

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

FACULTAD DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE VETERINARIA

Trabajo de Graduación

Estudio comparativo entre las técnicas, Frotis sanguíneo, Inmunocromatografía y Biología molecular para la identificación de *Ehrlichia Canis*, en el periodo diciembre 2016 - marzo 2017, Managua, Nicaragua

AUTORES:

Br. Anielka Guisselle Ruiz Barahona

Br. Christopher José Salinas Almendárez

ASESORES:

Dr. Omar Enrique Navarro Reyes

Lic. Mario Romero Vargas Msc.

Ing. Pasteur Parrales García

Managua, Nicaragua Febrero del 2017



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE CIENCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE VETERINARIA

**Estudio comparativo entre las técnicas de frotis sanguíneo,
Inmunocromatografía y Biología molecular para la identificación
de Ehrlichia canis, en el periodo diciembre 2016 - marzo 2017,
Managua, Nicaragua**

Médico Veterinario
En el grado de licenciatura

Por:

Br. Anielka Guisselle Ruíz Barahona
Br. Christopher José Salinas Almendárez

Esta tesis fue evaluada por el Concejo de Investigación y Desarrollo (CID), de la facultad de ciencia animal (FACA) de la Universidad Nacional Agraria (UNA), y aprobada por el Honorable Tribunal Examinador designado para tal efecto, como requisito parcial para optar el título profesional de:

MÉDICO VETERINARIO
En el grado de Licenciatura

Miembro del Tribunal Examinador

Dr. José A. Vivas Garay
Presidente

Dr. Mauricio Silva
Secretario

Dr. Julio López
Vocal

INDICE DE CONTENIDO

SECCIÓN	PÁGINA
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE ANEXOS	v
INDICE DE GRAFICAS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo General	3
2.2. Objetivos Específico	3
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	4
3.1. Ubicación del área del estudio	4
3.2. Diseño metodológico.....	4
3.2.1. Toma de muestra	5
3.2.2. Métodos para extracción de sangre a caninos	5
3.2.2.1. Método Vacutainer	5
3.2.2.2. Método por goteo.....	6
3.2.5.1. Tinción Diff Quick (Biopack)	7
3.2.5.2. Test inmunocromatográfico de Ehrlichia (Uranovet)	7
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	11
V. CONCLUSIONES.....	17
VI. RECOMENDACIONES	18
VII. LITERATURA CITADA	19
VIII. ANEXOS	21

DEDICATORIA

A nuestro Señor y Creador Dios por habernos permitido culminar una etapa mas de nuestra vidas, a quien nos encomendamos cada dia nuevo para que nos llene de fortaleza, sabiduria y entendimiento para salir adelante con todas las metas que nos propongamos para ser personas de bien.

A Nuestros padres quienes son los pilares principales de nuestra familia y son un ejemplo a seguir adelante en esta vida , quienes decidieron darlo todo por nosotros para forjarnos como profesionales.

A nuestros maestros quienes cumplen un lugar muy importante en nuestras vidas ya que con sus conocimientos, dedicación y aportes nos permitirán poner en práctica todo los conocimientos adquirido para la vida diaria.

Anielka Guisselle Ruiz Barahona
Christopher J. Salinas Almendárez

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a nuestros padres por habernos dado todo el apoyo emocional y económico a lo largo del tiempo para el desarrollo de nuestras vidas y haber alcanzado nuestras metas.

Agradecemos incondicionalmente al laboratorio Division Veterinaria por ser el patrocinador de nuestro trabajo investigativo.

A nuestros tutores Dr. Omar Navarro Reyes y MSc. Mario Romero quienes nos guiaron por un buen camino y ser los precursores de la enseñanza de nuevas tecnicas de diagnosticos.

Anielka Guisselle Ruiz Barahona
Christopher J. Salinas Almendárez

ÍNDICE DE CUADROS

<i>Tabla 1</i> componentes del Kit Diff quick.....	7
<i>Tabla 2.</i> Resultados de los pacientes de las tres técnicas.....	11
<i>Tabla 3.</i> Prueba de Friedman.....	13
<i>Tabla 4.</i> Media de varianza	13
<i>Tabla 5.</i> Interpretación de los resultados	15

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Ubicación topográfica Laboratorio Clínico División Veterinaria</i>	4
---	---

ÍNDICE DE ANEXOS

<i>Anexo 1. Recolección de los datos y triada clínica.</i>	<i>21</i>
<i>Anexo 2. Toma de muestra de los veinte caninos.</i>	<i>21</i>
<i>Anexo 3. Realización del frotis sanguíneo y tinción Diff quick.....</i>	<i>22</i>
<i>Anexo 4. Procedimiento prueba Inmunocromatografica.....</i>	<i>23</i>
<i>Anexo 5. Procedimiento premezcla PCR.....</i>	<i>24</i>
<i>Anexo 6. Procedimiento amplificación PCR.....</i>	<i>25</i>
<i>Anexo 7. Formato hoja clínica.....</i>	<i>26</i>
<i>Anexo 8. Formato remisión de exámenes División Veterinaria.....</i>	<i>27</i>
<i>Anexo 9. Triada clínica realizada a los veintes pacientes.....</i>	<i>28</i>
<i>Anexo 10. Resultados de Biometría Hemática Completa (BHC).</i>	<i>29</i>

INDICE DE GRAFICAS

<i>Grafica 1. Total de pacientes según sexo.</i>	<i>11</i>
<i>Grafica 2. Resultado de frotis sanguíneo.....</i>	<i>12</i>
<i>Grafica 3. Resultados obtenidos de serología Ehrlichia Canis.....</i>	<i>12</i>
<i>Grafica 4. Resultados obtenidos del PCR Ehrlichia canis.</i>	<i>13</i>
<i>Grafica 5 Sensibilidad y especificidad de las técnicas</i>	<i>14</i>

RESUMEN

La Ehrlichiosis monocítica canina es una enfermedad causada por la Rickettsia, *Ehrlichia Canis* transmitidas por garrapatas (*Rhipicephalus sanguíneos*) y que parasitan el citoplasma, principalmente de los leucocitos (monocitos, macrófagos y granulocitos) circulantes, en grupos de organismos denominados mórulas. El presente trabajo tuvo como fin realizar una comparación entre las técnicas de frotis sanguíneo, Inmunocromatografía y Biología molecular para la identificación de Ehrlichia canis, para demostrar cuales de las técnicas tiene una mayor especificidad y sensibilidad; para esto realizamos la recolección de los datos de los pacientes realizándole una hoja clínica, triada clínica y un hemograma automatizado (Human count) teniendo una población de 20 caninos en total, de cuales obtuvimos como resultado del frotis sanguíneo 11 positivos y 9 negativos, del test inmunocromatográfico 15 positivos y 5 negativos, y del PCR (reacción en cadena de la polimerasa) 4 Positivos y 16 negativos. Logrando comprobar que la técnica PCR (reacción en cadena de la polimerasa) es la más confiable ya que esta técnica se basa en la detección del ADN de la Ehrlichia y nos da un resultado acertado, es por eso que realizamos una comparación entre las técnicas para demostrar cual presenta la mayor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico e interpretación del resultado positivo a hemoparásitos. Así con este trabajo se fomentará el inicio de nuevas fuentes de estudios para el diagnóstico de hemoparásitos en Nicaragua utilizando métodos y técnicas más sensibles y confiables para dar un resultado verdadero.

Palabras clave: Ehrlichia canina, frotis sanguíneo, Inmunocromatografía, PCR, Sensibilidad, especificidad, positivos, negativos.

ABSTRACT

Canine monocytic Ehrlichiosis is a disease caused by Rickettsia, Ehrlichia Canis transmitted by ticks (*Rhipicephalus sanguineos*) and parasitizing the cytoplasm, mainly circulating leukocytes (monocytes, macrophages and granulocytes), in groups of organisms called morulae. The aim of the present work was to compare the blood smear, Immunochromatography and Molecular biology techniques for the identification of Ehrlichia canis, to demonstrate which of the techniques has a greater specificity and sensitivity; To do this, we performed the data collection of the patients by performing a clinical leaflet, clinical triad and an automated hemogram (Human count) with a population of 20 canines in total, of which we obtained as a result of the blood smear 11 positive and 9 negative, of the 15 positive and 5 negative immunochromatographic test, and the PCR (polymerase chain reaction) 4 positive and 16 negative. The PCR technique (polymerase chain reaction) is the most reliable because this technique analyzes the DNA of Ehrlichia and gives us a successful result that is why we make a comparison between the techniques to demonstrate which presents the highest Sensitivity and specificity for the diagnosis of hemoparasites. And so, with this work will encourage the start of new sources of studies for the diagnosis of hemoparasites in Nicaragua using methods and techniques more sensitive and reliable to give a true result.

