

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**  
**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA**



**SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA TÉCNICA DE  
FROTIS SANGUÍNEO FRENTE A CAPA LEUCOCITARIA EN  
EL HALLAZGO DE *Hepatozoon sp.* Y *Ehrlichia sp.* EN  
CANINOS DE LA CIUDAD DE TRUJILLO- 2016**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de  
**MÉDICO VETERINARIO**

Presentada por la Bachiller  
**KATHERINE BRIGETT ALVA DÍAZ**

Asesor  
**Dr. TEÓFILO SEVERINO TORREL PAJARES**

**Cajamarca – Perú**  
**2018**



## **ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**

En Cajamarca, siendo las once horas y diez minutos de la mañana del treinta y uno de agosto del dos mil diecisiete, se reunieron en el Auditorio de la Facultad de Ciencias Veterinarias “**César Bazán Vásquez**” de la Universidad Nacional de Cajamarca, los integrantes del Jurado Calificador, designados por el Consejo de Facultad, con el objeto de evaluar la sustentación de Tesis Titulada: “**SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DE LA TÉCNICA DE FROTIS SANGUÍNEO FRENTE A CAPA LEUCOCITARIA EN EL HALLAZGO DE *Hepatozoon sp.* y *Ehrlichia sp.* EN CANINOS DE LA CIUDAD DE TRUJILLO-2016**”, asesorada por: Dr. Teófilo Severino Torrel Pajares y presentada por la Bachiller en Medicina Veterinaria: **KATHERINE BRIGETT ALVA DÍAZ**.

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

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

Después de realizar la calificación de acuerdo a las pautas de evaluación señaladas en el Reglamento de Tesis, el Jurado Calificador acordó: **APROBAR** la sustentación de Tesis para optar el Título Profesional de **MÉDICO VETERINARIO**, con el Calificativo Final obtenido de **DIECISÉIS ( 16 )**.

Siendo las doce horas y diez minutos del mismo día, el Presidente del Jurado Calificador dio por concluido el proceso de sustentación.

**Dr. ABEL MELCHOR GARCÍA BAZÁN**  
**PRESIDENTE**

**Mg. M.V. FERNANDO ALBERTO OBLITAS GUAYÁN**  
**SECRETARIO**

**M.Cs. M.V. JUAN DE DIOS ROJAS MONCADA**  
**VOCAL**

**Dr. TEÓFILO SEVERINO TORREL PAJARES**  
**ASESOR**

## **DEDICATORIA**

Este trabajo está dedicado primero a Dios por su amor infinito. Mi madre Clara Díaz por su confianza, esfuerzo y amor incondicional. Mi padre y mis hermanos: Elena, Wilson, Obet y Ana. Amigos, que los llevo siempre en mi mente y a Joao con todo mi corazón.

**KATHERINE**

## **AGRADECIMIENTO**

A mi familia: mamá, papá, hermanos, sobrinos, primos, tíos por aguantarme tanto y brindarme su confianza y amor en cada paso que doy.

A la familia Paredes Alcántara, por su apoyo y cariño.

A mi gran amigo, compañero y amor Joao, por darme siempre motivos para avanzar y empujarme cuando siento que no puedo seguir.

Al Centro Médico Veterinario San Martín, por la ayuda en la toma de muestras y diagnóstico del presente trabajo.

A mi asesor Dr. Teófilo Severino Torrel Pajares, por su paciencia y apoyo constante.

A cada amigo que me brindo un poco de su tiempo dentro y fuera de la universidad.

A la Universidad Nacional de Cajamarca, a mi querida facultad y docentes por sus enseñanzas.

A mi lugar de trabajo Vet-Spa Alak por entenderme y apoyarme.

Por último y no menos importante: Di', Tina, Michalicha, Ricardo, Popriet', Cochesita y Macuto siempre en mi corazón.

**KATHERINE**

## RESUMEN

La técnica de frotis sanguíneo y capa leucocitaria son técnicas simples para el hallazgo de hemoparásitos intracelulares, en este trabajo se realizó en la ciudad de Trujillo entre los meses de julio y diciembre del 2016, se tomó 95 muestras de sangre de caninos de diferentes edades, sexo y raza. Las muestras fueron tomadas de la vena cefálica para visualizar la presencia de mórulas de *Ehrlichia sp.* y gamontes de *Hepatozoon sp.* Se encontró en frotis sanguíneo una prevalencia de 14.7% y en frotis de capa leucocitaria 31.6% para el diagnóstico de *Ehrlichia sp.* y obteniendo como resultado una especificidad de 96.9% y sensibilidad de 40% de frotis sanguíneo frente a capa leucocitaria; mientras que no se encontró presencia de gamonetes de *Hepatozoon sp.* en el presente estudio.

Palabras clave: *Ehrlichia sp.*, *Hepatozoon sp.*, frotis sanguíneo, frotis de capa leucocitaria.

## ABSTRACT

The technique of blood smear and leukocyte layer are simple techniques for the detection of intracellular hemoparasites, in this work in the city of Trujillo between July and December of the year 2016 the 95 blood samples of canines of different ages were taken, sex and race. The samples were taken from the cephalic vein area to visualize the presence of *Ehrlichia sp.* and gamontes of *Hepatozoon sp.* A prevalence of 14.7% was found in blood smears and 31.6% in the leukocyte layer smears for the diagnosis of *Ehrlichia sp.* and resulting in a specificity of 96.9% and sensitivity of 40% of blood smear against leukocyte layer; while there was no presence of *Hepatozoon sp.* in the present study

Key words: *Ehrlichia sp.*, *Hepatozoon sp.*, Blood smear and leukocyte layer smears.

## ÍNDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTO

RESUMEN

ABSTRACT

CAPÍTULO I .....	1
INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. OBJETIVOS .....	2
CAPÍTULO II .....	3
MARCO TEÓRICO .....	3
2.1. <i>Rhipicephalus sanguineus</i> .....	3
2.2. <i>Hepatozoon</i> .....	5
2.3. <i>Ehrlichia</i> .....	10
2.4. Métodos de diagnóstico.....	17
2.5. Tipos de tinción .....	19
CAPÍTULO III .....	21
MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
3.1. Localización:.....	21
Datos Meteorológicos:.....	21
3.2. Materiales .....	22
Material biológico.....	22
Material y equipo de laboratorio.....	22
3.3. Metodología .....	23

Determinación del número de muestras. ....	23
Selección de los caninos. ....	23
Obtención de la muestra de sangre.....	23
Remisión de muestras al laboratorio.....	25
Identificación de organismos.....	25
Análisis de datos .....	26
CAPÍTULO IV .....	29
RESULTADOS .....	29
Tabla 2: Prevalencia de <i>Ehrlichia sp.</i> y <i>Hepatozoon sp.</i> mediante la técnica de frotis sanguíneo en la ciudad de Trujillo-2016.....	29
Tabla 3: Prevalencia de <i>Ehrlichia sp.</i> y <i>Hepatozoon sp.</i> mediante la técnica de capa leucocitaria en la ciudad de Trujillo-2016. ....	30
Tabla 4. Sensibilidad y Especificidad de la técnica de frotis sanguíneo frente a la técnica de frotis de capa leucocitaria en el diagnóstico de <i>Ehrlichia sp.</i> ....	31
CAPÍTULO V .....	32
DISCUSIÓN.....	32
CAPÍTULO VI .....	34
CONCLUSIONES .....	34
CAPÍTULO VII	
REFERENCIAS.....	35
ANEXO .....	41



# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades parasitarias ocasionadas por organismos intracelulares comparten cuadros similares de sintomatología, el vector y hospedador intermediario más común es el *Rhipicephalus sanguineus* (Rodriguez *et al.*, 2010; Dantas, 2010), este se ha reportado como transmisor de Ehrlichiosis, Hepatozoonosis, Babesiosis, Anaplasmosis, Lyme, inclusive en infecciones mixtas (Rabanal, 2014). La transmisión de Ehrlichiosis y Hepatozoonosis es un problema frecuente y demandante en la actualidad que tiene una alta prevalencia y distribución en las áreas tropicales y subtropicales (Parra y Londoño, 1999).

Debido a la alta susceptibilidad que tienen los caninos de las zonas templadas y tropicales a la infestación por garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* (Waganabe *et al.* 2014), es importante el estudio de nuevas técnicas diagnósticas para el hallazgo y diferenciación de los organismos que transmiten estos vectores. En el caso de *Hepatozoon sp.* no existen casos reportados en caninos en Perú, mientras que en *Ehrlichia sp.* el último estudio de su prevalencia en la ciudad de Trujillo es de 45% (Rabanal, 2014).

Es necesario poder establecer un método de diagnóstico sencillo, barato y que sea sensible para tener un diagnóstico adecuado y como complemento de los hemogramas y kits comerciales que existen. Por ello, este trabajo de investigación busca comparar las técnicas de frotis sanguíneo y frotis de capa leucocitaria para el diagnóstico de *Hepatozoon sp.* y *Ehrlichia sp.*

## 1. OBJETIVOS

### 1.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la sensibilidad y especificidad de la técnica de frotis sanguíneo frente a capa leucocitaria en el hallazgo de *Ehrlichia sp.* y *Hepatozoon sp.* en caninos de la ciudad de Trujillo-2016.

### 1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✦ Determinar la prevalencia de *Ehrlichia sp.* y *Hepatozoon sp.* mediante las técnicas de frotis sanguíneo y capa leucocitaria en caninos de la ciudad de Trujillo-2016.
- ✦ Evaluar la sensibilidad y especificidad de la técnica de frotis sanguíneo frente a la técnica de capa leucocitaria en caninos de la ciudad de Trujillo 2016.

## HIPÓTESIS

La técnica de frotis sanguíneo tiene una sensibilidad de 40% y la especificidad es de 90% frente a la técnica de capa leucocitaria en el diagnóstico de *Hepatozoon sp.* y *Ehrlichia sp.*

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1. *Rhipicephalus sanguineus*

El *Rhipicephalus sanguineus*, es un parásito que se extiende por todo el mundo, se alimenta de la sangre de los mamíferos, con un fuerte tropismo para los perros.

En los perros, puede transmitir patógenos responsables de enfermedades graves: Bacterias como *Ehrlichia canis*, protozoos tales como *Hepatozoon canis*, y helmintos tales como *Cercopithifila riabainae* (Ramos *et al*, 2013; Aguiar *et al.*, 2007; Nordgren y Craig, 1984).

