
<i>Psorophora albipes</i>		1						3						4
<i>Psorophora ferox</i>								12						12
<i>Psorophora varipes</i>									15	5			15	5
<i>Toxorhynchites moctezuma</i>						1	1	1					1	2
<i>Wyeomyia</i>														
<i>abebe/melanopus</i>		4				1		2				1		8
Total	98	127	118	137	318	289	294	701	116	221	15	98	959	1573

Huixtla (HU), Suchiate (SU), Tapachula (TA), Álvaro Obregón (AO), Puerto Madero (PM) y Unión Juárez (UJ).

Del total de grupos analizados, 6 resultaron positivos a *D. immitis* con una TMI de 2.5 para *Ae. aegypti*, 4.6 para *Ae. albopictus*, 0.19 para *Ae. angustivittatus* y 0.83 para *Ae. taeniorhynchus*. Los mosquitos infectados fueron colectados en los cementerios de Tapachula y Álvaro Obregón,

Chiapas (Cuadro 2). En contraste con *D. repens* los resultados fueron negativos en el 100 % de los grupos.

Cuadro 2. Tasa mínima de infección (TMI) para *D. immitis* en diferentes especies de mosquitos de la región Soconusco, Chiapas.

Especie	Cementerio						TMI*
	HU	SU	TA	AO	PM	UJ	
	Grupos (+)	Grupos (+)	Grupos (+)	Grupos (+)	Grupos (+)	Grupos (+)	
<i>Aedes aegypti</i>		3 (0)	6 (0)	4 (1)	17 (0)		2.5
<i>Aedes albopictus</i>	121 (0)	129 (0)	276 (1)	588 (3)	124 (0)	31 (0)	4.6
<i>Aedes angustivittatus</i>	1 (0)		1 (0)	52 (1)			0.19
<i>Aedes taeniorhynchus</i>			2 (0)	12 (1)	74 (0)		0.83

Los datos entre paréntesis indican el número de grupos positivos a *D. immitis*.

*TMI = Número de grupos positivos/Número de mosquitos analizados X 1000

La Figura 2 muestra a *Ae. albopictus* con un rango de abundancia dominante en todos los cementerios del área de estudio. Esto se debe a la plasticidad biológica que exhibe esta especie de mosquito invasivo conferida por su rango de hospederos, la alta competitividad diurna de ovoposición en variados tipos de contenedores de agua peri y extradomiciliarios (Casas-Martínez, 2013; Taber *et al.*, 2016). Por esta razón, los cementerios que se encuentran dentro del paisaje urbano son considerados fuentes de reinfestación de vectores de arbovirus y ahora de *D. immitis*. Por otra parte, la mayor riqueza de especies resultó en el cementerio de Álvaro Obregón ($S=14$) seguido por el de Tapachula ($S=7$) el cual alberga a las tres especies que resultaron positivas a *D. immitis*. El cementerio con menor dominancia o mayor equidad entre especies fue el de Puerto Madero ($S=5$).

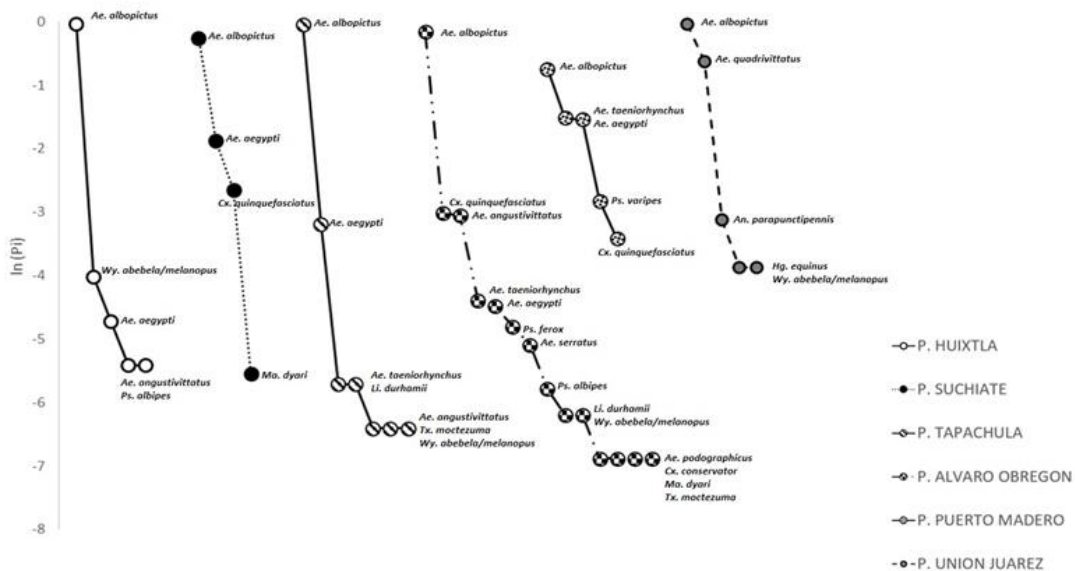


Figura 2. Índice de rango-abundancia de especies de mosquito en los cementerios de la región Soconusco, Chiapas.

