



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
CENTRO DIAGNÓSTICO “AURILAB”



**COMPARACIÓN DE DOS TÉCNICAS DE COLORACIÓN PARA EL
ESTUDIO DE *EHRlichia SPP.* POR FROTIS DE CAPA BLANCA.**

www.bdigital.ula.ve

TESISTA:

Zambrano, Edianny C.I.:20.531.073

TUTOR:

Profa. Carmen Lozano

Mérida, febrero de 2020



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
CENTRO DIAGNÓSTICO “AURILAB”



**COMPARACIÓN DE DOS TÉCNICAS DE COLORACIÓN PARA EL
ESTUDIO DE *EHRlichia SPP.* POR FROTIS DE CAPA BLANCA.**

Trabajo realizado como requisito para optar al título de Licenciada en Bioanálisis

www.bdigital.ula.ve

TESISTA:

Zambrano, Edianny C.I.:20.531.073

TUTOR:

Profa. Carmen Lozano

Mérida, febrero de 2020



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
CENTRO DIAGNOSTICO "AURILAB"



COMPARACIÓN DE DOS TÉCNICAS DE COLORACIÓN PARA EL ESTUDIO DE *EHRlichia SPP.* POR FROTIS DE CAPA BLANCA.

Trabajo realizado como requisito para optar al título de Licenciada en Bioanálisis.

Autor: Zambrano Hernández, Edianny Joselin

Tutora: Lozano Guillén, Carmen Aurora

RESUMEN

La ehrlichiosis es una enfermedad sistémica aguda, transmitida por la picadura de la garrapata marrón del perro *Rhipicephalus sanguineus* producida por microorganismos del género *Ehrlichia* spp., familia *Anaplasmataceae* que infecta una amplia variedad de animales domésticos, salvajes y al hombre. Fue descubierta inicialmente en perros, habiéndose identificado el primer caso humano en los Estados Unidos en 1986. Se han descrito diferentes especies, de acuerdo al hospedador que parasita, tropismo celular y vector. (Goodman et al. 2003, Straube 2010, Romero et al. 2011). El diagnóstico hematológico en el país es el más común, en los últimos años han ido incrementando el costo en los reactivos. El objetivo de este trabajo es comparar dos técnicas de coloración para el estudio de *Ehrlichia* spp. Por frotis de capa blanca en el centro de diagnóstico Aurilab. **Metodología:** se realizaron dos técnicas de coloración, Giemsa y Wright, se pudieron observar las mórulas de la bacteria en 100 muestras para un total de 200 frotis. **Resultados:** si pueden compararse ambas técnicas de coloración, obetiendose una efectividad del 84% de efectividad para la técnica de coloración de Giemsa por el sistema estadístico **t Student**.

Palabras clave: Bacteria, Frotis, Ehrlichia, Giemsa, Whright

Mérida, febrero de 2020

DEDICATORIA

A Dios todopoderoso, por el he podido llegar hasta aquí y mantenerme de pie en todas las circunstancias de mi vida.

A mis padres Columbo Zambrano y Nélide Hernández, a ellos les debo todo lo que tengo, mis logros siempre serán sus logros.

A mis hermanos Ediover, Edwin, Edixon y Yasmin y sobrinos con quienes crecí en un hogar donde no faltaron los valores de compartir en los mejores y peores momentos.

A mis tíos maternos quienes me criaron y educaron, y me enseñaron a no rendirme, gracias por no abandonarme.

A mis mejores amigas Fabiola, Andreina, Maricarmen, Rocío, Carmen, Yolisbeth y Audimelis, gracias por apoyarme y nunca fallarme cuando necesite de ustedes.

A las madres de mis amigas quienes fueron importantes en este camino, donde siempre encontré a la mía mientras estaba lejos.

A la familia Matheus Urbina por ser tan especiales conmigo, por darme alojamiento y cobijo en su casa durante toda la carrera.

Edianny J. Zambrano H.

AGRADECIMIENTOS

A Dios en primer lugar, sin su voluntad no estaría aquí en estos momentos tan importantes de mi vida.

A mis padres por haber apostado su tiempo y dinero en mi formación profesional, gracias por creer en mí.

A mi tía Nisbelia por acompañarme en todas las etapas de mi formación académica.

A mi tutora Carmen Lozano por su apoyo y colaboración, en la redacción y realización del trabajo experimental, por prestarme las instalaciones y material de trabajo para iniciar la investigación.

A mi madrina Eneida Castillo por prestarme las instalaciones de su laboratorio clínico para poder concluir la investigación de mi trabajo de grado.

A todos los profesores de la facultad de Farmacia y Bioanálisis, en especial a las profesoras Carmen Lozano y María Alejandra Blanco por ser mi modelo a seguir, espero algún día ser una profesional tan entregada como ellas.

ÍNDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	6
EL PROBLEMA	3
Planteamiento del problema	3
Justificación	4
Objetivos	4
Objetivo General.....	4
Objetivos Específicos	4
Alcances y Limitaciones	5
CAPÍTULO II	6
MARCO TEÓRICO	6
Antecedentes de la investigación	6
Definición de términos	13
Operacionalización de las variables	16
Hipótesis	17
CAPÍTULO III	19
MARCO METODOLÓGICO	19
Tipo de investigación	19
Diseño de investigación	19
Población y muestra	19
Sistema de variables	21
Instrumento de recolección de datos.....	21
Procedimiento.....	22
Diseño de análisis	23
CAPÍTULO IV	24
RESULTADOS Y DISCUSIONES	24

CAPITULO V.....	28
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	28
Conclusiones.....	28
Recomendaciones.....	29
REFERENCIAS	30

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N°1	24
Operacionalización de las variables.....	24
TABLA N°2	31

www.bdigital.ula.ve

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	27
Figura 2	32
Figura 3	33
Figura 4	33
Figura 5	34
Figura 6	34

www.bdigital.ula.ve

INTRODUCCIÓN

La ehrlichiosis es una enfermedad sistémica aguda, transmitida por la picadura de la garrapatamarrón del perro *Rhipicephalus sanguineus* producida por microorganismos del género *Ehrlichia* spp., familia *Anaplasmataceae* que infecta una amplia variedad de animales domésticos, salvajes y al hombre. Fue descubierta inicialmente en perros, habiéndose identificado el primer caso humano en los Estados Unidos en 1986. Se han descrito diferentes especies, de acuerdo al hospedador que parasita, tropismo celular y vector. (Goodman et al. 2003, Straube 2010, Romero et al. 2011).

Algunos signos y síntomas de la ehrlichiosis humana son similares a un resfriado común, fiebre, dolor de cabeza, dolor muscular y de articulaciones, escalofríos, cansancio, pérdida de apetito, náuseas y vómitos, también pueden observarse erupción cutánea, tos y confusión. Inician de 5 a 10 días después de la picadura de la garrapata, cabe destacar que la picadura pasa desapercibida.