##### 2.1.1. Taxonomía

Phylum:	<i>Anthropoda</i>
Clase:	<i>Arácnida</i>
Subclase:	<i>Euarachnida</i>
Orden:	<i>Acarina</i>
Suborden:	<i>Ixodoidea</i>
Familia:	<i>Ixodidea</i>
Género:	<i>Rhipicephalus</i>
Especie:	<i>Sanguineus</i> (Soulsby, 1987).

### 2.1.2. Ciclo biológico

*Rhipicephalus sanguineus* tiene un ciclo de tres hospederos. En condiciones ambientales ideales, el ciclo se completa en aproximadamente 63 días, pero si el ambiente no es favorable el ciclo se puede prolongar por varios meses, durante los cuales la garrapata permanece oculta en un estado de letargia. Las hembras repletas realizan una puesta aproximadamente de 4000 huevos, luego de un período de pre ovoposición que va desde 3 a 83 días, los huevos los ponen en lugares protegidos de la luz y de la desecación (Cordero *et al.*, 2002).

Los huevos de garrapata eclosionan entre los 8 y 67 días; las larvas pasan por un período de maduración tras el cual están capacitadas para fijarse a un primer huésped para alimentarse. Entre los 3 y 7 días post fijación, la larva se suelta y busca un lugar resguardado donde realizar su primera muda y se vuelven ninfas que aparecen entre los 6 y los 23 días después de la caída de la larva repleta y están preparadas para subir a un segundo huésped para volver a alimentarse. Se alimenta por 4 a 9 días pasados los cuales la ninfa repleta se suelta del huésped, cae al suelo y busca un sitio resguardado para realizar la segunda muda a partir de la cual emergerán los adultos entre los 12-129 días después, ya que las ninfas pueden sobrevivir más de 568 días en espera de un huésped. Los machos y hembras adultos se fijan a un tercer huésped para alimentarse; las hembras sólo se fijan y succionan sangre una vez y caen al suelo, mientras que los machos se alimentan en forma intermitente y persisten más tiempo sobre el hospedador, para que la mayoría de las hembras queden fecundadas. Éstas, una vez alimentadas, caen al suelo y buscan un refugio donde realizar la puesta de huevos y empieza el nuevo ciclo (Chávez, 2014).

### **2.1.3. Hospedadores**

La garrapata *Rhipicephalus sanguineus* afecta principalmente al perro, pero también puede afectar a una gran variedad de mamíferos y aves terrestres; se pueden mencionar a los gatos, venados, bovinos, liebres, cabras, caballos, borregos, leones, aves (avestruz, pavo, garza), reptiles y el hombre. Es importante mencionar que el perro siempre es el huésped definitivo de elección para la garrapata cuando está presente (Rojas, 2001).

## **2.2. Hepatozoon**

Los protozoarios del género *Hepatozoon* están estrechamente relacionados a Plasmodium y Piroplasma (Baneth y Shikap, 2003). Afecta principalmente a leucocitos y órganos hemolinfáticos, la infección comprende entre ser asintomática o subclínica en caninos aparentemente sanos a una potencialmente grave enfermedad que provoca letargo extremo, caquexia, anemia, dolores musculares, anorexia y fiebre (Gondim *et al.*, 1998; Gavazza *et al.*, 2003)

### **2.2.1. Antecedentes de Hepatozoon**

*Hepatozoon canis*, se descubrió por primera vez en India en 1905 y desde entonces se ha difundido por muchos países del mundo (Mancitire, 1999). Ha sido reportada en África, Asia, Francia, Islas del océano Pacífico e Índico y en los Estados Unidos de Norteamérica, donde fue reportado por primera vez en la Costa del Golfo de Texas luego en Luisiana y Oklahoma (Parra y Arraga, 1996). En el norte de Italia de 73 caninos en el primer muestreo solo uno salió positivo en el año 2009, después de verano se obtuvo un 43,9% mediante frotis de capa leucocitaria (Otranto *et al.*, 2011).

Se reportó 17 pacientes en Venezuela atendidos en la policlínica Veterinaria del año 1992 al año 1995, el 5.9% estuvo acompañada de *E. Canis* (Parra y Arraga, 1996), en Colombia se describe la presencia de 3 casos de Hepatozoonosis canina diagnosticados por medio de frotis coloreados con *Wright* o *Hemacolor* (Ardila *et al.*, 2007), también en Argentina se reporta 22 casos de *Hepatozoon* detectados en la ciudad de Mendoza en frotis sanguíneo, sangre obtenida de la vena cefálica fijados con metanol y coloreados con Giemsa y examinados al microscopio óptico a 20x y 100x (Linares, 2011).

### 2.2.2. Taxonomía

Phylum:	Apicomplexo
Clase:	Sporozoa
Subclase:	Coccidea
Orden:	Eucoccididae
Suborden:	Eimerima
Familia:	Haemogregarimadae
Género:	<i>Hepatozoon</i> (Soulsby, 1987)

### 2.2.3. Ciclo Biológico

Las infecciones naturales se adquieren por la ingestión de una garrapata infectada con ooquistes maduros (Craig, 1998).

#### ) En el hospedador invertebrado

En el tubo digestivo del vector, los gamontes son liberados de los leucocitos, se asocian en pares de sicigia y se transforman en gametos. Ocurre así la fusión de los gamontes y el resultado es la formación del cigoto. Este, al poseer movilidad, atraviesa la pared intestinal cayendo a la cavidad hemocélica,

cuando madura, presenta de 30 a 50 esporocistos cada uno, conteniendo cerca de 16 esporozoitos. Se ha demostrado que estos migren a la glándula salival o piezas bucales. Por lo tanto, la transmisión se produce por la ingestión de una garrapata infectada (Linares, 2011). Es importante resaltar que la infección en la garrapata se inicia en el estadio de ninfa y se completa en el adulto, es decir, que posee transmisión transestadial, provocando la transmisión a nuevos hospedadores vertebrados. No se ha comprobado aún que haya transmisión transovárica (Baneth y Shikap, 2003).

### ) **En el hospedador vertebrado**

Una vez ingerida la garrapata infecta un perro o mamífero susceptible, los esporozoitos son liberados de los Ooquistes, penetran la pared intestinal y son transportados (posiblemente dentro de una célula fagocitaria) a los tejidos y órganos. *Hepatozoon canis* difunde a través de la sangre o linfa e infecta principalmente órganos hemolinfáticos como el bazo, ganglios linfáticos y médula ósea, así como hacia otros órganos internos como el hígado, riñones y pulmones. En los tejidos del perro tiene lugar el proceso de merogonia, por el cual se forman los merontes, en los que se produce una división asexual de los merozoitos. Se detectan dos tipos de merontes en los tejidos infectados: Uno conteniendo macromerozoitos (grandes) y otro micromerozoitos (delgados). Los micromerozoitos se liberan de los merontes maduros, invaden los neutrófilos y monocitos, y se transforman en gamontes mediante el proceso de gamontogonia; en cuanto a los macromerozoitos, continúan el ciclo esquizogónico. El ciclo se completa dentro de 81 días, los fagocitos migratorios ingieren a los organismos; circulan hacia otros sitios y continúa su ciclo asexual. Otros pocos

ingresan a los fagocitos circulantes (neutrófilos y monocitos) transformándose en gamontes (Linares, 2011).

#### **2.2.4. Epidemiología**

*Hepatozoon canis* es transmitido principalmente por la garrapata marrón del perro, *Rhipicephalus sanguineus* (Moreno *et al.*, 2001). Esta garrapata se puede encontrar en perros que viven en zonas urbanas y rurales, donde se encuentran dentro de las viviendas del hombre, manteniéndose activas durante todo el año, no solo en regiones tropicales y subtropicales, sino también en zonas templadas (Dantas, 2010). Otras especies se han visto implicadas o sospechosas entre ella *Amblyomma ovale* en Brasil, *Rhipicephalus microplus* en Japón y el género *Haemophysalis* (Linares, 2011).

#### **2.2.5. Hallazgos Clínicos**

Los pacientes infectados con *Hepatozoon canis* generalmente no tienen signos clínicos; ya que el parásito frecuentemente es encontrado en leucocitos de caninos clínicamente sanos, considerando que el hallazgo de gamontes en la circulación sanguínea es ocasional, y atribuyendo eventuales signos clínicos en perros parasitados a otros agentes infecciosos (Baneth y Shikap, 2003), los signos clínicos son muy diversos e inespecíficos, causando desde náuseas, decaimiento, uveítis, cefaleas e inclusive hasta claudicaciones de leves a severas sin motivo aparente (Ettinger, 2003).

Muchas veces *Hepatozoon canis* se encuentra en asociación con otras infecciones especialmente *Ehrlichia* y *Babesia*, como



resultado de esto, los síntomas son aún menos específicos (O' Dwyer *et al.*, 2001).

Se ha observado parasitismo de un mismo neutrófilo, tanto por gamontes de *Hepatozoon canis* como mórula de *Ehrlichia canis* (Penzhorn *et al.*, 1990). Esto se le atribuye a su vector, la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*, la que puede transmitir simultáneamente otros patógenos (Gondim *et al.*, 1998).

### 2.2.6. Diagnóstico

Se basa en la observación directa de extendidos sanguíneos, donde neutrófilos y/o monocitos pueden verse parasitados con los gametocitos de *Hepatozoon*. Los frotis pueden ser coloreados con Wright o Giemsa, adoptando los gametocitos una coloración azul brillante (Moreno y col., 2001), cuerpos ovoides claros con una única mancha basofílica a eosinofílica; estos son lo suficientemente grandes para desplazar el núcleo celular y distorsionar los bordes citoplasmáticos, donde los gametocitos adoptan una coloración azul brillante de forma alargada, rectangulares que miden de 8 a 12  $\mu\text{m}$  (en promedio 11.42  $\mu\text{m}$ ) de largo por 3 a 6  $\mu\text{m}$  (en promedio 5.36  $\mu\text{m}$ ) de ancho, con un área total de 45.88  $\mu\text{m}^2$  y un perímetro promedio de 28.92  $\mu\text{m}$  (Ardila *et al.*, 2007). Algunas veces, la estructura ovoide permanece sin teñir, pero se ve un núcleo de la célula hospedadora (Cowell *et al.*, 2009).

En animales con infección crónica es difícil llegar al diagnóstico; las células afectadas pueden ser sólo una o dos por cada 1000 leucocitos, por lo tanto, el examen del frotis debe realizarse en forma meticulosa para lograr hallarlas (Moreno *et al.*, 2001).

