

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**DETECCIÓN MOLECULAR DE FILARIAS (NEMATODA: FILARIOIDEA) EN  
MOSQUITOS (DIPTERA: CULICIDAE) DE NUEVO LEÓN, MÉXICO.**


**Por**

**BIOL. JUAN DANIEL HERNANDEZ LEAL**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN ENTOMOLOGIA MEDICA Y VETERINARIA**

**DETECCIÓN MOLECULAR DE FILARIAS (NEMATODA: FILARIOIDEA) EN MOSQUITOS (DIPTERA: CULICIDAE) DE NUEVO LEÓN, MÉXICO.**

**Comité de Tesis**



---

**Dr. Jesús Antonio Dávila Barboza**

Director de Tesis



---

**Dr. Idelfonso Fernández Salas**

Secretario



---

**Dra. Adriana E. Flores Suárez**

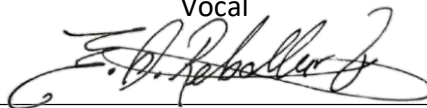
Vocal



---

**Dra. Beatriz López Monroy**

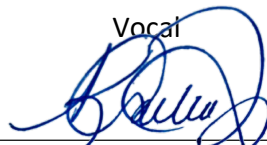
Vocal



---

**Dr. Eduardo Rebollar Téllez**

Vocal



**SUBDIRECCIÓN  
DE POSGRADO**

---

**Dra. Katiushka Arévalo Niño**

Subdirectora de Posgrado

**DERECHOS RESERVADOS©**

**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por el apoyo recibido durante el desarrollo de esta tesis. En particular, agradezco la oportunidad de haber sido beneficiario de la beca número 1233570, la cual me ha permitido dedicarme plenamente a mi investigación. El respaldo financiero y académico del CONAHCYT ha sido fundamental para mi formación y ha facilitado el acceso a recursos esenciales para llevar a cabo este trabajo. Estoy profundamente agradecido por el compromiso del CONAHCYT con el desarrollo de la investigación y la educación en nuestro país.

Este logro no habría sido posible sin su apoyo, y espero continuar contribuyendo al avance del conocimiento en mi área de estudio.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han contribuido de manera significativa a la realización de esta tesis. En primer lugar, a mi director de tesis, el Dr. Jesús Antonio Dávila Barboza, por su invaluable apoyo y orientación a lo largo de todo este proceso. Su vasta experiencia y conocimientos han sido fundamentales para el desarrollo de mi investigación. Gracias por su paciencia, por sus consejos siempre acertados y por motivarme a buscar la excelencia en cada etapa de este trabajo. Su compromiso con mis objetivos académicos ha dejado una huella profunda en mi formación profesional. Quiero extender mi agradecimiento al Dr. Idelfonso Fernández Salas mi secretario de tesis, a mis vocales, la Dra. Adriana Flores Suarez, la Dra. Beatriz López Monroy y el Dr. Eduardo Rebollar Téllez les agradezco sinceramente por su dedicación y por el tiempo que han invertido en la evaluación de mi tesis. Sus aportaciones y críticas constructivas han sido esenciales para enriquecer este trabajo. Cada una de sus observaciones me ha permitido reflexionar y mejorar aspectos fundamentales de mi investigación, lo que ha contribuido a darle mayor solidez y rigor académico. Agradezco su disposición para ayudarme en cada paso y por su paciencia en momentos de mayor carga. Asimismo, valoro enormemente el apoyo moral que todos ustedes me han brindado. En los momentos de incertidumbre y desafío, sus palabras de aliento me han motivado a seguir adelante. Su interés genuino en mi progreso ha sido una fuente de inspiración constante.

Quiero agradecer también a mis compañeros y amigos que me han acompañado en este camino.

Sus ánimos, discusiones y colaboración han hecho de esta experiencia algo más llevadero y enriquecedor.

Finalmente, agradezco a mi familia por su amor y apoyo incondicional. Sin su respaldo, este logro no habría sido posible.

A mi compañera de vida, la Biol. Marián Areli Hernández Salinas, por su apoyo incondicional, dedicación y paciencia. Agradezco su disposición y respaldo en todas las actividades que emprendo. Pero, sobre todo, valoro su profundo amor y cariño, así como su entusiasmo constante, y por acompañarme durante todo este tiempo.

A todos ustedes, gracias por su contribución y por haber hecho posible que este proyecto se materializara. Estoy profundamente agradecido y espero seguir aprendiendo y creciendo en mi camino profesional.

## **DEDICATORIA**

A mis padres, el Sr. Sergio Hernández Pichardo y la Sra. Martha Nelda Leal Carreón:

Les agradezco profundamente por enseñarme el verdadero valor de la vida. Su apoyo incondicional ha sido fundamental en mi camino, y hoy me siento orgulloso de ser un reflejo de ustedes. Gracias a sus enseñanzas, he aprendido a ver la vida desde diversas perspectivas y a formarme como un hombre fuerte, siempre orientado hacia el éxito. Gracias por ser mi inspiración y por guiarme con su ejemplo en cada paso de mi vida. Esta dedicación es un pequeño y humilde reconocimiento de mi eterna gratitud por todo lo que han hecho por mí.

## Índice

Agradecimientos	i
Dedicatoria	iii
Índice	iv
Índice de tablas	vii
Índice de figuras	vii
Resumen	x
Abstrac	xi
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1. Dirofilariasis: Epidemiología, Vector, Hospederos y Situación Actual	3
2.2. Filariasis epidemiología global y contexto regional	3
2.2.1. Perspectiva Global	3
2.3. Ciclo de vida general de las filarias	4
2.4. <i>Dirofilaria immitis</i>	5
2.5. El Vector de la Dirofilariasis	7
2.5.1. Registro de posibles mosquitos portadores de enfermedades en Nuevo León	7
2.6. Hospederos y Afectación Humana.	7
2.7. Especies de Filarias que Causan Problemas en México	8
2.7.1. <i>Dirofilaria immitis</i> en México.	9
2.8. Factores que influyen en la Distribución de <i>D. reconditum</i> y <i>D. repens</i>	10
2.8.1. Distribución de <i>Dipetalonema reconditum</i>	11

2.8.2. Distribución de <i>Dirofilaria repens</i>	11
2.9.Actualidad de la filariasis en el mundo	11
2.9.1. Situación Actual en América	12
2.9.2. Situación Actual en México	12
2.10. Estudios para el estado de Nuevo León	13
3. Justificación	15
4. Hipótesis	16
5. Objetivos	17
5.1. Objetivo general	17
5.2. Objetivos específicos	17
6. Metodología	18
6.1. Clima	19
6.2. Trabajo de campo	19
6.2.1. Colecta de mosquitos	19
6.3. Trabajo en laboratorio	20
6.3.1. Extracción de ADN	21
6.4. Elaboración de control positivo	21
6.5. Desarrollo de la PCR multiplex	23
6.6. Caracterización de microfilarias en mosquitos	25
6.7. Análisis de contenido alimenticio	26
6.8. Análisis estadístico	26
7. Resultados	28
7.1. Colecta de mosquitos	28
7.2. Comparación de métodos de muestreo	30
7.3. Análisis de diversidad alfa y beta	32
7.4. Análisis estacionales	34
7.4.1. Análisis de lluvia	34



7.4.1.1. Asociación entre lluvia y abundancia de mosquitos	35
7.4.2. Análisis de temperatura	37
7.4.2.1. Asociación entre temperatura y abundancia de mosquitos	38
7.5. Estandarización de PCR múltiplex para la identificación molecular de microfilarias caninas en mosquitos.	40
7.6. Detección de filarias en mosquitos	41
7.7. Análisis de contenido alimenticio de los mosquitos	42
8. Discusión	45
9. Conclusión	52
10. Bibliografía	54

## Índice de tablas

Tabla 1. Especies de dípteros distribuidos por el estado de Nuevo León (Elizondo, 2002	7
Tabla 2. Primers utilizados para la amplificación de las especies <i>Dirofilaria immitis</i> , <i>Dipetalonema reconditum</i> y <i>Dirofilaria repens</i> .	22
Tabla 3. Componentes de la PCR múltiple.	23
Tabla 4. Protocolo de estandarización de PCR para la amplificación de múltiples filarias en las muestras de mosquitos colectadas.	24
Tabla 5. Componentes de la PCR individual.	24
Tabla 6. Protocolo final de PCR multiplex utilizado para la amplificación de múltiples filarias en las muestras de mosquitos colectadas.	25
Tabla 7. Cebadores específicos para el gen mitocondrial citocromo b, utilizados en la PCR para la identificación de contenido alimenticio en mosquitos positivos a filarias.	26
Tabla 8. Número total y porcentajes de mosquitos colectados por medio de trampas y aspirados en los municipios de Monterrey, Guadalupe, Juárez, Apodaca y San Nicolás, durante el periodo de septiembre 2022 y marzo 2024.	29
Tabla 9. Prueba T de student para dos muestras, trampa - aspirado.	31
Tabla 10. Asociación entre lluvia y la especie <i>Ae. aegypti</i>	35
Tabla 11. Asociación entre lluvia y la especie <i>Ae. albopictus</i>	35
Tabla 12. Asociación entre lluvia y la especie <i>Cx. pipiens quinquefasciatus</i> .	36
Tabla 13. Asociación entre temperatura y la especie <i>Ae. aegypti</i>	38
Tabla 14. Asociación entre temperatura y la especie <i>Ae. albopictus</i>	38
Tabla 15. Asociación entre temperatura y la especie <i>Cx. pipiens quinquefasciatus</i>	39
Tabla 16. Tasa mínima de infección (TMI) para <i>D. immitis</i> en mosquitos vectores del área metropolitana de Monterrey.	41
Tabla 17. Especies de mosquitos, número de hembras no alimentadas y alimentadas con sangre de cada especie.	43

## Índice figuras

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Dirofilaria immitis</i> .	5
Figura 2. Línea del tiempo, estudios y prevalencia de microfilariasis reportadas en diferentes años en el área metropolitana de Monterrey Nuevo León.	14
Figura 3. Distribución geográfica de la zona metropolitana de Monterrey, N.L., y los municipios seleccionados para el muestreo.	18
Figura 4. Representación cartográfica de las Áreas Geoestadísticas Básicas (AGEB) subdivididas en manzanas correspondientes a Apodaca, Juárez (1903100010069), Guadalupe (1902600010853) y Monterrey (190390001445A).	20
Figura 5. Proceso general del trabajo en laboratorio identificación y obtención de DNA genómico a partir de muestras de mosquitos.	20
Figura 6. Verificación de alineamiento de la secuencia elaborada utilizando el programa BLAST.	22
Figura 7. Abundancia relativa por municipio del total de mosquitos macho y hembras recolectadas en el área metropolitana de Monterrey durante el período septiembre 2022 a marzo 2024.	28
Figura 8. Resultados de la recolección de mosquitos.	29
Figura 9. Porcentajes de mosquitos muestreados en los cinco municipios del área metropolitana de Monterrey durante los meses septiembre 2022 a marzo 2024. Comparación entre el uso de trampas BG-GAT para captura de mosquitos y aspirados en zonas de descanso.	30
Figura 10. Comparación entre el uso de trampas BG-GAT y aspirado activo.	31
Figura 11. Estimaciones de diversidad alfa, para las especies de culícidos del área metropolitana de Monterrey.	32
Figura 12. Índice de rango abundancia de especies de mosquito en el área metropolitana de Monterrey.	33

Figura 13. Índice de similitud de comunidades de Morisita.	33
Figura 14. Distribución estacional de mosquitos colectados en el área metropolitana de Monterrey y precipitación acumulada mensualmente.	34
Figura 15. Análisis de correlación de Pearson entre la abundancia de mosquitos <i>Ae. aegypti</i> y la lluvia: datos acumulados mensualmente.	35
Figura 16. Análisis de correlación de Pearson entre la abundancia de mosquitos <i>Ae. albopictus</i> y la lluvia: datos acumulados mensualmente.	36
Figura 17. Análisis de correlación de Pearson entre la abundancia de mosquitos <i>Cx. pipiens quinquefasciatus</i> y la lluvia: datos acumulados mensualmente.	37
Figura 18. Distribución estacional de mosquitos colectados en el área metropolitana de monterrey y temperatura acumulada mensualmente.	37
Figura 19. Análisis de correlación de Pearson entre la abundancia de <i>Ae. aegypti</i> y la temperatura: datos acumulados mensualmente.	38
Figura 20. Análisis de correlación de Pearson entre la abundancia de <i>Ae. albopictus</i> y la temperatura: datos acumulados mensualmente	39
Figura 21. Análisis de correlación de Pearson entre la abundancia de <i>Cx. pipiens quinquefasciatus</i> y la temperatura: datos acumulados mensualmente.	39
Figura 22. PCR de control positivos y negativo.	40
Figura 23. Muestras de mosquitos detectadas mediante PCR multiplex.	42
Figura 24. Análisis de contenido alimentico en mosquitos del área metropolitana.	43
Figura 25. Municipios con mosquitos positivos para <i>Dirofilaria immitis</i> , y hospedadores detectados en el análisis de contenido alimenticio.	44

## RESUMEN

Las enfermedades transmitidas por vectores constituyen más del 17% de todas las enfermedades infecciosas y causan más de 700,000 muertes anuales. Estas enfermedades pueden ser provocadas por parásitos, bacterias o virus. Los vectores, que son organismos capaces de transmitir patógenos infecciosos entre personas o de animales a personas, incluyen en su mayoría artrópodos hematófagos que adquieren los microorganismos patógenos al alimentarse de la sangre de un portador infectado y los transmiten a un nuevo huésped. La filariasis, una enfermedad parasitaria causada por nematodos, se transmite a través de la picadura de un artrópodo vector que inocula larvas en el huésped (Rodríguez, 2002). Este estudio se centró en la investigación de la presencia de microfilarias en mosquitos en el área metropolitana de Monterrey, N.L., México, abarcando los municipios de Monterrey, Guadalupe, Juárez, Apodaca y San Nicolás, con el objetivo de mejorar la comprensión de la epidemiología de enfermedades transmitidas por vectores en la región. Se recolectaron mosquitos utilizando trampas BG-GAT en domicilios y aspiradores en zonas cercanas a estos, y los ejemplares fueron analizados en el Laboratorio de Entomología Médica de la UANL. La extracción de ADN y la PCR múltiple se emplearon para detectar la presencia de microfilarias de *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria reconditum* y *Dirofilaria repens*. De un total de 747 mosquitos hembra recolectados, se identificaron microfilarias de *Dirofilaria immitis* en 15 mosquitos provenientes de cuatro localidades de muestreo: Apodaca, Juárez, Monterrey y San Nicolás. Las especies infectadas incluyeron *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* y *Culex pipiens quinquefasciatus*, con tasas de infección de 12.66%, 13.77% y 21.56%, respectivamente. El análisis del contenido alimenticio reveló que los mosquitos se habían alimentado de perro, gato y humano. La mayor riqueza de especies de mosquitos se encontró en el municipio de Juárez (S=4), seguido por Apodaca (S=3), Monterrey (S=3), Guadalupe (S=2) y San Nicolás (S=1). Sin embargo, el municipio de Monterrey mostró la mayor abundancia de mosquitos, representando el 46% del muestreo total. La comparación con el índice de similitud de comunidades de Morisita mostró una similitud superior al 100% entre Apodaca y San Nicolás, y del 90% entre Monterrey y Guadalupe. *Culex pipiens quinquefasciatus* fue la especie dominante en todas las localidades de recolección. Estos hallazgos sugieren un riesgo potencial significativo para la transmisión de enfermedades transmitidas por vectores en la población local, destacando la necesidad de implementar estrategias efectivas de control vectorial en la región.

## ABSTRACT

Vector-borne diseases account for more than 17% of all infectious diseases and result in over 700,000 deaths annually. Parasites, bacteria, or viruses can cause these diseases. Vectors, organisms capable of transmitting infectious pathogens between individuals or from animals to humans, primarily include hematophagous arthropods. These arthropods acquire pathogenic microorganisms by feeding on an infected host's blood and transmitting them to a new host. Filariasis, a parasitic disease caused by nematodes, is transmitted via the bite of an arthropod vector that inoculates larvae into the host (Rodríguez, 2002). This study focused on investigating the presence of microfilariae in mosquitoes within the metropolitan area of Monterrey, Mexico, including the municipalities of Monterrey, Guadalupe, Juárez, Apodaca, and San Nicolás. The aim was to enhance understanding of the epidemiology of vector-borne diseases in the region. Mosquitoes were collected using BG-GAT traps and manual aspirators in residential areas and nearby locations, and the specimens were analyzed at the Medical Entomology Laboratory at the Universidad Autónoma de Nuevo Leon. DNA extraction and multiplex PCR were employed to detect the presence of *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria reconditum*, and *Dirofilaria repens*. Out of 747 female mosquitoes collected, *Dirofilaria immitis* was identified in 15 from four sampling locations: Apodaca, Juárez, Monterrey, and San Nicolas. The infected mosquito species included *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Culex pipiens quinquefasciatus*, with infection rates of 12.66%, 13.77%, and 21.56%, respectively. Blood meal analysis revealed that the mosquitoes had fed on dogs, cats, and humans. The highest mosquito species richness was observed in the municipalities of Juarez (S=4), followed by Apodaca (S=3), Monterrey (S=3), Guadalupe (S=2), and San Nicolás (S=1); however, Monterrey showed the greatest mosquito abundance, representing 46% of the total sampling. Morisita's index of similarity indicated a similarity of over 100% between Apodaca and San Nicolas and 90% between Monterrey and Guadalupe. *Culex pipiens quinquefasciatus* was the dominant species in all collection sites. These findings suggest a significant potential risk for the transmission of vector-borne diseases in the local population, underscoring the need to implement effective vector control strategies in the region.

# 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por vectores representan más del 17% de todas las enfermedades infecciosas y ocasionan más de 700 000 muertes cada año, (Vector-Borne Diseases, 2020). Estas enfermedades pueden ser causadas por parásitos, bacterias o virus. Los vectores son organismos vivos que pueden transferir patógenos infecciosos entre personas o de animales a personas. Muchos de estos vectores son artrópodos hematófagos que adquieren los microorganismos patógenos al ingerir la sangre de un portador infectado (ya sea persona o animal) y luego los transmiten a otro individuo una vez que los patógenos se han replicado (Rodríguez, 2002).

La filariasis es una enfermedad parasitaria causada por nematodos del orden Spirurida, pertenecientes a la superfamilia Filarioidea. Estos nematodos son delgados y vivíparos, con su primer estadio en forma de microfilaria. Se encuentran principalmente en tejidos y cavidades del cuerpo de los vertebrados. Infectan principalmente a mamíferos a través de un vector artrópodo hematófago, que transmite las larvas mediante su picadura (Bulanti, 2005). Una vez en el torrente sanguíneo, son ingeridas por el vector para completar su ciclo de vida, infectando después a otro hospedero (Anderson, 2000). La presencia de estos agentes patógenos en el sistema circulatorio se conoce como microfilaremia (Borras et al, 1999).

La familia Onchocercidae, dentro del orden Spirurida y la superfamilia Filarioidea, es reconocida por su capacidad para afectar a humanos y mamíferos con enfermedades parasitarias graves. Se estima que hay entre 70 y 80 géneros en esta familia, con aproximadamente 34 géneros altamente patógenos para mamíferos. Las enfermedades asociadas incluyen loasis, elefantiasis, oncocercosis, dirofilariasis, entre otras (Anderson, 2000). Se conocen seis especies de filarias que afectan a los perros, entre ellas el gusano del corazón *Dirofilaria immitis*, así como las especies *Filaroide hirthei*, *Filaroide milksi*, *Filaria osleri*, *Dipetalonema reconditum* y *Dirofilaria repens* (Bulanti, 2005). Las filariasis tienen una distribución global, aunque son más frecuentes en climas tropicales (Taylor, 2002); siendo endémicas en ciertas regiones de África, Asia, las Islas del Pacífico y América del Sur, impactando a una población estimada de 120 millones de personas en todo el mundo (Werner, 2022).

La filariasis es una enfermedad desatendida en México y no se considera endémica en el país. Se han registrado casos aislados de filariasis importada en personas que han viajado a áreas donde la

enfermedad es endémica. Sin embargo, la ausencia de un programa de vigilancia y monitoreo dificulta determinar la verdadera incidencia de la enfermedad en México (Jiménez, 2021).

