

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE CUENCA

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

*Trabajo de titulación previo
a la obtención del título de
Médica Veterinaria Zootecnista*

TRABAJO EXPERIMENTAL:

“DIAGNÓSTICO COMPARATIVO DE MOQUILLO EN CANINOS (*Canis lupus familiaris*) MACHOS Y HEMBRAS MEDIANTE LA TÉCNICA ELISA CUANTITATIVA Y ELISA CUALITATIVA”

AUTORA:

TATIANA GABRIELA BUÑAY BARAHONA

TUTOR:

DR. JUAN LEONARDO MASACHE MASACHE

CUENCA - ECUADOR

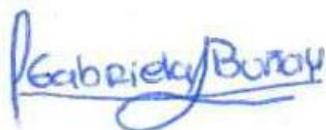
2019

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Yo, Tatiana Gabriela Buñay Barahona con documento de identificación N° 0302549175, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del trabajo de titulación: **“DIAGNÓSTICO COMPARATIVO DE MOQUILLO EN CANINOS (*CANIS LUPUS FAMILIARIS*) MACHOS Y HEMBRAS MEDIANTE LA TÉCNICA ELISA CUANTITATIVA Y ELISA CUALITATIVA”**, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: *Médica Veterinaria Zootecnista*, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autora me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago la entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, septiembre de 2019



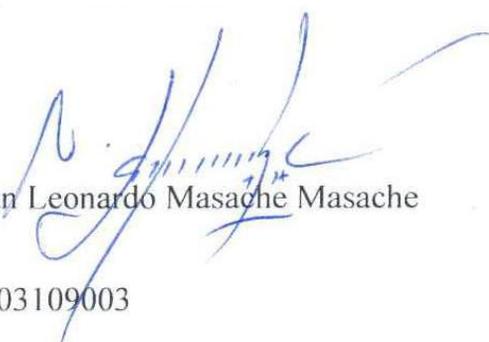
Tatiana Gabriela Buñay Barahona

C.I. 0302549175

CERTIFICACIÓN

Yo, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **“DIAGNÓSTICO COMPARATIVO DE MOQUILLO EN CANINOS (*CANIS LUPUS FAMILIARIS*) MACHOS Y HEMBRAS MEDIANTE LA TÉCNICA ELISA CUANTITATIVA Y ELISA CUALITATIVA”**, realizado por Tatiana Gabriela Buñay Barahona, obteniendo el *Trabajo Experimental*, que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, septiembre de 2019



Dr. Juan Leonardo Masache Masache

C.I. 1103109003

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

Yo, Tatiana Gabriela Buñay Barahona con documento de identificación N° 0302549175, autora del trabajo de titulación: **“DIAGNÓSTICO COMPARATIVO DE MOQUILLO EN CANINOS (*CANIS LUPUS FAMILIARIS*) MACHOS Y HEMBRAS MEDIANTE LA TÉCNICA ELISA CUANTITATIVA Y ELISA CUALITATIVA”**, certifico que el total contenido del *Trabajo Experimental*, es de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Cuenca, septiembre de 2019



Tatiana Gabriela Buñay Barahona

C.I. 0302549175

Dedicatoria

A Dios, por regalarme la vida, por las bendiciones diarias, por ser mi fuerza y sabiduría, por estar presente en cada etapa de mi vida y de esta manera permitirme culminar mi carrera universitaria.

A mis padres, Fernando y Rosita por sus consejos, por el ejemplo de perseverancia y responsabilidad, por siempre apoyarme y haberme enseñado a luchar por mis sueños.

A mis hermanas, Catalina, Fernanda y Priscila por ser mi más grande apoyo, por la compañía ejemplo de superación y por la motivación que me han brindado a lo largo de mi vida.

A mis sobrinos, Carlitos y Ema quienes son una gran inspiración en mi vida y en todos los proyectos que espero realizar, a mi sobrino Carlitos porque junto a mi cuñado, Carlos y a Juan David me dejaron varias enseñanzas y me dan la fuerza para seguir adelante a pesar de las adversidades.

Agradecimiento

En el presente trabajo de tesis, quiero agradecer en mi primer lugar a Dios por bendecirme a lo largo de la realización de este gran paso dentro de mi vida profesional.

