

1-1-2016

Niveles de troponina I (TnIc) y su correlación con la positividad por PCR a ehrlichia canis., en individuos caninos de una clínica veterinaria en Villavicencio, Meta

Clarena Emilse Polo Eraso
Universidad de La Salle, Bogotá

Luís Guillermo Villa López
Universidad de La Salle, Bogotá

Follow this and additional works at: https://ciencia.lasalle.edu.co/maest_ciencias_veterinarias

Citación recomendada

Polo Eraso, C. E., & Villa López, L. G. (2016). Niveles de troponina I (TnIc) y su correlación con la positividad por PCR a ehrlichia canis., en individuos caninos de una clínica veterinaria en Villavicencio, Meta. Retrieved from https://ciencia.lasalle.edu.co/maest_ciencias_veterinarias/59

This Tesis de maestría is brought to you for free and open access by the Facultad de Ciencias Agropecuarias at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Maestría en Ciencias Veterinarias by an authorized administrator of Ciencia Unisalle. For more information, please contact ciencia@lasalle.edu.co.

UNIVERSIDAD DE LA SALLE
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS VETERINARIAS



NIVELES DE TROPONINA I (TnIc) Y SU CORRELACIÓN CON LA
POSITIVIDAD POR PCR A *EHRlichia canis.*, EN INDIVIDUOS CANINOS DE
UNA CLÍNICA VETERINARIA EN VILLAVICENCIO META

Redactado por:

CLARENA EMILSE POLO ERASO

LUIS GUILLERMO VILLA LÓPEZ

Trabajo de grado como requisito para optar el título de
Magister en Ciencias Veterinarias

Director

PEDRO VARGAS PINTO, M.V., M.Sc., Ph.D.

Bogotá, junio

2016

UNIVERSIDAD DE LA SALLE
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
MAESTRIA EN CIENCIAS VETERINARIAS



NIVELES DE TROPONINA I (TnIc) Y SU CORRELACIÓN CON LA
POSITIVIDAD POR PCR A *EHRlichia canis.*, EN INDIVIDUOS CANINOS DE
UNA CLINICA VETERINARIA EN VILLAVICENCIO META.

Redactaron:

CLARENA EMILSE POLO ERASO
LUIS GUILLERMO VILLA LÓPEZ

Director

PEDRO VARGAS PINTO, M.V., M.Sc., Ph.D.

Bogotá, junio

2016

APROBACIÓN

DIRECTOR

Dr. Pedro Vargas Pinto

JURADO

Dr. Vladimir Galindo Zamora

JURADO

Dr. Frank Suárez

JURADO

Dr. Javier Fernando Rivas Guerrero

DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD DE LA SALLE

RECTOR	Hno. Carlos Gabriel Gómez Restrepo
VICERRECTOR ACADÉMICO	Hno. Carlos Carvajal Costa
VICERRECTOR DE PROMOCIÓN Y DESARROLLO HUMANO	Hno. Frank Leonardo Ramos Baquero
VICERRECTOR ADMINISTRATIVO	Dr. Eduardo Ángel Reyes
VICERRECTOR DE INVESTIGACIÓN Y TRANSFERENCIA	Dr. Luis Fernando Ramírez Hernández
DECANO FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS	Dra. Claudia Aixa Mutis Barreto
SECRETARIO ACADÉMICO	Dr. Alejandro Tobón González
DIRECTOR DE POSGRADOS	Dr. Ernesto Andrés Dalmau Barros

COMPROMISO

Los trabajos de grado no contienen ideas que sean contrarias a la doctrina católica en asuntos de dogma y moral.

Ni la Universidad, ni el director, ni el jurado calificador son responsables de las ideas expuestas por el graduando.

DEDICATORIA

A nuestras familias que nos animaron, impulsaron y tuvieron la paciencia necesaria para permitir que culmináramos tan importante proyecto profesional como es esta Maestría en Ciencias Veterinarias.

A nuestros compañeros de Maestría Diego, Geraldine, Cristina con quienes intercambiamos experiencias y conocimientos profesionales, además, de compartir con nosotros en la academia, gran cantidad de momentos gratos y algunos no tan gratos, los que afianzaron nuestra relación de compañeros y profesionales durante los dos años de estudios transcurridos.

A nuestros profesores en especial Los Doctores Pedro, César, Liliana, Frank, Vladimir, Javier, que gracias a su vocación, esfuerzo, discernimiento y dedicación nos transmitieron su conocimiento y experiencia por lo que estamos seguros que hoy hemos ascendido un gran escalón en esta disciplina que nos apasiona y agregando otro hecho tangible que se refiere al afianzamiento de nuestro espíritu como profesionales íntegros.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a nuestro director de Trabajo de grado, Doctor Pedro Vargas Pinto por confiar en nosotros, quién además nos orientó, en nuestra labor investigativa de manera permanente y constante.

A la Doctora Adriana Martínez por su asesoría y colaboración amplia y permanente en el laboratorio de Annar Diagnóstica, en lo que se refiera al procesamiento de las pruebas de Troponina I.

A la Doctora Arlen Patricia Gómez por su asesoría en el laboratorio de Biología molecular Universidad de la Salle referente a las pruebas para diagnóstico por PCR.

Al Doctor Andrés Felipe Santander por su asesoría en el laboratorio de Biología Molecular Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de la Salle en lo que se refiere a las pruebas para diagnóstico por PCR.

Al Doctor Cesar Augusto Díaz por su asesoría y colaboración durante el desarrollo del proyecto en la parte estadística y análisis de los resultados.

RESUMEN

La *Ehrlichia canis*, es una enfermedad hemoparasitaria de amplia propagación en Colombia, de presentación frecuente en zonas tropicales y climas cálidos, como en la ciudad de Villavicencio donde se realizó esta investigación. La ehrlichiosis se caracteriza por producir en caninos, alteraciones celulares a diferentes órganos. Estudios reportan, la implicación de éste patógeno en lesiones del corazón, concretamente los cardiomiocitos, comprobadas con aumentos en las concentraciones de troponina I en suero de caninos infectados con *Ehrlichia canis* (*E. canis*).

Por lo anterior el objetivo de esta investigación fue valorar los niveles troponina I (TnIc), como prueba predictiva de posible lesión cardiaca a futuro, en dos grupos de individuos caninos denominados (G1) o controles (n=20) y otro grupo (G2) o individuos sospechosos de manifestar Ehrlichia (n=40), confirmados por la prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y su correlación con posible lesión en los cardiomiocitos.

En la primera fase de la investigación se eligieron los individuos del G1 y G2 de la Clínica Veterinaria G & C de Villavicencio. Su selección se sustentó en el análisis clínico y hematológico, además de criterios de inclusión como, la edad, reporte de infestación por garrapatas y el estado febril. En la segunda fase, a partir de las muestras de sangre entera, se diagnosticó, mediante PCR, la presencia o no de la *E. Canis* en el total de los individuos incorporados al estudio. En la tercera fase, se realizó la valoración de la TnIc a partir del suero obtenido de las muestras de sangre de los G1 y G2.

Los resultados de la investigación descubren, en los individuos considerados clínica y hematológicamente controles G1 la presencia de *E. canis* por PCR en (6/20) individuos y en (14/20) se confirmaron sanos o Ehrlichia PCR-negativos. En el G2 de individuos con alteraciones presuntamente de *E. Canis solo* (17/40) se confirmaron PCR-positivos, mientras que (23/40) fueron PCR-negativos a *E. canis*

Los valores de TnIc del G1 (14/20), fueron $-0.1143\text{ng/ml} \pm 0.30$ niveles que están dentro de los rangos reportados por estudios anteriores. Para los individuos del G2 (17/40) positivos a *E. canis* los niveles de TnIc fueron de $0.2412 \text{ ng/ml} \pm 0.47$, encontrando diferencia significativa ($p=0.0478$) entre estos dos grupos. Este valor de TnIc para los positivos a *E. canis* del G2 fue el más alto de todos los grupos de esta investigación, confirmando así la lesión activa en los cardiomiocitos de individuos caninos, asociada con *E. canis*. Adicionalmente, en los resultados del hemograma los valores de hemoglobina, hematocrito y plaquetas fueron menores en individuos del G2-PCR positivos a *E. canis*, confirmando los reportes previos. Esta investigación determina la presencia a largo plazo de lesiones miocárdicas en individuos con enfermedad hemoparasitaria contribuyendo así al estudio de la enfermedad cardiovascular en zonas tropicales y la fisiopatología de *E. canis*

Palabras clave: Individuos, *Ehrlichia canis*, Hemograma, PCR, TnIc

ABSTRACT

Canis Ehrlichia, hemoparasitism disease is widespread in Colombia, present in tropical and warm climates, such as in the city of Villavicencio, where this research was done. Ehrlichiosis is characterized by producing in dogs, cellular alterations to different organs. Studies report, the involvement of this pathogen in heart lesions, particularly cardiomyocytes, showing increases in serum concentrations of troponin I in patients infected with *Ehrlichia canis* (*E. canis*) dogs.

The objective of this research was to evaluate the levels of troponin I (cTnI) as a predictive test for possible cardiac injury in the future, in two groups of canine's individuals (G1) or controls (n = 20) and another group (G2) or individuals suspected of manifesting Ehrlichia (n = 40), confirmed by test polymerase chain reaction (PCR) and its correlation with possible injury in cardiomyocytes.

In the first phase of the research individuals G1 and G2 of G & C Veterinary Clinic is selected Villavicencio. Are selected by clinical and hematological analysis, inclusion criteria, age, ticks infestation reporting and fever. In the second phase, in blood samples from all study subjects by PCR presence or absence of *E. canis* was diagnosed. In the third phase, the concentration of cTnI in serum from blood samples of G1 and G2 is evaluated.

In the results, the presence of *E. canis* by positive PCR (6/20), G1 individuals considered healthy controls and hematologically, while in (14/20) individuals are confirmed negative PCR. G2 of the suspects, individuals with *E. canis* (17/40) were confirmed PCR-positive, while (23/40) were PCR-negative *E. canis*

cTnI values G1 (14/20) were $-0.1143\text{ng} / \text{ml} \pm 0.30$ levels are within the ranges reported by previous studies. For individuals of G2 (17/40) *E. canis* positive cTnI levels were $0.2412 \text{ ng/ml} \pm 0.47$, finding significant difference ($p = 0.0478$) between these two groups. This value of cTnI positive for *E. canis* G2 was the highest of all groups in this investigation this confirms the active lesion in canine cardiomyocytes individuals associated with *E. canis*. Additionally, red blood cells count plus hemoglobin, hematocrit and platelet counts were lower in *E. canis* G2-PCR positive dogs confirming previous reports.

This research determines long-term myocardial lesions present in individuals with disease hemoparasitism, is a contribution to the study of cardiovascular disease in tropical areas and to physiopathology of *E. canis*.

Keywords: individuals, *Ehrlichia canis*, blood count, CRP, cTnI.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	19
2. MARCO TEÓRICO.....	22
2.1 Sintomatología.....	23
2.2 Fisiopatología.....	24
2.3 Diagnóstico.....	26
2.3.1 Diagnóstico mediante PCR.....	27
2.3.2 Marcadores de daño miocárdico.....	28
3. METODOLOGÍA.....	32
3.1 Lugar de realización del estudio.....	32
3.2 Población y muestra.....	32
3.2.1 Criterios para la selección de los individuos.....	33
3.3 Métodos y procedimientos.....	34
3.3.1 Técnicas de laboratorio.....	36
3.4 Diseño y análisis estadístico.....	45
4. RESULTADOS.....	47
4.1 Caracterización G1.....	47
4.1.1 Distribución por edad.....	48
4.1.2 Distribución por sexo.....	49

4.1.3	<i>Distribución de los individuos clasificados por raza.....</i>	49
4.1.4	<i>Motivo de consulta por edad para los individuos del G1</i>	50
4.1.5	<i>Parámetros clínicos los individuos del G1.....</i>	51
4.1.6	<i>Pruebas diagnósticas PCR y Tnlc.....</i>	53
4.2	<i>Caracterización de individuos del G2</i>	55
4.2.1	<i>Distribución por edad.</i>	55
4.2.2	<i>Distribución por sexo.</i>	56
4.2.3	<i>Distribución de individuos clasificados por raza.....</i>	57
4.2.4	<i>Motivo de la consulta individuos del G2.....</i>	58
4.2.5	<i>Parámetros clínicos de los individuos del G2.....</i>	59
4.3	<i>Prueba diagnóstica PCR</i>	61
4.3.1	<i>Análisis y estadística descriptiva de la PCR.....</i>	61
4.3.2	<i>Relación PCR respecto a las variables cuantitativas, cualitativas y fisiológicas de individuos del G2.....</i>	62
4.3.3	<i>Relación de la PCR respecto a las variables sanguíneas de individuos del G2.....</i>	64
4.4	<i>Prueba de la Tnlc.....</i>	68
4.4.1	<i>Relación de Tnlc respecto variables cualitativas y cuantitativas.</i>	68
4.4.2	<i>Relación entre las pruebas de la Tnlc y la PCR.</i>	69
5	<i>DISCUSIÓN</i>	70

6	CONCLUSIONES.....	79
7	REFERENCIAS.....	81
8	ANEXOS	89

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Valores de referencia para el cuadro hemático considerado normal	36
Tabla 2. Clasificación porcentual por edades en meses de los individuos del G1	49
Tabla 3. Distribución porcentual por sexos del total de los individuos del G1.....	49
Tabla 4. Distribución porcentual de los individuos del G1 por razas.....	50
Tabla 5. Estadística descriptiva de constantes fisiológicas en individuos del G1..	52
Tabla 6. Estadística descriptiva de algunos parámetros de línea roja individuos G1.	52
Tabla 7. Estadística descriptiva de algunos parámetros de línea Blanca individuos del G1.	53
Tabla 8. Estadística descriptiva practicada a los resultados de Tnlc y PCR.....	55
Tabla 9. Distribución porcentual por edades de los individuos del G2	56
Tabla 10. Composición por sexos de individuos G2.....	56
Tabla 11. Organización porcentual por razas de individuos del G2	57
Tabla 12. Presentación de la estadística descriptiva relacionada con las constantes fisiológicas de los 40 individuos del G2.....	60
Tabla 13. Estadística descriptiva hemograma línea roja y línea blanca de los 40 individuos G2.	60
Tabla 14. Algunos parámetros fisiológicos y sanguíneos de individuos del G2-PCR positivos y negativos	62
Tabla 15. Comparación temperatura entre el G1 y individuos del G2-PCR positivos y negativos.....	63

Tabla 16. Comparación del hematocrito entre los G1 y G2 (PCR negativos positivos).....	65
Tabla 17. Parámetros del PCR respecto a la hemoglobina del G2.....	65
Tabla 18. Comparativo entre Glóbulos rojos de individuos del G1 y individuos del G2 (PCR negativos y positivos).....	66
Tabla 19. Comparativo de las Plaquetas entre individuos del G1 y individuos del G2 (PCR negativos y positivos).....	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. (A) Equipo Nano Drop 2000® para determinare la concentración de ADN en Nanómetros, (B) Colocación de la gota muestra, (C) Lectura.....	38
Figura 2. (A) Termociclador C1000 Thermal Cycler® que se utilizó para el proceso del PCR. (B) Muestras extraídas del Termociclador listas para el proceso de electroforesis.....	39
Figura 3. (A) Vertimiento del gel de agarosa en la cámara de electroforesis marca Labnet®. (B) Aplicación de las muestras en los pozos (C) conexión a la corriente eléctrica, (D) funcionamiento de la cámara de electroforesis.	41
Figura 4. Transiluminador U-2225-2Transilluminators White/UV utilizado para realizar la lectura del gel de agarosa.....	42
Figura 5. Gel de electroforesis preparado para la lectura e interpretación.....	43
Figura 6. (A) Muestras de sangre usadas para el proceso de Tnlc, (B) Kit Accu Bind Elisa Micro Wells para la prueba mencionada.....	43
Figura 7. (A) Muestras de sangre para el proceso (B) Mezcla antígeno anticuerpo, (C) Incubación de las mezclas, (D) lectura de resultados.....	44
Figura 8. Distribuciones individuos del G1 por raza.	50
Figura 9. Motivo de consulta por edad para los individuos del G1.....	51
Figura 10. Niveles de troponina ng/ml de los G1 por edad en meses.....	54
Figura 11. Motivo de consulta individuos del G2	58
Figura 12. Comparativo de las temperaturas obtenidas de los individuos del G1 y individuos del G2.	63

Figura 13. Comparativo del Hematocrito entre individuos del G1 y individuos del G2 PCR negativos y positivos.	64
Figura 14. Comparativo de la Hemoglobina entre individuos del G1 y individuos del G2 (PCR negativos y positivos).....	65
Figura 15. Comparativo entre Glóbulos rojos de individuos del G1 y individuos del G2 (PCR negativos y positivos).....	66
Figura 16. Comparativo del valor obtenido de plaquetas entre individuos del G1 y individuos del G2 (PCR negativos y positivos).	67
Figura 17. Resultado de la prueba de troponina en individuos del G2.....	68
Figura 18. Relación de Tnlc con respecto a PCR de individuos del G2.....	69

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Formato de consentimiento informado	89
Anexo 2. Documento de aprobación Comité de Ética Universidad de la Salle	90
Anexo 3. Formato de historia clínica	91
Anexo 4. Descripción sobre el método para la toma de muestras de los individuos incluidos en el estudio.....	92
Anexo 5. Materiales, método y Protocolo de preparación de muestras y extracción de ADN de sangre canina.	94
Anexo 6. Método de la PCR anidada para la determinación de E. canis en Thermociclador.	97
Anexo 7. Descripción del procedimiento de la electroforesis de ADN en gel de agarosa.....	100
Anexo 8. Procedimientos para diagnóstico de la (Tnlc).....	104
Anexo 9. Tabla relacionando los individuos G1 y el motivo de consulta	110
Anexo 10. Tabla con la relación entre los resultados obtenidos de los cuadros hemáticos practicados a individuos del G1.	111
Anexo 11. Tabla relacionando las constantes fisiológicas de individuos del G1 incluidos en el estudio.....	112
Anexo 12. Tabla con el registro de los resultados obtenidos del hemograma, PCR y Tnlc referente al G1.	113
Anexo 13. Tabla con la relación de los resultados obtenidos de la prueba PCR practicada en el G1.....	114

Anexo 14. Tabla de lecturas de la absorbancia respecto a la concentración del ADN en equipo Nano Droop®.	115
Anexo 15. Tabla presentando los valores de Tnlc ng/ml obtenidos de las muestras del G1.	116
Anexo 16. Tabla relacionando los datos básicos de los individuos G2.	117
Anexo 17. Tabla relacionando las constantes fisiológicas y motivo de consulta de los individuos del G2.	118
Anexo 18. Tabla con las constantes fisiológicas de los individuos del G2.	119
Anexo 19. Tabla relacionando el cuadro hemático de los individuos del G2.	120
Anexo 20. Tabla concentración del ADN (<i>absorbancia ng/μl</i>) del G2.	121
Anexo 21. Tabla con los resultados de la prueba de PCR realizada a las muestras del G2.	122
Anexo 22. Estadística descriptiva relacionada con las constantes fisiológicas de 17 individuos G2-PCR positivos.	123
Anexo 233. Estadística descriptiva de las constantes fisiológicas de los 23 individuos G2-PCR negativos.	123
Anexo 24. Estadística descriptiva para el hemograma de los 17 individuos G2-PCR positivos.	123
Anexo 25. Estadística descriptiva del cuadro hemático para los 23 individuos G2-PCR negativos.	124
Anexo 26. Tabla relacionando los resultados de la prueba de Tnlc, en el G2. ...	124

1. INTRODUCCIÓN

La Ehrlichiosis canina se encuentra presente en zonas tropicales y subtropicales del mundo, de igual manera en una extensa área del territorio colombiano debido a su ubicación meridional. Se trata de una infección que se presenta con alta frecuencia en la especie canina y es causada específicamente por la *Ehrlichia canis* (*E. canis*), una bacteria Gram-negativa, cuyo genogrupo involucra tres especies capaces de infectar a los individuos: *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia ewingii* y *Ehrlichia chaffeensis*, las cuales se denominan en su conjunto como *Ehrlichia spp* (Kocan et al., 2000). Actualmente, se conoce que las *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii* y *Ehrlichia platys*, pueden desencadenar lesiones y anormalidades clínico patológicas en individuos y otros animales (Benavides y Ramírez, 2003).

La *Ehrlichia canis* tiene tropismo definido por monocitos y polimorfonucleares. La enfermedad se manifiesta de manera multisistémica con sintomatología difusa y se le ha dado el nombre de Ehrlichiosis Monocítica Canina (EMC) (Rojas et al., 2013; Weinborn et al., 2012). De igual manera la evidencia actual sugiere que *Ehrlichia canis*, puede causar daño o alteración miocárdica (Koutinas et al., 2012).

Al ser la *Ehrlichia spp.*, causante de lesiones multisistémicas, entre las que se puede presentar la lesión a los cardiomiocitos, es importante el uso de los métodos diagnósticos y pruebas que permitan valorar la presencia de estas lesiones. Como el biomarcador de la Tnlc altamente sensible, específico y de uso común en los laboratorios clínicos de diagnóstico humano en Colombia. Esta prueba se utiliza rutinariamente para el diagnóstico de lesión cardíaca aguda en humanos y con buenos resultados en el diagnóstico precoz de daño en cardiomiocitos de la especie canina (Wells y Sleeper, 2008). Motivo por el cual, a las muestras colectadas a los individuos de esta investigación, se les midió Tnlc y se correlacionó con los resultados diagnósticos obtenidos en el test de PCR para *Ehrlichia spp.*

Respecto al diagnóstico para la detección de la infección por la *E. canis*, resulta oportuno recordar las deficiencias presentadas en el uso y resultados obtenidos de las técnicas diagnósticas utilizadas actualmente, precisamente técnicas como la hematología, citología, serología y el aislamiento bacteriano, se usan comúnmente para la detección de la *Ehrlichia spp.*, sin embargo, estas presentan baja sensibilidad e incongruencias con el diagnóstico diferencial, de ahí la importancia de la técnica molecular de PCR (Harrus y Waner, 2011; McBride, 1996). No en vano, son múltiples los estudios que han posicionado a la PCR para el diagnóstico como método efectivo y sensible en la detección de *Ehrlichia spp.* (Ndip, et al., 2009).

Por su parte, las troponinas son proteínas que están unidas estructuralmente al aparato contráctil del músculo cardíaco y esquelético,

regulando la interacción entre la actina y la miosina mediado por el calcio. (Burgener, Kovacevic, Mauldin, y Lombard 2006). Para el diagnóstico temprano del daño a los cardiomiocitos se promueve el uso de la prueba TnIc. La troponina cardíaca I, es un biomarcador que se correlaciona con la gravedad de lesión miocárdica, evaluaciones seriadas de TnIc reportan la progresión de la insuficiencia cardíaca crónica en individuos (Polizopoulou et al., 2014). Según la investigación de Spratt et al., en el 2005, los individuos considerados sanos, presentan niveles muy bajos o indetectables de TnIc en la sangre; tal como sucede en los individuos con enfermedad cardíaca congénita, sin embargo, los valores de TnIc son significativamente elevados en los individuos con enfermedad valvular mitral adquirida, miocardiopatía dilatada, así como derrame pericárdico y varían según la gravedad de la insuficiencia cardíaca.

Se considera fundamental que las pruebas de PCR y TnIc sean incorporadas como métodos diagnósticos de rutina en la práctica veterinaria con caninos, apoyando así el diagnóstico temprano, tanto para el caso de la *Ehrlichia spp.*, como para detectar los daños iniciales a los cardiomiocitos producidos por esta bacteria, logrando de esta manera iniciar el tratamiento correspondiente, antes que el proceso infeccioso avance y con éste el daño sistémico.

2. MARCO TEÓRICO

El agente etiológico de la Ehrlichiosis, es una bacteria del género *Rickettsia* que se conoce como *Ehrlichia canis* (Schaefer et al., 2007), este genogrupo contiene tres especies conocidas por su capacidad de infectar a los individuos, las cuales se denominan: *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia ewingii* y *Ehrlichia chaffeensis* (Dawson et., al 1996). Las especies *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii* y *Ehrlichia platys*, pueden manifestar enfermedades y anomalías clinicopatológicas en individuos y otros animales, tal como quedó demostrado en un estudio realizado con 65 individuos en Oklahoma (EEUU), según el cual, el 15.4% de los individuos sometidos a diagnóstico por PCR, fueron positivos a *Ehrlichia spp*, de los cuales 6.2% eran positivos a *E. ewingii*, 3.1% *E. canis* y 6.2% presentaban *E. chaffeensis* (Benavides y Ramírez, 2003).

La *Ehrlichia canis* es una bacteria Gram negativa, cocoide pleomórfica, que parasita el citoplasma de los monocitos, circulan en grupos denominados mórulas (Buemberguer y Rincón, 2009), es transmitida a los individuos por la garrapata del género *Rhipicephalus sanguineus*, tanto en la etapa de vida transestadial como intraestadial (Gaunt et al, 2010). La garrapata transmite la bacteria durante más de cinco meses después de la ingestión de sangre de animales infectados, el período de incubación de la enfermedad varía de 7 a 21 días (Couto, 1998).

2.1 Sintomatología

Los individuos infectados por *E. canis*, presentan signos clínicos no específicos que incluyen: depresión, letargia, anorexia, fiebre y en algunos casos con epistaxis, petequias, así como, equimosis en piel y membranas mucosas. Otras, alteraciones ocasionadas a órganos y sistemas pueden ser, la linfadenopatía generalizada, esplenomegalia, hepatomegalia y edema (Benavides y Ramírez, 2003; Cardoso et al., 2012; Diniz et al., 2008; Gaunt et al., 2010; Warner y Harrus, 2000).

Cuando se han infectado individuos experimentalmente con *E. canis*, éstos desarrollan uveítis linfoplasmocítica y meningitis (Day, 2011), la uveítis y meningitis se observaron en los individuos infectados con *E. canis*, pero no están presentes en los individuos infectados con las otras especies de *Ehrlichia* (Panciera, Ewing y Confer, 2001), adicionalmente, pueden manifestarse signos de debilidad en los miembros posteriores e hiperestesia lumbar (Kaewmongkol et al., 2015).

No obstante lo anterior, es preciso aclarar que la sintomatología se clasifica de acuerdo a la evolución de la enfermedad, es así como, durante la fase aguda se presenta fiebre, secreción óculo nasal serosa o purulenta, anorexia, caquexia, disnea, linfadenopatía, mientras que en la fase crónica predominan la depresión, pérdida de peso, membranas pálidas, dolor abdominal, epistaxis, hemorragias retinianas, esplenomegalia, hepatomegalia, aumento en la frecuencia e intensidad de sonidos pulmonares, uveítis anterior o posterior, edema corneal, convulsiones, arritmias, poliuria, polidipsia y artralgias (Benavides y Ramírez, 2003).

2.2 Fisiopatología

La enfermedad se puede desarrollar manifestándose en tres fases, las cuales son: aguda, subaguda y crónica. La *E. canis* ingresa al torrente sanguíneo y linfático del perro mediante la picadura de una garrapata portadora, la saliva de la garrapata posee propiedades anticoagulantes, antiinflamatorias, además de potentes inmunomoduladores, cuya función es alterar la respuesta inmune del huésped dentro de la piel promoviendo la inmunidad Th2 y suprimiendo la respuesta Th1, lo cual propicia un entorno favorable para el desarrollo de la infección intracelular (Day, 2011). A partir de su ingreso, la *E. canis* se traslada a los leucocitos y macrófagos del bazo, hígado y ganglios linfáticos; donde se multiplica por fisión binaria, para posteriormente desplazarse a otros órganos (Castro et al., 2004; Warner y Harrus, 2000).

La *E. canis* puede encontrarse en lugares del organismo tan inesperados como el líquido cefalorraquídeo, siendo más probable la presentación en fase crónica que subclínica por la infección persistente con *E. canis* (Kaewmongkol et al., 2015).

Otro caso positivo a *E. canis*, presentó signos neurológicos y en la resonancia magnética se encontró hipertrofia del tejido meníngeo, lo que se diagnosticó como meningitis. Igualmente en el líquido cefalorraquídeo se determinó un aumento de proteínas en 2,4 g/dl, pleocitosis 3.200 μ /L, además de inclusiones intracitoplasmáticas en las células mononucleares (Baba et al., 2011).

De otro lado, cabe anotar que la fiebre y otros signos inespecíficos (depresión y anorexia) que se manifiestan en los individuos infectados, son causados por el incremento en la producción de interleucina-1 (IL-1) provenientes de células presentadoras de antígeno, células B o por productos como pirógenos exógenos de la bacteria (Tizard, 2002).

En lo que respecta al proceso de respuesta inmune, se ha establecido que intervienen multitud de células, predominantemente en linfonodos y bazo de animales infectados prevaleciendo las inmunoglobulinas IgG para la respuesta inmune humoral, éstas pueden activar el complemento y participar en reacciones de hipersensibilidad tipo III, mecanismo que interviene en la vasculitis ocasionada durante la Ehrlichiosis canina. La mencionada vasculitis inmunomediada es importante en el desarrollo de la enfermedad, por demostrar la mayoría de las lesiones observadas en órganos y tejidos de individuos infectados, entre ellos el tejido cardíaco (Castro et al., 2004; Harrus et al., 1999).

Por su parte, las alteraciones hematológicas encontradas fluctúan acorde con la fase de la enfermedad y están ligadas a la supresión de la médula ósea; las alteraciones bioquímicas incluyen primariamente hipergamaglobulinemia, la cual no se correlaciona únicamente con la producción de anticuerpos específicos, sugiriendo una estimulación inespecífica de la respuesta inmune y de forma secundaria, hipoalbuminemia y edema (Romero, et al., 2010).

Es así como, un estudio comparó el diagnóstico clínico con los resultados hematológicos de dos individuos durante la fase aguda de la enfermedad

ratificando la alta patogenicidad de la *E. canis* en esta fase; caracterizada por elevación de la temperatura (más de 40 °C), anorexia, mucosas pálidas entre los días 11 y 13 pos infección; la hematología evidenció anemia variable luego de tres días posteriores al pico de temperatura, el hematocrito disminuyó en 24% el día 15 después de la infección, ambos individuos presentaron leucopenia durante el pico de la enfermedad acompañada de trombocitopenia; finalmente se confirmó la presencia de *E. canis* por inmunofluorescencia indirecta (más de 1/40), a partir del día 10 siguiente a la infección (Normand, et al., 2009).

Adicionalmente, después de un episodio de la enfermedad, pueden presentarse arritmias, insuficiencia cardíaca o efusión pericárdica, los cambios histopatológicos son manifestados mediante infiltrados inflamatorios con degeneración y necrosis de los cardiomiocitos (Buemberguer y Rincón, 2009). Paniagua y Guzmán reportan en su estudio de 2010, que se practicó la necropsia a un canino diagnosticado con *E. canis*, las muestras de histopatología después de analizadas, evidenciaron en tejido cardíaco presencia de congestión y hemorragias con infiltración de células plasmáticas develando así; la relación de la infección con la afectación a los cardiomiocitos.

2.3 Diagnóstico

El diagnóstico preliminar para la Ehrlichiosis consiste en la anamnesis y manifestación clínica que se confirma con las pruebas de laboratorio (Benavides, 2011). La trombocitopenia es un hallazgo común en individuos con Ehrlichiosis, no

obstante, se pueden encontrar individuos con diagnóstico de trombocitopenia, pero negativos en la prueba rápida para la detección de *Ehrlichia spp.*, (Snap 3Dx) (Kelly y Lucas, 2009).

En consecuencia, para el diagnóstico adecuado se requiere que se cumpla uno de los eventos siguientes: observación de mórulas de *E. canis* dentro de los monocitos y/o linfocitos; (solo durante la fase aguda, y el porcentaje de células infectadas por lo general es menos de 1%) (Farías et al., 2012), o la detección del ADN en los tejidos o células mediante técnicas moleculares PCR o cultivo in vitro (Iqbal et al., 1994).

2.3.1 Diagnóstico mediante PCR. La prueba molecular PCR permite detectar el ADN de la bacteria en la muestra de sangre del paciente, en animales reservorios y en garrapatas, mientras que la secuenciación confirma o determina la especie infectante. Debido a su alta sensibilidad, se obtiene el diagnóstico temprano del agente, previo al desarrollo de los anticuerpos, determinando así, el estado de portador y diferenciando las especies de *Ehrlichia* (Breitschwerdt et al., 1998).

Esta prueba diagnóstica resulta ser una alternativa rápida y sensible, o un complemento a los actuales métodos diagnósticos para la detección de infecciones por *Ehrlichia spp.*; sin embargo, en este punto es importante destacar que las deficiencias en las pruebas diagnósticas usadas actualmente, referentes a la sensibilidad inadecuada y las dificultades con el diagnóstico diferencial, se superan utilizando la prueba de PCR, por lo que esta prueba ofrece ventajas

adicionales frente a las actuales técnicas, ya que se caracteriza por ser: rápida, fiable y permite la detección específica del agente infeccioso (McBride, 1996).

Adicionalmente la PCR, en numerosos estudios ha demostrado ser un método efectivo y sensible para la detección de *Ehrlichia spp.*, (Ndip, et al., 2009). Otra cualidad es la capacidad para detectar el ADN del microorganismo en estadios tempranos de la enfermedad y en la fase subclínica, facilitando identificar animales portadores, incluso cuando no se ha logrado establecer la respuesta inmune, propiciando así, la implementación del tratamiento, antes de la manifestación de signos clínicos (Harrus et al., 1999).

2.3.2 Marcadores de daño miocárdico. Los marcadores de daño miocárdico no invasivos y de uso generalizado en la práctica diaria tanto en humanos como animales, son Tnlc y la troponina T cardíaca (TnTc), los cuales demuestran daño celular miocárdico, reemplazan marcadores como la creatinfosfokinasa (CPK), lactato deshidrogenasa (LDH), la transaminasa glutámico-oxalacético (GOT) y los indicadores más específicos de lesión miocítica, como la fracción mioglobina (MB) de la creatinquinasa (CK-MB), debido a la alta especificidad y sensibilidad (Undhad et al., 2012).

Como quiera que la lesión en los cardiomiocitos se presenta con frecuencia en individuos con traumatismo torácico cerrado, el examen de la Tnlc en suero muestra mayor sensibilidad para la detección de lesiones miocárdicas, comparativamente con la determinación en circulación de otras pruebas como la

troponina T cardíaca (TnTc) y CK-MB o la electrocardiografía. (Schober, Kirbach y Oechtering 1999).

Troponinas y su utilidad diagnóstica en lesión cardíaca. Las troponinas están clasificadas como proteínas reguladoras, estas se integran al sistema contráctil del músculo esquelético y cardíaco, están ausentes en el tejido del músculo liso (Undhad, et al. 2012), en conjunción con las proteínas actina y tropomiosina, componen los filamentos delgados dentro de las miofibrillas e intervienen en la contracción del músculo mediada por el calcio.

El conjunto troponina se compone de tres subunidades de proteínas: Tnlc, TnTc y troponina C cardíaca (TnCc). Así mismo, existen isoformas de troponina para cada tipo de tejido muscular, las troponinas cumplen funciones reguladoras de la contracción muscular; cuando se presenta daño o muerte de la célula muscular, son liberadas a la circulación (Wells y Sleeper, 2008).

En efecto, la TnCc presenta dos isoformas, la primera, ubicada en las fibras musculares de contracción rápida y la otra en el músculo cardíaco, la segunda, en fibras de contracción lenta. La homología entre la isoforma cardíaca y una de las isoformas de músculo esquelético reduce la especificidad cardíaca de TnCc limitando su utilidad diagnóstica para la enfermedad del corazón. Las troponinas cardíacas TnTc y la Tnlc, son similares en sensibilidad y especificidad y muy elevadas para la detección de lesión miocárdica, siendo más sensible la Tnlc, para la detección de una mínima lesión miocárdica. Los ensayos de laboratorio para Tnlc de humanos pueden ser utilizados en la mayoría de los animales debido a la

homología significativa en las proteínas de troponina entre las especies (García de la Villa et al., 1998; Wells y Sleeper, 2008).

Ahora bien, los incrementos en el valor de Tnlc están asociados con lesiones cardiacas, en caninos se incrementa en derrame pericárdico, contusión cardíaca, cardiomiopatía, babesiosis, dilatación vólvulo gástrica, Ehrlichiosis y enfermedad de la válvula mitral crónica (Undhad et al., 2012).

La prueba para la medición de Tnlc en el plasma, es una prueba factible y sensible, siendo superior en el diagnóstico en casos de la alteración cardíaca en individuos con babesiosis (Lobetti, Dvir y Pearson 2002).

Los valores de Tnlc determinados como normales para los caninos, están situados en el rango entre 0,03-0,07 ng/ml, con una media de 0,02 ng/ml y una mediana de 0,02 ng/ml., estos resultados pueden estar supeditados a la sensibilidad del equipo (Sleeper, Clifford y Laster 2001).

Autores como Payne, et al., 2011 reportan en un estudio la comparación entre valores de Tnlc de 22 individuos clínicamente normales y 67 individuos con distress respiratorio cardiogénico y no cardiogénico, en los individuos normales una concentración de Tnlc media de 0,03 ng/ml fue la constante, en 36 individuos diagnosticados con dificultad respiratoria no cardiogénico la media de Tnlc 0,14 ng/ml, para 31 individuos diagnosticados con angustia cardiorespiratoria la concentración media de Tnlc fue de 1,74 ng/ml, con diferencias significativas en las concentraciones de Tnlc entre individuos normales frente a individuos con distress cardiogénico y no cardiogénico.

La variación en la concentración de troponina puede ser de utilidad en la medición cuantitativa sobre la magnitud del daño sufrido por el corazón, sin embargo, no provee información sobre la causa o mecanismo de liberación. Se ha determinado a las troponinas cardíacas como marcadores de primera línea en el diagnóstico de infarto agudo de miocardio en seres humanos, siendo ésta la prueba estándar para dicha indicación (Langhorn, y Willesen, 2016).

3. METODOLOGÍA

3.1 Lugar de realización del estudio

El estudio fue elaborado en la Clínica Veterinaria G & C, cuya sede se ubica en la ciudad de Villavicencio, región de la Orinoquía, en los 04°09 N 73°38'O y situada a 467 metros sobre el nivel del mar; cuenta con una superficie de 1.328 km²; tiene una temperatura que oscila entre 18 y 33°C con una media de 27 °C, la humedad relativa promedio es de 80% (Alcaldía de villavicencio.gov.co, 2015).

3.2 Población y muestra

Para el desarrollo de la investigación se incluyeron 60 individuos de la Clínica Veterinaria G & C, los propietarios y sus mascotas viven en la ciudad o se encontraban de vacaciones. Los individuos fueron llevados a consulta por presentar sintomatología o para efectuarles procedimientos tales como vacunación o desparasitación.

Los propietarios de los individuos autorizaron mediante la firma del consentimiento informado (anexo 1), la extracción de sangre de cada paciente canino con normas de asepsia y seguridad para los mismos, además de cumplir con los requisitos éticos del estudio respaldados por la aceptación del Comité de

ética perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria de La Universidad de La Salle (anexo 2).

3.2.1 Criterios para la selección de los individuos. Para empezar, se llevó a cabo una anamnesis detallada consultando a los propietarios o responsables de los individuos, posteriormente se realizó una exploración física, así como, toma de muestra de sangre para hemograma, prueba de PCR y troponina, a 60 individuos con edades entre uno y seis años, siendo éstos, machos y hembras de diversas razas (Poodle, Mestizo, Schnauzer, Beagle, Cocker, Pinscher, Golden Retriever, Dálmata, Maltés, Pastor Alemán, Pug, Chihuahua, Shih-Tzu, Yorkshire, Doberman y Bull Terrier).

Los individuos se clasificaron en dos grupos, el primero, denominado G1 o controles aparentemente sanos y el segundo, G2 o sospechosos de estar infectados por *E. canis*.

El Grupo uno (G1); formado por 20 individuos sanos, que fueron seleccionados teniendo en cuenta dos o más de los siguientes criterios de inclusión:

- No presentar historia o sintomatología clínica de enfermedad ni alteraciones al momento de exploración física.
- No tener reporte de haber estado infestado con garrapatas.
- No tener diagnóstico previo de la enfermedad conocida como Ehrlichiosis.
- Sin historia de episodios febriles en los últimos seis meses.
- Que el cuadro hemático al momento del examen se encuentre dentro de los rangos normales.

El segundo grupo, denominado G2, fue conformado por 40 caninos, para cuya clasificación se tuvieron en cuenta dos o más de los siguientes criterios de inclusión:

- Presentación de la fase aguda de la enfermedad (primera manifestación de signos y síntomas).
- Historial de infestación por garrapatas
- Pirexia
- Petequias y/o equimosis en membranas mucosas
- Epistaxis
- Cambios en el cuadro hemático como: leucopenia, trombocitopenia, anemia.

3.3 Métodos y procedimientos

Se practicó el examen clínico general a cada paciente seleccionado para obtener información acerca de su estado de salud, teniendo en cuenta los siguientes procedimientos: auscultación cardíaca y pulmonar, temperatura rectal, valoración del aspecto de las mucosas y elasticidad de la piel. La información obtenida fue registrada en formatos de historia clínica convencional (Anexo 3).

Así mismo, de cada grupo de individuos (G1 y G2), se obtuvo una muestra de sangre mediante punción de la vena cefálica, (anexo 4), la sangre colectada se depositó en tres tubos, dos con anticoagulante EDTA (tetra-acetato de etilenediamida) y uno sin anticoagulante.

Uno de los grupos de las muestras con EDTA se usó para la cuantificación celular sanguínea, el otro grupo de las mencionadas muestras con EDTA se mantuvo almacenado durante 15 días a (-20°C), a fin de preservar la integridad del ADN y de la troponina.

Para la extracción de ADN, las muestras se procesaron por etapas durante tres semanas, almacenando los productos resultantes a la misma temperatura durante un tiempo aproximado de un mes. Luego de unificadas el total de las muestras, se realizó la prueba molecular PCR en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de La Salle sede Bogotá.

Las muestras obtenidas sin anticoagulante fueron centrifugadas a 3.000 RPM y el suero resultante se almacenó en tubos eppendorf a (-20 °C), transcurrido un mes, fueron procesadas en el Laboratorio Clínico ANNAR Diagnóstica en la Ciudad de Bogotá, para la medición de TnIc.

Es importante recordar que una vez extraído el ADN, la muestra para PCR se conserva a (-20 °C), teniendo así, una vida útil que se extiende más allá de un año. En el caso de los sueros para el proceso de TnIc, la vida útil igualmente es de un año conservada a esta misma temperatura.

Las consideraciones del fabricante a que hace referencia el párrafo anterior, se encuentran contenidas en los insertos correspondientes de los Kits que se adquirieron para el proceso diagnóstico de PCR y TnIc.

3.3.1 *Técnicas de laboratorio.* Para el análisis hematológico en el Laboratorio Clínico Veterinario se utilizó el analizador automatizado para hematología Mindray BC-2300.

En la dinámica de selección de los individuos G1 y G2, se tuvo en cuenta el cuadro hemático y anamnesis. Los parámetros para los recuentos celulares se registran en la tabla 1, respecto a los cuales debe decirse que, se consideran normales los correspondientes a los individuos del G1; mientras que, pertenecen al G2 aquellos individuos que estén por debajo de estos parámetros.

Tabla 1. Valores de referencia para el cuadro hemático considerado normal

Parámetro	Valores referencia normales	Unidades del parámetro	Diferencial		
Hematocrito	38 – 57	%	Neutrófilos segmentados	55 -76	%
RBC	5.6 – 8.5	Cel./mm ³	Neutrófilos en banda	0-3	%
MCV	62 - 71	FL	Linfocitos	15 – 30	%
Hemoglobina	132 – 193	g/L	Monocitos	1 – 5,0	%
Plaquetas	200 – 500	Cel./mm ³			
Leucocitos	6.0 – 17	Cel./mm ³			

Fuente: Kirk y Bonagura, 1994

Extracción del ADN. En la obtención de ADN, se empleó el kit comercial “QIAamp® DNA Blood Mini Kit (50)” (QIAGEN Group, Estados Unidos) el cual requiere de 200 µl de muestra de sangre con anticoagulante EDTA, esta extracción simplifica el aislamiento del ADN de sangre sin necesidad de separar

los leucocitos de la muestra; además, el ADN purificado queda libre de proteínas, nucleasas, contaminantes y otros inhibidores de la PCR que se eliminan por completo en dos pasos de lavado dejando el ácido nucleico puro para ser diluido con tampón AE quedando preparadas las muestras para el proceso de PCR. En el anexo 5 se presenta paso a paso la extracción del ADN con el “QIAamp® DNA Blood Mini Kit.

Las muestras se procesaron por etapas durante tres semanas para la extracción del ADN almacenando los productos resultantes en tubo eppendorf de 1,5 ml; estas muestras fueron almacenadas a -20°C durante aproximadamente un mes.

Cuantificación del ADN. Obtenido el ADN de todas las muestras, se procedió a cuantificar la concentración de ADN en cada una con el equipo Nano Drop 2000® (Thermo Scientific, Delaware, Estados Unidos), en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de La Salle. Se midió la absorbancia de la luz ultravioleta a longitudes de onda entre 260 y 280 nm., la lectura a 260 nm., indica la concentración de ADN de la muestra, siendo ésta la concentración recomendada para la posterior realización de la PCR.

La relación entre las lecturas a 260 y a 280 nm., (relación ADN/proteínas), permite estimar la pureza del ADN y excluir la existencia de contaminación proteica de la muestra con un amplio rango de concentración de la medición. Para considerar la muestra de ácido nucleico como óptima para someterla a diagnóstico de PCR, el indicador de la relación 260/280 debe encontrarse entre 1,6 a 2.

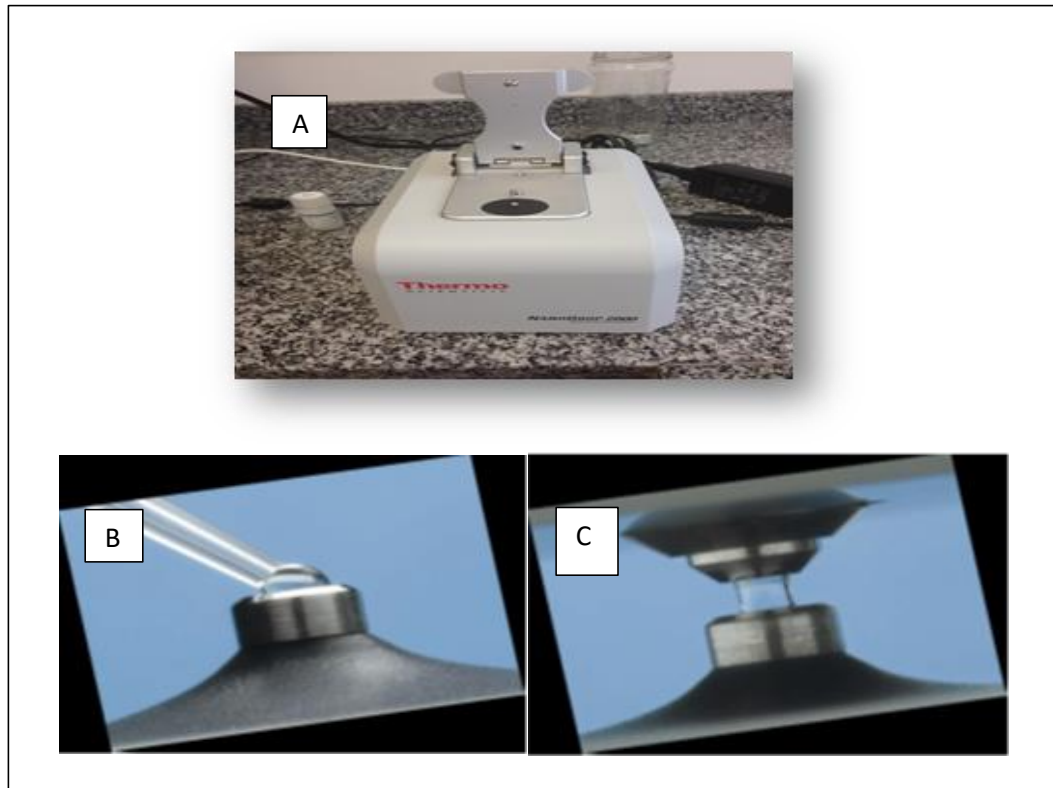


Figura 1. (A) Equipo Nano Drop 2000® para determinar la concentración de ADN en Nanómetros, (B) Colocación de la gota muestra, (C) Lectura (<http://www.nanodrop.com/>).

Proceso de la PCR en el Termociclador. En el proceso inicial para análisis por PCR se utilizó el Termociclador C100 Thermal Cycler®, con el cual, según el fabricante, se procesan las muestras en las siguientes fases:

1. Desnaturalización

En esta etapa, las cadenas de ADN son calentadas y se desnaturaliza el ADN de doble cadena dividiéndolo en dos cadenas sencillas a una temperatura de 95-98°C durante 20-30 segundos.

2. Hibridación

En esta etapa la temperatura se disminuyó entre 55-65 °C, permitiendo que los cebadores se unieran a secuencias específicas de ADN en cada extremo de la secuencia, también conocido como la plantilla.

3. Extensión

En esta etapa la temperatura se aumenta típicamente a 72 °C, lo que permite a la enzima ADN polimerasa extender los cebadores por la adición de dNTPs para crear una nueva cadena de ADN, duplicando así la cantidad de ADN en la reacción.

Esta secuencia de desnaturalización, hibridación y extensión se repite para muchos ciclos, dando como resultado la amplificación exponencial del ADN molde. Finalmente, el ADN polimerasa pierde actividad o los dNTPs y los cebadores se consumen y la velocidad de reacción alcanza una meseta.

El proceso detallado se relaciona en el Anexo 6).

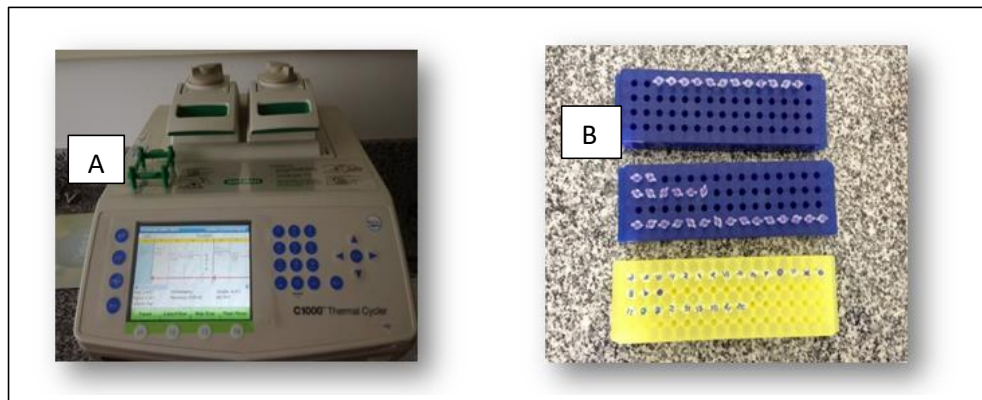


Figura 2. (A) Termociclador C1000 Thermal Cycler® que se utilizó para el proceso del PCR. (B) Muestras extraídas del Termociclador listas para el proceso de electroforesis.

Proceso de Electroforesis en gel de agarosa. Esta es una técnica empleada para separar los ácidos nucleicos y las proteínas, la separación de las macromoléculas depende de las variables: carga y masa. Cuando una muestra biológica, como por ejemplo el ADN, se mezcla en una solución tampón y se aplica a un gel, esas dos variables actúan conjuntamente; la corriente eléctrica de un electrodo repele las moléculas, al tiempo que el otro electrodo las atrae, la fuerza de fricción del material del gel actúa como “tamiz molecular”, separando las moléculas en función de su tamaño.

Durante la electroforesis, las macromoléculas son empujadas a través de los poros, dependiendo su tasa de migración por el campo eléctrico de los siguientes factores:

- Fuerza del campo
- Tamaño y forma de las moléculas
- Hidrofobicidad relativa de las muestras
- Fuerza iónica y temperatura del tampón en que se desplazan las moléculas (Anexo 7).

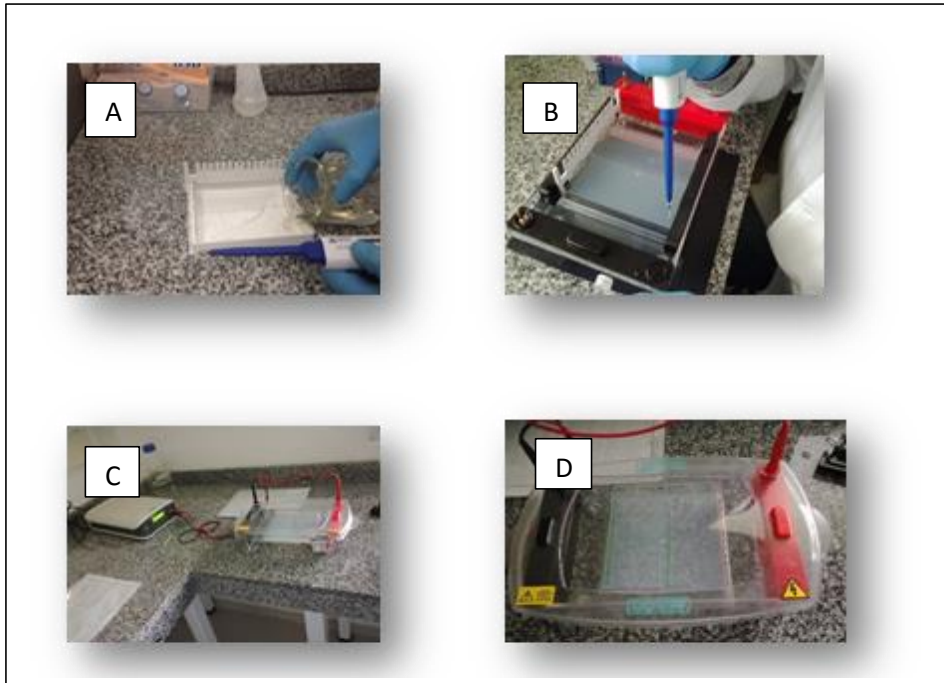


Figura 3. (A) Vertimiento del gel de agarosa en la cámara de electroforesis marca *Labnet*®. (B) Aplicación de las muestras en los pozos (C) conexión a la corriente eléctrica, (D) funcionamiento de la cámara de electroforesis.

Lectura del gel.

1. Una vez concluido el tiempo del gel en la cámara de electroforesis se situó el recipiente con el gel debajo de un grifo de agua y lavó hasta que el agua no se tiñó de color azul.
2. Luego el gel se puso cuidadosamente sobre papel absorbente para secarlo.
3. El gel se colocó sobre el transiluminador UV (U-2225-2Transilluminators White/UV).
4. Para Proteger el gel de la luz externa se cubre con una campana que presenta un orificio de visualización superior.



Figura 4. Transiluminador U-2225-2Transilluminators White/UV utilizado para realizar la lectura del gel de agarosa.

5. Encendiendo el iluminador se fotografía el gel iluminado con luz U.V. buscando determinar la longitud de las muestras de ADN en el carril de la escalera.
6. Se compararon las muestras en el primer carril a la muestra de ADN más cercano en la escalera del marcador.
7. La información se extrapola para proporcionarte una longitud aproximada de las muestras de ADN en esta pista.
8. Se compararon las longitudes de las muestras en cada pozo entre sí para encontrar similitudes.

Lectura del gel e Interpretación. En la interpretación de la foto del gel de agarosa con DNA, se observa como cualitativamente las bandas que se ven en el gel se relacionan con los fragmentos de DNA, los lugares donde marca la banda más intensamente es el sitio de reconocimiento de la enzima usada en el caso de *E. canis* se ubica en 400 pares de bases.

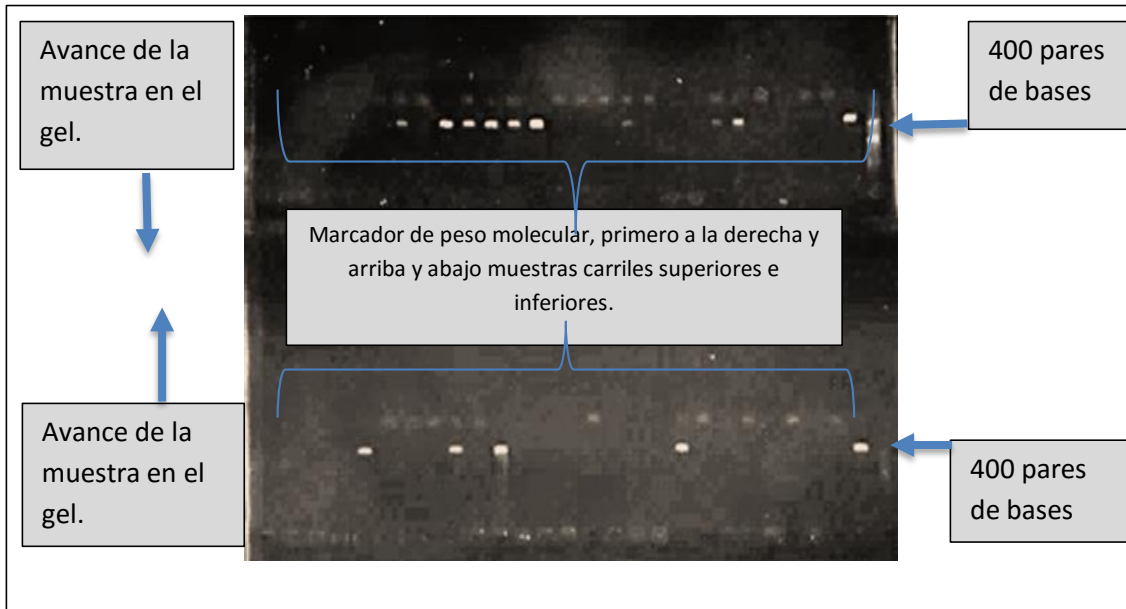


Figura5. Gel de electroforesis preparado para la lectura e interpretación.

Proceso diagnóstico para Tnlc. En el proceso para obtener los valores de troponina que presentaron los individuos G1 y G2, los sueros se mantuvieron almacenados a - 20 °C, para luego ser procesados con el Kit Accu Bind Elisa Microwells.

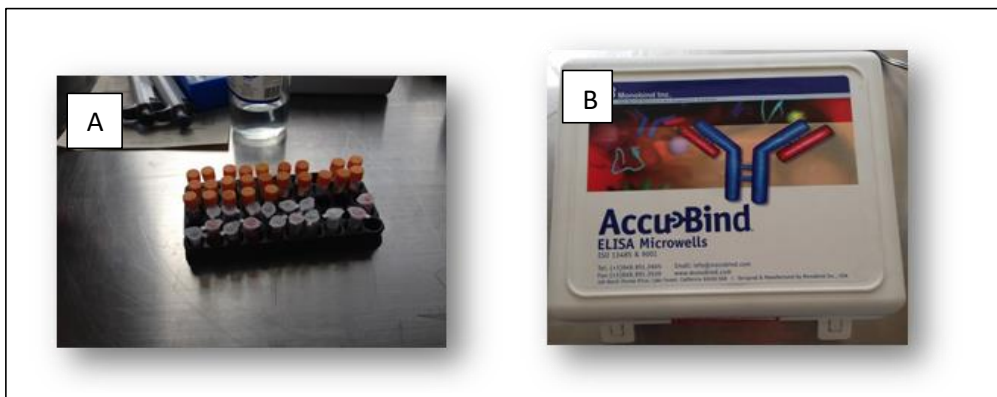


Figura 6. (A) Muestras de sangre usadas para el proceso de Tnlc, (B) Kit Accu Bind Elisa Micro Wells para la prueba mencionada.

El kit provee un sistema de análisis Inmunoenzimométrico tipo 3, que ofrece mayor afinidad y especificidad de los anticuerpos. En este procedimiento, la inmovilización toma lugar durante el análisis en la superficie del pozo en la Microplaca a través de la interacción de la estreptavidina que cubre el pozo con el anticuerpo anti- Tnlc monoclonal y con biotina agregada exógenamente. Después de la mezcla del anticuerpo monoclonal marcado con biotina, este y un suero que contiene antígeno nativo, provoca la reacción entre el antígeno nativo y los anticuerpos, sin competición formando un complejo anticuerpo-antígeno.

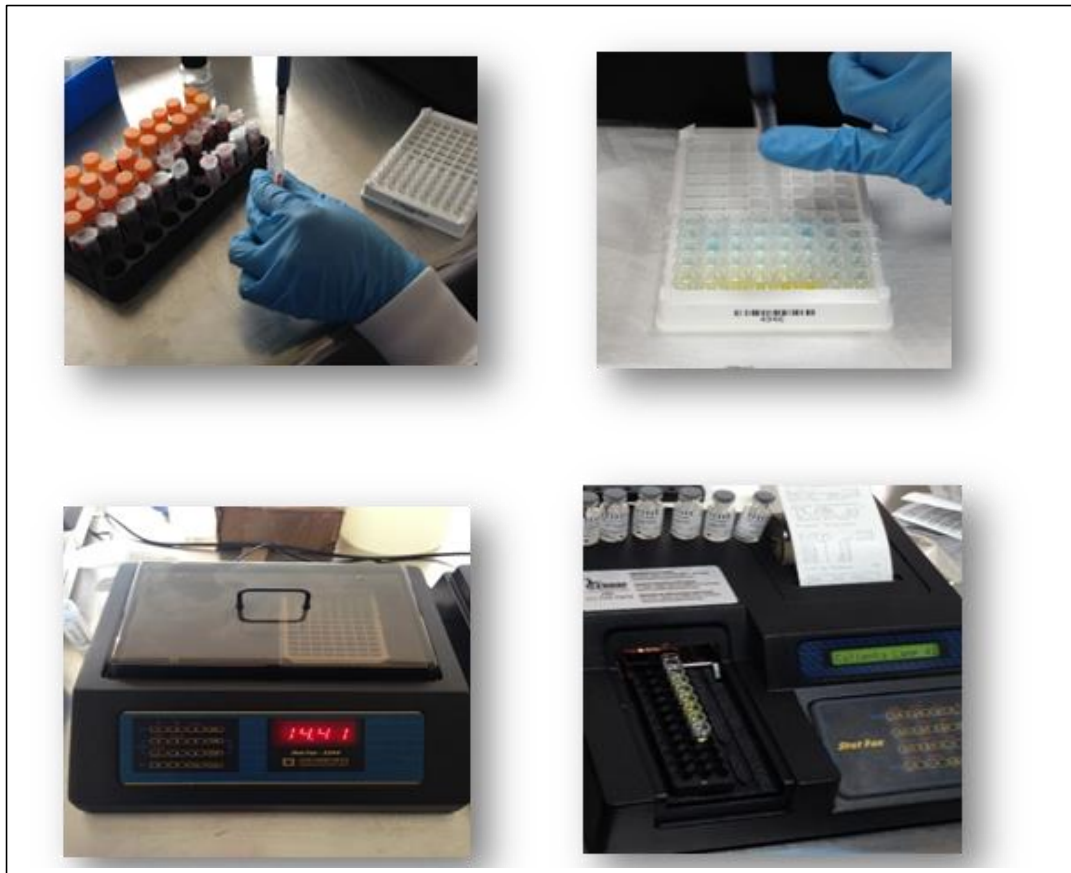


Figura 7. (A) Muestras de sangre para el proceso (B) Mezcla antígeno anticuerpo, (C) Incubación de las mezclas, (D) lectura de resultados.

La troponina cumple la función del antígeno, el cual quedará entre un anticuerpo o biotina que es la fase sólida (lo que está en la placa de reacción) y entre un anticuerpo específico marcado con una enzima el cual es el conjugado agregado durante el montaje de la Elisa, por lo tanto, la cantidad de color obtenido al final de la reacción es directamente proporcional a la cantidad de troponina presente en la muestra.

En el primer paso, se adicionan el calibrador de Tnlc, G1 o muestra del paciente al pozo revestido con estreptavidina.

Luego de realizar el procedimiento con las muestras de suero colocando los reactivos en cada pozo de acuerdo al orden de aplicación, después las mezclas se pasan al Incubador Stat Fax 2200 Awareness por unos minutos, posteriormente se procede a leer la absorbancia de cada pozo a 450 nm (usando una longitud de onda de referencia de 620-630nm para minimizar las imperfecciones de los pozos) en un lector de microplacas lector de Tira Stat Fax 303 Awareness. El procedimiento completo se presenta en el (Anexo 8).

3.4 Diseño y análisis estadístico

Los resultados obtenidos, fueron analizados con el método estadístico empleando el programa informático Statistix 8 y Excel. Inicialmente se procesaron los datos utilizando estadística descriptiva para variables cuantitativas y cualitativas que permitieron determinar las características de los individuos vinculados al estudio.

De igual manera se evaluó la existencia de asociaciones estadísticamente significativas para valores de $p < 0,05$ entre diferentes características de los individuos y las variables analizadas; usando el método paramétrico t de Student. Se compararon los resultados obtenidos para los valores de Tnlc en individuos del G1 y G2

4. RESULTADOS

Los 60 individuos incluidos en el estudio se dividieron en dos grupos teniendo en cuenta los criterios de inclusión de la metodología: G1 individuos sanos y G2 individuos sospechosos de haber enfermado por la *Ehrlichia canis*.

4.1 Caracterización G1

En el anexo 9 se relacionan los datos generales de los 20 individuos sanos o G1 donde el motivo de visita era control rutinario, primera vacunación o desparasitación, variables cualitativas y cuantitativas. En el anexo 10 se relacionan los cuadros hemáticos.

Al iniciar el estudio, todos los individuos G1 cumplían con los criterios de inclusión, como no presentar sintomatología compatible para la enfermedad y recuento plaquetario superior a 200.000 cel/mm³. Sin embargo, en el desarrollo de la investigación, se excluyeron seis muestras del G1 por dos factores: el primero, en la extracción de ADN para PCR cuatro de las muestras quedaron muy diluidas; al medir su concentración en el Nano Drop® su relación de absorbancia fue superior a dos, indicando que la concentración de ADN sería muy baja para ser

valorada por el Termociclador, condición que generaría falsos negativos. Y el segundo factor, dos muestras del G1 resultaron positivas para *Ehrlichia canis* por PCR. En estas dos muestras los valores del cuadro hemático como hematocrito, glóbulos rojos y leucocitos estaban dentro de los rangos normales. El conteo de plaquetas de estos dos individuos fue 202.000 cel x mm³ y 213.000 cel x mm³, fueron los más bajos con respecto a los otros individuos G1. Uno de ellos, un canino de 60 meses raza French Poodle, era paciente habitual de la clínica y el motivo de su última visita fue para ser desparasitado, mientras que el paciente con dos años de raza Pastor Belga Mallinois era su primera visita; esta mascota vive en Bogotá y los propietarios viajaron a vacacionar. Con los seis individuos excluidos en este grupo la investigación se realizó con 14 individuos sanos o G1 PCR negativos.

4.1.1 Distribución por edad. La edad promedio de los individuos del G1 incluidos en el estudio, fue de 51.42 meses, siendo la mínima 12 meses correspondiente a tres individuos, la máxima de 72 meses representado en siete individuos; con 24 meses y 36 meses un ejemplar en cada rango de edad; mientras que dos individuos tenían 60 meses de edad (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación porcentual por edades en meses de los individuos del G1

Edad meses	Individuos G1	Porcentaje
12	3	21,42%
24	1	7,14%
36	1	7,14%
60	2	14,28%
72	7	50%
TOTAL	14	100%

4.1.2 *Distribución por sexo.* Del total de los individuos seleccionados el 57,14% fueron machos y el 42,85% hembras.

Tabla 3. Distribución porcentual por sexos del total de los individuos del G1.

Sexo	Individuos	Porcentaje
Machos	8	57,14%
Hembras	6	42,85%
Total	14	100%

4.1.3 *Distribución de los individuos clasificados por raza.* Las razas Labrador, Golden y Mestizo fueron las más representativas siendo el 64,28% de la composición total de los individuos del grupo G1 cada raza con tres animales, el 35,71% restante están distribuidos entre las razas Poodle, Schnauzer, Cocker, Pastor Alemán y Maltés cada raza con un paciente.

Tabla 4. Distribución porcentual de los individuos del G1 por razas.

Raza	Individuos	Porcentaje
Mestizo	3	64,28%
Golden	3	
Labrador	3	
Poodle	1	35,71%
Schnauzer	1	
Cocker	1	
Pastor Alemán	1	
Maltés	1	
TOTAL	14	100%

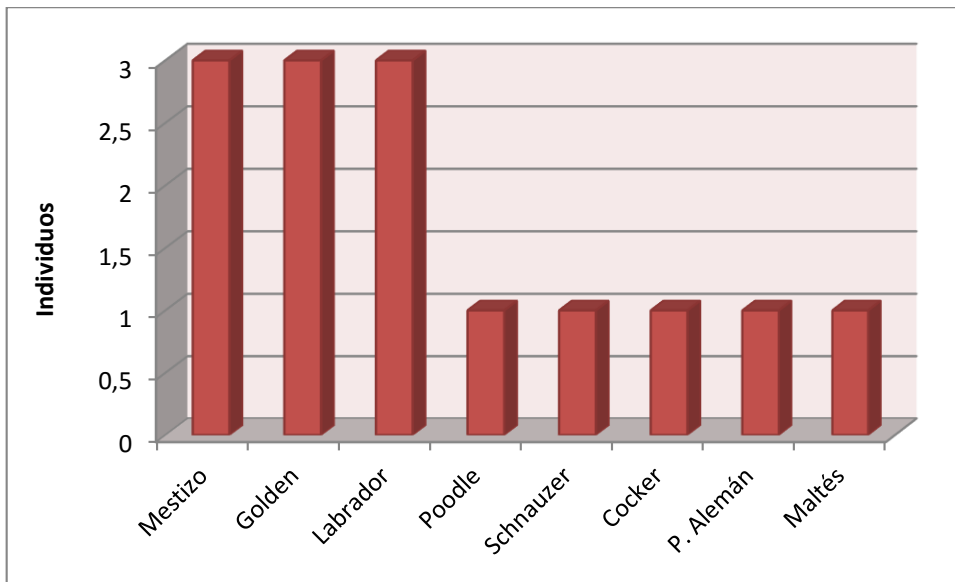


Figura 8. Distribución individuos del G1 por raza.

4.1.4 *Motivo de consulta por edad para los individuos del G1.* De los 14 individuos los motivos para la visita al veterinario según distribución etaria fueron en orden de frecuencia: antiparasitario, vacunación y control de rutina.

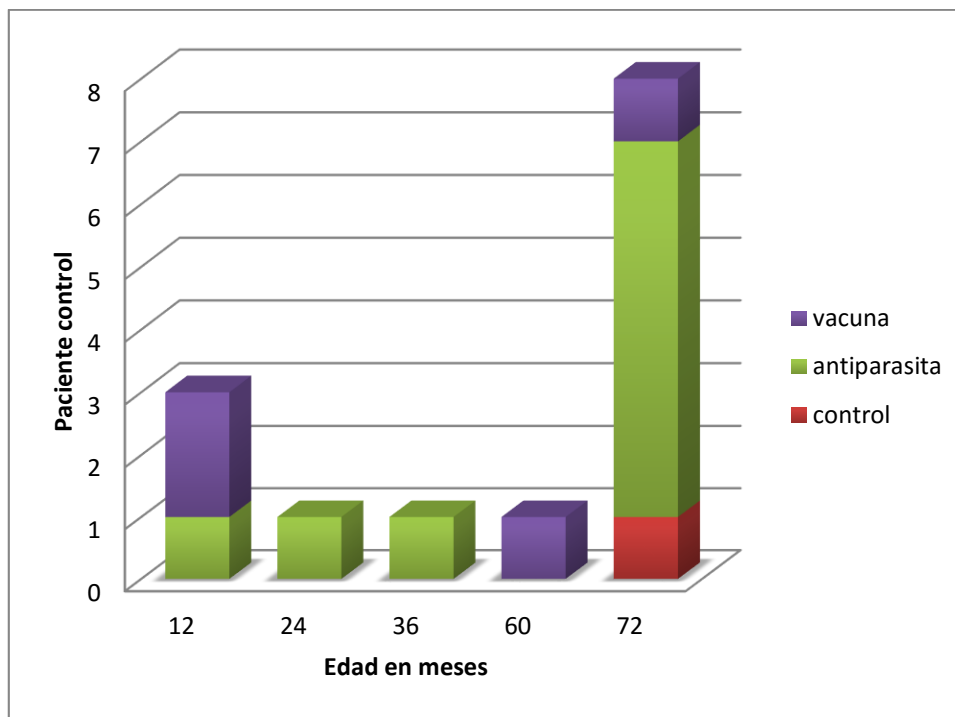


Figura 9. Motivo de consulta por edad para los individuos del G1

4.1.5 Parámetros clínicos los individuos del G1. Con los parámetros clínicos y de laboratorio analizados de los individuos del G1, se obtuvieron variables descriptivas y analíticas entre las que se cuentan: constantes fisiológicas al momento del examen físico, parámetros sanguíneos como el cuadro hemático, la medición de Tnlc, y pruebas de PCR para cada paciente.

Constantes fisiológicas. A la población de 14 individuos del G1, al momento de la visita a la clínica se les realizó el examen clínico que junto con la anamnesis permitieron obtener entre otros datos, constantes fisiológicas como frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria y temperatura. Los datos consolidados de estas constantes fisiológicas se presentan (Anexo 11).

Tabla 5. Estadística descriptiva de constantes fisiológicas en individuos del G1.

Parámetro	Promedio	Intervalo confianza 95%		Desv. Stan.	Error estimado	Máximo	Mínimo
		Lim. inferior	Lim. Superior				
Frec. Cardíaca l.p.m	84,85	80,82	88,89	6,99	1,8689	100	78
Frec. Respiratoria r.p.m	20,64	18,145	23,14	4,32	1,1560	28	12
Temp. ° C	38,85	38,623	39,09	0,405	0,1083	39,3	38

Hemogramas de los individuos G1. En el anexo 12, se encuentra el consolidado de los hemogramas para los individuos del G1.

Tabla 6. Estadística descriptiva de algunos parámetros de línea roja individuos del G1.

Parámetro	Promedio	Intervalo confianza 95%		Desv. stand	Error estimado	Máximo	Mínimo
		Lim. inferior	Lim. superior				
Hematocrito %	52,093	50,24	53,944	3,2059	0,8568	56,661	46,7
LINEA ROJA Hemoglobina g/L	146.07	112,70	179,44	57,8	15,448	188	17,0
Glób. Rojos cel/mm ³	8056,4	7762,4	8350,4	509,17	136,08	8.630	7.120
Plaquetas cel/mm ³	357.370	302.070	412.670	95.782	25.599	535.000	220.000

Tabla 7. Estadística descriptiva de algunos parámetros de línea Blanca individuos del G1.

Parámetro	Promedio	Intervalo confianza 95%		Desv. stand	Error estimado	Máximo	Mínimo
		Lim. inferior	Lim. superior				
Leucocito cel/mm ³	13.429	12099	14758	2.302	615,23	18.000	10.700
Neutro. relat. %	68,28	60,712	75,859	13,117	3,50	84.000	30.000
LÍNEA BLANCA DIFERENCIAL							
Neutro abs.	9117,0	7957,1	10277	2008,9	536,90	11.880	3.690
Linfo. relativ %	26,57	18,351	34,792	14,238	3,805	72.000	14.000
Linfo. Absol.	3500,7	2548,4	4453,0	1649,4	440,82	7.626	1.778

4.1.6 Pruebas diagnósticas PCR y TnIc. Extracción y medición de la concentración de ADN en muestras del G1. Luego de la extracción del ADN de las muestras con el kit comercial “QIAamp® DNA Blood Mini Kit (50)” y siguiendo las especificaciones del fabricante, se procede a medir la concentración del ADN en las muestras de los individuos del G1 utilizando para esto el equipo Nano Droop®. La proporción resultante en la medición de la absorbancia deseada en las muestras debe ser superior a uno y cercana a dos según especificaciones del fabricante. Los resultados de esta medición consolidada para los G1 se encuentran en el anexo 13.

Luego se procede al procesamiento de las muestras en el Termociclador y se pasan por electroforesis, obteniendo como resultado que todos los individuos del G1 fueron PCR negativos. Los resultados de la absorbancia se relacionan en el (Anexo 14).

Prueba de Tnlc realizada a las muestras del G1. En el anexo 15, se registran los valores de Tnlc expresados en ng/ml que se obtuvo de los individuos del G1 con el kit Accubin Elisa Microwells ®.

Los individuos del G1 en su mayoría presentaron valores inferiores a cero, teniendo en cuenta que en los de 12 meses de edad los valores de troponina fueron de -0,166 ng/ml, los de 24, 36 y 60 meses tenían un promedio de troponina de -0,5 ng/ml, mientras que los individuos de 72 meses los valores fueron de 0.0714 ng/ml. Presentando diferencia significativa entre la edad y los niveles de Tnlc por la prueba T Student con $p=0.0000$.

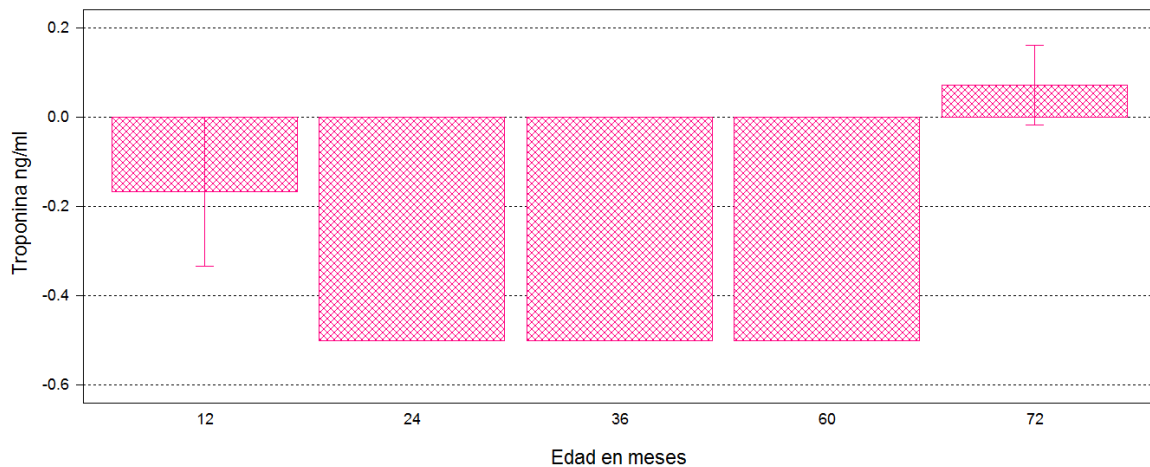


Figura 10. Niveles de troponina ng/ml de los G1 por edad en meses.

Estadística descriptiva para troponina y PCR. Con los resultados obtenidos de las pruebas de PCR y Tnlc, se calcula la estadística descriptiva.

Tabla 8. Estadística descriptiva practicada a los resultados de Tnlc y PCR.

Parámetro	Promedio	intervalo confianza 95% X		Desv. stand	Error estimado	Máximo	Mínimo
		Lim. inferior	Lim. superior				
Troponina ng/ml	-0.1429	-0,3278	0.0421	0.3204	0.0856	0.6	-0.5
PCR	0	0	0	0	0	0	0

En la estadística descriptiva obtenida de los G1 se observó que los 14 individuos presentaron en promedio el valor de Tnlc de -0.1429 ng/ml un CI del 95% (-0.3278 - 0.0421 ng/ml).

4.2 Caracterización de individuos del G2

Este grupo se conformó con 40 individuos sospechosos de estar infectados por *Ehrlichia canis*, que fueron llevados a consulta por varios motivos y al momento de realizar el examen y por la anamnesis fueron considerados enfermos (anexo 16).

Estos individuos cumplen con los criterios de inclusión determinados para su selección. El consolidado de los individuos G2 motivo de consulta, constantes fisiológicas se presenta en los anexos 17 y 18.

4.2.1 Distribución por edad. La edad de los individuos G2 va de los 12 a 72 meses y se divide de la siguiente manera:

Tabla 9. Distribución porcentual por edades de los individuos del G2

EDAD MESES	INDIVIDUOS	PORCENTAJE
12	2	5%
18	4	10%
24	10	25%
36	10	25%
48	3	7.5%
60	9	22.5%
72	2	5%
TOTAL	40	100%

El promedio de edad para los individuos del G2 está en 38 meses siendo la máxima de 72 meses y la mínima de 12.

4.2.2 *Distribución por sexo.* El grupo de 40 individuos del G2, estaba integrado por 26 machos y 14 hembras, porcentualmente el (65%) corresponde a los machos y (35%) a las hembras.

Tabla 10. Composición por sexos de individuos G2.

SEXO	INDIVIDUOS	PORCENTAJE
Machos	26	65%
Hembras	14	35%
Total	40	100%

4.2.3 *Distribución de individuos clasificados por raza.* Entre los individuos G2 se encuentran varias razas siendo la más frecuentes French Poodle con 10 ejemplares, (25%), Schnauzer con siete unidades (17.5%), seguida de Mestizos con seis individuos (15%), Labrador con dos (5%), Pinscher y Cocker con tres individuos de cada una y el 22,5% distribuidos en otras razas como Bull terrier, Shih Tzu, Yorkshire Terrier, Golden Retriever, Chihuahua, Pug, Beagle, Doberman y Maltés con un paciente cada una.

Tabla 11. Organización porcentual por razas de individuos del G2

RAZAS	INDIVIDUOS	PORCENTAJE
Pinscher	3	15%
Cocker	3	
Labrador	2	5%
Schnauzer	7	17,5%
Mestizo	6	15%
French Poodle	10	25%
Bull terrier	1	
Shih Tzu	1	
Yorkshire Terrier	1	
Golden Retriever	1	
Pug	1	22,5%
Chihuahua	1	
Beagle	1	
Maltés	1	
Doberman	1	
TOTAL	40	100%

4.2.4 Motivo de la consulta individuos del G2. Los individuos del G2 fueron seleccionados teniendo en cuenta los criterios de inclusión mencionados en la metodología, estos son individuos que consultan en la Clínica por presentar sintomatología y signos variados; como diarrea sanguinolenta, anorexia, tos, letargo entre otros. Pero se debe considerar que de los 40 individuos del G2, el común denominador fue la temperatura elevada, así como el historial de infestación por garrapatas semanas o meses atrás.

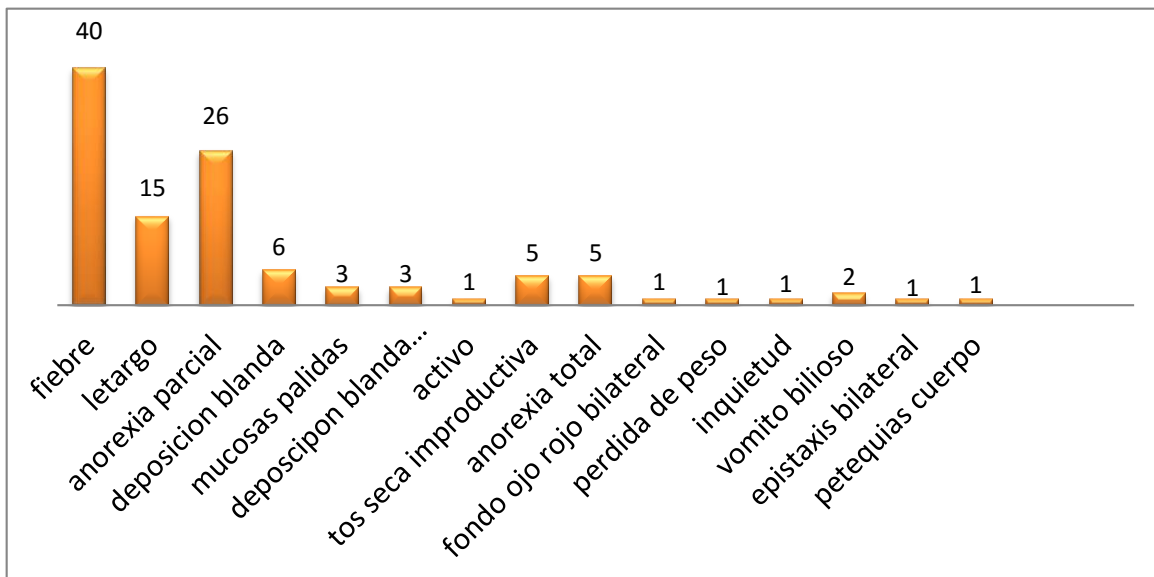


Figura 11. Motivo de consulta individuos del G2

Los motivos de consulta para los individuos del G2 fueron: en 26 individuos anorexia parcial, seguidos de condición de letargo en 15, además de deposición blanda en seis individuos, tos seca y anorexia en cinco individuos cada síntoma, mucosas pálidas y deposición blanda con sangre la reportan tres individuos en cada caso seguido por signos y síntomas de menor frecuencia entre los que están

la pérdida de peso, epistaxis bilateral, petequias en piel y un paciente está activo a pesar de presentar deposición blanda.

La sintomatología presentada en los individuos de la investigación varía entre diarrea sanguinolenta, anorexia, tos seca improductiva, vómito, letargo entre otros.

4.2.5 Parámetros clínicos de los individuos del G2. De igual forma como se analizaron los parámetros clínicos y de laboratorio de los individuos G1, se procede al análisis de los individuos G2, donde también se calculan variables descriptivas y analíticas entre las que están: constantes fisiológicas al momento del examen físico, cuadro hemático, medición de Tnlc, y pruebas de PCR de cada muestra.

Constantes fisiológicas y hemograma. A los individuos del G2 durante la consulta veterinaria se les realizó examen clínico que junto con la anamnesis permitieron obtener entre otros datos las constantes fisiológicas como frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria y temperatura.

La Estadística descriptiva efectuada a las constantes fisiológicas de los individuos del G2 se presenta en la tabla 12.

Tabla 12. Presentación de la estadística descriptiva relacionada con las constantes fisiológicas de 40 individuos del G2

Parámetro	promedio	intervalo confianza 95%		Desv. Stand.	Error estimado	Máximo	Mínimo
		Lim. inferior	Lim. superior				
FC l.p.m	78.975	77.299	80.651	5,2403	0,8286	90	70
FR r.p.m	22.100	20.935	23.265	3,6430	0.5760	29	16
TEMP °C	40.025	39.902	40.148	0.3841	0,0607	41.2	39.5

La temperatura en los individuos G2 presentó un valor mínimo de 39.5 °C y máximo de 41.2°C con promedio de 40,02 °C.

Los resultados del hemograma se presentan en el anexo 19. La estadística descriptiva para los parámetros sanguíneos de los individuos del G2 se presenta en la Tabla 13.

Tabla 13. Estadística descriptiva hemograma línea roja y línea blanca de los 40 individuos G2.

	Parámetro	Prome.	Intervalo confianza 95%		Desv. Stand.	Error estima.	Máximo	Mínimo
			Lim. inferior	Lim. superior				
LÍNEA ROJA	HCTO %	34,65	31,92	37,38	8,54	1,35	54,00	17,50
	RBC Cel/mm ³	5.127,80	4.728,70	5.526,80	1.247,70	197,2	8.080	2.880,0
	MCV FL	67,75	66,27	69,23	4,62	0,73	78,00	57,00
	HMGB g/L	118,03	109,01	127,04	28,18	4,46	179,00	63,00
	PLAQ Cel/mm ³	81.755	65.457	98.053	50.962	8.058	197.00	16.000
DIFERENCIAL LÍNEA BLANCA	LEUCO Cel/mm ³	8.053,30	6.916,10	9.190,40	3.555,50	562,1	15.800	940
	NEU REL %	66,33	61,58	71,07	14,84	2,35	90	28
	NEU ABS %	5.298,60	4.449,70	6.147,40	2.654,30	419,6	11.850	837
	LIN REL %	30,85	26,43	35,27	13,81	2,18	66	10
	LIN ABS %	2.523,90	1.991,90	3.055,90	1.663,40	263,0	8.154	103

Con los resultados obtenidos en los hemogramas de los individuos del G2, se observa un promedio en el recuento plaquetario de 81.775 cel / mm³ y en el hematocrito de 34.65%.

4.3 Prueba diagnóstica PCR

Una vez realizada la extracción del ADN de las muestras de los individuos del G2, se procede a la medición de la concentración de ADN con el Nano Drop®, siguiendo las instrucciones del fabricante, la proporción de la absorbancia debe encontrarse por encima de 1 y cercana a 2. El consolidado de las absorbancias obtenidas de los 40 individuos se encuentran en el anexo 20. Una vez obtenida la absorbancia se procede procesar las muestras para la obtención de los resultados de la prueba molecular PCR leyendo los resultados del Termociclador y la electroforesis igual que con los individuos del G1. Al obtener los resultados de los 40 individuos se observa en el anexo 21, el consolidado donde solo 17 de estos fueron positivos por PCR a *E. Canis*, los restantes 23 fueron negativos.

4.3.1 Análisis y estadística descriptiva de la PCR. Referente a la estadística descriptiva de las constantes fisiológicas de los individuos PCR positivos y negativos del G2, se presentan en el anexo 22 y 23. La estadística descriptiva de los hemogramas de los individuos del G2, PCR positivos y PCR negativos se presentan en los anexos 24 y anexo 25 respectivamente. La comparación de los del G2 con los subgrupos PCR positivos y negativos se relaciona en la tabla 14.

Tabla 14. Algunos parámetros fisiológicos y sanguíneos de individuos del G2-PCR positivos y negativos

Parámetro	Promedio de G2 (40)	PCR positivos (17)	PCR negativos (23)
TEMP °C	40.025	40,27	39,84
Htco. %	34,65	30,68	37,57
Hemogl. g/L	118,03	104,76	127,83
RBC cel/mm ³	5.127,80	4623,5	5500,4
Plaquetas cel/mm ³	81.755	41.465	111.530

Para los 17 individuos del G2 positivos por PCR a *E.canis*, se observa que el promedio de plaquetas fue de 41.465 cel/mm³, un hematocrito promedio de 30,68% comparados con los 23 individuos negativos por PCR donde las plaquetas fueron de 111.530 cel/mm³ y el hematocrito de 37,57%.

4.3.2 Relación PCR respecto a las variables cuantitativas, cualitativas y fisiológicas de individuos del G2. Al desarrollar el análisis estadístico se observa que no existe diferencia significativa entre la relación de PCR con las variables cualitativas y cuantitativas obtenidas de los individuos del G2 con respecto al sexo, edad, raza, peso, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria. Sin embargo, si se observó diferencia estadísticamente significativa en la prueba *t de Student* con (p=0.0002) entre PCR y temperatura, siendo la temperatura promedio para el G2, de 38,78°C. En el caso de los individuos del G2 que fueron PCR positivos, la temperatura promedio se situó en 40,27 °C, a su vez los individuos PCR negativos del mismo grupo G2, exhibieron una temperatura promedio de 39,84 °C.

Tabla 15. Comparación temperatura entre el G1 y individuos del G2-PCR positivos y negativos.

TEMPERATURA	G1	G2 PCR NEGATIVO	G2 PCR POSITIVO
PROMEDIO	38,78	39,84	40,27
SD	0,4	0,19	0,44
LIM INF IC 95%	38,54	39,75	40,04
LIM SUP IC 95%	39,02	39,92	40,49

Se observan variaciones en la temperatura al comparar los resultados obtenidos en individuos G1 y PCR negativos siendo la temperatura mas baja en los G1. Si bien en los PCR negativos la temperatura ya se considera fiebre al encontrarse por encima de los rangos de normalidad de 38.5 a 39.5°C que se establece en la practica clinica. Para los PCR positivos con 40.27°C ese valor se considera fiebre o temperatura alta.

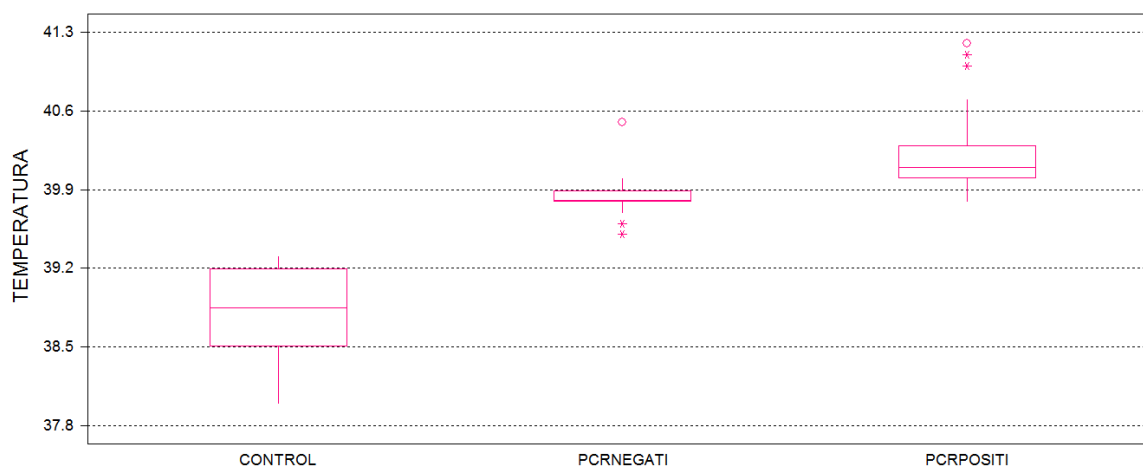


Figura 12. Comparativo de las temperaturas obtenidas de los individuos del G1 y individuos del G2.

4.3.3 Relación de la PCR respecto a las variables sanguíneas de individuos del G2. Con respecto a las células sanguíneas de los individuos del G2, no existe diferencia significativa entre el PCR respecto a los leucocitos, neutrófilos y linfocitos, pero si se encontró diferencia estadísticamente significativa con respecto al hematocrito $p=0.0098$, a la hemoglobina $p=0.0086$, a los glóbulos rojos $p=0.0260$ y a las plaquetas $p=0.0000$ en la prueba *t de Student*. En estas variables donde hubo diferencia significativa se realizan comparaciones con el G1 y los PCR positivos y negativos pertenecientes al G2, como se observa en la gráfica 6.

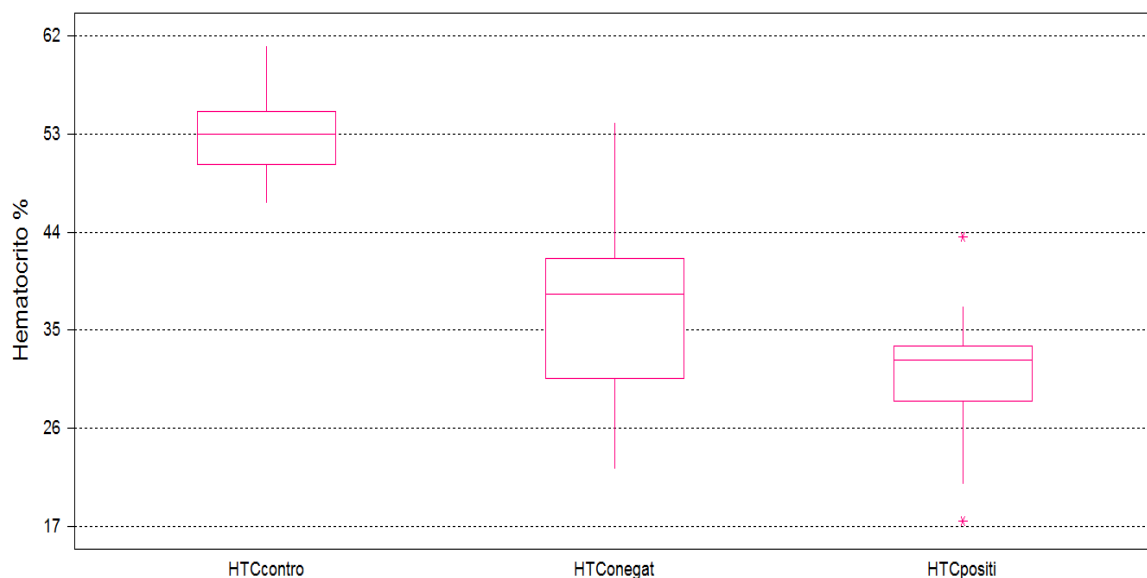


Figura 13. Comparativo del Hematocrito entre individuos del G1 y del G2 PCR negativos y positivos.

En cuanto al hematocrito de los individuos del G1, se observa que el promedio está en 52,55% mientras que los PCR positivo tienen el nivel más bajo correspondiente a 30,68% entre los tres grupos indicando presencia de anemia.

Tabla 16. Comparación del hematocrito entre los G1 y G2 (PCR negativos positivos).

HEMATOCRITO	G1	G2 PCR NEGATIVO	G2 PCR POSITIVO
PROMEDIO	52,55	37,57	30,68
SD	3,95	8,87	6,35
LIM INF CI 95%	50,26	33,73	27,42
LIM SUP CI 95%	54,83	41,41	33,95

En los individuos del G2, que resultaron PCR negativos el promedio fue 37,57%

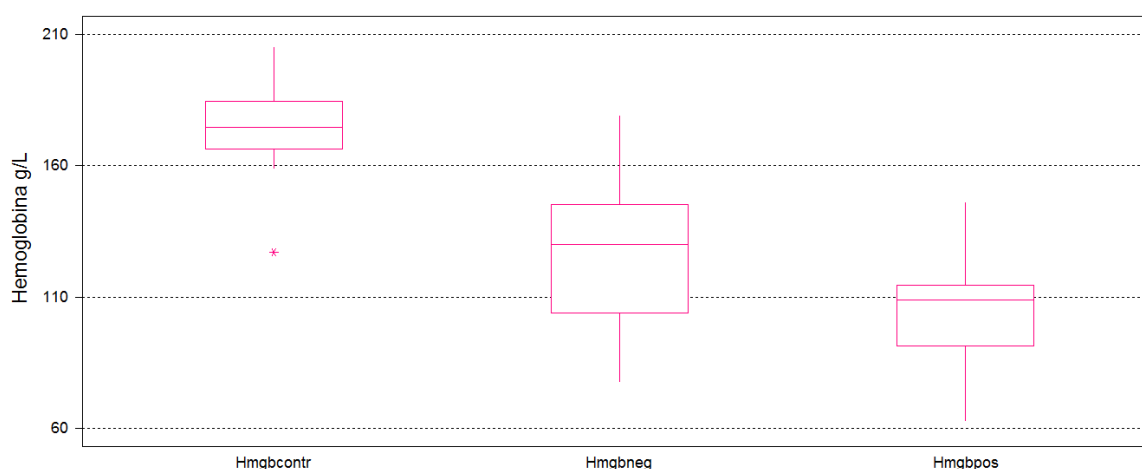


Figura 14. Comparativo de la Hemoglobina entre individuos del G1 y del G2 (PCR negativos y positivos).

Tabla 17. Parámetros del PCR respecto a la hemoglobina del G2.

HEMOGLOBINA	G1	G2 PCR NEGATIVO	G2 PCR POSITIVO
PROMEDIO	171,14	127,83	104,76
SD	17,90	29,03	21,23
LIM INF CI 95%	163,80	115,27	93,84
LIM SUP CI 95%	184,48	140,38	115,68

La hemoglobina de los individuos del G2 que fueron PCR negativos presentó un promedio de 127,83; mientras que los del mismo grupo PCR positivos el promedio de hemoglobina fue de 104,76.

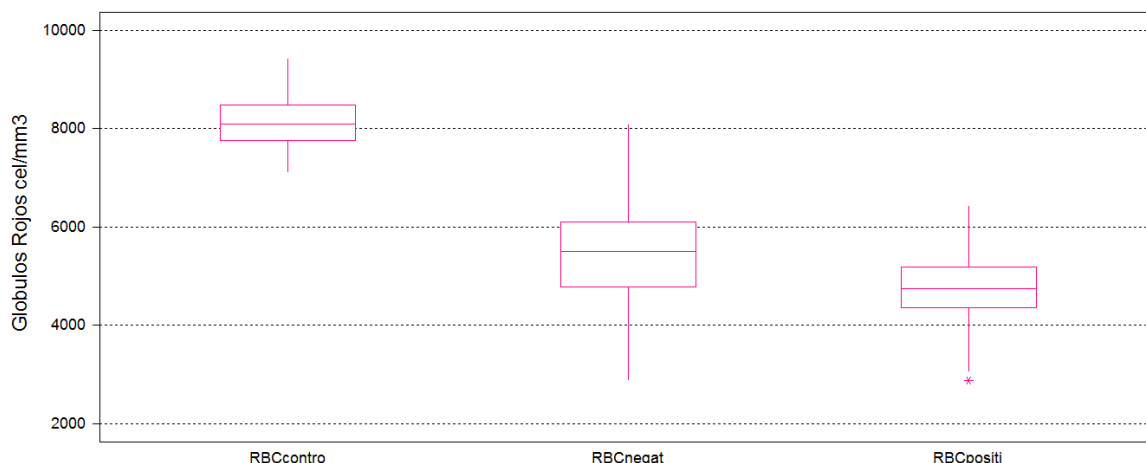


Figura 15. Comparativo entre Glóbulos rojos de individuos del G1 y del G2 (PCR negativos y positivos).

Tabla 18. Comparativo entre Glóbulos rojos de individuos del G1 y del G2 (PCR negativos y positivos).

GLOBULOS ROJOS	G1	G2	
		PCR NEGATIVO	PCR POSITIVO
PROMEDIO	8112,1	5500,4	4623,5
SD	609,54	1335,8	933,47
LIM INF CI 95%	7760,2	4922,8	4143,6
LIM SUP CI 95%	8464,1	6078,1	5103,5

El valor promedio de los glóbulos rojos en los G2 que resultaron negativos fue de 5500,4; para los positivos del grupo de G2, el promedio de glóbulos rojos fue 4623.5.

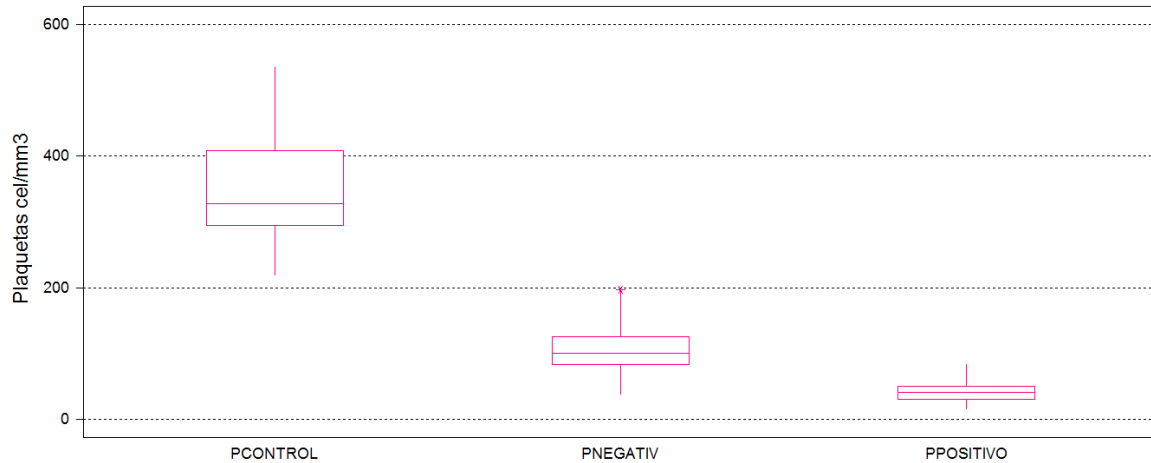


Figura 16. Comparativo del valor obtenido de plaquetas entre individuos del G1 y del G2 (PCR negativos y positivos).

Tabla 19. Comparativo de las Plaquetas entre individuos del G1 y del G2 (PCR negativos y positivos).

PLAQUETAS	G1	G2 PCR NEGATIVO	G2 PCR POSITIVO
PROMEDIO	347.590	111.530	41.465
SD	94,67	46,58	18,63
LIM INF CI 95%	292.920	91.391	31.882
LIM SUP CI 95%	402.250	131.680	51.048

Las plaquetas del grupo de individuos PCR negativos muestran un promedio de 111.535; en el caso de los PCR positivos del mismo grupo, el promedio fue 41.465, indicando una trombocitopenia marcada, mientras que en los individuos del G1, el promedio de plaquetas fue de 347.590 cel. / mm³.

4.4 Prueba de la Tnlc

Una vez desarrollado el proceso de medición de troponina en las muestras de los individuos del G2 como se menciona en el apartado de metodología se obtienen los resultados que se presentan en el anexo 26.

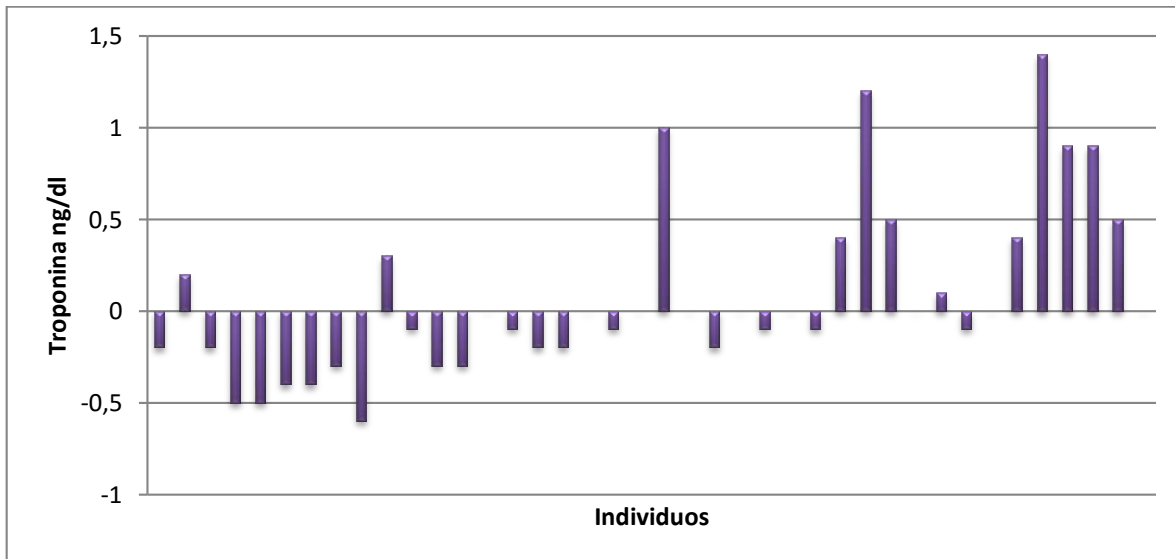


Figura 17. Resultado de la prueba de troponina en individuos del G2.

4.4.1 Relación de Tnlc respecto variables cualitativas y cuantitativas. No se encuentra diferencia significativa entre los resultados de la Tnlc con respecto a las variables cualitativas y cuantitativas como sexo, raza, edad, peso y temperatura de los individuos del G2, así como no existen diferencias significativas en comparación con las células sanguíneas de la línea roja y blanca.

4.4.2 *Relación entre las pruebas de la Tnlc y la PCR.* Aplicando la prueba de Student a los resultados de Tnlc y PCR, es evidente una diferencia estadística significativa entre las dos pruebas ($p = 0.0478$). Los valores de troponina son mayores en los individuos PCR positivos a Ehrlichia con promedio de 0,2412 y una SD de 0,4744, y el CI del 95% siendo el límite inferior de 0.00274 y el superior de 0,4851. Comparados con los individuos del G2-PCR negativos, los cuales presentaron valores de troponina promedio de -0.0522 y una SD de 0,4284 con un CI del 95% y el límite inferior de -0,2374 y el superior de 0.1331. Finalmente, en el grupo G1 el promedio es -0,1429 con SD de 0.3204 y con CI del 95% el límite inferior de -0,3278 y superior de 0.0421.

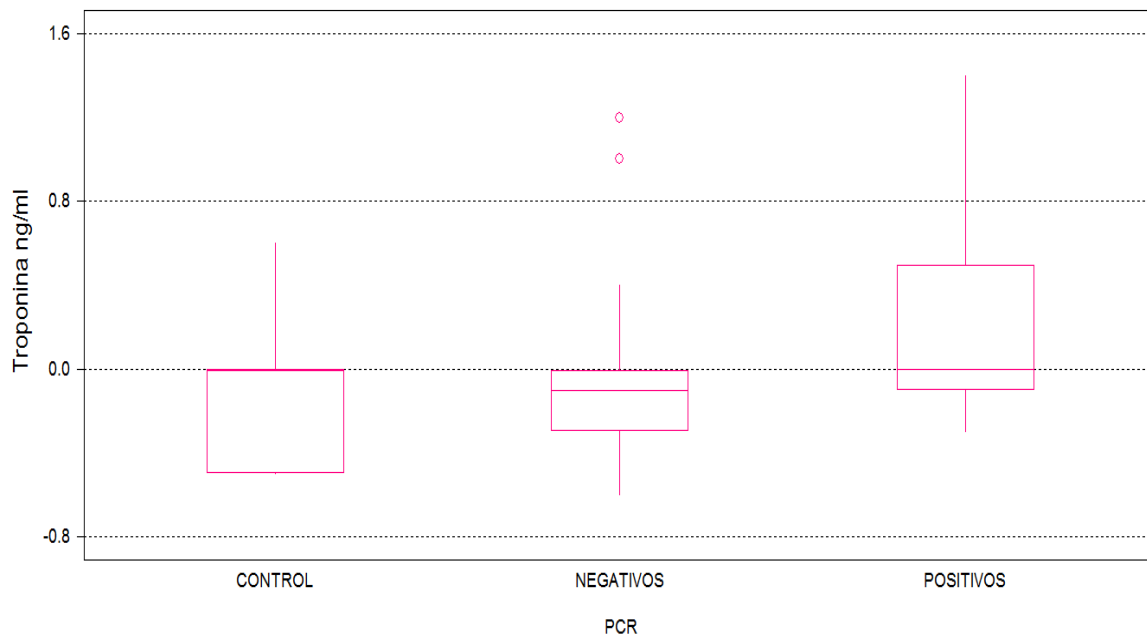


Figura 18. Relación de Tnlc con respecto a PCR de individuos del G2.

5 DISCUSIÓN

Este estudio analiza los niveles de Tnlc y su correlación con la positividad por PCR a *Ehrlichia canis* en individuos, aparentemente sanos G1 controles y el G2 individuos sospechosos por signos y sintomatología de estar infectados por la bacteria.

La primera fase de la investigación fue la selección de individuos con base en el cuadro hemático e historia clínica. Esto permitió distribuirlos en cada uno de los grupos G1 y G2. En la segunda fase del proyecto y para confirmar el diagnóstico de infección por *E. canis*, se realizaron las pruebas de diagnóstico por PCR y en la tercera fase se valoró la Tnlc.

Para el estudio, la población se seleccionó según criterios de inclusión generales como ser individuos indistintamente de machos y hembras, con rango de edad de uno a seis años. Esta consideración se tuvo en cuenta debido a que las mediciones de troponina presentan variaciones entre individuos jóvenes y adultos; considerando como adultos a los individuos mayores de siete años que pueden presentar alteraciones cardíacas a partir de esa edad, y esto lo explica un estudio adelantado con individuos G1 por Oyama et al., en el 2004. En este estudio, se relacionaron la edad con las concentraciones Tnlc, y se encontró que el corazón sano de individuos a partir de los siete años de vida, pierde hasta 35%

de los cardiomiocitos; probablemente por cambios degenerativos en la vasculatura coronaria que ocasiona la disminución en la densidad capilar llevando a la muerte de estas células como consecuencia normal del envejecimiento. La vasculitis, hemorragias de miocardio e hipoperfusión acompañada de una respuesta inflamatoria contribuyen a la fisiopatología de lesión cardíaca en individuos con Ehrlichiosis (Diniz et al., 2008).

El G2 cumplió con los criterios de inclusión establecidos para la investigación. Las variables como edad, sexo raza, no presentaron diferencia significativa con respecto a la positividad para PCR y la Tnlc. No hay predisposición con respecto al sexo en el desarrollo de la enfermedad y puede aparecer a cualquier edad (Sainz et al., 2015). Todas las razas son susceptibles, sin embargo, razas como Pastor Alemán y Huskie siberiano, están predispuestas a desarrollar signos clínicos más severos (Nyindo et al., 1980).

Dentro de la dinámica de la investigación, al adelantar la prueba diagnóstica de PCR se debió dividir el G2 en dos subgrupos, acogiéndose a los resultados de la PCR, en donde de los 17/40 individuos del G2 fueron PCR positivos y 23/40 individuos resultaron PCR negativos para *Ehrlichia canis*. La selección de los PCR positivos y negativos se dio teniéndose en cuenta la especificidad que ofrece la PCR como método diagnóstico para detectar la presencia de ADN de la bacteria para *E. canis*, siendo esto una prueba de que la infección se encuentra activa por la presencia de ADN de la bacteria (Sainz et al., 2015). Se encontraron 23 individuos PCR negativos, no obstante, presentaban sintomatología y hemograma concordante con Ehrlichiosis, condición que llevó a clasificarlos como G2. Varios

factores pudieron ser la causa, a tener en cuenta como: no hubo positividad en la prueba por los días que llevó la bacteria en circulación como lo reporta Schaefer et al., 2007, donde observaron signos de Ehrlichiosis Monocítica Canina 10 días pos inoculación, pero las pruebas de PCR solo mostraron positividad entre los días 18-24 días pos inoculación. Es posible que esa haya sido la causa en los individuos de esta investigación a pesar de presentar sintomatología para la enfermedad no reflejaron positividad en la prueba. Además, probablemente los individuos PCR negativos no estaban en fase aguda. Como lo observo René-Martellet et al., 2015, donde la PCR en general, permite la detección de individuos infectados en fase aguda de la enfermedad. También pueden resultar falsos negativos por la ausencia de ADN de los patógenos en la muestra, lo cual nos es garantía de su ausencia absoluta (Sainz et al., 2015).

Es de anotar que en esta investigación la prueba PCR se desarrolló exclusivamente para la especie *E. canis*, dejando por fuera otras especies como la *Ehrlichia chaffeensis*; *Ehrlichia Ewingii*, Ehrlichiosis granulocítica humana y *Ehrlichia ruminantium* que, durante su infección, producen fiebre y causan trombocitopenia en individuos (Kelly y Lucas 2009). Si bien *E. canis* se considera agente primario en individuos, tanto *E. ewingii* y *E. chaffeensis* parecen ser más comunes en estos que la *E. canis* en áreas con sobrepoblación de garrapatas (Little, 2010). Aunque en Colombia estudios de Benavides en el 2011 reportan presencia de *E. canis* y *E. platys* que son transmitidas por garrapatas del género *R. sanguineus* y *Amblyomma cajennense*.

Con respecto a la Tnlc, como biomarcador específico se libera del miocardio según la lesión tisular y la alteración de las membranas de los cardiomiocitos (O'Brien et al., 2006). Pero en cuanto a los niveles de Tnlc, a la fecha no se encontró literatura que reporte niveles o rangos normales para troponina en individuos debido a las diferentes pruebas y kits de laboratorios que existen en el mercado llevando a que cada prueba tenga rangos distintos. Como en el caso de individuos G1 en un estudio de Adin et al., en 2005, donde se utilizó el Biosite Triage Meter® el nivel de Tnlc fue de <0.05 ng/ml. Ninguna prueba puede considerarse mejor que otra como lo comprobaron al medir concentraciones de Tnlc en individuos enfermos donde los niveles 0.05 – 5.72 ng/ml (Biosite), 0.02 – 11.1 ng/mL (Access), y 0.02 – 9.73 ng/ml (Stratus) aunque están relacionadas no se pueden comparar entre sí (Adin et al., 2006).

En el presente estudio los niveles de Tnlc en los individuos del G1 el promedio fue -0.1143 ng/ml. Estos resultados son acordes con los obtenidos de investigaciones en individuos sanos de otros estudios como el de Oyama y Sisson en 2004; Shaw, et al., 2004. Los individuos PCR positivos presentan niveles de Tnlc en promedio de 0.2412 ng/ml comprobando así que los incrementos en los niveles de Tnlc están asociados a enfermedades como Ehrlichiosis (Undhad et al., 2012). Los niveles encontrados en esta investigación en individuos G2-PCR positivos a *Ehrlichia* con promedio de $0,2412$ ng/ml, presentan niveles más altos comparados con los reportados en el estudio de Diniz et al., 2008 donde determinaron como promedio para Tnlc un valor de $0,04$ ng/dl en individuos infectados naturalmente con *E. canis*; Indicando con ello lesión en los cardiomiocitos. Así mismo se encontró diferencia significativa con respecto a la

positividad para PCR condición que indica cierta asociación en la presentación de la enfermedad y el subsiguiente daño al miocardio, posterior a esto se produce el daño al miocardio, la hipertrofia y la pérdida progresiva de la función contráctil, que son acompañados de daño celular y liberación creciente de Tnlc (Oyama et al., 2004).

Luego de la infección por *E. canis*, se reportan cambios histopatológicos manifestados por infiltrados inflamatorios con degeneración y necrosis de cardiomiocitos (Buemberg y Rincón 2009). Estos daños celulares se explican por la sobreproducción de anticuerpos paralela a una respuesta celular disminuida que son claves en la patogenia de la enfermedad. La adhesión bacteriana lleva a la activación de la membrana celular e inicia la formación del fagosoma en el que se incluye la bacteria invasora. Los lisosomas y vacuolas se fusionan al fagosoma generando la digestión del patógeno (Roitt, 1998), la destrucción de la célula fagocitaria provocaría la liberación de agentes bacterianos, enzimas lisosómicas y metabolitos tóxicos capaces de producir una destrucción tisular crónica con inflamación (Harrus et al, 1999). Es así como se ven afectados varios órganos y sistemas, ocasionando diversas manifestaciones de signos y síntomas. Una de las razones más importantes de la multiplicidad de signología asociada a la infección por *E. canis*, es que tras el periodo de incubación se produce la diseminación de las *Ehrlichia* por la circulación sanguínea y linfática además la movilidad de los macrófagos coadyuva en la diseminación del patógeno en todo el organismo (Huxsoll et al, 1970).

En el estudio realizado por Diniz et al., 2008, encontraron que individuos infectados de forma aguda con *E. canis* e individuos anémicos tenían un mayor riesgo de lesión miocárdica, además una dilatación ventricular izquierda como mecanismo compensatorio durante la sobrecarga de volumen para evitar la disminución del gasto cardíaco, sugiriendo lesión cardíaca secundaria con cambios morfológicos.

En cuanto a las variables del hemograma en individuos PCR positivos se presentan niveles bajos en hemoglobina y hematocrito, comparado con los PCR negativos y el G1. Resultados similares fueron reportados por Dagnone, et al., en el 2003 demostrando en su estudio que una disminución significativa en los niveles de hemoglobina por Ehrlichiosis es una causa importante de la anemia en los individuos. De igual forma Breitschwerdt et al., 1998 describió el descenso en los valores de hemoglobina y hematocrito relacionado con lesiones severas de la médula ósea. La disminución de estos valores, en la fase aguda, se explica por depleción en la producción de células de la serie roja y el incremento de la eritrofagocitosis de causa inmunológica (Woody y Hoskins, 1991). En cuanto a la disminución en el conteo plaquetario indica la instauración de la trombocitopenia, condición más sobresaliente en los animales con Ehrlichiosis aguda (Ansari-Mood, et al., 2015; Bremer et al., 2005; Solano et al., 2015). Esto fue comprobado en esta investigación, en donde los individuos seleccionados como G2 presentaban trombocitopenia leve moderada o marcada como en el caso de los PCR positivos donde las plaquetas se encontraron por debajo de 50.000 cel/mm³. La Ehrlichiosis canina por *E. Canis* puede avanzar incluso a trombocitopenia severa, la cual desencadena en la mayoría de los casos múltiples hemorragias en diferentes

órganos y sistemas que deterioran aún más el recuento de células sanguíneas. (Schaefer, et al., 2007). Otro factor de presentación frecuente que altera los recuentos celulares es la coinfección con otros hemoparásitos, en donde la infección en estos casos es más persistente aunado a la trombocitopenia y anemia grave. (Gaunt, et al., 2010). La patogénesis de la trombocitopenia en la fase aguda de Ehrlichiosis incluye aumento del consumo de plaquetas por los cambios inflamatorios en el endotelio de los vasos sanguíneos, aumenta el secuestro esplénico de plaquetas, y la destrucción inmunológica que lleva a una disminución en la vida útil de las plaquetas (Harrus et al., 1999). Finalmente, la trombocitopenia puede explicarse además por la destrucción inmunomediada, secuestro de plaquetas, disminución en la producción, vasculitis y anomalías en la función de las plaquetas (Lappin et al., 2010).

En los 17 individuos del G2-PCR positivos se observaron, temperaturas elevadas por encima del rango normal, lo que concuerda con reportes en individuos con *Ehrlichia canis*, entre las que se menciona la fiebre como signo común, referenciado por Benavides y Ramirez, 2003; Cardoso et al., 2012; Diniz et al., 2008; Gaunt et al., 2010, y Warner y Harrus, 2000. En un estudio de Schaefer, et al., 2007 se reportaron temperaturas elevadas en individuos luego de 14 días pos inoculación con *E. canis*. Si se comparan los individuos PCR positivos con los PCR negativos del G2, en este estudio, se observa que exista diferencia en la temperatura promedio entre ellos, pero los PCR negativos están presentando temperaturas por encima de los valores considerados normales (Cunningham y Klein, 2009).

Los resultados del estudio indican que existe la posibilidad de que individuos PCR positivos a *Ehrlichia*, estén desarrollando lesión de los cardiomiocitos dado los niveles de Tnlc encontrados en ellos. En cuanto a los individuos PCR negativos del G2, los valores promedio para Tnlc indican lesión en los cardiomiocitos comparados con el G1; si bien estaban enfermos y no se comprobó la presencia de *E. canis*, pudieron estar infectados por otras especies de *Ehrlichia* que los llevó a ser considerados G2.

Es necesario continuar con estudios que permitan establecer niveles de Tnlc no solamente para casos de lesiones cardíacas, sino para determinar valores de normalidad en individuos G1 apoyados en las pruebas de laboratorio existentes en el país que sirvan como referente para futuras investigaciones al respecto. Además, es necesario realizar estudios con un número mayor de individuos, debido a la alta incidencia de garrapatas en la zona y en el país, así como la complementación con otras pruebas de laboratorio seriadas incluyendo pruebas moleculares donde se puedan tipificar otras especies de *Ehrlichia* causantes de la enfermedad y junto con la ecocardiografía confirmar la lesión cardíaca. Así mismo estudios por series de tiempo durante la presentación de la enfermedad con pruebas hematológicas para observar las alteraciones en los valores de las células sanguíneas, hasta la finalización del tratamiento, condición que revelaría no solo la lesión cardíaca, sino que brindaría más información sobre el desarrollo de la Ehrlichiosis en la zona; logrando entender mejor la fisiopatología de la infección y brindando un tratamiento más específico y adecuado al paciente no solo durante el desarrollo de la enfermedad hemoparasitaria si no en la posible instauración de

una lesión cardíaca a futuro, logrando con esto establecer medidas de prevención más que de tratamiento.

6 CONCLUSIONES

De acuerdo a los objetivos planteados y luego de obtener los resultados de la investigación se llegan a las siguientes conclusiones:

Existe diferencia significativa entre los niveles de troponina de individuos positivos a *E. canis* por PCR, valores de hematocrito, hemoglobina, glóbulos rojos y plaquetas se encuentran en niveles más bajos comparados con los individuos G1 y los G2 PCR negativos. En el G2 cerca de la mitad fueron PCR positivos, con una probabilidad alta de que la etapa en que se estaba desarrollando la enfermedad predominara la fase crónica sobre la aguda.

El valor de Tnlc en individuos G2-PCR positivos fue más elevado respecto a los individuos G2-PCR negativos y grupo G1 indicando lesión en los cardiomiocitos, aunque en este estudio no se pudo establecer una correlación directa entre PCR y Tnlc, probablemente el número reducido de individuos pudo influir al momento de la estadística. Adicionalmente, los resultados del hemograma como hemoglobina, hematocrito y plaquetas fueron estadísticamente menores en los individuos del G2-PCR positivos para la *E. canis*, confirmando reportes previos.

Siendo este trabajo eminentemente de tipo investigativo-diagnóstico, se desprende de los resultados obtenidos, la importancia del diagnóstico prematuro

de la Ehrlichiosis para instaurar un tratamiento inmediato y efectivo; lo que se logra con el uso adecuado de la semiología, a la cual se sugiere incorporar como protocolo para el diagnóstico, los criterios de selección de los individuos utilizados para este estudio y la utilización de una prueba que reconozca el ADN de la bacteria *Ehrlichia spp.*, en cualquiera de los estados de la enfermedad la que deberá ser sensible y específica, para lo cual la PCR, es la prueba que cumple con estas características

La Tnlc utilizada como método diagnóstico para detectar daños a los cardiomiocitos, resulta ser la prueba de elección si se sospecha de daños primarios a la célula cardíaca, siendo de gran ayuda para prevenir lesiones más severas que puedan comprometer la estructura y funcionalidad del corazón de los individuos. En la presente investigación esta prueba demostró su utilidad diagnóstica, siendo sensible, específica y rápida. No solo deberá considerarse para diagnóstico inicial de lesión a la célula cardíaca, en casos de infección por *Ehrlichia*; si no cuando se requiera para obtener el diagnóstico en todos los casos de lesiones del músculo cardíaco.

Este estudio puede tomarse como la base para generar procesos de investigación en los que se determine la presencia a largo plazo de lesiones miocárdicas en individuos con enfermedad hemoparasitaria subclínica. Los niveles de Tnlc no fueron correlacionados con la severidad de la lesión miocárdica, esta podría ser establecida *in vivo* mediante ecocardiografía, electrocardiografía y resonancia magnética y *ex vivo* mediante biopsia, lo cual aportaría en el estudio de la enfermedad cardiovascular en zonas tropicales.

7 REFERENCIAS

- Adin, D. B., Oyama, M. A., Sleeper, M. M. y Milner, R. J. (2006), Comparison of Canine Cardiac Troponin I Concentrations as Determined by 3 Analyzers. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20: 1136–1142. doi: 10.1111/j.1939-1676.2006.tb00712.x)
- Adin, D. B., Rowan J. Milner, R. J., Berger, K.D., Engel, C., Salute, M. (2005). Cardiac troponin I concentrations in normal dogs and cats using a bedside analyzer, *Journal of Veterinary Cardiology*, (7), Issue 1, 2005, Pages 27-32, ISSN 1760-2734, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jvc.2005.02.001>.
- Alcaldía de Villavicencio, Información General: descripción, ubicación geográfica, temperatura y otros datos de interés de la ciudad <http://www.villavicencio.gov.co/>.
- Ansari-Mood, M., Khoshnegah, J., Mohri, M., y Rajaei, S. M. (2015). Seroprevalence and Risk Factors of Ehrlichia canis Infection among Companion Dogs of Mashhad, North East of Iran, 2009–2010. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, 9(2), 184–194.
- Baba, K. I., Itamoto, K., Amimoto, A., Kitagawa, K., Hiraoka, H., Mizuno, T., Sato, H., Okuda, M. (2012). Ehrlichia canis infection in two dogs that emigrated from endemic areas. *Journal of Veterinary Medicine Science* ;74(6):775-8. Epub 2011 Dec 28.
- Benavides, J. A. (2011). Perspectiva tropical de rickettsias y otros agentes transmitidos por garrapatas en mascotas. III Congreso latinoamericano de enfermedades rickettsiales. *Biomédica* 2011;31(Supl):11-73.
- Benavides, J. A. y Ramírez, G. F. (2003). Casos clínicos. Ehrlichiosis canina. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* (16): 3, 2003. <http://rccp.udea.edu.co/index.php/ojs/article/view/132/129>.
- Buemberguer, S. J., y Rincón, C. N. (2009). Evaluación del uso de la troponina I sérica como indicador diagnóstico en enfermedad cardíaca en individuos. *T14.09 B862e.pdf - Universidad de la Salle*.

- Breitschwerdt, E. B., Hegarty, B. C., y Hancock, S. I. (1998). Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. *Journal of Clinical Microbiology* 1998; 36:2645-2651.
- Bremer, W. G., Schaefer, J. J., Wagner, E. R., Ewing, S. A., Rikihisa, Y., Needham, G. R., Jittapalapong, S., Moore, D. L. and Stich, R. W. (2005). Transstadial and intrastadial experimental transmission of *Ehrlichia canis* by male *Rhipicephalus sanguineus*. *Veterinary Parasitology*, 131(1-2), 95–105. <http://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.04.030>
- Burgener, I. A., Kovacevic, A., Mauldin, G. N. and Lombard, C. W. (2006), Cardiac troponins as indicators of acute myocardial damage in dogs. *Journal of veterinary internal medicine*, 20: 277–283. doi: 10.1111/j.1939-1676.2006.tb02857.x
- Cardoso, L., Mendao, C., and Madeira de Carvalho. L. (2012). Prevalence of *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, *Anaplasma* spp, and *Leishmania infantum* in apparently and CVBD-suspect dogs in Portugal. <http://www.parasitesandvectors.com/content/5/1/62>.
- Castro, M. B., Machado, Aquino, L.P., Alessi, A. C., Costa M. (2004). Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. *Veterinary Parasitology*. 119:73-86.
- Couto. (1998). Its a coagulopathy. But couldnt it be ehrlichiosis? *Proceedings of the fourth European FECAVA-SCIVAC Congress*, (págs. 135-136). European FECAVA-SCIVAC.
- Cunningham, J., Klein, B. (2009). *Fisiologia Veterinaria*. Elsevier Saunder. Cuarta Edicion. .
- Dagnone, A. S., de Moráis, H.S., Vidotto, M.C., Jojima, F.S., Vidotto, O. (2003). Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. *Veterinary Parasitology*. 117(4):285-90.
- Dawson, J.E., Biggie, K.I., Warner, C.K., Cookson, K., Jenkins, S., Levin, J.F., Olson, J. G. (1996). Polymerase chain reaction evidence of *Ehrlichia chaffeensis*, an etiologic agent of human ehrlichiosis, in dogs from southeast Virginia. *American Journal Veterinary Research*. 57(8):1175-9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8836370>.

- Day, M.(2011). The immunopathology of canine vector-borne diseases. *Parasites & Vectors* 2011, 4:48 doi:10.1186/1756-3305-4-48.
at:<http://www.parasitesandvectors.com/content/4/1/48>.
- Diniz, P.P.V.P., De Moraes, H. S., Breitschwerdt,E.B., y Schwartz, D. S. (2008). Serum cardiac troponin I concentration in dogs with ehrlichiosis. *Journal Veteterinary Intern Medicine*. 2008; 22(5):1136-43.
- Diniz, P.P.V.P., De Moraes, H.S.A., Breitschwerdt, E.B. and Schwartz, D.S. (2008). Serum Cardiac Troponin I Concentration in Dogs with Ehrlichiosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22: 1136–1143. doi: 10.1111/j.1939-1676.2008.0145.
- Farias, T.E., Paiva, A. and Camboim,E.M, (2012). An Assessment of Whole Blood and Fractions by Nested PCR as a DNA Source for Diagnosing Canine Ehrlichiosis and Anaplasmosis, *The Scientific World Journal*, 2012, Article ID 605743, 6 pages, 2012. doi:10.1100/2012/605743
- García de la Villa, B., Díaz-Buschmann, I., Jurado, J.A., García,R., y Parra, F. J. (1998). Valor de la troponina I cardíaca como prueba diagnóstica en el estudio de dolor toracico. *Revista Española de Cardiología* 1998; 51:122-8. – (51):2. <http://www.revespcardiol.org/es/valor-troponina-i-cardiaca-como/articulo/239/>.
- Gaunt,S., Beall, M., Stillman, B., Lorentzen,L., Diniz, P., and Chandrashekar, R. (2010). Experimental infection and co infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*, hematologic serologic and molecular findings. *5th Symposium of CVBD World foro* , (págs. 12-15). New York City-USA.
- Gaunt, S., Beall, M., Stillman, B., Lorentzen, L., Diniz, P., Chandrashekar, R., and Breitschwerdt, E. (2010). Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. *Parasites and Vectors*, 3, 33.
<http://doi.org/10.1186/1756-3305-3-33>.
- Guglielmini, C., Civitella, C., Diana, A., Di Tommaso, M., Cipone, M. and Luciani, A. (2010). Serum Cardiac Troponin I Concentration in Dogs with Precapillary and Postcapillary Pulmonary Hypertension. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24: 145–152. doi: 10.1111/j.1939-1676.2009.0430.
- Harrus , S., Waner, T. (2011). Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). *Veterinary Journal* 2011;187(3):292-6. doi: 10.1016/j.tvjl.2010.02.001. Epub 2010 Mar 11.

- Harrus, S., Waner, T., Bark, H., Jongejan, F., and Cornelissen, A. W. C. A. (1999). Recent Advances in Determining the Pathogenesis of Canine Monocytic Ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(9), 2745–2749.
- Harrus, S., Waner, T., and Aizenberg, C. (1999). Amplification of Ehrlichial DNA from Dogs 34 Months after Infection. *Journal of Clinical Microbiology* 1998; 36(1): 73–76.
- Huxsoll, D.L., Hildebrandt, P.K., Nims, R.M., Amyx, H.L., Ferguson, J.A., and Wildl, D. (1970). Epizootiology of tropical canine pancytopenia.; 6(4):220-5.
- Iqbal, Z., Chaichanasiriwithaya, W., and Rikihisa, Y. (1994). Comparison of PCR with Other Tests for Early Diagnosis of Canine Ehrlichiosis. *Journal of clinical microbiology*, 1994, p. 1658-1662 0095-1137/94/\$04.00+0. American Society for Microbiology.
- Kaewmongkol, G., Maneesaay, P., Suwana, N., Tiraphut, B., Krajarngjang, T., Chouybumrung, A., Kaewmongkol, S., Sirinarumit, T., Jittapalapong, S. and Fenwick, S.G. (2015). First Detection of *Ehrlichia canis* in Cerebrospinal Fluid From a Nonthrombocytopenic Dog with Meningoencephalitis By Broad-Range PCR. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. doi: 10.1111/jvim.13788.
- Kelly, P. J., and Lucas, H. (2009). Failure to demonstrate Babesia, Anaplasma or Ehrlichia in thrombocytopenic dogs from St Kitts. *The Journal of Infection in Developing Countries, North America*, 3,. 2009.
- Kelly, P. J., Xu, C., Lucas, H., Loftis, A., Abete, J., Zeoli, F, and Wang, C. (2013). Ehrlichiosis, Babesiosis, Anaplasmosis and Hepatozoonosis in Dogs from St. Kitts, West Indies, 8(1), e53450. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0053450>.
- Kirk-Bonagura. (1994). *Terapéutica Veterinaria en Pequeños Animales*. XI edición. Interamericana Mc Graw-Hill, Madrid.
- Kocan, A. A., Levesque, G. C., Whitworth, L. C., Murphy, G. L., Ewing, S. A., and Barker, R. W. (2000). Naturally occurring Ehrlichia chaffeensis infection in coyotes from Oklahoma. *Emerging Infectious Diseases*, 6(5), 477–480.
- Koutinas, C. K., Mylonakis, M. E., O'Brien, P. J., Leontides, L., Siarkou, V.I., and Breitschwerdt, E.B. (2012). Serum cardiac troponin I concentrations in naturally occurring. *The Veterinary Journal* (Impact Factor: 2.17). 05/2012; DOI: 10.1016/j.tvjl.2012.04.008. Source: PubMed.

- Langhorn, R. and Willesen, J.L. (2016). Cardiac troponins in dogs and cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30: 36–50. doi: 10.1111/jvim.13801.
- Lappin, M., Nelson, R. W., Couto, C. G. (2010). Doenças riquetsianas polissisternicas, In: *Medicina Interna Depequenos Animais*. 4th ed. Elsevier, Rio de Janeiro. 1322–1335.
- Little, S. E. (2010). Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, (40), Issue 6. Pages 1121-1140, ISSN 0195-5616, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.07.004>.
- Lobetti, R., Dvir, E., and Pearson, J. (2002). Cardiac troponins in canine babesiosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16: 63–68. doi: 10.1111/j.1939-1676.2002.tb01607.
- Martellet- René, M., Lebert, I., Chêne, J., Massot, R., Leon, M., Leal, A. y Halos, L. (2015). Diagnosis and incidence risk of clinical canine monocytic ehrlichiosis under field conditions in Southern Europe. *Parasites and Vectors*, 8, 3. <http://doi.org/10.1186/s13071-014-0613-4>
- McBride, J.W., Corstvet, R. E., Gaunt, S. D., Chinsangaram, J., Akita, G. Y., Osburn, B. I. (1996) PCR detection of acute *Ehrlichia canis* infection in dogs. *Journal of Veteterinary Diagnostic*. 8:441-447.
- Normand, T., Forest, L., Chabanne, L., Richard, S., Davoust, B. and Juillard, V. (2009). GammalFN *Ehrlichia canis*-specific cell responses. *Clinical Microbiologyc Infections*. 15 Suppl 2:70-1. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.02194.x. Epub 2009.
- Ndip, L. M., Ndip, R. N., Esemu, S. N., Walker, D. H., and McBride, J. W. (2010). Predominance of *Ehrlichia chaffeensis* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from a kennel-confined dogs in Limbe, Cameroon. *Experimental and Applied Acarology*, 50(2), 163–168. doi:10.1007/s10493-009-9293-8.
- Nyindo, M., Huxsoll, D.L., Ristic, M., Kakoma, I., Brown, J.L., and Carson, C.A.. (1980). Cell-mediated and humoral immune responses of German Shepherd Dogs and Beagles to experimental infection with *Ehrlichia canis*. *American Journal of Veterinary Research*. 1980;41(2):250–4.
- O'Brien, P.J., Smith, D.E., and Knechtel, T.J. (2006). Cardiac troponin I is a sensitive, specific biomarker of cardiac injury in laboratory animals. *Laboratory Animal* 2006;40:153–171.

- Oyama, M. A., and Sisson, D. D. (2004). Cardiac Troponin-I Concentration in Dogs with Cardiac Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 18: 831–839. doi: 10.1111/j.1939-1676.2004.tb02629.
- Pancieria, R. J., Ewing, S.A., y Confer, W.A. (2001). Ocular Histopathology of Ehrlichial Infections in the Dog *Veterinary Pathology* 2001 38: 43-46, doi:10.1354/vp.38-1-43.
- Paniagua, L.R., y Guzmán, C.J. (2010). Características hematológicas, bioquímicas e histopatológicas de ehrlichiosis canina. Hospital Universitario de Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias, U.A.G.R.M.
- Payne, E. E., Roberts, B. K., Schroeder, N., Burk, R. L., and Schermerhorn, T. (2011), Assessment of a point-of-care cardiac troponin I test to differentiate cardiac from noncardiac causes of respiratory distress in dogs. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 21: 217–225. doi: 10.1111/j.1476-4431.2011.00632.
- Polizopoulou, Z. S., Koutinas, C. K., Dasopoulou, A., Patsikas, M., York, M., Roman, I., Gandhi, M., Patel, S., Koutinas, A. F., and O'Brien, P. J. (2014), Serial analysis of serum cardiac troponin I changes and correlation with clinical findings in 46 dogs with mitral valve disease. *Veterinary Clinical Pathology*, 43: 218–225. doi: 10.1111/vcp.12124.
- Roitt, I. (1998). El reconocimiento de los antígenos: Anticuerpos y Receptores de membrana. En: *Inmunología Fundamentos*. Editorial Médica Panamericana. 1998b.
- Romero, L.E., Dolz, G., Romero, J.J., Guevara, A., Jiménez, M. y Salazar, L. (2010) Evaluación del diagnóstico de *Ehrlichia canis* mediante frotis sanguíneo y técnica molecular en individuos de Costa Rica .*Revista de Ciencias Veterinarias*, (28): 1, [23-36], ISSN: 0250-5649, 2010 URL: <http://www.revistas.una.ac.cr/index.php/veterinaria/>.
- Sainz, Á., Roura, X., Miró, G., Estrada-Peña, A., Kohn, B., Harrus, S., and Solano-Gallego, L. (2015). Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. *Parasites and Vectors*, 8, 75. <http://doi.org/10.1186/s13071-015-0649-0>
- Santos Flávia, J. S., Coppede, A.L., Pereira, L. P., Oliveira, P. G., Roberto, R.B., Benedetti, L. B., Zucoloto, F., Lucas, L. S., and Mozart, M. (2009). Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil, *The Veterinary*

Journal, (179), Issue 1, 2009, Pages 145-148, ISSN 1090-0233,
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.08.017>.

- Schaefer, J. J., Needham, G. R., Bremer, W. G., Rikihisa, Y., Ewing, S. A., and Stich, R. W. (2007). Tick Acquisition of *Ehrlichia canis* from Dogs Treated with Doxycycline Hyclate . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(9), 3394–3396. doi:10.1128/AAC.00358-07.
- Schober, K. E., Kirbach, B., and Oechtering, G. (1999). Noninvasive assessment of myocardial cell injury in dogs with suspected cardiac contusion. *Journal Veterinary of Cardiology*. 1(2):17-25. doi: 10.1016/S1760-2734(06)70030-3.
- Shaw, S. P., Rozanski, E. A. and Rush, J. E. (2004), Cardiac Troponins I and T in Dogs with Pericardial Effusion. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 18: 322–324. doi: 10.1111/j.1939-1676.2004.tb02552.
- Sleeper, M. M., Clifford, C. A. and Laster, L. L. (2001), Cardiac Troponin I in the Normal Dog and Cat. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 15: 501–503. doi: 10.1111/j.1939-1676.2001.tb01582.
- Solano-Gallego, L., Capri, A., Pennisi, M. G., Caldin, M., Furlanello, T., and Trotta, M. (2015). Acute febrile illness is associated with Rickettsia spp infection in dogs. *Parasites and Vectors*, 8, 216. <http://doi.org/10.1186/s13071-015-0824-3>.
- Spratt, D. P., Mellanby, R. J., Drury, N. and Archer, J. (2005), Cardiac troponin I: evaluation of a biomarker for the diagnosis of heart disease in the dog. *Journal of Small Animal Practice*, 46: 139–145. doi: 10.1111/j.1748-5827.2005.tb00304.
- Tizard, I. (2002). *Inmunologia Veterinaria*. 5ta Edicion. Mexico. McGraw-Hill. Interamericana: 233-253p.
- Undhad, V.V., Fefar, D.T., Jivani, B. M., Gupta, H., Ghodasara, D. J., Joshi, B.P., and Prajapati, K.S. (2012) Cardiac troponin: an emerging cardiac biomarker in animal health, *Veterinary World* 5(8):508-511. doi: 10.5455/vetworld.2012.508-511
- Warner, T., and Harrus, S. (2000). Ehrlichiosis Monocítica Canina). Recent Advances in Canine Infectious Diseases, L. Carmichael (Ed.) Publisher: International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Ithaca, New York, USA.

- Weinborn, R., Toro, I., Leporati, M., y Castillo, D. (2012). Hallazgos serológicos de Ehrlichia spp. en individuos de la ciudad de Talca, Chile. Hospitales veterinarios. (4) N° 2 – 2012.
- Wells, S., and Sleeper, M. (2008) Cardiac troponins . *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 18(3) 2008, pp 235–245 doi:10.1111/j.1476-4431.2008.00307.
- Woody, B.J., and Hoskins, J.D.(1991). Ehrlichial Disease of Dogs. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* 21(1): 75-97. 1991.

Anexo 1. Formato de consentimiento informado



G & C
VETERINARIA
Nit. 40.394.058-2

Dra. Glenda Polo E.
Médico Veterinario Universidad de los Llanos
Médico Veterinario Homeópata FICH
T.F. 07911 Comvezoel

Dra. Clarena Polo E.
Médico Veterinario Universidad de los Llanos
T.F. 04534 Comvezoel

- Consulta ✦
- Cirugía ✦
- Ecografía ✦
- Homeopatía ✦
- Odontología ✦
- Hospitalización ✦
- Laboratorio clínico ✦

CONSENTIMIENTO INFORMADO A PROPIETARIOS DE CANINOS PACIENTES G & C VETERINARIA

NIVELES DE TROPONINA I (TnIc) Y SU CORRELACIÓN CON LA POSITIVIDAD POR PCR A EHRlichia spp., EN PACIENTES CANINOS DE UNA CLINICA VETERINARIA EN VILLAVICENCIO META

Esta investigación está dirigida por el Dr. Pedro Vargas Pinto M.V., MSc., Ph.D. Docente de la Universidad de La Salle. Clarena Emilse Polo Eraso y Luis Guillermo Villa López, estudiantes de Maestría en Ciencias Veterinarias de la misma Universidad quienes investigan los niveles de troponina en perros con Ehrlichia y en perros sanos. La importancia de la investigación es establecer si pacientes caninos positivos a Ehrlichia por PCR y pacientes sanos podrían desarrollar enfermedad cardíaca midiendo niveles de troponina I en laboratorio

Como propietario y/o responsable de la mascota autoriza la extracción de una muestra de sangre una única vez, para si hay un diagnostico o no inicial de Ehrlichia a través del cuadro hemático, se midan en laboratorio PCR y niveles de troponina I. El beneficio obtenido es conocer el posible grado de afectación o no del musculo cardíaco de la mascota, y tomar medidas preventivas de forma temprana dado el caso, a su vez las pruebas de PCR y de troponina I no tendrá ningún costo adicional para el propietario.

El conocimiento que se obtenga por realizar esta investigación se compartirá con el propietario antes de que se haga al público. No se compartirá información confidencial. Habrá una sustentación de la investigación en la comunidad Universitaria, después se publicaran los resultados para que otros investigadores interesados en el tema puedan aprender de la investigación.



Firma Propietario y/o responsable



Firma del Investigador

Cra. 19 N°. 18-51 Cantarrana 1
Villavicencio - Meta.



Tel: 668 8264
Cel: 311 889 2006

Anexo 2. Documento de aprobación Comité de Ética Universidad de la Salle

UNIVERSIDAD DE LA SALLE
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
FORMATO COMITÉ DE ÉTICA

91
on

Datos diligenciados por el comité		Consecutivo		Concepto	
Fecha Entrega	19-05-14	Fecha Comité	23-05-14	Consecutivo	07
				Concepto	AVALIADO

1. TÍTULO DEL PROYECTO
MEDICIÓN SEROLÓGICA DE TROPONINA I PARA DETERMINAR ALTERACIONES EN CARDIOMICITOS DE PACIENTES CANINOS PCR POSITIVOS A Ehrlichia Sp.

2. RESPONSABLES DEL PROYECTO
Director o Tutor: Pedro Vargas Pinto. Cédula: 7964337. Matrícula profesional: 7365. Titula y área de investigación: Médico Veterinario. Master in Sciences, Doctor in Philosophy. Fisiología, fisiopatología y toxicología cardiovascular. pvargas@unisalle.edu.co
Investigadores: Clarena Emilia Polo Enao. Código 76131211, cpolo11@unisalle.edu.co; Luis Guillermo Villa López. Código 76131220, lvilla20@unisalle.edu.co. Maestría en Ciencias Veterinarias.

3. RESUMEN DEL PROYECTO
La garrapata *Rhipicephalus sanguineus* es el ectoparásito artrópodo de mayor distribución en regiones tropicales y subtropicales además de ser el vector más común en el perro de la bacteria *E. canis*, produce sintomatología inespecífica durante la infección como fiebre, depresión, anorexia, patalejas y equimosis en mucosas y piel, epistaxis, síntomas digestivos, cardiovasculares, respiratorios, neurológicos, infundematosis, esplenomegalia, hepatomegalia, alteración multistémica y edema, además de alteraciones hematológicas como anemia e trombocitopenia.
La troponina cardíaca I siendo un biomarcador molecular que es detectado en circulación después de la muerte o lesión de cardiomiocitos, es de gran utilidad por su sensibilidad y especificidad para diagnóstico de lesión miocárdica al ser liberada hacia el torrente sanguíneo.
El objetivo de este proyecto es determinar niveles de troponina I por serología en pacientes caninos PCR positivos a *Ehrlichia* sp., tomando una muestra de sangre de perros sospechosos a los cuales se les midieron los niveles de troponina I mediante prueba de ELISA, y serán comparados con un grupo control. Los datos serán analizados estadísticamente mediante T student y el software Grad Pad Prism. Las muestras serán obtenidas en pacientes de una Clínica Veterinaria ubicada en la ciudad de Villavieja, seleccionando por examen clínico general 40 caninos, en fase aguda de la enfermedad (primera manifestación de signos y síntomas), menores a 6 años de edad con historial de infestación por garrapatas, y que además

presenten uno o más de los siguientes signos y síntomas: fiebre, depresión, anorexia, patalejas y equimosis en mucosas y piel, epistaxis, trombocitopenia, anemia, posterior a la evolución. Se espera establecer si los pacientes caninos positivos a *Ehrlichia* sp., por la prueba de PCR, presentan aumentos en los niveles de troponina I medidos por ELISA, el aumento supone atención a la detección temprana de posibles lesiones cardíacas en pacientes con *Ehrlichia* PCR positivos, además de aportar a la generación de conocimientos en el campo de la medicina veterinaria y especialmente en las áreas de cardiología y diagnóstico por biología molecular para esta enfermedad.

4. INFORMACIÓN Y JUSTIFICACIÓN DEL USO Y MANEJO DEL MODELO ANIMAL
Los animales utilizados para la investigación serán ejemplares caninos destinados a ser animales de compañía, previo consentimiento del propietario, un importador raza, sexo y peso. En cuanto a la edad deben ser perros menores a 6 años (El consentimiento se hace más lento en los perros de mayor edad, entre los 7 y los 9 años por ende hay cambios en órganos y metabolismo en los cardiomiocitos, que podrían estar relacionadas con el desarrollo de la enfermedad cardíaca. Esta investigación permitirá la detección temprana de posibles lesiones cardíacas en pacientes con *Ehrlichia* PCR positivos, además de aportar a la generación de conocimientos en el campo de la medicina veterinaria y especialmente en las áreas de cardiología y diagnóstico por biología molecular para esta enfermedad.

La *Ehrlichiosis* es una enfermedad infecciosa importante y potencialmente fatal para perros y otros miembros de la familia Canidae (Waner & Harnus, 2000). Se puede transmitir los organismos durante más de 5 meses después de ingestión de sangre infectada, el período de incubación de la enfermedad varía de 7 a 21 días. La garrapata (montón del perro también puede albergar *Ixodes* spp. y *Hyalomma* (Couto, 1996). Los síntomas que se reportan en los pacientes se pueden clasificar según evolución en aguda: fiebre, secreción ocular nasal serosa o purulenta, anorexia, caquexia, disnea, infundematosis y en crónica: caracterizada por depresión, pérdida de peso, membranas pálidas, dolor abdominal, epistaxis, hemorragias retinianas, esplenomegalia, aumento de sonidos pulmonares, uveítis anterior o posterior, edema corneal, convulsiones, hepatomegalia, artritis, poliuria, polidipsia y ataxias. (Brenneisen & Ramm, 2003). El diagnóstico de la enfermedad se basa en anamnesis, presentación clínica y se confirma con las pruebas de laboratorio (Brenneisen, 2012). El diagnóstico definitivo para la infección por *E. canis* requiere de técnicas moleculares (Hanus, 2011). El método más fiable clínicamente para el diagnóstico de *Ehrlichiosis* canina es mediante técnicas serológicas tales como la prueba de inmunofluorescencia (IFA) y la placa de aglutinación del látex que detectan *E. canis* en suero anticuerpos (Sillinger, Sorenson, France, Bowie, Barbet, & Breitshwert, 2002; Mc Brinn, Corvett, Gaunt, Chinsangaram, Akita & Osburn 1996). La detección de su ADN en los tejidos blanco, mediante técnicas de amplificación de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Ishai, Chachanasinwhitaya, & Clin, 1994; Koutinas, Billiris, Kontos, Papadopoulos, & Ralls, 2003).

La troponina es una proteína globular forma parte del mecanismo regulador para la contracción del músculo esquelético y cardíaco, está situada en el filamento fino del complejo troponina de las miofibrillas, contiene tres subunidades polipeptídicas: troponina C (flajadora de calcio), troponina I (inhibidora de la interacción actina-miosina) y troponina T (flajadora de troponina), las cuales son liberadas hacia el torrente sanguíneo durante alteración o daño del miocardio, por pérdida de la integridad de la membrana celular (Guzmán & Quiroga, 2010). La troponina cardíaca I siendo un biomarcador molecular que se detecta en la circulación después de la muerte o lesión de cardiomiocitos, es de gran utilidad por su sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de lesión miocárdica (Koutinas, Mylonakis, O'Brien, Leonidas, Sliarkou, & Breitshwert, 2012). La evidencia actual sugiere que *E. canis* puede ser una causa de daño o alteración miocárdica (Koutinas, Mylonakis, O'Brien, Leonidas, Sliarkou, & Breitshwert, 2012). Los resultados de un estudio indican que la concentración de troponina I con frecuencia aumenta en perros que están infectados naturalmente con *Ehrlichia* canis. Es importante destacar que las concentraciones de troponina I se incrementaron a niveles similares en la enfermedad tanto con

4. CONCEPTO DEL COMITÉ DE ÉTICA

El Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de la Salle, en su sesión ordinaria del día 23 de mayo de 2014, aprobó el presente proyecto de investigación, con el concepto de **AVALIADO**.

5. OBSERVACIONES

Se recomienda al investigador que presente el consentimiento informado de los animales y de sus propietarios, así como el consentimiento de los investigadores y del tutor.

6. FIRMAS RESPONSABLES DEL PROYECTO

Director o Tutor: Pedro Vargas Pinto

Investigadores: Luis Guillermo Villa López y Clarena Emilia Polo Enao

CONCEPTO: Avaluado Avaluado con recomendaciones u observaciones No avaluado

REVISADO POR:

Miembro Comité: Comité de Ética

Miembro Comité: Comité de Ética

Miembro Comité: Comité de Ética

Miembro Comité: Comité de Ética

Guzmán, & Quiroga. (2010). Troponina en el diagnóstico de infarto al miocardio - *SciELO Chile*. Recuperado el 29 de 10 de 2013, de http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=00034-98872010000300020

Hanus. 2011. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). Recuperado el 05 de 09 de 2013, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20226700>

Ishai, Chachanasinwhitaya, & Clin. (1994). Comparison of PCR with Other Tests for Early Diagnosis of Canine - Recuperado el 05 de 09 de 2013, de <http://jgm.asm.org/content/32/7/1658.full.pdf>

Koutinas, Billiris, Kontos, Papadopoulos, & Ralls. (2003). Metodos de Diagnostico Ehrlichia - *GEOCITIES*.ws. Recuperado el 09 de 09 de 2013, de <http://www.geocities.ws/eboussaidv@pinobweb/VISEPNOT525.html>

Koutinas, Mylonakis, O'Brien, Leonidas, Sliarkou, & Breitshwert. (2012). Serum cardiac troponin I concentrations in naturally occurring. *The Veterinary Journal*, 30

McBrinn, Corvett, Gaunt, Chinsangaram, Akita, & Osburn. (1996). PCR detection of acute *Ehrlichia canis* infection in dogs. *Journal Veterinary Diagnostics*, 441-447.

Waner, & Harnus. (2000). Ehrlichiosis monocitica canina by T. Waner and S. Harnus. - *IVIS*. Recuperado el 05 de 09 de 2013, de http://www.ivis.org/advances/infect_dis_carniche/waner_es/ivis.pdf

FIRMA RESPONSABLES DEL PROYECTO

Nota: al firmar este documento, los investigadores hacen constar que tuvieron en cuenta las Cinco Libertades de los Animales del Farm Animal Welfare Council (1979) y el Principio de las 3Rs de Russel y Burch (1959).

Anexo 3. Formato de historia clínica

HISTORIA CLINICA		
I. Reseña		
Nombre:	Especie:	Raza:
Sexo:	Peso:	Alzada:
Fecha de Nacimiento:		
II. Características especiales:		
color.	Pelaje.	Cicatrices.
Cirugías estéticas	Tatuajes.	
Condición corporal 0/5	utilidad	
III. Datos del propietario:		
Nombre:	Dirección:	Teléfono:
IV. Motivo de consulta:		
V. Antecedentes de enfermedad actual: (Diagnósticos y Tratamientos anteriores)		
VI. Datos medio ambientales:		
Entorno:	Nutrición:	Calidad de vida:
VII. Enfermedades		
VIII. Constantes fisiológicas:		
Temperatura:	Frecuencia cardíaca:	Pulso:
Frecuencia respiratoria:		
IX. Hallazgos a la evaluación clínica		
X. Diagnóstico presuntivo		
XI. Diferenciales		
XII. Pruebas y ayudas diagnósticas ordenadas		
XIII. Tratamiento		

Anexo 4.Descripción sobre el método para la toma de muestras de los individuos incluidos en el estudio.

Toma de muestras

Para la toma de las muestras se utilizarán los siguientes materiales:

- tubos estériles de cierre hermético, tipo Venojet así:
- Con anticoagulante tubo tapa lila: EDTA o Heparina para el hemograma y prueba de PCR.
- Sin anticoagulante tubo tapa roja: para sueros para la prueba de Troponina
- Sistema de agujas vacutainer estériles: para la extracción de sangre
- Alcohol al 70%
- Iodo al 2%
- Máquina de esquilar con cuchilla No. 40 para rasurado
- Algodón

Extracción de muestras de sangre

Se debe rasurar el área a punzar, limpiar muy bien con alcohol 70% y luego aplicar un hisopo o gasa con tintura de iodo al 2%. La asepsia se realizará en sentido contrario al crecimiento del pelo del animal y en forma circular del centro hacia la periferia. Se extraerá la muestra de la Vena cefálica antebraquial o vena safena mediante el sistema de tubos al vacío (tipo Vacutainer), que por ser un sistema cerrado presta mayor garantía en cuanto a asepsia y preservación de las muestras. Se extraerán cinco centímetros cúbicos de sangre por cada tubo un total de tres tubos por paciente uno con anticoagulante dos sin anticoagulante, la

sangre se extraerá lentamente inclinando levemente cada tubo para que esta se deposite con suavidad en las paredes del tubo evitando así la hemólisis de los glóbulos rojos, una vez extraída la sangre se retirará la aguja que se desechará en guardián rojo y se aplicará presión con algodón adosado a la piel mediante cinta adhesiva de microporo por cinco minutos, se homogenizará la sangre con el anticoagulante moviendo el tubo suavemente, para evitar la formación de coágulos. El tubo sin anticoagulante se dejará reposar en posición horizontal durante cinco minutos.

Luego de la toma de las muestras estas se almacenarán temporalmente en refrigeración a temperaturas entre 4 °C y 8 °C mientras se envía en la hora siguiente al laboratorio clínico para el proceso del hemograma; las demás muestras PCR y troponina se almacenarán a menos 20 °C hasta su procesamiento, en el caso de PCR se almacena máximo seis meses y para el almacenamiento de la muestra para el test de troponina no se podrá almacenar por más de dos meses.

Anexo 5. Materiales, método y Protocolo de preparación de muestras y extracción de ADN de sangre canina.

Condiciones previas: organizar los materiales, reactivos y equipos requeridos para la preparación y extracción:

- Pipetas automáticas de diferentes volúmenes (Se recomienda 0,1 a 2µl., de 2 a 20 µl., de 20 a 200 µl., y de 100 a 1000 µl.).
- Puntas para las pipetas seleccionadas estériles en cajas (racks).
- Papel filtro
- Puntas automáticas azules con punta sellada.
- Cuchilla para escalpelo.
- Tubos eppendorf (micro centrífuga) de 1,5 ml.
- Guardián para descarte de puntas.
- Guantes de nitrilo y guantes de látex
- Marcador para tubos punta fina
- Gradilla
- Soluciones de trabajo del Estuche QIAamp® DNA Blood Mini Kit (50)
- tubos de 15 ml
- Alcohol al 70%
- PBS 1X
- DNAzol®
- Centrífuga
- Vortex
- Cabina de flujo laminar

Procedimiento

Se preparó la cabina de flujo laminar, limpiándola con alcohol al 70%. Luego se Colocaron todos los materiales necesarios para el procedimiento para irradiar con luz U.V. durante 15 minutos.

Preparación de la muestra:

1. Se sacaron los tubos con la sangre del congelador
2. Se dejaron a temperatura ambiente hasta que descongelaron, se ayuda agitando y frotando entre las dos manos
3. Una vez a temperatura ambiente se procedió al siguiente paso

Procedimiento de extracción transcrito del kit para extracción QIAamp® DNA Blood Mini Kit (50):

Se organizan las muestras en el orden adecuado para la extracción. Preparar la cabina de flujo laminar, realizar la limpieza con alcohol al 70%.

- Adicionar 400 µL de DNAzol® a cada muestra.
- Centrifugar la muestra a 10.000 (g) x 10 minutos a 4 °C o a temperatura ambiente.
- Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf de 2,0 ml.
- Agregar a la muestra 200 µL de Etanol al 100%.
- Mezclar la muestra por inversión y vortex. Mantener las muestras a temperatura ambiente durante 3 minutos.
- Transferir la mezcla a la columna ubicada en el tubo de 2,0 ml., (suministrada en el estuche de QIAamp® DNA Blood Mini Kit (50)).
- Centrifugar la muestra a 8.000 r.p.m. durante 1 minuto.

- Transferir la columna a un nuevo tubo de 2,0 ml (suministrado en el estuche) y descartar el tubo con el centrifugado.
- Agregar 500 µL de Buffer AW1 a cada columna.
- Centrifugar a 8.000 r.p.m. durante 1 minuto.
- Transferir la columna a un nuevo tubo de 2,0 ml., (suministrado en el estuche) y descartar el tubo con el centrifugado.
- Agregue 500 µL de Buffer AW2 a cada columna.
- Centrifugar a 14.000 r.p.m. durante 6 minutos para garantizar el secado total de la columna.
- Retirar la columna suavemente, evitando tenga contacto con el centrifugado, y transferirla a un nuevo tubo eppendorf de 2,0 ml., descartar el tubo con el centrifugado.
- Agregar 55 µL de Buffer AE a cada columna.
- Dejar reposar la muestra a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- Centrifugar a 8.000 r.p.m. durante 1 minuto.
- Transferir la columna a un nuevo tubo eppendorf de 2,0 ml., (No descartar el centrifugado, es DNA extraído).
- El centrifugado obtenido en la primera dilución (paso 3.18.) deberá agregarlo a la misma columna.
- Dejar reposar la muestra a temperatura ambiente durante 5 minutos.
- Centrifugar a 8.000 r.p.m. durante 1 minuto.
- El centrifugado obtenido es el DNA extraído. Almacenarlo a -20 °C para posteriores estudios.

Anexo 6. Método de la PCR anidada para la determinación de *E. canis* en Thermociclador.

Para la detección específica de *E. canis*, a partir de sangre de animales con síntomas de la enfermedad o con antecedentes de contacto con garrapatas, han sido diseñados dos pares de cebadores que amplifican el ADNr 16S; el primer par de cebadores ECC y ECB, utilizados para la primera reacción de PCR, amplifican para el género *Ehrlichia* y adicionalmente para otras procariontas como *Anaplasma spp.*, y *E. coli*. Una vez amplificada esta región del ADN, esta se utilizó como plantilla para la segunda PCR (o PCR-anidada) en la cual se acoplaron los cebadores ECAN5 y HE3, los cuales son específicos para la especie *E. canis* (Murphy et al., 1998; Gutiérrez et al., 2008; Vargas-Hernández et al., 2012) (Citados en Rojas et al., 2013). Inicialmente se tomaron alícuotas de 2 µl de ADN, las cuales se utilizaron para la amplificación de un segmento de la región 16S del RNAr que corresponde a las especies de *Ehrlichia* y otras procariontas como *Rickettsia spp.*, *Anaplasma spp.* y *E. coli* (Dawson et al., 1994); el amplificado resultante, fue sometido nuevamente a amplificación (PCR-anidada), con un segundo par de cebadores específicos para la especie *E. canis* (Wen et al., 1997; Murphy et al., 1998; Barbosa et al., 2007; Gutiérrez et al., 2008; Nakaghi et al., 2008) (Citados en Rojas et al., 2013). La primera reacción de PCR, se realizó en un volumen total de 20 µl, conteniendo Buffer Taq (BIOLASE™ DNA Polymerase, Bioline) 10x NH4 [160 mM (NH4)2SO4, 670 Tris-HCl pH 8,0, 0,1% Tween-20] a una concentración final de 1X/µl; 0,2 mM de cada uno de los dNTPs; 0,25 µM de cada uno de los cebadores ECC (5' AGA ACG AAC GCT GGC GGC AAG CC 3')

y *ECB* (5' CGT ATT ACC GCG GCT GCT GGC 3') (Dawson et al., 1994) (Citados en Rojas et al., 2013); 1,5 mM de MgCl₂, 20 ng/μl de ADN; agua tipo HPLC esterilizada a través de un filtro de membrana de 0,22 μm de tamaño de poro (MILLEX®-GV; Millipore Products Division, Bedford, MA) y autoclavada por 30 min/121°C/15 lb de presión; y 0,5 U/μl de Taq Polimerasa.

La reacción de PCR-anidada, se llevó a cabo bajo las mismas condiciones de la primera PCR. Para esta PCR, el amplificado de la primera se diluyó en proporción 1:30 en agua tipo HPLC esterilizada y posteriormente, 1 μl de esta dilución se tomó como plantilla para ser amplificada con el segundo par de cebadores *ECAN5* (5' CAATTA TTT ATA GCC TCT GGC TAT AGG A 3') y *HE3* (5' TAT AGG TAC CGT CAT TAT CTT CCC TAT 3') específicos para la especie *E. canis* (Murphy et al., 1998; Nakaghi et al., 2008; Vargas-Hernández et al., 2012) (Citados en Rojas et al., 2013). Para los dos ciclos de PCR fueron utilizados G1es positivos y negativos, compuestos por *E. canis*, ADN humano y cóctel de reacción PCR. El perfil térmico para la amplificación con el primer par de cebadores, se realizó en 35 ciclos con una denaturación inicial a 94°C/1 min y denaturación por ciclo a 94°C/30 segundos; la hibridación de los cebadores *ECC* y *ECB* se realizó a 68°C/2 min con una extensión a 72°C/2 min y una extensión final a la misma temperatura por un tiempo de 5 minutos. El perfil térmico para los cebadores *ECAN5* y *HE3*, consistió de 37 ciclos con una denaturación inicial a 94°C/1 min y denaturación por ciclo a la misma temperatura por 30 segundos. La hibridación de los cebadores, se realizó a 60°C/2 min, con una extensión por ciclo a 72°C/1,5 min y una extensión final a la misma temperatura por 5 minutos. (Rojas et al., 2013).

Secuencias de nucleótidos y tamaños de los productos de los *primers* específicos empleados para la detección de *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia* género.

Patógeno y gen de interés	Primer	Secuencia (5' a 3')	Tamaño del producto (bp)
<i>Ehrlichia canis</i> (16SrRNA)	ECA	AACACATGCAAGTCGAACGGA	400
	HE3	TATAGGTACCGTCATTATCTTCCCTAT	
<i>Ehrlichia</i> género (16SrRNA)	EHR16SD	GGTACCYACAGAAGAAGTCC	345
	EHR16SR	TAGCACTCATCGTTTACAGC	

Fuente: Gal et al., 2008

Anexo 7. Descripción del procedimiento de la electroforesis de ADN en gel de agarosa.

En este proceso se Separaron las moléculas de ADN de acuerdo a su peso molecular a través de gel de agarosa.

Materiales:

- Unidad de electroforesis horizontal con alimentación eléctrica
- Horno microondas
- Micropipetas
- Tubos de reacción de 1,5 ml
- Balanza que pueda pesar 0,01 g
- Espátulas
- Soporte para tubos de reacción
- Material de vidrio
- Transiluminador (radiación UV, 312 nm)
- Instrumentos para documentación (por ejemplo, cámara).

Reactivos:

- Agarosa adecuada para electroforesis de ADN
- Tris [hidroximetil] aminometano (Tris) CAS 77-68-1
- Ácido bórico
- Na₂EDTA CAS 6381-92-6
- Bromuro de etidio CAS 1239-45-8
- Sacarosa
- Cianol de xileno FF CAS 2650-17-1

- ADN marcadores:

Tampón de TBE 10x (1 litro)

Tris [hidroximetil] aminometano (Tris) 54,0 g

Ácido bórico 27,5 g

Na₂EDTA 7,44 g

- Mezclar el reactivo con agua desionizada para obtener una solución de un litro con pH de 8,3.

- Conservar a temperatura ambiente.

Tampón de carga 6x (10 ml)

Cianol de xileno FF 0,025 g

Sacarosa 4 g

- Añadir sacarosa y cianol de xileno FF al agua desionizada para obtener 10 ml de solución.

Principio del procedimiento:

En el proceso de la electroforesis se realizará la separación de las moléculas de ADN a analizar de acuerdo a su peso molecular. Dicha distribución dependerá de la concentración del gel de resolución que se esté trabajando

Procedimiento:

- Sellar los bordes de un molde de plástico limpio y seco con cinta adhesiva o de otro modo. Colocar el peine adecuado de modo que se formen pocillos completos al añadir la solución de agarosa.
- Diluir tampón de TBE 10x y preparar la cantidad adecuada de tampón de TBE 0,5x para llenar la cubeta de electroforesis y preparar el gel.

- Pesar la agarosa en polvo según lo indicado en el cuadro 2 y añadirla a una cantidad apropiada de tampón de TBE 0,5x en un matraz de Erlenmeyer con tapa suelta (normalmente 150 ml de solución de gel para un molde de 15 x 15 cm y 100 ml de gel para un molde de 15 x 10 cm).
- Calentar la mezcla en un horno microondas o al baño maría hasta que se disuelva la agarosa (comprobar el volumen de la solución tras haberla calentado).
- Enfriar la mezcla a 50 - 60°C y añadir bromuro de etidio (de una solución madre de 10 mg/ml) hasta lograr una concentración final de 0,2 µg/ml y mezclar bien.
- Verter la solución en el molde y dejar que se forme el gel. La cantidad de gel empleado debe corresponder a un grosor de 3 - 5 mm., aproximadamente.
- Una vez completamente formado el gel, retirar cuidadosamente el peine y la cinta adhesiva y colocar el gel en la cubeta de electroforesis.
- Añadir tampón de TBE 0,5x a la unidad de electroforesis de modo que el gel quede cubierto por una capa de 2 - 5 mm., aproximadamente.
- Cargar 10 µl de cada muestra en pocillos consecutivos y el ADN marcador adecuado en las calles primera y última.
- Cerrar la tapa de la cubeta del gel y conectar los cables eléctricos para que el ADN migre hacia el ánodo y aplicar una tensión de 5 - 10 V/cm.
- Desarrollar la electroforesis hasta que la muestra haya recorrido la distancia adecuada a través del gel (~ 40 - 60 minutos).

- Desconectar la corriente y retirar los cables y la tapa de la cubeta. Introducir el gel en un transiluminador UV y fotografiarlo.
- Tirar el gel en el recipiente para residuos s3lidos destinado al bromuro de etidio previsto a tal fin.

Anexo 8. Procedimientos para diagnóstico de la (TnIc)

Se utilizó la prueba: Accu Bind Elisa Microwells (Monobind Inc.) adquirida en laboratorios ANNAR diagnóstica.

Principio: Análisis secuencial Inmunoenzimométrico, tipo 3

Los reactivos esenciales requeridos para un análisis inmunoenzimático incluyen mayor afinidad y especificidad de los anticuerpos (enzima conjugada e inmovilizada), con diferentes y distintos reconocimientos de epítopes, en exceso y un antígeno nativo. En este procedimiento, la inmovilización toma lugar durante el análisis en la superficie del pozo en la micro placa a través de la interacción de estreptavidina que cubre el pozo con el anticuerpo anti- Troponina-I monoclonal con biotina agregado exógenamente.

Después de la mezcla del anticuerpo monoclonal marcado con biotina, el anticuerpo marcado con la enzima y un suero que contiene antígeno nativo, resulta la reacción entre el antígeno nativo y los anticuerpos, sin competición formando un complejo anticuerpo-antígeno. La interacción es ilustrada por la siguiente ecuación:

$$ka \text{ Enz Ac}(m) + \text{AgcTnI} + \text{BtnAc}(m) \rightleftharpoons \text{Enz Ac}(m) - \text{Ag}(c\text{TnI}) - \text{BtnAc}(m) + \text{BtnAc}(m)$$

=Anticuerpo Monoclonal marcado con biotina, (cantidad excesiva)

AgcTnI = Antígeno nativo, (cantidad variable)

EnzAc (m) = Enzima marcada con anticuerpo monoclonal, (cantidad excesiva)

EnzAc (m)-Ag (cTnI)-BtnAc (m) = Complejo antígeno- anticuerpos

ka = Tasa Constante de Asociación

K-a = Tasa Constante de Disociación

Simultáneamente, el complejo es depositado en el pozo a través de la mayor reacción de afinidad de la estreptavidina y el anticuerpo marcado con biotina, esta reacción es ilustrada a continuación:

EnzAc(m)-Ag(cTnl)-BtnAc(m)+ Estreptavidinac.w. Complejo inmovilizado

EstreptavidinaCW = Estreptavidina inmovilizada en el pozo

Complejo Inmovilizado = Complejo de sándwich unido a la superficie sólida.

Luego de tiempo suficiente para la reacción, la fracción enlace de anticuerpo es separada del antígeno sin enlace mediante decantación o aspiración, la actividad de la enzima en la fracción unida al anticuerpo es directamente proporcional a la concentración nativa del antígeno, mediante el uso de diversas referencias de sueros de concentración antigénica conocida, se puede generar una curva de respuesta de dosis, de la cual se puede deducir la concentración de antígeno desconocido.

Reactivos:

Materiales Proporcionados:

A. Calibradores de Troponina-I– 1.0 ml/vial (liofilizado) [A-F]

Seis (6) viales de referencias para el Antígeno Troponina-I en niveles de 0 (A), 1.0 (B), 3.0 (C), 6.0 (D), 15 (E), y 30 (F) ng/ml. Reconstituir cada vial con 1.0ml de agua destilada o desionizada.

Los calibradores reconstituidos son estables por 24 horas a 2- 8°C para almacenar durante un periodo más largo remarque los calibradores reconstituidos en frío viales y almacene a -20°C. NO DESCONGELE MAS DE UNA VEZ. Un preservante ha sido adicionado.

Nota: Los calibradores, a base de suero humano, fueron calibrados usando los estándares de NIST para cTnI # 2921

B. Conjugado enzima- Troponina-I- 13 ml/vial – icono

Un (1) vial que contiene anticuerpo purificado con afinidad enzimática e IgG monoclonal de ratón marcado con biotina en buffer, colorante y preservante.

Almacenaje a 2-8°C

C. Microplaca de Estreptavidina - 96 pozos- Icono

Una micro placa de 96 pozos recubierta con estreptavidina y empaquetada en una bolsa de aluminio con un agente de secante. Almacenar a 2-8°C.

D. Solución de Lavado (concentrado) - 20 ml – Icono

Un vial que contiene un surfactante en búfer salino. Un preservante ha sido adicionado. Almacenar a 2-8°C.

E. Substrato A – 7.0 ml/vial- Icono SA

Una (1) botella que contiene tetrametilbencidina (TMB) en buffer. Almacenaje a 2-8°C.

F. Substrato B – 7 ml/vial – Icono SB

Una (1) botella que contiene peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en buffer. Almacenaje a 2-8°C.

G. Solución de Interrupción de la reacción – 8ml/vial –Icono

Una (1) botella que contiene un ácido fuerte (1N HCl). Almacenaje a 2-30°C.

H. Instrucciones del Producto

Materiales Requeridos, pero no proporcionados:

1. Pipeta(s) para volúmenes de 25µl y 100µl con una precisión superior al 1.5%

2. Dispensador(es) para las distribuciones repetidas de 0.100 ml y 0.350ml volúmenes con una precisión superior al 1.5% (opcional)
3. Lavador de micro placa o una botella de lavado (opcional).
4. Lector de micro placa con capacidad de absorbancia de longitud de onda de 450nm a 620nm.
5. Papel absorbente para secar los pozos de la micro placa.
6. Cubierta plástica o de micro placa para los pasos de incubación.
7. Aspirador al vacío (opcional) para los pasos del lavado.
8. Cronómetro
9. Contenedor de almacenaje para almacenar el búfer de lavado.
10. Agua destilada o desionizada.
11. Materiales de G1 de calidad.

Recolección y preparación de las muestras:

La sangre será recogida en un tubo de punción venosa con tapa roja superior sin aditivos o barra de gel. Permitir que la sangre coagule. Centrifugar la muestra para separar el suero de las células.

Las muestras pueden ser refrigeradas a 2-8°C por un período máximo de 5 días.

Si no se procesa la muestra dentro de este tiempo, esta puede ser almacenada a temperatura de -20°C hasta por 30 días. Evitar el congelamiento y el descongelamiento repetitivo.

Antes de iniciar el procedimiento, permita que todos los reactivos, los sueros de referencia y los G1es se encuentren a temperatura ambiente (20-27°C).

1. Marcar los pozos de micro placa para cada uno de los calibradores, G1es y muestras de paciente para que se prueben por duplicado. Colocar las tiras no utilizadas nuevamente en la bolsa de aluminio, sellar y almacenarlo de 2- 8°C.
2. Pipetear 0.025 ml (25µl) del calibrador apropiado, G1 o muestra dentro del pozo asignado.
3. Adicionar 0.100ml (100µl) de Reactivo de trabajo Enzima Troponina I a todos los pozos Es muy importante dispensar todos los reactivos cerca al fondo del pozo Usando una pipeta multicanal para dispensar el reactivo de enzima de manera rápida y así evitar el desvío si se toma más tiempo al dispensar.
4. Agite suavemente la micro placa ligeramente por 20-30 segundos para mezclar y cubrir con un papel plástico.
5. incubar 15 minutos a temperatura ambiente (20-27oC).
6. Descartar los contenidos de la micro placa por decantación o aspiración. Si se realiza decantación, golpee y seque la placa con papel absorbente.
7. Adicionar 350µl de buffer de lavado, decantar (golpee y seque) o aspirar. Repetir 2 veces adicionales para un total de 3 lavados. Un lavador de placa automático o manual puede ser usado, según las instrucciones del fabricante. Si se usa una botella de lavado, llene cada pozo descomprimiendo la botella (evitar las burbujas de aire) para dispensar el lavado. Decantar el lavado y repetir 2 veces adicionales.
8. Adicionar 0.100 ml (100µl) de solución de trabajo de sustrato a todos los pozos. No mezclar la micro placa después de la adición del sustrato
9. Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos.

10. Adicionar 0.050 ml (50 μ l) de solución de parada a cada pocillo y mezclar ligeramente (por 15-20 segundos). Siempre adicione reactivos en el mismo orden para minimizar las diferencias del tiempo de reacción entre los pozos.

11. Leer la absorbancia de cada pozo a 450nmn (usando una longitud de onda de referencia de 620-630nm para minimizar las imperfecciones de los pozos) en un lector de micro placas. Los resultados deben ser leídos dentro de treinta (30) minutos de haber adicionado la solución de parada.

Anexo 9. Tabla relacionando los individuos G1 y el motivo de consulta

PACIENTE	EDAD MESES	RAZA	SEXO	PESO EN Kg	MOTIVO CONSULTA
1	72	GOLDEN	M	23,4	PRIMERA VISITA
2	12	SCHNAUZER	M	7.2	G1 VACUNA
3	24	MESTIZO	M	10.3	G1 ANTIPARAS
4	60	SCHNAUZER	H	6,5	G1 ANTIPARAS
5	36	MESTIZO	H	8.3	G1 ANTIPARAS
6	60	DALMATA	H	22,6	G1 VACUNAS
7	72	LABRADOR	H	28,1	G1 ANTIPARAS
8	24	SCHNAUZER	M	7,5	G1 ANTIPARAS
9	72	MESTIZO	H	20	G1 ANTIPARAS
10	36	GOLDEN	M	25.8	G1 VACUNAS
11	72	COKER	H	12.4	G1 ANTIPARAS
12	72	P.ALEMAN	H	26.2	G1 ANTIPARAS
13	60	POODLE	M	5.3	G1 VACUNAS
14	72	LABRADOR	M	31	G1 VACUNAS
15	12	MESTIZO	M	8,6	G1 ANTIPARAS
16	72	GOLDEN	M	25,6	G1 ANTIPARAS
17	12	MALTES	H	3,2	G1VACUNAS
18	72	LABRADOR	H	24,3	G1 ANTIPARAS

Anexo 10. Tabla con la relación entre los resultados obtenidos de los cuadros hemáticos practicados a individuos del G1.

PACIENT	HEMAT. %	GLOB ROJO Cel/mm3	HEMOGL. g/L	PLAQ. Cel/mm3	LEUC. Cel/mm3	NEUT RELAT %	NEUT. ABSOL	LINFO RELAT %	LINFOC ABSOL.
1	55.2	8490000	18.8	220000	17900	66	11814	29	5191
2	50.1	7480000	16.6	230000	11700	84	9828	16	1872
3	53.9	8630000	18.4	329000	14300	70	10010	26	3718
4	53.2	8040000	17	535000	12300	79	9717	17	2091
5	52.7	8160000	17.6	311000	13800	59	8142	27	3726
6	54	8450000	18.1	294000	8890	76	6756	21	1867
7	54.3	8760000	18	470000	11200	67	7504	32	3584
8	52.2	8030000	17.9	389000	12700	71	9017	14	1778
9	53.6	8580000	18	235000	10700	74	7918	24	2568
10	54.6	8630000	12.7	431000	12300	75	9225	18	2214
11	51.1	7970000	17.2	410000	15800	66	10428	30	4740
12	50.2	7810000	17.3	361200	12800	61	7808	32	4096
13	61	9410000	20.5	294000	13200	57	7524	40	5280
14	46.7	7120000	12.7	431000	12300	30	3690	72	7626
15	56.6	8510000	18.7	378000	12700	72	9144	14	1778
16	55.8	8330000	18.5	315000	12100	79	9559	18	2178
17	48.8	7750000	16.6	326000	18000	66	11880	25	4500
18	46.8	7290000	15.9	491000	11300	75	8475	24	2712

Anexo 11. Tabla relacionando las constantes fisiológicas de individuos del G1 incluidos en el estudio.

PACIENTE	EDAD MESES	RAZA	FC l.p.m	FR r.p.m	TEMP °C
1	72	GOLDEN	94	20	39,2
2	12	SCHNAUZER	86	16	38,5
3	24	MESTIZO	80	18	39
4	60	SCHNAUZER	88	22	39,1
5	36	MESTIZO	83	20	39,3
6	60	DALMATA	84	23	39
7	72	LABRADOR	82	20	38,3
8	24	SCHNAUZER	92	18	38,2
9	72	MESTIZO	80	16	38,7
10	36	GOLDEN	80	20	39,3
11	72	COKER	78	22	38
12	72	P.ALEMAN	100	26	38,4
13	60	POODLE	74	27	38,3
14	72	LABRADOR	78	20	39,2
15	12	MESTIZO	82	24	39
16	72	GOLDEN	87	12	38.6
17	12	MALTES	94	28	39,2
18	72	LABRADOR	78	25	38.5

Anexo 12. Tabla con el registro de los resultados obtenidos del hemograma, PCR y Tnlc referente al G1.

PAC	HTCO	GLOB ROJO	HEMOGL.	PLAQ.	LEUC.	NEU REL	NEUT. ABSOL	LINFO RELAT.	LINF. ABS.	TROPONINA ng/ml	PCR
1	55.2	8490000	18.8	220000	17900	66	11814	29	5191	0	NEGAT
2	47.5	6860000	19	202000	14100	70	9870	28	3948	0	POSITIV
3	52.4	7640000	17.7	213000	17000	68	11560	27	4590	-0.1	POSITIV
4	50.1	7480000	16.6	230000	11700	84	9828	16	1872	-0.5	NEGAT
5	53.9	8630000	18.4	329000	14300	70	10010	26	3718	-0.5	NEGAT
6	53.2	8040000	17	535000	12300	79	9717	17	2091	-0.5	NEGAT
7	52.7	8160000	17.6	311000	13800	59	8142	27	3726	-0.5	NEGAT
8	54	8,450.000	18.1	294000	8890	76	6756	21	1867	0.9	NEGAT
9	54.3	8760000	18	470000	11200	67	7504	32	3584	-0.1	NEGAT
10	52.2	8030000	17.9	389000	12700	71	9017	14	1778	-0.5	NEGAT
11	53.6	8580000	18	235000	10700	74	7918	24	2568	-0.1	NEGAT
12	54.6	8630000	12.7	431000	12300	75	9225	18	2214	-0.5	NEGAT
13	51.1	7970000	17.2	410000	15800	66	10428	30	4740	0	NEGAT
14	50.2	7810000	17.3	361200	12800	61	7808	32	4096	0	NEGAT
15	61	9410000	20.5	294000	13200	57	7524	40	5280	-0,5	NEGAT
16	46.7	7120000	12.7	431000	12300	30	3690	72	7626	0,6	NEGAT
17	56.6	8510000	18.7	378000	12700	72	9144	14	1778	0	NEGAT
18	55.8	8330000	18.5	315000	12100	79	9559	18	2178	0	NEGAT
19	48.8	7750000	16.6	326000	18000	66	11880	25	4500	0	NEGAT
20	46.8	7290000	15.9	491000	11300	75	8475	24	2712	0	NEGAT

Anexo 13. Tabla con la relación de los resultados obtenidos de la prueba PCR practicada en el G1.

PACIENTE	PCR
1	NEGATIVO
2	NEGATIVO
3	NEGATIVO
4	NEGATIVO
5	NEGATIVO
6	NEGATIVO
7	NEGATIVO
8	NEGATIVO
9	NEGATIVO
10	NEGATIVO
11	NEGATIVO
12	NEGATIVO
13	NEGATIVO
14	NEGATIVO
15	NEGATIVO
16	NEGATIVO
17	NEGATIVO
18	NEGATIVO

Anexo 14. Tabla de lecturas de la absorbancia respecto a la concentración del ADN en equipo Nano Droop®.

PACIENTE	ADN	Unit	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280
1	186	ng/μl	372	202	1.84
2	193	ng/μl	386	219	1.76
3	267	ng/μl	533	289	1.84
4	254	ng/μl	509	281	1.81
5	85	ng/μl	170	84	2.03
6	79	ng/μl	158	66	2.39
7	68	ng/μl	135	59	2.31
8	69	ng/μl	138	62	2.22
9	81	ng/μl	163	90	1.80
10	73	ng/μl	147	40	3.67
11	85	ng/μl	171	98	1.74
12	99	ng/μl	199	104	1.92
13	194	ng/μl	388	221	1.75
14	94	ng/μl	189	101	1.87
15	214	ng/μl	429	246	1.74
16	165	ng/μl	330	188	1.76
17	126	ng/μl	251	135	1.86
18	132	ng/μl	265	142	1.87

Anexo 15. Tabla presentando los valores de Tnlc ng/ml obtenidos de las muestras del G1.

PACIENTE	TROPONINA ng/ml
1	0
2	-0.5
3	-0.5
4	-0.5
5	-0.5
6	0.9
7	-0.1
8	-0.5
9	-0.1
10	-0.5
11	0
12	0
13	-0.5
14	0.6
15	0
16	0
17	0
18	0

Anexo 16. Tabla relacionando los datos básicos de los individuos G2.

PACIENTE	EDAD EN MESES	RAZA	SEXO	PESO EN KG
1e	60	Pinscher	M	2.5
2e	24	Cocker	M	13.5
3e	24	Schnauzer	H	9
4e	12	Poodle	M	3.8
5e	60	Chihuahua	M	8.2
6e	72	Poodle	H	5.3
7e	24	Doberman	M	25
8e	36	Poodle	H	1.2
9e	60	Maltipo	M	8
10e	60	Mestizo	M	16
11e	24	Beagle	M	12.3
12e	24	Poodle	M	5.6
13e	18	Labrador	M	28.2
14e	48	Pinscher	H	1.4
15e	36	Mestizo	H	20
16e	18	Pug	H	9
17e	72	Mestizo	M	6
18e	24	Poodle	M	3.6
19e	24	Golden R.	H	29
20e	36	Pinscher	M	3.3
21e	60	Mestizo	H	4.8
22e	36	Schnauzer	M	8.2
23e	24	Yorkshire	H	2.6
24e	36	Poodle	H	9.8
25e	24	Poodle	M	4.5
26e	36	Schnauzer	H	10.5
27e	24	Poodle	M	4.2
28e	48	Schnauzer	H	7.5
29e	60	Schnauzer	M	12.6
30e	36	Cocker	M	10.8
31e	36	Schnauzer	M	9
32e	60	Mestizo	M	21
33e	18	Labrador	M	20
34e	12	Cocker	M	11.2
35e	18	Poodle	M	5.4
36e	48	Poodle	M	8.7
37e	60	Mestizo	H	8.4
38e	30	Shithzu	M	6
39e	60	Schnauzer	H	7.9
40e	36	Bullterrier	M	16.5

Anexo 17. Tabla relacionando las constantes fisiológicas y motivo de consulta de los individuos del G2.

PAC	Edad mese	FC l.p.m	FR r.p.m	TEMP °C	Motivo de Consulta
1e	60	87	25	39.8	Letargo anorexia parcial
2e	24	79	26	41.1	Letargo deposición blanda, anorexia parcial
3e	24	82	18	40.3	Mucosas pálidas, anorexia parcial
4e	12	75	20	39.8	Deposición blanda con sangre, activo
5e	60	70	16	39.8	anorexia parcial letárgico
6e	72	80	18	39.9	anorexia parcial tos seca
7e	24	72	20	39.7	Deposición blanda con sangre
8e	36	75	18	39.6	Letargo anorexia total
9e	60	78	26	39.9	anorexia total
10e	60	82	25	40.1	Letargia anorexia parcial
11e	24	79	27	40	anorexia parcial letargo
12e	24	86	24	40.1	anorexia parcial
13e	18	80	21	39.8	Fondo ojo rojo bilateral ceguera parcial
14e	48	80	20	39.5	Letargo anorexia total ocasional
15e	36	77	25	39.8	Tos seca improductiva
16e	18	72	28	40	Letargo anorexia parcial deposición blanda
17e	72	79	21	39.8	Anorexia mucosas pálida letargo
18e	24	72	26	40	Letargo anorexia perdida peso
19e	24	74	22	39.9	Inquietud perdida apetito
20e	36	88	29	39.7	Vómito bilioso anorexia
21e	60	90	24	39.8	Hace 5 días tos seca improductiva
22e	36	86	27	40	Vómito alimento de 4 días tos seca improductiva
23e	24	79	19	39.8	Anorexia parcial, deposición blanda
24e	36	74	25	40	Epistaxis bilateral anorexia parcial
25e	24	83	26	39.9	anorexia parcial letargo
26e	36	85	21	41.2	Mucosas pálida anorexia total
27e	24	86	18	39.9	anorexia parcial letargo
28e	48	75	16	39.6	Vómito anorexia parcial
29e	60	72	18	40	anorexia parcial, letargo
30e	36	70	22	40.1	anorexia parcial
31e	36	75	20	39.8	Petequias en pecho anorexia parcial
32e	60	78	16	40.5	Vómito anorexia parcial
33e	18	82	26	39.8	Deposición sangre, blanda anorexia parcial
34e	12	79	24	40.2	anorexia parcial deposición blanda
35e	18	74	20	40	anorexia parcial letargo
36e	48	81	19	40.1	anorexia parcial tos seca
37e	60	87	25	39.9	anorexia parcial, letargo
38e	30	79	22	40.7	Letargo anorexia parcial
39e	60	77	23	40.1	Vómito bilioso anorexia
40e	36	80	18	41	anorexia parcial letargo

Anexo 18. Tabla con las constantes fisiológicas de los individuos del G2.

PAC	edad en meses	FC l.p.m	FR r.p.m	TEMP ° C
1e	60	87	25	39.8
2e	24	79	26	41.1
3e	24	82	18	40.3
4e	12	75	20	39.8
5e	60	70	16	39.8
6e	72	80	18	39.9
7e	24	72	20	39.7
8e	36	75	18	39.6
9e	60	78	26	39.9
10e	60	82	25	40.1
11e	24	79	27	40
12e	24	86	24	40.1
13e	18	80	21	39.8
14e	48	80	20	39.5
15e	36	77	25	39.8
16e	18	72	28	40
17e	72	79	21	39.8
18e	24	72	26	40
19e	24	74	22	39.9
20e	36	88	29	39.7
21e	60	90	24	39.8
22e	36	86	27	40
23e	24	79	19	39.8
24e	36	74	25	40
25e	24	83	26	39.9
26e	36	85	21	41.2
27e	24	86	18	39.9
28e	48	75	16	39.6
29e	60	72	18	40
30e	36	70	22	40.1
31e	36	75	20	39.8
32e	60	78	16	40.5
33e	18	82	26	39.8
34e	12	79	24	40.2
35e	18	74	20	40
36e	48	81	19	40.1
37e	60	87	25	39.9
38e	30	79	22	40.7
39e	60	77	23	40.1
40e	36	80	18	41

Anexo 19. Tabla relacionando el cuadro hemático de los individuos del G2.

N	HTCO	RBC	MCV	HMGB	PLAQ.	LEUCO.	NR	NAB	LR	LAB	ER	EA
1e	29.6	4.550	65	103	83.000	6.690	72	4.817	28	1.873		
2e	33.7	5.390	63	113	40.900	8.220	68	5.590	32	2.630		
3e	32.3	4.760	68	109	52.000	4.520	76	3.435	23	1.040	1	45
4e	22.4	2.890	78	79	184.800	8.080	62	5.010	36	2.909	2	161
5e	39.4	5.760	69	133	127.000	15.100	45	6.795	54	8.154	1	151
6e	35.7	5.560	64	119	100.800	8.060	44	3.547	39	3.143	17	1.370
7e	28.5	4.350	66	94	86.000	7.600	28	2.128	66	5.016	6	456
8e	30.3	4.130	73	100	111.400	8.310	83	6.897	16	1.330	1	83
9e	54	7.790	69	179	71.000	6.850	54	3.699	38	2.603	8	548
10e	17.5	3.070	57	63	20.000	5.880	90	5.292	10	588		
11e	30.6	5.170	59	107	83.000	14.100	83	11.703	13	1.833	4	564
12e	32.5	4.440	73	114	25.000	3.980	51	2.030	49	1.950		
13e	28.1	4.210	68	99	126.000	6.620	55	3.641	38	2.516	7	463
14e	38.3	5.580	69	126	37.800	940	89	837	11	103		
15e	53.5	8.080	66	177	183.400	10.500	57	5.985	32	3.360	11	1.155
16e	32.3	4.500	72	115	43.000	4.230	85	3.596	15	634		
17e	39.7	5.210	76	143	100.000	4.740	77	3.650	23	1.090		
18e	28.4	4.710	60	99	64.700	2.050	68	1.394	26	533		
19e	40.0	6.210	64	138	179.500	14.500	50	7.250	50	7.250		
20e	22.5	3.060	74	78	107.000	3.960	59	2.336	30	1.188	11	436
21e	41	5.920	69	138	99.100	7.440	73	5.431	24	1.786		
22e	37.3	5.220	71	146	65.800	9.430	63	5.941	34	3.206	2	189
23e	44.3	6.050	73	149	197.000	9.160	61	5.588	37	3.389	2	183
24e	28.4	4.340	66	91	50.000	7.300	56	4.088	41	2.993	3	219
25e	32.9	4.970	66	112	68.000	5.410	45	2435	51	2759	4	216
26e	23.6	3.280	72	81	20.000	6.550	81	5.305	19	1.245		
27e	33.3	4.830	69	110	85.000	5.020	53	2.661	45	2.259	2	100
28e	36.9	5.250	69	123	89.000	10.500	55	5.775	44	4.620	1	105
29e	39.3	5.510	71	130	127.000	14.200	77	10.934	16	2.272	7	994
30e	21	2880	73	68	64.000	15.800	75	11.850	25	3.950		
31e	47,6	7.010	68	159	195.000	9.140	77	7.038	22	2.011	1	91
32e	42.4	6.530	65	145	80.000	13.200	73	9.636	23	3.036		
33e	50.7	7.480	68	169	65.000	13.000	71	9.230	26	3.380	3	390
34e	35.7	5.200	69	120	29.000	7.650	77	5.890	23	1.760		
35e	31.1	4.750	66	107	51.000	7.080	47	3.328	53	3.752		
36e	36.5	5.470	67	125	30.000	8.310	60	4.986	40	3.324		
37e	37.1	5.700	65	123	16.000	5.520	62	3.422	37	2.043		
38e	28,5	4.830	59	105	35.000	6.770	82	5.551	18	1.219		
39e	43.6	6.420	68	146	48.000	6.620	87	5.759	10	662	3	199
40e	25.4	4.050	63	86	30.000	9.100	82	7.462	17	1.547	1	91

Anexo 20. Tabla concentración del ADN (*absorbancia ng/μl*) del G2.

MUESTRA	DNA	Unit	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280
1e	67	ng/μl	135	81	1.66
2e	59	ng/μl	118	60	1.97
3e	85	ng/μl	169	91	1.86
4e	183	ng/μl	366	198	1.85
5e	204	ng/μl	408	225	1.81
6e	453	ng/μl	907	501	1.81
7e	42	ng/μl	84	52	1.63
8e	160	ng/μl	320	175	1.83
9e	88	ng/μl	176	132	1.34
10e	164	ng/μl	327	355	0.92
11e	94	ng/μl	188	105	1.79
12e	183	ng/μl	366	201	1.82
13e	203	ng/μl	405	235	1.73
14e	1182	ng/μl	2364	1273	1.86
14e	86	ng/μl	172	150	1.15
14e	87	ng/μl	173	156	1.11
15e	71	ng/μl	142	91	1.56
16e	175	ng/μl	351	203	1.73
17e	238	ng/μl	477	273	1.75
18e	295	ng/μl	589	341	1.73
19e	52	ng/μl	104	98	1.06
20e	219	ng/μl	439	272	1.61
21e	237	ng/μl	474	262	1.81
22e	231	ng/μl	462	261	1.77
23e	217	ng/μl	434	241	1.80
24e	171	ng/μl	342	182	1.88
25e	82	ng/μl	164	96	1.70
26e	628	ng/μl	1256	772	1.63
27e	103	ng/μl	206	136	1.51
28e	24	ng/μl	48	26	1.84
29e	111	ng/μl	222	145	1.53
30e	168	ng/μl	336	194	1.74
31e	74	ng/μl	147	82	1.80
32e	171	ng/μl	343	196	1.75
33e	192	ng/μl	384	222	1.73
34e	80	ng/μl	160	94	1.71
35e	108	ng/μl	217	121	1.78
36e	116	ng/μl	232	135	1.72
37e	45	ng/μl	90	54	1.65
38e	108	ng/μl	217	130	1.67
39e	29	ng/μl	59	34	1.73
40e	146	ng/μl	292	160	1.82

Anexo 21. Tabla con los resultados de la prueba de PCR realizada a las muestras del G2.

PACIENTE N	PCR	PACIENTE N	PCR
1e	POSITIVO	21e	NEGATIVO
2e	POSITIVO	22e	NEGATIVO
3e	POSITIVO	23e	NEGATIVO
4e	NEGATIVO	24e	POSITIVO
5e	NEGATIVO	25e	POSITIVO
6e	NEGATIVO	26e	POSITIVO
7e	NEGATIVO	27e	NEGATIVO
8e	NEGATIVO	28e	NEGATIVO
9e	NEGATIVO	29e	NEGATIVO
10e	POSITIVO	30e	POSITIVO
11e	NEGATIVO	31e	NEGATIVO
12e	POSITIVO	32e	NEGATIVO
13e	NEGATIVO	33e	NEGATIVO
14e	NEGATIVO	34e	POSITIVO
15e	NEGATIVO	35e	POSITIVO
16e	POSITIVO	36e	POSITIVO
17e	NEGATIVO	37e	POSITIVO
18e	NEGATIVO	38e	POSITIVO
19e	NEGATIVO	39e	POSITIVO
20e	NEGATIVO	40e	POSITIVO

Anexo 22. Estadística descriptiva relacionada con las constantes fisiológicas de 17 individuos G2-PCR positivos.

Parámetro	Promedio	intervalo confianza 95% X		Desv. Stand.	Error estimado	Máximo	Mínimo
		Lim. inferior	Lim. superior				
FC l.p.m	79,82	77,17	82,47	5,15	1,24	87	70
FR r.p.m	23	21,46	24,53	2,97	0,72	28	18
TEMP °C	40,27	40,04	40,49	0.44	0.10	41.2	39,8

Anexo 233. Estadística descriptiva de las constantes fisiológicas de los 23 individuos G2-PCR negativos.

Parámetro	Promedio	intervalo confianza 95% X		Desv. Stand.	Error estimado	Máximo	Mínimo
		Lim. inferior	Lim. superior				
FC l.p.m	78,34	76,04	80,65	5,33	1,11	90	70
FR r.p.m	21,43	19,70	23,16	3,99	0,83	29	16
TEMP °C	39,84	39,75	39,92	0,19	0,04	40,5	39,5

Anexo 24. Estadística descriptiva para el hemograma de los 17 individuos G2-PCR positivos.

	Parámetro	promedio	interv. confianza 95%		Desv. stand	error estimado	máximo	mínimo
			Lim. inferior	Lim. superior				
LINEA ROJA	HCTO	30,688	27,420	33,957	6,3568	1,5417	43,6	17,5
	RBC	4623,5	4143,6	5103,5	933,47	226,40	6420	2880
	HMGB	104,76	93,848	115,68	21,232	5,1496	146	63
	PLAQ	41.465	31.882	51.048	18639	4520,5	83.000	16.000
LINEA BLAN. DIFER.	LEUCO	8804.3	7085.6	10523	3974,6	940.0	15100	940.0
	NEU REL	63.348	56.965	69.73	14.76	3.07	89.000	28.000
	NEU ABS	5526.3	4254.2	6799.9	2945,0	614,07	11703	837.00
	LIN REL	32.304	26,36	38,24	13,746	2,8662	66.000	11.000
	LIN ABS	2912.5	20,82	37,42	1920.2	400.40	8154.0	103.00

Anexo 25. Estadística descriptiva del cuadro hemático para los 23 individuos G2-PCR negativos.

	Parámetro	promedio	interv. confianza 95%		Desv. stand	error estimado	máximo	mínimo
			Lim. inferior	Lim. superior				
LINEA ROJA	HCTO	37,57	33.73	41,41	8,8712	1,8498	54	22,4
	RBC	5500,4	4.922,8	6078,1	1335,8	278,54	8.080	2890
	HMGB	127,83	115.27	140,38	6,5046	5,1496	179	78
	PLAQ	111.530	91.391	131.680	46,582	9,7129	197.000	37.800
LINEA BLAN. DIFER.	LEUCO	8804.3	7085.6	10523	3974,6	828,76	15100	940.0
	NEU REL	63.348	56.965	69.73	14.76	3.07	89.000	28.000
	NEU ABS	5526.3	4252.8	6799.9	2945,0	614,07	11703	837.00
	LIN REL	32.304	26,36	38,24	13,746	2,8662	66.000	11.000
	LIN ABS	2912.5	20,82	37,42	1920.2	400.40	8154.0	103.00

Anexo 26. Tabla relacionando los resultados de la prueba de Tnlc, en el G2.

PACIENTE N	Troponina ng/ml	PACIENTE N	Troponina ng/ml
1e	-0.2	21e	1
2e	0.2	22e	0
3e	-0.2	23e	-0.2
4e	-0.5	24e	0
5e	-0.5	25e	-0.1
6e	-0.4	26e	0
7e	-0.4	27e	-0.1
8e	-0.3	28e	0.4
9e	-0.6	29e	1.2
0e	0.3	30e	0.5
11e	-0.1	31e	0
12e	-0.3	32e	0.1
13e	-0.3	33e	-0.1
14e	0	34e	0
15e	-0.1	35e	0.4
16e	-0.2	36e	1.4
17e	-0.2	37e	0.9
18e	0	38e	0.9
19e	-0.1	39e	0.5
20e	0	40e	0