La biopsia muscular también es a menudo útil para establecer el diagnóstico, con el fin de hallar quistes con microesquizontes en desarrollo (Cowell *et al.*, 2009).

### **2.2.7. Tratamiento**

Varias drogas han sido estudiadas para el tratamiento de Hepatozoonosis canina, con resultados contradictorios en relación a su eficiencia. La droga utilizada de rutina es dipropionato de imidocarb, administrada de manera subcutánea o intramuscular a dosis de 5-6 mg/kg cada 14 días utilizado hasta 2 o 3 resultados consecutivos de frotis sanguíneo negativo (Sasanelli *et al.*, 2010).

La eliminación de gamontes de sangre periférica es lenta, requiriendo al menos 8 semanas de tratamiento (Baneth y Shikap, 2003).

También combinar con tetraciclina a dosis de 22 mg/kg cada 8 horas oralmente por 14 días, puede aportar. Es importante un tratamiento sintomático de órganos y tejidos dañados, con protectores hepáticos, glucosa, anti- Inflamatorios no esteroides, etc. (Cordero *et al.*, 2002.).

## **2.3. Ehrlichia**

La *Ehrlichia* afecta especialmente a cánidos, seres humanos y otras especies como équidos y venados. Es producida por bacterias rickettsiales del género *Ehrlichia* (Benavides y Ramires, 2003).

De acuerdo a esta nueva clasificación hay tres enfermedades leucotróficas en perros inducidas por este organismo:

- ) Ehrlichiosis monocítica canina, causada por *E. canis*, *E. chaffeensis*.
- ) Ehrlichiosis granulocítica canina, causada por *E. canis*.
- ) Ehrlichiosis trombocítica canina, también llamada cíclica infecciosa canina y causada por *A. platys* (Ettinger, 2003).

### 2.3.1. Antecedentes

La *Ehrlichia canis* fue identificada por primera vez en 1935 en el Instituto Pasteur de Argelia por Donatien y Lestoquard (Chávez, 2014), en 1971 se describió una ehrlichia granulocítica en perros que años más tarde se denominó *E. ewingii*. Pocos años después se describió un organismo similar a *E. canis*, que parasitaba plaquetas de perros y se denominó *A. platys* (López y col., 1999). La distribución de la Ehrlichiosis canina está relacionada con la distribución del vector *Rhipicephalus sanguineus* y se ha descrito su ocurrencia en cuatro continentes incluyendo Asia, África, Europa y América. En América existe evidencia serológica en: Costa Rica, Estados Unidos de América (EEUU), Chile y México, en Perú, Cuba, Nicaragua, Venezuela, Colombia, Argentina, también en Chile. Habiéndose detectado en Venezuela como agente infeccioso de humanos (Chávez, 2014). En Ecuador, ciudad de Cuenca se reporta una prevalencia de 56.25% de 560 muestras analizadas (Domínguez, 2011), en Guayaquil con un 25% mediante Kits Snap 4 DX (Márquez, 2011). En el año 1998, fue diagnosticada por primera vez la ehrlichiosis canina en Santiago de Chile, en perros provenientes de la comuna de Puente Alto, al sur de Santiago. Desde ese año y hasta la fecha se ha ido incrementando el número de casos en toda la región Metropolitana, constituyéndose en una enfermedad cada vez más común, en los meses de primavera y verano (López *et al.*, 1999).

En Lima, Perú de 63 caninos muestreados se reportó un 8.1% de casos positivos a *Ehrlichia sp.*, mediante coloración Wrigt, también se reportó una asociación de *Ehrlichia sp.* y *Anaplasma spp.* de 13.5% (Paredes, 1994), también en la ciudad de Trujillo en un estudio de 100 caninos se obtuvo una prevalencia de 45% a través del método de frotis sanguíneo (Rabanal, 2014).

### 2.3.2. Taxonomía

Orden:	Rickettsiales
Familia:	Rickettsiaceae
Tribu:	Ehrlichieae
Género:	Ehrlichia.
Especie:	<i>canis</i> (Márquez, 2011).

### 2.3.3. Ciclo biológico

Las células diana de *E. canis* son las células del sistema mononuclear fagocitario (SMF) y más concretamente los monocitos y algunos tipos de linfocitos circulantes. Generalmente hay una sola inclusión por célula, a veces dos o más. Se han observado hasta 14 mórulas en un mismo monocito (Domínguez, 2011). El siguiente paso es el estallido de esta mórula con la dispersión de sus elementos, cuerpos elementales de 0'2 a 0'4 $\mu$  en el medio extracelular infectando a otros monocitos. (Font *et al.*, 1988).

En el interior de estas células donde se desarrolla su ciclo vital a partir de unas formas cocoides o elipsoides que tienen un diámetro aproximado entre 0,5 y 0,9 micras y que reciben el nombre de cuerpos elementales. La entrada del microorganismo

en el interior de la célula parece llevarse a cabo por endocitosis mediada por receptores proteicos existentes en la superficie celular. En las células infectadas la replicación se produce por fisión binaria; a los 3-5 días de post-infección, aparece un pequeño número de cuerpos elementales agrupados, en forma de inclusiones pleomórficas con un tamaño aproximado de 1,4 a 2 micras y que reciben el nombre de cuerpos iniciales. Durante los 7-12 días siguientes continúa el crecimiento y la replicación de estos microorganismos dando lugar a las mórulas (mayores de 2 micras), denominadas así por su típica forma. Las mórulas se encuentran rodeadas por una membrana que engloba un número variable de cuerpos elementales (incluso hasta 40). La destrucción de la célula hospedadora parece que tiene lugar cuando el citoplasma celular se encuentra repleto de microorganismos, lo que trae consigo una liberación de cuerpos elementales que invaden nuevas células. El ciclo de infección completo, desde la invasión de la célula hospedadora hasta la salida de ella, se completa en 12-28 días (Dominguez, 2011).

#### **2.3.4. Epidemiología**

La garrapata parda del perro (*Rhipicephalus sanguineus*) es el vector, también se han reportado: *Amblyomma americanum*, *Ixodes scapularis* y *Dermacentor variabilis* (Benavides y Ramírez, 2003).

#### **2.3.5. Hallazgos Clínicos**

Los signos resultan de implicación de los sistemas hemático y linforreticular, normalmente progresan desde agudos a crónicos, dependiendo de la cepa del microorganismo y del estado inmune

del huésped (Aiello, 2003). El curso de la enfermedad presenta tres fases:

) **Fase aguda:** En esta fase es común encontrar garrapatas en el perro. Los signos clínicos pueden ser leves y no específicos, aunque en algunos casos, pueden ser severos y comprometer la vida (Ramírez, 2001).

Tras el periodo de incubación de 8 a 20 días se inicia dicha fase y dura de 2 a 4 semanas. Se caracteriza por alteraciones hematológicas: trombocitopenia, leucopenia y anemia leve variable. Otras alteraciones que se pueden presentar son la pérdida de peso, anorexia, letargio, hipertermia, (41° C), linfadenomegalia, exudado óculonasal seroso o purulento, hemorragias, disnea. 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 de forma espontánea y se inicia las siguientes fases (Archila, 2007).

) **Fase subclínica:** Puede durar de meses a años. En esta fase el animal recupera el peso perdido y resuelve la hipertermia llegando a tener temperatura corporal normal. En algunos animales puede ser eliminado el parásito, (si su estado inmune es competente). Aunque en la mayoría persiste, instaurándose así la fase crónica (Archila, 2007).

) **Fase crónica:** puede manifestarse como una enfermedad leve con alteraciones hematológicas y de peso irrelevante, o, por el contrario, se pueden generar cuadros con:

- ✓ Trombocitopenia, que den síntomas tales como palidez de mucosas, petequias, equimosis en las mucosas, y/o hemorragias importantes (epixtasis) (Archila, 2007).
- ✓ Nefropatía perdedora de proteínas, da lugar a proteinuria, que en algunos casos puede llevar a hipoalbuminemia lo que explicaría otro síntoma que se puede observar en Ehrlichiosis, edema en la parte ventral del cuerpo (extremidades, escroto) (Archila, 2007).
- ✓ Disnea o tos por el edema intersticial a nivel del pulmón (Archila, 2007).
- ✓ Hepatomegalia, esplenomegalia o linfadenopatía (Archila, 2007).
- ✓ Signos oculares, como otra consecuencia de glomerulonefritis (Archila, 2007).
- ✓ Alteraciones neuromusculares principalmente causadas por meningitis inflamatoria o hemorrágica (Archila, 2007).
- ✓ Cojeras, rigidez en la marcha por depósitos de inmunocomplejos en las articulaciones (Archila, 2007).

### **2.3.6. Diagnóstico**

El diagnóstico de la enfermedad incluye, de forma general, el estudio de la situación epizoótica del área con la demostración de la presencia de garrapata, la observación del cuadro clínico-hematológico y la observación intracitoplasmática de cuerpos de inclusión o mórulas de la rickettsia (León *et al.*, 2008). Se puede ampliar la sensibilidad de esta técnica mediante la realización de frotis de sangre obtenida de capilares del margen de pabellón auricular (Kirk y Bonagura, 1994).

Se presentan las siguientes anomalías:

- ) Anomalías Hematológicas: Trombocitopenia, anemias variable y panleucopenia (Rhea, 2004).
- ) Cambios de la bioquímica sérica: Hiperproteinemia (Rhea, 2004).
- ) Aumento de la alaninotransaminasa y de la fosfatasa alcalina (Rhea, 2004).
- ) Análisis de Orina: Proteinuria, disminución de la densidad específica de la orina, en animales inmunodeprimidos es posible la aparición de infecciones secundarias con bacterianas (Rhea, 2004).
- ) Parámetros de Coagulación anómalos: Prolongación del tiempo de coagulación activado, tiempo de hemorragia prolongado sobre todo a causa de la disfunción de las plaquetas (Rhea, 2004).
- ) Análisis del líquido cefalorraquídeo (LCR): Aumento de proteínas, pleocitosis linfocítica (Rhea, 2004).
- ) Citología de la médula ósea: Líneas celulares híper o hipoplásicas con infiltrados de células plasmáticas (Rhea, 2004).
- ) Artrocentesis: Inflamación neutrofílica (Rhea, 2004).
- ) Identificación del microorganismo: Extensiones de sangre o médula ósea, líquido articular (Rhea, 2004).
- ) Pruebas inmunológicas: Pruebas serológicas (la prueba indirecta de anticuerpos inmunofluorescentes (IFI) es la más efectiva) (Rhea, 2004).
- ) Prueba de Western Immunoblot. 39, pruebas de PCR utilizadas (Rhea, 2004).