Key words: Ehrlichia canine, blood smear, Immunochromatography, PCR, Sensitivity, specificity, positive, negative

I. INTRODUCCIÓN

La Ehrlichiosis monocítica canina es una enfermedad causada por la Rickettsia, *Ehrlichia Canis*, bacterias intracelulares obligadas Gram negativas, cocoides pleomórficas pequeñas (0,5 µm de diámetro), transmitidas por garrapatas (*Rhipicephalus sanguineus*) y que parasitan el citoplasma, principalmente, de los leucocitos (monocitos, macrófagos y granulocitos) circulantes, en grupos de organismos denominados mórulas (Mayors, 2010).

Así mismo, son bacterias aeróbicas que no tienen una vía glucolítica. *E. canis* fue identificada por primera vez en Algeria en 1935 (Donatien y Lestoquard). Otras especies de *Ehrlichia*, pueden infectar a los perros como *E. platys*, *E. ruminantium*, *E. equi* y *E. ewingii*, estas últimas producirían manifestaciones clínicas más benignas (Mayors, 2010).

Mientras, la transmisión y distribución de la Ehrlichiosis está basada con el vector *Rhipicephalus Sanguineus* y se ha descrito su ocurrencia en cuatro continentes incluyendo Asia, África, Europa y América. El perro es infectado por la picadura de una garrapata que al alimentarse inyecta en el lugar secreciones salivares contaminadas con *Ehrlichia canis* o en forma iatrogénica por medio de transfusiones sanguíneas de un perro infectado a otro susceptible (Mayors, 2010).

La Ehrlichiosis canina puede englobar varias sintomatologías; se inicia con un proceso agudo caracterizado por depresión, anorexia, letargo, pérdida de peso y fiebre, seguido por una etapa subclínica que no aparece síntomas, el perro parece normal. En una etapa final o fase crónica, la Ehrlichiosis se manifiesta con hemorragias, linfadenopatías, esplenomegalia, poliartropatías y signos neurológicos (Benavides, 2003).

Con respecto al diagnóstico de la enfermedad se basa en la anamnesis, presentación clínica, hallazgos patológicos al examen clínico y se confirma con las pruebas de laboratorio (Mayors, 2010). Según Font et al (2009), el diagnóstico basado en los síntomas clínicos es difícil debido a lo inespecífico de estos y varían según el área geográfica y según la cepa. El período de incubación es de 7 a 10 días, y generalmente aparece primero un incremento de temperatura.

El diagnóstico microscópico vendrá dado por la localización de la mórula en el interior de los monocitos. Para facilitar su hallazgo se recurre a técnicas de leuco concentración, seguidas de extensión o frotis sanguíneo que permite el estudio cualitativo de los diferentes componentes sanguíneos, ya sea por cambios morfológicos (eritrocitos, leucocitos y/o plaquetas), inclusiones intra o extracelular de parásitos o bacterias sanguíneas teñidas con Diff-Quick (Biopack) (Gallo, 2014).

Se debe agregar que la demostración del agente causal (mórulas parasitando monocitos de talla media), se debe intentar en todos los animales sospechosos, siendo el momento óptimo para localizar monocitos parasitados durante la fase febril (Font et al, 2009). En caso de no poder visualizar la mórula se recurre a un laboratorio especializado para la detección de anticuerpos anti- *E. canis* (Font, et al., 1988).

La serología o prueba inmunocromatográfica consiste en la detección de anticuerpos específicos contra el agente infeccioso. La presencia de anticuerpos puede indicar tanto la presencia de infección actual como de infección pasada (contacto previo con el agente infeccioso y ahora libre de infección). Los estudios serológicos para los anticuerpos anti- *E. canis* se detectan a la segunda y tercera semana de comenzada la infección (Ettinger, 1992, Leal, 2004).

De igual manera la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) pueden utilizarse para el diagnóstico en perros con serología negativa de *Ehrlichia canis* y de otras especies de Ehrlichia; sin embargo, estas técnicas no están disponibles para su uso sistemático en la clínica (Birchard, 2002, Leal, 2004).

Las técnicas moleculares nos permiten detectar DNA (PCR). Son técnicas muy útiles por su elevada sensibilidad y capacidad de detectar pequeñas cargas infecciosas. La especificidad de las mismas dependerá del diseño de los “primers” (secuencias de nucleótidos que tienen que “engancharse” al DNA/RNA del agente infeccioso buscado para posteriormente ser amplificado), pudiendo estar diseñados para detectar por ejemplo un género (ejemplo, Ehrlichia spp.) o una especie concreta (ejemplo, Ehrlichia canis) (Giné, et al, 2012).

Lo ideal es realizar un último paso tras la amplificación del DNA que consiste en la secuenciación del fragmento de DNA amplificado para confirmar que se trata del agente infeccioso buscado (y para el cual están diseñados los “primers”), puede utilizarse para la detección de *E. canis* dentro de los 4 a 10 días pos-inoculación (Giné, et al, 2012, Mayors, 2010).

En Nicaragua existe la ley 747 que trata sobre la protección de los animales domésticos y silvestres domesticados en la cual dicha ley contempla en el artículo.7 las cinco libertades donde se considera el estado de salud mental y físico de la mascota. Teniendo como base que las mascotas estén libres de dolor, lesión y enfermedades se realizará este estudio con el objetivo de realizar exámenes complementarios para preservar y alargar la vida de las mascotas con el diagnóstico de *Ehrlichia canis*.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Comparar las técnicas, Frotis sanguíneo, Inmunocromatografía y Biología molecular para el diagnóstico de *Ehrlichia Canis*.

2.2. Objetivos Específico

1. Analizar muestras de sangre de pacientes caninos preseleccionados según hemograma, mediante las técnicas, Frotis sanguíneo, PCR y serología para la identificación de *Ehrlichia Canis*.
2. Fomentar el uso de PCR como alternativa diagnóstica para la identificación de hemoparásitos.
3. Determinar la especificidad y sensibilidad de las técnicas, Frotis sanguíneo y serología, para el diagnóstico de *Ehrlichia Canis* usando el PCR como diagnóstico más confiable (verdadero).
4. Determinar si existe relación entre las técnicas diagnósticas evaluadas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del área del estudio



Figura 1. Ubicación topográfica Laboratorio Clínico División Veterinaria

La investigación se realizó en el Laboratorio de Diagnóstico Clínico Veterinario División Veterinaria, localizado en el departamento de Managua, con la dirección Colonia Nicarao, de los Nacatamales Nicarao 1 ½ al norte, banda sur, casa número K- 647. Ubicación topográfica Managua 11.179, Nicaragua 12.127867, -86.235345, con clima tropical.

3.2. Diseño metodológico

Realizamos el experimento de la siguiente manera:

Hicimos la recolección de los datos de los pacientes realizándole una hoja clínica que contiene la información básica del paciente, luego se tomó la triada clínica (ver anexo 1.) y se les realizó un hemograma automatizado (Human Count 30^{ts}) (ver anexos 10.).

Recolectamos muestras de sangre a cada canino de la vena cefálica, la vena safena o en la vena yugular según el paciente con un mínimo de sangre recolectada de 2 ml y un máximo de 5 ml en tubos con EDTA como también se recolecto en tubos con gel separador; teniendo una población de 20 caninos en total.

Cada una de las muestras fue procesada mediante un extendido sanguíneos teñidos con Diff Quick (Biopack), pruebas inmunocromatográficas de *Ehrlichia canis* (Uranovet) y PCR de *Ehrlichia canis* (Pockit Micro plus), de pacientes con parámetros hematológicos que presumen el padecimiento de una Ehrlichiosis canina.

3.2.1. Toma de muestra

La toma de muestra es un procedimiento que permitirá acceder al torrente sanguíneo del paciente con el objetivo de realizar una variedad de exámenes para el diagnóstico de patologías presentes o no presentes en la mascota.

Una muestra es un tejido o fluido obtenido del paciente en estudio, ésta es representativa cuando se obtiene de la lesión patognomónica de la enfermedad sospechosa. La importancia radica en que su análisis en un laboratorio permite establecer un diagnóstico definitivo. (OIE, 2015). Para realizar una excelente obtención de la muestra se deben cumplirse protocolos de bioseguridad establecido por el laboratorio veterinario donde estará comprometido desde el cuarto de toma de muestra hasta las medidas de higiene del flebotomista.

Existen diferentes métodos para realizar la extracción de sangre, que pueden emplearse en los diferentes sitios de toma de muestra sanguínea, en dependencia del tamaño y temperamento del animal, el calibre de la vena, los medios disponibles y la confianza del clínico hacia determinado procedimiento (Tercero, 2015).

3.2.2. Métodos para extracción de sangre a caninos

3.2.2.1. Método Vacutainer

El método vacutainer o método de extracción por sistema de vacío consisten en la extracción de sangre donde una aguja de doble punta estéril con una manga retráctil permita realizar tomas múltiples donde la parte de la aguja más corta se inserta en el tubo y la parte más larga en la vena permitiendo así la extracción de sangre según el volumen necesario para el mantenimiento adecuado en relación aditivo-muestra. Evitando así problemas pre analíticos de la muestra.

Iniciamos colocándole el bozal al paciente y localizar la vena a puncionar. Se rasuro y desinfecto el área con motas de algodón cubiertas de alcohol al 70%, donde se realizó la punción, colocaremos el torniquete en la extremidad a puncionar. Se procede a preparar la aguja vacutainer ya sea calibre #21 y/o #22 dependiendo de la talla del animal, procedemos a quitar la cobertura de la aguja vacutainer, a continuación, la parte posterior de la aguja se enrosca en la camisa vacutainer (Holder). Se realizó la punción venosa en forma acostumbrada. Cuando la aguja esté en vena, se colocan dos dedos por debajo del borde del soporte (Holder). El pulgar de la misma mano se pone en el extremo del tubo ya sea tapón lila con anticoagulante EDTA de 2 – 5 ml o tubo tapón rojo seco con gel separador de 5ml y posteriormente se empuja el tubo con el pulgar hasta que la aguja (porción cubierta por hule) penetre en el tapón del tubo.

Si la aguja se encuentra en vena, la sangre fluirá hacia el tubo. Si no entra sangre al tubo, hay que buscar la vena hasta que aparezca el flujo de sangre. Mientras el tubo se está llenando se retira la presión de la vena o el torniquete. (ver anexos 2.)

3.2.2.2. Método por goteo

Este método se empleará en perros de talla pequeña y/o cachorros, se le colocó un bozal y se localizó la vena a puncionar, se rasuro y desinfecto el área con motas de algodón cubiertas de alcohol al 70% donde se realizó la punción, luego ocluir la vena mediante presión digital o con torniquete. Estirar la piel sobre la vena para inmovilizarla. Insertar la aguja calibres 22, 23 y 24 con el bisel hacia arriba. Se colocó el tubo tapón lila con anticoagulante EDTA de 1ml bajo la parte posterior de la aguja, de manera de la sangre caiga gota a gota. Retirar la aguja cuando se haya obtenido la cantidad de sangre necesaria. Se hace presión con un algodón seco sobre el sitio de punción.

3.2.3. Sitios de extracción de sangre en caninos

3.2.3.1. Vena yugular

Se recomienda la vena yugular para perros muy pequeños o cuando se necesitan grandes cantidades de sangre. Con el perro sentado, un ayudante detiene la mandíbula inferior con una mano y le volteo la cabeza hacia arriba y ligeramente de lado. El flebotomista coloca el pulgar de la mano izquierda en el surco yugular para ocluir y anclar la vena yugular, mientras manipula la jeringa y la aguja con la mano derecha. El perro también puede sujetarse en inclinación dorsal o lateral con la cabeza extendida. En caso de cachorritos, puede ser más conveniente sostener al animal debajo del brazo derecho del ayudante sujetando los miembros anteriores con la mano izquierda (Day et al., 2012).

3.2.3.2. Vena cefálica

Sitio que se usa con mayor frecuencia para la extracción de pequeñas cantidades de sangre en el perro. Al constreñir el área del aspecto dorsal de la extremidad anterior a nivel del codo se puede elevar la vena cefálica, empezando justo por encima de la articulación carpiana. Rasurar el área. Se coloca el torniquete para facilitar la fijación y la visualización de la vena.

3.2.4. Realización de frotis sanguíneos

El primer paso que realizamos fue identificar las muestras de los 20 pacientes, seguidamente identificamos también todas las láminas donde realizamos las muestras (véase anexos), con ayuda de la pipeta automática colocamos 10 μ l de sangre en cada lamina, procediendo a realizar el extendido de la sangre. (ver anexo 3.)

3.2.5. Técnicas laboratoriales para la identificación de *Ehrlichia Canis*

3.2.5.1. Tinción Diff Quick (Biopack)

El Color Fast® es un kit de 3 componentes para realizar tinciones citológicas rápidas.

Este método es de gran utilidad en punciones bajo control tomográfico, ecográfico o intraoperatorio, donde se extrae material, se realizan extendidos del mismo y se tiñen con Color Fast®.

Las tinciones con Color Fast® ponen de manifiesto la morfología celular y una muy buena diferenciación núcleo citoplasmática. Color Fast® es una tinción muy simple, muy efectiva y además puede aplicarse a todo tipo de muestras en frotis.

Técnicamente cada usuario puede emplear variaciones en el tiempo de aplicación de los componentes del kit. Dependiendo del tipo de material biológico, del espesor de los extendidos a teñir o de los hábitos de visualización del operador.

Se trata de una coloración rápida para tinción de extendido citológico y sanguíneo fijados al aire en 3 pasos. (ver anexo 3.)

El kit presenta 3 soluciones:
Fijador
Solución A
Solución B

Tabla 1 componentes del Kit Diff quick

3.2.5.2. Test inmunocromatográfico de Ehrlichia (Uranovet)

Es una técnica inmunocromatográfica para la detección cualitativa de anticuerpos de *Ehrlichia Canis* en sangre entera, suero o plasma.

Recogida y preparación de la muestra

El test se realizó con muestras de suero:

Se tomó una muestra de sangre por los métodos tradicionales utilizando un tubo con gel separador. Se centrifugo la sangre hasta que se separó en dos fases (suero y elementos formes).

Procedimiento de la técnica Inmunocromatografía

Se sacó la prueba del sobre de aluminio y se colocó en una superficie plana y seca, añadimos 10µ de suero en el pocillo marcado con una S, utilizamos para la dispensación una pipeta de 5-50 µl con su respectiva punta de pipeta, luego añadimos dos gotas de solución tampón reveladora y se interpretó los resultados a los 20 minutos. Después de 30 minutos la interpretación puede ser inválida. (ver anexo 4.)

Interpretación de los resultados

Una banda de control debe aparecer siempre la sección marcada con la letra C. la aparición de esta banda indica que la técnica se ha realizado correctamente

Resultados negativos

Cuando solo se observa la banda de control (banda C)

Resultados positivos

Cuando se observa una doble banda la banda C y la banda T

Resultados inválidos

Si la banda C no aparece, el resultado debe considerarse invalido la causa puede ser un seguimiento inadecuado de las instrucciones o la utilización de un test deteriorado.

Limitaciones

Aunque la prueba de inmunocromatográfica de *Ehrlichia canis* tiene una elevada sensibilidad y especificidad no puede descartarse una pequeña incidencia de resultados falsos positivos o negativos. Al igual que con cualquier otro procedimiento laboratoriales, un diagnóstico clínico definitivo no debe basarse tan solo en la realización de una sola prueba, sino que ha de ser el conjunto de una serie de hallazgo clínicos y laboratoriales.

3.2.5.3. Utilización del POKKIT, Set de reactivos para *Ehrlichia canis*

Este conjunto reactivo está pensado para el análisis de ácidos nucleicos extraídos de la sangre entera. Se recomienda el siguiente tamaño de la muestra:

Tipo de muestra	Tamaño de la muestra
Sangre entera	200µl

Realización de la pre-mezcla

Nota: añadir volúmenes adecuados de etanol al 95% a PB2, PB3 y PB4 antes del primer uso.

Nota: Preservar la sangre en un tubo que contiene EDTA si no se utiliza inmediatamente.

Recogimos la sangre fresca en un tubo que contenía EDTA, se transfirió 200 µl de la sangre fresca a un tubo de micro centrifuga de 1,5 ml, luego se añadió PB1 600 µl a continuación, se mezcló bien durante 1 minuto luego añadimos 600 µl PB2 (con etanol) a continuación, se mezcló bien durante 10 segundos utilizando el vortex después se transferimos 600 µl de la mezcla a un tubo de centrifugado y se centrifugo a toda velocidad durante 1 minuto. Se desechó el flujo continuo, luego añadimos PB3 600 µl (con etanol) en el tubo de centrifugado y se centrifugo a toda velocidad durante 1 minuto. Desechamos el flujo continuo y agregaremos 600 µl de PB4 (con etanol) en el tubo de centrifugado y se centrifugo a toda velocidad durante 1 minuto. Desechamos el flujo continuo, volvimos a centrifugar a toda velocidad por otros 3 minutos para eliminar el etanol residual, colocamos la columna del tubo de centrifugado en un tubo de 1,5 micro-centrífuga limpio, añadimos 50 µl PB5 en la columna e incubamos a temperatura ambiente durante 1 minuto, se centrifugo a toda velocidad durante 1 minuto para eluir el ácido nucleico. Se utilizó el extracto del ADN inmediatamente. (ver anexo 5.)