La dirofilariasis, una enfermedad parasitaria transmitida por mosquitos está emergiendo como un tema de preocupación en diversas partes del mundo. Desde un punto de vista entomológico y parasitológico, esta afección revela una intrincada interacción entre los mosquitos, los nematodos del género *Dirofilaria* y los hospedadores vertebrados, incluidos los seres humanos (Hernandez, 2021). Es crucial considerar que la filariasis puede ocasionar serios problemas de salud, tales como inflamación crónica, disfunción renal, lesiones pulmonares y linfedema. Por ello, resulta fundamental prevenir la infección mediante el control de mosquitos y la atención temprana de los individuos infectados (Sánchez, 2014).

La filariasis tiene relevancia debido a su impacto en la salud y el bienestar de los afectados, su alta prevalencia global, las implicaciones económicas, así como su influencia en el turismo en áreas tropicales y su posibilidad de erradicación. El propósito de este estudio es abordar los posibles vectores (mosquitos) y confirmar la existencia de filarias a través de pruebas de PCR. Asimismo, busca determinar la frecuencia de la infección en dichos vectores.



## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Dirofilariasis: Epidemiología, Vector, Hospederos y Situación Actual**

La dirofilariasis es una enfermedad parasitaria causada por el nematodo *Dirofilaria immitis*, conocido comúnmente como el gusano del corazón. Esta patología afecta predominantemente a perros y otros animales domésticos, aunque en casos excepcionales puede presentar infecciones en humanos. La infección por *Dirofilaria immitis* ocurre cuando un mosquito infectado con larvas del nematodo pica a un huésped susceptible, transmitiendo las larvas al torrente sanguíneo del animal. Una vez en el sistema circulatorio, las larvas migran hasta asentarse en las arterias pulmonares y en el ventrículo derecho del corazón, donde se desarrollan y maduran a gusanos adultos (Otranto y Deplazes, 2019).

### **2.2. Filariasis epidemiología global y contexto regional**

#### **2.2.1. Perspectiva Global**

La filariasis es una enfermedad parasitaria crónica provocada por diversos nematodos pertenecientes al género Filarioidea. Estas infecciones son transmitidas por vectores insectos, principalmente mosquitos, y tienen el potencial de causar afecciones severas y discapacitantes en los individuos afectados. A nivel mundial, la filariasis se clasifica en dos formas principales: filariasis linfática y filariasis subcutánea (Lymphatic Filariasis, 2022). La filariasis linfática, cuya etiología se asocia predominantemente a *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* y *Brugia timori*, incide sobre el sistema linfático y puede dar lugar a elefantiasis, una afección debilitante caracterizada por una hinchazón extrema en las extremidades y otros tejidos (Molloy y Cavanagh, 2020). En contraste, la filariasis subcutánea, provocada por *Onchocerca volvulus* y *Loa loa*, se manifiesta mediante la formación de nódulos subcutáneos y puede desencadenar complicaciones oculares y otras graves afecciones (Fitzsimmons et al., 2019). Según la estimación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), más de 120 millones de personas en todo el mundo están infectadas con filariasis, siendo las regiones tropicales y subtropicales de África, Asia, y América Central y del Sur las más afectadas (WHO, 2023). Aunque los programas de control y eliminación de filariasis han mostrado avances significativos, la enfermedad sigue representando un desafío importante para la salud pública en numerosas áreas.

#### **2.3. Ciclo de vida general de las filarias**

Las microfilarias representan el estadio inmaduro de un grupo de organismos que se encuentran en el torrente sanguíneo en forma de filaria. Estas microfilarias son el producto del apareamiento de dos nematodos adultos dentro del hospedero definitivo, y son liberadas en el sistema circulatorio. Una vez en el torrente sanguíneo, son ingeridas por el vector para completar su ciclo de vida, infectando después a otro hospedero (Anderson, 2000). La presencia de estos agentes patógenos en el sistema circulatorio se conoce como microfilaremia (Borras et al., 1999).

Tomando en cuenta las diferentes especies, el ciclo de vida general (Figura 1) de estos nematodos cuando son adultos desarrollan una reproducción en la que las larvas viajan al torrente sanguíneo en forma de L1 primer estadio larval o microfilaria, éstas permanecen circulando en el hospedero para ser ingeridas por el vector, un artrópodo hematófago que cumple su función de hospedero intermediario, en el hospedero intermediario la larvas L1 se desarrollan en el interior del vector en los túbulos de Malpighi o el hemocele donde pasan a un segundo estadio L2 y posteriormente a un tercer estadio L3, siendo esta la última etapa y la infectiva al migrar a la cabeza y probóscide del vector y que se transmite a un nuevo hospedador cuando el vector pica nuevamente (Notarnicola, 2004).

Una vez en el hospedero, las larvas buscan un lugar adecuado para desarrollarse hasta convertirse en adultos (Rivas, 1990). La transmisión de la filariasis generalmente ocurre a través de mosquitos de las familias Culicidae o Phlebotomidae, así como también por moscas de la familia Tabanidae. Después de la transmisión, las larvas se posicionan en el órgano blanco para desarrollarse hasta convertirse en adultos (Supali et al., 2006).

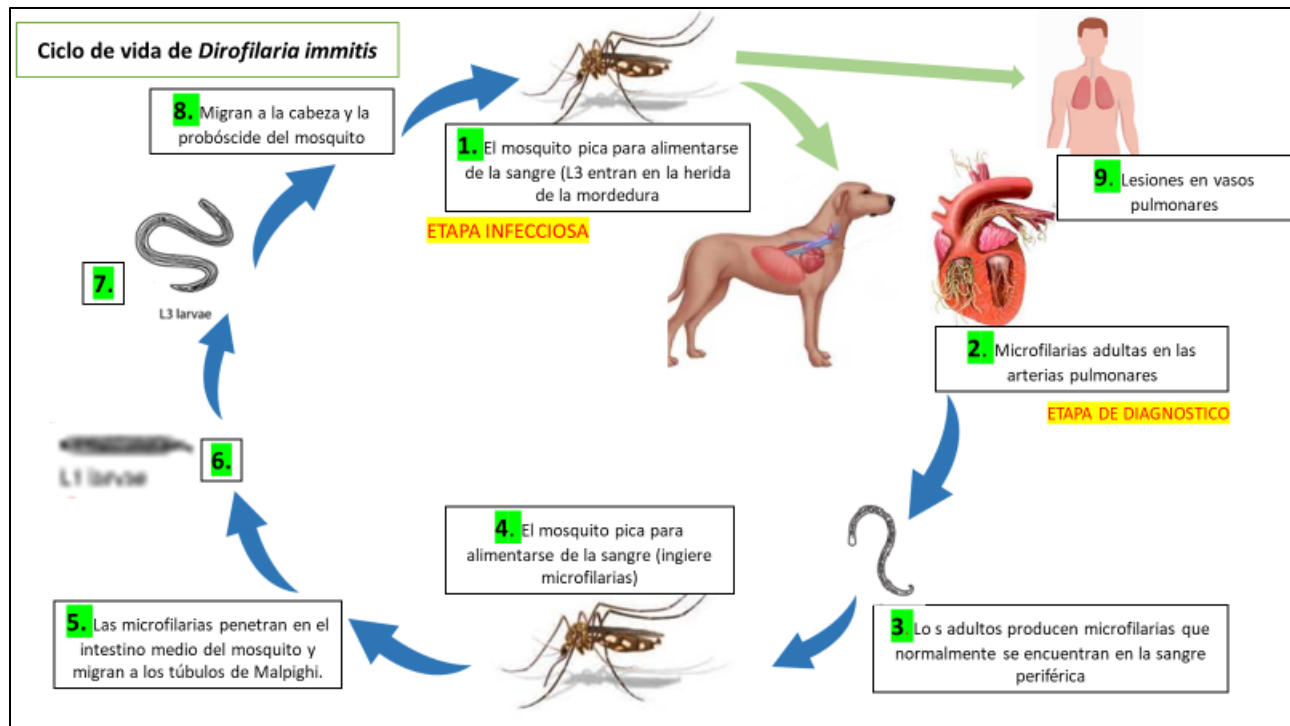


Figura 1. Ciclo de vida de *Dirofilaria immitis*. Hernandez, (2021).

#### 2.4. *Dirofilaria immitis*

Favia et al, (1996) a partir de la información genética de *Dirofilaria repens* y *D. immitis*, diseñaron herramientas moleculares específicas para identificar estas especies mediante PCR. Este método permitió distinguir microfilarias en muestras de sangre, larvas en desarrollo en mosquitos y adultos inmaduros en muestras de tejido, superando las dificultades de la identificación morfológica en etapas tempranas. La PCR demostró ser sensible y adaptable a diferentes condiciones de almacenamiento, excluyendo el uso de formalina. Esta capacidad de identificación precisa desde distintos tipos de muestras ha mejorado la detección de infecciones en humanos y ha potenciado las investigaciones epidemiológicas, particularmente en regiones donde ambas especies de nematodos son comunes, como Italia.

Mar et al. (2002) llevaron a cabo un estudio centrado en las especies *D. immitis* y *D. reconditum*, en el cual se clonaron y secuenciaron la región espaciadora transcrita. A partir de esto, se diseñaron dos pares de cebadores específicos derivados de ITS2 para su uso en PCR. Sus resultados indicaron que la PCR permitía la detección de  $1 \times 10^{-2}$  microfilarias de cada especie de parásito. Por lo

tanto, concluyeron que *D. immitis* y *D. reconditum* podrían diagnosticarse diferencialmente mediante esta técnica de PCR específica.

En la Guayana Francesa, Laidoudi et al. (2020) llevaron a cabo un estudio para detectar filariasis, utilizando 98 muestras de sangre canina. Estas muestras fueron evaluadas mediante la prueba de antígeno del gusano del corazón y análisis de ADN de filarias y *Wolbachia* mediante qPCR multiplex específica de especie. Se detectaron antígenos del gusano del corazón en 15 perros. De estos, seis se consideraron infecciones ocultas, ya que no se detectaron microfilarias ni ADN de *Dirofilaria immitis*. Se identificaron 11 aislados de *D. immitis*, correspondientes a una cepa de baja virulencia. Además, seis de los aislados de *D. immitis* resultaron positivos para endosimbiontes de *Wolbachia* asociados a *D. immitis*.

Prichard (2021), presentó una prueba de supresión de microfilarias que puede servir como prueba sustituta. El tratamiento anti-*Wolbachia* con doxiciclina, administrada diariamente durante 28 días, ha demostrado reducir la transmisión y eliminar los parásitos adultos. No obstante, se requieren nuevas clases de preventivos contra el gusano del corazón. Aunque cualquier estrategia preventiva debe ser altamente efectiva, los requisitos de registro para una eficacia del 100 % pueden obstaculizar el desarrollo de nuevas clases útiles de preventivos. La continua dependencia de los preventivos de lactona macrocíclica, cuando no son efectivos contra los genotipos resistentes, podría propagar la resistencia y permitir la proliferación de más enfermedades.

En un estudio más reciente, Scavo et al. (2022) evaluaron la prevalencia de *D. immitis* en perros, muestreando un total de 200 muestras de sangre. Las muestras de suero canino fueron analizadas con el kit DiroCHEK® antes y después de disociaciones de complejos inmunes, seguido de la aplicación de una PCR cuantitativa y una qPCR basada en sonda. Los resultados revelaron una prevalencia del 40.8% en perros mayores de 6 meses. Se detectó el antígeno del gusano del corazón en el 33.5% de los perros antes y en el 40.7% después de las disociaciones de complejos inmunes utilizando DiroCHEK®. Además, el 20,1% de los perros arrojaron resultados positivos mediante la qPCR basada en sonda, mientras que solo uno resultó positivo con HRM qPCR.

Por otro lado, Sobotyky et al. (2022), determinaron la ocurrencia de *D. immitis* en coyotes en todo Texas mediante detección de antígenos y ensayos moleculares. Se recolectaron muestras de sangre de 122 coyotes, las cuales se evaluaron serológicamente utilizando DiroCHEK®, qPCR y PCR

convencional. Los resultados combinados mostraron 12 muestras positivas: siete para antígeno, ocho para qPCR y cuatro para PCR convencional. Estos hallazgos confirman la presencia de infección por *D. immitis* en coyotes tanto en el sur como en el norte de Texas.

## 2.5.El Vector de la *Dirofilariasis*

El principal vector de *Dirofilaria immitis* es el mosquito del género *Aedes*, aunque otras especies de mosquitos, como *Culex* y *Anopheles*, también pueden participar en la transmisión de la enfermedad. Los mosquitos sirven como hospedadores intermedios en el ciclo de vida del parásito, permitiendo que las larvas se desarrollen en su interior antes de ser transmitidas a un nuevo huésped durante la picadura (Nelson et al., 2020). La presencia y densidad de estos vectores son factores determinantes en la epidemiología de la *dirofilariasis*. Condiciones climáticas que favorecen la proliferación de mosquitos, tales como temperaturas cálidas y alta humedad, incrementan el riesgo de transmisión de la enfermedad (Rojas et al., 2022).

### 2.5.1. Registro de posibles mosquitos portadores de enfermedades en Nuevo León

La *microfilariasis* canina se encuentra ampliamente difundida en todo el mundo y está vinculada a la presencia de vectores como mosquitos. Los dípteros, especialmente, actúan como portadores de organismos patógenos tanto para humanos como para animales, tales como plasmodios, filarías y arbovirus. En el estado de Nuevo León, Elizondo (2002), proporciona una lista familias y especies presentes en la región en la que se detallan las especies mosquitos en los diferentes municipios de Nuevo León (Tabla 1).

**Tabla 1.** Especies de mosquitos distribuidas por municipios en el estado de Nuevo León (Elizondo, 2002).

MUNICIPIO	ESPECIES
Apodaca	<i>Cx. tarsalis</i> , <i>Cx. p. quinquefasciatus</i> , <i>An. pseudopunctipennis</i> , <i>Ae. aegypti</i>
Juárez	<i>Cx. tarsalis</i> , <i>Cx. p. quinquefasciatus</i> , <i>An. pseudopunctipennis</i> , <i>Ae. aegypti</i>
Guadalupe	<i>Cx. tarsalis</i> , <i>Ae. aegypti</i>
Monterrey	<i>Cx. tarsalis</i> , <i>Cx. p. quinquefasciatus</i> , <i>An. pseudopunctipennis</i> , <i>Ae. aegypti</i>
San Nicolás de los Garza	<i>Cx.tarsalis</i> , <i>Cx.p. quinquefasciatus</i> , <i>An. pseudopunctipennis</i> , <i>Ae. aegypti</i>

## **2.6.Hospederos y Afectación Humana**

Los hospederos definitivos de *Dirofilaria immitis* son principalmente los perros domésticos, que se infectan a través de la picadura de mosquitos infectados. En los perros, el parásito puede provocar una serie de graves problemas cardiovasculares y pulmonares, incluyendo insuficiencia cardíaca y daño pulmonar (Nielsen et al., 2021). Los síntomas en los caninos pueden variar desde tos y dificultad respiratoria hasta insuficiencia cardíaca severa (Otranto y Deplazes, 2019). Aunque menos frecuente, también pueden infectarse los gatos, generalmente presentando síntomas menos severos.

En humanos, la dirofilariasis es menos común y generalmente se manifiesta en dos formas: dirofilariasis subcutánea o pulmonar. La forma subcutánea se caracteriza por la aparición de nódulos o tumores debajo de la piel, mientras que la forma pulmonar puede provocar tos y dolor torácico (Deplazes et al., 2022). Los casos humanos son esporádicos y se deben a la migración de larvas que no completan su ciclo de vida en el organismo humano, impidiendo que lleguen a madurar completamente (Morchon et al., 2012).

## **2.7.Especies de Filarias que Causan Problemas en México**

En México, la prevalencia de la filariasis es notablemente inferior en comparación con otras regiones tropicales. Sin embargo, algunas especies de filarias continúan siendo motivo de preocupación. *Wuchereria bancrofti* es la principal especie responsable de la filariasis linfática en el país. A pesar de que los casos son menos frecuentes en comparación con África o Asia, la enfermedad sigue siendo reportada ocasionalmente en áreas endémicas (González et al., 2021).

Por otro lado, *Onchocerca volvulus*, el agente etiológico de la oncocercosis o "ceguera de los ríos", ha sido detectado en México, aunque con menor frecuencia. La prevalencia de esta especie en el país ha disminuido de manera significativa gracias a la implementación de programas de control y tratamiento efectivos (Gutiérrez et al., 2022). No obstante, la oncocercosis persiste como un problema en algunas áreas rurales donde los vectores, como las moscas negras, siguen presentes.

Al contrario, la filariosis canina en México representa una preocupación significativa para la salud veterinaria, principalmente debido a la infección por *Dirofilaria immitis*, que causa la filariosis cardíaca. No obstante, otras especies de filarias, como *Dipetalonema reconditum* y *Dirofilaria*

*repens*, también revisten interés epidemiológico. Aunque *Dipetalonema reconditum* tiene una patogenicidad menor, su identificación es crucial para la correcta diferenciación de otros tipos de filariosis (Roberts et al., 2019). En contraste, *Dirofilaria repens* es conocido por inducir problemas dermatológicos en caninos y, aunque menos frecuente, también puede afectar a humanos en casos aislados (Gálvez et al., 2021).

### **2.7.1. Dirofilaria immitis en México.**

En México, se han realizado diversos estudios que detallan las especies de filarias presentes en distintos estados del país. entre estos, destacan especialmente aquellos centrados en la familia onchocercidae, los cuales constituyen contribuciones relevantes al campo de la parasitología; estos trabajos documentan las especies parasitarias y sus áreas de distribución, así como los hospederos muestreados en diferentes regiones (Hernández, 2021). La oncocercosis, causada por la filaria *Onchocerca volvulus* y transmitida por la mosca negra, es una enfermedad endémica en ciertas regiones del país, especialmente en áreas rurales de los estados de Chiapas, Oaxaca, Guerrero, Veracruz e Hidalgo (García, 1962). Actualmente, la Secretaría de Salud de México ha implementado programas de control y prevención de la oncocercosis en estas áreas endémicas. Estos programas incluyen la distribución de medicamentos y la aplicación de medidas para reducir la población de moscas negras. Para el año 2015, la Organización Mundial de la Salud considera que la oncocercosis en México ha sido erradicada (OMS, 2024).

En Mexicali, Baja California, durante el período comprendido entre septiembre de 2012 y septiembre de 2013, Ortega (2014), llevó a cabo un estudio de detección molecular de *Dirofilaria immitis* en perros y mosquitos utilizando el Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas (ELISA) y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Este estudio implicó el análisis de muestras sanguíneas de 284 perros y 903 mosquitos hembra, resultando en un total de 6 perros seropositivos y 9 positivos por PCR. Se observó una concordancia del 100% entre las pruebas serológicas, mientras que entre la prueba serológica y la molecular se registró una concordancia moderadamente alta ( $\kappa=0.78$ ). Además, se determinó la abundancia relativa y la tasa mínima de infección por mosquito infestado, lo que evidenció la presencia de *Dirofilaria immitis* tanto en perros como en mosquitos.

En una encuesta domiciliaria aleatoria llevada a cabo entre 2016 y 2017 en Tabasco, México, Torres et al. (2018) recolectaron un total de 1050 muestras de sangre de perros. Estas muestras

fueron sometidas a análisis de ADN mediante PCR utilizando cebadores pan-filariales y diversos cebadores específicos de especies. Asimismo, se realizaron recolecciones de mosquitos en reposo tanto en interiores como en exteriores mediante aspiración manual, con el fin de identificar las especies de nematodos filariales mediante PCR. Los resultados revelaron la presencia de 84 perros positivos a *D. immitis* y 3 a *Acanthocheilonema sp.* En cuanto a los mosquitos, se identificaron 4 grupos de *Culex quinquefasciatus* positivos a *D. immitis*, obteniéndose una tasa mínima de infección del 2.9%, calculada como el número de grupos positivos por cada mil mosquitos analizados. Estos hallazgos sugieren que *Cx. quinquefasciatus* podría ser un vector potencial en esta región.

Rodríguez et al. (2019), realizaron un estudio con el propósito de determinar la prevalencia de *D. immitis* en perros domésticos de los municipios de Cuauhtepic y Acapulco de Juárez, en el estado de Guerrero. Para ello, se obtuvieron muestras de sangre de caninos mayores de un año, y se aplicaron las técnicas de gota gruesa y Knott. Los resultados indicaron que el municipio de Cuauhtepic presentó la prevalencia más alta con un 15.68%, mientras que en Acapulco de Juárez se registró un 7.44% de caninos positivos a microfilarias. Además, se observó que los machos de talla pequeña a mediana que vivían en exteriores mostraron mayor prevalencia.