### **2.3.7. Tratamiento**

Inicialmente se realiza tratamiento para anemia y/o tendencia hemorrágica resultante de trombocitopenia (solución electrolítica equilibrada o transfusión sanguínea si se la indica). Se utiliza Doxiciclina observándose una mejoría rápida (dentro de las 72 horas del comienzo del tratamiento) del recuento plaquetario en casos agudos (Barr, 2007).

La utilización de dipropionato de imidocarb tiene que ser en dosis elevadas para obtener una respuesta terapéutica satisfactoria. Se ha recomendado la corticoterapia durante la etapa inicial para disminuir la trombocitopenia (Benavides y Ramirez, 2013).

En perros menores a 6 meses de edad se recomienda el uso de cloranfenicol a razón de 15-25 mg por kilo de peso vivo, vía oral o intravenosa cada 8 horas durante 2 semanas (Aiello, 2003).

## **2.4. Métodos de diagnóstico**

Hay varios métodos de preparación de muestras para la detección en sangre de hemoparásitos, pero a continuación solo hablaremos de frotis sanguíneo y capa leucocitaria.

### **2.4.1. Técnica de frotis sanguíneo**

Constituye un examen rutinario, que cuando es debidamente interpretado por el observador tiene una enorme utilidad diagnóstica para el médico.

Para la técnica se coloca una gota de sangre en el portaobjetos, en la superficie a 1 o 1,5 cm del borde esmerilado. Con otra porta objetos limpio y seco se sostiene ligeramente sobre la superficie del primer portaobjetos en un ángulo de 30° y se desliza suavemente hacia la gota de sangre. El portaobjetos extensor se debe colocar en una posición en la que justo contacte, pero no entre, en la gota de sangre. Entonces sin presionar, el portaobjetos extensor se desliza rápida y ligeramente a lo largo de la longitud restante del portaobjetos inferior. Una vez se logra adecuadamente este procedimiento se deja secar (Cowell *et al.*, 2009).

Para el hallazgo de *Ehrlichia sp.* esta técnica es muy utilizada, uno de los primeros estudios fue realizado en España, donde el frotis sanguíneo de 10 casos en caninos, fueron 2 positivos a formaciones intracitoplasmáticas (Font *et al.*, 1988). En Costa Rica de un total de 300 muestras analizadas, en 147 (49,0%) hubo resultados positivos a *E. canis*, utilizando un PCR anidado, mientras que, en 178 (59,3%) fueron reportadas con inclusiones de *E. canis* (Romero *et al.*, 2013). En un estudio realizado en la Habana de los 145 frotis de sangre y diez de leucoconcentración estudiados se detectaron formaciones intracitoplasmáticas en monocitos de 13 animales que representa el 12,03% (León *et al.*, 2008).

Aunque *Hepatozoon sp.* es poco conocido se encontró dos casos positivos, visualizando gamontes en sangre periférica (Cairo *et al.*, 1994), en Colombia se obtuvo 3 casos positivos por frotis con Hemocolor (Ardila *et al.*, 2007), Argentina tuvo 3 casos positivos en frotis sanguíneo en un estudio de 45 caninos (Pardo, 2016).

### 2.4.2. Extensión de capa leucocitaria

Esta técnica no muy difundida, separa la sangre mediante centrifugación: eritrocitos, capa leucocitaria, que contiene leucocitos (células blancas), plaquetas y plasma; para el estudio de células blancas, su sensibilidad es de 98% y sobre su especificidad podría llegar al 100% (Otranto *et al.*, 2011). El procedimiento que se sigue es el siguiente:

Se mezcla con anticoagulante la sangre extraída, para centrifugar a 1500 rpm durante 15 minutos, seguidamente se retira el sobrenadante (plasma) y se extrae una muestra de la capa leucocitaria teniendo cuidado de no mezclar con la capa eritrocitaria se realiza una extensión como la técnica de frotis sanguíneo (Rubio *et al.*, 2012).

Estudios en esta técnica para el hallazgo de *Ehrlichia* sp., se puede usar en casos que a exámenes previos que demuestren leucopenia (Font *et al.*, 1988; León *et al.*, 2008); para *Hepatozoon* sp. en Argentina se obtuvo 8 cosas positivos con esta técnica (Pardo, 2016).

## 2.5. Tipos de tinción

Para tinción de muestras sanguíneas se han utilizado varios tipos de tinciones para las preparaciones citológicas. Los dos tipos de tinción más frecuentes son las tinciones tipo Romanowsky (tinción de Wright, tinción de Giemsa, Diff-Quik) y la tinción de Papanicolaou y sus derivados, como el tricrómico de Sano.

Las tinciones de Papanicolaou y sus derivados necesitan una fijación húmeda de la muestra (es decir, la preparación debe fijarse antes de que las células se hayan secado): En general esto se logra aplicando

un fijador citológico en forma de aerosol o introduciéndola en etanol inmediatamente después de su preparación. En estos procedimientos no son necesarios y, en realidad, no son aconsejables las muestras van a ser teñidas con tinciones de Romanowsky (Cowell y col., 2009).

Las tinciones tipo Romanowsky son baratas, de fácil disponibilidad para el veterinario clínico, tiñen los organismos y los citoplasmas celulares de forma excelente. Aunque con las tinciones tipo Romanowsky el detalle del núcleo y el nucléolo no se percibe tan bien como con las tinciones tipo Papanicolaou, el detalle nuclear y nucleolar apreciado es suficiente para diferenciar entre neoplasia e inflamación (Cowell *et al.*, 2009). Las extensiones que se van a teñir con tinciones tipo Romanowsky, primero se secan al aire para ayudar a adherirse al portaobjetos, de tal forma que no se desprendan durante el proceso de tinción (Cowell *et al.*, 2009). Existen muchas tinciones tipo Romanowsky comercialmente disponibles, incluyendo Diff-Quik, DipStat y otras tinciones de Wright rápidas. La mayor parte de las tinciones Romanowsky, si no todas, son aceptables para teñir preparaciones citológicas. El Diff-Quik no experimenta la reacción metacromática, por lo que los gránulos de ciertos mastocitos no se tiñen. Cuando no se tiñen los gránulos de los mastocitos, dichos mastocitos pueden clasificarse erróneamente como macrófagos o células plasmáticas (Cowell *et al.*, 2009). La tinción defectuosa o de mala calidad es un problema frecuente, debido a varias razones.

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Localización

La parte clínica, toma de muestras y coloración se realizó en la ciudad de Trujillo. La confirmación de la lectura de las muestras recolectadas se realizó en el Laboratorio de Parasitología Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Cajamarca.

#### Datos Meteorológicos<sup>1</sup>:

Altitud:	30 msnm
Latitud:	09°04'15"S
Longitud:	78°35'27"W
Superficie:	1461,44km <sup>2</sup>
Temperatura promedio anual:	19.1 °C
Temperatura mínima promedio anual:	14 °C
Temperatura máxima promedio anual:	32 °C
Precipitación pluvial promedio anual:	40 mm
Humedad relativa:	89%

---

<sup>1</sup> Datos proporcionados por SENAMHI La Libertad – 2015

## 3.2. Materiales

### 3.2.1. Material biológico

Para el presente trabajo se tomaron 95 muestras de sangre de caninos de diferentes razas, edad, sexo; animales infestados con garrapatas o con exposición anterior a las mismas. De los cuales se tomó sangre venosa.

### 3.2.2. Material y equipo de laboratorio <sup>2</sup>

- ) Microscopio Nikon<sup>2</sup>.
- ) Láminas porta objetos<sup>3</sup>.
- ) Agujas hipodérmicas N° 21 x 1.5”<sup>4</sup>.
- ) Alcohol 75° comercial<sup>5</sup>.
- ) Algodón hidrófilo<sup>6</sup>.
- ) Tubos al vacío con EDTA<sup>7</sup>.
- ) Centrífuga<sup>8</sup>.
- ) Guantes de nitrilo<sup>9</sup>.
- ) Colorante de Wright<sup>10</sup>.
- ) Solución Buffer pH 7,2 para hematología<sup>10</sup>.
- ) Agua destilada.
- ) Aceite de inmersión<sup>10</sup>.
- ) Caja porta láminas<sup>3</sup>.

---

<sup>2</sup> Nikon eclipse E200 Halógeno

<sup>3</sup> Sail Brand Co. Ltd. Importado por Droguería importadora La Merced.

<sup>4</sup> Dendi-C®. Fabricado por; Shandong Zibo Shanchuan Medical Instrument Co. Ltda China.

<sup>5</sup> Mifarma; re envasado por Laboratorio Alkofarma E.I.R.L

<sup>6</sup> CFK Industrial S.A - Perú

<sup>7</sup> Vacuette® Greiner Bio-One North América Inc.

<sup>8</sup> Boeco® KG Roedingsmarkt 20459 Hamburg - Germany

<sup>9</sup> Pure Shiled. Fabricado por PERUSAHAAN ASAS SBN BHD, Malasya. Importado por MEDICAL FULL IMPORT S.A.

<sup>10</sup> Merck Millipore®. Fabricado por: Merck KGaA, 64271 Darmstadt. Germany Tel +49(0)6151 72-2440.

### 3.4. Metodología

#### 3.4.1. Determinación del número de muestras

Para la determinación del número de muestras requeridas se utilizó muestreo simple al azar, con un nivel de confianza del 95% (Thursfield, 1991).

El tamaño muestral se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$N = \frac{1.96^2 \cdot P \cdot (1-P)}{d^2}$$

N= Número de muestras requeridas.

1.96= Constante que equivale al nivel de confianza de 95%

d= Precisión deseada (10%)

P= Prevalencia esperada (45%) (Rabanal, 2014)

$$N = \frac{1.96^2 \cdot 0.4 \cdot (1-0.4)}{0.1^2}$$

N= 95 Muestras

#### 3.4.2. Selección de los caninos

Se procedió a tomar la muestra de los animales, cuyos propietarios en la anamnesis manifestaron presencia o hayan presentado garrapatas los últimos tres meses.

#### 3.4.3. Obtención de la muestra de sangre

) Se procedió a sujetar adecuadamente al canino, desinfectar con alcohol de 75° el área donde recorre la vena cefálica antebraquial.

) Seguidamente se colectaron 3 ml de sangre, en un tubo al vacío con anticoagulante EDTA, los cuales se identificaron de manera progresiva.