Procedimiento

Etiquetamos los R-tubos (s) en el área de la etiqueta, Preparamos una premezcla para cada muestra (los tubos de mezcla previa se encuentran en el paquete de premezcla. Cada paquete de premezcla contenía ocho tubos de premezcla.) Luego añadimos 50 µl de premezcla Tampón B a cada tubo de premezcla, luego se añadió 5 µl de extracto de ácido nucleico a cada tubo premezcla. Se centrifugo el tubo Premix durante 10 segundos en una centrífuga, luego transferimos 50µl de la muestra de mezcla previa en los R-tubos, Sellamos la parte superior de cada uno de los R-tubos con un tapón. Nos aseguramos de que los R-tubos estuvieran tapados herméticamente, colocamos los R-tubos en el soporte de POCKYT.

POCKYT reacción:

Seleccionamos "520nm", Cuando se visualizó "El sistema está listo", colocamos los soportes con R-tubo (s) en la cámara de reacción luego quitamos el tapón de la toma de cada uno de R-tubo y nos aseguramos de que el tubo estuviera colocado correctamente, cerramos la tapa y pulsamos el botón "Ejecutar" para iniciar el programa de reacción. (ver anexo 6.)

Resultado negativo

El resultado será negativo cuando en el monitor aparezca la siguiente imagen:



Resultado positivo

El resultado será positivo cuando en el monitor aparezca la siguiente imagen:



Resultado invalido

Repetir la reacción con ácido nucleico recién preparado será representado en el monitor por la siguiente imagen:



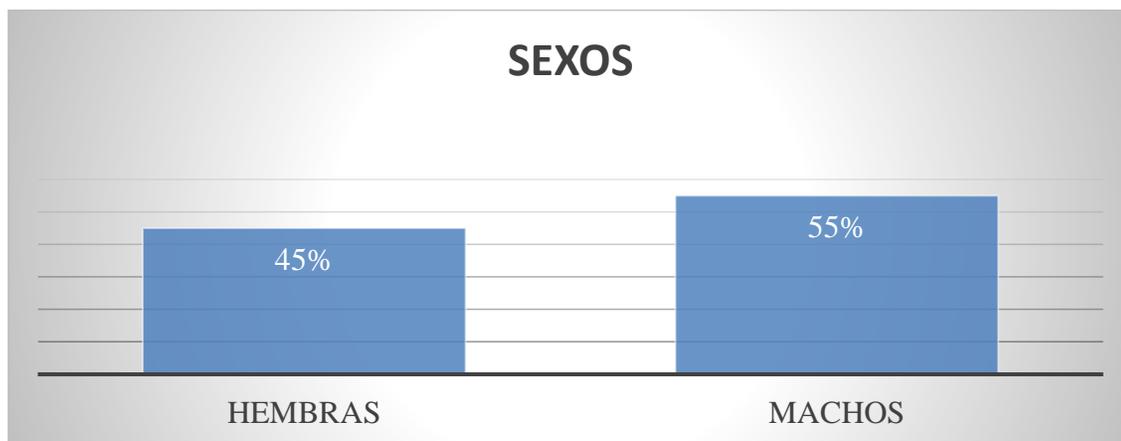
Limitaciones

- La prueba debe utilizarse sólo para la prueba de ácido nucleico extraído de especímenes de animales. No añada especímenes (sangre entera) directamente en la premezcla.
- Pet NAD ácido nucleico Co-prep kit y taco mini automático, sistema de extracción de ácido nucleico se recomienda para la extracción de ácidos nucleicos
- Cualquier desviación del procedimiento recomendado puede conducir a resultados subóptimos. La calidad de los extractos debe ser validada por el usuario
- Se recomienda utilizar ácidos nucleicos recién preparados (dentro de 1 hora después de la extracción) para lograr resultados óptimos con el POCKIT

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se eligieron un total de 20 pacientes aleatoriamente con signos clínicos característicos a *Ehrlichia canis*, tales como epistaxis, temperatura alta, alopecia, desnutrición, uveítis, deshidratación y presencia de garrapatas (*Rhipicephalus sanguíneos*)

En las instalaciones del laboratorio división veterinaria se tomaron las muestras de sangre de los 20 pacientes de los cuales estaban divididos en 9 hembras que representan el 45% y 11 machos quienes representan el 55%, todos nuestros pacientes tenían un rango de edad de 1 año a 8 años.



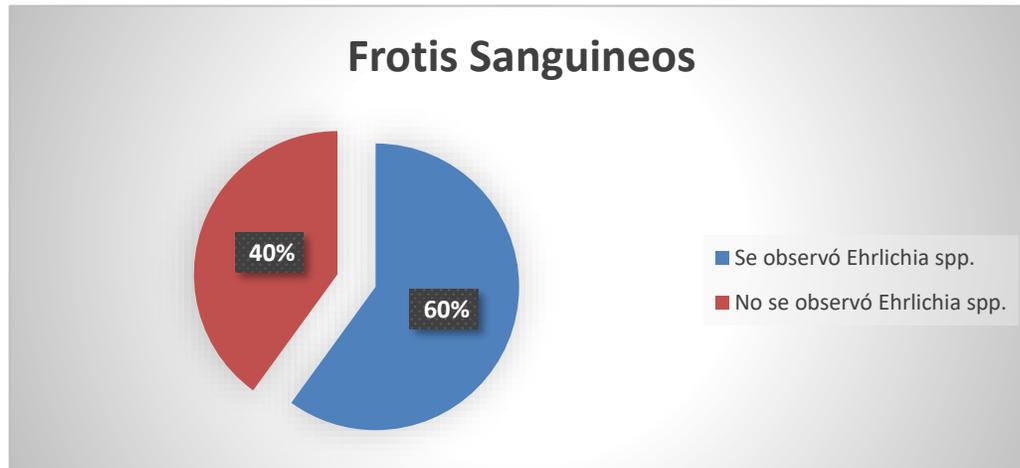
Grafica 1. Total de pacientes según sexo.

Obtenida la muestra de sangre recolectadas en un tubo con anticoagulante EDTA. Se procedió a realizar el hemograma de los 20 pacientes. (ver anexo 10.)

P/O/N	Paciente	Frotis	Serologia de Ehrlichia canis	PCR Ehrlichia canis
1	Venus	Positivo	Positivo	Negativo
2	Gea	Negativo	Negativo	Negativo
3	Pepe	Negativo	Positivo	Negativo
4	Constantin	Negativo	Negativo	Negativo
5	Copito	Negativo	Positivo	Negativo
6	Sufy	Negativo	Positivo	Negativo
7	Meyson	Negativo	Positivo	Negativo
8	Lia	Negativo	Positivo	Positivo
9	Dixi	Negativo	Negativo	Negativo
10	Magui	Negativo	Negativo	Negativo
11	Rex	Positivo	Negativo	Negativo
12	Ivan	Positivo	Positivo	Negativo
13	Tonky	Positivo	Positivo	Positivo
14	Barbie	Positivo	Positivo	Positivo
15	Missy	Positivo	Positivo	Negativo
16	Hulk	Positivo	Positivo	Positivo
17	Esperanza	Positivo	Positivo	Negativo
18	Obama	Positivo	Positivo	Negativo
19	Beto	Positivo	Positivo	Negativo
20	Bobby	Positivo	Positivo	Negativo

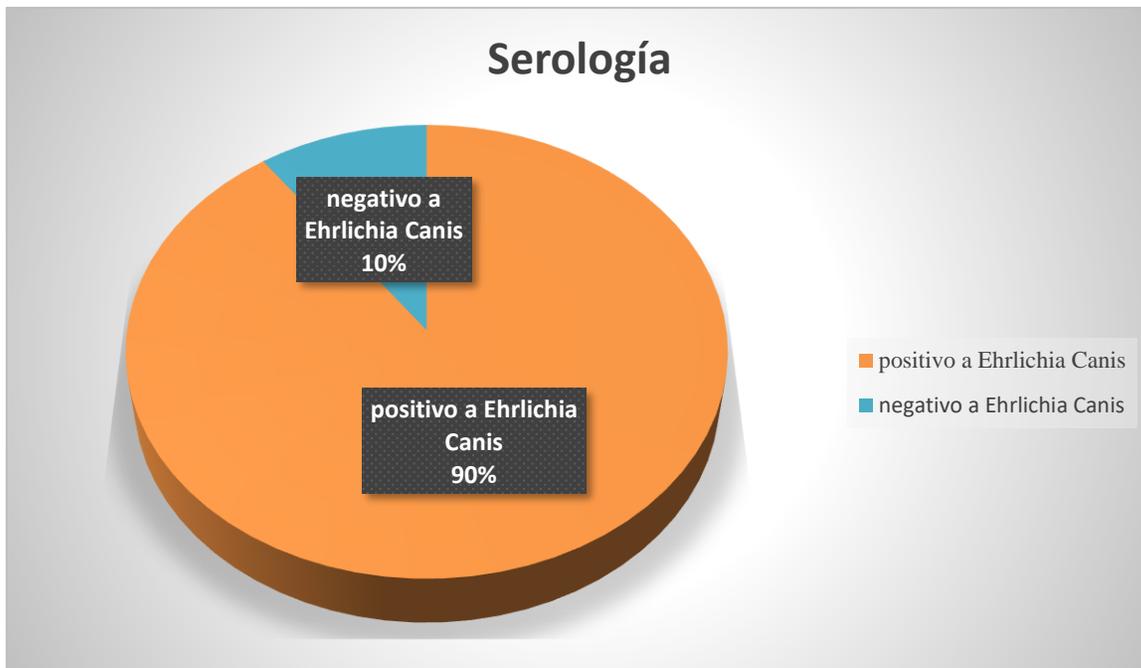
Tabla 2. Resultados de los pacientes de las tres técnicas.