Debido a que la infección se concentra en diferentes latitudes tropicales y subtropicales, su curso largo y duración variable hace difícil relacionar la ehrlichiosis con una determinada época del año, la importancia de esta patología para la salud pública hace que en el diagnóstico de esta enfermedad sea necesario tomar en cuenta los antecedentes de infestación por garrapatas sumado a la prueba serológica que permita detectar el contacto del paciente con el agente infeccioso.

El diagnóstico de la enfermedad se ha basado en el hallazgo de inclusiones intracitoplasmáticas en linfocitos, monocitos o neutrófilos ó en la detección de anticuerpos contra antígenos de *Ehrlichia* spp. Dentro de las técnicas de coloración la más utilizada es la coloración de tipo RomanowskyDiff-quick. La tinción tipo romanowsky es una mezcla de distintos colorantes, utilizada para preparar extensiones para el análisis de células sanguíneas. (Oleskyn 2008).

Por lo que en el presente estudio se compararan dos coloraciones de tipo Romanowsky, como el método de coloración de Wright y el método de coloración de Giemsa, ambas usadas en el estudio de células hematológicas, definiéndose las ventajas y desventajas de éstos métodos como herramienta de apoyo para el Licenciado en Bioanálisis.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del problema

Las enfermedades transmitidas por garrapatas como la ehrlichiosis representan un problema emergente para la salud pública considerándose una potencial zoonosis, en los últimos años ha incrementado el número de casos de humanos infectados con *Ehrlichiaspp.* en esto radica la importancia del diagnóstico oportuno.

Este aumento de prevalencia, de casos de ehrlichiosis en humanos va de la mano con diversos factores medio ambientales, socio económicos y culturales, para la medicina veterinaria ha sido poco controlable la propagación de la bacteria, ya que el vector puede habitar en áreas tropicales y subtropicales en las diferentes estaciones del año, nuestro país no ha sido la excepción en este aumento de la incidencia de casos de la enfermedad, es por ello que el licenciado en Bioanálisis tiene la tarea de buscar formas de diagnóstico eficaces aminorando costos no dejando a un lado el control de calidad dentro del laboratorio.

Existen técnicas estandarizadas para el diagnóstico de la bacteria, mediante la realización de extendidos o frotis sanguíneos y posterior coloración de ellos, como la técnica de coloración de Diff-quick por frotis de capa blanca, sin embargo dentro del estudio hematológico se encuentra una diversidad de coloraciones de tipo romanowsky empleadas para la observación, estudio y análisis de células sanguíneas, con colorantes y reactivos de fácil manejo y obtención.

Una vez descrita la situación del problema de estudio, como autora elaboré el siguiente enunciado holopráxico:

¿Existe alguna diferencia entre las técnicas de coloración de Giemsa y Wright para el estudio de *Ehrlichiaspp.* por frotis de capa blanca, en las muestras analizadas en el Centro Diagnóstico Aurilab desde octubre de 2018 hasta marzo de 2019?

Justificación de la investigación

El aumento notorio del número de casos diagnosticados de ehrlichiosis en la población no solo poseedora de caninos sino también en aquellas que no tienen el animal doméstico, ha alarmado al personal de la salud, especialmente al licenciado en Bioanálisis quienes mediante su labor diaria han encontrado cifras considerablemente altas de pacientes portadores de la bacteria, actualmente hay ciertas limitaciones en el diagnóstico debido a la falta de reactivos y colorantes usados en la técnica de detección de *Ehrlichiaspp.* Ya que el precio de estos ha incrementado y cada vez se hace más difícil un diagnóstico oportuno.

En este estudio podremos comparar dos técnicas de coloración hematológicas sencillas realizadas rutinariamente en el laboratorio clínico para encontrar las ventajas y desventajas, en cuanto a costos, tiempo de realización y eficacia en los resultados arrojados a la hora de poner en práctica estas técnicas.

Por ello es importante realizar un seguimiento en los pacientes que acuden al laboratorio clínico, para la realización del examen de la detección de *Ehrlichiaspp.* por frotis de capa blanca. Aplicando ambas técnicas de coloración y comparando sus resultados.

Objetivos de la investigación

Objetivo General

- Comparar dos técnicas de coloración para el estudio de *Ehrlichiaspp.* Por frotis de capa blanca que serán diagnosticados en el Centro de Diagnóstico Aurilaben la ciudad de Mérida desde octubre de 2018 hasta marzo de 2019.

Objetivos Específicos

- Evaluar los valores absolutos y relativos de las células sanguíneas en pacientes sospechosos de ehrlichiosis.
- Comparar dos técnicas de coloración utilizadas en la tinción de frotis sanguíneos de rutina para el conteo y observación de células hematológicas.

- Encontrar cual de las técnicas es la que permite una mejor observación y detección de la bacteria en las células sanguíneas.

Alcances y Limitaciones

Alcances

- Esta investigación se busco comparar dos técnicas de coloración que permitan un diagnóstico oportuno de la ehrlichiosis disminuyendo costos de los reactivos y colorantes manteniendo la eficacia y el control de calidad en los resultados.
- La investigación abarco desde evaluar las células hematológicas del paciente hasta emitir el resultado más confiable en el diagnostico de la enfermedad.
- El estudio se llevo a cabo con los pacientes que acudan al Centro de Diagnostico Aurilab, en la ciudad de Mérida el cual será un aporte a nivel nacional.

Limitaciones

- El estudio se realizo con los pacientes, con sospecha de la enfermedad, pero no con la certeza de tenerla.
- Los pacientes en su mayoría fueron solo de la ciudad de Mérida y zonas circunvecinas por lo que el estudio no sería representativo del estado, seria de gran importancia realizarlos a nivel nacional por ser un problema de salud pública.
- El médico a cargo del paciente debe referir al laboratorio que llevara a cargo la investigación, de lo contrario el estudio no puede llevarse a cabo para aplicar ambas técnicas en el frotis por capa blanca.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

Durante años los investigadores han tenido la inquietud de conocer y diagnosticar la ehrlichiosis tanto en humanos como en animales, avanzando cada día más en las técnicas específicas en la detección de la bacteria, han comparado entre técnicas hematológicas y serológicas, realización de estudios retrospectivo que permitan aportar avances en problemas de salud pública.