) De la sangre extraída se realizó el frotis de la siguiente manera:

- ❖ Se colocó en la superficie a 1 o 1,5 cm en uno de los bordes esmerilados una pequeña gota.
- ❖ Con otro porta objetos limpio y seco se sostuvo ligeramente sobre la superficie del primer portaobjetos en un ángulo de 30° y se deslizó suavemente hacia la gota de sangre.
- ❖ El portaobjetos extensor se colocó en una posición en la que justo contacte, pero no entre, en la gota de sangre.
- ❖ Entonces sin presionar, el portaobjetos extensor se deslizó rápida y ligeramente a lo largo de la longitud restante del portaobjetos inferior.
- ❖ Una vez se logró adecuadamente este procedimiento se dejó secar (Cowel *et al.*, 2009).

) Las muestras fueron teñidas con colorante Wright, de la siguiente manera:

- ✦ Se colocó la muestra secada al aire, sobre una rejilla o cubeta.
- ✦ Se cubrió completamente el portaobjetos con el colorante Wright gota a gota, evitando que la tinción se derrame por los bordes.
- ✦ Se dejó el colorante por 4 minutos. Se agregó directamente al colorante un volumen igual de



solución buffer fosfato, esto ayudó a evitar la coloración débil.

- ✦ Se esperó la formación de una capa con brillo metálico.
- ✦ Se dejó actuar por 6 minutos.
- ✦ Se lavó con agua corriente hasta que la muestra tome una coloración rosada (Cowel *et al.*, 2009).

) Seguidamente se realizó lo siguiente:

- El restante de sangre extraída se centrifugó a 1500 rpm durante 15 minutos.
- Posteriormente se retiró el sobrenadante (plasma).
- Se extrajo una muestra de la capa leucocitaria teniendo cuidado de no mezclar con la capa eritrocitaria.
- Se realizó extensión y coloración utilizando la técnica para frotis sanguíneo.

#### **3.4.4. Remisión de muestras al laboratorio**

Los tubos recolectados con las muestras extraídas fueron enviados en envases rígidos de plástico o espuma, envueltos en material protector (p. ej., toalla de papel) y enviados en una caja pequeña resistente (Cowel *et al.*, 2009).

#### **3.4.5. Identificación de organismos**

Para la identificación de los organismos se usó microscopio compuesto con fuente de luz incorporada. Los frotis fueron observados en 400x y 1000x con aceite de inmersión.

### 3.4.6. Análisis de datos

Se colectaron los resultados de las muestras para la técnica de frotis sanguíneo y capa leucocitaria, se sometieron a una estadística analítica comparativa.

#### 3.4.6.1. Análisis de datos

Se reportó el frotis sanguíneo y capa leucocitaria en términos de frecuencias, porcentajes y prueba de chi cuadrado. La sensibilidad, especificidad, Valor predictivo negativo (VPN) y Valor predictivo positivo (VPP) se midieron con las siguientes fórmulas apoyándonos de una tabla de contingencia de 2x2. Las tablas se confeccionaron de acuerdo a los objetivos del trabajo.

- **Especificidad**

La especificidad de una prueba en estudio se refiere a la proporción de individuos clasificados como negativos por el estándar de oro, que se identifiquen correctamente por la prueba en estudio (Cuevas y Alejo, 2010).

- **Sensibilidad**

La sensibilidad de una prueba se puede definir como la proporción de los individuos clasificados como positivos por el estándar de oro, que se identifican correctamente por la prueba en estudio (Cuevas y Alejo, 2010).

Además de la sensibilidad y la especificidad de una prueba, se han desarrollado otros parámetros para poder determinar que tanta validez tiene ésta, al

ser utilizada como prueba diagnóstica. Entre estos parámetros se encuentra el valor predictivo (Cuevas y Alejo, 2010).

- **Valor Predictivo Positivo**

El valor obtenido por la fórmula representa la probabilidad de que alguien con un resultado positivo en estudio tenga la característica de interés (Cuevas y Alejo, 2010).

- **Valor Predictivo Negativo**

Este valor representa la probabilidad de que alguien con un resultado negativo en la prueba en estudio no tenga la característica de interés (Cuevas y Alejo, 2010).

- **Tablas De Contingencia**

Las tablas de contingencia (tablas de doble entrada) son una herramienta fundamental para este tipo de análisis. Están compuestas por filas (horizontales), para la información de una variable y columnas (verticales) para la información de otra variable. Estas filas y columnas delimitan *celdas* donde se vuelcan las frecuencias de cada combinación de las variables analizadas. En su expresión más elemental, las tablas tienen solo 2 filas y 2 columnas (tablas de 2x2) (Cuevas y Alejo, 2010).

**Tabla 1.** Tabla de contingencia 2x2, para análisis estadístico de resultados.

<b>Frotis Sanguíneo</b>	<b>Capa leucocitaria</b>	
	<b>Positivo</b>	<b>Negativo</b>
<b>Positivo</b>	Verdaderos positivos (VP)	Falsos positivos (FP)
<b>Negativo</b>	Falsos negativos (FN)	Verdaderos negativos (VN)

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS

**Tabla 2.** Prevalencia de *Ehrlichia sp.* y *Hepatozoon sp.* mediante la técnica de frotis sanguíneo en la ciudad de Trujillo-2016

	<b>Número de animales muestreados</b>	<b>Número de casos positivos</b>	<b>Prevalencia (%)</b>
<b><i>Ehrlichia sp.</i></b>	95	14	14.7
<b><i>Hepatozoon sp.</i></b>	95	0	0

Los resultados de la Tabla 2, se obtuvieron de 95 muestras de sangre de caninos. Utilizando la técnica de frotis sanguíneo se observan 14 casos positivos para *Ehrlichia sp.* y ningún caso positivo para *Hepatozoon sp.*

**Tabla 3.** Prevalencia de *Ehrlichia sp.* y *Hepatozoon sp.* mediante la técnica de capa leucocitaria en la ciudad de Trujillo-2016.

	<b>Número de animales muestreados</b>	<b>Número de casos positivos</b>	<b>Prevalencia (%)</b>
<b><i>Ehrlichia sp.</i></b>	95	30	31.6
<b><i>Hepatozoon sp.</i></b>	95	0	0

Los resultados de la Tabla 3, se obtuvieron de 95 muestras de sangre de caninos. Utilizando la técnica de capa leucocitaria se observan 30 casos positivos para *Ehrlichia sp.* y ningún caso positivo para *Hepatozoon sp.*

**Tabla 4.** Sensibilidad y Especificidad de la técnica de frotis sanguíneo frente a la técnica de frotis de capa leucocitaria en el diagnóstico de *Ehrlichia sp.*

<b>Parámetros</b>	<b>Número de animales muestreados</b>	<b>Sensibilidad (%)</b>	<b>Especificidad (%)</b>
<b><i>Ehrlichia sp.</i></b>	95	40	96.9

Los resultados obtenidos Tabla 4, de 95 muestras sanguíneas muestran una sensibilidad de 40% y especificidad de 96.9% de técnica frotis sanguíneo frente a capa leucocitaria en el hallazgo de *Ehrlichia sp.*

## CAPÍTULO V

### DISCUSIÓN

En la Tabla 2 y 3, encontramos la prevalencia para *Ehrlichia sp.* de 14.75% a la técnica de frotis sanguíneo y de 31.6% a través de la técnica de capa leucocitaria, porcentajes que son menores comparados con el 45% encontrado en el año 2013 (Rabanal, 2014), las diferencias podrían deberse al lugar donde se tomó la muestra; en el año 2013 las muestras fueron obtenidas de sangre de la región auricular y en el presente trabajo se utilizó sangre de la vena cefálica; esto podría deberse a que las presentaciones intracitoplasmáticas de *Ehrlichia sp.* se encuentran con mayor porcentaje en áreas periféricas (Couto *et al.*, 2008); también podríamos decir que las muestras en el año 2013 fueron obtenidas de caninos que se encontraban en las casas de sus propietarios mientras que en el presente estudio se tomaron muestras de caninos que llegaron a consulta; esta diferencia podría deberse al interés que tuvieron los propietarios que llevaron a sus caninos a consulta; también en el año 2013 se observaron mórulas de *Ehrlichia sp.* en 65% neutrófilos, 16% en monocitos, 14% monocitos con neutrófilos y 5% en plaquetas (Rabanal, 2014); y en este trabajo no se consideraron a las mórulas encontradas en plaquetas debido a que actualmente a estas se las denomina *Anaplasma platys* (Sánchez, 2013).

También en la Tabla 2 y 3, podemos observar que no se encontraron casos positivos a *Hepatozoon sp.*, esto podría deberse a que no se han reportado casos positivos en Perú.



La Tabla 4, muestra para *Ehrlichia sp.* una sensibilidad de frotis sanguíneo frente a capa leucocitaria de 40%, haciendo una comparación con la sensibilidad de la técnica de capa leucocitaria de 98%, el porcentaje diferencial podría deberse a que el presente estudio se identificaron individuos como positivos por la capa leucocitaria pero negativos por la técnica de frotis sanguíneo. Sobre la especificidad de la prueba de frotis sanguíneo frente a capa leucocitaria encontramos un 96.9%, esto considerando la especificidad de capa leucocitaria que podría llegar al 100% nos indica también un correcto diagnóstico de verdaderos negativos a través de esta técnica de frotis sanguíneo (Otranto *et al.*, 2011).

## CAPÍTULO VI

### CONCLUSIONES

En el siguiente trabajo utilizando las técnicas de frotis sanguíneo y frotis de capa leucocitaria con colorante de Wright para el hallazgo de *Hepatozoon sp.* y *Ehrlichia sp.* se llegó a las siguientes conclusiones:

- 6.1. La prevalencia de *Ehrlichia sp.* en la ciudad de Trujillo fue de 14.7% por la técnica de frotis sanguíneo y de 31.6% con la técnica de capa leucocitaria entre el mes de julio del 2016 y diciembre del 2016.
- 6.2. La sensibilidad de la técnica de frotis sanguíneo fue de 40%, porcentaje bajo comparado con el 98% que tiene la técnica de capa leucocitaria.
- 6.3. La especificidad encontrada para la técnica de frotis sanguíneo frente a capa leucocitaria fue de 96.9%, que indica una buena capacidad de detección de sujetos sanos usando la prueba en estudio.
- 6.4. No se ha registrado la presencia de gamontes en el caso de *Hepatozoon sp.* mientras duró este estudio.

## CAPÍTULO VII

### REFERENCIAS

Aiello, S. 2003. Manual Merck de Veterinaria. 5ta edición. Editorial Grupo Océano. Barcelona. España. p. 1037.