En la gráfica 2. se demuestra los resultados obtenidos en la elaboración de frotis sanguíneos teñidos con tinción Diff Quick, donde 12 pacientes equivalente al 60% se observaron con Ehrlichia spp y 8 pacientes equivalente al 40% en frotis sanguíneo no se observó el hemoparásitos en extendido de sangre periférica.



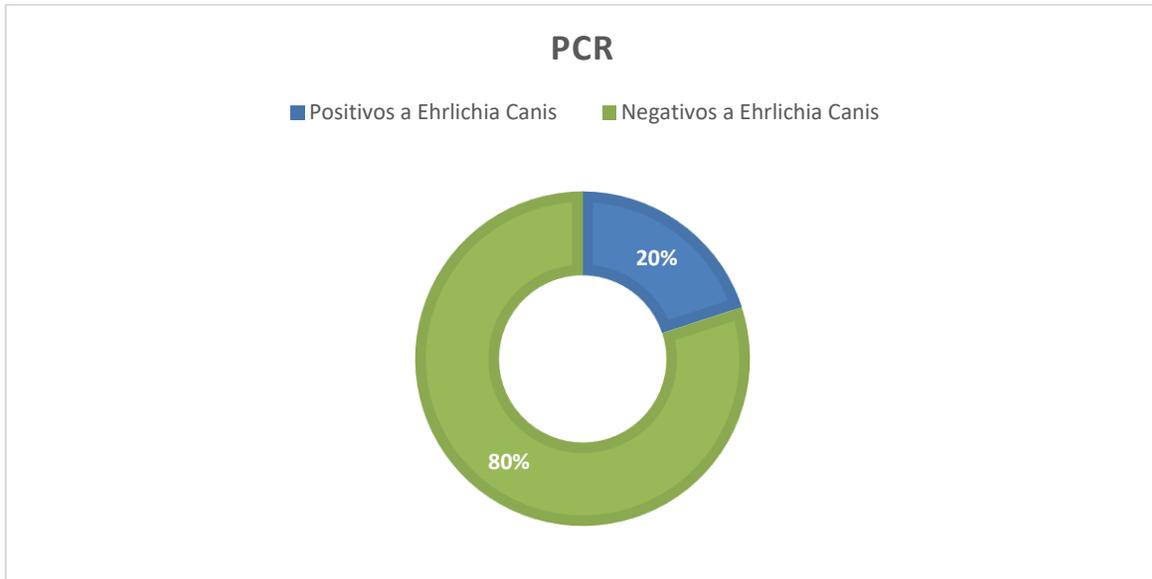
Gráfica 2. Resultado de frotis sanguíneo

En la gráfica 3, se demuestra la cantidad de muestras procesada con serología de Ehrlichia canis (Uranotest-Ehrlichia URANO® VET) de lo cual 18 pacientes que equivalen el 90% de total resultaron positivo a la prueba y tan solo 2 pacientes equivalente al 10 % tuvieron un resultado negativo, dicha muestra fueron recolectadas con tubos vacutainer sin anticoagulante (suero).



Gráfica 3. Resultados obtenidos de serología Ehrlichia Canis.

En la gráfica 4. se representa los resultados que se obtuvieron al realizar la técnica de PCR a los 20 paciente donde 4 pacientes equivalente al 20% resultaron positivos a *Ehrlichia canis* y 16 pacientes equivalente al 80% resultaron negativos a *Ehrlichia canis*.



Gráfica 4. Resultados obtenidos del PCR *Ehrlichia canis*.

Tratamiento	Suma (Ranks)	Media (Ranks)	Población		
PCR <i>Ehrlichia canis</i>	31.00	1.55	20	A	
Frotis sanguíneo	41.50	2.08	20		B
Serología <i>Ehrlichia canis</i>	47.50	2.38	20		B

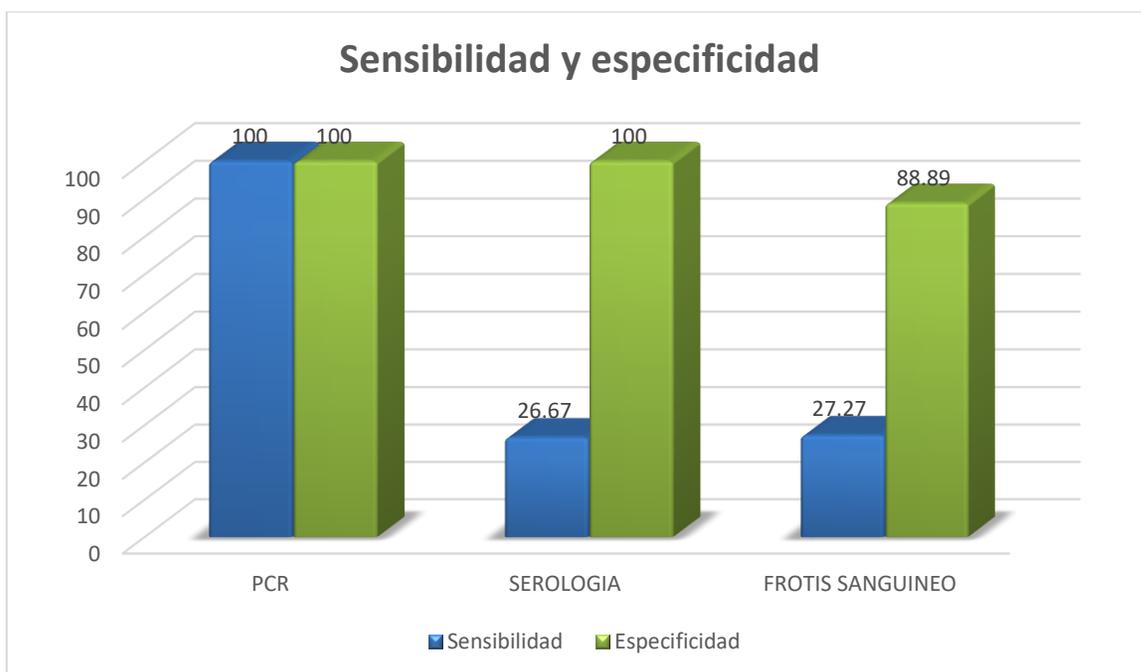
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.050$)

Tabla 3. Prueba de Friedman

Variables	Nº de pacientes	Media
PCR <i>Ehrlichia Canis</i>	20	0.20
Frotis sanguíneo	20	0.55
Serología <i>Ehrlichia Canis</i>	20	0.75

Tabla 4. Media de varianza

Según la prueba de Friedman, (ver tabla 3.) es una prueba de análisis no paramétrico, donde nos ayuda a comparar los tratamientos y deduce que entre frotis sanguíneo y serología de *Ehrlichia canis* no son significativamente diferente para detectar la presencia del agente causal, en comparación con PCR de *Ehrlichia Canis* que poseen una diferencia significativa con las otras pruebas antes mencionada. Donde es confirmada por la media de varianza (ver tabla 4) por tal razón tomamos a la técnica de PCR como una técnica confiable (verdadera).