## **2.8. Factores que influyen en la Distribución de *D. reconditum* y *D. repens***

La distribución de *D. reconditum* y *D. repens* en México está determinada por varios factores ambientales, entre los que destacan la temperatura y la humedad, ya que estos factores influyen en la presencia y actividad de los vectores responsables de la transmisión (Torres et al., 2020). Además, la densidad de la población canina y las prácticas de control de vectores desempeñan un papel fundamental en la prevalencia de estas infecciones, ya que una mayor densidad de perros puede aumentar la probabilidad de transmisión, mientras que las estrategias efectivas de manejo de vectores pueden reducir la incidencia de la enfermedad (Vargas et al., 2021). Aunque ambos parásitos están presentes en el país, su prevalencia es notablemente inferior en comparación con *Dirofilaria immitis*. Para gestionar eficazmente estas infecciones en la población canina, es crucial realizar una identificación precisa y un monitoreo continuo. Este enfoque permitirá una vigilancia adecuada y una intervención oportuna para mitigar la propagación de estos nematodos.



### **2.8.1. Distribución de *Dipetalonema reconditum***

*Dipetalonema reconditum* es un nematodo que, a diferencia de *Dirofilaria immitis*, suele provocar menos síntomas clínicos en perros. Esta especie ha sido reportada en varias regiones de México, aunque su prevalencia muestra variaciones (García et al., 2020). La identificación de *D. reconditum* puede resultar desafiante debido a su similitud con *Dirofilaria immitis* en las pruebas de diagnóstico rutinarias (López et al., 2018).

Un estudio llevado a cabo en la Ciudad de México reveló la presencia de *D. reconditum* en el 5% de los casos examinados dentro de una muestra de perros (Mendoza et al., 2022). En contraste, en regiones como Jalisco y Nuevo León, la prevalencia parece ser aún menor, con casos reportados de manera esporádica que sugieren una distribución focal en lugar de una propagación generalizada (Pérez et al., 2019).

### **2.8.2. Distribución de *Dirofilaria repens***

*Dirofilaria repens* ha sido reportado en diversas regiones de México, aunque su incidencia es notablemente menor en comparación con *Dirofilaria immitis* (Orozco et al., 2021). Este nematodo se encuentra predominantemente en áreas donde los vectores, como los mosquitos del género *Culex*, son prevalentes.

Investigaciones realizadas en el estado de Yucatán han revelado la presencia de *D. repens* en el 3% de los perros examinados, indicando una presencia relevante en ciertas zonas (Ramírez et al., 2023). En contraste, en estados del norte como Chihuahua, la frecuencia de casos es extremadamente baja, lo que sugiere que factores climáticos pueden influir en la prevalencia de esta especie (Sánchez et al., 2022).

## **2.9. Actualidad de la filariasis en el mundo**

A nivel global, la dirofilariasis es una enfermedad que afecta predominantemente a países situados en zonas tropicales y subtropicales. Según la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), la enfermedad está ampliamente distribuida en regiones de África, Asia, y América Central y del Sur (OIE, 2023). En Europa, la prevalencia varía según la región, siendo más común en el sur del continente, especialmente en países como Italia y España. La expansión de la dirofilariasis a

nuevas áreas está siendo impulsada por el cambio climático y el desplazamiento de animales de compañía (Rossi et al., 2022).

En Asia, la dirofilariasis representa un problema de salud significativo en países como India y China, donde se observa una alta prevalencia en perros y algunos casos en humanos. Las condiciones socioeconómicas y la infraestructura de salud pública en estos países pueden dificultar los esfuerzos de control de la enfermedad (Patel et al., 2023).

### **2.9.1. Situación Actual en América**

En América del Norte, la dirofilariasis es endémica en diversas regiones de los Estados Unidos, particularmente en el sur y el sureste del país. Según la American Heartworm Society (2021), se reporta una prevalencia de hasta el 40% en algunas áreas de alta incidencia. En estas regiones, los programas de prevención son comunes e incluyen el uso de medicamentos preventivos y estrategias para el control de la población de mosquitos. En Canadá, aunque la prevalencia es menor en comparación con los Estados Unidos, se está incrementando debido a la expansión del hábitat de los vectores (McCall et al., 2022).

En América del Sur, la dirofilariasis también está en aumento, con casos reportados en países como Brasil y Argentina. La prevalencia en perros en estos países puede ser comparable a la observada en las zonas más afectadas de América del Norte. La transmisión de la enfermedad en América del Sur está influenciada por condiciones ambientales que favorecen a los vectores y la falta de programas de control eficaces (Silva et al., 2022).

### **2.9.2. Situación Actual en México**

En México, la dirofilariasis ha sido reconocida como una enfermedad emergente con una creciente incidencia. La prevalencia de esta infección en perros ha experimentado un aumento notable, especialmente en áreas urbanas y periurbanas. Un estudio reciente realizado en la Ciudad de México reportó una prevalencia de infección de hasta el 22% entre los perros examinados, lo que señala una expansión significativa de la enfermedad (Romero et al., 2022). Para Nuevo León, se ha registrado una alta prevalencia de microfilariasis, con un 50% de los perros examinados infectados por microfilarias, siendo *Dirofilaria immitis* es la especie predominantemente reportada

en el estudio (Hernández, 2021). Este incremento en la prevalencia se atribuye en parte a la expansión del hábitat del mosquito vector, facilitada por el cambio climático y la urbanización acelerada (Hernández et al., 2023). Para enfrentar esta problemática, México ha implementado una serie de esfuerzos de control, que incluyen campañas de concienciación pública y programas de prevención. Estos programas están dirigidos a reducir la población de mosquitos vectores y promover la desparasitación regular de los perros, con el objetivo de limitar la propagación de la dirofilariasis y mitigar su impacto en la salud animal y pública.

## **2.10. Estudios para el estado de Nuevo León**

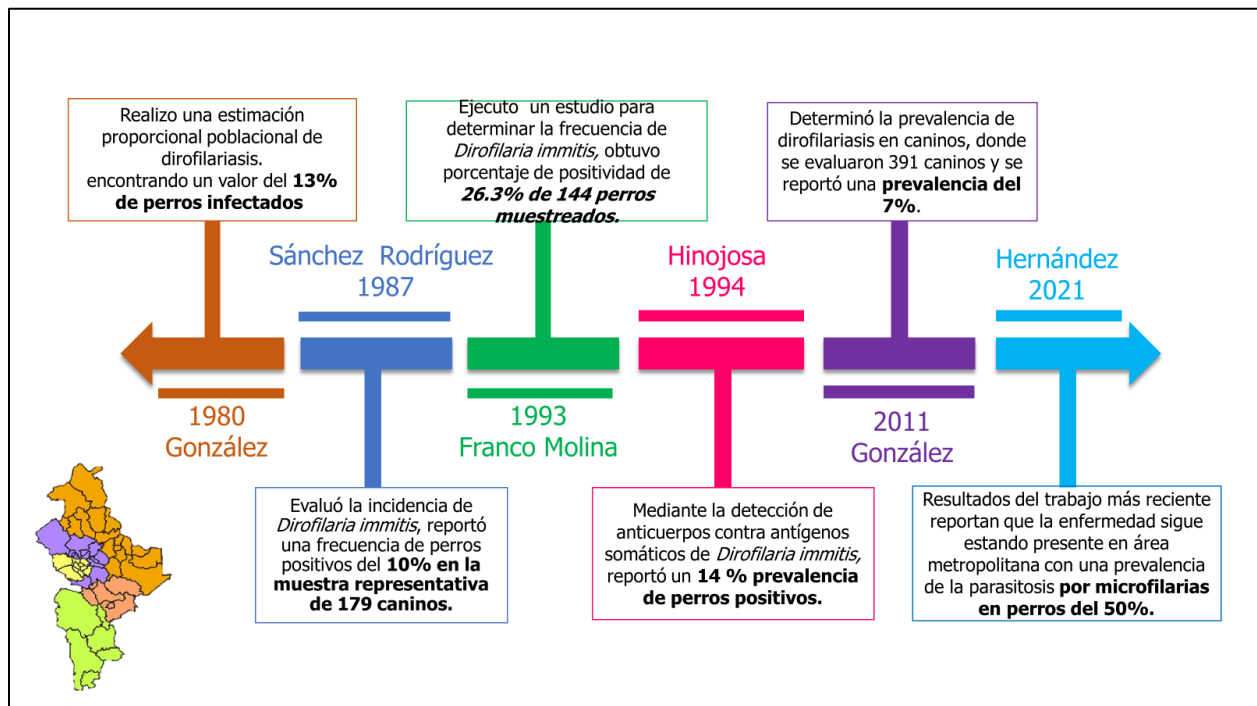
En el estado de Nuevo León, diversos estudios han abordado la problemática de la dirofilariasis, una enfermedad parasitaria transmitida por mosquitos que afecta principalmente a los caninos. La investigación ha sido crucial para entender la prevalencia y las características de esta enfermedad en la región. Estos hallazgos subrayan la diversidad de parasitosis en la región y su posible impacto en la salud.

González (1980) centró su investigación en la dirofilariasis en caninos del área metropolitana de Monterrey. A través de un muestreo clínico, identificó que la presencia de mosquitos y la escasa sintomatología en perros infectados hacían necesaria una evaluación más profunda del parásito *Dirofilaria immitis*, resaltando la falta de estudios previos y la necesidad de mayor atención en la región. En 1987, Sánchez Rodríguez analizó la incidencia de *Dirofilaria immitis* en caninos mediante la detección de sangre, encontrando una frecuencia del 10% en una muestra de 179 perros. Este estudio proporcionó una estimación inicial de la prevalencia de la enfermedad en la población canina local. Franco (1993) también se enfocó en el área metropolitana de Monterrey, determinando la frecuencia de la enfermedad en perros sospechosos y reportando una positividad del 26.3% en 144 perros. Su investigación utilizó técnicas convencionales de laboratorio, subrayando la necesidad de métodos de diagnóstico más precisos. En 1994, Hinojosa Hernández presentó un estudio sobre la detección de anticuerpos contra *Dirofilaria immitis* en perros clínicamente sanos. Encontró un 14% de perros positivos en Monterrey y evaluó la sensibilidad y especificidad de las pruebas, proporcionando datos importantes sobre la seroprevalencia de la enfermedad. Más recientemente, González (2011) investigó la prevalencia de la dirofilariasis en Monterrey, dividiendo la ciudad en 16 cuadrantes y evaluando 391 caninos. Reportó una

prevalencia del 7% utilizando una prueba de anticuerpos tipo ELISA, ofreciendo una visión más actualizada de la situación.

Finalmente, Hernández (2021) utilizó la prueba de diagnóstico Knott modificada para analizar microfilarias en 102 perros en Monterrey, hallando una prevalencia del 50%. Identificó tanto *Dirofilaria immitis* como *Dipetalonema reconditum*, este resultado prevalente alto en comparación con estudios anteriores sugiere una posible alta carga de parásitos en la población canina o una mayor sensibilidad en el método de diagnóstico utilizado. La identificación de *Dipetalonema reconditum* también señala la presencia de múltiples especies de microfilarias, lo cual puede complicar el diagnóstico.

En resumen, los trabajos sobre dirofilariasis en Nuevo León muestran una evolución en la comprensión de la enfermedad, con discrepancias en la prevalencia que reflejan tanto avances en las técnicas de diagnóstico como variaciones en las metodologías y poblaciones estudiadas (Figura 2). Estos estudios destacan la necesidad de una vigilancia continua y el desarrollo de estrategias de diagnóstico más precisas para abordar eficazmente la dirofilariasis en la región.



**Figura 2.** Línea del tiempo, estudios y prevalencia de microfilariasis reportadas en diferentes años en el área metropolitana de Monterrey Nuevo León. Elaboración propia.

### **3. JUSTIFICACION**

Las filarias son uno de los grupos de microorganismos responsables de enfermedades zoonóticas a nivel mundial. Según la Organización Mundial de la Salud, 863 millones de personas en 47 países aún enfrentan la amenaza de la filariasis linfática, mientras que 20 millones de personas se ven afectadas por la oncocercosis, esta última registrada en México y erradicada en 2015 (OMS, 2022). Aun cuando recientemente se ha incrementado el estudio sobre las microfilarias en animales domésticos, especialmente en caninos que conviven estrechamente con los seres humanos en el estado de Nuevo León, sigue siendo necesario de recopilar más datos sobre estas filarias y sus posibles transmisores, como las especies de mosquitos que actúan como vectores. Este esfuerzo busca aportar información relevante en los campos de la entomología, parasitología y nematología en el estado de Nuevo León.

#### **4. HIPÓTESIS.**

La presencia de vectores de filariasis (mosquitos) en el estado de Nuevo León sostiene las infecciones entre animales de compañía (perros, gatos, aves) e incrementan el riesgo de transmisión al humano.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1.Objetivo general**

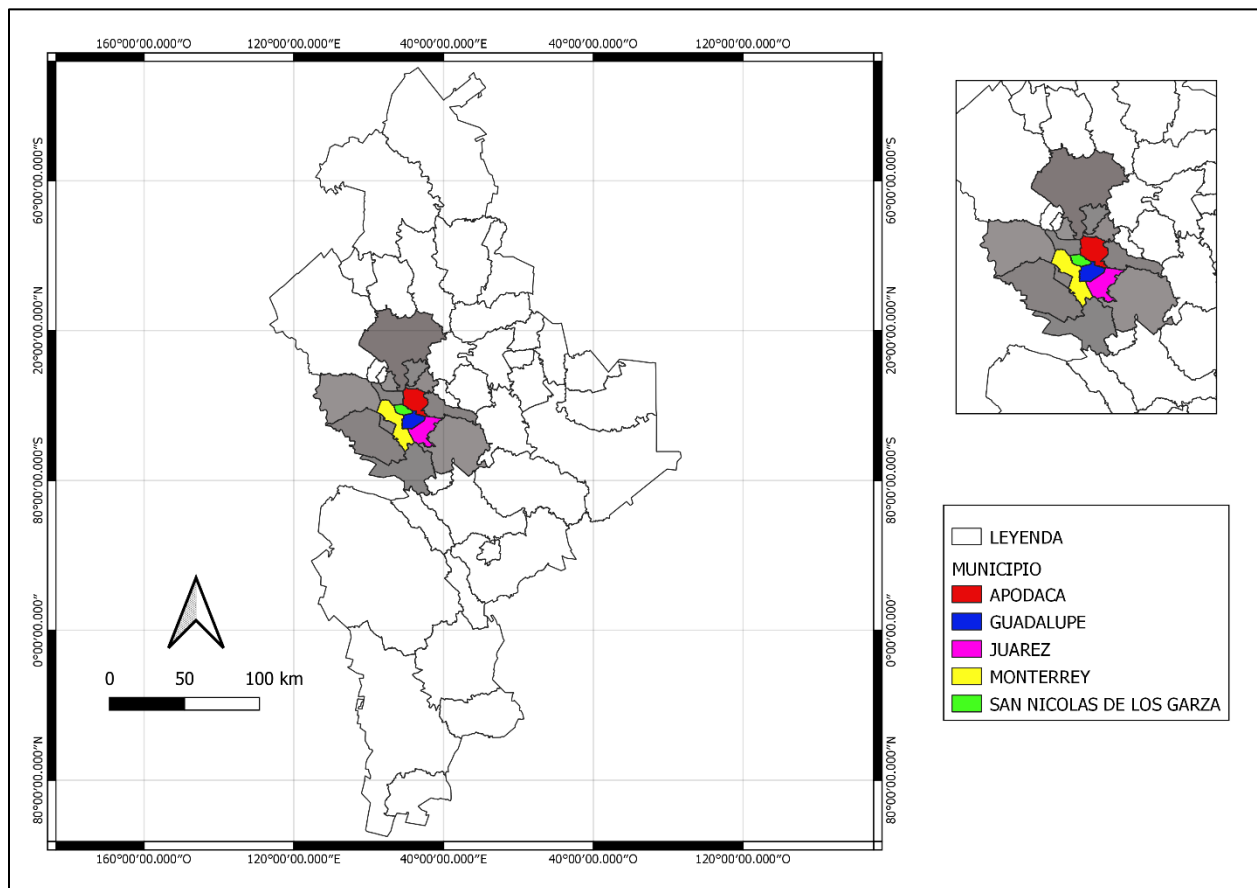
Detectar molecularmente microfilarias caninas en mosquitos y determinar la tasa media de infección en el área metropolitana de Monterrey, Nuevo León.

### **5.2.Objetivos específicos**

- Estandarizar una técnica de PCR multiplex para la identificación molecular de microfilarias caninas en mosquitos vectores.
- Caracterizar las microfilarias presentes en mosquitos vectores del área metropolitana de Monterrey, Nuevo León, mediante PCR.
- Determinar la tasa media de infección por microfilarias en mosquitos.
- Análizar la diversidad alfa y beta de los mosquitos vectores en el área de estudio.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

El área de estudio se encuentra dentro de la zona metropolitana de Monterrey, Nuevo León, México, actualmente conformada por 16 municipios, que forman una mancha urbana con exponencial crecimiento, localizado en las coordenadas  $25^{\circ}40'0''\text{N}$  y  $100^{\circ}18'0''\text{O}$  de longitud oeste, con una superficie total de  $7657\text{ km}^2$  de acuerdo con información del INEGI, (2023). Se realizaron colectas de mosquitos en 5 de los 16 municipios del área metropolitana; Apodaca, Guadalupe, Juárez, Monterrey y San Nicolas, en domicilios tomados al azar, y zonas aledañas, estableciendo como puntos de inicio zonas con previos reportes de infección por microfilarias en caninos (Hernández, 2021) (Figura 3).



**Figura 3.** Distribución geográfica de la zona metropolitana de Monterrey, N.L., y los municipios seleccionados para el muestreo. Fuente: elaboración propia.



## **6.1.Clima**

La situación fisiológica del área bajo estudio exhibe un clima característico propio del estado de Nuevo León, influenciado por las peculiaridades municipales. Los tipos climáticos del sitio, según la clasificación de Köppen adaptada por García (1970) y presentada en la carta temática "F13-02" de INEGI a escala 1:250,000, abarcan un rango de temperatura de 20-24°C y una precipitación anual de 500 a 1000 milímetros. Se identifican los siguientes climas predominantes: semiseco semicálido (34%), seco muy cálido y cálido (20%), semiseco muy cálido y cálido (12%), semicálido subhúmedo con lluvias estivales de baja humedad (12%), y semicálido subhúmedo con lluvias estivales de humedad moderada (2%). La temperatura media anual es de 23°C, con registros extremos de 8°C como mínima absoluta y 43°C como máxima absoluta, siendo junio, julio y agosto los meses más calurosos. El período de lluvias comprende de julio a septiembre, con una precipitación media anual de 640.3 milímetros (INEGI 2024).

## **6.2.Trabajo de campo**

### **6.2.1. Colecta de mosquitos**

Para la recolecta de mosquitos se colocaron trampas BG-GAT para la captura de hembras grávidas en domicilios en el área metropolitana de Monterrey, siguiendo la Guía Metodológica para la Vigilancia Entomológica con Ovitrampas del CENAPRESE (2020), se procedió a seleccionar un Área Geoestadística Básica (AGEB) y se dividió en manzanas dentro de los municipios de Apodaca (1900604062151), Juárez (1903100010069), Guadalupe (1902600010853) y Monterrey (190390001445A) (Figura 4).

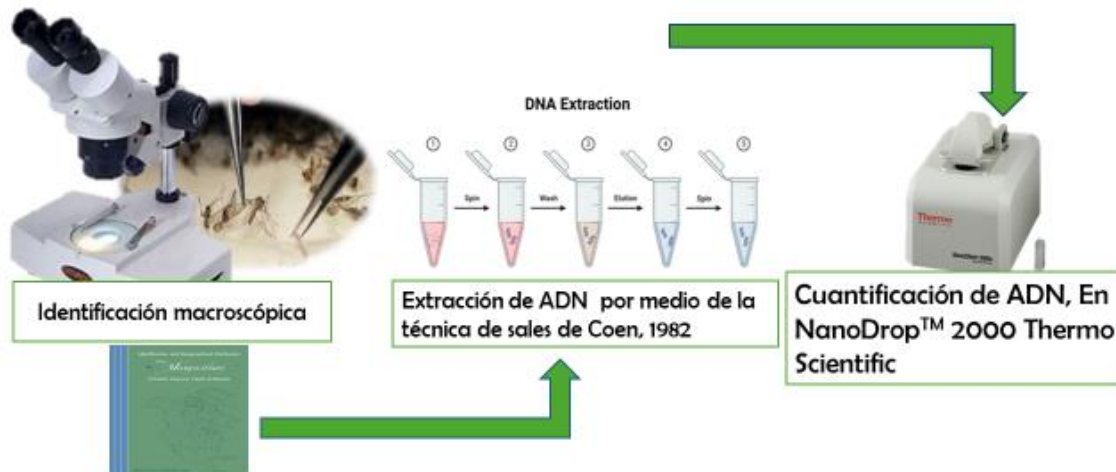
Una vez colocadas las ovitrampas se realizaron revisiones dos veces por semana durante los periodos de muestreo y se colectaron los mosquitos con tubos de aspiración, así mismo también se revisaron zonas de descanso de mosquitos en los domicilios y aledaños como vegetación, huecos, charcas, estructuras artificiales y lugares con zonas sombrías y oscuras, los mosquitos colectados se colocaron en frascos y se trasladaron al laboratorio de Entomología Médica UANL, donde se congelaron a una temperatura de -20° C con la finalidad de sacrificarlos y preservarlos.



**Figura 4.** Representación cartográfica de las Áreas Geostatísticas Básicas (AGEB) subdivididas en manzanas correspondientes a Apodaca, Juárez (1903100010069), Guadalupe (1902600010853) y Monterrey (190390001445A). Fuente: Sistema de Clasificación Nacional de Entidades (SCINCE) del INEGI 2012.

### 6.3. Trabajo en laboratorio

Cada uno de los mosquitos muestreados, se identificó de acuerdo con las guías aprobadas por el laboratorio de Entomología Médica. Se utilizaron las claves de Darsie y Ward, (2000) para mosquitos. Posterior a esto se identificó el estado de Sella de Detinova, (Santos et al. 2019). Las hembras se clasificaron como alimentadas y no alimentadas, se agruparon por especies, y se colocaron individualmente en tubos Eppendorf para posteriormente llevar a cabo la extracción de ADN y detección de las filarias por medio de PCR, (Figura 5).



**Figura 5.** Proceso general del trabajo en laboratorio identificación y obtención de DNA genómico a partir de muestras de mosquitos.

### 6.3.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó con la técnica de sales de Cohen (1982). Los mosquitos fueron macerados individualmente utilizando pistilos Kontex en tubos Eppendorf de fondo cónico de 1.5 ml, en 100 µl de buffer de extracción (0.1M NaCl, 0.2M sacarosa, 0.1 Tris-HCl pH 9.1, 0.005M EDTA y 0.5% de dodecilsulfato de sodio- SDS). Posteriormente se centrifugaron durante 2 min a 14,000 rpm y se incubaron durante 30 minutos a 65°C. Transcurrido el tiempo se agregó a cada tubo 15 µl de acetato de potasio y se colocó a -20°C por al menos 30 min con la finalidad de que precipite el SDS. Una vez hecho esto se centrifugaron nuevamente a 14,000 rpm durante 15 min y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo donde se realizaron lavados con etanol al 100% y 70%. Finalmente, y una vez obtenido el pellet de ADN se secaron por 10 minutos y posterior a ello se utilizó una plancha caliente a 68° C por un periodo de 1-3 minutos, y se re suspendió en 20-30 µl de agua (Cellgro®, agua purificada estéril, grado de biología molecular). La concentración y la calidad de cada muestra de ADN se determinó por medio del equipo NanoDrop 2000® spectrophotometer (Rhode Island, USA).

### 6.4. Elaboración de control positivo

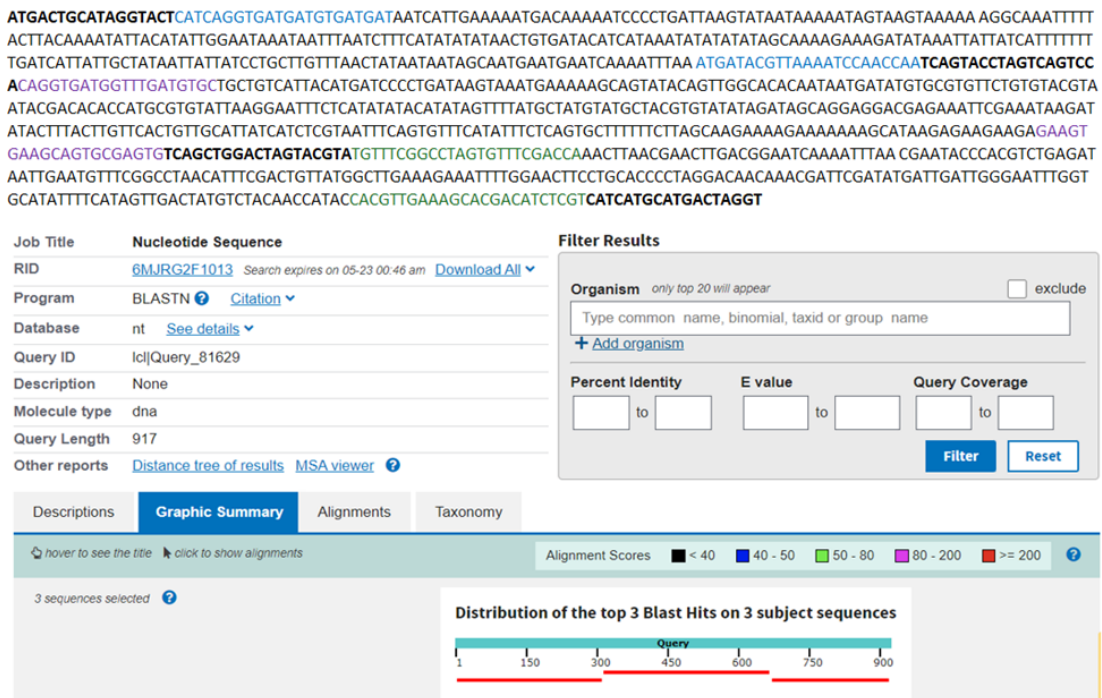
Se diseñó un control positivo para la detección de las tres especies de filariás mayormente reportadas en México: *Dirofilaria immitis*, *Dipetalonema reconditum* y *Dirofilaria repens*. Para ello se seleccionaron primers que amplificarán individualmente para las filarias de interés. Tomando como referencia los primer reportado por Rishniw et al 2006, las secuencias fueron obtenidas del GenBank (*Dirofilaria immitis* AF217800, *Dirofilaria repens* AF217801, *Dipetalonema reconditum* AJ242966) (Tabla 2). Tanto los primers como las secuencias específicas de cada especie, se sometieron de manera individual a una PCR virtual en el programa Amplifx®, con la finalidad de confirmar los aplicones de cada especie

**Tabla 2.** Primers utilizados para la amplificación de las especies *Dirofilaria immitis*, *Dipetalonema reconditum* y *Dirofilaria repens*.

Especie	Primer		Secuencia	Gen objetivo	bp
<i>Dirofilaria immitis</i>	DiF	Fwd	CAT CAG GTG ATG ATG TGA TGAT	ITS2	302
	DiR	Rev	TTGATTGGATTTTAAACGTATCATT		
<i>Dipetalonema reconditum</i>	DrF	Fwd	CAGGTGATGGTTTGATGTGC	ITS2	348
	DrR	Rev	CAC TCGCACTGCTTCACTTC		
<i>Dirofilaria repens</i>	DrepF	Fwd	TGTTTCGGCCTAGTGTTCGACCA	5SrRNA	247
	DrepR	Rev	ACGAGATGTCGTGCTTCAACGTG		

Rishniw, et al 2006.

Una vez confirmados los tres amplicones se diseñó una sola secuencia control de 970 bp conformada por las secuencias de las tres especies y que se utilizó como control positivo. Al inicio de la secuencia control y entre cada inicio de secuencia se agregó una serie de nucleótidos que no codifican para la región de la secuencia de los organismos con la finalidad de evitar el solapamiento. Posterior a esto se corrió una segunda PCR virtual y se confirmó la calidad de la secuencia y la correcta hibridación de los primers; adicional a esto la secuencia elaborada fue corrida en el programa BLAST para confirmar la alineación con las tres especies de filaria (Figura 6). La secuencia se envió a sintetizar a los laboratorios IDT (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, Iowa, USA).



**Figura 6.** Confirmación de alineamiento de la secuencia elaborada utilizando el programa BLAST.

### 6.5. Desarrollo de la PCR multiplex

La amplificación por PCR multiplex se llevó a cabo para cada mosquito recolectado. Los primers específicos para *Dirofilaria immitis*, *Dipetalonema reconditum* y *Dirofilaria repens* amplifican regiones específicas de 302, 348 y 247 bp respectivamente. Las pruebas para la optimización de las condiciones de PCR dieron como resultado el siguiente protocolo de PCR multiplex. La concentración de las muestras de DNA amplificado fue de 56 - 370 ng/  $\mu$ l. La reacción final se preparó a un volumen total de 10  $\mu$ l y contenía: 5  $\mu$ l de GoTaq polimerasa Colorless (Promega, Madison, WI, USA), 1  $\mu$ l de agua molecular, 1  $\mu$ l de muestra de ADN y 0.5  $\mu$ l de cada primer (10 mol/ul) (Tabla 3). Posteriormente, se realizó un gradiente de temperatura de 52 hasta 62°C para determinar la temperatura óptima de alineamiento en común para los tres pares de primers, basándonos en lo establecido por Rishniw et al. (2006). El protocolo de PCR se detalla a continuación: separación inicial de las cadenas de ADN a 94°C durante 2 min, seguido de 32 ciclos a 94°C (1 min), 52 - 62°C (1 min) and 72°C (30 s) y una extensión final a 72°C (7 min) (Tabla 4). Para el control individual de cada filaria se corrió la secuencia control solo con un par de marcadores (Table 5). Con los cebadores se colocó un tubo de PCR que contenía todos los componentes, excepto el ADN genómico, como control de contaminación. El control de secuencia se incluyó en cada PCR realizada (Table 5).

**Tabla 3.** Componentes de la PCR múltiple.

Componente	Cantidad
Agua	1 $\mu$ l
GoTaq polimerasa Colorless	5 $\mu$ l
Primer <i>Dirofilaria immitis</i>	
DiF	0.5 $\mu$ l
DiR	0.5 $\mu$ l
Primer <i>Dipetalonema reconditum</i>	
DrF	0.5 $\mu$ l
DrR	0.5 $\mu$ l
Primer <i>Dirofilaria repens</i>	
<i>DrepF</i>	0.5 $\mu$ l
<i>DrepR</i>	0.5 $\mu$ l
Muestra de ADN	1 $\mu$ l
Total	10 $\mu$ l

**Tabla 4.** Protocolo de estandarización de PCR para la amplificación de múltiples filarias en las muestras de mosquitos colectadas.

ETAPA	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Extensión inicial	94°	2 minutos	1
Desnaturalización	94°	1 minuto	32
Alineamiento	52 - 62°	1 minuto	
Elongación	72°	30 segundos	
Extensión	72°	7 minutos	1

**Tabla 5.** Componentes de la PCR individual.

<i>Dirofilaria immitis</i>	
GoTaq polimerasa Colorless	5 µl
Agua molecular	3 µl
Muestra de ADN	1 µl
DiF	0.5 µl
DiR	0.5 µl
Total	10 µl

<i>Dipetalonema reconditum</i>	
GoTaq polimerasa Colorless	5 µl
Agua molecular	3 µl
Muestra de ADN	1 µl
DrF	0.5 µl
DrR	0.5 µl
Total	10 µl

<i>Dirofilaria repens</i>	
GoTaq polimerasa Colorless	5 µl
Agua molecular	3 µl
Muestra de ADN	1 µl
DrepF	0.5 µl
DrepR	0.5 µl
Total	10 µl

Los productos amplificados se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% (Bioline, Tauton, MA, USA) en una solución amortiguadora de SYBR buffer. Los patrones de bandas se visualizaron bajo luz ultravioleta (UV) y luego se fotografiaron en un transiluminador Uvitec (Cambridge, Reino Unido). Al final de la amplificación, fue posible obtener hasta 3 productos de PCR por muestra, cuyo tamaño indicaba la especie contenida en la muestra. El control positivo que contiene la secuencia de mostro las tres bandas.

### 6.6. Caracterización de microfilarias en mosquitos

La amplificación del PCR multiplex se llevó a cabo individualmente para cada mosquito recolectado, siguiendo previamente un protocolo estandarizado. La mezcla de reacción PCR se preparó con un volumen total de 10 µl, compuesto por 5 µl de Taq polimerasa, 1 µl de agua molecular, 1 µl de muestra de ADN de mosquito y 1 µl de cada iniciador, diluidos a 10 mol. El perfil térmico utilizado comenzó con un calentamiento a 94°C durante 2 minutos, seguido de 32 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 60°C durante 1 minuto, elongación a 72°C durante 30 segundos y una extensión final a 72°C durante 7 minutos (Tabla 6) Posteriormente, los productos amplificados se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% en una solución amortiguadora de SYBR buffer. Finalmente, se visualizaron bajo luz UV para identificar patrones específicos de especies y determinar resultados positivos o negativos.

**Tabla 6.** Protocolo final de PCR multiplex utilizado para la amplificación de múltiples filarias en las muestras de mosquitos colectadas.

ETAPA	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Extensión inicial	94°	2 minutos	1
Desnaturalización	94°	1 minuto	32
Alineamiento	60°	1 minuto	
Elongación	72°	30 segundos	
Extensión	72°	7 minutos	1

### 6.7. Análisis de contenido alimenticio

Después de la extracción de ADN de las muestras y su posterior sometimiento a la reacción de PCR multiplex para la detección de filarias, se llevaron a cabo reacciones adicionales de PCR para el análisis del contenido alimenticio. Para esta etapa, se emplearon cebadores específicos diseñados para cuatro tipos de hospederos: humano, perro, gato y ave. Estos cebadores, reportados por Luis (2021), se detallan en la tabla 4 y se dirigieron al gen mitocondrial citocromo b (Tabla 7).

**Tabla 7.** Cebadores específicos para el gen mitocondrial citocromo b, utilizados en la PCR para la identificación de contenido alimenticio en mosquitos positivos a filarias.

Huésped	Cebador	Amplicón
Humano	Fwd CTCTCCTACACATCGGGCG Rev GTGATTGGCTTAGTGGGCGA	691pb
Perro	Fwd TATTCGCAACCATAGCCACA Rev TGAAAGGGAGGATGAAATGG	204pb
Gato	Fwd CGGCTCCTACACCTTCTCAG Rev TCGTGTTAGGGTGGCTTTGT	220pb
Ave	Fwd GAAACTTCACCCCAGCAAA Rev AGAGGGCGGAAGGTTATTGT	200pb

### 6.8. Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico para determinar la tasa media de infección (TMI) en las especies de mosquitos infectados. La TMI se calculó dividiendo el número de mosquitos infectados entre el número total de mosquitos de la especie y multiplicando por 1000 (Walter *et al.*, 1980).

$$TMI \frac{\text{número de positivos}}{\text{total de analizados}} \times 1000$$

Los resultados obtenidos de la colecta de mosquitos mediante el uso de trampas BG-GAT y aspirados activos fueron sometidos a una prueba t de Student con un nivel de significancia del 95%. El objetivo era respaldar conclusiones y determinar si existía una diferencia significativa entre ambos métodos de colecta.



Además, se llevaron a cabo análisis de diversidad Alfa (incluyendo los índices Gini- Simpson 1-D, Shannon H, Margalef y Equitatividad J) y Beta (como las curvas de rango abundancia e índice de similitud de comunidades de Morisita).

Para determinar la influencia de variables independientes acumuladas mensuales, (temperatura y precipitación), sobre la abundancia de mosquitos mensuales durante todo el periodo de muestreo, se llevó a cabo un análisis de correlación de Pearson ( $\alpha=0.05$ ) en el programa SPSS.

Para determinar el riesgo de la infección con la fuente de alimentación humana se realizó un análisis de Odds Ratio, tomando en cuenta las variables de infección, no infección y la alimentación con sangre humana de los mosquitos.

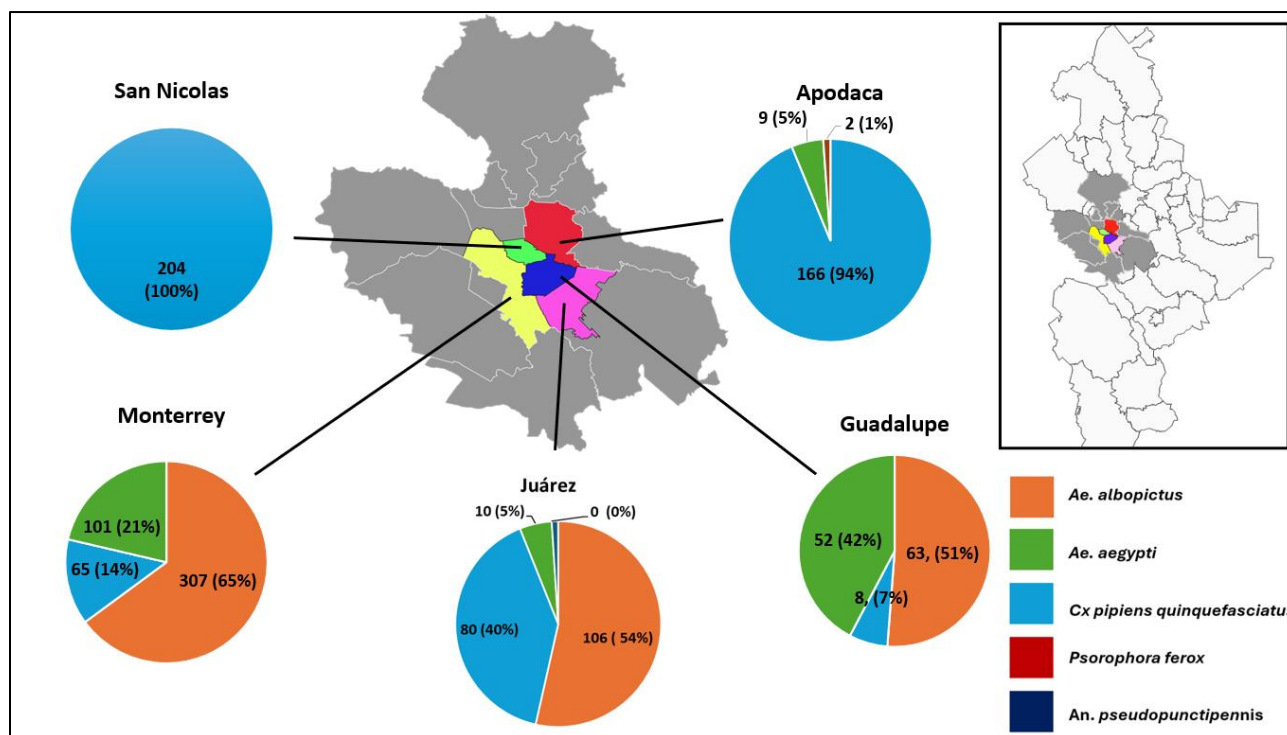
Todos los análisis se realizaron utilizando los programas estadísticos Past versión 4 y SPSS versión 26.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Recolección de mosquitos por municipio y método de captura

Se colectaron un total 1175 mosquitos de cinco especies diferentes en cinco municipios del área metropolitana de Monterrey, los mosquitos se colectaron con ayuda de trampas BG-GAT para captura de mosquitos y de manera manual haciendo aspirados en zonas de descanso. En el municipio de Monterrey se colectaron 473 (45%) mosquitos, de los cuales 114 (23%) fueron capturados en trampas mientras que 359 (77%) se colectaron por medio de aspirados; En Guadalupe se obtuvieron 123 (22%) mosquitos, 80 (65%) por medio trampa y 43 (35%) por medio de aspirados; Para el municipio de Juárez se capturaron un total 198 (20%) mosquitos, 55 (28%) y 143 (72%) de trampa y aspirado; el municipio de Apodaca se colectaron 177 (9%) mosquitos, de los cuales 10 (19%) fue con ayuda de trampas y 167 (81%) fueron por medio de aspirado; En el municipio de San Nicolás solamente se hicieron capturas por medio de aspirados de los cuales obtuvimos 204 (14%) mosquitos (Figura 7).

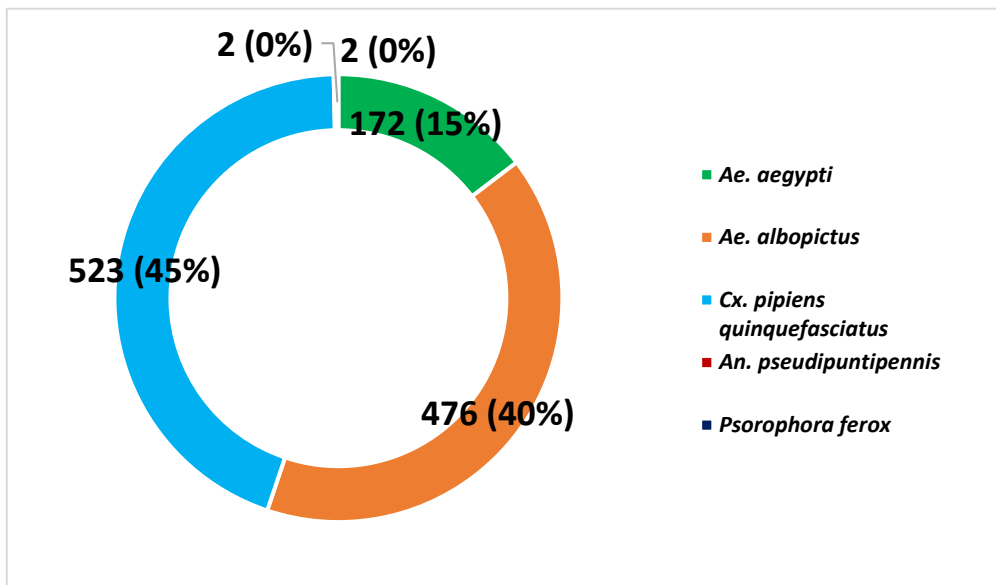
**Figura 7.** Abundancia relativa por municipio del total de mosquitos macho y hembras recolectadas en el área metropolitana de Monterrey durante el período septiembre 2022 a marzo 2024.



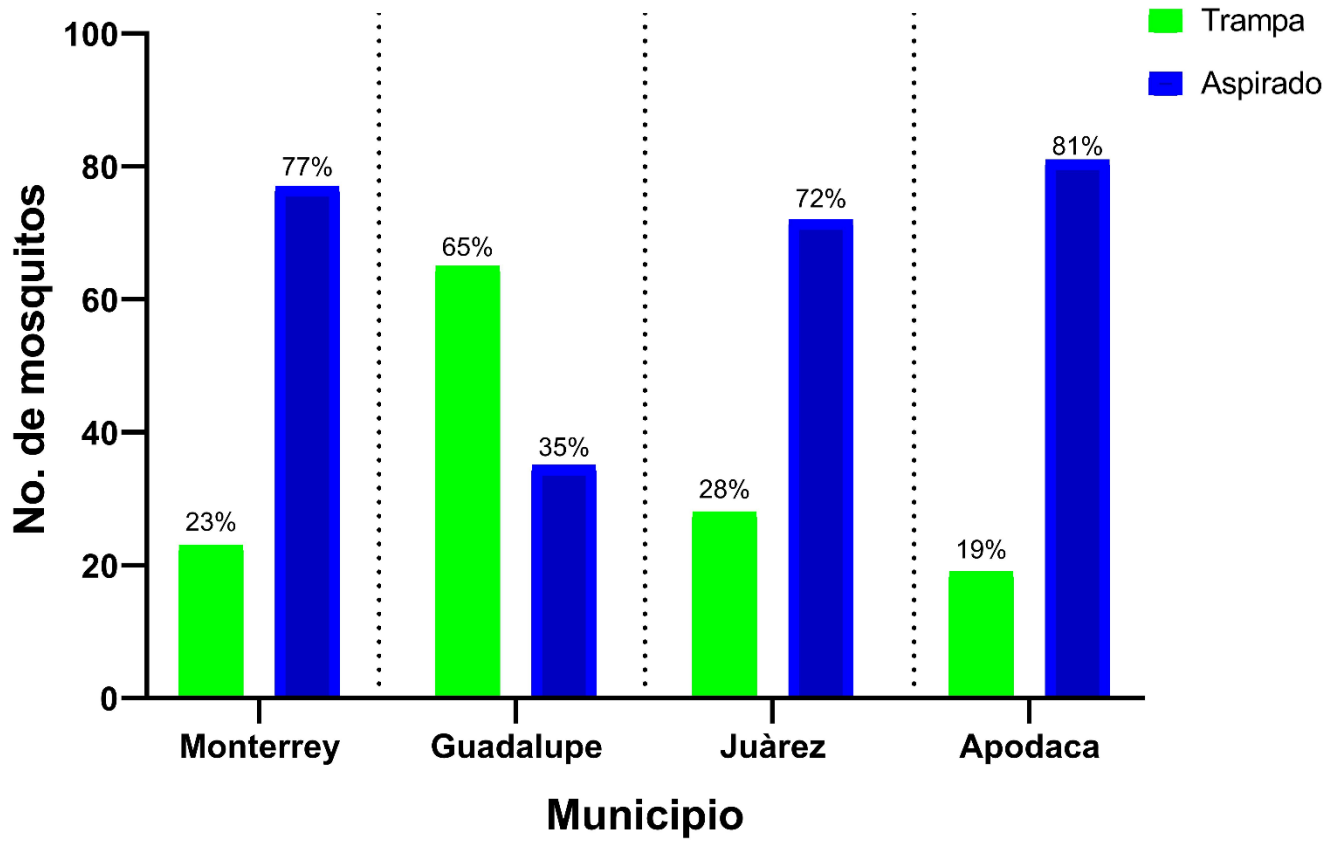
**Tabla 8.** Distribución de mosquitos colectados por método de captura en municipios del área metropolitana de Monterrey, N., de septiembre 2022 a marzo 2024.

Localidad	No. de mosquitos (%)		Trampa (%)		Aspirado (%)	
	No.	%	No.	%	No.	%
Monterrey	473	45%	114	23%	359	77%
Guadalupe	123	12%	80	65%	43	35%
Juárez	198	20%	55	28%	143	72%
Apodaca	177	9%	10	19%	167	81%
San Nicolás	204	14%	NA	NA	204	100%
<b>Total</b>	<b>1175</b>		<b>259</b>	<b>22%</b>	<b>916</b>	<b>78%</b>

La figura y tabla 8 muestran las especies de mosquitos capturados en el periodo de septiembre 2022 a marzo 2024, donde se observan cuatro géneros y cinco especies encontrándose principalmente *Cx. pipiens quinquefasciatus* (45%) como la especie más dominante.



**Figura 8.** Especies de mosquitos recolectados en municipios del área metropolitana de Monterrey, N.L., (septiembre 2022-marzo 2024).



**Figura 9.** Porcentajes de mosquitos muestreados en los cinco municipios del área metropolitana de Monterrey durante los meses septiembre 2022 a marzo 2024. Comparación entre el uso de trampas BG-GAT para captura de mosquitos y aspirados en zonas de descanso.

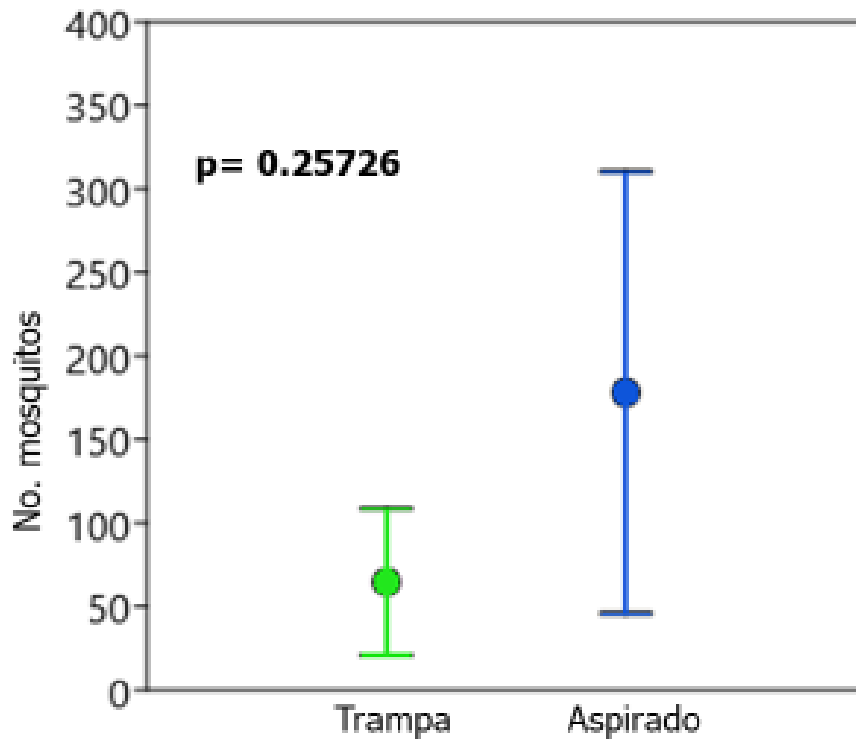
### 7.2. Comparación de métodos de muestreo

Se realizó una prueba t de Student para comparar las medias de dos muestras independientes en para el uso de trampas y aspirado activo, en el área de estudio. Las muestras de trampa y aspirado consistieron en 4 sitios como tamaño de muestra de datos respectivamente, recopilados durante los meses de septiembre 2022 y marzo 2024. Los resultados de la prueba t de Student se resumen en la figura 9.

El valor de t obtenido fue menor que el valor crítico de ( $t=1.2517$ ; g.l. $\leq 2.447$ ;  $p=0.05$ ) Esto indica que no hay suficiente evidencia para rechazar la hipótesis nula. Por lo tanto, no se encontraron diferencias significativas entre las muestras colectadas por medio de uso de trampa y aspirado (Tabla 9).

**Tabla 9.** Prueba T de Student para dos muestras, trampa - aspirado.

Dato Estadístico	Trampa	Aspirado
N	4	4
Media	64.75	178
Varianza	1916.9	17444
Grados de libertad	6	
Estadístico T	1.6278	
P valor	<b>0.25726</b>	
Valor crítico de T	2.4469	



**Figura 10.** Comparación entre el uso de trampas BG-GAT y aspirado activo

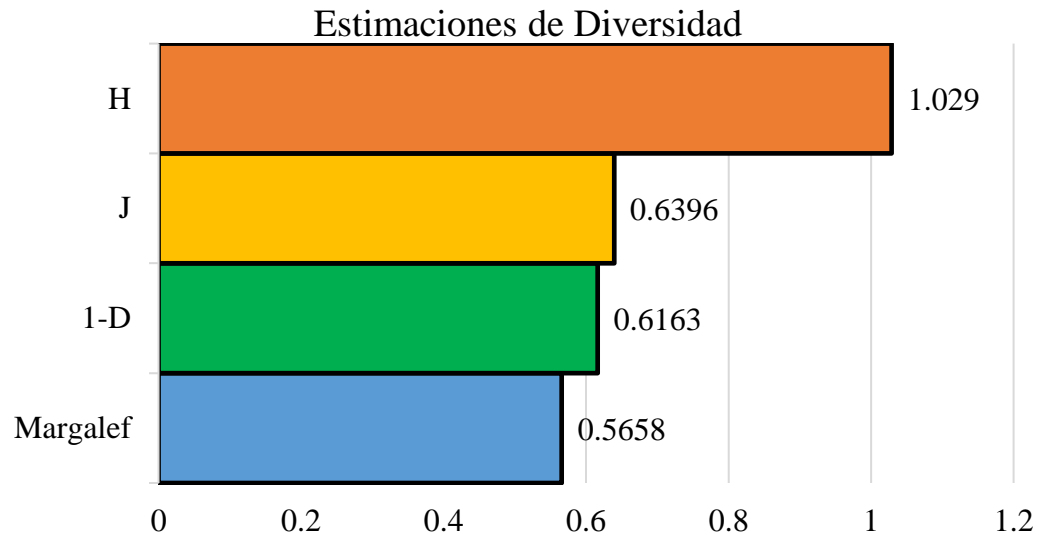
Los resultados sugieren que no hay una diferencia significativa, entre las dos muestras en estudio en relación con el método de colecta por medio de trampas y aspirado activo ( $p > 0.05$ ). La figura 10 muestra la diferencia de las medianas de los métodos, a pesar de tener mayor abundancia el método aspirado la mediana se encuentra dentro del rango de desviación estándar del método con trampas.

### 7.3. Análisis de diversidad alfa, beta y análisis de ensamble de especies

En los cinco municipios del área metropolitana de Monterrey, N.L., la riqueza de especies fue de cinco. El índice de diversidad de Shannon-Wiener ( $H'$ ) arrojó un valor de baja diversidad de 1.029. La equitatividad ( $J$ ), que mide cuán uniformemente se distribuyen los individuos entre las especies presentes y varían entre 0 y 1 fue de 0.6396 lo que indica una distribución moderadamente equitativa de individuos entre las especies (Figura 11).

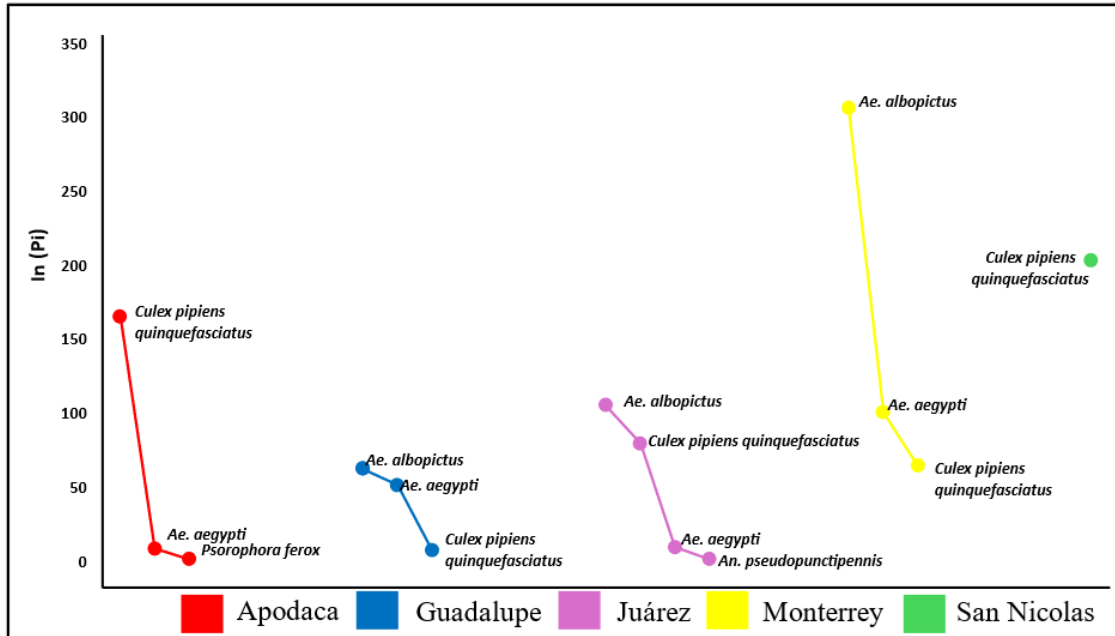
Por otro lado, el índice de diversidad de Gini-Simpson fue de 0.6163, y el índice de Margalef, que refleja la riqueza de especies considerando el número total de individuos fue de 0.5658. La dominancia se observó en los siguientes porcentajes: *Cx. pipiens quinquefasciatus* (45%), *Ae. albopictus* (40%), *Ae. aegypti* (15%), *An. pseudopunctipennis* (0%) y *Psorophora ferox* (0%). Entre estas especies, *Cx. pipiens quinquefasciatus* fue la especie más dominante (Figura 11).

Diversidad del muestreo de culícidos	n	S	$H'$	1-D	J	Margalef
	1175	5	1.029	0.3	0.6396	0.5658



**Figura 11.** Estimaciones de diversidad alfa, para las especies de culícidos del área metropolitana de Monterrey.

La figura 12 muestra que *Ae. albopictus* es la especie dominante para 3 de los 5 municipios muestreados del área metropolitana de Monterrey. Por otra parte, el municipio de Juárez mostró la mayor riqueza de especies ( $S=4$ ), seguido por Apodaca, Monterrey y Guadalupe ( $S=3$ ) y San Nicolás con la menor cantidad de especies ( $S=1$ )



Figura

12. Índice de rango abundancia de especies de mosquito en el área metropolitana de Monterrey

El dendrograma obtenido a partir del índice de Morisita mostró una similitud del 100% entre los municipios de Apodaca y San Nicolás. No obstante, a pesar de esta similitud, la riqueza de mosquitos presente en ambos municipios difiere. Para Monterrey y Guadalupe, la similitud fue del 90%, y para Juárez fue del 75% (Figura 13). Esto indica que, aunque algunos municipios presentan una composición de especies de mosquitos muy similar, las diferencias en la riqueza específica pueden ser significativas.

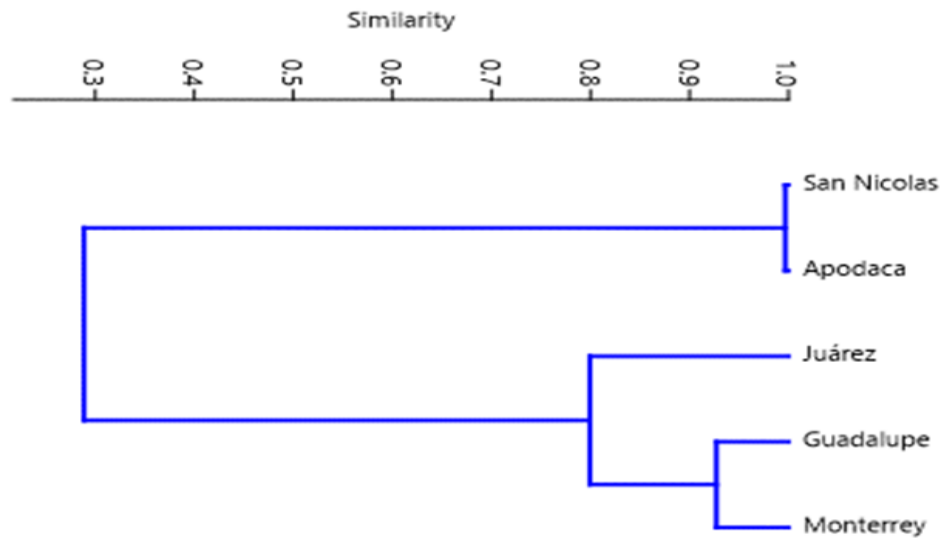


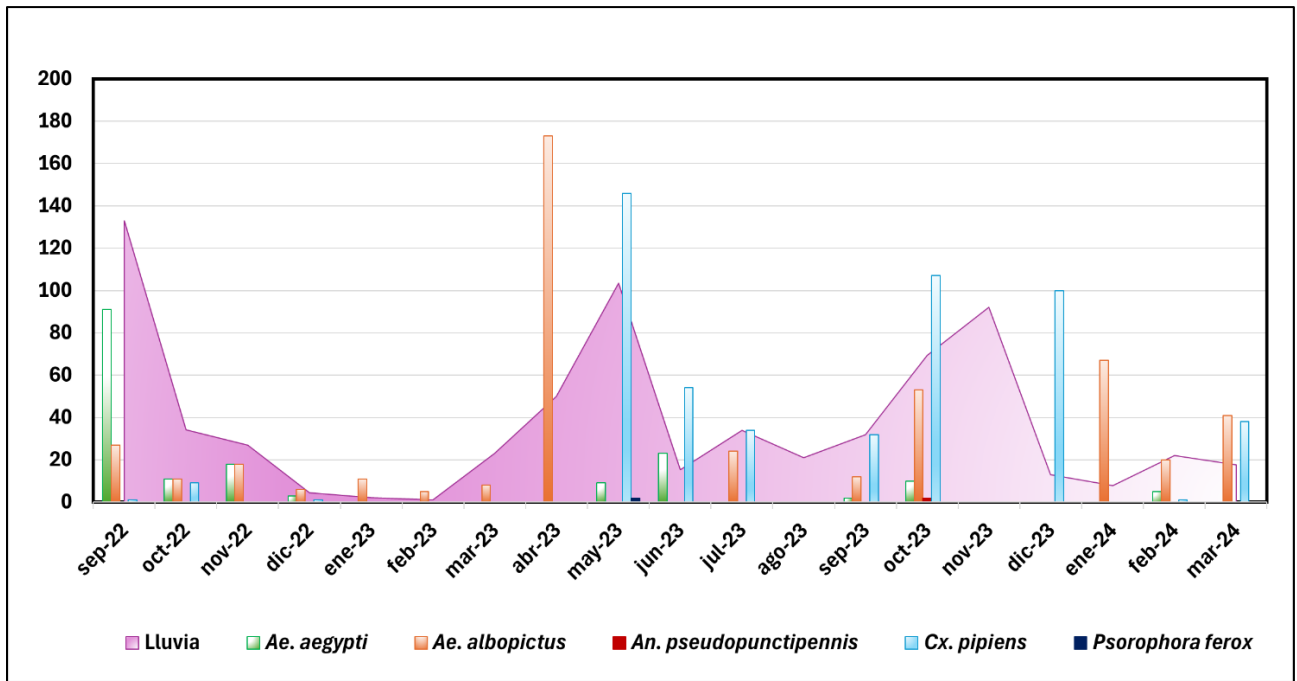
Figura 13. Dendrograma de similitud de comunidades de mosquitos según el índice de Morisita

## 7.4. Análisis estacionales

Durante el estudio, se recolectaron un total de 1175 mosquitos de cinco especies diferentes. Se incluyeron variables meteorológicas, como el promedio mensual acumulado de precipitación y temperaturas.

### 7.4.1. Análisis de lluvia

En el periodo de muestreo, se registró la mayor cantidad de lluvia acumulada en septiembre de 2022, con 132.9 mm<sup>3</sup>, mientras que la menor cantidad se registró en febrero de 2023, con 1.2 mm<sup>3</sup>. La figura 14 muestra un resumen de los patrones de abundancia mensual en comparación con las precipitaciones acumuladas.



**Figura 14.** Distribución estacional de mosquitos colectados en el área metropolitana de Monterrey y precipitación acumulada mensualmente (área morada).

A lo largo del período de recolección de datos, las temperaturas variaron entre 14.4°C como mínima en enero de 2024 y 30.1°C como máxima en julio y agosto de 2023. La figura 14 proporciona un resumen de cómo se relacionan los patrones de abundancia mensual con las temperaturas acumuladas.

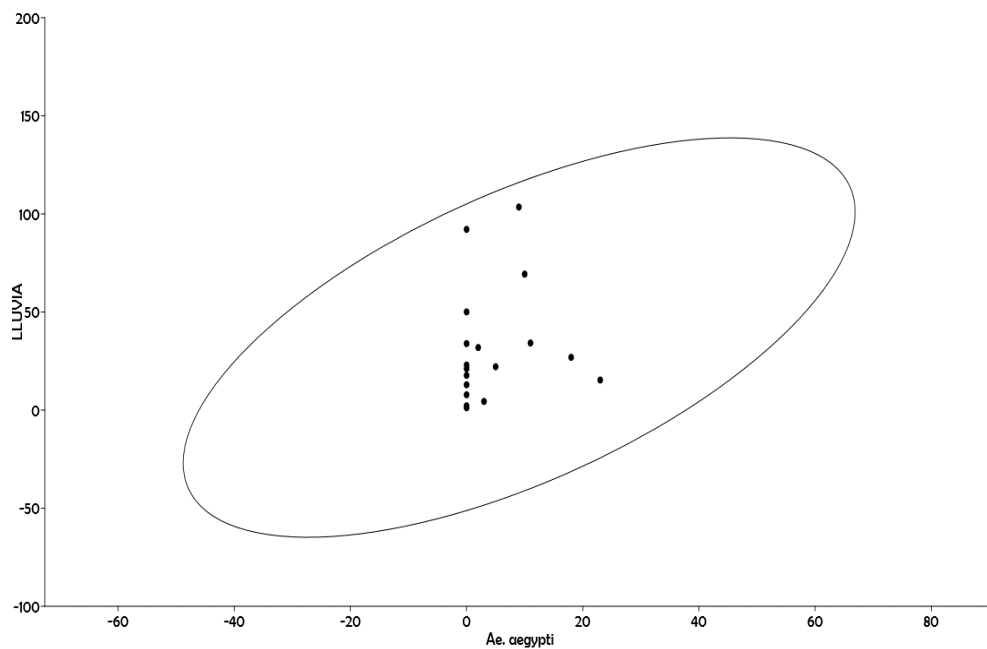


#### 7.4.1.1. Asociación entre lluvia y abundancia de mosquitos.

Durante el periodo de recolección, se analizó la relación entre la abundancia mensual de mosquitos y las condiciones climáticas, considerando la precipitación como variable independiente. Se observaron diferentes tendencias para cada especie: solo *Ae. aegypti* presentó una correlación significativa con la lluvia (Figura 15), mientras que *Ae. albopictus* (Figura 16) y *Culex pipiens quinquefasciatus* (Figura, 17), no mostraron ninguna asociación con este factor climático (Tablas 10, 11 y 12).

**Tabla 10.** Asociación entre lluvia y la especie *Ae. aegypti*

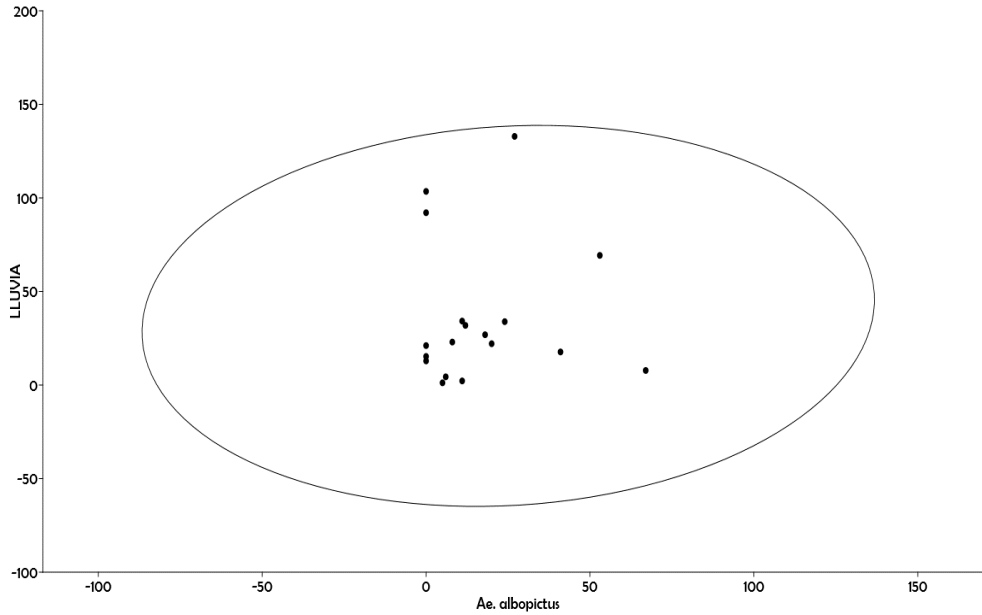
<i>Ae. aegypti</i>		
Variable	R <sup>2</sup>	p<0.05
Lluvia	0.629	0.004



**Figura 15.** Análisis de correlación de Pearson entre la abundancia de mosquitos *Ae. aegypti* y la lluvia: datos acumulados mensualmente.

**Tabla 11.** Asociación entre lluvia y la especie *Ae. albopictus*

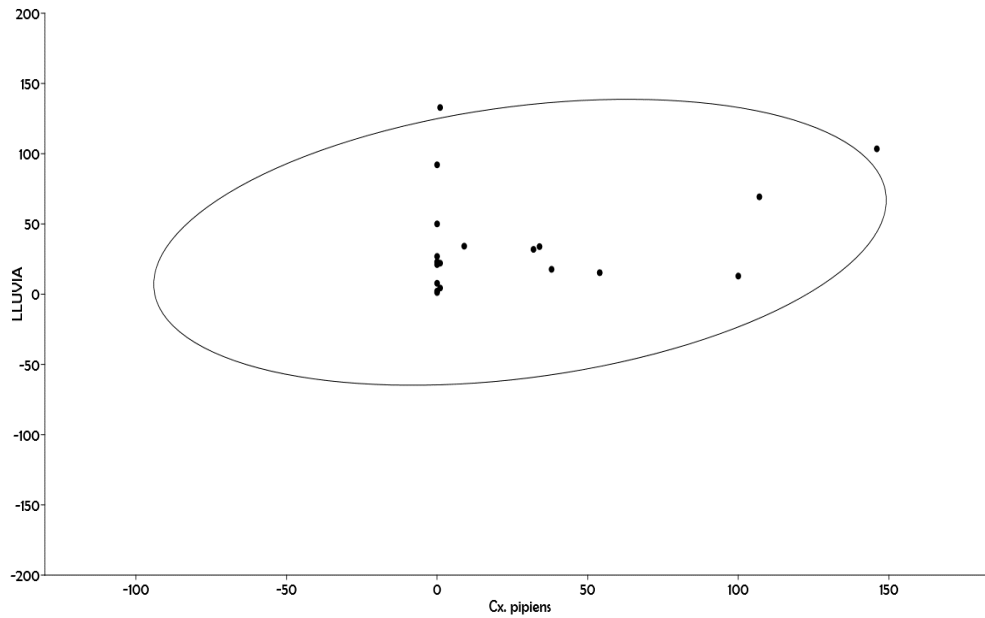
<i>Ae. albopictus</i>		
Variable	R <sup>2</sup>	p<0.05
Lluvia	0.086	0.727



**Figura 16.** Análisis de correlación de Pearson entre la abundancia de mosquitos *Ae. albopictus* y la lluvia: datos acumulados mensualmente.

**Tabla 12.** Asociación entre lluvia y la especie *Cx. pipiens quinquefasciatus*.

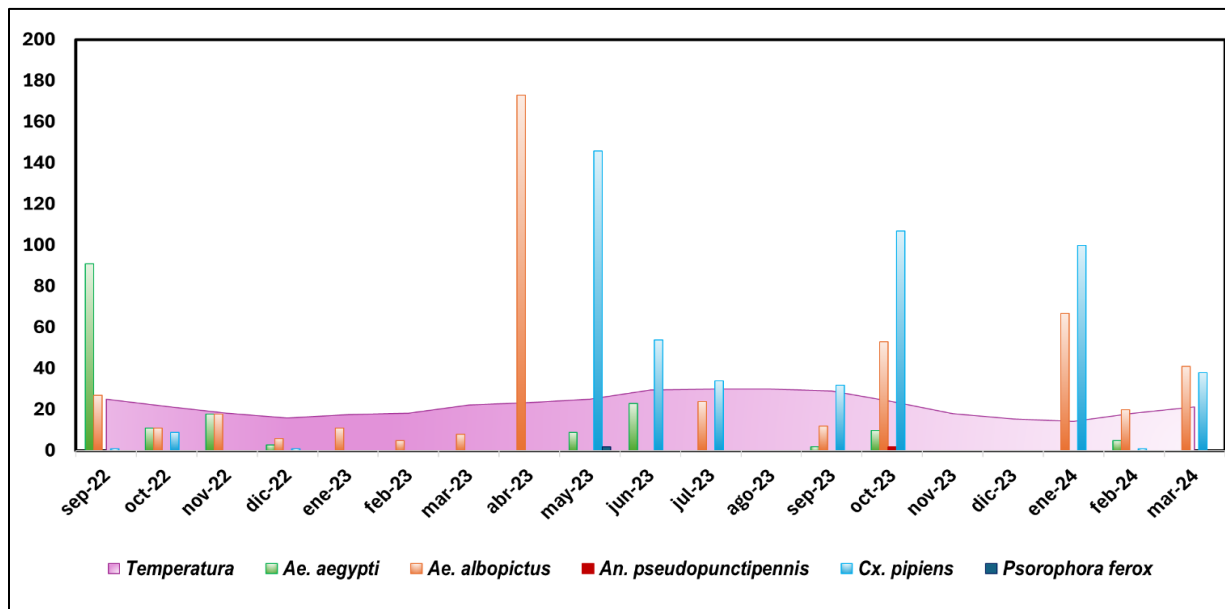
<i>Cx pipiens quinquefasciatus</i>		
Variable	R <sup>2</sup>	p<0.05
Lluvia	0.277	0.251



**Figura 17.** Análisis de correlación de Pearson entre la abundancia de mosquitos *Cx. pipiens quinquefasciatus*. y la lluvia: datos acumulados mensualmente.

### 7.4.2. Análisis de temperatura

A lo largo del período de recolección de datos, las temperaturas variaron entre 14.4°C como mínima en enero del 2024 y 30.1°C como máxima en julio y agosto de 2023 (Figura 18).



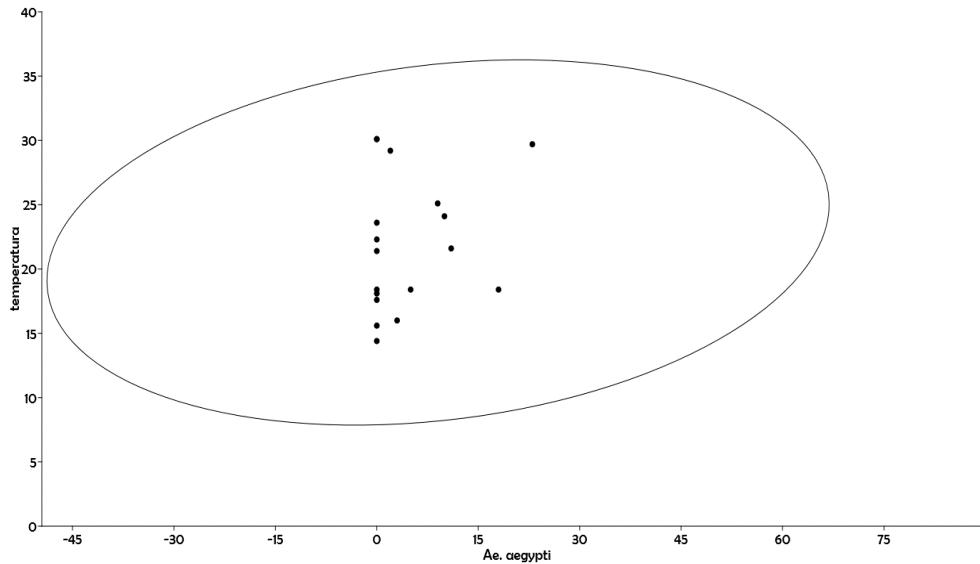
**Figura 18.** Distribución estacional de mosquitos colectados en el área metropolitana de Monterrey y temperatura acumulada mensualmente.

### 7.4.2.1. Asociación entre temperatura y abundancia de mosquitos.

Durante la temporada de recolección, se investigó la relación entre la abundancia mensual de mosquitos y la temperatura como variable independiente. Se identificaron diferentes patrones para cada especie; sin embargo, no se encontró ninguna asociación significativa con este factor climático (Figura 19, 20, y 21).

**Tabla 13.** Asociación entre temperatura y la especie *Ae. aegypti*

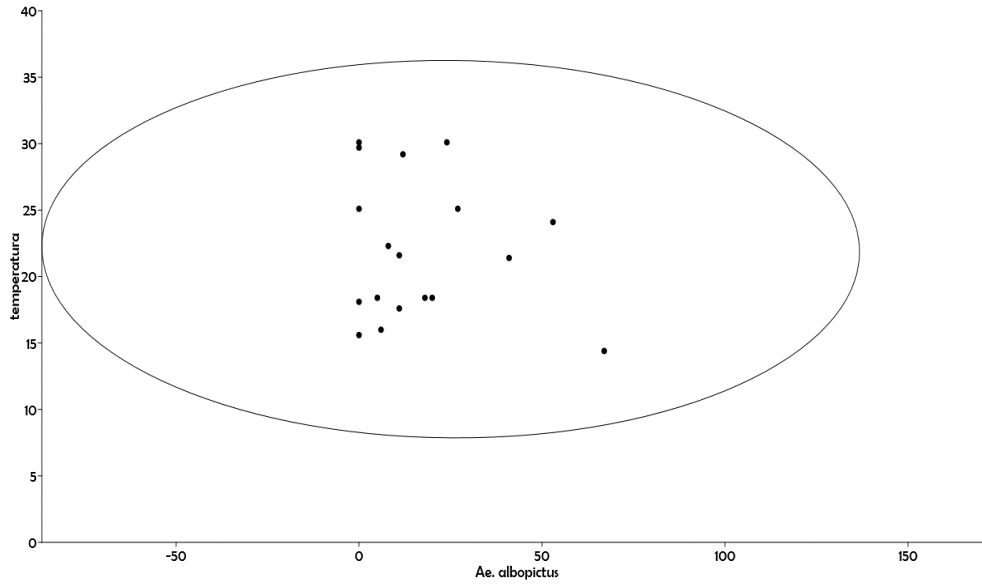
<i>Ae. aegypti</i>		
Variable	R <sup>2</sup>	p<0.05
Temperatura	0.209	0.39



**Figura 19.** Análisis de correlación de Pearson entre la abundancia de *Ae. aegypti* y la temperatura: datos acumulados mensualmente.

**Tabla 14.** Asociación entre temperatura y la especie *Ae. albopictus*

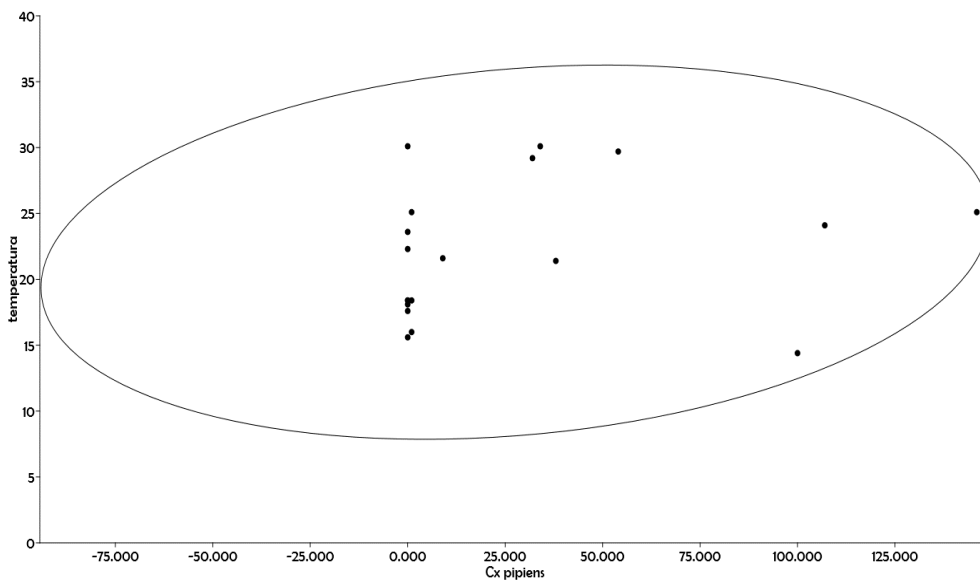
<i>Ae. albopictus</i>		
Variable	R <sup>2</sup>	p<0.05
Temperatura	-0.014	0.955



**Figura 20.** Análisis de correlación de Pearson entre la abundancia de *Ae. albopictus* y la temperatura: datos acumulados mensualmente.

**Tabla 15.** Asociación entre temperatura y la especie *Cx. pipiens quinquefasciatus*

<i>Cx. pipiens quinquefasciatus</i>		
Variable	R <sup>2</sup>	p<0.05
Temperatura	0.189	0.438



**Figura 21.** Análisis de correlación de Pearson entre la abundancia de *Cx. pipiens quinquefasciatus* y la temperatura: datos acumulados mensualmente.

Los análisis de correlación demostraron poca influencia de las variables ambientales en la abundancia de mosquitos. Se observó que la especie *Ae. albopictus* se mantuvo constante independientemente de las variaciones en la precipitación y temperatura. En contraste, especies como *Ae. aegypti* mostraron un aumento en su abundancia conforme aumentaba la precipitación (Tablas 12, 13 y 14).

### 7.5. Estandarización de PCR múltiplex para la identificación molecular de microfilarias caninas en mosquitos.

El protocolo de PCR que permitió amplificar el control positivo es el siguiente: separación inicial de las cadenas de ADN a 94°C durante 2 min, seguido de 32 ciclos a 94°C (1 min), 60°C (1 min) and 72°C (30 s) y una extensión final a 72°C (7 min). Obteniendo los siguientes resultados: para el control positivo se amplificaron tres bandas correspondientes a *Dirofilaria immitis* con un tamaño de 302 bp, una banda de 348 bp para *Dipetalonema reconditum* y para *Dirofilaria repens* una banda de 247 bp; en los carriles correspondientes a cada filaria que contenían solo con un par de marcadores se obtuvieron las bandas individuales con los pesos moleculares antes mencionados (Figura 22).



**Figura 22.** PCR de controles positivos y un negativo. Carril 1 marcador de peso molecular (100pb). Carril 2 control positivo múltiplex. Carril 3 (*Dirofilaria immitis*) 4 (*Dipetalonema reconditum*) y 5 (*Dirofilaria repens*) primers amplificados individualmente. Carril 6 control negativo.

## 7.6. Detección de filarias en mosquitos.

Un total de 15 (2%) mosquitos hembra resultaron positivos para *D. immitis*, todas ellas alimentadas con sangre (Figura 23). Las TMI fueron variables para las especies siendo la mayor registrada de 24.10 para *Cx. pipiens*, seguida de *Ae. albopictus* con 19.08 y 13.07 para *Ae. aegypti*. La prevalencia también fue variable entre las especies y los municipios, para Apodaca se registró una prevalencia de 2.4% (2/83) para *Cx. pipiens* y 14.3% (1/7) para *Ae. aegypti*; en los municipios de Juárez y San Nicolas de los Garza se registró una prevalencia del 1.5% (1/69) y 2.1% (3/144) en *Cx. pipiens quinquefasciatus*; mientras que para Monterrey la prevalencia fue de 1.2% (1/86), 2.7% (5/187) y 7.1% (2/28) para *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* y *Cx. pipiens quinquefasciatus* respectivamente (Tabla 15). Los resultados de la detección de filarias en mosquitos revelaron la presencia de filarias en tres especies de mosquitos. Este hallazgo sugiere un potencial significativo para la transmisión de enfermedades transmitidas por vectores en la población local.

**Tabla 16.** Tasa mínima de infección (TMI) para *D. immitis* en mosquitos vectores del área metropolitana de Monterrey.

Especie	Localidades					PMI	TMI*	95%IC
	Apodaca	Guadalupe	Juárez	Monterrey	San Nicolas			
<i>Cx pipiens</i>	83	8	69	28	144			
<i>quinquefasciatus</i>	<b>2*(2.4%)</b>	<b>0(0%)</b>	<b>1*(1.5%)</b>	<b>2*(7.1%)</b>	<b>3*(2.1%)</b>	0.022	<b>21.56</b>	0.02 - 0.04
<i>Ae. albopictus</i>	0	43	32	187	0			
	<b>0(0%)</b>	<b>0(0%)</b>	<b>0(0%)</b>	<b>5*(2.7%)</b>	<b>0(0%)</b>	0.014	<b>13.77</b>	0.02 - 0.04
<i>Ae. aegypti</i>	7	52	8	86	0			
	<b>1*(14.3%)</b>	<b>0(0%)</b>	<b>0(0%)</b>	<b>1*(1.2%)</b>	<b>0(0%)</b>	0.013	<b>12.66</b>	0.01 - 0.03

\* indica el número de mosquitos positivos a *Dirofilaria immitis*, seguido de su porcentaje.

PMI proporción de mosquitos infectados.

TMI Tasa media de infección.



**Figura 23.** Muestras de mosquitos detectadas mediante PCR multiplex. El aplicom es de 302 pb como se obtuvo en el control positivo para *Dirofilaria immitis*. Carril 1: control positivo múltiple, carriles 2 a 6: las muestras de mosquitos del área metropolitana de Monterrey, carril 7: control negativo.

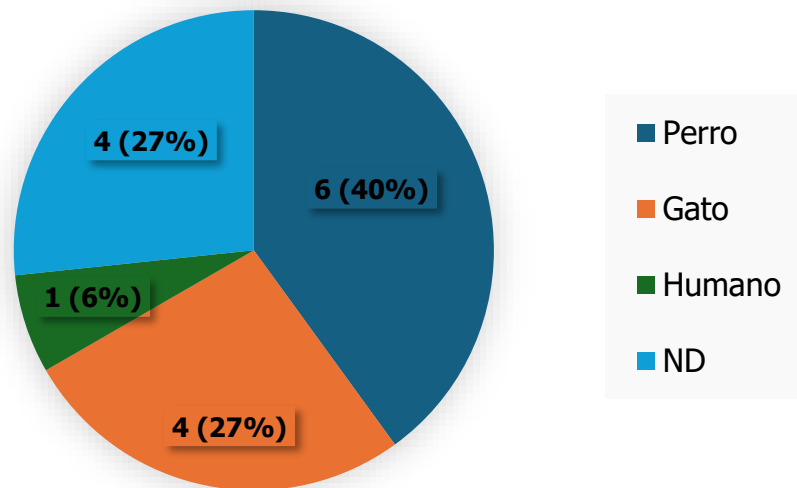
### 7.7. Análisis de contenido alimenticio de los mosquitos

Se analizaron un total de 747 mosquitos hembra, para la detección de filarias, de los cuales 169 no habían ingerido sangre y 578 sí lo habían hecho (Tabla 16); se estudiaron 4 especies diferentes de contenido alimenticio (humano, perro, gato y ave). De los 15 mosquitos positivos a *Dirofilaria immitis* analizados para contenido alimenticio, se encontró el genoma de 3 especies, resultando que 6 (40%) se alimentaron de perros, 4 (27%) de gatos, 1 (6%) de Humano y 4 (27%) que no se pudo determinar su contenido alimenticio. (Figura 24). Todos los mosquitos positivos se recolectaron en Apodaca, Juárez, Monterrey y San Nicolás mientras que los mosquitos del municipio de Guadalupe no fueron positivos para los parásitos en estudio (Figura 25).

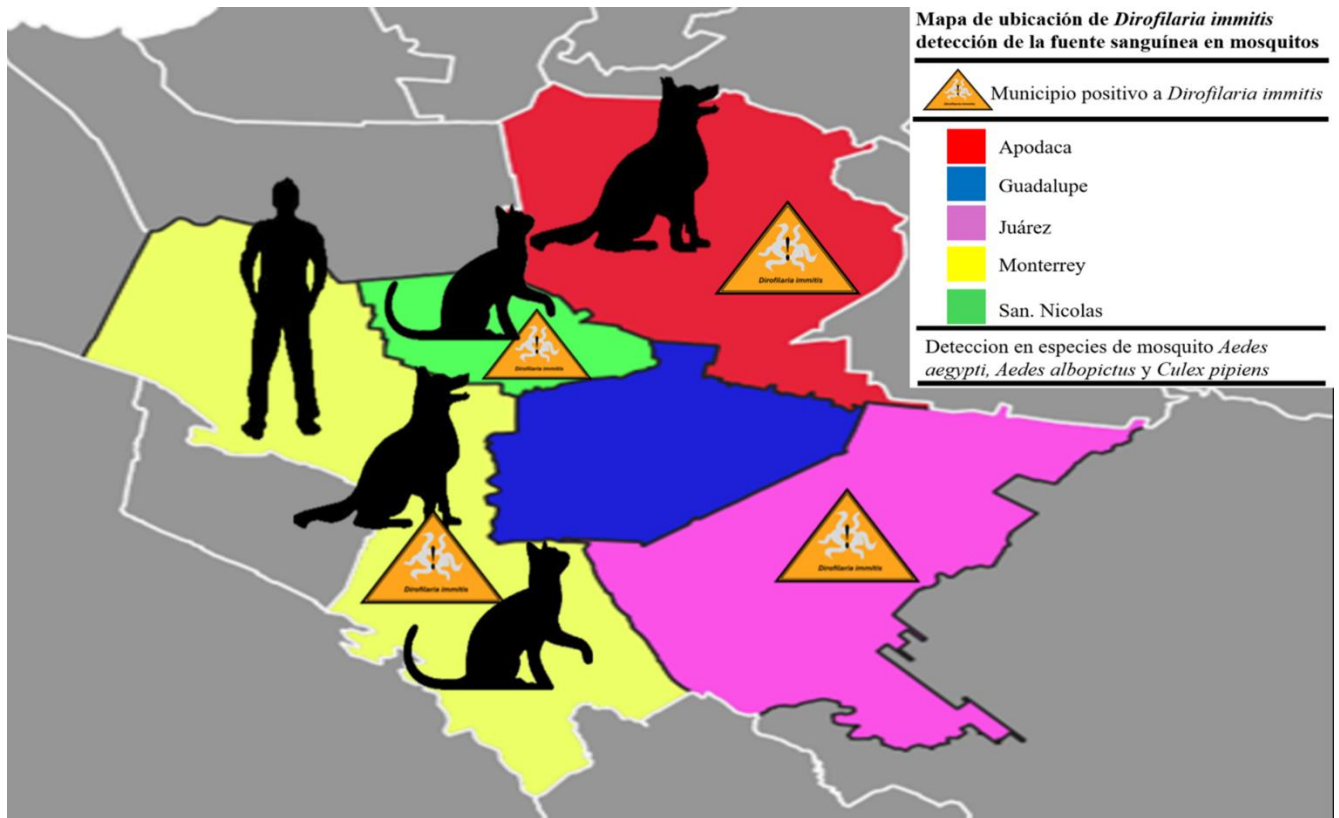


**Tabla 17.** Número de mosquitos, analizados y positivos a *Dirofilaria immitis*, según especie y estado de alimentación.

Especies de mosquito	No alimentados de sangre	Alimentados de sangre	Total, de mosquitos analizados	Número de mosquitos positivos a <i>Dirofilaria immitis</i>
<i>Ae. aegypti</i>	38	115	153	2
<i>Cx. pipiens quinquefasciatus</i>	80	252	332	8
<i>Ae. albopictus</i>	51	211	262	5
Totales	169	578	747	15



**Figura 24.** Distribución de fuente de alimentación de mosquitos del área metropolitana de Monterrey, N.L.



**Figura 25.** Municipios con mosquitos positivos para *Dirofilaria immitis*, y hospedadores detectados en el análisis de contenido alimenticio.

## 8. DISCUSIÓN

La limitada disponibilidad y variabilidad de controles naturales de filarias comprometen la exactitud y fiabilidad de las pruebas de PCR para su detección. Para abordar esta limitación se diseñó y validó un control positivo sintético capaz de amplificar específicamente las tres especies de filarias más prevalentes en México: *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria reconditum* y *Dirofilaria repens*. Este desarrollo, que optimiza una técnica de PCR multiplex para la detección de filarias representa un avance significativo en la investigación biomédica, especialmente en el diagnóstico molecular

En estudios previos, como el de Favia *et al.* (1996), se diseñaron cebadores específicos para amplificar el ADN de dos especies de gusanos filariales, *Dirofilaria repens* y *D. immitis* utilizando información genética para desarrollar herramientas moleculares específicas para su identificación mediante PCR. Este enfoque molecular permitió distinguir microfilarias en muestras de sangre, larvas en desarrollo en mosquitos y adultos inmaduros en muestras de tejido, superando las limitaciones de la identificación morfológica en las primeras etapas del ciclo de vida del parásito. Además, el uso de técnicas moleculares como la PCR no solo mejora la precisión y rapidez del diagnóstico, sino que también es de gran relevancia en salud pública para optimizar estrategias de control y prevención de enfermedades transmitidas por vectores, destacando el papel de la biología molecular en la investigación y gestión de enfermedades parasitarias de importancia médica. Utilizamos la secuencia previamente reportada de *Dirofilaria repens* como base para desarrollar nuestro control positivo, confirmando su capacidad para amplificar el mismo fragmento descrito por los autores. La validación de la capacidad de amplificación del fragmento específico descrito por Favia *et al.* (1996), subraya la importancia de la precisión en la selección y uso de estas secuencias como estándares en el desarrollo del trabajo, garantizando que los resultados obtenidos en las pruebas moleculares, como la PCR, sean comparables y consistentes con hallazgos previamente publicados.

El estudio de Mar *et al.* (2002) se centró en las especies *D. immitis* y *D. reconditum*, clonando y secuenciando la región espaciadora transcrita. A partir de esta secuencia, diseñaron pares de cebadores específicos para la aplicación del gen ITS2 mediante PCR. Los resultados mostraron que esta técnica de PCR permitía la detección de  $1 \times 10^{-2}$  microfilarias en sangre para cada especie de parásito. Sus hallazgos demostraron la eficacia y sensibilidad de la PCR diseñada con cebadores

específicos de ITS2 para diferenciar *D. immitis* y *D. reconditum*, siendo crucial en entornos clínicos y epidemiológicos, para una identificación precisa incluso a bajos niveles de infección. En nuestro estudio, empleamos las secuencias previamente reportadas de la región espaciadora transcrita de *D. immitis* y *D. reconditum* para diseñar nuestro control positivo, confirmando que amplifican los mismos fragmentos descritos en la literatura. El uso de estas secuencias genéticas previamente caracterizadas para diseñar el control positivo es fundamental para garantizar la reproducibilidad y fiabilidad de los resultados. En este caso, las secuencias de la región ITS2 de *D. immitis* y *D. reconditum* fueron seleccionadas por su disponibilidad y por haber sido validadas previamente en la literatura. La confirmación de que estas secuencias amplifican en los mismos fragmentos descritos subraya la consistencia y precisión del método empleado para ambas especies. Este enfoque no solo valida la robustez del control positivo desarrollado, sino que también asegura que los resultados obtenidos sean comparables con investigaciones anteriores, reforzando la confianza en los métodos empleados.

Para la estandarización y optimización de la PCR multiplex, se adaptó el protocolo establecido por Rishniw *et al.* (2006), que utilizaba una reacción de 25 µl para identificar múltiples especies de filarias mediante reacciones de PCR individuales. En contraste, reducimos el volumen de reacción a 10 µl y optimizamos las condiciones de la PCR para una reacción múltiple destinada a amplificar simultáneamente las tres especies de filarias (*Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria reconditum* y *Dirofilaria repens*) en una sola reacción. Para lograr esto, se realizó un gradiente de temperaturas con el fin de encontrar la temperatura óptima de alineamiento de los primers específicos para cada microfilaria.

Esta modificación no solo permitió una mayor eficiencia en el uso de reactivos, sino también una optimización del tiempo y los recursos de laboratorio. Los ajustes en el protocolo, como la reducción del volumen de reacción y la adaptación de las condiciones térmicas, fueron cruciales para lograr una amplificación específica y robusta en la PCR multiplex, representando una mejora significativa respecto al protocolo original y facilitando su aplicación en estudios de diagnóstico y epidemiológicos que requieran la identificación simultánea de múltiples patógenos.

Para la parte del estudio de la infección por filarias en mosquitos, de un total de 747 mosquitos hembra recolectados, se identificaron filarias de la especie *D. immitis* en 15 mosquitos procedentes de cuatro localidades de muestreo. Las especies de mosquitos infectadas incluyeron *Ae. aegypti*,

*Ae. albopictus* y *Cx. pipiens*, con tasas de infección del 12.66%, 13.77% y 21.56%, respectivamente. Estos resultados sugieren una alta prevalencia de filarias en la población de mosquitos estudiada, indicando una presencia significativa del patógeno en la región. En otros estudios como el de Younes et al. (2021), reportaron tasas de infección de entre 0.6% y 3.0% en *Cx. pipiens* y *Ae. albopictus* respectivamente. Es crucial señalar que la infección por microfilarias en mosquitos puede tener importantes implicaciones en la transmisión de enfermedades tanto a seres humanos como a otros animales.

A nivel nacional hay pocos estudios que investiguen a los vectores portadores de filarias. Sin embargo, Torres et al. (2018) detectaron ADN de *Dirofilaria immitis* en 8% de los perros analizados y de *Acanthocheilonema reconditum* en 0.3%, con una tasa mínima de infección del 2.9% en *Culex quinquefasciatus*, lo cual coincide con nuestras tasas de infección, que oscilaron entre 1.5 y 7.1%.

Alvarado et al. (2018) en la zona del Soconusco Chiapas, México, encontraron *D. immitis* en seis grupos de mosquitos en dos sitios de muestreo, con tasas de infección que variaron del 0.19% al 4.6% en *Aedes angustivittatus*, *Aedes taeniorhynchus*, *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus*. Estos hallazgos reflejan la amplia distribución de *D. immitis* entre diferentes especies de mosquitos, lo que podría facilitar la propagación de la filariosis canina en diversas áreas. Comparado con estudios previos, nuestras tasas de infección fueron más elevadas, con 12.66% en *Ae. aegypti*, 13.77% en *Ae. albopictus* y 21.56% en *Cx. pipiens*.

La alta tasa de infección en *Aedes albopictus* (4.6%) es especialmente alarmante, y que esta especie es un vector conocido de varias enfermedades y se adapta bien a entornos urbanos y rurales, aumentando el riesgo de transmisión a poblaciones caninas y potencialmente a otros huéspedes incluidos los humanos. Además, la detección de *D. immitis* en *Aedes angustivittatus* y *Aedes taeniorhynchus* con tasas de infección relativamente bajas (0.19% y 0.83%, respectivamente) también es relevante, ya que estas especies pueden actuar como vectores secundarios, contribuyendo a la persistencia y dispersión de la enfermedad en áreas específicas.

Por otro lado, para el norte de México, Ortega (2014) analizó 384 perros y 903 mosquitos para detectar la presencia del parásito *Dirofilaria immitis*. Se encontraron seis perros positivos en pruebas serológicas y en pruebas de PCR. Además, se identificaron cinco especies de mosquitos, de las cuales cuatro estaban infectadas con el parásito, encontrando tasas de infección de 5.61% en

*Cx. pipiens*, 26.32% en *Cx. tarsalis*, 53.57% en *Ae. vexans* y 25.64% en *P. columbiae/toltecum*. Estos resultados subrayan la importancia de implementar medidas preventivas contra esta enfermedad zoonótica.

Scavo *et al.* (2021) recolectaron especímenes de *Ae. aegypti* en Texas, EE. UU., y evaluaron la presencia de microfilarias mediante PCR convencional, además de analizar su contenido alimenticio. Los resultados revelaron que el 21.7% de los mosquitos que se alimentaron de perros y el 7% de los que se alimentaron de humanos fueron positivos para dirofilariasis. Este estudio destaca el papel potencial de *Ae. aegypti* como vector de *Dirofilaria immitis* en la región estudiada. La alta prevalencia de mosquitos infectados, especialmente entre aquellos que se alimentaron de perros, sugiere una posible ruta de transmisión de la enfermedad entre los huéspedes vertebrados y los mosquitos vectores. Esta diferencia en la prevalencia de infección entre los mosquitos que se alimentaron de perros y los que lo hicieron de humanos podría reflejar preferencias alimenticias específicas de *Ae. aegypti*, así como diferencias en la carga parasitaria entre las especies huésped. En nuestro estudio, tras identificar infección por *D. immitis* en 15 mosquitos analizados para su contenido alimenticio, se detectó ADN de tres especies diferentes: 6 (40%) se alimentaron de perros, 4 (27%) de gatos, 1 (6%) de humano, y en 4 (27%) no se pudo determinar el contenido alimenticio, reflejando una infección similar a lo reportado por Scavo *et al.* (2021).

En comparación con los resultados de estudios anteriores (Torres *et al.*, 2018; Alvarado *et al.*, 2018; Ortega, 2014; Scavo *et al.*, 2022), nuestro estudio confirmó la presencia de microfilarias de *D. immitis* en mosquitos *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* y *Cx. pipiens quinquefasciatus*, lo que sugiere un potencial significativo de estos vectores para la transmisión de la enfermedad en el área metropolitana de Monterrey. Las tasas de infección observadas varían entre las especies de mosquitos, subrayando la importancia de cada una en la epidemiología de la dirofilariasis en la región estudiada. Además, la presencia de microfilarias en mosquitos que se alimentaron de perros y gatos sugiere una transmisión zoonótica de *D. immitis* en la región. La alta frecuencia de mosquitos que se alimentaron de perros y gatos refleja la interacción estrecha entre estos huéspedes y los vectores, reforzando la necesidad de estrategias de control dirigidas tanto a los mosquitos como a las poblaciones de animales domésticos. La detección de *D. immitis* en *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* es especialmente preocupante, ya que ambas especies también son vectores de virus importantes como el dengue, el zika y el chikungunya.

En resumen, las tasas medias de infección por filarias en 15 mosquitos de tres especies diferentes son un indicador crucial de la presencia y prevalencia de enfermedades transmitidas por mosquitos en la región estudiada, así como de la efectividad de las medidas de control de vectores.