Aguiar, D., Cavalcante, G., Pinter, A., Gennari, S., Camargo, L., Labruna, M. 2007. Prevalencia de *Ehrlichia canis* en perros y *Rhipicephalus sanguineus* garrapatas de Brasil. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17294930>. Consultado el 17 de febrero 2016.

Archila, M. 2007. Ehrlichiosis. Enfermedades Parasitarias. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos43/erlichiosis/erlichiosis.shtml>. Consultado el 17 marzo 2016.

Ardila, A., Cala, F., Vargas, G., Arcilla, V. y Castellanos, V. 2007. Reporte de casos clínicos con *Hepatozoon canis* en el Centro Médico Quirúrgico Veterinario de la Universidad Cooperativa de Colombia. REDVET. Revista electrónica de Veterinaria 1695-7504. Volumen VIII Número 5

Baneth, G., Shikap, A. 2003. Monozoic cysts of *Hepatozoon canis*. The Journal of parasitology. Disponible en: [http://www.bioone.org/doi/pdf/10.1645/0022-3395\(2003\)290\[089:5B0379\]3AMCOHC%5D20.CO%3B2](http://www.bioone.org/doi/pdf/10.1645/0022-3395(2003)290[089:5B0379]3AMCOHC%5D20.CO%3B2). Consultado el 17 de enero 2016.

Barr, S. 2007. La consulta veterinaria en 5 minutos. Enfermedades Infecciosas y Parasitología en Caninos y Felinos. Inter-Medica. Buenos Aires Argentina. pp. 133-140; 150-154; 162-164.

Benavides, J. y Ramirez, G. 2003. Ehrlichiosis canina. Vol 16:3. Colombia. pp 268 - 274.

Craig, T. 1998. Hepatozoonosis in Infectious diseases of the dog and cat. 2da edicion. Editorial W.B. Saunders. Philadelphia, Pennsylvania. pp.

Cairo, J., Font, J., Gorraiz, J., Martín, N., Pallisera, M., Pons, C. 1994. Hepatozoonosis canina. Estudio de 8 casos clínicos. Disponible en: <https://ddd.uab.cat/pub/clivetpeqani/11307064v14n1/11307064v14n1p35.pdf> Consultado el 18 de marzo 2017.

Chávez, C. 2014. *Ehrlichia Canis* en caninos y el tratamiento con Doxiciclina. Disponible en: [http://ateneo.unmsm.edu.pe/ateneo/bitstream/123456789/4151/1/Chavez\\_Calderon\\_Cesar\\_Daniel\\_2014.pdf](http://ateneo.unmsm.edu.pe/ateneo/bitstream/123456789/4151/1/Chavez_Calderon_Cesar_Daniel_2014.pdf). Consultado el 11 de marzo 2016.

Cordero, M., Rojo, F., Martínez, A., Sánchez, C., Hernández, S., Navarrete, I., Díez, P., Quiroz, H. y Carvalho, H. 2002. Parasitología Veterinaria. 3ra edición. Editorial McGRAW-HILL. España. pp. 718, 676-718

Couto, G., Nelson, R., Baruch, S., Grauer, G., Hawkins, E., Jhonson, C., Lappin, M., Taylor, S., Ware, W., Willard, M. 2008. Medicina interna de animales pequeños. Segunda edición. Editorial Interamericana. Argentina. 1368p.

Cowell, R., Tyler, R., Meinkoth, J. y DeNicola, D. 2009. Diagnóstico Citológico y Hematológico del perro y el gato. 3ra edición. Editorial ELSEVIER. Barcelona- España. pp.15, 389.

Cuevas, R.C. y Alejo, M.A. 2010. Sensibilidad y especificidad de una prueba. Facultad de psicología – Universidad Nacional Autónoma de México. México. pp.1 – 14.

Dantas Torres F. 2010. Biología y ecología de la garrapata marrón del perro, *Rhipicephalus sanguineus* Parasitology vectorial. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20377860>. Consultado 21 de enero del 2016.

Domínguez, G. 2011. Prevalencia de hemoparásitos en perros de la ciudad de Cuenca Ecuador, PRE. [En línea]. Ecuador. Disponible en: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3024/1/tv1099.pdf>. Consultado el 27 de enero 2016.

Ettinger, S. 2003. Compendio Tratado de Medicina Interna. Enfermedades del perro y del gato. 3era edición. Editorial Intermédica. México. pp 202 – 207, 211.212.

Font, J., Cairo, J. y Callés, A. 1988. Ehrlichiosis en revista AVEPA. Disponible en: [www.ddd.uab.cat/pub/clivetpeqani/11307064](http://www.ddd.uab.cat/pub/clivetpeqani/11307064). Consultado 21 de enero del 2016.

Gavazzo, A., Bizzeti, M. y Papini, R. 2003. Observations on dogs found naturally infected with *Hepatozoon canis* in Italy. *Revue de médecine veterinaire*. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2287008>. Consultado 21 de enero del 2016.

Gondim, L., Kohayagawa, A., Alencar, N., Biondo, A., Takahira, R. y Franco, S. 1998. Canine Hepatozoonosis in Brazil: description of eight naturally occurring cases. *Veterinary Parasitology canin*. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9561717>. Consultado 21 de enero del 2016.

Kirk, R. y Bonagura, J. 1994. *Terapéutica Veterinaria de Pequeños Animales*. Editorial McGraw- Hill-Interamerica. España, Madrid. España. pp. 281-282.

León, A., Demedio, J., Márquez, M., Castillo, E., Perera, A., Zuaznaba, O., Caníbal, J., González, B., Reynaldo, L., Vega, N., Blanco, D., Ronda, M., Peña, A. y Seija, V. 2008. Diagnóstico de Ehrlichiosis en caninos en la ciudad de La Habana. *RECVET*: 2008, Vol. III, Nº 5. p 22.

Linares, M. 2011. Hepatozoonosis canina en la provincia Mendoza, Argentina. Hallazgos clínicos de laboratorio. Tesis. Universidad Juan Agustín Maza. Facultad de Ciencias Veterinarias y Ambientales. Argentina. p 61.

López, J., Castillo, A., Muñoz, M., Hildebrandt, S. 1999. Hallazgo de *Ehrlichia canis* en Chile, informe preliminar. Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0301732X199900020008](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301732X199900020008). Consultado el 20 Febrero 2016.

Mancitire, D. 1999. *Hepatozoon americanum*. Identification of a new species. Department of small animal surgery and medicine, college of veterinary medicine. USA. Disponible en: Document: P0106.o899. ([www.ivis.org](http://www.ivis.org)). Consultado el 17 de Febrero 2016.

Márquez, I. 2011. Diagnóstico de Enfermedades Hemáticas en Caninos en la Ciudad de Milagro Mediante El Uso De Kits Snap 4dx. Guayaquil-Ecuador. p. 72

Moreno, B., Fernández, J., Rodríguez, J., Chacón M. y Fernando R. 2001. Hepatozoonosis Canina. Revista Mexicana innovadora. Disponible en: [http://www.imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?method=showDetail&id\\_articulo=245&id\\_seccion=15&id\\_ejemplar=39&id\\_revista=4](http://www.imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?method=showDetail&id_articulo=245&id_seccion=15&id_ejemplar=39&id_revista=4). Consultado el 02 de Febrero 2016.

Nascimento, R., Alessio, G., Carbonea, D., Baneth, G., Dantas, F. 2014. Occurrence of *Hepatozoon canis* and *Cercopithifilaria bairnei* in an off-host population of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* ticks. Revista Ti k. borne diseases. p 4.

Nordgren, R. y Craig, T. 1984. La transmisión experimental de la cepa de *Hepatozoon canis* en la ciudad de las Tejas. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6542719207-214>. Consultado el 01 de Febrero 2016.

Otranto, D., Dantas, F., Weigl, S., Latrofa, M., Stanneck, D., De Caprariis, D., Capelli, G. y Baneth, G. 2011. Diagnosis of *Hepatozoon canis* in young dogs by cytology PCR. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles /PMC3083373 />. Consultado el 17 de Febrero 2016.

O' Dwyer, L., Massard, C. y Pereira, J. 2001. *Hepatozoon canis* infection associated with dog ticks of rural areas of Rio de Janeiro State, Brazil Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11113545>. Consultado 11 de enero del 2016.

Pacheco, G. y Loza, V. 2013. Determinación de hemoparasitosis en caninos que frecuentan el parque metropolitano de Quito. Universidad de las américas. Facultad de ciencias de la salud. Escuela de medicina veterinaria y zootecnia. Ecuador. pp. 25 – 27, 98

Pardo, D. 2016. Diagnóstico de *Hepatozoon canis* en caninos domésticos de Esperanza, (FCV-UNL) (Santa Fe), Argentina. Disponible en <http://repository.udca.edu.co:8080/jspui/bitstream/11158/587/1/DIAGN%C3%93STICO%20DE%20HEPATOZOON%20CANIS%20EN%20CANINOS%20%281%29.pdf>. Consultado el 4 de agosto 2017.

Paredes, J. 1994. Hemoparasitos en caninos infestados con garrapatas en Comas-Lima, Tesis. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de Cajamarca. Perú. p 14.

Parra, M. y Londoño, J. 1999. "Hemoparásitos", FAO Agrario. Colombia. Disponible en: <http://agris.fao.org/agrissearch/search.do?recordID=CO2001000555>. Consultado el día 23 de Diciembre de 2015.

Parra, O. y Arraga, C. 1996. Hepatozoonosis canina en Venezuela. Revista científica. Vol. VI. N°2. p. 125.

Penzhorn, B. y Lange, A. 1990. *Hepatozoon* and *Ehrlichia* in the same canine neutrophil. Journal of the South African Veterinary Association. Disponible en: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Hepatozoon%20and%20Ehrlichia%20in%20the%20same%20canine%20neutrophil\[all\]&cmd=correc ts p e l l i n g](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Hepatozoon%20and%20Ehrlichia%20in%20the%20same%20canine%20neutrophil[all]&cmd=correc ts p e l l i n g). Consultado 21 de enero del 2016.

Rabanal, L. 2014. Prevalencia de *Ehrlichia sp.*, en caninos infestados con garrapatas (*Rhipicephalus sanguineus*), mediante frotis sanguíneo en la provincia de Trujillo. Tesis. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de Cajamarca. Perú. p 42.

Ramos, R., Giannelli, A., Brianti, E., Annoscia, G., Cantacessi, C. y Danta, M. 2013. *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* frente *Ixodes*. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2377174>. Consultado el 03 de enero 2016.