Grafica 5 Sensibilidad y especificidad de las técnicas

Se propone la técnica de PCR, como un método altamente sensible y específico, que ofrece hasta un 100% de seguridad en el diagnóstico de muchas enfermedades, ya que detecta y amplifica el ADN de *Ehrlichia Canis* (Lina María Carrillo Bonilla, y otros, 2012). Denominaremos al PCR como Gold Standard donde interpretaremos más a fondo las técnicas de serología de *Ehrlichia Canis* y Frotis sanguíneos, en la cual la serología según la gráfica 5 tiene una sensibilidad de 26.67 % y el frotis sanguíneo un 27.27 % esto quiere decir que es más probable detectar hemoparásitos en frotis que en serología; mientras que serología tiene una especificidad de 100% y el frotis un 88.89 % indicándonos que es más probable detectar *Ehrlichia Canis* en fase crónica por serología que en frotis, debido a que la serología detecta los anticuerpos anti *Ehrlichia Canis*, mientras que la técnica de frotis sanguíneo localiza las células parasitadas.

Técnicas	Caso 1	Caso 2	Caso 3	Caso 4	Caso 5
PCR	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
Serología	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
Frotis	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
INTERPRETACION	<p>FS: Hemoparásitos visibles en células</p> <p>SS: Suficiente tiempo para que el sistema inmunitario del paciente produjera anticuerpos detectables en la serología (en etapa crónica)</p> <p>PCR: Presencia del organismo unicelular de <i>Ehrlichia Canis</i> para su detección con PCR (etapa aguda a causa de una reinfección)</p>	<p>FS: No se observó hemoparásitos en frotis sanguíneo debido a la densidad parasitaria.</p> <p>SS: Serología positivo por que el paciente está cursando por una etapa crónica.</p> <p>PCR: Positivo a PCR a causa de una reinfección o puede haber partículas de ADN detectables en PCR</p>	<p>FS: No se observó hemoparásitos en frotis sanguíneo debido a la densidad parasitaria.</p> <p>SS: Se observa negativo cuando el animal está cursando una fase aguda y no ha producido anticuerpos específicos IgG (como en Fase crónica).</p> <p>PCR: Presencia del organismo unicelular de <i>Ehrlichia canis</i> para su detección con PCR</p>		<p>FS: Positivo cuando se observa formaciones morulares o puntos de inclusión asociada a <i>Ehrlichia</i> spp.</p> <p>SS: Negativo donde el animal está cursando una etapa aguda no hay una cantidad de anticuerpos necesarios para su detección.</p> <p>PCR: Negativo porque es altamente específico a <i>Ehrlichia canis</i>.</p>

FS: Frotis sanguíneo.

SS: Serología de *Ehrlichia canis*

PCR: (Reacción en cadena de polimerasa)

Tabla 5. Interpretación de los resultados.

V. CONCLUSIONES

- ✓ Las técnicas PCR, Serología y Frotis Sanguíneo juegan un papel importante para el diagnóstico de la enfermedad ya que nos permite identificar no solamente el hemoparasitos sino también que nos permite determinar la fase de la enfermedad que está cursando el paciente.
- ✓ Se aplicó PCR como técnica de identificación de *Ehrlichia Canis* donde nos permitió verificar la presencia del hemoparasitos en animales con sintomatologías
- ✓ Utilizamos PCR como prueba Gold Standard ya que como refiere la literatura tiene una alta sensibilidad y especificidad para la identificación de *Ehrlichia Canis* debido a que tiene la capacidad de amplificar pequeñas cantidades de ADN. Comprobando así el diagnóstico definitivo de la enfermedad
- ✓ Existe una relación en cuanto a los resultados obtenido en cada una de las pruebas pero no interpretación ya que cada técnica tiene un análisis diferenciado.

VI. RECOMENDACIONES

- Incentivar a la población por medio de propagandas la realización de exámenes complementario para mantener el bienestar de las mascotas.
- Promover a través de charlas el uso de PCR para el diagnóstico de la Ehrlichiosis canina a clínicas veterinaria para dar un mejor tratamiento a pacientes que muestren la sintomatología de la enfermedad.
- Promover a los estudiantes de la carrera de medicina veterinaria el uso y la buena interpretación de los exámenes complementarios como herramienta para el diagnóstico y tratamiento de la Ehrlichiosis canina.
- Evaluar prevalencia de Ehrlichiosis canina por técnica de PCR con el fin de aportar datos confiables de la enfermedad en caninos neonatos y de razas siberianas.

VII. LITERATURA CITADA

- Villiers Elizabeth, Blackwood Laura . (2013). Manual de diagnostico de laboratorio en pequeños animales. En L. B. Elizabeth Villiers, *Manual de diagnostico de laboratorio en pequeños animales* (págs. 26-28). Barcelona: lexus.
- Almao, Maria; Garcia, Martha; Mujica, Roberto. (Enero-Junio de 2013). *Revista Colegio de Medicos Veterinario del Estado Lara*. Recuperado el 16 de 01 de 2017, de revistacmvl.jimdo.com/suscripci%C3%B3n/volumen-5/ehrlichia-canis/
- IVAMI. (22 de Septiembre de 2015). *Instituto Valenciano de Microbiologia*. Recuperado el 16 de 01 de 2017, de IVAMI: www.ivami.com/microbiologia-veterinaria-molecular/422-ehrlichia-canis
- JORDI GINÉ, XAVIER ROURA, ANGEL SAINZ RODRÍGUEZ, MARIA LUISA SUÁREZ REY, OSCAR CORTADELLAS, MARIA DOLORES TABAR, . (2012). *Actualización de diagnostico y control de enfermedades infecciosas en perros y gatos*. Barcelona: Idexx Laboratories.
- José Díaz Novás, Bárbara Gallego Machado y Aracelys León González. (2006). *El diagnostico medico: Bases y procedimientos*. Cuba: Rev Cubana Med Gen Integr.
- Josep Font, Jordi Cairó, Antoni Callés. (1988). Ehrlichia canis. *Revista de AVEPA*, 141-148. Recuperado el 20 de 01 de 2017, de Ehrlichiosis canina.
- lab., M. (2010). *Ehrlichiosis canina*. Buenos aires: Argentina.
- lab., M. (2010). *Ehrlichiosis canina*. Buenos aires: Argentina.
- León, Avelina [1]; Demedio, Jorge [2]; Márquez, Mario [2]; Castillo, Elio [2]; Perera, Anayram [3]; Zuaznaba, Oliver [3]; Canbal, Javier [3]; Gonzalez, Barbara [1]; Reynaldo, Lázaro Vega, Natan [2]; Blanco, Diuris [1]; Ronda, Marisel [1]; Peña Amelia [1] . (5 de Mayo de 2008). *RECVET*. Recuperado el 20 de 01 de 2017, de Revista electronica de clinicos veterinarios: www.veterinario.org
- Lina María Carrillo Bonilla, M. M., Sara Betancur Cardona, M., Daniel Roldán Cardona, M. J., Daniel Galeano Rivera, M., Érica Tatiana Loaiza Echeverri, M. M., & Echeverri, C. A. (2012). Implementación de un método basado en PCR, para el diagnóstico de. *Grupo de Investigación VERICEL*, 9.

- Marcelo B. Labruna, Ph.D, Salim Mattar V, Ph.D, Santiago Nava, Ph.D, Sergio Bermudez, M.Sc, Jose M. Venzal, Ph.D, Gaby Dolz, Ph.D, Katia Abarca, M.D, Luis Romero, M.Sc, Rita de Sousa, Ph.D, Jose Oteo, M.D, Jorge Zavala-Castro, Ph.D. . (2011). *Rickettsiosis in latin american, caribbean, spain and portugal*. Cordoba: Rev.MVZ Córdoba.
- Múrcia, D. B. (25 de Junio de 2012). *Citología y patología Veterinaria*. Recuperado el 18 de 01 de 2017, de Blog de citología y anatomia patologica veterinaria de Daniel Borrás: patolvet.wordpress.com/tag/diffquick/
- oficial, B. v. (8 de Diciembre de 2016). *Servicio Agrícola y Ganadera*. Recuperado el 16 de 01 de 2017, de SAG: www.sag.cl/ambitos-de-accion/bienestar-animal
- Romy Weinborn, Ignacio Toro, Michel Leporati, Daniela Castillo. (2012). *Hallazgo serologico de Ehrlichia spp. en caninos en la ciudad de Talca, Chile*. Talca: Universidad de Santo Tomas Talca.
- Tercero Daniela, (2016), *Manual de toma, conservación y Envío de muestras representativas al laboratorio de diagnósticos veterinarios*, Universidad Nacional Agraria (UNA), Managua, Nicaragua
- Villiers Elizabeth, Blackwood Laura . (2013). Manual de diagnostico de laboratorio en pequeños animales. En L. B. Elizabeth Villiers, *Manual de diagnostico de laboratorio en pequeños animales* (págs. 26-28). Barcelona: lexus.