Antecedentes de la investigación

Megumi, E. y cols. (2016) realizaron una investigación cuyo título es “Ehrlichiosis, enfermedad transmitida por garrapatas y potencial zoonosis en Paraguay” Paraguay. El objetivo del presente estudio fue determinar la presencia de mórula de *Ehrlichiaspp.* en frotis de sangre periférica de animales y humanos con sintomatología compatible a la enfermedad, como una forma de detección oportuna en la población se realizó FSP a caninos sin distinción de sexo, raza y edad; con signos clínicos inespecíficos como fiebre, diarrea, uveítis, petequias, epistaxis, trastornos osteoarticulares, reproductivos y neurológicos, las muestras fueron obtenidas de la cara interna del pabellón auricular en todos los casos y los FSP fueron procesados para el análisis citológico y la determinación del ácido nucléico (ARN ribosómico) bacteriano por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Cinco mujeres, de entre 24 y 47 años, serológicamente negativas a Dengue y Chikungunya por el método de inmunocromatografía. Con fiebre intermitente, malestar general, mialgia, artralgia, cefalea y vasculitis de 30 días de evolución. A todas se le extrajo SP del dedo índice para la realización del FSP y la determinación de ácido nucléico (ARN ribosómico) bacteriano. Esto llevado a cabo en una clínica veterinaria y el instituto de investigación de ciencias de la salud, Facultad de ciencias médicas, Universidad Nacional de Asunción, Asunción, Paraguay.

Los FSP con presencia de una mórula intracitoplasmática en neutrófilos, monocitos y/o plaquetas fueron considerados positivos a la Ehrlichiosis y dichos resultados son expresados en porcentaje. Los productos de PCR amplificación de aproximadamente 478 pb fueron considerados positivos para la enfermedad al contrastar los resultados con la FSP.

Las enfermedades transmitidas por garrapatas representan un problema de creciente importancia para la salud pública. La Ehrlichiosis es una zoonosis cosmopolita emergente, pudiendo ser mortal en caninos y humanos. Debido a los síntomas inespecíficos que manifiesta en seres humanos pueden confundirse con otras enfermedades emergentes de países tropicales tales como el Dengue y Chikungunya por lo que debe ser considerada entre los diagnósticos diferenciales. Este es el primer reporte de casos de Ehrlichiosis canina en un laboratorio privado y casos en humanos con exposición a garrapatas en Paraguay; y como profesionales y responsables de la salud pública, se resalta la importancia de la enfermedad en nuestro medio para la toma de decisiones y medidas profilácticas necesarias para prevenir el riesgo de infección y transmisión entre caninos y humanos.

También Barrios, L. y cols. (2015) en un estudio denominado “Evidencia hematológica y serológica de Ehrlichia SPP en propietarios de caninos domésticos con antecedentes de ehrlichiosis en Lima metropolitana” cuyo objetivo fue determinar la seropositividad a *Ehrlichia canis* mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) en pacientes humanos, sus parámetros hematológicos y su asociación con las variables edad, sexo, nivel de contacto con perros y antecedentes de exposición a garrapatas. Se evaluaron 91 sujetos sin distinción de género, edad o condición socioeconómica cuyos perros tenían historia de ehrlichiosis dentro de los seis meses previos al muestreo. El muestreo se realizó entre febrero y mayo de 2015. La evaluación hematológica mostró ausencia de pacientes positivos y 15.4% de pacientes sospechosos (presencia de corpúsculos de inclusión en células mononucleares y ausencia de trombocitopenia). La frecuencia de pacientes seropositivos mediante IFI fue de 14.3%. No se encontró diferencia

estadística por efecto de las variables en estudio. Los hallazgos confirman la exposición a *E. canis* en propietarios de caninos domésticos con antecedentes de ehrlichiosis en Lima Metropolitana.

Se recolectó 8 ml de sangre periférica dividida en dos partes: 2 ml con EDTA con anticoagulante y 6 ml sin anticoagulante, para la obtención de suero. La obtención de sangre venosa con jeringa se realizó según las indicaciones recomendadas por el Instituto Nacional de Salud (INS, 2005) del Perú, y se hizo posterior a las seis semanas de la aceptación de los pacientes en el estudio.

Las muestras para hematología y estudio de capa flogística se procesaron de inmediato en el Laboratorio de Patología Clínica, mientras que las muestras para serología se centrifugaron y los sueros resultantes fueron conservados en congelación a -20 °C hasta su procesamiento en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria. Ambos laboratorios forman parte de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.

A nivel hematológico se determinó el recuento de eritrocitos ($\times 10^6/\mu\text{l}$) y leucocitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$) utilizando la cámara de Neubauer, hemoglobina (g/dl) por el método de la cianometahemoglobina, hematocrito (%) por el método del microhematocrito, y el recuento diferencial (%) y recuento plaquetario (μl) utilizando la tinción Wright.

En Lima Metropolitana, al menos el 14.3% de propietarios de caninos domésticos con antecedentes de ehrlichiosis presentan anticuerpos que reaccionan contra *Ehrlichia canis*; sin embargo, no evidencian positividad a la enfermedad mediante la evaluación hematológica aunque presentan alteraciones hematológicas compatibles con la enfermedad. Las variables edad, género, exposición a garrapatas y nivel de contacto con perros no estuvieron asociadas a la presencia de anticuerpos contra *E. canis* en propietarios de caninos domésticos con antecedentes de ehrlichiosis en Lima Metropolitana.

Arocha, F. y cols (2013) realizaron una investigación denominada “Diagnóstico serológico y molecular de Ehrlichiosis humana en pacientes con sintomatología clínica compatible con la enfermedad en el estado Zulia-Venezuela” cuyo objetivo general fue Investigar la presencia de infección por *Ehrlichia* spp., en pacientes con sospecha clínica de Ehrlichiosis Humana. Se realizó una entrevista personal a los sujetos de la muestra en estudio, para investigar antecedentes de picadura de garrapata, tenencia de mascotas, y/o antecedentes epidemiológicos (visita a regiones rurales), signos y síntomas compatibles con la patología y tiempo de evolución. Se tomaron 2 muestras de sangre periférica, cada una, en dos oportunidades separadas por un lapso de 15 días. Bajo campana de flujo laminar, se tomó una muestra de sangre venosa, esta muestra se distribuyó de la siguiente manera: 6 cc fueron colocados en tubo de vidrio vacutainer con EDTA, que fueron usados para el ensayo de PCR. La muestra para serología, consistió de 4cc colocada en tubo sin anticoagulante, se centrifugó a 2.500 rpm por 10 minutos y el suero obtenido fue alicuotado en tubos de ensayo en cantidades de 2 cc y almacenado a 20°C hasta el momento de ser procesado. Las muestras para el ensayo de PCR fueron transferidas, a viales de 1.5-2 mL de polietileno sin contaminantes. Las muestras fueron almacenadas a -20°C por unas horas y luego congeladas a -60°C, hasta su procesamiento. Se realizaron pruebas diagnósticas como Inmunofluorescencia indirecta (IFI), Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), lisis celular y extracción del ADN.