Ramírez, M. 2001. Otras zoonosis transmitidas por garrapatas: Babesiosis y Ehrlichiosis. España: First Tick-borne Diseases Conference. Disponible en: <http://www.lymefonet.espanol/zoonis.pdf>. Consultado el 03 de enero 2016.

Rhea, V. 2004. Clínica de Pequeños Animales. Trad. Diorki servicios integrales de edición. 4ta edición. España S.A. pg. 424-437.

Rodríguez, R., Gonzalo, M., Aguilar, A. 2000. Hemoparásitos. Disponible en: [www.cicy.mx/sites/biodiversidad/cap5/09%20hemoparasitos](http://www.cicy.mx/sites/biodiversidad/cap5/09%20hemoparasitos). Consultado el 03 de enero 2016.

Romero, L., Dolz, G., Romero, J., Meneses, A., Jimenez, S., Salazar, L. 2013. Evaluación del diagnóstico de *Ehrlichia canis* mediante frotis sanguíneo y técnica molecular en perros de Costa Rica. Disponible en: <http://www.revistas.una.ac.cr/index.php/veterinaria/index>. Consultado el 4 de Abril del 2017.

Rojas, E. 2001. Las garrapatas II. Disponible en: <http://webveterinaria.com/merial/GarrapataII.pdf>. Consultado el 01 de Febrero 2016.

Rubio, F., García, B. y Carrasco, J. 2012. Fundamentos y técnicas de análisis hematológicos y citológicos. Editorial Paraninfo. España pp. 236-238.

Sánchez, J. 2013. Trombocitopenia cíclica en caninos causada por *Anaplasma Platys*. Disponible en: <http://repositorio.uaa.n.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/7267/JORGE%20EDUARDO%20SANCHEZ%20DUE%C3%91AS.pdf?sequence=1>. Consultado el 13 de mayo del 2017.

Sasanelli, M., Paradies, P., Greco, B., Eyal, O., Zaza, V. y Baneth, G. 2010. Failure of imidocarb dipropionate to eliminate *Hepatozoon canis* in naturally infected dogs based on parasitological and molecular evaluation methods. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20444549>. Consultado el 05 de enero 2016.

Soulsby, E. 1987. Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos, 7<sup>o</sup> edición. Editorial Interamericana. México. pp.

Waganabe, M., Okuda, M., Tsuji, M., Inokuma, H. 2014. Seroepidemiological study of canine ehrlichial infections in Yamaguchi prefecture and surrounding areas of Japan. *Vet. Parasit.* Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15350665>. Consultado el 17 de Febrero 2016.



# ANEXO



Fig. 1. Hembra canina con presencia de garrapatas en canino que acudio a consulta.



Fig. 2. Identificación de las muestras extraídas previo al procesamiento de estas.

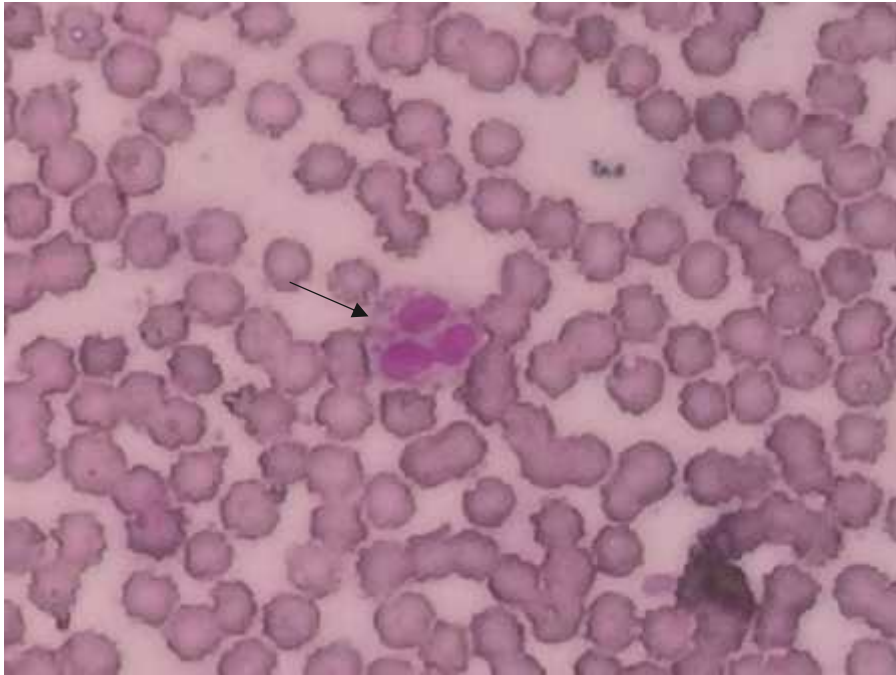


Fig. 3. Presencia intracitoplasmática de múltiples mórulas de *Ehrlichia sp.* en un neutrófilo segmentado, de un paciente canino. Trujillo, 2016.

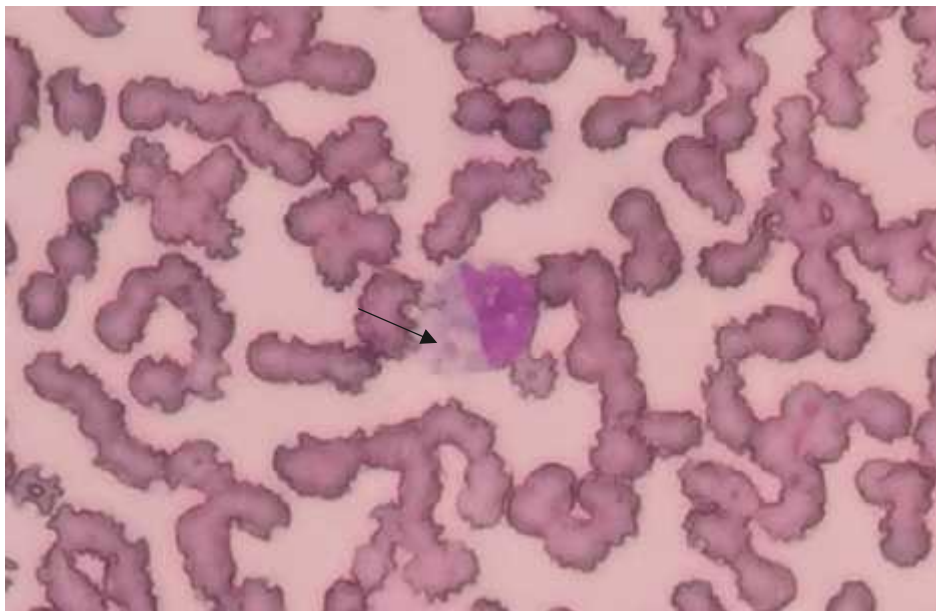


Fig. 4. Presencia intracitoplasmática de una mórula de *Ehrlichia sp.* en un monocito reactivo, de un paciente canino. Trujillo, 2016.

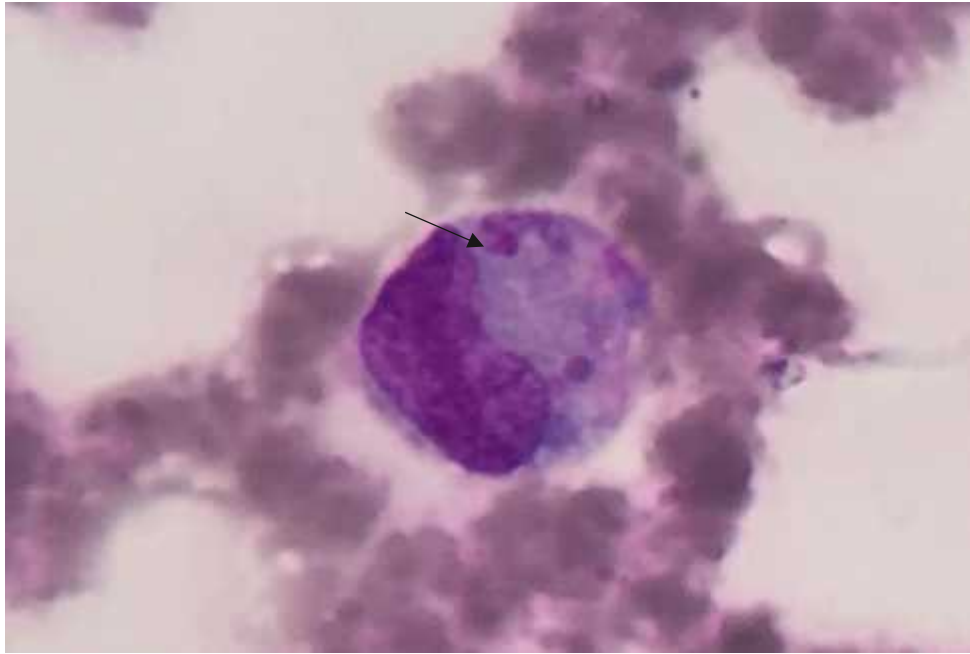


Fig. 5. Presencia intracitoplasmática de mórulas de *Ehrlichia sp.* en un monocito, de un paciente canino. Trujillo, 2016.

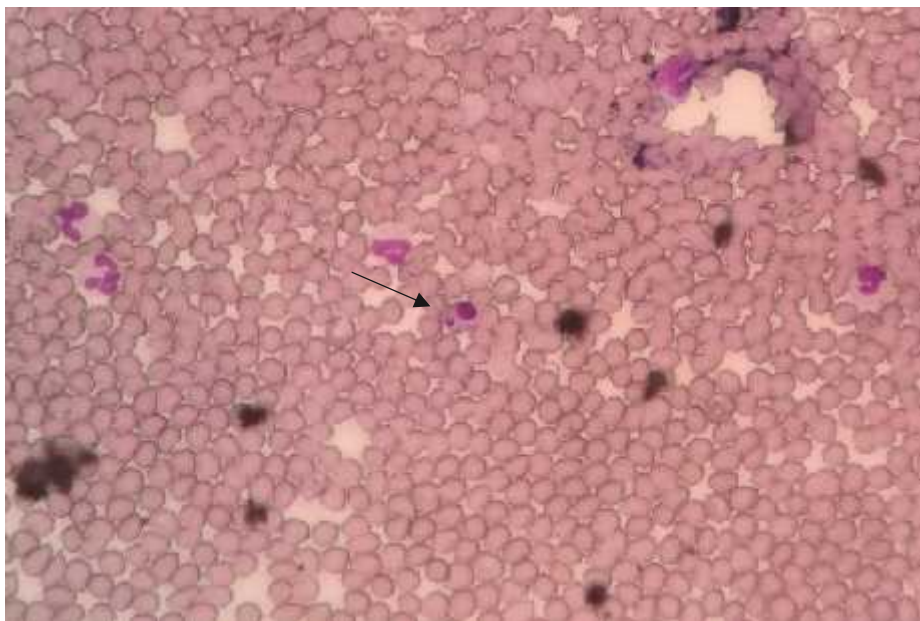


Fig. 6. Presencia de mórula de *Ehrlichia sp.* intracitoplasmática en un Linfocito.