VIII. ANEXOS

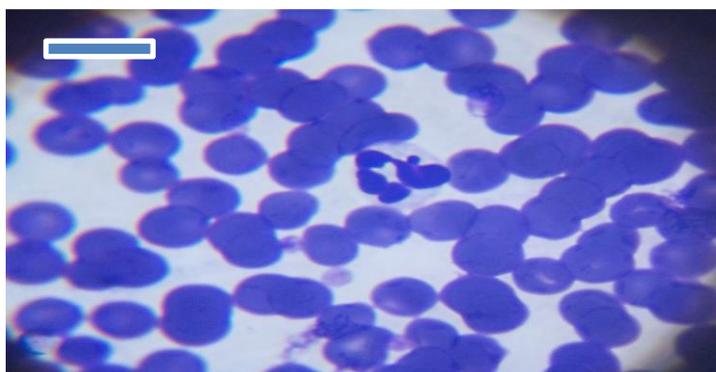
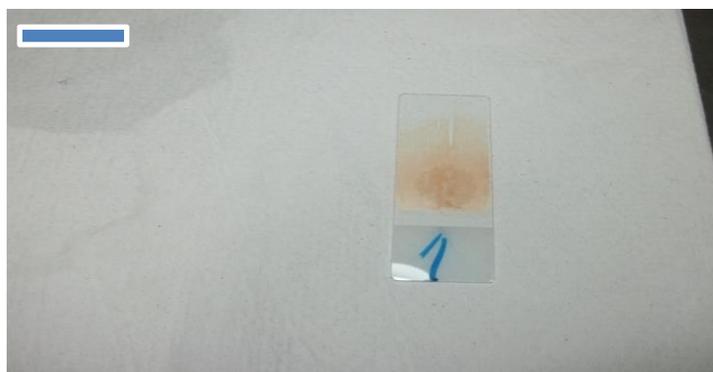
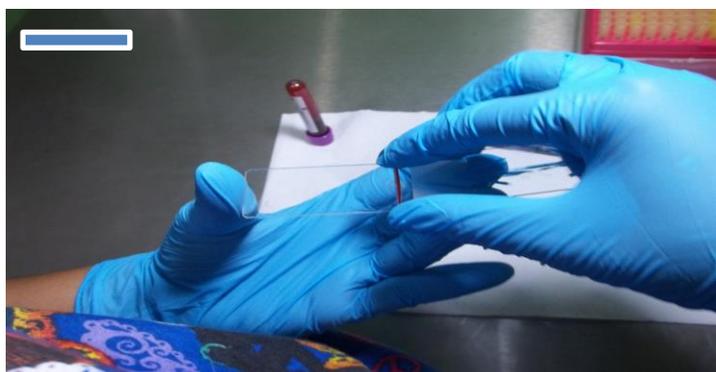
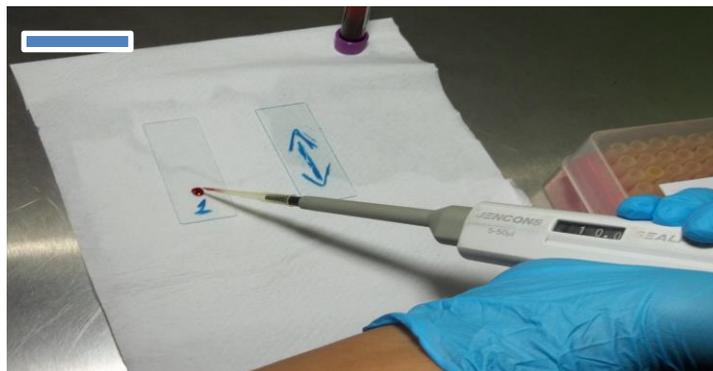
Anexo 1. Recolección de los datos y triada clínica.



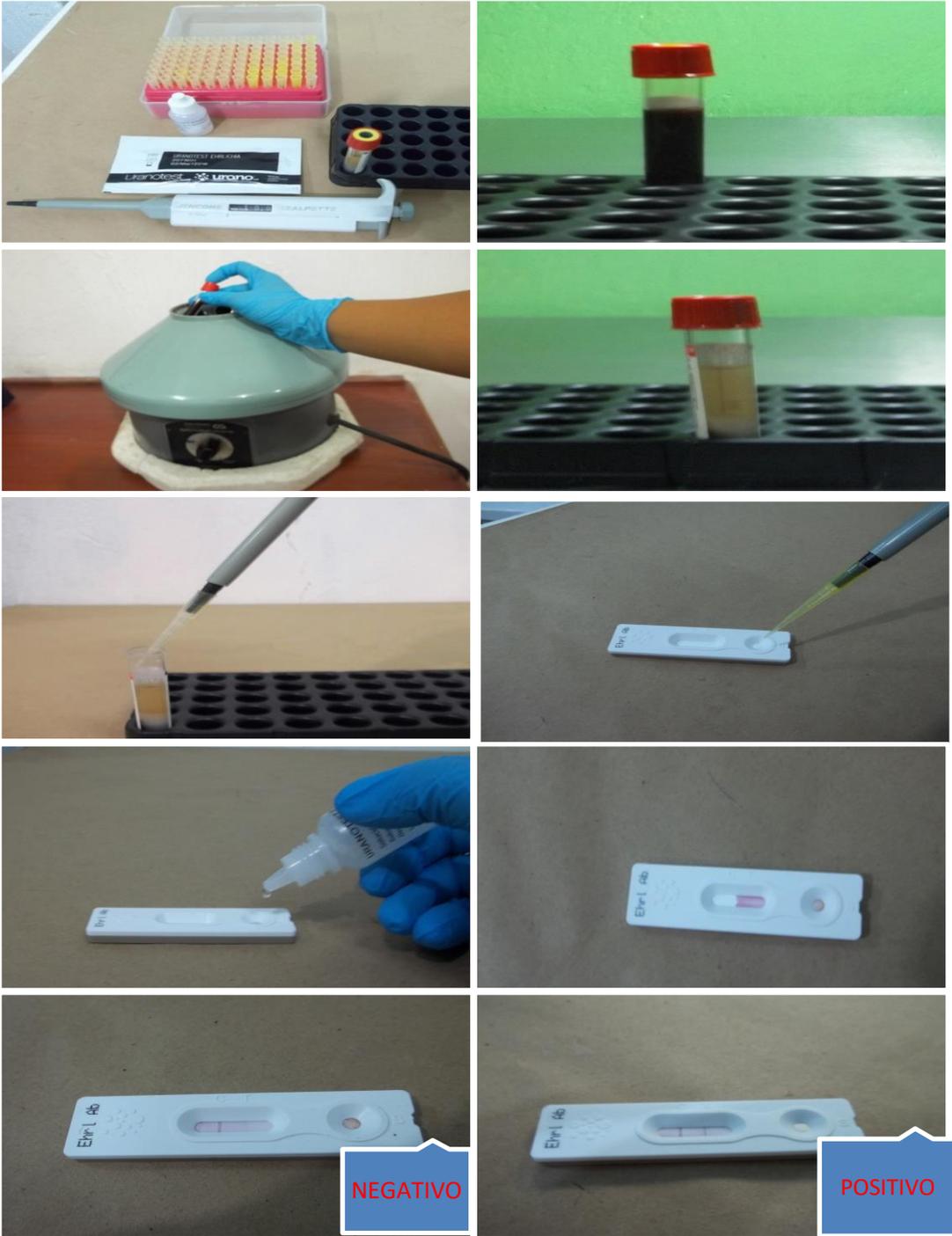
Anexo 2. Toma de muestra de los veinte caninos.



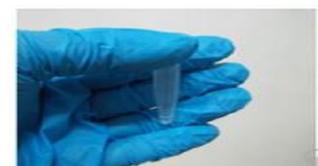
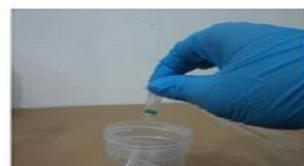
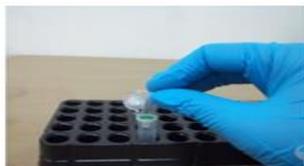
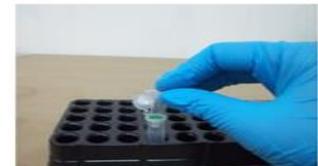
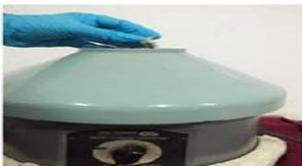
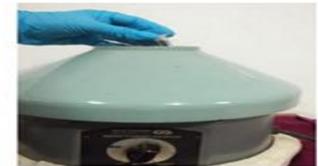
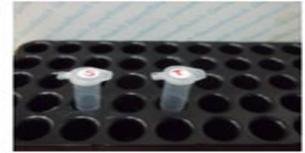
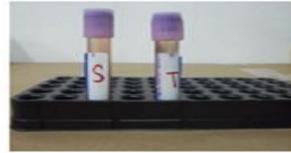
Anexo 3 Realización del frotis sanguíneo y tinción Diff quick



Anexo 4. Procedimiento prueba Inmunocromatografica.