El dendograma resultante de la comparación del índice de Morisita (Figura 3), demostró una similitud del 100% entre la comunidad de mosquitos presentes en los cementerios de Tapachula y Huixtla probablemente como consecuencia de su localización altitudinal y a que ambos se encuentran dentro de un ambiente urbano altamente modificado. Sin embargo, la riqueza de mosquitos presentes no es la misma. Asimismo, los cementerios de Álvaro Obregón y Suchiate se encuentran dentro del mismo conglomerado con >95% de similitud. El de Puerto Madero (similitud de 80%), localizado en la zona costera y el de Unión Juárez (similitud de 55%) contrasta de los demás posiblemente por su ubicación a 1278 msnm en la zona montañosa. Al respecto, se ha reportado que los factores que intervienen y promueven la diseminación de la dirofilariasis son principalmente la temperatura y humedad relativa; además de la densidad de mosquitos vectores y la presencia de los hospederos definitivos en los que el parásito se reproduce y completa su desarrollo (Song *et al.*, 2002). En este contexto, el conocimiento de la composición de especies y la similitud entre las comunidades de mosquitos proporcionó información suficiente para priorizar las zonas de riesgo.

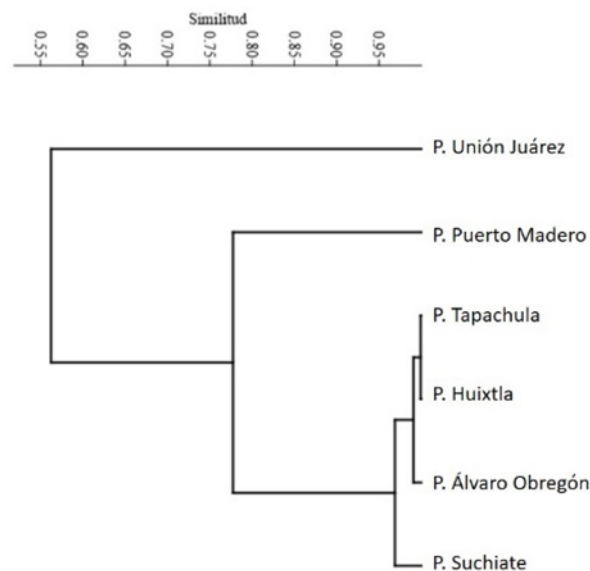


Figura 3. Dendograma de similitud específica según el índice de Morisita.

Este trabajo describe los resultados correspondientes al primer estudio sobre *Dirofilaria immitis* en la comunidad de mosquitos colectados en cementerios del sur de Chiapas

Los resultados demostraron que los mosquitos de las especies: *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Ae. angustivittatus* y *Ae. taeniorhynchus* se encuentran infectados con *D. immitis* resaltando que *Ae. albopictus* fue la especie con un mayor número de grupos de especies positivas a *D. immitis*. A diferencia de los resultados de Manriques-Saide *et al.* (2010) quien reportó que *Ae. taeniorhynchus* es la principal especie vectora de dirofilariasis en Celestún, Yucatán. En contraste, Torres-Chable *et al.* (2018) encontró grupos de mosquitos positivos a este parásito en la especie *Cx. quinquefasciatus* en el estado de Tabasco. El mismo autor, detectó positividad a *D. immitis* en muestras sanguíneas de perros lo cual es alarmante por el establecimiento de un posible ciclo de transmisión, ya que conviven con otros vectores competentes y abundantes a lo largo de la costa, como *Ae. aegypti* y *Ae. taeniorhynchus*, especies también reportadas como vectores.

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio exploratorio identificaron a *Ae. albopictus*, *Ae. aegypti*, *Ae. taeniorhynchus*, y *Ae. angustivittatus* como posibles especies participantes en la transmisión de *D. immitis* en distintos estratos altitudinales de la región del Soconusco, Chiapas. Estos hallazgos, constituyen el primer componente para determinar posibles focos de transmisión de dirofilariasis en la zona. Por esta razón, se espera que los resultados puedan servir de línea base para la toma de decisiones de las autoridades sanitarias encargadas de las zoonosis y la salud pública para la implementación de un programa de vigilancia de mosquitos y hospederos (caninos y felinos).

AGRADECIMIENTOS

Al J de B. Miguel Muñoz Reyes y Aux. de Lab. y/o Bio. José Luis Aguilar Rodríguez, integrantes del Grupo BioDivector del CRISP, por su apoyo técnico durante las colectas entomológicas de campo.

A la MC. Jenifer D. Villafuerte Reyes y al M. en C. Rafael A. Avendaño Rabiella por su apoyo en el Laboratorio de Patógenos del CRISP.