En el grupo de 30 sujetos con manifestaciones clínicas sugestivas de Ehrlichiosis Humana las 60 muestras recolectadas en los días 0 y 15 de la enfermedad no reportaron seroconversión, con títulos iguales o menores a 1/64; lo que se interpreta como prueba negativa sin evidencia de anticuerpos contra el antígeno utilizado en la prueba (células humanas infectadas con *E. chaffeensis*). Como prueba confirmatoria se realizó el ensayo nested-PCR a las 20 muestras de sangre periférica, utilizando primers derivados de las secuencias genéticas del 16S rRNA de *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. equi* y *E. ewingii* que permiten hacer identificación a nivel de género

obteniéndose también resultados negativos. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran evidencia de infección por *Ehrlichia chaffeensis* en los pacientes consintomas y signos similares a los de la Ehrlichiosis Humana, ya que a través de pruebas serológicas no se evidenciaron anticuerpos contra *Ehrlichia chaffeensis* y en las pruebas moleculares no hubo amplificación de la secuencia genética. Los datos obtenidos permiten descartar la enfermedad por este agente, pero no por otro, descubierto por Arraga y colaboradores en el estado Zulia, aún no clasificado por el CDC. En especial si se consideran los 12 casos diagnosticados por serología desde 1994, en el Laboratorio de Investigaciones Clínicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia y los numerosos casos (más de 400 entre 1994-1999) causados por un nuevo agente, que si bien los estudios de microscopía electrónica revelaron que no era una especie de *Ehrlichia*, si cumplía con las características de una *Rickettsia*, por ello la MSc. Cruz Árraga, quien conduce estos estudios, decidió nombrarlo *Rickettsia Plaquetaria Humana*, en espera aún de estudios de aislamiento e identificación. A la luz de la información obtenida en este trabajo se hace necesario realizar estudios multidisciplinarios que involucren a especialistas en diagnóstico molecular, infectólogos, epidemiólogos, médicos generales y médicos veterinarios, entre otros, con el objeto de precisar la real magnitud e importancia de estos agentes en nuestro país, por agentes infecciosos que son considerados como emergentes a nivel mundial.

González, A. y cols (2013) en su trabajo de investigación “Correlación entre hemograma y frotis sanguíneo para determinar *E. canis* en la vereda Peñitas de Puente Nacional” en el cual el objetivo general fue determinar la presencia de *E. canis* en perros de la vereda Peñitas del municipio de Puente Nacional, Santander, correlacionando el cuadro hemático con el frotis sanguíneo. El estudio se realizó en la vereda Peñitas del municipio de Puente Nacional; se eligió esta vereda por la presencia de caninos de finca expuestos a garrapatas, en su mayoría de raza criolla y con escaso control antiparasitario, y por las facilidades que brindaron los propietarios

para tomar las muestras y recolectar los datos requeridos para el estudio; además por la cercanía de la vereda al casco urbano.

Como resultado de este estudio se obtuvo una prevalencia de 26,25% de casos positivos, y 73,75% de casos negativos. Cifras distantes a las de un estudio realizado en la ciudad de Cali, donde de 101 pruebas de ELISA realizadas en sangre de caninos para análisis diagnóstico específico de *E. canis*, el 49,5% resultaron positivas, y el 50,5%, negativas (Silva et al., 2008); el mayor porcentaje de casos positivos se debe a la especificidad de la prueba ELISA en la confirmación de *E. canis*; de los casos positivos se encontró que por raza se presenta más en criolla (22,5%), y es menor en Pastor ovejero, Pincher y Poddle (cada una 1,25%), y seronegativas en Labrador y Cocker; sin embargo, hay que señalar que estos resultados se dan debido a que la mayoría de caninos muestreados eran de raza criolla (75 animales), y sólo había un animal de cada una de las otras razas, por lo cual el porcentaje para estas últimas no fue muy importante, comparado con resultados obtenidos en otros estudios, en donde la raza labrador presentó positividad del 7,9%; Podle, del 7%; Cocker y Criollo (mestizo), del 2,97% (Silva et al., 2008). Del 26,25% de casos positivos, un 16,25% eran machos y un 10%, hembras; estos resultados muestran una elevación en la frecuencia de presentación en animales machos respecto a las hembras, lo que ya observó Burke y Cunha (2004), quienes reportan que los machos son más afectados, en proporción 4:1, que las hembras, sin que exista una explicación clara de la causa; resultado que coincide con Ortegón et al. (2004) y Ettinger (1997), quienes encontraron predisposición de los hemoparásitos por canes machos. A pesar de que no hay relación entre la edad de los animales y la presentación de la enfermedad (Sainz et al., 2000), en este estudio se encontró que se presentaron animales positivos en todos los grupos etarios; sin embargo, el grupo más afectado fue el de los animales de edad adulta (3 y 5 años), debido, posiblemente, a que la mayoría de los caninos muestreados están en este rango de edad.

Romero, L. y cols (2013) en su estudio “Evaluación del diagnóstico de *Ehrlichia canis* mediante frotis sanguíneo y técnica molecular en perros de Costa

Rica” el cual tuvo como objetivo general fue comparar y evaluar la técnica microscópica de cuerpos de inclusión en frotis sanguíneos con la técnica molecular de PCR anidado para determinar la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo del frotis sanguíneo comparado con los resultados obtenidos en la técnica de PCR, así como determinar características de los animales y valores hematológicos asociadas a la presencia de *E. canis*.

Un total de 300 muestras de sangre canina fueron recolectadas, entre octubre 2012 y octubre 2013, en diversas clínicas veterinarias y laboratorios de análisis clínicos veterinarios del Valle Central, procedentes de perros con sospecha de sufrir ehrliquiosis, basado en el cuadro clínico que presentaban los animales y en el diagnóstico de inclusiones leucocitarias compatibles con *Ehrlichiaspp*. En resumen, se realizó la extracción de ADN con WizardGenomicPurification Kit (Promega). El ADN se sometió a un primer PCR para amplificar un segmento de 478–480 pb, correspondiente al gen 16S ARNr, utilizando los cebadores ECC y ECB, seguido del PCR especie-específico empleando los cebadores ECAN5 y HE3. Las reacciones comprendieron 12.5 µl de Máster Mix (Fermentas), 0.2 µM de cada cebador, 1µl de ADN y agua libre de nucleasas (Fermentas) para completar una reacción de 25 µl. El protocolo empleado fue de 2 minutos iniciales de desnaturalización a 95°C, seguido de 40 ciclos de 95°C por un minuto, 60°C por un minuto y 72°C por un minuto, finalizando con 72°C por cinco minutos. Los productos amplificados fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en TBE (pH 8), mediante tinción con bromuro de etidio y luz ultravioleta, considerando positivas las muestras con un tamaño 389 pb. Cada muestra se acompañó de una encuesta para recolectar información sobre ubicación geográfica de la clínica veterinaria de procedencia del perro, raza, sexo, edad y síntomas clínicos. Además, se recolectó información sobre el resultado del frotis sanguíneo, hemograma y examen serológico (Snap® 3Dx, IDEXX Laboratorios Inc., Westbrook, Maine, USA), en caso de haber sido efectuado. La sensibilidad, especificidad y los valores predictivos de los resultados obtenidos en el frotis sanguíneo (presencia de inclusiones) se determinó

mediante el programa WinEpiscope 2.0, tomando como prueba de oro la técnica de PCR.

Del total de 300 muestras sanguíneas analizadas, mediante la técnica de PCR, se detectó ADN de *E. canis* en 147 (49,0%) muestras; mientras que el análisis, mediante frotis sanguíneo, en búsqueda de inclusiones compatibles con *E. canis* arrojó 178 (59,3%) muestras con inclusiones. Solamente en 103 (57,9%) de las muestras con inclusiones fue posible detectar ADN de *E. canis*, mientras que en 44 (36,0%) de las muestras sin inclusiones también se detectó ADN de *E. canis*. Para la prueba de frotis sanguíneo se determinó una sensibilidad del 70,1%; una especificidad del 51,0%; un valor predictivo positivo de 57,8% y valor predictivo negativo de 63,9%, comparado con los resultados obtenidos en la técnica de PCR. El análisis de regresión logística demostró, sin embargo, que animales con inclusiones reportadas en frotis sanguíneos tuvieron 2,6 veces el riesgo de ser positivos en la PCR de *E. canis* que muestras de perros que no presentaron inclusiones.

Definición de términos

Bacteria

Las bacterias son microorganismos con una célula única (unicelulares) relativamente simples. Dado que su material genético no está encerrado por una membrana nuclear especial, las células bacterianas se denominan procariontes.

Bacterias gramnegativas

Son aquellas cuya membrana celular tiene características que le impiden teñirse con el color característico de la tinción de gram (azul) sino que lo hacen de un color rosa tenue. (Tortora 2010).

Coloración de diff-quick

Es la tinción de mayor empleo en citología veterinaria, es una modificación rápida de los colorantes tipos Romanowsky.

Coloración de Giemsa

Es un método habitual para el examen de frotis sanguíneos, cortes histológicos y otro tipo de muestras biológicas. Este método tiene utilidad sobre todo para poner de manifiesto las rickettsias localizadas dentro de las células huéspedes.

Técnica:

- 1- Cubra los extendidos con alcohol metílico durante 3 ó 5 minutos, teniendo la precaución de no dejar que el alcohol se evapore.
- 2- Incline el extendido y descarte el metanol.
- 3- Cúbralo con solución de Giemsa diluida en proporción 1:10 con agua destilada a pH 6,8. Dejarla actuar por 20 minutos.
- 4- Lavar con agua destilada y seque al aire.
- 5- Limpiar el dorso del extendido de los restos de colorantes.
- 6- Montar la preparación sobre una lámina porta-objetos con una gota de Permount o Bálsamo de Canadá de manera que el extendido quede entre lámina y laminilla.

Coloración de Wright

Es un tipo de tinción usada en histología para facilitar la diferenciación de los tipos de células de la sangre. Se usa principalmente para teñir frotis de sangre y punciones medulares, para ser examinadas al microscopio. En citogenética se usa para teñir cromosomas, para facilitar el diagnóstico de síndromes y enfermedades.

Técnica

Colocar las laminillas, con el frotis hacia arriba, sobre tapones de goma invertidos, colocados en una bandeja de coloración.

- 1- Cubrir las laminillas con solución colorante y déjelo actuar por 1 o 2 minutos. En esta etapa se fija el frotis en la laminilla por desnaturalización de las proteínas con el alcohol metílico.
- 2- Añadir una cantidad igual de amortiguador, evitando que la mezcla se derrame. Mezclar inmediatamente, soplando suavemente y dejarla actuar por 2 ó 3 minutos. Es importante que la mezcla se efectúe bien soplando sobre la laminilla para evitar que el colorante se precipite. Un brillo metálico debe aparecer sobre la superficie de la mezcla colorante. El tiempo óptimo para dejar actuar la mezcla varía con cada preparación del colorante y hay que decidirlo probando cada nueva solución que se prepara. Durante esta etapa se efectúa la coloración propiamente dicha.
- 3- Inclinar la laminilla para escurrir el agua, seque al aire (nunca al calor), limpiar el dorso de la laminilla de restos de colorante y montar la preparación sobre una lámina, con una gota de Bálsamo de Canadá o Permount, de tal manera que el extendido quede entre laminilla y lámina. No deben quedar burbujas de aire en la preparación.

Ehrlichia:

Orden:Rickettsiales

Familia: Anaplasmataceae

Género: Ehrlichia

Especies:*Ehrlichia chaffeensis, Ehrlichia ewingii, Ehrlichia canis*

Ehrlichia muris, Ehrlichia ruminantum, Ehrlichia sensu lato.

Bacilos gramnegativos pequeños pleomórficos, no presentan lipopolisacárido, ni capa de peptidoglicanos, se observan inclusiones celulares con Giemsa o Wright, son intracelulares estrictos de 0,3 µm x 1,2 µm, infectan monocitos, linfocitos y granulocitos, carecen de flagelos o pilis.

Ehrlichiosis humana

La ehrlichiosis es una enfermedad bacteriana transmitida por las garrapatas, que provoca síntomas similares a los de la influenza. Los signos y síntomas de la ehrlichiosis van desde dolor generalizado leve hasta fiebre intensa, y generalmente aparecen una o dos semanas después de la picadura de una garrapata. (OMS 2001)

Sistema de variables

Variable Independiente:

Técnica de frotis por capa blanca.

Variable Dependiente: Técnicas de coloración

Operacionalización de las variables

Una variable es una cualidad susceptible de sufrir cambios. Un sistema de variables, consiste por lo tanto, en una serie de características por estudiar, definida de manera operacional, en función de sus indicadores o unidades de medida (Arias, 2006)

Tabla 1. Operacionalización de las variables

Objetivos específicos	Variabes	Dimensión	Indicadores
Evaluar los valores absolutos y relativos de las células sanguíneas en pacientes sospechosos de ehrlichiosis	Comparar dos técnicas de coloración para el estudio de		
			• Síntomas de

Comparar dos técnicas de coloración utilizadas en la tinción de frotis sanguíneos de rutina para el conteo y observación de células hematológicas.	<i>Ehrlichiasp</i> <i>p</i>	Pacientes	pacientes. • Dolor. • Control y seguimiento al paciente
Encontrar cuál de las técnicas es la que permite una mejor observación y detección de la bacteria en las células sanguíneas	Técnica de frotis por capa blanca	Costo	• Economía. • Financiamiento.
		Efectividad.	• Wright. • Giemsa.

Fuente: Zambrano (2020)

Hipótesis

La hipótesis es una suposición o solución alternativa conjetural que relaciona unas variables entre sí (Arias, 2006). Estas proposiciones sencillas presentan la característica de las variables del estudio, se presentan las hipótesis que se plantean los investigadores para su futura verificación o validación.

Hipótesis de investigación

Alguna de las dos técnicas de coloración empleadas sea la idónea para la realización de frotis de capa blanca y permita aminorar los costos de reactivos del laboratorio sin afectar el control de calidad en el resultado.

Hipótesis alternativa

Ambas técnicas pueden ser usadas para la observación de la bacteria en las células sanguíneas.

Hipótesis nula

Ninguna de las técnicas puede sustituir a la coloración de Diff- Quick.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

Hurtado (2010), refirió que el tipo de investigación tiene relación con la interrogante de estudio en la cual se resalta lo que se quiere saber, pues esto marca el logro general que se desea conseguir durante el proceso e identificar el tipo de investigación. En consecuencia el verbo a utilizar en el objetivo tiene que implicar un logro. Específicamente, en esta investigación se quiere comparar dos técnicas de coloración para el estudio de *Ehrlichiaspp*. Estudiando frotis de capa blanca, por lo tanto se puede decir que esta investigación es de tipo comparativa.

Diseño de Investigación

La estrategia que se implementa para recolectar los datos de un proceso de investigación constituye el diseño (Hurtado, 2010). De tal manera, esta investigación es de campo, ya que los datos del evento de estudio se recolectaran en el lugar donde acuden las pacientes para realizarse el examen diagnóstico de la ehrlichiosis, específicamente en Centro de Diagnóstico Aurilab, en la ciudad de Mérida. Con respecto al tiempo de recolección de datos, esta investigación debe ser contemporánea, debido a que se recolectaran durante el periodo de desarrollo del trabajo.

Población y Muestra

Hernández, Fernández y Baptista (2004), refirieron que una población es el conjunto de todos los casos que concuerdan con una serie de especificaciones. La población conduce hacia el conjunto finito o infinito de elementos que presentan características

comunes con el fenómeno que se investiga. Una vez conociendo lo citado al principio la población a estudiar es finita, integrada por las pacientes con sospecha de ehrlichiosis que acudirán al Centro de Diagnóstico Aurilab, la ciudad de Mérida, desde octubre de 2018 hasta marzo de 2019.

Para efectos de esta investigación, la población estuvo conformada por 100 pacientes, es decir, su muestra es calculada a través de la siguiente fórmula de Sierra Bravo (2000).

$$n = \frac{N \cdot Z_c^2 \cdot P \cdot Q}{(N - 1)e^2 + Z_c^2 \cdot P \cdot Q} = \frac{(100)(4)(50)(50)}{(100 - 1)(4) + (4)(50)(50)} = \frac{1000000}{10396}$$

$n = 96,19$ pacientes para el estudio.

Leyenda

$n =$ la muestra

$N =$ la población

$e^2 =$ error muestral, es una falla que se produce al extraer

la muestra de la población, oscila entre el 1 – 5%

$P =$ Proporción de elemento que representa determinada característica, probabilidad de éxito.

$Q =$ Proporción de elemento que representa determinada característica, probabilidad de fracaso.

$Z_c^2 =$ zeta crítico, valor seleccionado por el investigador, es decir,

el nivel de confianza adaptado, elevado al cuadrado. Si se toma un nivel

Del 95% el coeficiente es igual a 2, entonces su valor al cuadrado 2^2 es 4

Sistemas de Variables

En cuanto al sistema de variables, se pueden describir en la investigación dos variables que lo fundamentan. La primera, la Variable Dependiente (VD) que causa o genera cambios en el grupo experimental, en este particular serán las técnicas de coloración de Wright y Giemsa. Como Variable Independiente (VI), que se verá modificada por la acción de la variable antes descrita se tiene la técnica de frotis de capa blanca, realizando ambas coloraciones podré comparar y saber cual resulta más eficaz y con menor gasto en el laboratorio (Martínez, Briones y Cortés, 2013).

Instrumento de Recolección de Datos

Los instrumentos que se utilizaran para la obtención de la información deberán ser validados por los expertos, con el objetivo de determinar la validez del contenido. De hecho, se estima que la validez constituye el procedimiento que permite determinar la consistencia interna de los instrumentos en cuanto a que midan lo que se propone medir, de ahí se dice que la validez, se refiere al grado en que un instrumento realmente mida la variable según Hernández y Cols (2004).

Con los instrumentos que se aplicaran, permitirán comparar técnicas con el evento de estudio, referido con las técnicas de coloración por frotis de capa blanca. Permitirá conocer la eficacia de ambas técnicas para encontrar la que sea más sensible para el diagnóstico de la ehrlichiosis.

Posterior a la obtención de la muestra, se procede a la realización de los frotis sanguíneos descritos en el capítulo anterior, y para los datos que se obtengan de dicho análisis se utilizará la técnica de observación directa, que Silva (2010) define como “la técnica más importante de la investigación científica, por cuanto conecta al investigador con la realidad, es decir, al sujeto con el objeto o problema” (p.109).

Igualmente, dicha técnica contará con sus instrumentos, en esta oportunidad los materiales e instrumentos a utilizar son láminas cubre y portaobjetos, tubos capilaresparamicrohematócrito y microscopio así como también tabla de datos, también denominada lista de control, que “es un instrumento que indica la presencia o ausencia de un aspecto o conducta a ser observada” (Arias, 2006, p.70). Este instrumento cuenta con tres columnas, en las cuales se menciona los ítems, resultados obtenidos con la técnica de coloración de Wright y resultados obtenidos con la coloración de Giemsa.

Procedimiento

Para la realización de la presente investigación, los miembros del equipo se dirigirán al Centro Diagnóstico Aurilab donde asisten cierta cantidad de pacientes que pertenecen a la población del proyecto, el investigador se ocupará de realizar la toma de muestras a cada paciente para así proceder a la realización de los frotis sanguíneos, no existe diferencia entre pacientes en cuanto a sexo y edad.

Luego de la estructuración del grupo experimental, se procede a la toma de muestra de sangre venosa para realizar en el laboratorio los extendidos y frotis sanguíneos y las técnicas de coloración, para luego observar cual es la técnica con resultados más eficaces en cada paciente y registrarlos en la lista de datos. A partir de este momento, el investigador podrá realizar el análisis de los datos obtenidos, la comparación entre ambas técnicas y así la verificación de la hipótesis anteriormente formulada.

Materiales y Métodos

Frotis de capa blanca

1-Extraer 5 ml de sangre y mezclar con anticoagulante Ethylenediaminetetraacetate (EDTA).