Anexo 5. Procedimiento premezcla PCR



Anexo 6. Procedimiento amplificación PCR



Anexo 7. Formato hoja clínica



DIVISION VETERINARIA

HOJA CLINICA

Nº de paciente: _____

fecha recepción: _____

Datos del paciente

Nombre de la mascota: _____

Edad: _____

Raza: _____

Sexo: _____

Especie: _____

Medico veterinario: _____

Tº: _____

FR: _____

FC: _____

Nombre del dueño: _____

Teléfono: _____

E-mail: _____

Sintomas: _____

Exámenes Anteriores: _____

Anexo 8. Formato remisión de exámenes División Veterinaria.



DIVISION VETERINARIA- LABORATORIO CLINICO
HOJA DE REMISION DE EXAMENES

Propietario:	<input type="text"/>	Edad:	<input type="text"/>
Nombre animal:	<input type="text"/>	Sexo:	<input type="text"/>
E-mail / Teléfono:	<input type="text"/>	Especie:	<input type="text"/>
Centro veterinario / Dr. Dra.:	<input type="text"/>	Raza:	<input type="text"/>

Historial relacionado y sospecha clínica:

HEMATOLOGÍA

- Hemograma
- BHC
- Plaquetas
- Extendido Periférico
- Hemoglobina
- Hematocrito
- VSG
- Reticulocitos
- Hemoparásito (Especies menores)
- Hemoparásito (Especies mayores)

BIOQUÍMICA

- ALT (GPT) AST (GOT)
- Bilirrubina Total y Fraccionada
- Creatinina
- Fosfatasa alcalina
- Glucosa

ORINA

- Proteinuria
- Glucosuria
- Urianálisis (EGO)

SEROLOGIA CANINA

- Parvovirus-Coronavirus (Ag)*
- Ehrlichia canis*
- Prueba de gestación
- Proteína C Reactiva

PARASITOLOGÍA

- Parasitológico heces flotación
- Examen general de heces (EGH)
- Conteo de huevos
- Citología Fecal
- Sangre oculta en heces

MICROBIOLOGIA

- Tinción GRAM
- Tinción Ziellh-Neelsen
- Urocultivo
- Coprocultivo
- Cultivo ótico
- Hemocultivo
- Cultivo para dermatofitos
- Cultivo de.....

OTROS

- Tipo y Rh
- Coombs directo
- Coombs Indirecto
- Prueba de compatibilidad sanguínea
- Raspado de piel (Ectoparásitos)
- KOH para hongos
- Otros.....

Anexo 9. Triada clínica realizada a los veintes pacientes.

Variables Fisiologicas						
Variables	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4	Paciente 5	Parametros de referencia
Temperatura °c	38	38.7	39.2	39	37.7	38.5-39.5
Frecuencia cardiaca	114	116	108	115	112	110-120
Frecuencia respiratorio	25	29	25	34	40	10-30

Variables Fisiologicas						
Variables	Paciente 6	Paciente 7	Paciente 8	Paciente 9	Paciente 10	Parametros de referencia
Temperatura °c	39.5	38.1	39.7	37.9	38.8	38.5-39.5
Frecuencia cardiaca	115	112	118	130	100	110-120
Frecuencia respiratorio	34	18	28	36	28	10-30

Variables Fisiologicas						
Variables	Paciente 11	Paciente 12	Paciente 13	Paciente 14	Paciente 15	Parametros de referencia
Temperatura °c	38.6	38.2	39.6	38.6	38	38.5-39.5
Frecuencia cardiaca	115	110	112	130	112	110-120
Frecuencia respiratorio	28	20	28	31	25	10-30

Variables Fisiologicas						
Variables	Paciente 16	Paciente 17	Paciente 18	Paciente 19	Paciente 20	Parametros de referencia
Temperatura °c	39.1	38.4	38.3	38.7	37.8	38.5-39.5
Frecuencia cardiaca	100	109	104	110	89	110-120
Frecuencia respiratorio	18	23	27	26	14	10-30

Anexo 10. Resultados de Biometría Hemática Completa (BHC).

	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4	Paciente 5	Valores de referencia
Leucocitos (mm³)	7,350	10,650	8,950	45,750	7,250	6,000-12,000
Hematocrito (%)	46	46	22	26	47	Cachorros: 22,2-42,0 Adultos: 37,0-55,0
Hemoglobina (gr/dl)	15,3	15,3	7,3	8,7	15,7	Cachorros: 7,4-14,9 Adultos: 12,0-18,0
Eritrocitos	4,830,000	4,830,000	2,310,000	2,730,000	4,935,000	Cachorro: 3,300-6,300 Adultos: 5,500-8,500
Segmentados (%)	62	54	54	89	80	60.0-77.0
Linfocitos (%)	34	37	41	06	15	12.0-30.0
Monocitos (%)	04	09	05	05	05	3,0-10,0
Eosinofilos (%)	00	00	00	00	00	2.0-10.0
Basofilos (%)	00	00	00	00	00	0,0-1,0
Neutrofilos en banda (%)	00	00	00	00	00	0,0-1,0
Plaquetas (mm³)	349,000	429,000	85,000	402,000	107,000	200,000-500,000

	Paciente 6	Paciente 7	Paciente 8	Paciente 9	Paciente 10	Valores de referencia
Leucocitos (mm³)	12,650	11,900	7,350	1,900	13,750	6,000-12,000
Hematocrito (%)	40	23	46	9	42	Cachorros: 22,2-42,0 Adultos: 37,0-55,0
Hemoglobina (gr/dl)	13,3	7,7	15,3	3,0	14,0	Cachorros: 7,4-14,9 Adultos: 12,0-18,0
Eritrocitos	4,200,000	2,415,000	4,830,000	945,000	4,410,000	Cachorro: 3,300- 6,300 Adultos: 5,500-8,500
Segmentados (%)	61	73	63	49	58	60.0-77.0
Linfocitos (%)	31	12	32	42	40	12.0-30.0
Monocitos (%)	08	05	05	09	02	3,0-10,0
Eosinofilos (%)	00	05	00	00	00	2.0-10.0
Basofilos (%)	00	00	00	00	00	0,0-1,0
Neutrofilos en banda (%)	00	05	00	00	00	0,0-1,0
Plaquetas (mm³)	119,000	178,000	142,000	121,000	193,000	200,000-500,000

	Paciente 11	Paciente 12	Paciente 13	Paciente 14	Paciente 15	Valores de referencia
Leucocitos (mm³)	14,950	17,450	12,300	12,650	23,450	6,000-12,000
Hematocrito (%)	7	22	25	32	24	Cachorros: 22,2-42,0 Adultos: 37,0-55,0
Hemoglobina (gr/dl)	2,3	7,3	8,3	10,7	8,0	Cachorros: 7,4-14,9 Adultos: 12,0-18,0
Eritrocitos	735,000	2,310,000	2,625,000	3,360,000	2,520,000	Cachorro: 3,300-6,300 Adultos: 5,500-8,500
Segmentados (%)	55	64	85	61	81	60.0-77.0
Linfocitos (%)	11	30	10	32	16	12.0-30.0
Monocitos (%)	20	06	05	07	03	3,0-10,0
Eosinofilos (%)	00	00	00	00	00	2,0-10,0
Basofilos (%)	00	00	00	00	00	0,0-1,0
Neutrofilos en banda (%)	14	00	00	00	00	0,0-1,0
Plaquetas (mm³)	297,000	552,000	253,000	189,000	226,000	200,000-500,000

	Paciente 16	Paciente 17	Paciente 18	Paciente 19	Paciente 20	Valores de referencia
Leucocitos (mm³)	25,350	18,250	6,850	21,800	29,100	6,000-12,000
Hematocrito (%)	31	47	27	20	26	Cachorros: 22,2-42,0 Adultos: 37,0-55,0
Hemoglobina (gr/dl)	10,3	15,7	9,0	6,7	8,7	Cachorros: 7,4-14,9 Adultos: 12,0-18,0
Eritrocitos	3,255,000	4,935,000	2,835,000	2,100,000	2,730,000	Cachorro: 3,300-6,300 Adultos: 5,500-8,500
Segmentados (%)	68	62	64	80	82	60.0-77.0
Linfocitos (%)	26	33	26	14	14	12.0-30.0
Monocitos (%)	06	05	10	06	02	3,0-10,0
Eosinofilos (%)	00	00	00	00	01	2,0-10,0
Basofilos (%)	00	00	00	00	00	0,0-1,0
Neutrofilos en banda (%)	00	00	00	00	01	0,0-1,0
Plaquetas (mm³)	316,000	268,000	188,000	201,000	109,000	200,000-500,000