A mis padres, Fernando y Rosita y a mis hermanas, Catalina, Fernanda y Priscila quienes han sido mi motivación y con su ejemplo me han incentivado alcanzar mis metas a lo largo de mi vida.

A David Ramos, quien me ha ayudado motivándome durante los años de estudio y me ha apoyado en la realización de esta investigación.

Un especial agradecimiento a mi Tutor, Dr. Juan Masache por compartir todos sus conocimientos y experiencias, por brindarme sus consejos y apoyo incondicional para poder concluir satisfactoriamente con nuestra investigación y al Dr. Luis Saa por haber aportado y colaborado con todos su conocimiento y tiempo para la realización práctica de la investigación y quien se mostró siempre presto al aclararme cualquier duda de la investigación.

A mis estimados profesores quienes han sido un gran apoyo, por sus enseñanzas y por haber impartido todos sus conocimientos durante toda mi formación académica, ya que han sido indispensables para mi formación universitaria.

Tabla de contenido

Resumen.....	18
Abstract.....	19
1. Introducción.....	20
1.1. Problema.....	20
1.2. Delimitación.....	21
1.2.1. Temporal.....	21
1.2.2. Espacial.....	21
1.2.3. Académica.....	22
1.3. Explicación del problema.....	22
1.4. Objetivos.....	23
1.4.1. Objetivo General.....	23
1.4.2. Objetivo Específico.....	23
1.5. Fundamentación teórica.....	23
2. Revisión y análisis bibliográfico y documental.....	25
2.1. Anamnesis.....	25
2.1.1. Examen físico.....	25
2.2. Toma de muestras.....	25
2.2.1. Sangre.....	26
2.2.2. Punción.....	26

2.2.3. Consideraciones en la toma de muestra de sangre	27
2.2.4. Métodos de extraer sangre.....	28
2.2.5. Suero y plasma.....	29
2.2.6. Alteraciones en los resultados	30
2.3. Moquillo.....	31
2.3.1. Historia, distribución y sinónimos.....	31
2.3.2. Definición de Moquillo	31
2.3.3. Virus	32
2.3.4. Epidemiología.....	33
2.3.5. Patogenia	34
2.3.6. Diseminación.....	35
2.3.7. Signos	35
2.3.7.2. Signos clínicos neurológicos	36
2.3.7.3. Signos dérmicos.....	37
2.3.7.4. Signos oculares.....	37
2.3.8. Alteraciones Clínico-patológicas.....	37
2.3.9. Diagnóstico	38
2.3.9.1. Citología	38
2.3.9.2. Inmunofluorescencia directa.....	39
2.3.9.3. Análisis Hematológico	39

2.3.9.4. Necropsia y biopsia de la piel.....	39
2.3.10. Diagnóstico diferencial.....	39
2.3.11. Tratamiento.....	40
2.3.12. Prevención y Control.....	40
2.4. Vacunas	41
2.4.1. Definición	41
2.4.2. La necesidad de vacunar.....	41
2.4.3. Vacunación contra Moquillo canino.....	42
2.4.3.1. Pautas Vacunales	43
2.4.4. Respuesta inmune contra antígenos virales	43
2.5. Sistema Inmunitario	44
2.5.1. Definición	44
2.5.2. Inmunoglobulinas	44
2.5.3. Inmunoglobulina G e Inmunoglobulina M.....	45
2.5.4. Antígenos.....	45
2.5.5. Sistema inmune y enfermedad.....	46
2.6. Técnica de ELISA	46
2.6.1. Principales tipos de Elisa.....	47
2.6.1.1. ELISA tipo sándwich.....	47
2.6.1.2. ELISA Competitivo	48

2.6.1.3. ELISA indirecto.....	48
2.6.2. Elisa Cualitativo	49
2.6.2.1. Principios de Elisa Cualitativo	49
2.6.2.2. Precauciones	50
2.6.2.3. Almacenamiento y estabilidad.....	51
2.6.3. ELISA Cuantitativo	51
2.6.3.1. Principios de Elisa Cuantitativo	51
2.6.3.1.1. INgezim Moquillo IgM 15.CDM.K.2	51
2.6.3.2. Precauciones	52
2.6.3.3. Conservación	53
2.6.4. Parámetros de validación de los inmunoensayos enzimáticos.	53
2.7. