



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO BOLÍVAR
ESCUELA DE CIENCIAS DE LA SALUD
“DR. FRANCISCO VIRGILIO BATTISTINI CASALTA”
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

**MÓRULAS DE *Ehrlichia spp.* EN FROTIS DE SANGRE
PERIFÉRICA DE CANINOS. CIUDAD BOLÍVAR, ESTADO
BOLÍVAR.**

Profesora asesora:
Lcda. Tepedino, María. E

Trabajo de grado presentado por:
Br. Marcano Martínez, Anny Elena
C.I. 17.382.740
Como requisito para optar al
título de Licenciado en Bioanálisis.

Ciudad Bolívar, Julio de 2009

ÍNDICE

ÍNDICE	ii
AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIA.....	v
RESUMEN.....	vi
INTRODUCCIÓN	1
JUSTIFICACION	14
OBJETIVOS.....	16
Objetivo General	16
Objetivos Especificos.....	16
MATERIALES Y METODOS	16
Tipo de estudio	16
Universo	16
Muestra.....	16
Materiales utilizados:	18
Método	18
Preparación del sitio de punción.	18
Extendido de sangre periférica.....	20
Coloración de frotis de sangre periférica.	21
Diagnóstico morfológico.....	22
Formula leucocitaria	22
Valores hematológicos de referencia (Caninos).	23
Interpretación de resultados:	23
Análisis de los datos:.....	24
RESULTADOS.....	25

Tabla 1.....	28
Tabla 2.....	29
Tabla 3.....	30
Tabla 4.....	31
Tabla 5.....	32
Tabla 6.....	33
DISCUSIÓN	34
CONCLUSIONES.....	38
RECOMENDACIONES.....	39
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a la Lcda. María Eugenia Tepedino por sus valiosas sugerencias y acertados aportes durante el desarrollo de este trabajo.

A la Lcda. Angélica Farrera por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia en un marco de confianza y afecto fundamentales para culminar este trabajo.

A la Universidad de Oriente, en especial a la Escuela de Ciencias de la Salud “Dr. Francisco Battistini Casalta” por ser mi segundo hogar a lo largo de toda la carrera y darme la oportunidad de cumplir uno de mis sueños, ser una profesional de la salud.

A la Lcda. Marielisa Rondón por ofrecer su colaboración y permitirme de manera desinteresada realizar el estudio en las instalaciones del Laboratorio Clínico “Nuestra Señora de Las Nieves”.

Mis compañeros y profesores de carrera que de alguna manera u otra me enseñaron cosas útiles para profesión y otras circunstancias de la vida. A todas aquellas personas que colaboraron o participaron en la realización de esta investigación, mi más sincero agradecimiento.

DEDICATORIA

Doy gracias a Dios, por estar conmigo en cada uno de mis pasos, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

A mis padres, Lucia Martínez y Lombardo Marcano por toda su ayuda y apoyo incondicional siempre animándome a vencer todos los obstáculos y seguir adelante para cumplir mis metas.

A mis hermanos Luis y Antonio por acompañarme siempre y darme una mano en los momentos en los que los necesite.

A Johny Velásquez, gracias por ser la persona que he tenido siempre a mi lado apoyándome y animándome sin dejarme caer, en tu compañía las cosas malas se convierten en buenas, la tristeza se transforma en alegría y la soledad no existe.

Gracias a todos, esto es por y para ustedes tanto como para mí....

Anny Marcano.

MÓRULAS DE *Ehrlichia spp.* EN FROTIS DE SANGRE PERIFÉRICA DE CANINOS. CIUDAD BOLÍVAR, ESTADO BOLÍVAR.

Marcano Martínez Anny Elena

Departamento de Bioanálisis, Escuela de Ciencias de la Salud. Universidad De Oriente, Núcleo Bolívar.

RESUMEN

La ehrlichiosis es una enfermedad producida por bacterias del género *Ehrlichia*, son microorganismos Gram negativos, intracelulares obligados y pleomórficos, que parasitan leucocitos circulantes de animales y humanos. Es transmitida por garrapatas que al picar, introducen la bacteria que invade leucocitos y plaquetas, donde se multiplica originando una mórula, visible al microscopio óptico. El objeto del trabajo es la identificación del microorganismo mediante frotis de sangre periférica. Se estudiaron 504 muestras de sangre de caninos que fueron enviadas al Laboratorio Clínico “Nuestra Señora de Las Nieves”, de Ciudad Bolívar, Estado Bolívar. A todas las muestras recolectadas se les realizó hematología completa y diagnóstico de hemoparásitos, mediante revisión minuciosa del frotis, coloreado con Wright. Se identificaron, por frotis, mórulas en 259 muestras de las 504 estudiadas, con una prevalencia de 51%. Las variables hematológicas con alteraciones estadísticamente significativas ($p < 0,05$), fueron la hemoglobina 56%, los leucocitos 46% y las plaquetas 54% en los casos positivos. En conclusión, se determinó una elevada prevalencia de infección por *Ehrlichia spp.*, en las muestras de perros estudiados.

Palabras clave: *Ehrlichia spp.*, caninos, garrapatas, Venezuela.

INTRODUCCIÓN

La ehrlichiosis es una enfermedad causada por microorganismos Gram negativos, intracelulares obligados y pleomórficos, que parasitan leucocitos circulantes de hospedadores mamíferos susceptibles como perros, vacas, ovejas, cabras, caballos, incluido el hombre. Poseen una pared celular rígida, típica de bacteria Gram negativas y no son móviles. Dentro de la célula infectada aparecen aisladas, en parejas o formando masas densas (Mandaniluz *et al.*, 1997; García, 2005).

Las especies bacterianas pertenecientes a los géneros de la familia que produce la ehrlichiosis son bacterias con especificidad para un solo tipo de célula diana. Las especies de *Ehrlichia* muchas veces se pueden identificar basándose en el tipo de célula que infectan y el nombre de la enfermedad resultante se basa en el tipo de célula (ehrlichiosis monocítica o granulocítica). Muchas de las *Ehrlichia* son transmitidas por garrapatas, pero algunas especies utilizan otros hospederos intermedios. Más de una especie de *Ehrlichia* puede causar enfermedad en la mayoría de los hospederos vertebrados (Rey *et al.*, 2002; Zanfí y Duno, 2007).

La ehrlichiosis canina, en su forma monocítica y granulocítica es una enfermedad infecciosa del perro de alta frecuencia en Venezuela, considerada zoonótica y emergente, producida por bacterias del orden Rickettsiales, familia Anaplasmataceae cuyos vectores principales son las garrapatas marrón (*Rhipicephalus sanguineus*), pertenecientes a la familia Ixodidae (Zanfí y Duno, 2007; Simón 2009).

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos de un número variable de vertebrados, incluyendo el ser humano y succionan la sangre de animales tanto

grandes como pequeños. Las garrapatas se distribuyen en dos grandes familias, Ixodidae o garrapatas duras y Argasidae o garrapatas blandas. *Rhipicephalus sanguineus* vulgarmente conocida como la garrapata marrón del perro es una garrapata dura que ataca a los animales y al hombre causándoles lesiones epidérmicas, malestar y anemia. Posee escudo dorsal y la superficie dorsal de su cuerpo es lisa, con festones en el borde posterior, con 4 pares de patas. La hembra mide entre 10 y 12 mm, posee el abdomen de color de blanquecino a marrón y es más blanda; mientras que el macho mide entre 3 y 4 mm es más duro y de color marrón (Murray *et al.*, 2002; Drugueri, 2004).

La penetración de *Ehrlichia* spp. en el individuo se produce a través de la saliva de la garrapata infectada, que contamina el sitio de la picada en el momento de su alimentación, siendo confirmado por su presencia en las glándulas salivares. La transmisión es transestadial; lo que significa que durante el estado de larva, ninfa o adulto (macho o hembra) de la garrapata, están en capacidad de transmitir la enfermedad. No se presenta transmisión transovárica; es decir que durante la etapa del desarrollo dentro del vector, la bacteria no pasa al embrión, por lo que no es transmitida al hospedero por la siguiente generación (Tamí, 2003).

La transmisión de ese agente requiere que la duración de la picada sea lo suficientemente prolongada (24 a 48 horas). La garrapata, al picar, puede transmitir otros microorganismos que conducen a otras enfermedades en el humano, como son la babesiosis, la encefalitis equina y la enfermedad de Lyme. Se ha demostrado que las garrapatas pueden sobrevivir como adultos 155 a 568 días sin alimentarse y transmitir la infección por 155 días después de infectarse. Las garrapatas son más abundantes durante las estaciones cálidas y la mayoría de los casos agudos de ehrlichiosis monocítica canina ocurren durante esos períodos. Como la transmisión de *Ehrlichia* es mecánica y no biológica, las transfusiones de sangre infectada pueden también transmitir la Rickettsia (Waner y Harrus, 2000; Tamí, 2003).

En su ciclo biológico las Ehrlichias se introducen en el animal hospedador como cuerpos elementales que poseen un diámetro de 0,5-0,9 μm , una vez en el torrente sanguíneo y dependiendo de la especie de *Ehrlichia*, los cuerpos elementales buscan la célula diana (granulocitos, monocitos, plaquetas), se introducen en ella por endocitosis mediada por un receptor o por fagocitosis, se multiplican por fisión binaria para luego convertirse en cuerpos iniciales que son cuerpos redondos, ovales o en forma de habichuela, de 0,3 a 1,2 μm y se hallan dentro de mórulas en un número variable. Las mórulas pueden ser únicas o múltiples y alcanzan un diámetro de 0,8 a 2,1 μm , con lo que pueden llegar a ocupar gran parte del citoplasma (Mandaniluz *et al.*, 1997; Kujman *et al.*, 2005).

Las mórulas se encuentran incluidas dentro de vacuolas fagocitarias que protegen a los organismos. En estos casos no se forma la unión del fagosoma con los lisosomas o gránulos que contienen las enzimas que normalmente destruyen bacterias, por lo tanto las Ehrlichias continúan su multiplicación binaria dando origen a grandes mórulas que a veces contienen hasta 100 cuerpos elementales. Luego la vacuola se rompe dejando salir los cuerpos elementales que para sobrevivir requerirán ser fagocitados por nuevos leucocitos (Árraga, 2007).

Este microorganismo ha experimentado variaciones en la clasificación taxonómica a medida que se profundiza en su estudio. Actualmente, basados en técnicas científicas de clasificación genética, mucho más objetivas, tales como el análisis de la secuencia genética del 16S del ARN ribosomal y el operón groESL, reforzada por características biológicas, antigénicas, morfológicas, ecológicas, epidemiológicas de las bacterias y en las manifestaciones clínicas de la enfermedad que producen se ha presentado una nueva reorganización de los miembros de la tribu Ehrlichieae (Dumler *et al.*, 2001; Lorente *et al.*, 2004).

En la anterior nomenclatura, la tribu Ehrlichieae se clasificaba dentro de la familia Rickettsiaceae y del orden Rickettsiales. Con los recientes estudios genéticos y moleculares sobre la secuencia genética, se ha sugerido la reorganización etimológica dentro del orden Rhickettsiales. Así mismo, Dumler *et al.* (2001), propone la sustitución del tribu Ehrlichieae por la familia Anaplasmataceae y la reorganización de las ya existentes, resultando cuatro géneros: *Anaplasma*, *Neorickettsia*, *Wolbachia* y *Ehrlichia*. El género *Cowdria*, con su única especie *Cowdria ruminantium*, desaparece, pasando a ser denominada como *Ehrlichia ruminantium*. El género *Anaplasma* reagrupa, de un modo subjetivo, las especies *E. phagocytophilum*, *E. equi* y la *Ehrlichiosis Granulocítica Humana (EGH)* en una sola especie, con el nombre de *Anaplasma phagocytophilum* y la especie *Ehrlichia platys* como *Anaplasma platys*. El género *Neorickettsia* se expande, incluyendo las especies *E. sennetsu* y *E. risticii* como: *Neorickettsia sennetsu* y respectivamente *Neorickettsia risticii*. En el género *Ehrlichia* quedan las especies *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. muris*, *E. ewingii* y *E. ruminantium*. El género *Wolbachia* tiene una sola especie *W. pipientis* (Dumler *et al.*, 2001; Zanfır y Duno, 2007).

La primera ehrlichiosis canina descrita, así como la más conocida universalmente, es aquella producida por *Ehrlichia canis* agente causal de la ehrlichiosis monocítica canina, se identificó en Argelia en perros infestados por garrapatas que desarrollaban un proceso febril y anemia, tras observar las extensiones sanguíneas de los perros afectados, notaron pequeños microorganismos en el interior de los monocitos. La ehrlichiosis granulocítica canina es causada por *Ehrlichia ewingii*, un patógeno reconocido que se identifica en segmentados neutrófilos de sangre periférica y serológicamente presenta una reacción cruzada con *E. chaffeensis*. En rumiantes el agente causal es *E. ruminantium*, que es transmitida por garrapatas *Amblyomma*, se ha descrito en Sudáfrica la existencia tanto de perros sanos portadores de la bacteria, como de animales enfermos con ehrlichiosis causada por esta especie (Behrman *et al.*, 2004; Lorente *et al.*, 2004).

Anaplasma platys es el agente causal de la trombocitopenia cíclica infecciosa y se distingue de otras especies de *Anaplasma* por su capacidad de infectar plaquetas, además se considera un parásito estricto del perro que produce de fiebre y trombocitopenia, con una duración de 3 o 4 días, cada 7 a 21 días. *Anaplasma phagocytophilum* infecta sobre todo segmentados neutrófilos, algo menos segmentados eosinófilos y a los mononucleares. (Kujman *et al.*, 2005; Wikipedia, 2008).

Los patógenos pertenecientes al género *Neorickettsia* se caracterizan porque su transmisión no se produce a través de una garrapata vector, sino a través de tremátodos o nemátodos que infestan caracoles, peces o insectos, de tal manera que la transmisión a vertebrados superiores se produce por ingestión de éstos. La transmisión de *Neorickettsia sennetsu* está ligada al consumo de pescado crudo infestado por cercarias de tremátodos. Esta especie se encuentra filogenéticamente relacionada con *Neorickettsia risticii*, causante de la fiebre equina del Potomac y de algunas infecciones naturales en perros, denominándose la enfermedad en estos ehrlichiosis canina atípica. *Neorickettsia helminthoeca* produce la denominada intoxicación o enfermedad por salmón, es una afección rickettsial que afecta a perros y zorros, siendo transmitida mediante un tremátodo que actúa de vector, constituyéndose el salmón sólo como un huésped intermediario (Larenas *et al.*, 1998; Lorente *et al.*, 2004).

Entre las especies patógenas para el humano se ha podido constatar la infección con al menos, cinco especies diferentes de *Ehrlichia*: *N. sennetsu* que fue el primer agente Ehrlichial en humanos y causó un síndrome llamado fiebre de Sennetsu, *E. canis* que infecta a los linfocitos y monocitos, *E. chaffeensis* agente causal de la ehrlichiosis monocítica humana que infecta predominante células monocíticas y *E. ewingii* junto a *A. phagocytophilum* que son especies responsables de la ehrlichiosis granulocítica humana. Ciertas condiciones en el hombre como la

edad, estado de nutrición, trastornos relacionados con enfermedades malignas y/o infecciosas, alteraciones metabólicas, trastornos laborales, psíquicos o estrés, que ocasionan un déficit de la inmunocompetencia, hacen al hospedero más vulnerable a las infecciones, entre ellas la ehrlichiosis humana (Lorente *et al.*, 2004; Tamí y Tamí, 2004).

Hay varias especies de *Ehrlichia* (*E.equi*, *E.ewingii*, *E.phagocytophila*) que, en lugar de infectar linfocitos y monocitos caninos como lo hace *E. canis* y *E. chaffeensis*, infectan los leucocitos granulocíticos, es decir, neutrófilos, eosinófilos y basófilos. En cambio los monocitos y macrófagos se infectan por el grupo de *N. helminthoeca*, a diferencia de *N. risticii* que infecta además células epiteliales intestinales y mastocitos. La especie *A. platys* es la única que infecta plaquetas (Sainz, 2007; León *et al.*, 2009).

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad son difíciles de delimitar ya que hay considerables variaciones en el tipo, duración y severidad de la patología en el animal. La enfermedad presenta tres fases; fase aguda, subclínica y crónica.]La fase aguda se inicia tras un periodo de incubación de 8 a 20 días y dura de 2 a 4 semanas, se caracteriza por alteraciones hematológicas, pérdida de peso, anorexia, fiebre, hemorragias y disnea. Luego la fase subclínica puede durar de meses a años, el animal recupera el peso perdido y disipa la fiebre, para dar lugar a la fase crónica que puede manifestarse como una enfermedad leve con alteraciones hematológicas y de peso irrelevantes o por el contrario, se pueden generar cuadros con trombocitopenia, palidez, petequias, hemorragias, nefropatía, edemas, disnea, hepatoesplenomegalia, signos oculares, alteraciones neuromusculares, cojeras y dolor articular (Simón, 2009).

La alteración más típicamente detectada en perros con ehrlichiosis es la trombocitopenia que aparece a los 15-20 días post-infección y puede persistir durante todas las fases de la enfermedad. Sin embargo, se han descrito casos de ehrlichiosis sin trombocitopenias, también podemos encontrar anemia y con menos frecuencia, leucopenia. Aunque la ehrlichiosis canina se denominó en el pasado pancitopenia tropical canina, tan sólo el 15% de los perros enfermos presentan un descenso en el recuento de las tres líneas celulares sanguíneas (Lorente *et al.*, 2004).

El recuento de leucocitos en sangre es variable, encontrando inicialmente una ligera leucopenia debida al secuestro de leucocitos motivado por procesos inmunológicos e inflamatorios. Esta leucopenia puede transformarse posteriormente en leucocitosis. Se ha descrito una inversión de la formula leucocitaria en perros con ehrlichiosis, con presentación de una neutropenia y una linfocitosis relativa. En relación con la bioquímica sanguínea, es habitual encontrar hiperproteinemia con hipoalbuminemia, hiperglobulinemia e hipergammaglobulinemia, aumentos en la urea y la creatinina por encima de los valores fisiológicos de referencia. En el uroanálisis, las dos alteraciones más frecuentes son proteinuria y hematuria (Lorente *et al.*, 2004).

La trombocitopenia que se observa en los animales infectados se debe a un secuestro por parte del bazo, destrucción por acción inmune y disminución de la producción de plaquetas. La anemia que se observa en algunos casos, más frecuentemente en los crónicos (normocítica, normocromica no regenerativa) se debe a que la médula ósea se hace grasosa e hipocelular donde podemos conseguirnos con una anemia aplásica por una supresión en la producción y una mayor destrucción de eritrocitos, además de valores reducidos de leucocitos y plaquetas generándose una pancitopenia con hipoplasia medular. En médula ósea las células que se observan en su mayoría son linfocitos y plasmocitos (López *et al.*, 2003; Árraga, 2007).

La hematología constituye una herramienta de gran utilidad para el diagnóstico de la ehrlichiosis, debido a que la bacteria y las alteraciones más importantes de la enfermedad se evidencian a nivel sanguíneo. El cuerpo elemental, debido a su diminuto tamaño, es difícil de visualizar, no así la forma madura o mórula, que por su tamaño es fácilmente identificada con el microscopio óptico. La observación de las mórulas, si bien indica infección, no identifica el tipo de agente ehrlichial responsable de la misma. Las mórulas también pueden detectarse a partir de cultivos celulares a partir de sangre de perros infectados. Sin embargo, esta técnica no tiene utilidad clínica porque pueden pasar hasta ocho semanas en obtenerse cultivos positivos y no siempre se consigue el aislamiento (Tamí y Jordán, 2002; Hoyos *et al.*, 2007).

En la actualidad se han diseñado pruebas serológicas rápidas para la detección de anticuerpos de diversos microorganismos rickettsiales como la reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCR), también existen en el mercado algunos test comerciales de diagnóstico de ehrlichiosis basados en la técnica de ELISA. Aunque no son técnicas habitualmente accesibles para el clínico, tanto el Western-blot como la PCR, empleados en laboratorios especializados, son bastante útiles en casos dudosos y a la hora de distinguir infecciones por diferentes especies de *Ehrlichia* (Hoyos, 2007; Sainz *et al.*, 2007).

El agente etiológico de la erlichiosis monocítica canina es *Ehrlichia canis*, fue identificada por primera vez en Argelia en 1935 en el Instituto Pasteur por Donatien y Lestoquard, años después la enfermedad cobró mucha importancia durante la Guerra de Vietnam (1959- 1975) causando la muerte de cientos de perros militares, mientras que en Japón fue descubierto el primer agente Ehrlichial en humanos por Misao *et al.* en 1955 llamado *E. sennetsu*, en Estados Unidos en 1978 se diagnosticó por primera vez el agente causal de la trombocitopenia cíclica infecciosa *Anaplasma*

platys, desde entonces se ha descrito también en Venezuela, China, Taiwán, Japón, Israel, Australia, España, Grecia, Alemania, Italia y Francia (Kujman *et al.*, 2005; Zafir y Duno, 2007).

Ehrlichia muris se aisló del bazo de un roedor salvaje en Japón en 1983. Mientras que en 1987 en EE.UU, *E. chaffeensis* fue identificada como la causa de la ehrlichiosis monocítica humana, al año siguiente en 1988 se demostró que los perros eran susceptibles a la infección experimental provocada por *Neorickettsia risticii*. Por otra parte, en 1996, se demostró que *E. chaffeensis* causa signos de enfermedad en los perros indistinguible de la infección provocada por *E. canis* y en 1999 se descubrió que *E. ewingii*, un patógeno reconocido como agente causal de ehrlichiosis granulocítica en perros puede también causar infección en humanos con inmunodepresión (Lorente *et al.*, 2004; Anda *et al.*, 2007).

Árraga (1992), informa el hallazgo de diversas ehrlichias caninas observadas en el Estado Zulia, Venezuela, desde 1982 y demuestra el primer caso de ehrlichiosis humana en una niña de 17 meses de edad, en la que por serología se le detecto *E. chaffeensis* y otro organismo similar a *E. platys* de los perros. Tamí *et al.* (1994), publicó un trabajo de investigación sobre Ehrlichiosis en animales y humanos en Venezuela, donde se analizaron 103 muestras de sangre tomadas a 50 perros infestados por garrapatas, a 33 personas en contacto con esos perros infestados y a 20 personas sin contacto aparente con animales y concluyeron que el 32% de los perros y el 45% de las personas en contacto con esos perros tenía *Ehrlichia* en las plaquetas y también en algunos linfocitos y monocitos. En el último grupo de control, se halló 0% de presencia de *Ehrlichia*. Luego en 1996 Árraga publica, Ehrlichiosis humana: reporte del primer caso en Venezuela, en el que mediante el test de IFI detectaron anticuerpos de *E. chaffeensis* (Tamí, 2003; Árraga, 2006).

También en 1996 se publicó en Venezuela Identification of *Ehrlichia* Specie in Blood Smear, por Tamí *et al.* que realizó el estudio en el cual se recolectaron muestras provenientes de 92 perros enfermos de clínicas veterinarias, 100 perros callejeros de Caracas, 33 humanos con picaduras previas por garrapatas, 14 personas sin recordar haber sido picadas por garrapatas pero en contacto ocasional con caninos y 20 personas sin haber tenido contacto con caninos. En este estudio los investigadores hallaron organismos de algún tipo de *Ehrlichia* en el citoplasma de las plaquetas en el 33% de los perros de las clínicas, en el 65% de los perros callejeros, en el 45% de los humanos que reportaban picadura previa, en el 1% de los que no recordaron haber sido picados y en el 0% de los que no habían tenido contacto con perros; además, incluye un estudio de microscopía electrónica en muestra de sangre canina con ehrlichiosis en fase aguda y se presentó la ultraestructura de la bacteria trombocitotrópica canina (Tamí, 2003; Árraga, 2006).

Pérez *et al.* (1996), informo de una infección asintomática por un agente semejante a *Ehrlichia canis* en un hombre venezolano donde se aísla y realiza caracterización antigénica y genética del agente al que se denomina *Ehrlichia* Venezolana Humana. En 1997, Árraga *et al.* logra preparar un antígeno de *A. platys* que resulta efectivo para demostrar perros afectados por trombocitopenia cíclica canina, pero que no reaccionó con el suero de humanos con organismos plaquetarios (Pérez *et al.* 1996; Árraga, 2006).

Más tarde en 1998 Árraga *et al.* presenta en Cancún, México, un trabajo con la identificación, por Técnicas de microscopía electrónica, de un organismo parasitante de las plaquetas en humanos similar pero no idéntico a *A. platys*. En el 2002, en un trabajo de investigación publicado en Venezuela, se detecto la presencia en sangre humana del ADN del microorganismo, diagnosticado morfológicamente como *Ehrlichia* trombocítica, utilizando la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), observándose una migración electroforética igual a la de *A. platys*,

conocido agente de ehrlichiosis trombocítica canina en el campo veterinario. Más adelante en el 2003 Tamí publicó el trabajo Ehrlichiosis humana: *Ehrlichia* trombocítica en sangre periférica donde se revisaron 182 frotis sanguíneos (periférica y capa blanca) coloreados con Wright. Se identificaron mórulas intraplaquetarias de *Ehrlichia* en 68 de los 182 sujetos estudiados (Tamí, 2003; Árraga, 2006).

En el año 2004 en Venezuela, se publicó un estudio cuyo objetivo fue determinar la frecuencia de infección por bacterias del género *Ehrlichia* en una población de pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Para el estudio se reunieron muestras de sangre periférica de 87 pacientes con seropositividad a VIH y se revisaron al microscopio óptico, frotis elaborados con capa blanca sanguínea concentrada, teñidos con colorante de Wright, como resultado se identificó *Ehrlichia* trombocítica en 12 de los 87 sujetos del estudio, es decir, en 13,8%. Por medio del estudio, se sugirió la necesidad de tener en cuenta la ehrlichiosis como posible diagnóstico en la población con infección por VIH (Tamí y Tamí, 2004).

En el año 2009 en el Estado Bolívar, se llevó a cabo un estudio de ehrlichiosis en perros en un centro veterinario de la ciudad, para un total de 126 muestras, se encontraron 64 muestras que presentaban infección por *Ehrlichia spp.*, representando una frecuencia de 50,79%. De un total de 3 parámetros hematológicos evaluados solo dos se encontraron alterados, la hemoglobina con una media de 9,25 g/dl en el 79,69% y la cuenta de plaquetas con una media de 73.781 células xmm^3 en el 87,50% del total de las muestras. En los casos positivos de infección causada por *Ehrlichia spp.* se observó leucopenia en solo 15,63% (León *et al.*, 2009).

Dada la variedad de signos clínicos de la ehrlichiosis, el diagnóstico diferencial debe incluir numerosas patologías. Muchos de los signos clínicos y los resultados de laboratorio, también pueden estar presentes en Leishmaniosis canina

que en algunas áreas geográficas es la enfermedad con la que más frecuencia se puede confundir, debido a la similitud de muchos de sus signos. Los perros con Ehrlichiosis pueden tener otros agentes infecciosos asociados, se ha observado infecciones simultáneas de *E. canis* con uno o más de los siguientes agentes: *A. platys*, *Babesia canis*, *Hepatozoon canis*, *Bartonella vinsonii*. Estas infecciones mixtas pueden ser debido a que las garrapatas estén infectadas con todos ellos o a que los perros hayan sido picados por diferentes garrapatas en diversas ocasiones (Lorente *et al.*, 2004; Árraga, 2007).

Los perros son vulnerables a los ataques de distintos tipos de ectoparásitos, como las pulgas, garrapatas y flebotomos, ya que todos estos vectores transmiten determinados patógenos que pueden causar graves enfermedades a los perros y, si no se diagnostican a tiempo y no se tratan de forma adecuada, pueden provocar la muerte al animal. Las precauciones sencillas encaminadas a reducir el riesgo de exposición a la garrapata, que incluyen evitar las zonas infestadas con garrapatas, llevar ropas adecuadas como barrera, usar repelentes para garrapatas y quitarse con prontitud y de manera cuidadosa las garrapatas adheridas, disminuirán el riesgo de contraer la enfermedad ya que en la actualidad no se dispone de vacunas (Guerrant *et al.*, 2002; Ventura, 2009).

La Ley del Ejercicio Bioanálisis, en su capítulo I. del ejercicio del Bioanálisis. Artículo 2º señala que el ejercicio de esta profesión consiste en el análisis de muestras provenientes de seres humanos, realizados mediante métodos científicos y tecnología propio del laboratorio clínico para suministrar datos al proceso de diagnóstico de enfermedades, su prevención y terapéutica. También en su párrafo primero establece que los profesionales legalmente autorizados por la presente Ley, podrán analizar, además, muestras provenientes de vegetales o animales. Basados en esta Ley se realizó esta investigación cuyo objetivo principal fue identificar fórmulas

de *Ehrlichia spp.* en frotis de sangre periférica de caninos. Ciudad Bolívar, Estado Bolívar.

JUSTIFICACION

Las bacterias que pertenecen al género de *Ehrlichia spp.* son microorganismos intracelulares, de gran interés para el hombre porque varias de sus especies pueden producirle infecciones y otras son agentes causales de enfermedades en caninos. Las hemoparasitosis en caninos son una preocupación de reciente data en Venezuela. Los casos han crecido vertiginosamente a lo largo de pocos años y se han tomado en consideración por su potencial zoonótico. El amplio cuadro de síntomas, que se observó en los primeros casos diagnosticados, corroborado con la variedad de resultados reflejados en la bibliografía, en cuanto a la eficacia terapéutica de distintos protocolos empleados, dieron motivos para profundizar los conocimientos sobre estas enfermedades (Garcia, 2005; Zanfiri y Duno, 2007).

Las garrapatas se encuentran distribuidas mundialmente. Hasta hace poco, cada una de las especies de *Ehrlichia* se considero localizada geográficamente y capaz de infectar sólo una especie animal o el hombre. Esta idea ha cambiado por la existencia de la misma especie de *Ehrlichia* en latitudes muy diferentes del mundo y capaces de infectar no sólo a el hombre, sino también distintas especies de animales (Sainz, 2002).

Una gran cantidad de la población del Estado Bolívar específicamente Ciudad Bolívar posee caninos como mascotas dentro de sus hogares por lo que existe un aumento en la movilización de mascotas y la habilidad de las garrapatas de encontrar nichos en nuevas condiciones climáticas resultado en una rápida extensión de rangos zoogeográficos por muchas especies de garrapatas. Esto ha hecho pensar que para prevenir y alertar a la población del posible riesgo, es necesario el conocimiento los casos de ehrlichiosis que se presentan en los animales. Por lo tanto se realizó esta

investigación cuyo objetivo principal fue identificar mórulas de *ehrlichia spp.* en frotis de sangre periférica de caninos. Ciudad Bolívar, Estado Bolívar.

OBJETIVOS

Objetivo General

Identificar mórulas de *Ehrlichia spp.* en frotis de sangre periférica de caninos en Ciudad Bolívar. Edo Bolívar.

Objetivos Especificos

- Determinar la frecuencia de *Ehrlichia spp.* en muestras de caninos.
- Describir los valores de hemoglobina, leucocitos, recuento diferencial y plaquetas de la población a estudiar.
- Comparar datos hematológicos en animales sanos y animales con ehrlichiosis.

MATERIALES Y METODOS

Tipo de estudio

El esquema metodológico que se utilizó corresponde al de una investigación de campo, documental, no experimental con carácter descriptivo.

Descriptivo: Se estudiaron todos los pasos que se deben seguir en la identificación de *Ehrlichia spp.* en un frotis sanguíneo teñido con la técnica de Wright.

Documental: Se realizó la investigación de documentos, revistas, etc.

De campo: La investigación se desarrolló en el sitio de estudio establecido, Laboratorio Clínico “Nuestra Señora de las Nieves” de Ciudad Bolívar. Estado Bolívar.

No experimental: No se controlaron ni manipularon las variables, no se realizó una comparación con otra investigación.

Universo

Estuvo conformado por todas las muestras de caninos que fueron recibidas en el Laboratorio Clínico “Nuestra Señora de las Nieves” en Ciudad Bolívar. Estado Bolívar. Enero – Mayo de 2009.

Muestra

Al tratarse de un universo finito la muestra está representada por la totalidad del universo. Las muestras se procesaron con las normas éticas establecidas.

Materiales utilizados:

- ❖ Láminas portaobjetos.
- ❖ Láminas cubreobjetos
- ❖ Tubos con EDTA.
- ❖ Ficha de datos.
- ❖ Coloración Wright
- ❖ Agua destilada.
- ❖ Bandejas de coloración.
- ❖ Aceite de inmersión.
- ❖ Microscopio óptico, marca Nikon.
- ❖ Gasas.
- ❖ Coulter T890

Método

Preparación del sitio de punción.

La sangre venosa es la muestra más común obtenida de los animales. Las técnicas varían de una especie a otra, según la localización de los vasos sanguíneos convenientes y el espesor, dureza y capa de la piel. Las muestras sanguíneas fueron tomadas por un médico veterinario quien las envió al laboratorio donde se les realizó el diagnóstico de hemoparásitos y hematología completa.

El médico realiza asepsia y antisepsia del sitio de punción que debe estar limpio y libre de patógenos, esto incluye recortar el pelo, lavarlo con jabón,

detergente o solución yodada en dos veces y después realiza una limpieza con alcohol. El corte de pelo puede ser indeseable en animales de exhibición por lo que es necesario pedir el consentimiento del dueño, en caso que el corte no sea posible por algún motivo la limpieza debe ser más estricta. La asepsia debe realizarse en sentido contrario al crecimiento del pelo del animal y en forma circular del centro hacia la periferia. Después de la punción el sitio debe dejarse seco, limpio y libre de sangre ya que cualquier humedad o materia orgánica favorece las infecciones (Zapata y Fajardo, 2008).

Es muy útil el servicio de un ayudante experto en el manejo de animales. Las venas cefálica y safena son usadas comúnmente en el perro y algunas veces en el gato. Con una mano el ayudante sujeta con suavidad la cabeza del animal y con la otra rodea por detrás, arriba del codo extendiéndolo un poco. Con el pulgar y los otros dedos de esta mano se fija la piel floja para sujetar el vaso firmemente. El operador inmoviliza el vaso con el pulgar e inserta la aguja (cal, 18, 22,25 o 38 mm) arriba de este punto. La sangre también se obtiene de la vena femoral, que es palpada en su fosa, este procedimiento es probablemente más largo y doloroso que la venipunción de rutina y se recomienda el uso de anestesia local (Zapata y Fajardo, 2008).

La cantidad de muestra obtenida a través de la punción debe tenerse en cuenta en las diferentes especies, es así como para las especies mayores puede obtenerse por punción sin causar trastornos hasta 15 ml de sangre y en pequeñas especies la muestra no se puede exceder de 10 ml. Se utilizaron 5 ml de sangre extraída con anticoagulante Ethylenediamine tetraacetate (EDTA), se elaboraron frotis de sangre periférica. Los frotis fijados y coloreados con Wright se montaron sobre portaobjetos. El tiempo de acción del colorante se ajustó cuidadosamente y se estandarizó, lo que evitó la sobrecoloración de los elementos. Se busco el campo útil del frotis que mostró una mejor distribución y coloración de los elementos. Las extensiones sanguíneas se revisaron meticulosamente con objetivo de inmersión, para

familiarizarse inicialmente con lo que era normal y lo que era anormal. Cada paciente tiene sus particularidades hematológicas que fueron reconocidas y analizadas (Tamí, 2003; Zapata y Fajardo, 2008).

A cada una de las muestras sanguíneas de caninos recibidas en el laboratorio se les realizó la hematología completa por medio del equipo semiautomatizado Coulter T890 el cual utiliza un sistema de recuento por impedancia, radiofrecuencia y tecnología VCSn.

Extendido de sangre periférica.

Consiste en la extensión de una gota de sangre sobre un portaobjeto empleando el canto biselado de otro portaobjeto de igual dimensión. Puede usarse sangre entera anticoagulada con EDTA o sangre capilar de flujo libre. Si se emplea EDTA, los frotis deben prepararse durante la primera hora siguiente a la recolección. Es necesario mezclar bien la muestra antes de prepararlos. Para realizar el extendido se requieren portaobjetos de vidrio limpios (simples o con un extremo esmerilado), un lápiz marcador (Muñoz, 2005; Anónimo, 2008).

El procedimiento es el siguiente:

1. Colocar una pequeña gota (0.05 mL) de sangre bien mezclada del tubo con anticoagulante, a 2 cm aproximadamente de uno de los extremos del portaobjetos.
2. Colocar el canto de otro portaobjetos esmerilado sobre la superficie del primer portaobjeto (en la que se encuentra la gota de sangre) tomando un ángulo de 45°.
3. Deslizar suavemente y a velocidad moderada el portaobjetos sobre el otro, en sentido longitudinal, hasta que la gota de sangre quede bien extendida sobre la

superficie del primer portaobjetos. El grosor del frotis sanguíneo puede variar según sea el ángulo que formen entre si ambos portaobjetos

4. El frotis debe secarse al aire libre antes de teñirlo. Se pueden abanicar en el aire para que se sequen en menos tiempo.

5. Marcar el portaobjetos con un lápiz marcador. La identificación debe ser en el extremo grueso (o el esmerilado) del portaobjetos (Muñoz, 2005; Anónimo, 2008).

Coloración de frotis de sangre periférica.

Para examinar con detalle las células de un frotis de sangre, es necesario teñirlas. La tinción más usual en el laboratorio de hematología es la de tipo Romanowsky. El uso de una tinción que combinaba una solución policroma de azul de metileno (oxidado) con eosina para teñir la sangre se describió por primera vez por Romanowsky y Malachowsky. Diez años más tarde, Leishmann refinó esta técnica; combinó la eosina con el azul de metileno policromo, recuperó el precipitado y lo disolvió en alcohol metílico. Hoy en día, las tinciones tipo Romanowsky se preparan con esta técnica modificada (Anónimo, 2008).

Las tinciones de base de Romanowsky, como la técnica de Wright, Giemsa o May-Grünwald, son soluciones alcohólicas con componentes ácidos y básicos. Las tinciones de este tipo se conocen como policromas porque pueden impartir muchos colores y producir el efecto de Romanowsky. Este efecto imparte un color típico a ciertos componentes celulares y refleja la acción combinada de los pigmentos contenidos en la tinción a un pH de 6.4 a 7.0. Los colores característicos son púrpura en el núcleo celular, azul y rosa en el citoplasma y varios colores en gránulos específicos (Anónimo, 2008).

Procedimiento para la coloración:

1. Colocar la lámina seca e identificada adecuadamente en un soporte para coloración nivelado, con el lado del frotis hacia arriba.
2. Colocar colorante recién filtrado lentamente sobre el portaobjetos hasta que el frotis quede todo cubierto. No agregar colorante en exceso. Dejándolo por espacio de 5 minutos, los tiempos de coloración varían de un laboratorio a otro.
3. Al final del tiempo de coloración, agregar el amortiguador en partes iguales sobre el portaobjetos sin retirar el colorante. El amortiguador debe formar una burbuja grande de forma convexa sobre la lámina.
4. Mezclar el colorante y el amortiguador con suavidad. Una lámina bien mezclada debe exhibir un brillo verde metálico en la superficie. El tiempo para esta etapa debe variar entre 2 y 5 minutos.
5. Lavar el colorante y el amortiguador de la lámina con un flujo suave de agua corriente, levantar la lámina por los bordes y limpie el dorso del mismo para eliminar cualquier pigmento.
6. Secar el extendido coloreado al aire libre (Muñoz, 2005; Anónimo, 2008).

Diagnóstico morfológico

El diagnóstico morfológico se realizó mediante la revisión de frotis sanguíneos (sangre periférica), coloreados con Wright, utilizando un microscopio óptico (Tamí, 2002).

Formula leucocitaria

La formula leucocitaria tiene por objetivo determinar los porcentajes de las distintas clases de leucocitos normales y anormales en la sangre. A partir de los

porcentajes puede calcularse el número real de cada clase de leucocito por mm^3 de sangre (Muñoz, 2005).

Se examinara la lámina a pequeño aumento para comprobar si los elementos celulares están bien distribuidos, si es favorable se examinará con el objetivo de inmersión recorriendo la lámina de arriba hacia abajo o de izquierda a derecha hasta contar 100 leucocitos. Aquí no se incluyen los elementos inmaduros de sangre roja, a medida que se va contando se va anotando el numero de cada una de las clases de glóbulos blancos observados, luego se determinaran los porcentajes de cada uno de ellos (Muñoz, 2005).

Valores hematológicos de referencia (Caninos).

Hemoglobina	12,0-18,0 (g/dl)
Plaquetas	200-500 ($\times 10^3/\mu\text{l}$)
Leucocitos	6,0-17,0 ($\times 10^3/\mu\text{l}$)
Segmentados neutrófilos	60-77 % (3000-11.500/ μl)
Eosinófilos	2-10 % (100-1.250/ μl)
Basófilos	0-1 % (0)
Linfocitos	12-30 % (1.000-4.800/ μl)
Monocitos	3-10 % (150-1.350/ μl) (Lopez, 2008).

Interpretación de resultados:

Evaluación Cualitativa: La identificación de mórulas de *Ehrlichia spp* presentes en las muestras se determinó mediante una evaluación visual de los frotis de sangre periférica, por medio de un microscopio óptico con objetivo de inmersión.

Análisis de los datos:

El tratamiento estadístico que se utilizó para el procesamiento de los datos fueron medidas de tendencia central las que están representadas en tablas de frecuencia absoluta (n) y porcentual (%). Para los parámetros hematológicos, se aplicó el coeficiente de correlación de Pearson, que se utilizó para establecer la relación entre dos valores; no supone establecimiento de casualidad entre ellas, sino el comportamiento de las puntuaciones obtenidas en dos variables estudiadas. Si la p es igual o menor que 0.05 se dice que es estadísticamente significativa, lo que significa que es poco probable que esta correlación se dé por el azar, si la p es mayor que este valor se dice que no es significativa pues ese resultado bien podría observarse por el azar.

RESULTADOS

El estudio que se realizó estuvo representado por 504 muestras de caninos, que se recibieron en el laboratorio para su procesamiento, las muestras sanguíneas fueron extraídas por un profesional de la medicina veterinaria por punción venosa y colocadas en tubos preparados comercialmente con anticoagulante EDTA. A cada muestra se le realizó hematología completa y frotis de sangre periférica teñidos por medio de la coloración de Wright, para la observación de las mórulas o cuerpos de inclusión de *Ehrlichia spp.* en el citoplasma de linfocitos, monocitos y plaquetas en un frotis sanguíneo teñido con la coloración de Wright.

En la tabla 1 se presentan los resultados de la observación de los frotis de sangre periférica de la población estudiada teñidos por medio de la coloración de Wright, en la cual se observó que de las 504 muestras analizadas 51% (n=256) fueron positivas para el diagnóstico de ehrlichiosis por medio de la observación de mórulas de *Ehrlichia spp.*, mientras que el resto de las muestras estudiadas 49% (n= 248), dieron resultados negativos.

En la tabla 2 se puede apreciar el promedio de los cuatro parámetros hematológicos evaluados en las muestras de caninos con diagnóstico positivo o negativo para ehrlichiosis. En cuanto a los valores de hemoglobina (gr/dl), las muestras con diagnóstico negativo para ehrlichiosis presentaron una media de 12,3gr/dl, mientras que en las muestras con diagnóstico positivo para ehrlichiosis 10,4gr/dl. Con respecto a la cifra de leucocitos, las muestras con diagnóstico negativo para ehrlichiosis resultaron con una media de $15 \times 10^3/\mu\text{L}$, mientras que para las muestras con diagnóstico positivo fue de $14,8 \times 10^3/\mu\text{L}$. En cuanto al número de plaquetas, el valor para las muestras con diagnóstico negativo para ehrlichiosis es de

203.7 $\times 10^3/\mu\text{L}$ y las que presentan diagnóstico positivo para ehrlichiosis tienen un valor de 173,7 $\times 10^3/\mu\text{L}$.

Con relación a la distribución del recuento diferencial realizado a las muestras de caninos con diagnóstico positivo y negativo para ehrlichiosis, se observa en la tabla 3 que los neutrófilos alcanzaron un 68 % en los casos positivos y un 73% en los casos negativos, mientras que los linfocitos en los casos positivos obtuvieron valores de 31% y 26% en los negativos, en los eosinófilos los casos positivos y negativos obtuvieron un valor de 1% cada uno.

En la tabla 4 se puede apreciar la comparación de los valores de hemoglobina (gr/dl), evaluados en las muestras de caninos con diagnóstico positivo y negativo para ehrlichiosis. Los valores bajos de hemoglobina (gr/dl), en los caninos con diagnóstico positivo para ehrlichiosis (n=134; 56%) presentaron una media de 8,6gr/dl. los valores normales de hemoglobina (n=118; 48%) una media de 14,3 gr/dl, y los valores altos de hemoglobina (n=4; 22%) una media de 18,6 gr/dl. Mientras que los caninos con diagnóstico negativo con hemoglobina baja (n=105; 44%) presentaron una media de 8,6gr/dl en los valores normales de hemoglobina (n=129; 52%) alcanzaron una media de 14,6 gr/dl y para la hemoglobina alta (n=14; 78%) obtuvieron una media de 19,8 gr/dl.

En la tabla 5 se muestra la comparación de los valores de leucocitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$), entre las muestras de caninos con ehrlichiosis y sanos. En la cual podemos observar que los caninos con ehrlichiosis positivos, tienen un valor bajo de leucocitos (n=16; 47%) presentando una media de 4 $\times 10^3/\mu\text{L}$, en los que mostraron valores normales de leucocitos (n=176; 53%) se observó una media de 11,6 gr/dl y en los que tienen un valor leucocitos alto (n=64; 46%) una media de 26,4 $\times 10^3/\mu\text{L}$. Mientras que los valores bajos de leucocitos en los caninos sanos negativos (n=18; 53%) presentaron una media de 3,6 $\times 10^3/\mu\text{L}$. los que tienen valores normales de

leucocitos (n=155; 47%) presentan una media de $11,6 \times 10^3/\mu\text{L}$ y los caninos con valores altos de leucocitos (n=75; 54%) una media de $24,8 \times 10^3/\mu\text{L}$.

En la tabla 6 se refleja una comparación de los valores de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$), entre las muestras de caninos con ehrlichiosis y sanos, en esta se observa que los caninos con ehrlichiosis positivos, que presentaron un valor de plaquetas por debajo de los rangos de referencia (n=156; 54%) presentaron una media de $71,3 \times 10^3/\mu\text{L}$. $304,5 \times 10^3/\mu\text{L}$, los caninos con valores normales de plaquetas (n=90; 47%) y $593,5 \times 10^3/\mu\text{L}$, los caninos con un valor de plaquetas elevado (n=10; 48%). Mientras que los caninos sanos negativos con un valor de plaquetas bajas (n=135; 46%) presentaron una media de $93,7 \times 10^3/\mu\text{L}$, los caninos con valores normales de plaquetas (n=102; 53%) una media de $302,6 \times 10^3/\mu\text{L}$ y los que poseen valores altos de plaquetas (n=11; 52%) una media de $635,5 \times 10^3/\mu\text{L}$.

Tabla 1

Frecuencia de ehrlichiosis en muestras de caninos.

Casos de Ehrlichiosis	n	%
Positivos	256	51
Negativos	248	49
Total	504	100

Tabla 2

Distribución de valores de parámetros hematológicos en muestras de caninos.

Parámetros hematológicos	Casos de Ehrlichiosis	
	Negativos	Positivos
	Media	Media
Hemoglobina (gr/dl)	12.3	10.4
Leucocitos (10^3 /uL)	15.0	14.8
Plaquetas (10^3 /uL)	203.7	173.7

(p< 0,05) Existen diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 3

Distribución de la fórmula leucocitaria en frotis sanguíneos de sangre periférica de caninos.

Parámetros hematológicos	Casos de Ehrlichiosis	
	negativos	positivos
	Media	Media
Linfocitos (%)	26	31
Neutrófilos (%)	73	68
Eosinófilos (%)	1	1

(p> 0,05) No existen diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 4

Comparación de valores de hemoglobina en muestras de caninos con ehrlichiosis y sanos.

Casos de Ehrlichiosis	Valores de hemoglobina (g/dl)								
	Bajo			Normal			Alto		
	< 12			12-18			> 18		
	n	%	Media	n	%	Media	n	%	Media
Positivos	134	56	8,6	118	48	14,3	4	22	18,6
Negativos	105	44	8,6	129	52	14,6	14	78	19,8
Total	239	100	8,6	247	58	14,4	18	100	19,2

(p< 0,05) Existen diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 5

Comparación de valores de leucocitos en muestras de caninos con ehrlichiosis y sanos.

Casos de Ehrlichiosis	Valores de leucocitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$)								
	Bajo			Normal			Alto		
	< 6			6-17			> 17		
	n	%	Media	n	%	Media	n	%	Media
Positivos	16	47	4,0	176	53	11,6	64	46	26,4
Negativos	18	53	3,6	155	47	11,6	75	54	24,8
Total	34	100	3,8	331	100	11,6	139	100	25,6

($p < 0,05$) Existen diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 6

Comparación de valores de plaquetas en muestras de caninos con ehrlichiosis y sanos.

Casos de Ehrlichiosis	Valores de plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$)								
	Bajo			Normal			Alto		
	< 200($\times 10^3/\mu\text{L}$)			200-500($\times 10^3/\mu\text{L}$)			> 500($\times 10^3/\mu\text{L}$)		
	n	%	Media	n	%	Media	n	%	Media
Positivos	156	54	71,3	90	47	304,5	10	48	593,5
Negativos	135	46	93,7	102	53	302,6	11	52	635,5
Total	291	100	82,5	192	100	303.5	21	100	614,5

($p < 0,05$) Existen diferencias estadísticamente significativas.

DISCUSIÓN

Las hemoparasitosis en caninos son una preocupación de reciente data en Venezuela. Los casos han crecido vertiginosamente a lo largo de pocos años y se han tomado en consideración por su potencial zoonótico (Zanfír y Duno, 2007). La ehrlichiosis es una infección bacteriana febril de tipo zoonótica descrita como una enfermedad emergente en perros, fue reconocida recientemente en seres humanos y afecta mayormente a personas relacionadas con animales portadores de garrapatas o que viven en zonas donde estos se encuentran (Tamí, 2004; Torello, 2003). En la presente investigación se estableció la frecuencia de mórulas de *Ehrlichia spp.* en frotis de sangre periférica de caninos, determinando la presencia de mórulas en extendidos sanguíneos, además de determinación de valores de hemoglobina, leucocitos, plaquetas y el recuento diferencial.

Para este estudio donde se analizaron 504 muestras en total se encontró una frecuencia de observación de mórulas en los frotis de sangre periférica de 256 casos positivos para el diagnóstico de ehrlichiosis, que representan el 51% de la población total de esta investigación, al respecto León *et al.* (2009), en su estudio realizado en el Estado Bolívar, presentó una frecuencia de 50,79% de casos positivos y Zanfír *et al.* (2007), en la ciudad de Caracas, determinó una frecuencia de 55,97% siendo estos valores similares a los obtenidos en este estudio.

En otras investigaciones realizadas, se demuestra que existen distintos porcentajes cuando se refiere al estudio de la presencia de ehrlichiosis, tal es el caso en los resultados de Unver *et al.* (2001), que consiguió una frecuencia de 31%, Tamí *et al.* (1994), donde la frecuencia fue de 32% de perros infectados, Parrado *et al.* (2003) que confirmó 34.6% de casos positivos, Tamí *et al.* (1996), señaló un 33% de positividad en perros internados en clínicas y 65% en perros callejeros, de modo que

se pudieron observar resultados diferentes pero no muy alejados a los de este estudio 51%, según lo señalado por Árraga (2007), Waner y Harrus (2000), esta diferencia puede deberse a que existen lugares donde se producen cambios climáticos durante el año, por lo que la presencia activa de garrapatas se acorta, en cambio, en el trópico las garrapatas están activas durante todo el año, siendo estas zonas endémicas para la enfermedad. Así mismo, Tamí (2003) y León *et al.* (2008), indican que se debe considerar que el diagnóstico y en consecuencia la prevalencia puede diferir dependiendo de el método que se utiliza al estudiar las muestras, siendo la visualización de mórulas en frotis sanguíneos coloreados con Wright el método más económico y confiable disponible en la mayoría de los laboratorios, sin embargo la sensibilidad de este método depende de diversos factores asociados a los equipos, la técnica y el personal profesional.

Según González *et al.* (1994), por medio del laboratorio se describe en la primera semana trombocitopenia en el 85%, leucopenia en el 57% con predominio de linfopenia y anemia en el 50% de casos, entre otras manifestaciones, por lo que es importante resaltar que los valores de hemoglobina en este estudio mantuvieron un promedio de 10,4gr/dl, en los perros portadores de *Ehrlichia spp.*, caso contrario ocurrió en los perros sanos donde la media fue de 12,3gr/dl, representando un valor normal. El promedio de leucocitos se encontró dentro de los valores de referencia establecidos y no hubo mayor relevancia, por su parte la trombocitopenia se hizo evidente al presentar una media de $173.7 \times 10^3/\mu\text{L}$.

En el recuento diferencial se encontró una media de 31% de linfocitos, 68% de segmentados neutrófilos y 1% de segmentados eosinófilos en perros con ehrlichiosis, estos resultados coinciden con el estudio de León *et al.* (2008) donde se señala que obtuvo un recuento total dentro del rango normal con un predominio de neutrófilos y valores de linfocitos de 29%, neutrófilos 67%, monocitos 2% y eosinófilos 2%. Sin embargo, Parrado *et al.* (2003) expresa que estos resultados no

pueden considerarse como estándar para el diagnóstico, debido a la variación que ocurre durante el transcurso de la enfermedad, en el recuento diferencial no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$).

Entre los resultados de los parámetros hematológicos, se observaron 134 casos de anemia que corresponde a un 56%, de perros infectados por *Ehrlichia spp.* Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$) datos que concuerdan con otros estudios (González *et al.*, 1994; Sainz *et al.*, 2002; León *et al.*, 2009). Estas cifras indican

que aún cuando se conoce que los valores de la serie roja, de forma general, descienden durante fases tardías de la enfermedad, la disminución de estos valores, aún en la fase aguda, se explica como resultado de una disminución en la producción de células de la serie roja (León *et al.*, 2008).

Con relación a la leucopenia, esta se presentó en el 47% de los perros con ehrlichiosis, esta frecuencia es variable en diversos estudios realizados a nivel nacional e internacional, al respecto Árraga (1992), en su estudio realizado en Venezuela, presentó una frecuencia de 37,83%, cercana a la de Parrado *et al.* (2003), en Colombia, con un 28,57% de frecuencia de leucocitopenia. Sin embargo, en los resultados de la investigación de León *et al.* (2009), realizados en la misma región de este estudio se presentó 15,63% de frecuencia. Para este parámetro se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) discrepando de los resultados obtenidos por León *et al.* (2009).

Los parámetros hematológicos mostraron como indicador más significativo una clara disminución de las plaquetas, constituyendo el desorden hematológico más común. Los resultados del estudio muestran que el 54% de los perros con ehrlichiosis presentan trombocitopenia haciendo obvia la presencia de esta alteración. Según lo

planteado por Waner (2000), en el análisis clínico, la trombocitopenia, es el hallazgo más común y consistente de la ehrlichiosis canina. Así mismo, lo demuestran Parrado *et al.* (2003) con 89.28% y Árraga (1992) con 81% de frecuencia de trombocitopenia en perros con ehrlichiosis, con respecto a las plaquetas se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) datos que concuerdan con las investigaciones de estos autores mencionados.

CONCLUSIONES

Una vez finalizado el estudio se llegó a las siguientes conclusiones:

- ❖ Se determinó una frecuencia de infección por *Ehrlichia spp.* de 51% por lo que la ehrlichiosis se considera frecuente en la población estudiada.
- ❖ La hemoglobina y las plaquetas fueron los parámetros hematológicos que presentaron más alteraciones, produciendo anemia y trombocitopenia en la población estudiada.
- ❖ El recuento diferencial de los perros que presentan infección por *Ehrlichia spp.* no presenta variaciones significativas con relación a los perros sanos (sin ehrlichiosis).

RECOMENDACIONES

- ❖ Elaborar programas nacionales e internacionales de prevención y manejo de perros portadores de garrapatas que incluyan elementos de vigilancia, difusión de información, orientación, concienciación y detección de la enfermedad; para el manejo de animales además del cuidado de las personas que se encuentran en torno a ellos y así la reducir la morbi-mortalidad.
- ❖ Enseñar a la población en general a tomar en cuenta las precauciones sencillas encaminadas a reducir el riesgo de exposición a la garrapata, que incluyen evitar las zonas infestadas con garrapatas, llevar ropas adecuadas como barrera, usar repelentes para garrapatas y quitarse con prontitud y de manera cuidadosa las garrapatas adheridas, disminuirán el riesgo de contraer la enfermedad.
- ❖ Educar a los dueños de animales a dar importancia y brindar auxilio médico ante cualquier eventualidad que presente el animal, sobre todo en lo relacionado a las infecciones causadas por ectoparásitos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anda, P., Blanco, J., Jado, I., Marín, M., Oteo, J., Pons, I., *et al.* 2007. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por patógenos bacterianos emergentes: *Anaplasma*, *Bartonella*, *Rickettsia*, *Tropheryma whipplei*. [En línea]. Disponible: <http://www.seinc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap27.asp>. [Enero, 2009].

Anónimo. 2008. Extendido de sangre periférica. [En línea]. Disponible: <http://cucuta.udes.edu.co/PBacteriologia/pdf/ESP.pdf?PHPSESSID=d481530056e30ec9ed2187ea86e5c86b>. [Febrero, 2009].

Árraga, C. 1992. Ehrlichiosis canina en Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela, Reporte de 55 casos. Rev Científica. FCV de LUZ. [En línea]. 2 (2): 30 - 40. Disponible: <http://www.fcv.luz.edu.ve/Pdf/1992/02/articulo6.pdf>. [Junio, 2009].

Árraga, C. 2006. Ehrlichia tambien en humanos. Reposición. [En línea]. Disponible: <http://elperrunodigital.blogspot.com/2006/02/la-ehrlichia-tambin-en-humanos.html>. [Abril, 2009].

Árraga, C. 2007. Ehrlichiosis en caninos y felinos. reposicion. [En línea]. Disponible: <http://elperrunodigital.blogspot.com/2006/05/ehrlichiosis-en-caninos-yfelinos.html>. julio 07. [Abril, 2009].

Behrman. R., Kliegman, R. y Hal, B. 2004. Nelson Tratado de Pediatría. Elsevier. España. 17^a edic. 2618 páginas.

Druger, L. 2004. garrapatapardadelperro.[en linea]. Disponible: <http://www.zoetecno campo.com/foro/forum1/HTML/00051.html>. [junio, 2009]

Dumler, J., Barbet, A., Bekker, C., Dasch, G., Palmer, G., Ray, S., *et al.* 2001. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'he agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, [Serie en línea] **51** 2145–2165. Disponible: http://ijs.sgmjournals.org/cgi/search?sortspec=relevance&journalcode=ijs&author1=Dumler+J.S&fulltext=&pubdate_year=2001&volume=51&firstpage=2145. [Enero, 2009].

García, V. 2005. Introducción a la microbiología. [En línea]. Disponible: http://books.google.co.ve/books?id=K_ETVnqnMZIC&dq=rickettsias&source=gbsu mmary_s&cad=0. [Febrero, 2009].

González, A., Palaviccini, Z., Lleras, A. 1994. Ehrlichiosis y toxocariasis enfermedades rara o raramente reconocidas. Boletín méd Postgrado [En línea].**10**(3). [Serie en línea]. [http://bibmed.ucla.edu.ve/EDOCS_PSM_UCLA/BM1003/ BM100313.pdf](http://bibmed.ucla.edu.ve/EDOCS_PSM_UCLA/BM1003/BM100313.pdf). [Mayo, 2009].

Guerrant, R., Walker, H. y Weller, P. 2002. Enfermedades infecciosas tropicales. Publicado por Elsevier España. España .684 páginas (298-299).

Hoyos, L., Li, O., Alvarado, A., Suárez, F. y Díaz, D. 2007. Evaluación del examen hematológico en el diagnóstico de ehrlichiosis canina. Rev Inv Vet Perú [En

línea]. **18** (2): 129-135 Disponible: http://sisbib.unmsm.edu.pe/BvRevistas/veterinaria/v18_n2/pdf/a07.pdf. [Enero, 2009].

Kujman, S., Sepiurka, L. y Greco, S. 2005. Hemoparásitos transmitidos por garrapatas. [En línea]. Disponible: <http://www.veterinariosenweb.com/revista/capitulo13/nota2.html>. [Mayo, 2009]

Larenas, J., Contreras, J. y Smith, P. 1998 Noviembre. Infecciones rickettsiales en peces.[En línea]. Disponible: <http://www.revistaaquatic.com/index.asp?p=aquatic/art.asp?c=54> . [Febrero, 2008]

León, A., Demedio, J., Márquez, M., Castillo, E., Perera, A., Zuaznaba, O., *et al.* 2008. Diagnóstico de Ehrlichiosis en caninos en la ciudad de La Habana. RECVET. [En línea] **3** (5).1-22. Disponible: <http://www.veterinaria.org/revistas/recvet/n050508.html>. [Julio 2009].

León, L., Romero, A., Tepedino, M., Amaya, I. 2009. *Ehrlichia spp.* en perros domésticos en el Centro Veterinario IMPROA de Ciudad Bolívar, Estado Bolívar. Tesis de grado. Departamento de Parasitología y Microbiología. Escuela de Ciencias de la Salud “Dr. Francisco Virgilio Battistini Casalta. Bolívar. Universidad De Oriente. 29 pág. (Multígrafo).

Ley de Ejercicio Del Bioanálisis. 7/1973, de 20 de julio, Del ejercicio del Bioanálisis. Gaceta Oficial De La República De Venezuela. Número 30.160. 23, de julio de 1973.

López, D. 2008. Valores de referencia. [En línea]. Disponible: http://www.dlvlaboratorioveterinario.com/index_archivos/page0001.htm. [Abril, 2009]

López, J., Rivera, M., Concha, J., Gatica, S., Loeffeholz, M. y Barriga, O. 2003. Ehrlichiosis humana en Chile: evidencia serológica. Rev. méd. Chile [Serie en línea]. **131** (1): 67-70. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003498872003000100010&lng=es&nrm=iso >. ISSN 0034-9887. [Enero, 2009]

Lorente, C., Sainz, A. y Tesouro, M. 2004. Evaluación hematológica e inmunofenotípica de la “ehrlichiosis canina”: evolución tras la administración de “dipropionato de imidocarb”. Tesis de grado. Departamento de Medicina y Cirugía Animal. Facultad De Veterinaria. Madrid. Universidad Complutense De Madrid. 307 pág. (Multígrafo).

Mandaluniz, N., García, A., Barral, M. y Juste, R. 1997. Desarrollo de un protocolo de PCR para la detección de *Ehrlichia phagocytophila*. Primer estudio de prevalencia en el vector. [En línea] Disponible: <http://personal.redestb.es/~rajuste/epha03.htm> [Mayo, 2009].

Muñoz, M. y Morón, C. 2005. Manual de procedimientos de laboratorio en técnicas básicas de hematología. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud. Peru.2005. [En línea]. Disponible: <http://www.scribd.com/doc/3476365/-Manual-de-procedimientos-de-laboratorio-en-tecnicas-basicas-de-hematologia>. [Febrero, 2009].

Murray, P., Rosenthal, K., Kobayashi, G., Pfaller, M. 2006. Microbiología Médica. 5ta ed. Edit. Edit. Elsevier España. 810 páginas.

Parrado, M., Vargas, F., Hernández, G. y Vergara H. 2003. Asociación de los resultados de una prueba serológica (ELISA) y frotis sanguíneos en caninos con sintomatología compatible con ehrlichiosis. Orinoquia. [En línea] **7** (1-2): 6-11. Disponible: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/896/89670202.pdf>. [Julio, 2009].

Pérez, M., Rikihisa, Y. y Wen, B. 1996. *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: Antigenic and genetic characterization. J Clin Microbiol. [Serie en línea] **34** (9): 2133-2139. Disponible: <http://jcm.asm.org/cgi/reprint/34/9/2133.pdf>. [Marzo, 2009]

Rey, J., Lord, C. y Rutledge, R. 2002. Ehrlichia en florida. [En línea]. Disponible: <http://edis.ifas.ufl.edu/IN422>. [Enero, 2009] Sainz, A. 2002. Clinical and Therapeutic Aspects of Canine Ehrlichiosis. College of Veterinary Medicine, Complutense University of Madrid Spain. [En línea]. Disponible: <http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2002&PID=2595>. [Junio, 2009].

Sainz, A., Amusategui, I., Rodríguez, F. y Tesouro, M. 2007. Las ehrlichiosis en el perro: presente y futuro. [En línea]. Disponible: <http://www.mevepa.cl/modules.php?name=News&file=article&sid=201>. [Marzo, 2009].

Simón, C. 2009. Ehrlichiosis. [En línea]. Disponible: <http://www.mevepa.cl/modules.php?name=News&file=article&sid=590>. [Junio, 2009].

Tamí, I. y Jordán, L. 2002. Identificación de mórulas de *Ehrlichia* en plaquetas de sangre humana en Venezuela. Antib e Inf . [Serie en línea]. **10** (3):123-128. Disponible: http://www.mikrosdigital.com/revista/V10-3/V103_4.pdf. [Febrero, 2009].

Tamí, I.C. y Tamí, I.M. 2004. Identificación morfológica de *Ehrlichia sp.* en las plaquetas de pacientes con infección por virus de la inmunodeficiencia humana, en Venezuela. Rev Panam Salud Pública. [Serie en línea] **16** (5): 345-349. Disponible: http://revista.paho.org/?a_ID=326 . [Febrero, 2009].

Tamí, J. 2003. Ehrlichiosis humana: *Ehrlichia* trombocítica en sangre periférica. Rev. Soc.Ven. Microbiol. [Serie en línea]. **23** (2): 135-141. Disponible: <http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S131525562003000200007&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1315-2556. [Marzo, 2009].

Unver, A., Perez M., Orellana, N., Huang, H. y Rikihisa, Y. 2001. Molecular and antigenic comparison of the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a deer tick-roedent cycle. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. [Serie en línea]. 39 (8): 2788-2793. Disponible: <http://jcm.asm.org/cgi/content/short/39/8/2788>. [Mayo, 2009].

Ventura, J. 2009. La incidencia de enfermedades caninas transmitidas por vectores va en aumento. [En línea]. Disponible: <http://argos.portalveterinaria.com/noticia.asp?ref=2031>. [Enero, 2009].

Waner, T. y Harrus, S. 2000. Ehrlichiosis monocítica canina. [En línea]. Disponible: http://www.ivis.org/advances/Infect_Dis_Carmichael/waner_es/ivis.pdf. [Abril, 2009].

Wikipedia. 2008. Fiebre bobina por garrapatas. [En línea]. Disponible: http://es.wikipedia.org/wiki/Fiebre_bovina_por_garrapatas. [Marzo, 2009]

Zanfir, D. y Duno, F. 2007. Análisis retrospectivo de ehrlichiosis canina Periodo enero-diciembre.2004.en el consultorio veterinario Pro-Avícola Catia, Municipio Libertador, Distrito Capital, Caracas. Tesis de grado. Dpto de Sanidad Animal, Complejo Académico "Ing. Agr. José Rodolfo Bastidas". Coro. UNEFM. 90 pág. (Multígrafo).

Zapata, W. y Fajardo, H. 1999. Manual de química sanguínea veterinaria. [En línea]. Disponible: <http://www.monografias.com/trabajos/quimsangvet/quimsangvet.shtml>. [Abril, 2009].

Apéndice A

- Boleta de datos:

Identificación del espécimen

PARAMETROS	RESULTADOS	OBSERVACIONES
Hemoglobina		
Hematocrito		
Leucocitos		
Plaquetas		

FORMULA LEUCOCITARIA	RESULTADOS	OBSERVACIONES
Neutrófilos (%)		
Linfocitos (%)		
Eosinófilos (%)		
Monocitos (%)		
Basófilos (%)		

	POSITIVO	NEGATIVO
<i>Ehrlichia spp.</i>		

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/5

Título	MÓRULAS DE <i>Ehrlichia spp.</i> EN FROTIS DE SANGRE PERIFÉRICA DE CANINOS. CIUDAD BOLÍVAR, ESTADO BOLÍVAR.
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
MARCANO M., ANNY E.	CVLAC	
	e-mail	vodquita@hotmail.com
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

[illegible]

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/5

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
HEMATOLOGÍA	HEMATOLOGÍA

Resumen (abstract):

La ehrlichiosis es una enfermedad producida por bacterias del género *Ehrlichia*, son microorganismos Gram negativos, intracelulares obligados y pleomórficos, que parasitan leucocitos circulantes de animales y humanos. Es transmitida por garrapatas que al picar, introducen la bacteria que invade leucocitos y plaquetas, donde se multiplica originando una mórula, visible al microscopio óptico. El objeto del trabajo es la identificación del microorganismo mediante frotis de sangre periférica. Se estudiaron 504 muestras de sangre de caninos que fueron enviadas al Laboratorio Clínico “Nuestra Señora de Las Nieves”, de Ciudad Bolívar, Estado Bolívar. A todas las muestras recolectadas se les realizó hematología completa y diagnóstico de hemoparásitos, mediante revisión minuciosa del frotis, coloreado con Wright. Se identificaron, por frotis, mórulas en 259 muestras de las 504 estudiadas, con una prevalencia de 51%. Las variables hematológicas con alteraciones estadísticamente significativas ($p < 0,05$), fueron la hemoglobina 56%, los leucocitos 46% y las plaquetas 54% en los casos positivos. En conclusión, se determinó una elevada prevalencia de infección por *Ehrlichia spp.*, en las muestras de perros estudiados.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/5

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail
Lcda.Tepedino Maria E.	ROL CA ☐ AS ☒ TU ☐ JU ☒
	CVLAC
	e-mail metepedino@hotmail.com
	e-mail
Lcda. Farrera Angélica.	ROL CA ☐ AS ☐ TU ☒ JU ☒
	CVLAC
	e-mail farreraangelica@gmail.com
	e-mail
Lcda. Romero Mercedes.	ROL CA ☐ AS ☐ TU ☐ JU ☒
	CVLAC
	e-mail
	e-mail
	ROL CA ☐ AS ☐ TU ☐ JU ☐
	CVLAC
	e-mail
	e-mail

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2009	08	07

Lenguaje: SPA

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/5

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis.Mórfulas	.doc

Alcance:

Espacial : Laboratorio “Nuestra Señora de las Nieves”

Temporal: 6 meses

Título o Grado asociado con el trabajo: LICENCIADO EN BIOANÁLISIS.

Nivel Asociado con el Trabajo: LICENCIATURA

Área de Estudio: DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

UNIVERSIDAD DE ORIENTE

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/5

Derechos:

De acuerdo al artículo 44 del reglamento de trabajos de grado

**“Los trabajos de grado son exclusiva propiedad de la
Universidad de Oriente y solo podrán ser utilizadas a otros
fines con el consentimiento del consejo de núcleo respectivo,
quien lo participara al Consejo Universitario”**



AUTOR 1

Br. Marcano M., Anny E.

AUTOR 2

AUTOR 3



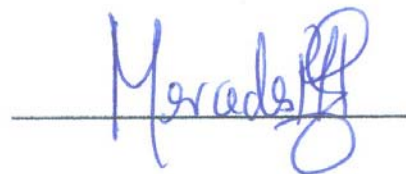
TUTOR

Lcda. Tepedino María E.



JURADO 1

Lcda. Farrera Angélica



JURADO 2

Lcda. Romero Mercedes

POR LA SUBCOMISIÓN DE TESIS:
