

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



GLADYS CONSUELO MORALES DE LOS ANGELES

GUATEMALA, NOVIEMBRE 2010.

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

**“Utilización de la prueba rápida de Elisa para la determinación de anticuerpos
circulantes en perros sospechosos de Anaplasmosis en el municipio de Mixco,
Guatemala”**

TESIS

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

POR

GLADYS CONSUELO MORALES DE LOS ANGELES

AL CONFERÍRSELE EL GRADO ACADÉMICO DE

MÉDICA VETERINARIA

GUATEMALA, NOVIEMBRE 2010.

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

DECANO: Med. Vet. Leonidas Ávila Palma

SECRETARIO: Med. Vet. Marco Vinicio García Urbina

VOCAL I: Mag. Art. Med. Vet. Yeri Edgardo Véliz Porras

VOCAL II: Mag. Sc. Med. Vet. Fredy Rolando González Guerrero

VOCAL III: Med. Vet. y Zoot. Mario Antonio Motta González

VOCAL IV: Br. Set Leví Samayoa López

VOCAL V: Br. Luis Alberto Villeda Lanuza

ASESORES

Med. Vet. Manuel Rodríguez Zea

Med. Vet. Karla Marlene Barrientos

Med. Vet. Carlos Enrique Camey

HONORABLE TRIBUNAL EXAMINAR

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

“Utilización de la prueba rápida de Elisa para la determinación de anticuerpos circulantes en perros sospechosos de Anaplasmosis en el municipio de Mixco, Guatemala”

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

Como requisito previo a optar al título profesional de

MÉDICA VETERINARIA

TESIS QUE DEDICO

A Dios, por ser siempre mi guía y fortaleza.

A mis padres René y Thelma, por ser los pilares de mi vida.

A mis hermanas Elida y Ulda.

A mi hermano Estuardo siempre conmigo! (Q.E.P.D.)

A mi hijo el pequeño Estuardo, eres la luz de mis ojos.

A mi esposo, por aparecer en mi vida y darme el mayor de los regalos.

A mis amigos Argelia, Claudia, Vilanova, Ruano y Viviana Álvarez.

A mis amigos de EPS en especial a Vivian Teos, Sofía, Lilian y Aurora por ser ángeles en mi vida.

Finalmente a mis mascotas y animales que me alegran con sus regalos de amor, risa y lealtad.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por el regalo de los animales y la promesa de otro Edén en el cielo.

A mi familia en especial a mi madre por esas noches de desvelo y paciencia.

A mi esposo por su apoyo incondicional.

A mis asesores: Dr. Rodríguez Zea, Dr. Carlos Camey y Dra. Karla Barrientos.

Y muy especialmente a todas las familias que velan por la salud, felicidad y la longevidad de sus mascotas como una prioridad. A todas ellas, mil Gracias.

INDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	HIPÓTESIS	2
III.	OBJETIVOS	3
	3.1 General	3
	3.2 Específicos	3
IV.	REVISIÓN DE LITERATURA	4
	4.1 Anaplasmosis	4
	4.1.1. Etiología	4
	4.1.2. Sinónimo	5
	4.1.3. Epidemiología	5
	4.1.4. Transmisión	5
	4.1.5. Especies susceptibles	5
	4.2 Descripción de la garrapata	6
	4.2.1. Clasificación taxonómica	6
	4.3 Orden Rickettsiales	6
	4.3.1. Subdivisión	7
	4.4 Signos clínicos	7
	4.5 Diagnóstico de la enfermedad	8
	4.5.1. La técnica de Elisa	9
	4.5.1.2. Fases de un ensayo Elisa	10
	4.5.1.2.1. Elisa indirecto	11
	4.5.1.2.2. Elisa de competición	11
	4.5.1.3. Tipos de Técnica Elisa	11
	4.5.1.3.1. Técnicas Cualitativas	11
	4.5.1.3.2. Técnicas Cuantitativas	12
	4.5.1.3.3. Técnicas Semi-cuantitativas	12
	4.5.2. Descripción snap 4 dx	13
	4.6 Diagnóstico diferencial	14
	4.7 Tratamiento	14
V.	MATERIALES Y MÉTODOS	15
	5.1 Área de estudio	15
	5.2 Materiales	15
	5.2.1. Recursos humanos	15
	5.2.2. Recursos de laboratorio	15
	5.2.3. Recursos de tipo biológico	15
	5.2.4. Centros de referencia	16
	5.3 Métodos	16
	5.3.1. Área de Estudio	16

5.3.2.	Metodología de Campo	17
5.3.3.	Metodología de Laboratorio	17
5.3.4.	Análisis Estadístico	17
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÒN	18
VII.	CONCLUSIONES	19
VIII.	RECOMENDACIONES	20
IX.	RESUMEN	21
X.	BIBLIOGRAFÍA	22
XI.	ANEXO	24
11.1	Formulario para el registro de las muestras Analizadas.	25
11.2	Tablas y Gráficas de Resultados	26
	Tabla 1. Pacientes caninos infectados con <i>Anaplasma sp.</i>	26
	Tabla 2. Exposición a garrapatas y presencia de Síntomatología en caninos	27
	Tabla 3. Animales infectados positivos y negativos Según el sexo.	28
	Tabla 4. Animales infectados por edad en años	29

I. INTRODUCCIÓN

La Anaplasmosis es una enfermedad causada por organismos de *Anaplasma phagocytophilum* y *Anaplasma platys* las cuales son transmitidas al animal por medio de la mordedura de la garrapata.

Anaplasma sp es transmitida por la garrapata marrón del perro *Rhipicephalus sanguineus* y por *Ixodes scapularis* o *Ixodes pacificus*.

Debido a que la infección se concentra en latitudes tropicales y subtropicales, su curso largo y duración variable hace difícil relacionar la Anaplasmosis con una determinada época del año. Sin embargo, hay mayor prevalencia durante la temporada de calor o después de la misma, cuando las garrapatas tienen mayor prevalencia.

Un perro con Anaplasmosis presenta varios signos asociados, incluyendo fiebre, depresión, poliartritis, vómito, diarrea, anorexia y trombocitopenia entre otros.

El diagnóstico de la enfermedad se ha basado en el hallazgo de inclusiones intracitoplasmáticas en linfocitos, monocitos o neutrófilos, o en la detección de anticuerpos contra antígenos de *Anaplasma sp*.

En la actualidad existen en el mercado algunos test comerciales de diagnóstico de Anaplasmosis basados en la técnica de Elisa las cuales, requieren de un equipo mínimo y permiten un diagnóstico serológico de Anaplasmosis ampliamente disponible.

El propósito de ésta investigación es ofrecer tanto al médico como al paciente, un diagnóstico certero, rápido y seguro que le permita instalar en clínica un tratamiento confiable y preciso al caso clínico.

II. HIPÓTESIS

En perros domésticos del grupo muestreado con la presencia de garrapata o historia de haberlas tenido, existen anticuerpos circulantes de *Anaplasma sp.*

III. OBJETIVOS

3.1 General:

- Comprobar la existencia de anticuerpos circulantes contra *Anaplasma sp* en perros domésticos con o sin presencia de garrapatas.

3.2 Específicos:

- Determinar la presencia de anticuerpos circulantes contra *Anaplasma sp* en perros domésticos, por medio de la prueba rápida de Elisa realizada en perros con presencia de garrapatas o historial de haberlas tenido, sospechosos de la enfermedad.
- Determinar la relación entre la presencia de anticuerpos, en perros domésticos con presencia de garrapatas o historial de haberlas tenido.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 ANAPLASMOSIS

Es una enfermedad rickettsial transmitida por garrapatas. Son muy comunes en perros pero extremadamente raras en gatos. La mayor parte de las enfermedades por rickettsias son causadas por garrapatas. En áreas endémicas se presenta en forma aguda, y existe mayor prevalencia durante la temporada de calor o después de la misma, cuando las garrapatas tienen mayor prevalencia. (2)

4.1.1 ETIOLOGÍA

Anaplasmosis, causada por *Anaplasma phagocytophilum*, se caracteriza por una enfermedad febril aguda en gatos, perros, caballos y seres humanos. Se transmite por la garrapata de venado (a menudo referida como el negro de patas marcaje) la misma garrapata que transmite la enfermedad de Lyme. *Anaplasma phagocytophilum* también puede infectar muchas otras especies animales silvestres que sirven de reservorios para su posterior transmisión por *Ixodes scapularis*, *Ixodes pacificus* y quizás otras especies de garrapatas. Otra forma de Anaplasmosis en caninos es causada por *Anaplasma platys* transportado por la garrapata marrón de perro. (5)

Anteriormente *Anaplasma phagocytophilum* pertenecía al género *Ehrlichia phagocytophila* (agente causal de la fiebre en el ganado bovino, ovino y caprino), y a *Ehrlichia equi* (o sea *Ehrlichia equitativa* causando *ehrlichiosis granulocítica* en caballos) y un agente sin nombre de la *ehrlichiosis granulocítica* humana (HGE). (18)

Existen varios reportes de la infección en perros por Ehrlichias que afectan granulocitos como *Ehrlichia ewingii* y por otros organismos que anteriormente se denominaban Ehrlichias y que posteriormente se renombraron como *Anaplasma phagocitophillum* (*Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocitophila* y *Ehrlichia granulocítica humana*) (12).

Anaplasma sp es un Gram negativo, y las células diana son neutrófilos, leucocitos y algunas veces Eosinófilos. Anaplasma puede verse de 4 a 18 días después de la infección primaria como un organismo de 0-6 micras. (18)

4.1.2 Sinónimo

Anaplasmosis sp, anteriormente conocida como *Ehrlichia equi*. A veces se denomina fiebre de perro, o de garrapata, fiebre canina anaplasmosis. (9)

4.1.3 Epidemiología

Anaplasma en perros esporádicamente se ha detectado en diferentes países de Europa: Suecia, Noruega, Suiza, Italia, Austria, Gran Bretaña, Eslovenia, República Checa.

Anaplasmosis se evidenció por primera vez en Australia en 2001, mientras que la primera incidencia en Canadá fue en 2005. El vector más común de Anaplasmosis en Europa es la garrapata *Ixodes ricinus*. Los vectores en América son las garrapatas *Ixodes scapularis* e *Ixodes pacificus*. Una infección con *Anaplasma sp* podría ocurrir a través de transfusión de sangre. No hay predisposición por motivos de género en los perros. (1)

4.1.4 Transmisión

Por mordedura de varias especies de garrapatas: Garrapata de venado (*Ixodes scapularis*), Garrapata Occidental patas negras (*Ixodes pacificus*) Garrapata marrón del perro (*Rhipicephalus sanguineus*) Garrapata Lone Star (*Amblyomma americanum*) Garrapata del perro americano (*Dermacentor variabilis*); que actúan como vectores en la transmisión natural.

En la actualidad no hay pruebas de que *Anaplasma sp* se puede transmitir de perros a los seres humanos. (6)

4.1.5. Especies susceptibles:

✓ Puede afectar a perros, gatos, caballos, y los seres humanos. (6)

4.2. DESCRIPCIÓN DE LA GARRAPATA

Las garrapatas son parásitos obligados en cualquiera de sus fases. La ingestión de sangre puede alcanzar 3 milímetros en una hembra repleta, insertan su órgano picador profundamente en la dermis, lo que conlleva a la aparición de lesiones en la zona. La reacción cutánea a la picadura

tiene una zona de eritema, con un pequeño nódulo de 1 mm con los bordes claramente delimitados. Estas reacciones conducen a la aparición de prurito, eritema, alopecia y descamación. (15)

4.2.1. Clasificación taxonómica de la garrapata

Phylum: Artrópoda

Clase: Arácnida

Orden: Acarina

Suborden: Ixodidos

Familia: Ixodidae (Garrapatas duras)

Género: Rhipicephalus (15)

4.3. ORDEN: RICKETTSIALES

Es el nombre genérico de un grupo de diminutos microorganismos, que presentan caracteres intermedios entre las bacterias más pequeñas y los virus. Tienen ciertas características comunes con las bacterias gram-negativas, y su multiplicación intracelular dentro de los fagosomas de la célula hospedadora, su ultraestructura, su tropismo por leucocitos circulantes así como su composición antigénica, demuestran que sus necesidades metabólicas se asemejan más a las de los virus filtrables. Su transmisión exclusiva, en la mayoría de las especies es por picadura de garrapata; aunque también pueden crecer en el tubo digestivo de piojos y otros.

Los gérmenes del orden rickettsiales son esféricos, teniendo entre 0.2 a 2.0 μ de diámetro, o bacilares, midiendo de 0.3 a 4.0 μ de longitud. (4,13,14)

4.3.1. Subdivisión

El orden Rickettsiales se dividen en cuatro familias: Rickettsiaceae, Chlamydiaceae, Bartonellaceae y Anaplasmataceae y muchos géneros patógenos que infectan diversas especies de vertebrados. (13)

4.4. SIGNOS CLÍNICOS DE ANAPLASMA

Los perros infectados con *Anaplasma sp* pueden desarrollar una enfermedad leve o una enfermedad clínicamente no aparente.

Los perros con esta enfermedad generalmente presentan síntomas dos semanas después de haber sido mordidos por una garrapata. Sin embargo, algunos perros no muestran signos durante meses.

La mayoría de los signos de la anaplasmosis:

- ✓ Artritis
- ✓ Fiebre alta
- ✓ Letargo
- ✓ Pérdida de apetito
- ✓ Vómitos
- ✓ Diarrea
- ✓ Epistaxis
- ✓ Transtornos reproductivos
- ✓ Signos neurológicos (poco frecuentes) (3)

Algunos reportes indican que la infección por *Anaplasma (Ehrlichia ewingii)* a través de PCR positiva puede ser asintomática aunque frecuentemente se reporta poliartritis y meningitis.

Durante las diferentes fases de la Anaplasmosis (Ehrlichiosis) se pueden observar cambios en los parámetros hematológicos. La trombocitopenia se mantiene durante todas las fases pudiendo ser muy severa (menor de 20.000/ μ l) y por lo general en la fase crónica los valores son menores de 10.000/ μ l. En algunos casos agudos y frecuentemente en la fase crónica se presenta leucopenia con neutropenia, linfocitosis, monocitosis y a veces eosinofilia. Se observa reactividad en todas las células sanguíneas (linfocitos reactivos e inmaduros, monocitos reactivos activados hasta convertirse en macrófagos, macroplaquetas, plaquetas vacuoladas e inmaduras). Estas alteraciones celulares son observables en todas las fases. La anemia es mas frecuente en los casos crónicos (normocítica, normocrómica no regenerativa) y en aquellos casos agudos donde hay infección mixta con Babesia (anemia regenerativa).

En la fase aguda la médula ósea es hiperplásica, especialmente por la producción de megacariocitos. En la fase crónica donde la médula ósea se hace grasosa e hipocelular puede conseguirse anemia aplásica, y al estar reducidos los valores de leucocitos y plaquetas se puede concluir que existe pancitopenia e hipoplasia medular, lo cual se ha observado en menos del 25% de los casos crónicos. En la médula ósea las pocas células que son observadas son en su mayoría linfocitos y plasmocitos; ésta infiltración linfoplasmocitaria también es observable en nódulos linfáticos cuando se realizan aspiraciones en vivo, así como post mortem; también se puede observar en bazo, hígado, meninges, pulmones, riñones y otros órganos y pueden observarse mórulas en estos tejidos. Los plasmocitos también son observados en sangre. Se han reportado mórulas de Anaplasma (Ehrlichia) en líquido cefalorraquídeo, acompañado de pleocitosis y aumento de las proteínas. En casos de Anaplasma (*E. ewingii*) se han observado mórulas en leucocitos del líquido sinovial. Mórulas en estos líquidos se han reportado en perros que recibían esteroides o quimioterapia. (12)

4.5. DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD

El diagnóstico de *Anaplasma sp* se puede realizar por medio del Ensayo de Inmunofluorescencia (IFA) donde se marca el anticuerpo con un tinte fluorescente, se requiere de un laboratorio especializado y utiliza un frotis de sangre periférica. La prueba de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es utilizada a menudo para confirmar los resultados de otras pruebas (Anaplasma), en ésta un iniciador (cebador) de ácido nucléico específico reacciona con una porción del genoma del microorganismo de interés. En la tinción de Wright modificada (Diff-Quik) el portaobjetos preparado se sumerge lentamente en metanol como fijador, luego se repite lo mismo con tinción eosinofílica y tinción basófila, se enjuaga con agua, se seca al aire. La tinción va de rosa pálido a púrpura oscuro observándose diferenciación clara de la morfología. (16,8)

4.5.1. LA TÉCNICA DE ELISA

La técnica ELISA es una prueba de unión primaria que mide la unión antígeno-anticuerpo. Es un procedimiento de ensayo inmunoenzimático cuyo nombre resulta de la asociación de las iniciales de su denominación inglesa (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Esta prueba se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto, por ejemplo un colorante, puede ser medido espectrofotométricamente. Este principio consigue mediante el uso de la fase sólida, una separación fácil entre la fracción retenida y la fracción libre.

Para esta prueba se utilizan las placas de poliestirano o filtros de membrana cubiertos de antígenos o de anticuerpos. Se pueden analizar diversas muestras como saliva, sangre o lágrimas; sin embargo, la muestra más utilizada es el suero. (10,11)

Generalmente, se procede a la fijación de uno de los componentes de la reacción inmunológica (antígeno Ag o anticuerpo Ac) a un soporte sólido, poniendo luego ese sistema en contacto con una fase fluida que contiene el reactivo complementario. Este complejo inmunológico formado es enfrentado a las moléculas capaces de reconocer a su componente más superficial, marcadas con una enzima (peroxidasa de rábano picante); agregándose posteriormente un sustrato cromogénico de la enzima marcadora. La existencia de una reacción inmunológica se demuestra y se cuantifica midiendo espectrofotométricamente la cantidad del producto enzimático resultante. (10)

El método ELISA es una técnica altamente sensible y de gran especificidad recomendado para estudio sobre grandes poblaciones en un corto tiempo de manera sencilla y económica. Está siendo utilizada como primer sustituto de la técnica de Radioinmunoensayo en la medición de hormonas, inmunoglobulinas, antígenos y anticuerpos en infecciones bacterianas, micóticas, parasitarias o virósicas. Ésta técnica presenta además una buena reproducibilidad y facilidad en la interpretación de los resultados. (10,14)

4.5.1.2. Fases de un ensayo ELISA

Las 4 fases de un ensayo ELISA son las siguientes:

1. Conjugación del anticuerpo o del antígeno con una enzima (peroxidasa, fosfatasa alcalina). El anticuerpo conjugado a la enzima se emplea en los ensayos directos e indirectos, sandwich, etc. El antígeno marcado se emplea en ensayos de competición de antígeno.
 2. Unión del antígeno (o del anticuerpo) a los pocillos. La unión de anticuerpo o antígeno se realiza con facilidad a la superficie de plásticos tratados que tienen gran afinidad por proteínas.
 3. Formación de una o más capas de inmunocomplejos. En el caso del antígeno unido a la placa se puede detectar mediante un anticuerpo anti-antígeno marcado (ELISA directo) o empleando un anticuerpo primario anti-antígeno y un secundario anti-primario marcado (ELISA indirecto). Este segundo método permite la amplificación de la señal al poderse unir uno o más anticuerpos secundarios a cada anticuerpo primario. En el caso del anticuerpo unido a la placa se incuba con una mezcla de antígeno y antígeno marcado. Se ensayan diferentes relaciones de antígeno frío frente a una cantidad fija de antígeno marcado. Es el ensayo de competición del antígeno.
 4. Revelado de la reacción enzimática. Después de un lavado para eliminar todas las moléculas marcadas no fijadas en forma de inmunocomplejos se añade el sustrato enzimático en solución. Se deja reaccionar y se lee la densidad óptica mediante espectrofotometría.
- Se han adaptado varios tipos del método Elisa tanto para la determinación de antígenos como de anticuerpos:

- Determinación de antígenos.

La modalidad mas frecuente del método Elisa para la determinación de antígenos es el modelo Elisa “sándwich”. En esta forma la placa suele ya venir con un anticuerpo fijado (monoclonal o policlonal) frente al antígeno problema, sobre el que se añadirá el macerado del órgano sospechoso, que en caso de reaccionar con el anticuerpo de la placa, será puesto en evidencia tras la adicción del segundo anticuerpo marcado con la enzima. Por último, se añade el sustrato para revelar la reacción. (14)

- Determinación de anticuerpos.

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

4.5.1.2.1. ELISA INDIRECTO

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

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

4.5.1.2.2. ELISA DE COMPETICIÓN

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

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

4.5.1.3. Tipos de Técnica Elisa

4.5.1.3.1. Técnicas Cualitativas

Son técnicas que nos indica la ausencia o presencia de un antígeno o anticuerpo determinado. Los kits incluyen controles positivos y negativos para poder determinar ésta presencia o ausencia de antígenos. Ejemplo: HIV, Hepatitis, etc. (10).

4.5.1.3.2. Técnicas Cuantitativas

Son técnicas que nos indican la cantidad de antígenos o anticuerpo presente en la muestra. Los kits incluyen +/- 6 standards (suero de diferentes concentraciones del antígeno objetivo) con los cuales se realiza una curva para así poder determinar la concentración de la muestra. Ejemplo: Hormonas, marcadores tumorales, etc. (10)

4.5.1.3.3. Técnicas Semi-cuantitativas:

Son técnicas que nos dan un indicio de la cantidad de antígeno o anticuerpo presente en la muestra con la utilización de un estándar o calibrador.

Ejemplo: ANA, nDNA, etc. (10)

4.5.2. DESCRIPCIÓN SNAP 4 DX

Tecnología Snap= ELISA

Es un ensayo inmunoenzimático competitivo donde los anticuerpos de una enfermedad se ligan con los antígenos de la misma, que están sembrados en pozos o tiras de filtro (cromex).

Que sucede dentro del snap 4 dx:

Depósito de muestra (suero + conjugado), la muestra corre por el cromex corriendo los puntos de reacción hasta alcanzar la ventana testigo.

Plataforma Snap:

- Especificidad y sensibilidad máxima
- Controles positivos y negativo
- Prefiltros para remover impurezas de la muestra
- Reactivos autocontenido eliminan la variabilidad y errores técnicos
- Usable con 3 gotas de suero, sangre o plasma
- Sólo 2 minutos de mano de obra

- Reactivos de lavado para crear fondo blanco
- Resultados estables
- Elimina residuos de hemólisis

Funcionamiento Snap 4Dx

Procedimiento

- Esta prueba puede usarse con suero, plasma o sangre entera
- El dispositivo Snap debe temperarse entre 10 a 15 minutos antes de usarse
- Se mezcla la muestra con el conjugado (3 gotas de muestra + 4 gotas de conjugado)
- Agregar la mezcla en el pozo de la muestra
- Activar el dispositivo cuando aparezca el punto de activación
- Los resultados se obtienen en 10 minutos

Reacción del Snap

- Muestra con anticuerpos o antígenos
- Anticuerpos o antígenos específicos sembrados
- Ligamiento del conjugado con los anticuerpos o antígenos
- Lavado elimina elementos no objetivo
- Conjugado amplifica el ligamiento con color azul. (7)

Método para recolección de la muestra:

Para el aislamiento de *Anaplasma phagocytophilum* se debe obtener sangre durante la fase aguda de la enfermedad, que es cuando existe la mayor concentración de leucocitos infectados en sangre periférica. La sangre debe ser extraída preferiblemente en tubos de ácido EtilenDiaminoTetraAcético (EDTA), y preservada a temperatura ambiente no más de 48 horas o congelada a 20 °C antes de la inoculación en los medios de cultivo. La sangre infectada con *Anaplasma phagocytophilum* recogida en tubos de heparina también se ha mostrado útil para el cultivo durante 10 días a temperatura ambiente y hasta 13 días conservada a 4°C. No obstante, se recomienda no utilizar estos tubos ya que comprometen su posterior utilización para la posible amplificación del genoma mediante técnicas de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

La técnica de Elisa básicamente consiste en emparejar la molécula que haya de analizarse entre otras dos macromoléculas, una de las cuales se halla conjugada a una enzima lo cual permite su detección mediante un cromógeno o sustancia luminiscente. (14)

4.6. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL PARA LA ANAPLASMOSIS

Debe realizarse diagnóstico diferencial de la Enfermedad de Lyme, debido a la exhibición de signos clínicos similares (poliartritis, letargo, anorexia, linfadenopatía). (7)

4.7. TRATAMIENTO

En pacientes con signos de Anaplasma, se suministra Doxiciclina en dosis de 5 a 10 mg/kg cada 12 horas durante 4 semanas. La doxiciclina penetra adecuadamente las células, no se elimina mediante vía renal, por lo que se recomienda en pacientes con deficiencia renal. (7,17)

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 ÁREA DE ESTUDIO

El presente estudio se realizó en el Municipio de Mixco, Guatemala.

5.2. MATERIALES

5.2.1. Recursos Humanos

- 3 Médicos Veterinarios asesores
- Estudiante investigador.

5.2.2. RECURSOS DE LABORATORIO

- Kit Elisa (Kit SNAP 4 Dx):
 - Pipetas de traslado
 - Conjugado de anticuerpo
 - Substrato amortiguador
 - Cromógeno
- Tubos de ensayo con anticoagulante (EDTA)
- Jeringas de 3 ml.
- Algodón
- Guantes de látex
- Alcohol
- Lapicero
- Fichas de control

5.2.3. RECURSOS DE TIPO BIOLÓGICO

Se sometieron a análisis 30 muestras de suero canino pertenecientes a 3 Clínicas Veterinarias en el municipio de Mixco, Guatemala.

Muestras:

Para este estudio se tomaron en cuenta los siguientes criterios:

a) Toma de muestra: Se tomaron muestras de sangre utilizando para ello los siguientes criterios de inclusión:

- 1) Pacientes caninos mayores de 1 año de edad
- 2) Pacientes caninos (perros) de ambos sexos
- 3) Pacientes caninos (perros) sin importar raza
- 4) Pacientes con o sin presencia de garrapatas, que tuvieran o no sintomatología aparente (fiebre, anorexia, epistaxis, letargo, pérdida de peso, signos neurológicos, linfadenitis, poliartritis, trastornos reproductivos).

5.2.4. CENTROS DE REFERENCIA

- Biblioteca de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Biblioteca de una Clínica Veterinaria del Municipio de Mixco, Guatemala.
- Internet.

5.3. MÉTODOS

5.3.1. Área de Estudio

Se visitaron 3 Clínicas Veterinarias ubicadas en el Municipio de Mixco, Guatemala, y se muestrearon perros que presentaron las características anteriores de inclusión mencionados en la toma de muestra y que sus dueños estuvieron anuentes a dicha toma.

5.3.2. Metodología de campo

Como primer paso se procedió a tomar las muestras de sangre con anticoagulante de 30 pacientes caninos (perros) atendidos en tres clínicas veterinarias de Municipio de Mixco, Guatemala. Luego se llevó a cabo el Método rápido de ELISA (Kit Snap 4 Dx).

5.3.3. Metodología de Laboratorio

- Se tomaron muestras de sangre de la vena cefálica del paciente utilizando jeringa.
- Se dejaron caer 3 gotas de sangre al tubo de muestra, se añadieron cuatro gotas del conjugado y se homogenizó la muestra invirtiendo el tubo 3 a 5 veces.
- Se colocó el dispositivo sobre una superficie plana, se añadió el contenido del tubo de muestra a la cubeta de muestra.
- La muestra fluyó a través de la ventanilla de resultados llegando al círculo de activación en 30 a 60 segundos aproximadamente, se pulsó firmemente el activador hasta que estuvo a nivel con el cuerpo del dispositivo y se procedió a la lectura del resultado de la prueba a los 8 minutos.

Interpretación de los resultados de los análisis:

Resultados negativos: solamente se torna de color azul el círculo del control positivo.

Resultados positivos: Cualquier desarrollo del color en los puntos de la muestra indica la presencia de anticuerpo frente a *Anaplasma phagocytophila*.. Un resultado positivo esta dado por la coloración azul del círculo del control positivo y el círculo del centro.

5.3.4. Análisis Estadístico

La variable a analizar fue la presencia de anticuerpos contra *Anaplasma sp*.

Con base a los resultados obtenidos se procedió.

- Anotación de resultados en tablas de registro y descripción de las mismas, se utilizó estadística descriptiva.
- Para determinar la relación entre animales positivos y negativos a la presencia de anticuerpos contra *Anaplasma sp* se utilizó la Prueba de Chi².

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizaron un total de 30 muestras de sangre en pacientes caninos, con un rango de edad de 1 a 10 años con un total de 15 machos y 15 hembras. (ver anexo tabla 3).

Con el uso de la Prueba de Elisa para detección de anticuerpos frente a *Anaplasma phagocytophila* en perros, de un total de 30 muestras realizadas, se obtuvieron 3 casos positivos a la enfermedad lo cual equivale al 10% de prevalencia. (ver anexo tabla 1). De dichos casos 2 fueron hembras y 1 macho.

De los animales infectados por edad en años se obtuvieron 2 casos positivos hembras en el rango de 1 a 3 años y 1 macho comprendido en el rango de 4 a 6 años. (ver anexo tabla 4).

De 30 animales muestreados se obtuvo un total de 24 con exposición a garrapatas de los cuales 11 presentaron síntomas clínicos y 13 no presentaron síntomas. Se obtuvo un total de 6 animales sin exposición a garrapatas pero con historial de haberlas tenido de los cuales, 2 presentaron síntomas y 4 no presentaron sintomatología aparente (ver anexo tabla 2, gráfico 2).

La prueba de Elisa (Kit 4 DX), detecta la presencia de anticuerpos contra antígenos de *Anaplasma sp* por lo cual es de utilidad en todas las fases de la enfermedad.

Sin embargo, la prueba de Elisa tiene como desventaja que se pueden encontrar títulos por debajo del umbral de positividad dando como resultados falsos positivos, esto es debido al período que tardan en aparecer los anticuerpos luego de la infección (varía de 15 a 28 días).

En los casos obtenidos en el presente estudio según la prueba de Chi² se determinó que no hay asociación entre la presencia de garrapatas o historial de haberlas tenido con respecto a la existencia de anticuerpos circulantes de *Anaplasma sp*.

También se pudo observar que no hay asociación estadística en referencia a la edad y sexo de cada individuo y el resultado de la prueba de Elisa de acuerdo a la prueba de Chi².

VII. CONCLUSIONES

1. En el estudio realizado en 30 perros pertenecientes al municipio de Mixco, Guatemala, se comprobó la presencia de anticuerpos circulantes contra *Anaplasma sp.*
2. No existe asociación estadística en relación a la historia clínica de infestación por garrapata y la presencia de estos durante el examen clínico con respecto a la existencia de anticuerpos contra *Anaplasma sp.*
3. No hay relación estadística en referencia a la edad y sexo del animal respecto al resultado de la prueba de Elisa.
4. La presencia o historia de garrapatoxis se hace indispensable para el diagnóstico de *Anaplasma sp.*, ya que los síntomas relacionados son variables e inespecíficos.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Implementar el test de Elisa (Snap 4DX) como un examen de monitoreo en caninos en conjunto con el certificado de salud.
2. Realizar monitoreo periódicamente a los perros con alta población de garrapatas.
3. Mantener medidas de control de la garrapata en zonas endémicas de propagación del vector.

IX. RESUMEN

La Anaplasmosis es una enfermedad que puede presentarse con curso de agudo a crónico. Es causada por *Anaplasma phagocitophilum*. Entre los síntomas podemos mencionar artritis, fiebre, letargo, pérdida de peso, vómito, epistaxis, trastornos reproductivos, síntomas neurológicos. Es una enfermedad transmitida por la garrapata de venado (*Ixodes scapularis*) o la garrapata marrón del perro (*Rhipicephalus sanguineus*).

El diagnóstico de Anaplasmosis se basa en una combinación de signos clínicos, detección de títulos de anticuerpos séricos por medio de la Prueba de Elisa (Kit Snap 4 Dx) la cual es de utilidad, ya que el procedimiento es fácil, sencillo y requiere de equipo mínimo para su realización. Esta prueba presenta además buena facilidad en la interpretación de los resultados.

El presente estudio tuvo como objetivo comprobar la existencia de anticuerpos circulantes contra *Anaplasma sp* en perros domésticos con o sin presencia de garrapatas por medio de la Prueba Rápida de ELISA. Dicho estudio se realizó en el Municipio de Mixco, Guatemala, se tomaron 30 muestras de sangre en base a los siguientes criterios de inclusión: caninos mayores de un año de edad, pacientes con o sin sintomatología aparente de la enfermedad, pacientes con o sin presencia de garrapatas no importando así, la raza, edad o sexo.

De 30 animales muestreados con rango de edad de 1 a 10 años, se obtuvo un total de 3 casos positivos a Anaplasmosis por medio de la Prueba Rápida de Elisa, siendo 2 hembras y 1 macho.

Para buscar asociación entre las variables, se utilizó la Prueba Estadística de Chi² determinándose así, que no existe asociación estadística entre la presencia de garrapatas o historial de haberlas tenido con respecto a la existencia de anticuerpos de *Anaplasma sp*. Tampoco existe relación estadística en referencia a la edad y sexo de cada individuo y el resultado de la prueba de Elisa.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Alleman, R; Wamsley, H. 2008. Una actualización sobre anaplasmosis en perros. Medicina Veterinaria. (en línea). Consultado 5 abr. 2009. Disponible en http://www.unisz.bg/tsj/Vol7No1_2009.
2. Birchard, S.J.; Sherding, R.G. 1996. Manual Clínico de pequeñas especies. Trad. S Lara Díaz. Mexico, DF, McGraw-Hill. p .1747
3. Blagburn, B. 2007. Avances en los Animales de compañía de control de garrapatas. (en línea). Consultado 7 abr. 2009. Disponible en <http://www.sportdogtraining.net/dog-health-anaplasmosis/>
4. Generalidades sobre el género Ehrlichia. (en línea). s.f. Consultado 20 feb. 2009. Disponible en <http://personal.redestb.es/rajuste/epha03.htm>
5. Hess, PR.; et al. 2006. Experimental *Ehrlichia canis* infección en el perro no causa inmunosupresión. Consultado 18 abr. 2009. Disponible en http://www.cvm.ncsu.edu/vth/documents/interpretation_SNAP_4DX_1_07.pdfLas
6. Hospital animal; otter lago, centro de atención s.f. (en línea) Consultado 5 abr. 2009. Disponible en <http://www.whitebearanimalhospital.com/Handouts/Files/Anaplasmosis.htm>
7. IDEXX Laboratories. 2006. Is it Lyme disease, anaplasmosis-or both?. Newsmagazine USA. Part No. 09-65768-00.
8. Jack, CM; Watson, PM. 2005. Guía de Medicina Veterinaria Canina y Felina. Ed. Marck S. Donovan. Trad. R Palacios. México, DF, McGraw-Hill. p. 664
9. Las garrapatas y las enfermedades. s.f. Consultado 18 abr. 2009. Disponible en www.dogsandticks.com/ticks-dogs

10. La técnica Elisa. s.f. laboratorios geminis (en línea). Consultado 20 feb. 2009. Disponible en <http://pandora.labgeminis.com:8909/publicidad/latecnicaelisa.htm>
11. Hernández, A. 1999. Manual de Inmunología. México, DF, Pfizer, S.A. de C.V. p. 34.
12. Mattison, K. s.f. Ehrlichiosis en caninos y felinos.(en línea). Consultado 7 abr. 2009. Disponible en <http://elperrunodigital.blogspot.com/2006/05/ehrlichiosis-en-caninos-y-felinos.html>
13. Merchant, IA; Packer, RA. 1980. Bacteriología y Virología Veterinaria. 3 ed. España,. Acribia. p. 679
14. Sanchez Viscaino, JM. 2004. Curso de introducción a la inmunología porcina. Elisa. (en línea). Consultado 22 feb. 2009. Disponible en <http://www.sanidadanimal.info/cursos/inmuno2/ca051.htm>
15. Servicios de Diagnóstico. s.f. Colegio de Medicina Veterinaria. Departamento de Patobiología. Consultado 12 abr. 2009. Disponible en www.critterology.com/canine_anaplasmosis.
16. Stephen, E; Feldman, E. 2005. Medicina Interna Veterinaria. . 6 ed. Elsevier / Saunders vol. 1. p. 634. Consultado 11 abr. 2009. Disponible en <http://www.dogsandticks.com/faqs-lyme-disease-dogs-tick-diseases/>
17. Sumano, HS; Ocampo, L. 2006. Farmacología Veterinaria. 3 ed. México, McGraw-Hill. p.1082
18. Trakia Diario de Ciencias. Facultad de Veterinaria. Universidad de Trakia. s.f. (impreso) Stara Zagora, Bulgaria ISSN 1313-3551 1313-7050 (en línea) *ini-revisión* CANINAS granulocítico ANAPLASMOSIS vol. 7, No. 1, p. 68-72, 2009 Consultado 23 feb. 2009. Disponible en <http://www.uni-sz.bg>

XI. ANEXOS

11.1. Formulario para el registro de las muestras analizadas.

FORMULARIO PARA MUESTREO			
DATOS DEL ANIMAL	Nombre: _____ _____ _____	Sexo: M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/>	Edad _____ Raza _____ <input type="checkbox"/>
	ANAMNESIS Ha sido tratado contra <i>Anaplasma sp</i> ? Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Presenta signos respiratorios, tos, edema, hemorragia, petequias, claudicación, mucosas pálidas? Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Ha tenido garrapatas anteriormente? Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Vive la mayor parte: Dentro de casa <input type="checkbox"/> Fuera de casa <input type="checkbox"/> 50% y <input type="checkbox"/> %		
RESULTADOS SNAP 4Dx	<i>D. immitis</i>	Positivo <input type="checkbox"/>	Negativo <input type="checkbox"/>
	<i>Ehrlichia canis</i>	Positivo <input type="checkbox"/>	Negativo <input type="checkbox"/>
	<i>Borrelia burgdoferi</i> "Lyme"	Positivo <input type="checkbox"/>	Negativo <input type="checkbox"/>
	Anaplasma	Positivo <input type="checkbox"/>	Negativo <input type="checkbox"/>
FECHA:			

11.2. Tablas y Gráficas de Resultados.

Tabla 1. Pacientes caninos infectados con *Anaplasma sp*

Prueba Elisa	Cantidad positivos	Cantidad negativos	Total
4DX	3	27	30

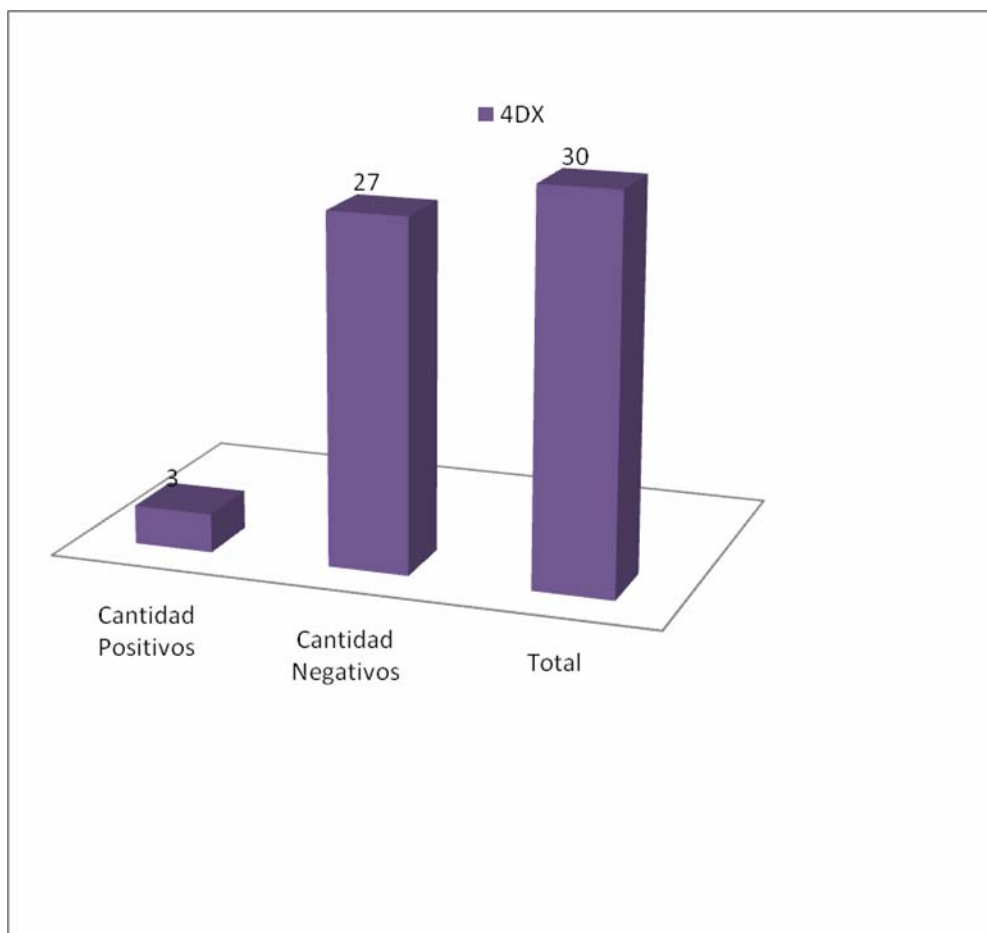
Gráfico 1. Pacientes caninos infectados con *Anaplasma sp* en clínicas del Municipio de Mixco, Guatemala. Año 2010.

Tabla 2. Exposición a garrapatas y presencia de sintomatología en caninos

	Con Síntomas	Sin Síntomas	Total
Con Garrapatas	11	13	24
Sin Garrapatas	2	4	6
Total	13	17	30

Grafico 2. Exposición a garrapatas y presencia de sintomatología en caninos. En clínicas del Municipio de Mixco, Guatemala. Año 2010.

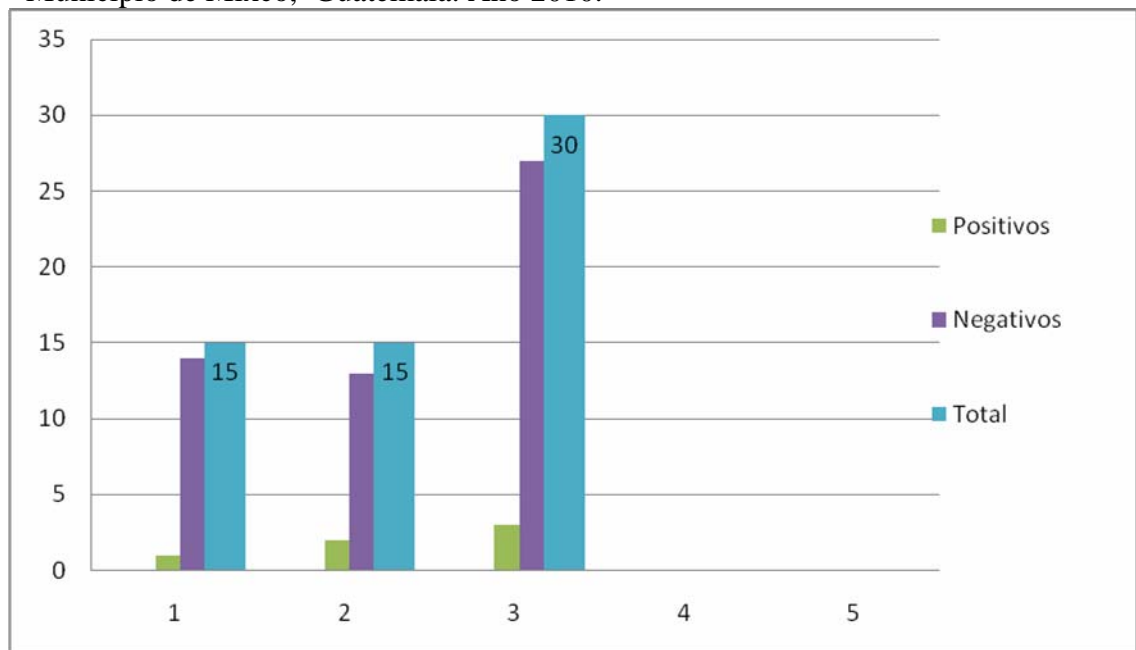


Tabla 3. Animales infectados positivos y negativos según el sexo.

	Machos	Hembras	Total
Positivos	1	2	3
Negativos	14	13	27
Total	15	15	30

Gráfico 3. Animales infectados positivos y negativos según el sexo, en clínicas del Municipio de Mixco, Guatemala. Año 2010.

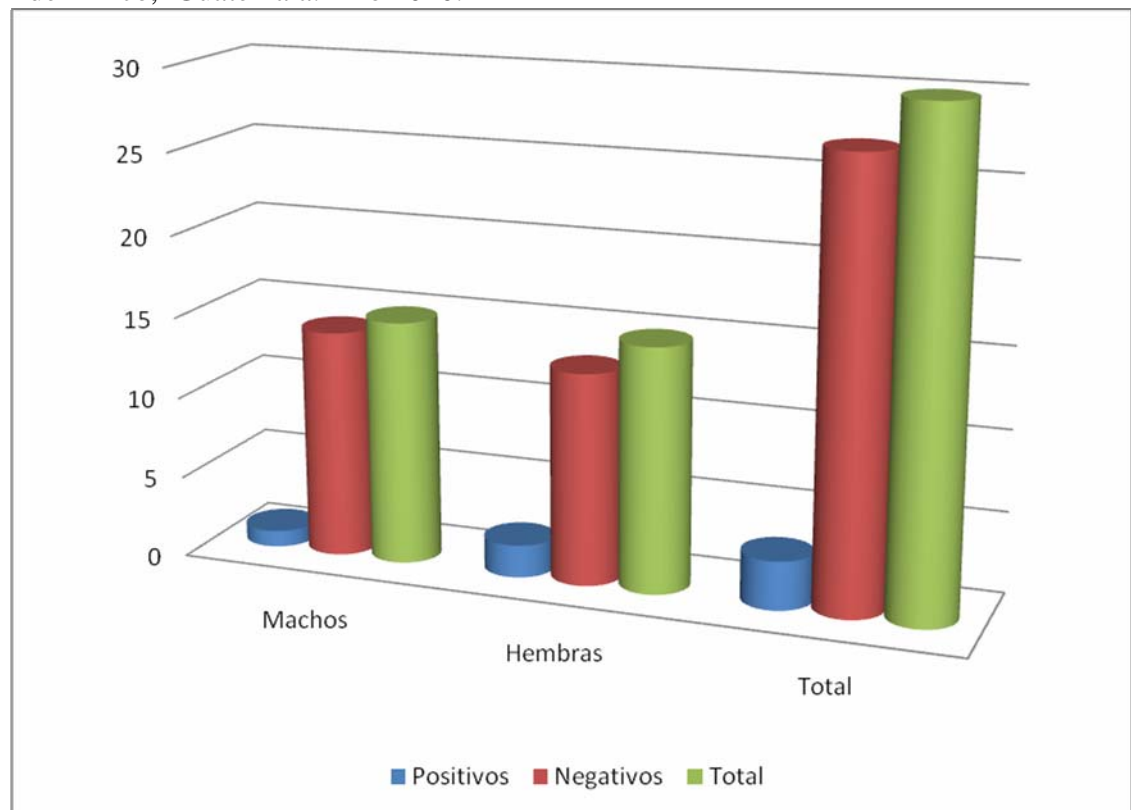


Tabla 4. Animales infectados por edad en años.

Edad en años	Positivos	Negativos	Total
1-3	2	12	14
4-6	1	6	7
7-9		6	6
10 ó +		3	3
Total	3	27	30

Gráfico 4. Animales infectados por edad en años. Clínicas del Municipio de Mixco, Guatemala. Año 2010.