2-Tomar los tubos capilares y llenarlos hasta obtener $\frac{3}{4}$ partes del mismo, llevarlos a la micro centrífuga por 15 minutos.

3-Con la ayuda de un lápiz punta de diamante cortar la parte del tubo donde esté la capa blanca, descartando el plasma y colocarla en la lámina portaobjetos.

4-Se procede a realizar el frotis entre lamina y laminilla (libre de grasa y pulida), luego se realizan las coloraciones.

Diseño de análisis

Hernández y Cols (2010) refirieron que existe dos tipos de enfoques de investigación: cuantitativo y cualitativo. La metodología cuantitativa se basa en métodos de recolección de datos con medición numérica y análisis matemático. Por lo tanto, esta investigación tiene un enfoque cuantitativo, ya que se evaluarán numéricamente los resultados de las comparaciones entre las técnicas de coloración de Wright y Giemsa con el fin de encontrar la que sea más eficaz y permita disminuir costos y preservar la calidad en el laboratorio clínico.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

En este apartado se presenta el análisis e interpretación de la información recolectada, la misma se discute en función de los objetivos planteados:

Con respecto al objetivo específico concerniente a :

- ✓ Evaluar los valores absolutos y relativos de las células sanguíneas en pacientes sospechosos de ehrlichiosis.
- ✓ Comparar dos técnicas de coloración utilizadas en la tinción de frotis sanguíneos de rutina para el conteo y observación de células hematológicas.
- ✓ Encontrar cuál de las técnicas es la que permite una mejor observación y detección de la bacteria en las células sanguíneas.

Variable: Comparar dos técnicas de coloración para el estudio de *Ehrlichiaspp.*

Dimensión: costo

Tabla N° 2 Indicador: costos y efectividad

Opciones de respuestas	Efectividad vs costos		Efectividad vs costos		Total	
	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa	F/A	F/R
Efectividad de la técnica de la coloración Wright	40	42%	56	58%	96	100%
Efectividad de la técnica de la coloración Giemsa	74	87%	12	13%	96	100%

Fuente: Zambrano (2020)

Comprobación de la hipótesis

La contrastación de la hipótesis se realizó a través de la prueba del t-student.

Planteamiento de las hipótesis

Hipótesis nula

H_0 = Ninguna de las técnicas puede sustituir a la coloración de Diff Quick.

Hipótesis alternativa

H_1 =Ambas técnicas pueden ser usadas para la observación de la bacteria en las células sanguíneas

Modelo matemático

$$H_0 = H_1$$

$$H_0 \neq H_1$$

Nivel de significación

Para la comprobación de la hipótesis se considera un nivel de significancia del 5% ($\alpha=0,05$)

Modelo estadístico

Nivel de significación

Para la comprobación de la hipótesis se considera un nivel de significancia del 5% ($\alpha=0,05$)

Modelo estadístico

Se aplica el modelo estadístico T student

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{\sigma_1^2}{n_1} + \frac{\sigma_2^2}{n_2}}}$$

Dónde

T= estadístico equivalente a t Student

\bar{X}_1 = media aritmética del grupo 1

\bar{X}_2 = media aritmética del grupo 2

σ_1^2 = varianza del grupo 1

σ_2^2 = varianza del grupo 2

n_1 = tamaño de la muestra del grupo 1

n_2 = tamaño de la muestra del grupo 2

TablaN°3 de aplicación de la fórmula de t student

preguntas	si	no	$(x_1 - \bar{X}_1)$	$(x_1 - \bar{x}_1)^2$	$(x_2 - \bar{x}_2)$	$(x_2 - \bar{x}_2)^2$
Tabla2	144	134	-41.28	1704.03	52.15	2719.62
Total	1297	573		15027.37		10014.84

Cálculo de las medias aritméticas.

$$\bar{x} = \frac{\sum x_1}{n_1} = \frac{1297}{7} = 185.28$$

$$\bar{x} = \frac{\sum x_2}{n_2} = \frac{573}{7} = 81.85$$

Cálculo de las desviaciones estándar

$$\sigma_1^2 = \frac{\sqrt{\sum_1^n (x_1 - \bar{x}_1)^2}}{n-1} = \frac{\sqrt{15027.37}}{7-1} = \frac{122.58}{6} = 20.33$$

$$\sigma_2^2 = \frac{\sqrt{\sum_1^n (x_2 - \bar{x}_2)^2}}{n-1} = \frac{\sqrt{10014.84}}{7-1} = \frac{100.07}{6} = 16.79$$

Cálculo de la t de student.

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{\sigma_1^2}{n_1} + \frac{\sigma_2^2}{n_2}}} = t = \frac{185.28 - 81.85}{\sqrt{\frac{20.33}{7} + \frac{16.79}{7}}} = \frac{103.43}{\sqrt{2.90 + 2.39}} = \frac{103.43}{\sqrt{5.29}} = \frac{103.43}{2.30} = 17.36$$

$t_c = 44.96$

Cálculo de los grados de libertad.

$$gl = \frac{\left(\frac{\sigma_1^2}{n_1} + \frac{\sigma_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{\left(\frac{\sigma_1^2}{n_1}\right)^2}{n_1} + \frac{\left(\frac{\sigma_2^2}{n_2}\right)^2}{n_2}} - 2 = \frac{\left(\frac{20.33}{7} + \frac{16.79}{7}\right)^2}{\frac{(20.33)^2}{7} + \frac{(16.79)^2}{7}} - 2 = \frac{\left(\frac{37.12}{7}\right)^2}{\frac{(11.48 + 7.83)}{7}} - 2 = \frac{28.12}{2.75} - 2$$

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

- En el 87% de los frotis realizados la técnica de coloración de Giemsa fue más efectiva en comparación con la de Wright.
- Se encontró que la coloración de Wright, deja precipitados en los frotis sanguíneos.
- La técnica de coloración de Wright si puede ser usada para la observación de mórulas sugestivas de *Ehrlichiaspp.*
- Al poder utilizar la técnica de coloración de Wright, disminuirían los costos de reactivos en el laboratorio, por ser esta coloración mas económica que la de Giemsa.
- El financiamiento para el laboratorio sería con unos costos menos elevados a la hora de presupuestar la compra de los reactivos.
- Los frotis coloreados con Giemsa permitían mejor observación de las mórulas.
- La situación económica en la cual se encuentra nuestro país es precaria, esto obliga a los laboratorios a adquirir reactivos con un menor costo, sin dejar de lado la calidad al dar un diagnostico y emitir resultados, al comparar estas técnicas a pesar de que la coloración de Giemsa es mas efectiva, se puede identificar las morulas con la coloración de Wright.

RECOMENDACIONES

- Utilizar en el laboratorio la técnica más efectiva, esta facilita un mejor diagnóstico de la bacteria.
- Evaluar la calidad al momento de emitir los resultados, puesto que para la mejor observación se debe realizar la técnica más costosa.
- Analizar, en el caso de situaciones extremas en el laboratorio, en cuanto al financiamiento, utilizar el reactivo con un costo menor, puesto que la vida del paciente es lo primordial.

www.bdigital.ula.ve

REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS

- Arias, F., (2006), *El proyecto de investigación. Introducción a la metodología científica*, Caracas, Venezuela, editorial Episteme.
- Gerad, J y cols (2010). *Introducción a la Microbiología*. Madrid, España
- González, J y cols. (2004). Valoración de factores de riesgo para Diabetes Mellitus tipo 2 en una comunidad semiurbana de la ciudad de México. *Revista Médica*. Volumen 12. N° 4.
- Hans, R y cols. (2003). *Diagnostico y Monitorización de zoonosis*. WorldHealthOrganization.
- Hernández, R., Fernández, C., Baptista, P., (2014), *Metodología de la investigación*, Mc Graw Hill, México, DF., México.
- Martínez, M., Briones, R., Cortés, J., (2013), *Metodología de la investigación para el área de la salud*, Mc Graw Hill, México, DF., México.
- Morales, A. (1980). *Guía Técnicas Básicas Hematológicas*, Mérida, Mérida, Venezuela.
- Pardo, F. (1996). *Anatomía Patológica*, Editorial Panamericana, México, DF., México.
- Pineda, E., Alvarado, E., (2008), *Metodología de la investigación*, Organización Panamericana de la Salud.
- Silva, J., (2010), *Metodología de la investigación, elementos básicos*, Editorial CO-BO, Caracas, Venezuela.

Anexos

www.bdigital.ula.ve

Figura 1. Consentimiento informado

Universidad de los Andes
Facultad de Farmacia y Bioanálisis
Escuela de Bioanálisis

Fecha: _____

Consentimiento Informado

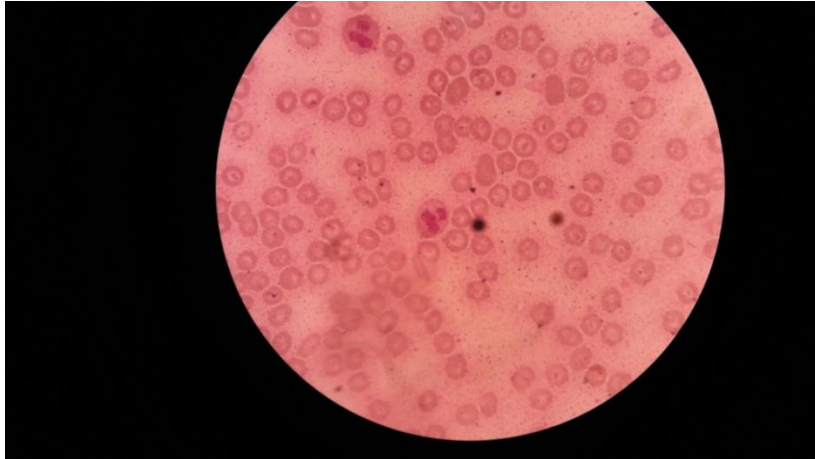
Yo: _____, titular de la cedula de
identidad: _____

Autorizo la utilización de muestras de sangres para la realización del trabajo de investigación titulado **“COMPARACIÓN DE DOS TÉCNICAS DE COLORACIÓN PARA EL ESTUDIO DE *EHRlichia spp.* POR FROTIS DE CAPA BLANCA”**, llevado a cabo por **Edianny Zambrano**, titular de la cedula de identidad 20.531.073, estudiante de la Escuela de Bioanálisis de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes, como parte de su trabajo de pregrado para optar al título de Licenciado en Bioanálisis. Certifico que he sido informado con la claridad y veracidad debida respecto a dicha investigación, contribuyendo de manera consecuente, libre y voluntaria a realización del mismo.

Firma

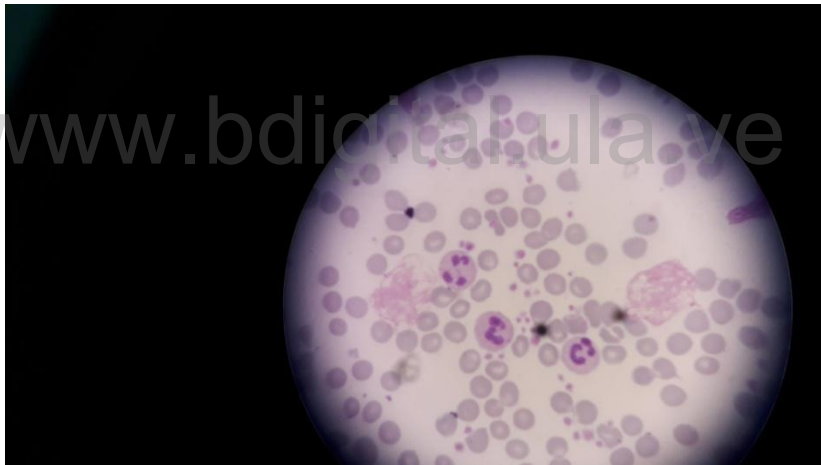
Fuente: Zambrano 2020

Figura 2. Coloración de Wright



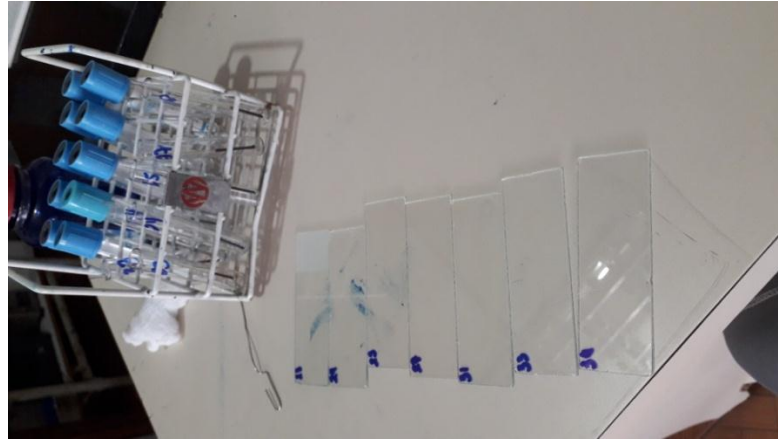
Fuente: Zambrano, 2020.

Figura 3. Coloración de Giemsa



Fuente: Zambrano, 2020.

Figura 4. Realización de frotis



Fuente: Zambrano, 2020.

Figura 5. Realización de frotis.



Fuente: Zambrano, 2020.

Figura 6. Coloraciones.



Fuente: Zambrano, 2020.

www.bdigital.ula.ve