El estudio formó parte del proyecto de investigación FOSEC-SEP Ciencia Básica 257973 “Detección de *Wolbachia* sp. en poblaciones mexicanas de mosquitos *Aedes* sp. y su efecto en la interacción con arbovirus de importancia médica” con apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

LITERATURA CITADA

- Cancrini G., Frangipane di Regalbono A., Ricci I., Tessarin C., Gabrielli S. and M. Pietrobelli. 2003. *Aedes albopictus* is a natural vector of *Dirofilaria immitis* in Italy. *Veterinary parasitology*. 118: 195-202.
- Casas-Martínez M. 2013. Bionomía comparative de *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* y sus implicaciones en la transmisión del dengue en el sur de México. Tesis de doctorado del *Colegio de la Frontera Sur*. 177 pp.
- Casas-Martínez M., Orozco-Bonilla A., Muñoz-Reyes M., Ulloa-García A., Bond G., Valle-Mora J., Weber M., and J. C. Rojas. 2013. A new tent trap for monitoring the daily activity of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Journal of Vector Ecology* 38(2): 277-288.
- Casiraghi, M., Bain, O., Guerrero, R., Martin, C., Pocacqua, V., Gardner, S. L. and C. Bandi. 2004. Mapping the presence of *Wolbachia pipientis* on the phylogeny of filarial nematodes: Evidence for symbiont loss during evolution. *International Journal for Parasitology*. 34(2):191–203.
- Clark-Gil S. and Darsie R. 1983. The Mosquitoes of Guatemala. Their identification, distribution and bionomics, with keys to adult females and larvae in english and spanish. *Mosquito Systematics*.15(3):151–284.
- Labarthe N. and J. Guerrero. 2005. Epidemiology of heartworm: What is happening in South America and Mexico. *Veterinary parasitology*. 133:149-156.
- Latrofa M. S., Weigl, S., Dantas-Torres F., Annoscia, G., Traversa, D., Brianti, E., and D. Otranto. 2012. A multiplex PCR for the simultaneous detection of species of filarioids infesting dogs. *Acta Tropica*. 122(1): 150–154.
- Li Y., Kamara F., Zhou G., Puthiyakunnon S., Li C., Liu Y., Zhou Y., Yao. L., Yan G. and X. Chen. 2014. Urbanization increases *Aedes albopictus* larval habitats and accelerates mosquito development and survivorship. *PLoS Neglected Tropical Disease*. 8(11):1–12. 10.1371/journal.pntd.0003301.

- Luck A.N., Evans C.C., Riggs M.D., Foster J.M., Moorhead A.R., Slatko B.E. and M.L. Michalski. 2014. Concurrent transcriptional profiling of *Dirofilaria immitis* and its *Wolbachia* endosymbiont throughout the nematode life cycle reveals coordinated gene expression. *BioMed Central Genomics*. 15:1-18.
- Manriques-Saide P, Escobedo-Ortegón J, Bolio-González M, Sauri-Arceo C, Dzib-Florez S, Guillermo-May G, Ceh-Pavía E and A. Lenhart. 2010. Incrimination of the mosquito, *Aedes taeniorhynchus*, as the primary vector of heartworm, *Dirofilaria immitis*, in coastal Yucatán, México. *Veterinary entomology* 24:456–460
- Moreno C.E. 2001. Métodos para medir la biodiversidad. Manuales y Tesis SEA. *Sociedad Entomológica Aragonesa* Ed. Madrid, España.
- Otranto D., Diniz D.G., Dantas-Torres F., Casiraghi M., N.F. de Almeida I., N.F. de Almeida L., Nascimento dos Santos J., Penha A., Almeida E.F., and O. Bain. 2011. Human intraocular filariasis caused by *Dirofilaria* sp. Nematode, Brazil. *Emerging infectious diseases* 17(2):863-866.
- Simón F. Morchón R., Gonzáles-Miguel J., Marcos-Atxutegi C. and M. Siles-Lucas. 2009. What is new about animal and human dirofilariosis. *Trends in Parasitology*. 25(9): 404-409.
- Song K. H., Hayasaki M., Choliq C., Cho K., Han H., Jeong B., Jeon M., Park B. and D. Kim. 2002. Immunological responses of dogs experimentally infected with *Dirofilaria immitis*. *Journal of veterinary society*. 3: 104-109.
- Taber E.D., Hutchinson M.L., Smithwick E. and J.I. Blanford. 2016. A decade of colonization: the spread of the Asian tiger mosquito in Pennsylvania and implications for disease risk. *Journal of vector ecology*. 42(1):3-12.
- Torres-Chable O.M., Baak-Baak C.M., Cigarroa-Toledo N., Blitvich B.J., Brito-Argaez L-G., Alvarado-Kantun Y.N., Zaragoza-Vera C.V., Arjona-Jimenez G., Moreno-Perez L-G., Medina-Perez P., Machain-Williams C.I. and J.E. Garcia-Rejon. 2018. Molecular detection of *Dirofilaria immitis* in dogs and mosquitoes in Tabasco, Mexico. *Journal vector borne disease*. 55:151-158.
- Walter S. D., S. W. Hildreth, and B. J. Beaty. 1980. Estimation of infection rate in populations of organism using pool of a variable size. *Am J Epidemiol* 112: 124-128.