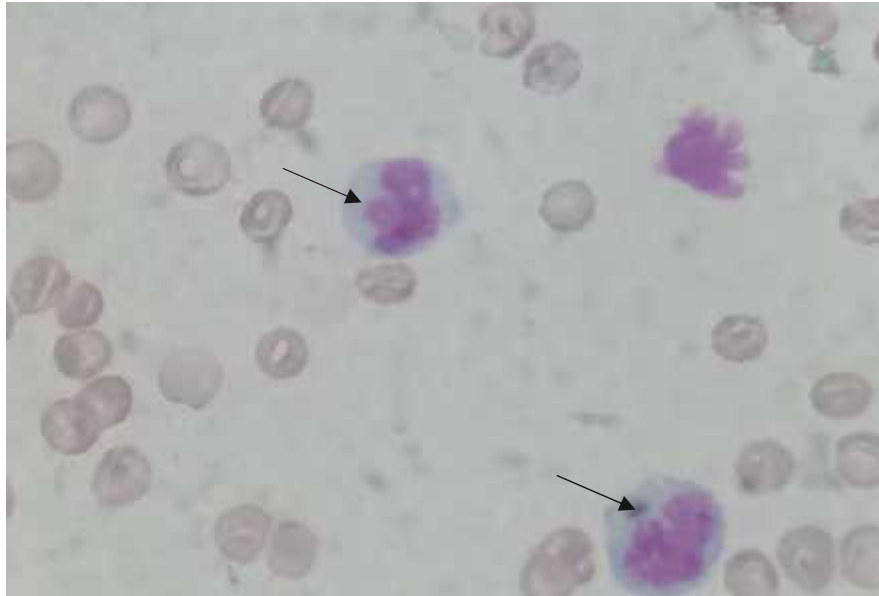


Fig. 7. Presencia intracitoplasmática de *Ehrlichia* sp. en un monocito, de un paciente canino. Trujillo, 2016.

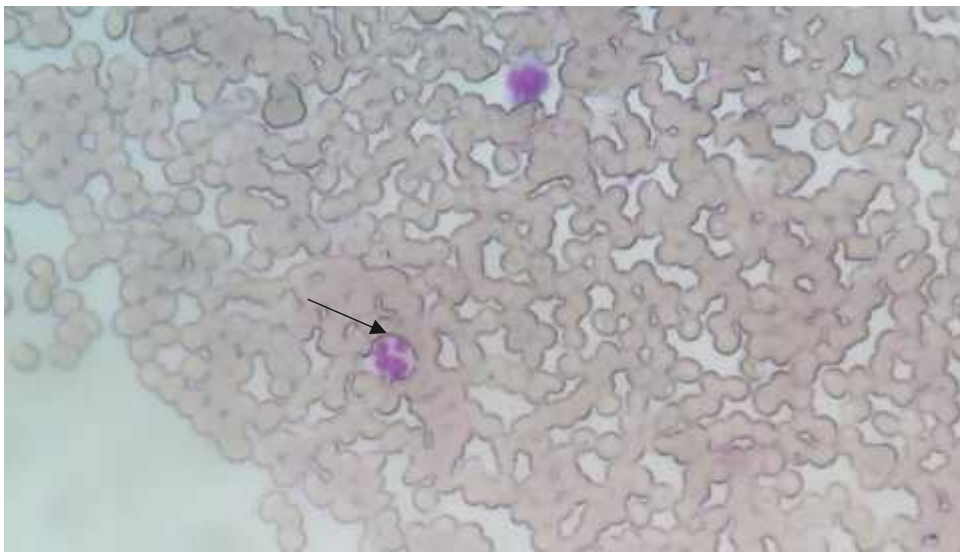


Fig. 8. Presencia de bacterias intracitoplasmáticas de *Ehrlichia* sp. en un neutrófilo segmentado, de un paciente canino. Trujillo, 2016.

**Tabla 5.** Resultados de frotis sanguíneo y capa leucocitaria en caninos para el diagnóstico de *Ehrlichia sp.* Trujillo, 2016.

Número de muestra	Frotis sanguíneo	Capa leucocitaria	Sexo	Edad (años)	Raza
1	-	+	M	1.5	Cruzado
2	-	-	M	0.3	Schnauzer
3	-	-	H	2	Cruzado
4	-	+	H	3	Cruzado
5	-	+	M	1.7	Shih Tzú
6	+	+	M	3	Lhasa Apso
7	-	-	M	4.6	Cruzado
8	-	+	H	2.1	Weimar
9	+	+	H	6.3	Shih Tzú
10	-	-	M	3.4	Poodle
11	-	-	H	2.1	Cruzado
12	-	-	M	0.8	Cruzado
13	-	-	M	0.5	Shih Tzú
14	-	-	H	9	Rottweiler
15	-	-	H	3	Pitbull
16	-	-	M	2.6	Shih Tzú
17	-	-	H	4.3	Cruzado
18	-	-	H	4	Poodle
19	-	-	M	1.8	Shih Tzú
20	-	-	H	3	Rottweiler

Número de muestra	Frotis sanguíneo	Capa leucocitaria	Sexo	Edad	Raza
21	-	-	H	0.11	Cruzado
22	-	-	M	1.1	Pitbull
23	-	-	H	2.6	Shih Tzú
24	-	-	M	13	Rottweiler
25	+	+	H	0.1	Shih Tzú
26	+	-	M	1	Cruzado
27	-	-	H	3	Poodle
28	-	-	M	7	Cruzado
29	-	-	H	3	Pitbull
30	-	+	M	2.5	Shih Tzú
31	-	+	M	2.8	Schnauzer
32	-	-	M	8.2	Pitbull
33	-	-	M	12	Shih Tzú
34	-	+	H	0.1	Rottweiler
35	-	-	H	3.2	Schnauzer
36	-	-	M	4.5	Cruzado
37	-	-	H	8	Cruzado
38	-	+	H	2.1	Cruzado
39	-	+	M	5.2	Pitbull
40	+	+	H	3.7	Pastor Alemán

Número de muestra	Frotis sanguíneo	Capa leucocitaria	Sexo	Edad	Raza
41	+	+	H	2	Poodle
42	-	-	M	1.5	Schnauzer
43	-	-	M	4.6	Rottweiler
44	-	-	H	2	Cruzado
45	-	+	M	2.10	Cruzado
46	-	-	H	3	Shih Tzú
47	+	+	H	2	Pastor Alemán
48	-	-	M	14	Cruzado
49	-	+	H	11	Boxer
50	-	-	M	13	Pekinés
51	-	-	M	0.4	Pitbull
52	-	-	H	0.2	Schnauzer
53	-	-	M	2	Cruzado
54	-	-	M	4.2	Labrador
55	-	-	M	7.3	Cruzado
56	-	-	M	10.1	Cruzado
57	-	-	H	5.2	Pekinés
58	-	-	M	3.8	Pitbull
59	-	-	H	6.2	Golden Retriever
60	-	-	H	1.2	Poodle



Número de muestra	Frotis sanguíneo	Capa leucocitaria	Sexo	Edad	Raza
61	-	-	M	3.4	Pitbull
62	-	-	H	7.3	Golden Retriever
63	-	-	M	9	Pitbull
64	-	+	M	4.5	Schnauzer
65	-	-	M	7.6	Poodle
66	-	-	M	3.6	Cruzado
67	-	-	H	5.5	Cruzado
68	-	-	M	0.5	Labrador
69	+	+	M	1.1	Pekinés
70	-	+	H	8.1	Pitbull
71	+	+	M	4	Beagle
72	-	-	H	5.1	Schnauzer
73	-	-	H	11	Cruzado
74	-	-	M	1.1	Cruzado
75	-	-	H	5	Golden Retriever

Número de muestra	Frotis sanguíneo	Capa leucocitaria	Sexo	Edad	Raza
76	-	+	H	2	Schnauzer
77	-	+	H	0.11	Pitbull
78	+	+	M	0.8	Labrador
79	+	+	H	3	Cruzado
80	-	+	M	0.8	Golden Retriever
81	-	-	H	13	Cruzado
82	-	-	M	3	Schnauzer
83	-	-	M	3.3	Cruzado
84	-	-	H	5.1	Cruzado
85	+	+	H	2.3	Cruzado
86	-	-	M	6.2	Fox Terrier
87	-	-	H	4	Pitbull
88	-	-	M	2	Poodle
89	-	+	H	0.1	Cruzado
90	-	-	M	0.5	Schnauzer
91	-	-	M	0.7	Cruzado
92	-	-	H	0.2	Cruzado
93	-	+	M	5	Shihtzu
94	+	-	M	3.4	Cruzado
95	+	+	H	7	Rottweiler

**Tabla 6.** Tabla de contingencia de 2 X 2 en el hallazgo de *Ehrlichia sp.* mediante la técnica de frotis sanguíneo frente a capa leucocitaria, 2016.

Resultado de la técnica de frotis sanguíneo	Resultado de la técnica de capa leucocitaria		Total
	Total positivos capa leucocitaria	Total negativos capa leucocitaria	
Total positivos frotis sanguíneo	12 (VP)	2 (FP)	14
Total negativo frotis sanguíneo	18 (FN)	63 (VN)	81
Total	30	65	95

**Valor predictivo positivo**

$$VPP \times \frac{12}{12 + 2} * 100 = 85.71\%$$

**Valor Predictivo Negativo**

$$VPN \times \frac{63}{63 + 18} * 100 = 77.78\%$$

**Tabla 7.** Chi cuadrado para frotis sanguíneo frente a capa leucocitaria.

<b>Pruebas de Chi-cuadrado</b>		
	Valor	Sig. exacta (bilateral)
Prueba de McNemar		0.000
N° de casos válidos	95	

La Tabla 7, nos muestra que al realizar el Chi cuadrado de independencia se encuentra un valor significativo.