

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA**

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central shield with a figure, likely a saint, and various heraldic symbols. The shield is surrounded by a circular border containing the Latin text "CAROLINA ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER CÆTERA VBI CONSPICUA".

**“Estudio comparativo entre el método de coloración de Wright
y prueba de Elisa para el diagnóstico de Ehrlichiosis canina en
la ciudad de San Pedro Sula, Honduras”**

VILANOVA GUTIÉRREZ MEJÍA

GUATEMALA, AGOSTO 2008.

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA

“Estudio comparativo entre el método de coloración de Wright y prueba de Elisa para el diagnóstico de Ehrlichiosis canina en la ciudad de San Pedro Sula, Honduras”

TESIS

**PRESENTADA A LA JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE MEDICINA
VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

POR

VILANOVA GUTIÉRREZ MEJÍA

AL CONFERÍRSELE EL GRADO ACADÉMICO DE

MÉDICA VETERINARIA

GUATEMALA, AGOSTO 2008.

JUNTA DIRECTIVA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

DECANO: Lic. Zoot. Marco Vinicio de la Rosa Montepeque

SECRETARIO: Med. Vet. Marco Vinicio García Urbina

VOCAL I: Med. Vet. Yeri E. Veliz Porras

VOCAL II: Mag. Sc. M.V. Fredy Rolando González Guerrero

VOCAL III: Med. Vet. Mario A. Motta Gonzalez

VOCAL IV: Br. José Abraham Ramírez Chang

VOCAL V: Br. José Antonio Motta Fuentes

ASESORES

Med. Vet. Virginia De Corzo

Med. Vet. Grizelda Arizandieta

Med. Vet. Ninneth Blanco Suchite

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINAR

En cumplimiento con lo establecido por los estatutos de la Universidad de San Carlos de Guatemala, presento a su consideración el trabajo de tesis titulado:

“Estudio comparativo entre el método de coloración de Wright y prueba de Elisa para el diagnóstico de Ehrlichiosis canina en la ciudad de San Pedro Sula, Honduras”

Que fuera aprobado por la Junta Directiva de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Como requisito previo a optar al título profesional de

MÉDICA VETERINARIA

TESIS QUE DEDICO

A MI FAMILIA

A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

A LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

A MIS CATEDRÁTICOS E INSTRUCTORES:

En especial a:

Dra. Virginia de Corzo, Dra. Grizelda Arizandieta, Dra. Ninneth Blanco Suchite.

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS EN ESPECIAL A:

Gladys, Claudia, Argelia, Carolina, Verónica y Laurita.

AL LECTOR:

Para que sea una herramienta de consulta en futuras investigaciones.

Y MUY ESPECIALMENTE A USTED QUE ME ACOMPAÑA EN ESTE DIA TAN ESPECIAL...

ACTO QUE DEDICO

A DIOS: Por la fortaleza, luz, sabiduría que me ha brindado para alcanzar esta meta.

A MIS PADRES: Maria Concepción Mejía y Emilio Arturo Gutiérrez por su apoyo, sacrificio, orientación y enseñanzas.

A MIS HERMANOS: Pavel y Ludmila por su cariño y apoyo incondicional.

A TODA MI FAMILIA: gracias por todos los consejos brindados.

A MIS AMIGOS: Gracias por todos los momentos agradables que compartí con ellos.

A LA FAMILIA: MENDEZ PEINADO por todo su apoyo durante mi estadía en ese hermoso país de Guatemala, muchas gracias...

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. HIPÓTESIS	3
III. OBJETIVOS	4
3.1 General	4
3.2 Específicos	4
IV. REVISIÓN DE LITERATURA	5
4.1 TAXONOMÍA	5
4.2 TRANSMISIÓN	7
4.3 PATOGENIA	8
4.4 SINTOMATOLOGÍA	10
4.4.1 Fase aguda	10
4.4.2 Fase subclínica	11
4.4.3 Fase crónica	11
4.5 DIAGNÓSTICO	13
4.6 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL	15
4.7 TRATAMIENTO	16
4.8 PRONÓSTICO Y PREVENCIÓN	18
4.9 TÉCNICA DE ELISA	18
4.9.1 Fases de un ensayo Elisa	19
4.9.2 Determinación de antígenos	20
4.9.3 Determinación de anticuerpos	21
4.9.4 Tipos de técnicas Elisa	22
4.9.5 Marcadores enzimáticos	23
4.10 FROTE PERIFÉRICO CON COLORACIÓN DE WRIGHT	24
4.10.1 Coloracion de Wright	25

4.10.2 Preparación	26
4.10.3 Técnica	27
V. MATERIALES Y MÉTODOS	31
5.1 RECURSOS HUMANOS	31
5.2 RECURSOS DE LABORATORIO	31
5.3 CENTROS DE REFERENCIA	31
5.4 RECURSOS BIOLÓGICOS	31
5.5 METODOLOGÍA	32
5.6 DISEÑO ESTADÍSTICO	32
5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	33
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
6.1 RESULTADOS	34
6.2 DISCUSIÓN	37
VII. CONCLUSIONES	39
VIII. RECOMENDACIONES	40
IX. RESUMEN	41
X. BIBLIOGRAFÍA	43
XI. ANEXOS	47
11.1 FICHA PARA EL REGISTRO DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS	48
11.2 COLORACIÓN DE WRIGHT	49
11.3 PRUEBA DE ELISA	50
11.4 TABLA PACIENTES CANINOS INFECTADOS CON E. CANIS	51
11.5 TABLA DE ANIMALES POSITIVO A E. CANIS SEGÚN SEXO	52

11.6 TABLA DE ANIMALES POSITIVOS A E. CANIS SEGÚN EDAD	53
11.7 TABLA DE ANIMALES POSITIVOS A E. CANIS SEGÚN RAZA	54
11.8 PRUEBA ELISA (KIT SNAP 3DX)	55

I. INTRODUCCIÓN

Una de las enfermedades mas comunes causadas por rickettsias en perros es la Ehrlichiosis canina, cuyo agente causal la Ehrlichia sp. es transmitida al animal por medio de la picadura de la garrapata marrón del perro Rhipicephalus sanguineus. Debido a que la infección se concentra en latitudes tropicales y subtropicales, su curso largo y duración variable hace difícil relacionar la ehrlichiosis con una determinada época del año.

En el presente se reconocen tres fases de la infección: aguda, subclínica y crónica. La infección no complicada es con frecuencia benigna y se caracteriza por fiebre moderada, abatimiento, inapetencia, pérdida de peso, palidez de mucosas, disnea y linfadenopatía.

En la ehrlichiosis crónica grave, estos síntomas se agravan mucho e irán unidos a la propensión a las hemorragias, incluso a la epistaxis. La gran variedad de signos clínicos con los que cursa la ehrlichiosis hace que el diagnostico diferencial deba incluir muy variadas patologías.

Siendo la Ehrlichiosis una enfermedad de importancia veterinaria en zonas aptas para el desarrollo del microorganismo y debido a la alta incidencia de la misma en la población canina atendida en las diferentes clínicas de San Pedro Sula, Honduras, se hace de suma importancia utilizar un método de diagnostico efectivo y confiable para la identificación de dicha enfermedad.

El diagnostico de la enfermedad se ha basado en el hallazgo de inclusiones intracitoplasmáticas en linfocitos, monocitos o neutrófilos, o en la detección de anticuerpos contra antígenos de Ehrlichia canis. En la actualidad existen en el mercado algunos test comerciales de diagnostico de ehrlichiosis basados en la técnica de Elisa. Estas pruebas requieren de un equipo mínimo y permiten un diagnostico serológico de ehrlichiosis ampliamente disponible.

Por lo que en el presente estudio se compararan el método de coloración de Wright y la prueba de Elisa, ambos utilizados en el diagnostico de ehrlichiosis canina, definiéndose las ventajas y desventajas de estos métodos como herramienta de apoyo para el clínico veterinario.

II. HIPÓTESIS

La Prueba de ELISA como método de diagnóstico de *Ehrlichia canis* presenta una mayor sensibilidad y especificidad que la coloración de Wright.

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

- Contribuir al estudio de la Ehrlichia canis ofreciendo un método de diagnóstico rápido y seguro para su identificación.

3.2. Objetivos Específicos

- Comparar la eficacia de la Prueba de Elisa en la identificación de Ehrlichia canis versus coloración de Wright.
- Definir ventajas y desventajas de ambos métodos en el diagnóstico de Ehrlichiosis canina.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

La Ehrlichiosis canina es una enfermedad rickettsial causada por *Ehrlichia* spp. y transmitida por garrapatas, también conocida como rickettsiosis canina, fiebre hemorrágica canina, enfermedad del perro rastreador, tifus de la garrapata canina, desorden hemorrágico de Nairobi y pancitopenia tropical canina, nombres que representan diferentes aspectos de una misma enfermedad. Es reconocida como una enfermedad infecciosa importante y potencialmente fatal de los perros y otros miembros de la familia Canidae (zorro, coyote, chacal, etc.)

Todas las *Ehrlichia* spp. son microorganismos intracelulares de 0.2 a 2 micras de diámetro que infectan leucocitos salvo *Ehrlichia platys* que se encuentra en plaquetas. Son varias las especies de *Ehrlichia* capaces de infectar al perro, aunque desde un punto de vista clínico es *Ehrlichia canis* la que más importancia tiene. *E. canis* infecta el citoplasma de los linfocitos y los monocitos sanguíneos de los perros afectados. (17,6)

4.1 TAXONOMÍA:

Familia: se encuentra clasificada dentro de la familia Rickettsiaceae pero difiere del resto de los organismos de este grupo en algunos aspectos como, por ejemplo, su replicación dentro de los fagosomas de la célula hospedadora, su ultraestructura, su tropismo por leucocitos circulantes, su composición antigénica y su transmisión exclusiva, en la mayoría de las especies por picadura de garrapata. (8)

Genero: Ehrlichia

Especies: Ehrlichia canis:

Enfermedad: Ehrlichiosis monocítica canina

Vector: Rhipicephalus sanguineus, posiblemente Amblyomma americanum

Distribución: mundial

Células que afecta: monocitos y linfocitos. (16)

Ehrlichia ewingii:

Enfermedad: Ehrlichiosis granulocítica canina

Vector: desconocidos, pero probablemente *R. sanguineus* o *A. americanum*

Distribución: principalmente en los estados centrales del sur de los Estados Unidos.

Células que afecta: Granulocitos. (16)

Ehrlichia chaffeensis:

Enfermedad: raramente Ehrlichiosis monocítica canina

Vector: Amblyomma americanum; posiblemente Dermacentor variabilis

Células que afecta: Monocitos y linfocitos. (16)

Ehrlichia platys:

Enfermedad: Trombocitopenia cíclica canina

Vector: Rhipicephalus sanguineus

Células que afecta: Plaquetas. (14)

4.2 TRANSMISIÓN

En general, *Ehrlichia* spp. se transmite por la picadura de garrapatas. En el caso de *Ehrlichia canis* existe un único vector conocido: *Rhipicephalus sanguineus*. Esta garrapata, al alimentarse de un perro con ehrlichiosis, puede ingerir glóbulos blancos con *Ehrlichia* en su citoplasma. (15)

Este hecho es mucho más frecuente si la garrapata se fija a perros en fase aguda de la enfermedad, ya que es en esta fase cuando se encuentran un mayor número de leucocitos infectados en sangre.

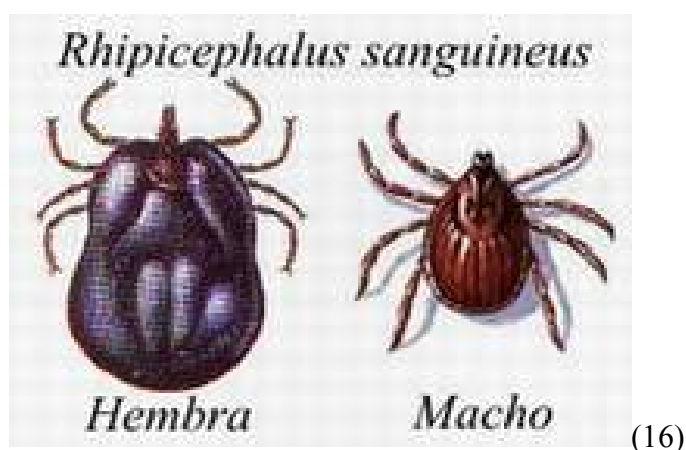
Las secreciones de las glándulas salivares de la garrapata constituyen la fuente de transmisión para el perro. Estas secreciones y la inflamación causada por la picadura parecen favorecer la llegada de leucocitos a ese lugar, facilitándose la entrada de *Ehrlichia* spp. en los mismos. (17, 2)

El microorganismo se introduce en la célula diana por endocitosis mediada por un receptor o por fagocitosis, se multiplica por fisión binaria pasando a “cuerpos iniciales” y posteriormente a “morulas”. Las morulas se disgregan en cuerpos elementales una vez que la célula infectada se rompe, e invaden nuevas células hasta instaurar la parasitemia. (8)

La transmisión de *E. canis* en la garrapata es de tipo transestadial, es decir, de larva a ninfa y de ninfa a adulto, sin que se haya podido demostrar hasta el momento la existencia de transmisión transovárica. (17)

Rhipicephalus sanguineus adulto es capaz de transmitir la *E. canis* durante un mínimo de 155 días luego de desprenderse del huésped.

También puede ser introducida en los perros susceptibles mediante la transfusión de sangre, en las que el animal donador sea rickettsiémico. (7,20)



4.3 PATOGENIA

Clásicamente se describen 3 fases de la enfermedad: aguda, subclínica y crónica, aunque en la práctica clínica no se diferencian fácilmente. Después de un periodo de incubación de 8 a 20 días, el perro infectado ingresa en la fase aguda, que dura de 2-4 semanas. (15)

Durante este lapso, el organismo se multiplica dentro de las células mononucleares circulantes y los tejidos fagocíticos mononucleares del hígado, bazo y ganglios linfáticos. Esto ocasiona linfadenomegalia e hiperplasia linforeticular hepatoesplénica. Las células infectadas son transportadas por sangre a otros órganos corporales, en especial pulmón, riñón y meninges, donde se adhieren al endotelio vascular e inducen vasculitis e infección tisular subendotelial.

El consumo, secuestro y destrucción de las plaquetas contribuyen a la trombocitopenia durante la fase aguda, motivada fundamentalmente por procesos inmunomediados. Los recuentos leucocitarios son variables y la anemia, posiblemente relacionada con la supresión de la eritrogenesis y destrucción eritrocítica acelerada, se desarrolla en forma progresiva durante la fase aguda.

La fase subclínica ocurre a las 6-9 semanas postinoculación y se caracteriza por la persistencia variable de la trombocitopenia, leucopenia y anemia sin signos clínicos. (7,14)

Hay evidencias crecientes acerca de la intervención de mecanismos inmunológicos en la patogénesis de la enfermedad. Estas incluyen pruebas de Coombs y de autoaglutinación positivas en animales infectados y la demostración de anticuerpos antiplaquetas (APA) en perros infectados experimentalmente con *E. canis*.

Tanto plaquetas libres como ligadas a anticuerpos han sido demostradas en la sangre de perros infectados y se cree que cumplen un papel importante en la patogénesis de la trombocitopenia y la trombocitopatía.

Fueron demostradas nuevas evidencias sobre la intervención de mecanismos inmunopatológicos en la patogénesis de la ehrlichiosis en infecciones experimentales realizadas en perros esplenectomizados. Perros enteros y esplenectomizados fueron infectados con *E. canis*. La serología, los signos clínicos y los parámetros hematológicos fueron evaluados durante el curso de la enfermedad aguda. Los perros esplenectomizados presentaron una forma menos severa de la enfermedad aguda en comparación con los perros enteros. Los resultados sugieren un compromiso del bazo. La típica esplenitis linfoplasmocítica, con la consecuente liberación de mediadores de la inflamación y/o sustancias esplénicas, ha sido propuesta como un elemento fundamental en la patogénesis de la enfermedad. (6, 21)

Algunos animales con buena respuesta celular pueden superar la infección sin necesidad de ser tratados; sin embargo, en la mayoría de los casos la enfermedad progresa a una fase crónica cuya severidad es variable. Esta severidad depende fundamentalmente del grado de afección de algunos órganos vitales. Los casos con insuficiencia renal no suelen responder demasiado bien al tratamiento. Igualmente en ocasiones la médula ósea se puede afectar hasta el extremo de presentarse una aplasia medular que produce un cuadro de pancitopenia que suele desembocar en la muerte del animal.(17,20)

4.4 SINTOMATOLOGÍA

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad son difíciles de delimitar ya que hay considerables variaciones en el tipo, duración y severidad del historial clínico, así como en las anormalidades físicas y clínico-patológicas, por los siguientes-motivos:

1. La Ehrlichiosis puede ir acompañada de otras enfermedades concomitantes, tales como la Babesiosis, Filariosis, o Leishmania.
2. La gravedad de la enfermedad está en función de:
 - la cepa del microorganismo
 - que transcurra en animales inmunosuprimidos.
 - la edad del animal, (más grave en animales jóvenes y viejos). (4)

4.4.1 Fase aguda:

Los signos clínicos durante esta fase varían de depresión, anorexia, fiebre (39.5-41.5°C) a pérdida seria de la condición corporal, pérdida de peso, linfadenopatía, secreción oculonasal, hemorragias, disnea y edema de las extremidades o el escroto.

También se caracteriza por alteraciones hematológicas como trombocitopenia, leucopenia o leucocitosis y anemia leve variable.

Las pruebas bioquímicas muestran una hiperglobulinemia, así como un aumento de la enzima TGP (ALT), fosfatasa alcalina y bilirrubina, indicando comprometimiento hepático.

Debido al corto periodo de incubación se puede encontrar en algunos de estos animales una infestación evidente de garrapatas, si no han sido eliminadas todavía. En la mayoría de los casos se resuelve esta fase en forma espontánea y se inicia la siguiente fase. (20, 4)

4.4.2 Fase subclínica:

Puede durar de meses a años. Los pacientes están asintomáticos, en esta fase el animal recupera el peso perdido y resuelve la hipertermia, llegando a tener temperatura corporal normal. (5)

La identificación de ADN de Ehrlichia en aspirados esplénicos, obtenidos de 4 portadores persistentes después de 4 meses de la infección experimental, sugiere que el bazo es el órgano donde permanece la rickettsia en los casos subclínicos.(6)

En algunos animales puede ser eliminado el parásito (si su estado inmune es competente). Aunque en la mayoría persiste instaurándose así la fase crónica. Pueden identificarse cambios hematológicos y bioquímicos leves. (2)

4.4.3 Fase crónica:

Generalmente en esta fase el animal tiene los mismos signos de la fase aguda pero atenuados, encontrándose apático, caquético y con susceptibilidad aumentada a infecciones secundarias.

No todos los perros desarrollan la fase crónica, y las condiciones que llevan al desarrollo de la misma permanecen poco claras. El ovejero alemán tiende a desarrollar

la fase crónica mucho mas frecuentemente que otras razas, posiblemente debido a una respuesta disminuida de la inmunidad celular en estos perros. (6)

Los signos clínicos se desarrollan en 1 a 4 meses después de la inoculación del microorganismo, pudiéndose observar:

- Pérdida de peso, pirexia, anorexia
- Sangrado espontáneo, aunque este solo aparece en aproximadamente un 35 % de los perros ehrlichiosos. De todos los signos hemorrágicos observados (petequias y equimosis en piel y mucosas, hematuria, melena, hemorragias retinianas o conjuntivales, etc.) la epistaxis es el mas frecuente.
- Palidez de mucosas, linfadenopatía, hepato y esplenomegalia.
- Signos neurológicos (hiperestesia, estado de estupor, convulsiones) causados por meningitis inflamatoria o hemorrágica.
- Nefropatía perdedora de proteínas, como una glomerulonefritis que se origina por depósito de inmunocomplejos sobre los capilares del glomérulo. Esto da lugar a proteinuria que en algunos casos puede llevar a hipoalbuminemia lo que explicaría la aparición de edemas en la parte ventral del cuerpo (extremidades, escroto).
- Signos oculares como uveítis, cambio de color en los ojos, hipema, retinitis, desprendimiento de retina y ceguera.
- Disnea o tos por el edema intersticial a nivel de pulmón.
- Algunos desordenes reproductivos, como sangrado prolongado durante el estro, infertilidad, aborto y muerte neonatal pueden estar asociados a la enfermedad.

Las anormalidades hematológicas y bioquímicas en general son pronunciadas e incluyen: monocitopenia, bicitopenia o pancitopenia debido a hipoplasia de la medula ósea; plasmocitosis de la medula ósea o esplénica, linfocitosis, en ocasiones compuesta de grandes linfocitos granulares, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia y proteinuria. (4, 6,2)

5.5 DIAGNÓSTICO

Basado en:

1. Animales que presenten un cuadro clínico compatible con las alteraciones que se sabe produce *E. canis*.

2. Historial de infestación por garrapatas.

3. Área endémica de *Ehrlichiosis*, zonas de climas cálidos y húmedos.

4. Por anormalidades hematológicas: trombocitopenias, anemias (normalmente no regenerativas), leucopenias y ya en estados crónicos graves pancitopenias por hipoplasia de las células precursoras de médula ósea.

5. Por alteraciones bioquímicas: hiperproteinemias, (por valores elevados de globulinas), hiperglobulinemia e hipoalbuminemia. La hiperglobulinemia suele ser gammapatía policlonal, si bien se han detectado por electroforesis proteica, gammapatía monoclonal. En fases crónicas se produce nefropatía perdedora de proteínas por lo que, clínicamente, se manifiesta como proteinuria. También hay hematuria y aumento del tiempo de sangrado (aún estando los valores de plaquetas en rangos normales). (4)

6. Diagnóstico etiológico. El diagnóstico se puede realizar observando mórulas o cuerpos de inclusión de *E. canis* en el citoplasma de linfocitos, monocitos o neutrofilos en un frotis sanguíneo teñido con las técnicas habituales (Giemsa, Diff-Quick, Wright, etc.). (15)



Desgraciadamente, *E. canis* aparece transitoriamente en la sangre (4-5 días postexposición) y, especialmente, durante la fase aguda por lo que son muchos los perros con ehrlichiosis en los que no encontramos estos cuerpos de inclusión. (17, 22)

7. Inmunodiagnóstico. Debido a la baja sensibilidad del diagnóstico etiológico, las técnicas serológicas y, en especial, la inmunofluorescencia indirecta (IFI) son las más empleadas en la práctica clínica. La detección de un título de anticuerpos positivo en un perro con signos clínicos o alteraciones en la analítica compatibles con ehrlichiosis permite realizar un diagnóstico de la enfermedad.

Las IgG tardan en aparecer entre 14 y 21 días después de la infección por lo que en fases agudas podemos encontrar títulos por debajo del umbral de positividad. En estos casos si se quiere confirmar el diagnóstico se recomienda tomar una segunda muestra para poner de manifiesto la seroconversión, incluso tras haber instaurado un tratamiento específico.

En la actualidad existen en el mercado algunos tests comerciales de diagnóstico de ehrlichiosis basados en la técnica de ELISA. Estos dispositivos poseen un sistema de inmunoanálisis enzimático con un anticuerpo de captura inmovilizado en un filtro de membrana. La muestra se hace fluir a través de la membrana de nailon con gran capacidad inmovilizante, la cual se fija en una base conectada a un lecho absorbente, seguida en secuencia y en momentos específicos de reactivo, incluidos conjugado de anticuerpo marcado, solución de lavado y solución de sustrato. El anticuerpo se visualiza como un punto coloreado o como un signo más para indicar un resultado positivo.

El resultado positivo indica que el paciente tuvo contacto con *Ehrlichia*, sin embargo es necesario cuantificar la reacción, midiendo las concentraciones de anticuerpos que permitan estimar la cantidad de anticuerpos en el suero.

Estas pruebas requieren un equipo mínimo y permitirán un diagnóstico serológico de ehrlichiosis canina ampliamente disponible. (17)

Otros métodos, usados principalmente en investigación, son el cultivo del parásito, PCR y Western immunoblotting. En un estudio en el que se comparó PCR, cultivo del parásito, IFA y Western immunoblotting para la detección temprana del parásito se vio que el cultivo celular y el re-aislamiento es el método más sensible y definitivo para el diagnóstico temprano de la ehrlichiosis. No obstante, se necesitan entre 14 a 34 días para obtener resultados positivos, por lo que no es un método conveniente. (6,10)

4.6 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

La gran variedad de signos clínicos con los que puede cursar la ehrlichiosis hace que el diagnóstico diferencial deba incluir muy variadas patologías. No obstante, la que con más frecuencia se puede confundir con ehrlichiosis es la leishmaniosis canina debido a la similitud de muchos de sus síntomas (hemorragias, apatía, linfadenopatía, pérdida de peso, uveítis, etc.), especialmente en animales con hiperproteinemia.

También se deben descartar otras enfermedades transmitidas por garrapatas como la babesiosis o la hepatozoonosis, por la similitud tanto de sus vectores como, en ocasiones, de su sintomatología. Aunque se trata de patologías mucho menos frecuentes que la ehrlichiosis, ésta también debe diferenciarse de lupus eritematoso sistémico, mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica, leptospirosis, etc. (10, 2)

4.7 TRATAMIENTO

Diversos fármacos pueden ser utilizados en el tratamiento de ehrlichiosis, entre ellos están: la oxitetraciclina, o cloranfenicol, o imidocarb, la tetraciclina y la doxiciclina. (Tabla 1)

De estos, la doxiciclina constituye la droga de elección para el tratamiento de ehrlichiosis en todas sus fases.

Esta droga es absorbida con rapidez cuando es administrada por vía oral. Se distribuye ampliamente en corazón, riñones, pulmones, músculo, fluido pleural, secreciones bronquiales, bilis, saliva, fluido sinovial, líquido ascítico y humores vítreo y acuoso. La doxiciclina es más liposoluble y penetra más los tejidos y fluidos corporales mejor que el clorhidrato de tetraciclina y oxitetraciclina. La eliminación de la doxiciclina se da primariamente a través de las heces por vías biliares, en forma activa. La vida media de la doxiciclina es de 10-12 horas. La droga no se acumula en pacientes con disfunción renal y por eso puede ser usada en estos animales sin mayores restricciones. (20)

La doxiciclina se suele emplear a dosis de 10 mg/kg/24 horas (o 5 mg/kg dos veces por día) durante 28 días. El dipropionato de imidocarb se puede emplear, administrando 2 inyecciones de 5 mg/kg vía SC, con un intervalo de 2 semanas entre ambas. El dipropionato de imidocarb está especialmente indicado en perros que también presentan babesiosis. (21)

Con relativa frecuencia se presentan efectos secundarios como disnea, sialorrea, diarrea, exudado nasal y taquicardia, que parecen ser debidos a un efecto anticolinesterasa del fármaco. Estos signos remiten tras la administración de atropina.

En la práctica clínica, en aquellos casos que presentan un cuadro severo, frecuentemente se instaure un tratamiento combinado a base de doxiciclina y de imidocarb. (17)

En caso de animales jóvenes, menores de 5 meses, para evitar la coloración irreversible gris-amarillenta de los dientes que se produce por depósito de las tetraciclinas en huesos y dientes en desarrollo, el antibiótico de elección es el cloranfenicol en dosis de 25-50 mg/kg cada 8 horas vía oral. (4)

En muchos casos no suele ser necesario instaurar un tratamiento de apoyo y sólo con la terapia específica se suele conseguir una buena respuesta. No obstante, en casos con anemia severa, están indicadas las transfusiones sanguíneas. Debido a la dificultad con la que, a veces, nos encontramos para diferenciar la ehrlichiosis de otras anemias y/o trombocitopenias inmunomediadas o autoinmunes, en la práctica inicialmente se puede instaurar un tratamiento combinado con corticoides, a la espera de los resultados serológicos. (2, 14)

BASE TERAPEUTICA	DOSIS	VIA	FRECUENCIA
Antibióticos de 1ª Línea			
Clorhidrato de tetraciclina	22 mg/Kg	Oral	Tres veces al día por 21 días
Oxitetraciclina	25 mg/Kg	Oral	Tres veces al día por 21 días
Doxiciclina	5 a 10 mg/Kg	Oral o Intravenosa	Una a dos veces al día por 14 días
Minociclina	20 mg/Kg	Oral	Dos veces al día por 14 días
Antibióticos de 2ª Línea			
Imidocarb	5 mg/Kg	Intramuscular o Subcutánea	Dosis única con repetición cada 2 o 3 semanas.
Cloranfenicol	50 mg/Kg	Oral	Tres veces al día por 21 días

Tabla 1: Productos disponibles para el tratamiento de Ehrlichiosis Canina (modificado de WOODY *et al.*, 1991) (20)

4.8 PRONÓSTICO Y PREVENCIÓN:

- El pronóstico de la ehrlichiosis canina es excelente con el tratamiento apropiado, a menos que la médula ósea se encuentre muy hipoplasica. La respuesta clínica en las formas más crónicas puede tardar 3 a 4 semanas.
- Hasta la fecha, no se ha desarrollado ninguna vacuna eficaz contra *E. canis* y el control de las garrapatas, tanto en el animal como en el medio sigue siendo la medida de prevención más eficaz contra la infección. (2,5)

En áreas endémicas, el tratamiento con bajas dosis de oxitetraciclina (6,6 mg/kg) una vez al día ha sido sugerida como medida preventiva. A pesar del éxito de este tratamiento, algunos autores no consideran práctica esta medida debido a la posibilidad del desarrollo futuro de cepas de *E. canis* resistentes. Este desarrollo de resistencia complicaría aun más el tratamiento de los perros y como consecuencia de esto, una disminución en la tasa de éxito de los tratamientos. (6, 21)

4.9 LA TÉCNICA DE ELISA

La técnica ELISA es un procedimiento de ensayo inmunoenzimático cuyo nombre resulta de la asociación de las iniciales de su denominación inglesa (enzyme linked immuno sorbent assay). Se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto, por ejemplo un colorante, puede ser medido espectrofotométricamente. (11)

Este principio tiene muchas de las propiedades de un inmunoensayo ideal: es versátil, robusto, simple en su realización, emplea reactivos económicos y consigue, mediante el uso de la fase sólida, una separación fácil entre la fracción retenida y la fracción libre. (11)

El área de sus aplicaciones médicas se ha expandido en forma sostenida, siendo utilizada como el primer sustituto de la técnica de Radioinmunoensayo en la medición de hormonas, inmunoglobulinas, antígenos y anticuerpos en infecciones bacterianas, micóticas, parasitarias o virósicas. (11)

De un modo general se procede a la fijación de uno de los componentes de la reacción inmunológica (antígeno Ag o anticuerpo Ac) a un soporte sólido, poniendo luego ese sistema en contacto con una fase fluida que contiene el reactivo complementario. El complejo inmunológico formado es enfrentado luego a las moléculas capaces de reconocer a su componente más superficial, marcadas con una enzima (peroxidasa de rábano picante); agregándose posteriormente un sustrato cromogénico de la enzima marcadora. La existencia de una reacción inmunológica se demuestra y se cuantifica midiendo espectrofotométricamente la cantidad de producto enzimático resultante. (11)

El método ELISA está recomendado fundamentalmente para el estudio de poblaciones. Es una técnica altamente sensible y de gran especificidad, que permite realizar en un corto espacio de tiempo estudios sobre grandes poblaciones, de manera sencilla y económica. Esta técnica presenta además una buena reproducibilidad y facilidad en la interpretación de los resultados. (18)

4.9.1 Fases de un ensayo ELISA

Las 4 fases de un ensayo ELISA son las siguientes:

1. Conjugación del anticuerpo o del antígeno con un enzima (peroxidasa, fosfatasa alcalina,). El anticuerpo conjugado a la enzima se emplea en los ensayos directos e indirectos, sándwich, etc. El antígeno marcado se emplea en ensayos de competición de antígeno.

2. Unión del antígeno (o del anticuerpo) a los pocillos. La unión de anticuerpos o antígenos se realiza con facilidad a la superficie de plásticos tratados que tienen gran afinidad por proteínas.
3. Formación de una o más capas de inmunocomplejos. En el caso del antígeno unido a la placa se puede detectar mediante un anticuerpo anti-antígeno marcado (ELISA directo) o empleando un anticuerpo primario anti-antígeno y un secundario anti primario marcado (ELISA indirecto). Este segundo método permite la amplificación de la señal al poderse unir uno o más anticuerpos secundarios a cada anticuerpo primario. En el caso del anticuerpo unido a la placa se incuba con una mezcla de antígeno y antígeno marcado. Se ensayan diferentes relaciones de antígeno frente a una cantidad fija de antígeno marcado. Es el ensayo de competición del antígeno.
4. Revelado de la reacción enzimática. Después de un lavado para eliminar todos las moléculas marcadas no fijadas en forma de inmunocomplejos se añade el sustrato enzimático en solución. Se deja reaccionar y se lee la densidad óptica mediante espectrofotometría. En el esquema se muestra la reacción asociada a un ELISA directo. (12)

Se han adaptado varios tipos del método ELISA tanto para la determinación de ANTÍGENOS como de ANTICUERPOS:

4.9.2 Determinación de antígenos

La modalidad más frecuente del método ELISA para la determinación de antígenos es el modelo ELISA "Sandwich". En esta forma, la placa suele ya venir con un anticuerpo fijado (monoclonal ó policlonal) frente al antígeno problema, sobre el que se añadirá el macerado del órgano sospechoso, que en caso de reaccionar con el anticuerpo de la placa, será puesto en evidencia tras la adición del segundo anticuerpo marcado con la enzima. Por último, se añade el sustrato para revelar la reacción. (18)

4.9.3 Determinación de anticuerpos

Para la determinación de anticuerpos específicos frente a un determinado antígeno se utilizan normalmente las siguientes modalidades del método ELISA:

- **ELISA INDIRECTO.**
- **ELISA COMPETICIÓN.**

ELISA INDIRECTO

Es el método más utilizado para la determinación de anticuerpos. Básicamente, consiste en la inmovilización a la placa de ELISA del antígeno (en los Kits ya viene fijado) del que queremos conocer si en el suero problema existen anticuerpos específicos. Se pueden utilizar como antígenos, proteínas virales o bacterianas e incluso virus completos.

Cada día es más frecuente utilizar exclusivamente las proteínas de interés inmunológico y no todas las proteínas antigénicas. Los pasos siguientes serían la adición del suero problema, incubación y lavado, adición del conjugado, incubación y lavado, finalizando con la adición del sustrato, el frenado de la reacción y la lectura. (18)

ELISA DE COMPETICIÓN

En este sistema también es muy utilizado para la detección de anticuerpos específicos. Se parte de un anticuerpo (monoclonal o policlonal), frente a un antígeno conocido, que previamente ha sido inmovilizado en la placa. Se denomina de competición ya que el suero problema es incubado previamente con el antígeno, antes de incubarlo con el antisuero fijado en la placa, y por tanto compite con él.

Los pasos siguientes es la adición e incubación del conjugado, lavado y finalización con el sustrato y lectura. (18)

4.9.4 Tipos de técnicas Elisa:

Técnicas cualitativas:

Son técnicas Elisa que nos indican la ausencia ó presencia de un antígeno o anticuerpo determinando. Los kits incluyen controles positivos y negativos para poder determinar esta presencia o ausencia de antígenos.

Ejemplo: HIV, Hepatitis, etc. (11)

Técnicas cuantitativas:

Son técnicas Elisa que nos indican la cantidad de antígeno ó anticuerpo presente en la muestra. Los kits incluyen +/-6 standards (sueros de diferentes concentraciones del antígeno objetivo) con los cuales se realiza una curva para así poder determinar la concentración de la muestra.

Ejemplo: Hormonas, Marcadores tumorales, etc. (11)

Técnicas semi-cuantitativas:

Son técnicas Elisa que nos dan un indicio de la cantidad de antígeno ó anticuerpo presente en la muestra con la utilización de un standard ó calibrador.

Ejemplo: ANA, nDNA, etc. (11)

EQUIPOS QUE SE NECESITAN PARA MONTAR LAS TÉCNICAS ELISA

- Pipetas P20, P100, P200 y P1000 para servir las muestras y los reactivos.
- Baño de María o baño seco.
- Agitador de placas
- Lavador automático, pipeta Multicanal ó Distriman (repetidora)
- Lector de tiras ó placa de Elisa.
- Opcionalmente un procesador automatizado de placas de Elisa. (11)

4.9.5 Marcadores enzimáticos más comúnmente utilizados

En la tabla siguiente se recogen los marcadores enzimáticos más comúnmente empleados en ensayos ELISA, los sustratos que se emplean para su revelado y el modo de prepararlos.

Enzima	Sustrato	Tampón
HRP (peroxidasa de rábano)	OPD	10 mg/25 mL de tampón citrato sódico 0.15 M pH 5; añadir microL de 30% peróxido de hidrógeno 30%
	TMB	2.5 mg/250 microL de DMSO; hasta 25 ml con tampón citrato sódico 0.1M pH 6; añadir 5 microL de peróxido de hidrógeno 30%
	ABTS	60 mg/100 mL de tampón citrato sódico 0.1 M pH 6; añadir 35 microL de peróxido de hidrógeno 30%; parar con fluoruro sódico 1.25%; leer a 405 nm
	DAB	10 mg/20 mL de tampón Tris 50 mM pH 7.4; filtrar y añadir 20 microL de peróxido de hidrógeno 1%
	CNP	6 mg en 1 mL de metanol; añadir 10 mL de tampón Tris 50 mM pH 7.4; filtrar y añadir 40 microL de peróxido de hidrógeno 30%
	AEC	80 mg en 1 mL de N,N'-dimetilformamida + 200 microL de tampón acetato 0.1 M pH 4.5; filtrar y añadir 50 microL de peróxido de hidrógeno 30%
	ASA	80 mg/100 mL de agua destilada caliente; ajustar a pH 6.0 con 1 mM NaOH y añadir 10 % por volumen de 0.05% peróxido de hidrógeno; parar con 25 microL de NaOH 1 M
AP (Fosfatasa)	PNPP	5 mg/5 mL de tampón dietanolamina-HCl 0.1 M pH 9.8 +1 mM cloruro de magnesio

alcalina)	NAPFB	(A) 4 mg de fosfato de naftol en 200 microL de dimetilformamida en un tubo de vidrio, (B) 10 mg de sal Fast Blue BB/ 10 ml de tampón Tris 0.05M pH 9.2 - 2 mM cloruro de magnesio. Mezclar A + B y filtrar.
	NAPR	(A) 4 mg de fosfato de naftol en 200 microL de dimetilformamida en un tubo de vidrio, (B) 10 mg de sal Red BB/ 10 ml de tampón Tris 0.05M pH 9.2 - 2 mM cloruro de magnesio. Mezclar A + B y filtrar.
	BCIP	1 mg/mL en solución AMP (2-amino-2-metil-propanol)
beta-G	ONPG	2.5 mg/ml en tampón fosfato sódico 0.1 M pH 7.0 + 1 mM cloruro de magnesio + 0.1 M beta-mercaptoetanol
ureasa	BP	8 mg/1.48 ml de 0.01M NaOH; llevarlo a 100 ml con agua desionizada; añadir 100 mg de urea y EDTA a 0.2 mM; ajustar el pH a 4.8 con 1 mM NaOH o HCl; almacenar a 4°C
PG	IS	Añadir a cada placa de ELISA 25 microL de cada uno de los reactivos siguientes en secuencia : (A) 1% (peso/vol) gelatina en 0.1 M tampón fosfato pH 7.0, (B) 1% (peso/vol) almidón en agua destilada caliente, (C) 3.04 mg/mL de benzil-penicilina en 0.1 M tampón fosfato pH 7.0 (5000 U/mL), (D) 0.01 N yoduro en 0.1 M KI solución stock (en una botella oscura)

4.10 FROTE PERIFERICO CON COLORACIÓN DE WRIGHT

El Frote Periférico, es un método de laboratorio que se utiliza para el estudio de las características citológicas de las células de la sangre. Se define como frote, frotis o extendido a la preparación microscópica delgada y transparente, extendida entre dos cristales, obtenida de un líquido espeso o tejido semilíquido o pastoso (sangre, secreciones, exudados, etc.).

La preparación y tinción de un Extendido o Frote de sangre o médula ósea, es una técnica fundamental en hematología. Debe exigirse una excelente calidad ya que de los datos que se obtengan de este estudio, dependerá la conducta a seguir con un determinado paciente.

Los frotis pueden hacerse de dos formas:

- a) sobre Porta-objetos y
- b) sobre Cubre-objetos

La técnica se facilita más utilizando cubre-objetos.

No obstante, se prefieren los porta-objetos por las siguientes razones:

1. Son fáciles de manipular.
2. Se rompen menos.
3. Se pueden rotular fácilmente.
4. No requieren montaje y pueden archivarse de inmediato.

Cualquiera de los tipos de laminilla que se utilice, debe estar perfectamente limpia, sin grasa y seca. Después de realizado el extendido se deja secar al aire. El tiempo y la forma de hacerlo, dependerá de la tinción a utilizar.

Actualmente son muy utilizadas la coloración de Wright, Giemsa, Leishman y otras.
(9)

4.10.1 Coloración de Wright

Fundamento:

La tinción de Wright es una tinción de tipo Romanowsky. Una tinción de Romanowsky consiste en azul de metileno y sus productos de oxidación, así como eosina Y o eosina B.

La acción combinada de estos colorantes produce el efecto Romanowsky y da una coloración púrpura a los núcleos de los leucocitos y a los gránulos neutrofilicos y de color rosado a los eritrocitos. Los componentes de este efecto son el azul B y la eosina Y.

Las propiedades de tinción de Romanowsky dependen del enlace de los colorantes a las estructuras químicas y de las interacciones del azul B y la eosina Y.

Los agrupamientos de ácidos nucleicos, las proteínas de los núcleos celulares y el citoplasma inmaduro reactivo, fijan el azul B, colorante básico.

La eosina Y, colorante ácido, se fija a los agrupamientos básicos de las moléculas de hemoglobina y a las proteínas básicas. (19)

El resultado de tinción puede ser influido por diferentes factores como el valor del pH de la solución y de la solución tampón, las sustancias tampón (amortiguadores), el tiempo de tinción y la fijación. (12)

4.10.2 Preparación:

1. *Solución tampón*

Disolver 1 tableta tampón según Weise* en 1000 ml de agua destilada.

*1.11374 ó 1.09468 en función del resultado de tinción deseado

2. *Solución de Wright diluida para tinción manual*

Añadir 20 ml de solución tampón y 150 ml de agua destilada a 30 ml de solución de eosina-azul de metileno según Wright.

3. *Solución de Wright diluida para tinción en el MIRASTAINER*

Añadir 30 ml de solución tampón y 220 ml de agua destilada a 50 ml de solución de eosina-azul de metileno según Wright.

4. Preparación de la solución de eosina-azul de metileno según Wright a partir de colorante

Disolver 0,25 g de eosina-azul de metileno según Wright en 100 ml de metanol, calentar cuidadosamente en el baño de agua durante 20-30 minutos o hasta que se haya disuelto el colorante, filtrar antes del uso. (12)

4.10.3 Técnica:

Frotis secados al aire

Banco de tinción

- Solución primaria de Wright 1 min
- Añadir solución tampón(1 ml), mezclar, teñir 4 min
- Enjuagar con solución tampón
- Secar

Cubeta de tinción

- Solución primaria de Wright 3 min
- Solución de Wright diluida 6 min
- Lavar con solución tampón 2 x 1 min.
- Secar

Tinción en el MIRASTAINER

Reactivos	Tiempo	Estación	Dip
Solución primaria de Wright	3 min	2	on
Solución de Wright diluida	6 min	3	on
Solución tampón	1 min	4	on
Agua corriente del grifo (lavar)	2 min	5	on
Secar	3 min	6	

Resultado:

Núcleos: rojo a violeta

Linfocitos: plasma azul

Monocitos: plasma azul grisáceo

Neutrófilos: gránulos violeta claro

Eosinófilos: gránulos rojo ladrillo a pardo rojizo

Basófilos: gránulos violeta oscuro a negro

Trombocitos: violeta

Eritrocitos: rojizo (12)

Las células coloreadas con Wright observadas en el frote periférico y sus características se mencionan a continuación:

1. LEUCOCITOS**A) Leucocitos Granulosos (Polimorfonucleares)****NEUTROFILOS:**

1. Son células que tienen un diámetro medio de 12 micrómetros.
2. El núcleo es lobulado, se tiñe intensamente, es irregular y muchas veces asume formas comparables a letras como E, Z y S. Los lóbulos son segmentos de material nuclear conectados por delicados filamentos de cromatina.
 - a) Neutrófilo Segmentado: Tiene por lo menos dos de sus lóbulos separados por el filamento de cromatina.
 - b) Neutrófilo en Banda: Tiene una banda de material nuclear más gruesa que un filamento de cromatina, que conecta los lóbulos y presenta un núcleo en forma de U, de espesor uniforme.

3. El citoplasma en sí mismo es incoloro, está totalmente lleno de gránulos de 0.2 a 0.3 micrómetros, que adoptan un color entre marrón y rosado con la tinción de Wright. Aproximadamente las dos terceras partes de éstos son gránulos específicos y una tercera parte son gránulos azurófilos. (9)

EOSINÓFILOS.

1. Tienen un diámetro medio de 13 micrómetros
2. Su citoplasma contiene gránulos de mayores tamaños que los del Neutrófilo, grandes, redondos, que se tiñen de color rojo brillante.
3. El núcleo tiene dos segmentos conectados, rara vez son más de tres.

BASÓFILOS.

1. Miden de 10 a 12 micrómetros de diámetro.
2. El núcleo ocupa la mitad de la célula, son forma segmentada o irregular.
3. El núcleo es pálido y suele estar oculto por gránulos grandes, oscuros de color azul, que se encuentran en el citoplasma.

B) Leucocitos no granulados (Mononucleares)

LINFOCITOS:

1. Son células mononucleadas que carecen de gránulos citoplasmáticos específicos.
2. Son las células más pequeñas midiendo entre 6 a 10 micrómetros.

3. Presentan un núcleo único, redondo, bien definido, pudiendo tener indentaciones. Contiene grumos de cromatina, teñidos de color oscuro. En la periferia del núcleo la cromatina se condensa.

4. El citoplasma se tiñe de color azul, exceptuando una zona perinuclear clara.

MONOCITOS:

1. Es la célula de mayor tamaño en la sangre normal, midiendo entre 14 a 20 micrómetros.

2. Contiene un único núcleo parcialmente lobulado y fuertemente indentado o en forma de herradura o reniforme.

3. El citoplasma es abundante, de color azul grisáceo y presenta un aspecto de vidrio esmerilado.

ERITROCITOS:

1. Son células anucleadas, tienen forma de disco bicóncavo con un diámetro de 7.2 micrómetros y un grosor de 2.1 micrómetros cerca de su borde.

2. Por su alta concentración de hemoglobina se tiñen de rojo.

3. Son las células más abundantes en el frote periférico. (9)

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 RECURSOS HUMANOS:

- 3 médicos veterinarios asesores de tesis

5.2 RECURSOS DE LABORATORIO:

- 210 tubos de ensayo con anticoagulante EDTA
- 210 tubos de ensayo sin anticoagulante
- 210 capilares para micro hematocrito
- Portaobjetos
- Jeringas
- Colorante de Wright
- Centrífuga
- Agua destilada
- Microscopio
- Aceite de inmersión
- 210 Kits de Elisa (Kit SNAP 3DX)(ver anexo 8)

5.3 CENTROS DE REFERENCIA:

- Biblioteca Facultad de medicina veterinaria y zootecnia.
- Laboratorio Microbiología facultad de medicina veterinaria y zootecnia.
- Laboratorio clínico hospital de la facultad de veterinaria.
- Internet

5.4 RECURSOS BIOLÓGICOS:

- 210 caninos

5.5 METODOLOGÍA

El estudio se realizo en la ciudad de San Pedro Sula departamento de Cortes, Honduras.

Como primer paso se procedió a tomar las muestras de sangre de 210 pacientes caninos atendidos en 3 diferentes clínicas veterinarias de dicha ciudad, teniendo en cuenta los criterios de inclusión definidos en el diseño estadístico.

Coloración de Wright:

Para cada una de las muestras tomadas en tubos de ensayo con anticoagulante se llevo a cabo una coloración de Wright , procediendo de la forma en que se indica en el anexo 2.

Prueba de ELISA:

Para cada una de las muestras tomadas en tubos de ensayo con /sin anticoagulante se llevo a cabo una prueba de Elisa (Kit SNAP 3DX), procediendo de la forma en que se indica en el anexo 3.

5.6 DISEÑO ESTADÍSTICO

Para la realización del estudio se tomo en cuenta los siguientes criterios de inclusión:

1. Muestras sanguínea de pacientes caninos de todas las edades.
2. Pacientes caninos sin importar raza.
3. Pacientes caninos de ambos sexos.
4. Que presenten uno o mas de los siguientes síntomas, compatibles con la enfermedad:
Fiebre, anorexia, perdida de peso, palidez de mucosas, epistaxis, hemorragias petequiales o equimóticas, linfadenomegalia, disnea, tos, signos neurológicos, edema de partes ventrales y trastornos reproductivos.
5. Que el paciente presente garrapatas, o con historial reciente de haberlas tenido.

5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

- Los resultados se anotarán en una Tabla de Registro (Anexo 1).
- Para el análisis de los datos se realizó la prueba estadística de Chi ².
- Para presentación de resultados se utilizaron tablas de referencia y gráficos.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 RESULTADOS:

No. de pacientes caninos positivos a *Ehrlichia canis*

No. de pacientes caninos negativos a *Ehrlichia canis*

* Análisis estadístico prueba de Chi ²

TABLA DE PACIENTES CANINOS INFECTADOS CON EHRLICHIA CANIS

Prueba	No de caninos positivos	No de caninos negativos	Total
Elisa	108	102	210
Wright	41	169	210
Total	149	271	420

Valores críticos: 3.84

X ² = 46.68

**TABLA DE ANIMALES INFECTADOS POR SEXO UTILIZANDO
COLORACIÓN DE WRIGHT**

Wright	Positivos	Negativos	Total
Sexo			
Machos	18	85	103
Hembras	23	84	107
Total	41	169	210

Valores críticos: 3.84

$$X^2 = 0.5$$

**TABLA DE ANIMALES INFECTADOS POR SEXO UTILIZANDO PRUEBA
DE ELISA**

Elisa	Positivos	Negativos	Total
Sexo			
Machos	47	56	103
Hembras	61	46	107
Total	108	102	210

Valores críticos: 3.84

$$X^2 = 3.2$$

**TABLA DE ANIMALES INFECTADOS POR EDAD UTILIZANDO
COLORACIÓN DE WRIGHT**

Wright	Positivos	Negativos	Total
Edad en años			
0-1	10	55	65
2-5	26	85	111
6-9	5	26	31
10 o mas	0	3	3
Total	41	169	210

Valor crítico: 7.81

$X^2 = 2.69$

**TABLA DE ANIMALES INFECTADOS POR EDAD UTILIZANDO PRUEBA
DE ELISA**

Elisa	Positivos	Negativos	Total
Edad en años			
0-1	29	36	65
2-5	63	48	111
6-9	13	18	31
10 o mas	3	0	3
Total	108	102	210

Valor crítico: 7.81

$X^2 = 6.55$

6.2 DISCUSIÓN:

El uso de la técnica de coloración de Wright en el diagnostico de *Erhlichia canis* en perros mostró ser poco efectiva, concordando con la literatura revisada en el hecho de que los cuerpos de inclusión solo pueden observarse durante la fase aguda de la enfermedad, por lo que en aquellos perros que se encuentran en la fase crónica esta técnica resulta de poco valor.

Por el contrario la prueba de Elisa resulto ser mas efectiva en el diagnostico de la *Erhlichia canis* con un mayor numero de casos positivos a la enfermedad. (ver anexo 7)

Para ambos métodos de diagnóstico se definieron ventajas y desventajas de cada uno:

- Coloración de Wright tiene las ventajas de que permite diferenciar entre las especies de *Ehrlichia*, permite identificar otros parásitos sanguíneos transmitidos por garrapatas (*Babesia*, *Hepatozoon*).

Con las desventajas de que el diagnóstico es en base a la identificación de cuerpos de inclusión (mórulas) que solo se encuentran en la fase aguda de la enfermedad, para la realización de la técnica se requiere de equipo de laboratorio.

- La prueba de Elisa (kit SNAP 3DX) tiene las ventajas de que el diagnóstico se realiza en base a la detección de anticuerpos contra antígenos de *E. canis* por lo que es útil en todas las fases de la enfermedad, el procedimiento es fácil de realizar y se requiere de un equipo mínimo, la muestra a utilizar puede ser plasma, suero o sangre entera.

Con las desventajas de que los anticuerpos contra *E. canis* tardan en aparecer de 14 a 28 días después de la infección por lo que en la fase aguda se pueden encontrar títulos por debajo del umbral de positividad (falsos negativos), alto costo de la prueba.

Entre los datos adicionales se observó la mayor frecuencia de la enfermedad en pacientes caninos hembras y animales de edad media (2-5 años) (ver anexos 5 y 6). Las razas caninas con mayor predisposición a la enfermedad: labrador, pastor alemán, cocker, boxer, golden retriever, rottweiler, sharpei, siberian husky. (ver anexo 7).

VII. CONCLUSIONES

1. Si $\alpha = 3.84$ y $X^2 = 46.68$ cae en la región de rechazo de la hipótesis. Por lo tanto existen diferencias altamente significativas entre la prueba de Elisa y el Método de coloración de Wright en la identificación de ehrlichiosis canina en perros.
2. La prueba de Elisa resulta ser mas efectiva en el diagnostico de *Erhlichia canis*.
3. Según la prueba de Chi ² las diferencias en los resultados obtenidos entre ambas pruebas de diagnostico no están relacionados con la edad y sexo del animal.
4. La mayor frecuencia de la enfermedad se observa en pacientes hembras y animales de edad media.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Utilizar la técnica de coloración de Wright como complemento de la prueba de Elisa, nunca como herramienta única de diagnóstico.
2. Evaluar otras técnicas de diagnóstico de Ehrlichiosis, que impliquen un menor costo para el propietario del animal.
3. Mantener un mayor control de la garrapata en zonas aptas para la propagación del vector.

IX. RESUMEN

La Ehrlichiosis es una enfermedad con curso de agudo a crónico que es provocada por una infección de las células mononucleares por la rickettsia Ehrlichia canis y que se trasmite por la picadura de la garrapata marrón del perro Rhipicephalus sanguineus.

Los signos clínicos que se pueden observar son: pérdida de peso, fiebre, anorexia, hemorragias, palidez de mucosas, linfadenopatía, signos neurológicos, uveítis y trastornos reproductivos.

El diagnóstico clínico se confirma ante la evidencia de microorganismos en el interior de leucocitos, pero cuando existe un número reducido de microorganismos su identificación es más difícil, excepto en la fase aguda previa al tratamiento. Con más frecuencia el diagnóstico se basa en una combinación de signos clínicos, detección de títulos de anticuerpos séricos y en función de la respuesta al tratamiento. La respuesta de anticuerpos puede demorar hasta 28 días, de modo que la serología puede no ser un elemento de diagnóstico seguro en las primeras fases de la enfermedad.

El objetivo del presente estudio fue comparar la eficacia de la prueba de Elisa versus coloración de Wright en la identificación de Ehrlichia canis.

El estudio se realizó en la ciudad de San Pedro Sula departamento de Cortes, Honduras. Se tomaron muestras de sangre de 210 pacientes caninos, atendidos en 3 clínicas veterinarias de esta ciudad.

Para la selección de los pacientes se tomaron los siguientes criterios de inclusión: sintomatología compatible con la enfermedad, historial de infestación por garrapatas, sin importar raza, sexo o edad del animal.

A cada una de las muestras se le realizó una prueba de Elisa (kit SNAP 3DX) y una coloración de Wright. Por los resultados obtenidos con ambas técnicas se concluye

que la Prueba de Elisa posee mayor sensibilidad y especificidad que la coloración de Wright para el diagnostico de *Erhlichia canis*.

Como datos adicionales se puede mencionar que la mayor frecuencia de la enfermedad se observo en pacientes caninos hembras y animales de edad media.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Biberstein, EL; Zee, CY. 1994. Tratado de microbiología Veterinaria. España, editorial Acribia. 673 p.
2. Birchard, SJ; Sherding, KG. 1996. Manual de pequeñas especies. México, Interamericana. 1747 p.
3. Cambio de divisas. s.f. Cambio de quetzal a dólar. WWW. Altavista.com
4. Ehrlichiosis. s.f. Sociedad de Médicos Veterinarios especialistas en pequeños animales. (en línea). Consultado 20 oct. 2007. Disponible en **<http://www.mevepa.cl/modules.php?name=News&file=article&sid=590>**
5. Ehrlichiosis. s.f. (en línea). Brasil Consultado 20 oct. 2007. Disponible en Tomado de Internet: **<http://personal.redestb.es/rajuste/epha03.htm>**
6. Erlichiosis monolítica canina. 2000. (en línea). Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de la Plata, Argentina. Consultado 20 oct. 2007. Disponible en **[http://www.dogues- argentines.com/jauriabrava/articulo18.htm](http://www.dogues-argentines.com/jauriabrava/articulo18.htm)**

7. Ettinger, SJ. 2002. Tratado de Medicina Interna Veterinaria. 5 ed. Argentina, Interamericana. 2274p.
8. Generalidades sobre el genero Ehrlichia. (en línea). s.f. Consultado 20 oct. 2007. Disponible en <http://personal.redestb.es/rajuste/epha03.htm>
9. Gonzáles Ortiz, SC ; Pernillo Rodas, O. Frote periférico. s.f. (en línea). Consultado 20 oct. 2007. Disponible en <http://medicina.usac.edu.gt/histologia/3-17.pdf>
10. Kakoma, I. 1996. Ehrlichia. (em línea). Consultado 20 oct. 2007. Disponible en <http://www.swiftwaterfarms.com/swiftwater/p11Ehrlichiosis.htm>
11. La Técnica Elisa. s.f. Laboratorios géminis (en línea). Consultado 20 oct. 2007. Disponible en [http://pandora.labgeminis.com:8909/publicidad/la tecnica elisa.htm](http://pandora.labgeminis.com:8909/publicidad/la_tecnica_elisa.htm)
12. Métodos en Biología celular. Elisa. s.f. (em línea). Consultado 20 oct. 2007. Disponible en <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/elisa.htm>
13. Merck. 2004. Eosina-azul de metileno según Wright para microscopia (em línea). Consultado 20 oct. 2007. Disponible en www.merck.de/servlet/PB/show/1239300/101383109278es.pdf
14. Pereira, N et al. s.f. Ehrlichiosis en caninos. (en línea). Brasil. Consultado 20 oct. 2007. Disponible en

http://www.veterinariazen.hpg.ig.com.br/arch_erlichC.htm

15. Peters, J. 2000. Canine Ehrlichiosis (en línea). Consultado 20 oct. 2007. Disponible en **<http://www.addl.purdue.edu/newsletters/2000/winter/ce.shtml>**

16. Rey, RJ et al. s.f. Ehrlichia en Florida (en línea). Departamento de Entomología y Nematología, del Servicio de Extensión Cooperativo de la Florida, Instituto de Alimentos y Ciencias Agrícolas, Universidad de la Florida. Consultado 20 oct. 2007. Disponible en **<http://edis.ifas.ufl.edu/IN422>**

17. Sainz, A et al. s.f. La ehrlichiosis en el perro: presente y futuro (en línea). Departamento de patología animal II. Facultad de veterinaria de Madrid. Consultado 20 oct. 2007. Disponible en **http://www.colvet.es/madrid/revista/may_jun_00/peq_animales.htm**

18. Sánchez Vizcaíno, JM. 2004. Curso de introducción a la inmunología porcina. Elisa. (en línea). Consultado 20 oct. 2007. Disponible en **<http://www.sanidadanimal.info/cursos/inmuno2/ca051.htm>**

19. Tinción de Wright. s.f. Manual de Hematología (en línea). Consultado 20 oct. 2007. Disponible en **<http://html.rincondelvago.com/manual-de-hematologia.html>**

20. Vignard Rosez, I et al. s.f. Ehrlichiosis canina (en línea). Laboratorios CEPAV. Consultado 20 oct. 2007. Disponible en **http://www.cepav.com.br/textos/t_erliq.htm**

21. Waner, T; Harrus, S. 2000. Canine Monocytic Ehrlichiosis (en línea).
Consultado 20 oct. 2007. Disponible en [www.ivis.org/advances/Infect
Dis Carmichael/waner/IVIS.pdf](http://www.ivis.org/advances/InfectDis/Carmichael/waner/IVIS.pdf)
22. Wolfgang KJ et al. 1995. Microbiología. 20 ed. Argentina, Panamericana.
1696 p.

XI. ANEXOS

11.1 FICHA PARA EL REGISTRO DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS

Muestra #	Sexo del paciente	Raza del paciente	Edad del paciente/ años	Prueba de Elisa	Coloración de Wright
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					

M= Macho

H= Hembra

(P)= positivo a Ehrlichia

(N) = negativo a Ehrlichia

11.2 COLORACIÓN DE WRIGHT

Procedimiento:

- Toma de la muestra de sangre en tubo con anticoagulante EDTA.
- Realización del frotis sanguíneo, dejar secar la lamina.
- Aplicación del colorante de Wright
- Esperar 10 minutos
- Agregar solución buffer (agua destilada)
- Esperar 10 minutos
- Lavar con agua destilada o agua corriente
- Dejar secar la lamina
- Observar al microscopio, objetivo 100x

Interpretación:

- Un resultado positivo esta dado por la presencia de morulas en el interior del citoplasma de monocitos y linfocitos.

11.3 PRUEBA DE ELISA

Procedimiento:

- Toma de la muestra de sangre en tubo de ensayo con o sin anticoagulante.
- Usando una pipeta se transfieren 3 gotas de muestra (sangre entera, suero o plasma) al tubo de muestra (tapa azul).
- Manteniendo el frasco en posición vertical, se añaden 4 gotas de conjugado al tubo de muestra (tapa azul).
- Se tapa el tubo de muestra y se mezcla bien invirtiendo el tubo de 3 a 5 veces.
- Se coloca el dispositivo sobre una superficie plana. Se añade el contenido del tubo de muestra a la cubeta de muestra, teniendo cuidado de no salpicar el contenido fuera de la cubeta.
- La muestra fluirá a través de la ventanilla de resultados llegando al círculo de activación en 30 a 60 segundos aproximadamente.
- Cuando comienza a aparecer color en el círculo de activación se pulsa firmemente el activador hasta que este a nivel con el cuerpo del dispositivo.
- Se mantiene el dispositivo en posición horizontal para asegurar resultados precisos. Se lee el resultado de la prueba a los 8 minutos.

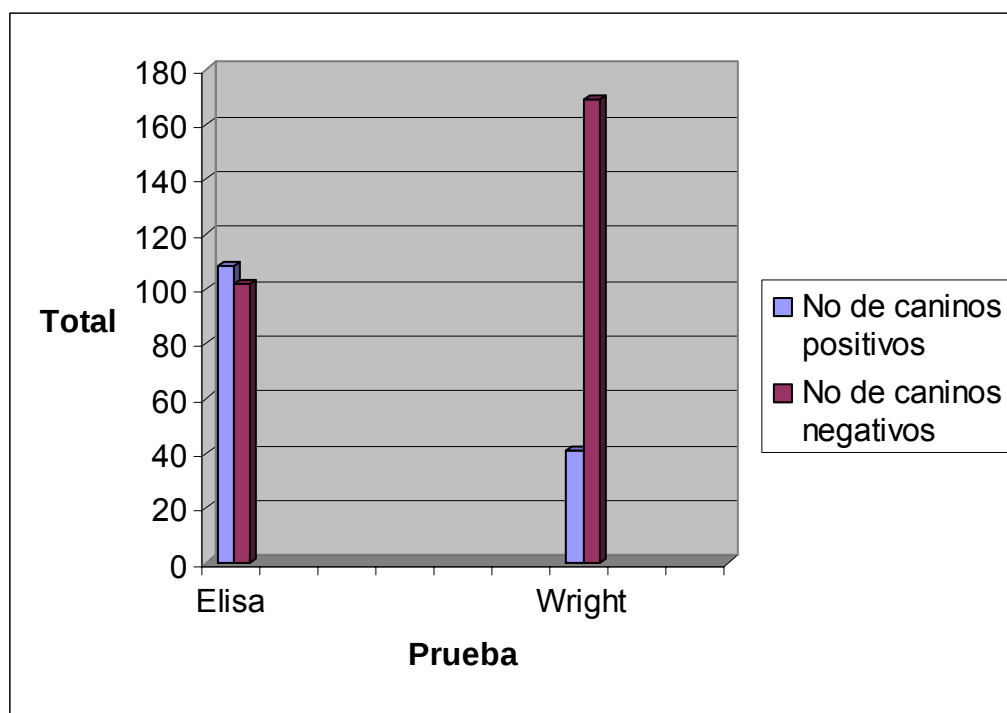
Interpretación:

- Si el resultado es negativo, solo se colorea de azul el círculo del control positivo.
- Si el resultado es positivo, se colorea de azul el círculo del control positivo y el círculo de la izquierda.

11.4 TABLA PACIENTES CANINOS INFECTADOS CON E. CANIS

Prueba	No de caninos positivos	No de caninos negativos	Total
Elisa	108	102	210
Wright	41	169	210

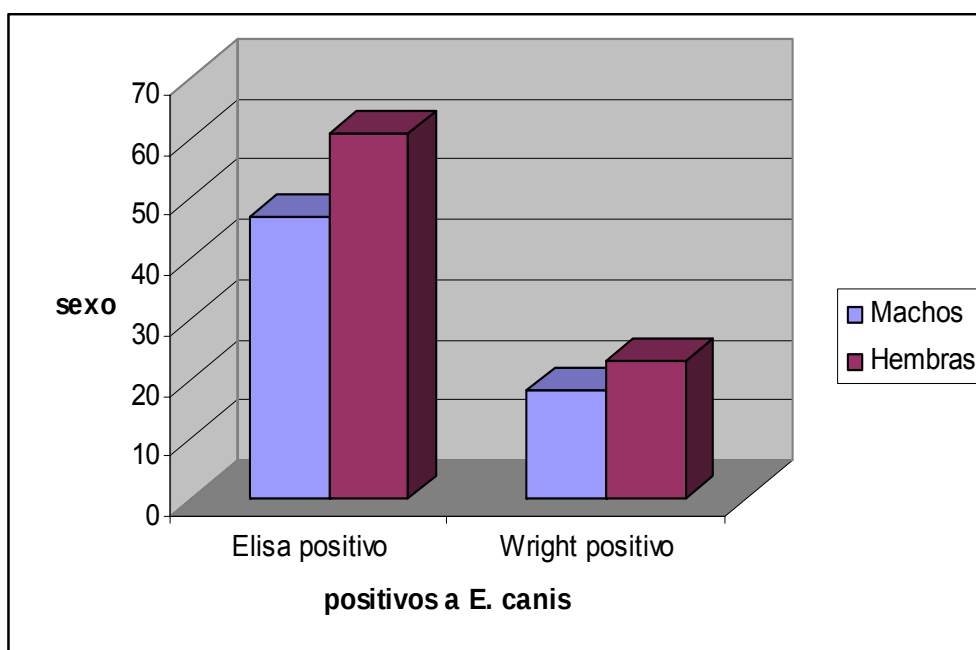
Gráfico de tabla pacientes caninos infectados con E. canis



11.5 TABLA DE ANIMALES POSITIVO A E. CANIS SEGÚN SEXO

Positivos a E. canis	Elisa positivos	Wright positivos
Sexo		
Machos	47	18
Hembras	61	23
Total	108	41

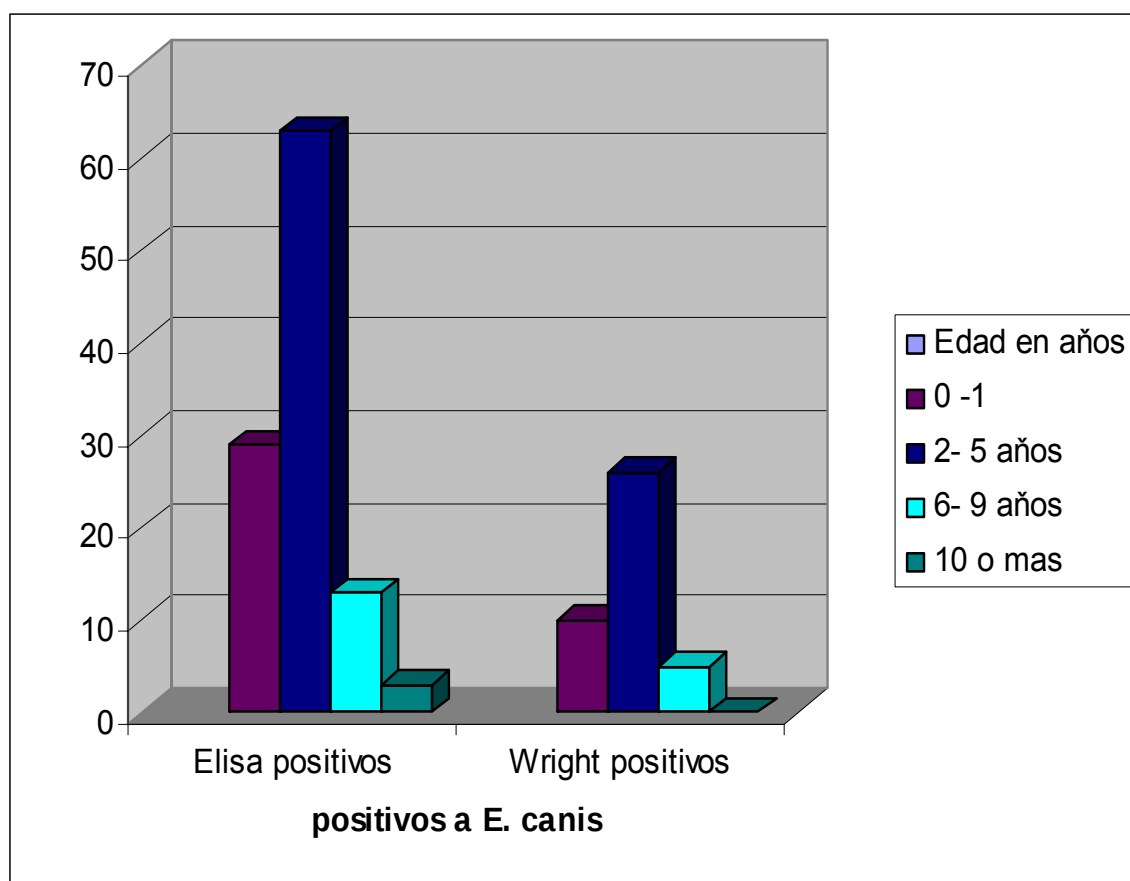
Gráfico de tabla de animales positivos a E. canis según sexo



11.6 TABLA DE ANIMALES POSITIVOS A E. CANIS SEGÚN EDAD

Positivos a E. canis		
Edad en años	Elisa positivos	Wright positivos
0 -1	29	10
2- 5	63	26
6- 9	13	5
10 o mas	3	0
Total	108	41

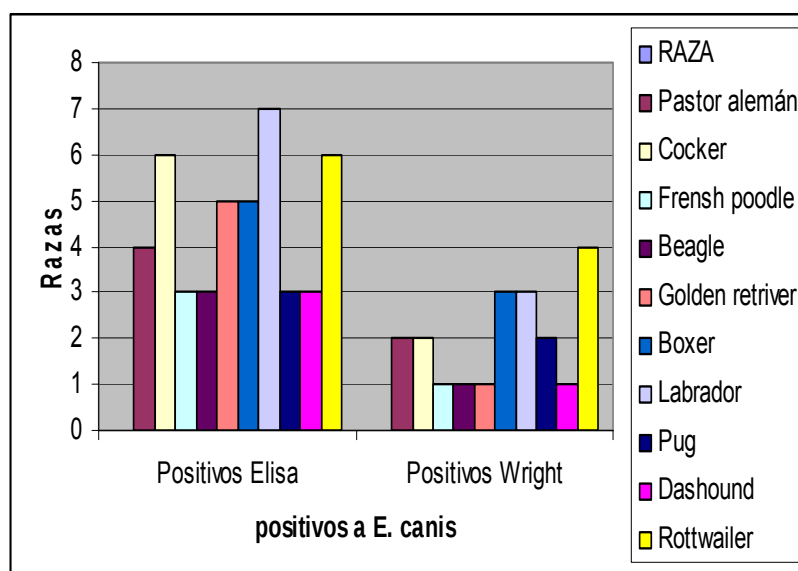
Gráfico de la tabla animales positivos a E. canis según edad



11.7 TABLA DE ANIMALES POSITIVOS A E. CANIS SEGÚN RAZA

RAZA	Positivos Elisa	Positivos Wright
Pastor alemán	4	2
Cocker	6	2
Frensh poodle	3	1
Beagle	3	1
Golden retriever	5	1
Boxer	5	3
Labrador	7	3
Pug	3	2
Dashound	3	1
Rottwailer	6	4
Sharpei	8	3
Siberian Husky	5	1
Dalmata	4	2

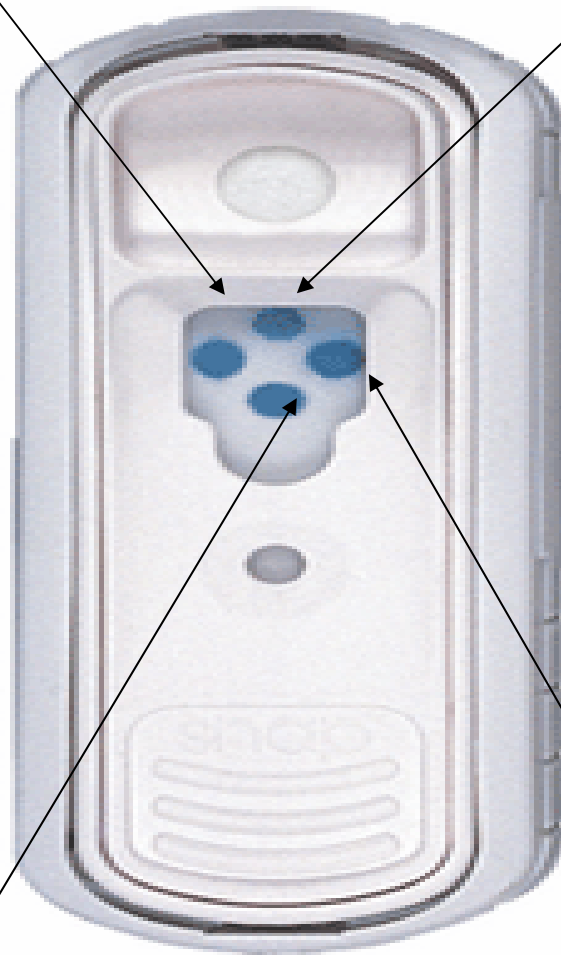
Gráfica animales positivos a E. canis según raza



11.8 PRUEBA ELISA (KIT SNAP 3DX)

E.canis (+)

Control
positivo



Lyme(+)

Dirofilaria (+)

Br. Vilanova Gutiérrez

Dra. Virginia de Corzo

Dra. Griselda Arizandieta

Dra. Ninneth Blanco

IMPRIMASE

Decano Lic. Zoot. Marco Vinicio de la Rosa