Los resultados obtenidos sobre la diversidad alfa y beta de mosquitos en los municipios del área metropolitana de Monterrey muestran que el índice de diversidad de Shannon-Wiener ( $H'$ ) fue de 1.029, lo que sugiere una diversidad baja en la comunidad de mosquitos de la región. Este índice refleja la diversidad tanto en términos de riqueza de especies como en equitatividad. Comparado con el estudio de Flores (1990), quien reportó valores máximos de  $H' = 0.618$  en otoño y  $H' = 0.583$  en primavera, nuestros resultados muestran una diversidad generalmente más alta en términos absolutos.

El índice de equitatividad de ( $J$ ) obtuvo un valor de 0.6396, lo que indica una distribución relativamente equitativa de especies. Esta medida es comparable con los hallazgos de Flores (1990), quien registró máximos de equitatividad en julio y noviembre ( $J = 0.890$  y  $0.968$ , respectivamente), mostrando una mayor uniformidad en la distribución de las especies en esos meses específicos.

El índice de diversidad de Gini- Simpson fue de 0.6163, sugiriendo una dominancia significativa de ciertas especies, particularmente *Ae. albopictus*, *Cx. pipiens quinquefasciatus* y *Ae. aegypti*. Este patrón coincide con los resultados de otros estudios, como el de Trujillo (1994), donde *Ae. aegypti* y *Cx. pipiens* también fueron las especies más abundantes.

El índice de Margalef obtuvo un valor de 0.5763, indicando una diversidad moderada. Comparado con el estudio de Trujillo (1994), que reportó valores máximos de 0.9918 y mínimos de 0.4803, nuestros resultados sugieren una diversidad relativamente constante a los muestreos.

Es interesante notar la baja presencia o ausencia de especies como *An. pseudopunctipennis* y *Psorophora ferox* en las colectas, lo cual podría ser el resultado de factores ambientales específicos o de medidas de control de mosquitos implementadas en la región, coincidiendo con lo reportado por Elizondo (2002) y Ortega (2010), quienes destacan la importancia de *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* y *Cx. Pipiens quinquefasciatus* como los principales vectores de enfermedades en la zona metropolitana de Monterrey N.L.

Estos resultados proporcionan una visión actualizada sobre la diversidad y dominancia de especies de mosquitos en el área metropolitana de Monterrey, destacando la importancia de especies como *Ae. albopictus*, *Cx. pipiens quinquefasciatus* y *Ae. aegypti*. La comparación con estudios previos refuerza la consistencia de los patrones observados y subraya la necesidad continua de monitoreo y gestión adecuada de las poblaciones de mosquitos para reducir el riesgo de enfermedades transmitidas por estos insectos. Además, se subraya la necesidad de implementar estrategias de control integrado de vectores que tengan en cuenta la diversidad de especies y los factores ambientales locales para garantizar un enfoque efectivo y sostenible en la gestión de mosquitos en la región.

Nuestros resultados sugieren que la especie *Ae. albopictus* parece ser menos influenciada por las variaciones de precipitación y temperatura, ya que su abundancia se mantuvo constante durante el período de recolección de datos. Esto podría indicar que esta especie es más resistente a los cambios ambientales o que su ciclo de vida y comportamiento no están tan estrechamente ligados a estos factores, lo que ha llevado a clasificarla como una especie invasora con capacidad de adaptación rápida (Avila *et al.*, 2015; Castro *et al.*, 2013; Márquez *et al.*, 2019).

Por otro lado, *Ae. aegypti* mostró un aumento en su abundancia con el incremento de la precipitación, lo que sugiere que esta especie puede estar más influenciada por las condiciones de humedad asociadas con la lluvia. Esto coincide con lo descrito por Lega *et al.* (2017) y Estallo *et al.* (2015), quienes observaron que la actividad de oviposición de *Ae. aegypti* disminuye durante los inviernos secos y aumenta durante la temporada de lluvias. Dado que *Ae. aegypti* es el principal vector de enfermedades como el dengue, Zika y Chikungunya, un aumento en su abundancia podría tener implicaciones significativas para la salud pública.

Es interesante cómo la complejidad de los ecosistemas y los cambios climáticos pueden afectar la distribución y abundancia de especies de mosquitos, destacando especialmente aquellas que pueden tener un impacto significativo en la salud humana. Por lo tanto, es importante continuar investigando y desarrollando estrategias de control efectivas para gestionar las poblaciones de mosquitos y reducir el riesgo de transmisión de enfermedades.



## 9. CONCLUSIÓN

Esta investigación constituye el primer estudio sobre filarias caninas en las comunidades de mosquitos del área metropolitana de Monterrey, Nuevo León. Además de registrar los patrones alimenticios y la distribución periódica de las especies vectoras.

La utilización de secuencias genéticas específicas, como las obtenidas, subraya la importancia de la biología molecular en el diagnóstico de parasitosis. Este enfoque no solo mejora la exactitud de las pruebas diagnósticas, sino que también facilita la detección temprana y diferenciada de especies de *Dirofilaria*, contribuyendo así a una gestión más efectiva de las enfermedades parasitarias.

Esta capacidad de identificar con precisión las especies de *Dirofilaria* desde múltiples tipos de muestras favorece a la detección de infecciones en humanos y fortalece las investigaciones epidemiológicas, especialmente en regiones donde diversas especies de nematodos son endémicas por lo que la PCR multiplex estandarizada en este estudio no solo resuelve un diagnóstico discordante de filarias si no que permite amplificar tres diferentes especies *D. immitis*, *D. reconditum* y *D. repens* en una misma reacción de PCR eliminando la necesidad de realizar múltiples reacciones individuales.

La selección de estas especies es crucial dada su relevancia en la salud pública y veterinaria, subrayando la importancia de métodos precisos y sensibles para la detección temprana y diferenciación de estas parasitosis. La implementación de la PCR multiplex en este estudio no solo facilita la detección simultánea de múltiples especies de filarias, sino que también optimiza la eficiencia al reducir el volumen de reactivos y el número de reacciones necesarias. Este enfoque simplifica la logística del laboratorio y minimiza los errores asociados con la manipulación de muestras y reactivos múltiples.

Los resultados de este estudio identificaron a *Cx. pipiens*, *Ae. albopictus* y *Ae. aegypti*, como posibles especies participantes en la transmisión de *D. immitis* en distintos municipios del área metropolitana de Monterrey, reportando altas tasas de infección del 24.10, 19.8 y 13.7 respectivamente.

Se encontraron cinco especies de mosquito donde la mayor riqueza de especies se observó en el municipio de Juárez, mientras que la mayor abundancia en el municipio de Monterrey.

*Cx. pipiens* como *Ae. albopictus*, se encontraron como especies dominantes en casi todos los municipios de muestreo, sin embargo, *Ae. aegypti* mostro picos poblacionales altos durante los meses con mayor lluvia acumulada. Esto sugiere que las estrategias de control vectorial que se implementan para estas enfermedades podrían tener un impacto positivo secundario en la reducción de la transmisión de *D. immitis*. Sin embargo, la efectividad de estas estrategias debe evaluarse cuidadosamente, implementar estos estudios en otras regiones o con diferentes especies de mosquitos podría proporcionar una perspectiva más completa de la situación epidemiológica y contribuir a la orientación de estrategias futuras.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

Alvarado-Torres, Horacio & Viveros-Santos, Vicente & Torres Monzon, Jorge & Lopez-Ordenez, Teresa & Torres, Oswaldo. (2020). Detección de *Dirofilaria immitis*. (Spirurida: Onchocercidae) en la comunidad de mosquitos (Diptera: Culicidae) de cementerios de la región soconusco, sur de México.

American Heartworm Society. (2021). Heartworm Prevalence in the United States. Retrieved from [https://www.heartwormsociety.org] (https://www.heartwormsociety.org)

Anderson, R.C. (2000). Family Onchocercidae. In: *Parásitos Nemátodos en Vertebrados: Su desarrollo y transmisión*. 2.<sup>a</sup> Edición. Editorial CABI: Wallingford, Inglaterra. pp. 472-532. (En inglés)

Apt, B. W. (2014). Infecciones por parásitos más frecuentes y su manejo. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 25(3), 485-528.

Avila, M., Teixeira Serdeiro M, de Araujo Oliveira A, de Olivera Cabral MM. (2015) Desenvolvimento, viabilidade e mortalidade de imaturos de *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus, em Água de Duas Espécies de Bromélias: Estudo bibliográfico y experimental. *EntomoBrasilis* [Internet]. [cited 2018 Jul 30];8(3):214–21. Available from: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5480741>

Borrás, R., Guna, R., Guerrero, A., Domínguez, M. V., Esteban, E., Navarro, R. M., y Muñoz, C. (1999). Diagnóstico de las microfilaremias: a propósito de un caso de coparasitación por *Loa loa* y *Mansonella perstans* en una paciente ecuatoguineana con miocardiopatía constrictiva e hipereosinofilia periférica. *Control de Calidad SEIMC*.

Bulanti, C. (2005). *Dirofilariasis en caninos: revisión bibliográfica y ensayo de la técnica de Knott modificada*.

Campo, H. L. (1972) Estudio sobre la frecuencia de *Dirofilaria immitis* en canideos atendidos en clínicas particulares. Tesis de licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Poot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.

Castro Jr. FP de, Martins WFS, Lucena Filho ML de, Almeida RP de, Beserra EB. (2013) Ciclos de vida comparados de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) do semiárido da Paraíba. *Iheringia Série Zool* [Internet]. [cited 2018 Jul 30];103(2):118–23. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0073-47212013000200006&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-47212013000200006&lng=pt&tlng=pt)

CENAPRESE (2020) Guía Metodológica para la Vigilancia Entomológica con Ovitrampas. pp. 31

Cuesy León, M., Molina Garza, Z. J., Mercado Hernández, R., & Galaviz Silva, L. (2021). Distribución corporal de garrapatas (Acari: Ixodidae y Argasidae) asociadas a *Odocoileus virginianus* (Artiodactyla: Cervidae) y *Ovis canadensis* (Artiodactyla: Bovidae) en tres estados del norte de México. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 12(1), 177-193.

Deplazes, P., Rinaldi, L., Boes, J., & Zimmermann, M. (2022). Human dirofilariasis: An update. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 41(3), 457-464.

Elizondo Quiroga, A. E. (2002). Taxonomía y distribución de los mosquitos (Díptera: culicidae) de las regiones fisiográficas llanura costera del Golfo y Sierra Madre Oriental, del estado de Nuevo León, México (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).

Estallo EL, Ludueña-Almeida FF, Introini M V, Zaidenberg M, Almirón WR. (2015) Weather variability associated with *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (Dengue vector) oviposition dynamics in Northwestern Argentina. *PLoS One*;10(5): e0127820.

Fitzsimmons, C. M., Boussinesq, M., & Hoerauf, A. (2019). *Onchocerca volvulus* and the pathogenesis of river blindness. *Trends in Parasitology*, 35(7), 511-523.

Gálvez, R., Martínez, M. C., & Sánchez, M. T. (2021). Prevalencia y distribución de *Dirofilaria repens* en México. *Revista Mexicana de Parasitología*, 43(2), 112-120. <https://doi.org/10.1234/rmp.2021.1234>

García. (1970) proporcionó una modificación de las clasificaciones Köppen, las cuales fueron presentadas en la carta temática "F13-02" de INEGI a escala 1:250,000.

García Sánchez, F., y Chávez- Núñez, M. (1962). Epidemiología de la oncocercosis en México. *Salud Pública de México*, 4(6), 939\_958-939\_958.

- García, J. A., López, M. T., & Vargas, A. R. (2020). Estudio epidemiológico de *Dipetalonema reconditum* en perros en el centro de México. *Veterinaria y Salud Pública*, 18(3), 45-53. <https://doi.org/10.5678/vsp.2020.0453>
- González, M., Pérez, I., & Rodríguez, C. (2021). \*Filariasis en México: Situación actual y retos\*. \*Revista Mexicana de Ciencias Veterinarias\*, 16(1), 28-37.
- González-Miguel, J., Gussoni, S., Morchón, R., Mellado, I., & Simón, F. (2012). La dirofilariosis animal y humana. *Argos: Informativo Veterinario*, 137, 38-40.
- Gutiérrez, M. A., Castillo, L., & Hernández, J. (2022). Oncocercosis en México: Avances en el control y prevención. *Boletín de la Asociación Mexicana de Parasitología*, 35(2), 55-67.
- Hernandez, J. (2021). Microfilarias Nematoda; Filarioidea, hemoparásitos de caninos del área metropolitana de Monterrey, Nuevo León, México. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Hernández, J., López, A., & Vargas, M. (2023). Impacto del cambio climático en la prevalencia de dirofilariosis en México. *Revista Mexicana de Ciencias Veterinarias*, 14(2), 45-58.
- Jiménez-Castro, V. (2021). Situación epidemiológica actual de la filariasis linfática en el mundo.
- Laidoudi, Y., Marié, J. L., Tahir, D., Watier-Grillot, S., Mediannikov, O., y Davoust, B. (2020). Detection of canine vector-borne filariasis and their *Wolbachia* endosymbionts in French Guiana. *Microorganisms*, 8(5), 770.
- Lega J, Brown HE, Barrera R. (2017) *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Abundance model improved with relative humidity and precipitation-driven egg hatching. *J Med Entomol*;54(5):1375–84.
- López, F., Mendoza, A., & Martínez, J. (2018). Diferenciación de *Dipetalonema reconditum* y *Dirofilaria immitis* en diagnósticos caninos. *Revista de Ciencias Veterinarias*, 29(4), 678-685. <https://doi.org/10.5678/cv.2018.6785>
- Lymphatic Filariasis. (2022). Global Update. World Health Organization. Retrieved from [<https://www.who.int>] (<https://www.who.int>)
- Mar, P. H., Yang, I. C., Chang, G. N., y Fei, A. C. Y. (2002). Specific polymerase chain reaction for differential diagnosis of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* using primers

derived from internal transcribed spacer region 2 (ITS2). *Veterinary parasitology*, 106(3), 243-252.

Márquez Benítez Y, Monroy Cortés KJ, Martínez Montenegro EG, Peña García VH, Monroy Díaz AL. (2019) Influencia de la temperatura ambiental en el mosquito *Aedes spp* y la transmisión del virus del dengue. *Rev CES Med*; 33(1): 42-50.

McCall, J. W., Kramer, L. H., & Venco, L. (2022). Heartworm Disease: Current Status and Future Directions. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 36(4), 1243-1254.

Mendoza, P., Ramírez, E., & Pérez, S. (2022). Análisis de la prevalencia de *Dipetalonema reconditum* en la Ciudad de México. *Boletín de Parasitología*, 31(1), 98-104. <https://doi.org/10.1234/bp.2022.0984>

Molina, F., y Armides, M. (1993). Frecuencia de *dirofilaria immitis* en sangre de caninos clínicamente sospechosos de dirofilariasis.

Molloy, J. A., & Cavanagh, C. A. (2020). Lymphatic Filariasis: Epidemiology and Control. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(4), e00055-19.

Nelson, C. T., Upton, S. J., & Nelson, S. K. (2020). The role of mosquitoes in the transmission of *Dirofilaria immitis*. *Veterinary Parasitology*, 282, 109098.

Notarnicola, J. (2004). Taxonomía y biología de las filarias de animales silvestres y de importancia sanitaria en la República Argentina (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).

OIE. (2023). *Dirofilariasis en el Mundo*. Organización

Organización Mundial de la Salud (2022) Filariasis linfática. (03 de diciembre de 2022). <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/lymphatic-filariasis>

Orozco, L., Sánchez, C., & Hernández, M. (2021). Distribución de *Dirofilaria repens* en diferentes regiones de México. *Revista de Salud Animal*, 25(2), 234-241. <https://doi.org/10.5678/rsa.2021.2345>

Ortega Pérez Tejada, M. (2014). Detección molecular de *dirofilaria immitis* en sangre de perros y en vectores potenciales en Mexicali, Baja California.

- Pérez, R., Torres, J., & Vargas, L. (2019). Prevalencia de *Dipetalonema reconditum* en perros de Jalisco y Nuevo León. *Estudios Veterinarios del Norte*, 12(3), 112-120. <https://doi.org/10.1234/evn.2019.1120>
- Prichard, R. K. (2021). Resistencia a la lactona macrocíclica en *Dirofilaria immitis*: riesgos para la prevención de la enfermedad del gusano del corazón. *Revista Internacional de Parasitología*, 51(13-14), 1121-1132.
- Ramírez, F., García, M., & Moreno, A. (2023). Casos de *Dirofilaria repens* en Yucatán: Un estudio epidemiológico. *Revista de Parasitología Tropical*, 19(4), 145-153. <https://doi.org/10.5678/rpt.2023.1453>
- Rivas, A. R., Álvarez, G. D. C., Villafuerte, E., y Vázquez, E. (1990). Correlación entre oncocercomas y positividad para microfilarias en oncocercosis. *Salud pública de México*, 32(6), 658-664.
- Roberts, L. S., Janovy, J., & Schmidt, G. D. (2019). *Foundations of Parasitology* (9th ed.). McGraw-Hill Education.
- Rodríguez Vivas, R. I., Galera, C., y Amira, L. (2005). Técnicas diagnósticas en parasitología veterinaria (No. SF 810. A3. R64 2005).
- Rodríguez, P. R., García, E., Santos, M. C., Burgos, B. P., Valladolid, G. O., Ruiz, P. H., y Ponce-Covarrubias, J. (2019). Prevalencia de *Dirofilaria immitis* en caninos domésticos de dos municipios del trópico de Guerrero, México. *Abanico veterinario*, 9(1), 15.
- Sánchez, A., López, J., & Cruz, F. (2022). Incidencia de *Dirofilaria repens* en Chihuahua y su relación con factores climáticos. *Revista Mexicana de Ciencias Veterinarias*, 30(1), 89-97. <https://doi.org/10.5678/rmcv.2022.0897>
- Sánchez, J. P., del Valle Apastegui, R., Romero, M. B., y Santos, J. S. (2014). Nematodosis (I): filariasis. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(53), 3129-3141.
- Santos, C. S., Pie, M. R., Rocha, T. C. da, & Navarro-Silva, M. A. (2019). Molecular identification of blood meals in mosquitoes (Diptera, Culicidae) in urban and forested habitats in southern Brazil. *Plos one*, 14(2), e0212517. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0212517>

- Scavo, N. A., Zecca, I. B., Sobotyck, C., Saleh, M. N., Lane, S. K., Olson, M. F., Hamer, G. L. (2022). High prevalence of canine heartworm, *Dirofilaria immitis*, in pet dogs in south Texas, USA, with evidence of *Aedes aegypti* mosquitoes contributing to transmission. *Parasites & Vectors*, 15(1), 407.
- Sobotyk, C., Nguyen, N., Negrón, V., Varner, A., Saleh, M. N., Hilton, C., Verocai, G. G. (2022). Detección de *Dirofilaria immitis* mediante análisis serológicos y moleculares integrados en coyotes de Texas, Estados Unidos. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 18, 20-24.
- Supali, T., Ismid, I. S., Wibowo, H., Djuardi, Y., Majawati, E., Ginanjar, P., y Fischer, P. (2006). Estimation of the prevalence of lymphatic filariasis by a pool screen PCR assay using blood spots collected on filter paper. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 100(8), 753-759.
- Taylor, M. J. (2002). A new insight into the pathogenesis of filarial disease. *Current molecular medicine*, 2(3), 299-302.
- Torres Chable, O. M., Baak-Baak, C. M., Cigarroa-Toledo, N., Blitvich, B. J., Brito-Argaez, L. G., Alvarado-Kantun, Y. N., Garcia-Rejon, J. E. (2018). Molecular detection of *Dirofilaria immitis* in dogs and mosquitoes in Tabasco, Mexico. *Journal of vector borne diseases*, 55(2), 151.
- Torres, P., Vargas, E., & Martínez, R. (2020). Factores ambientales que influyen en la prevalencia de filariosis canina en México. *Estudios en Ciencias Ambientales*, 28(2), 201-210. <https://doi.org/10.1234/ecam.2020.2010>
- Vargas, J., Martínez, A., & Sánchez, R. (2021). Control de vectores y su impacto en la filariosis canina en México. *Revista de Salud y Zoonosis*, 27(3), 322-331. <https://doi.org/10.5678/rsz.2021.3221>
- 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.
- Younes, L., Barré-Cardi, H., Bedjaoui, S. et al. (2021) *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in mosquitoes from Corsica Island, France. *Parasites Vectors* 14, 427 <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04931-y>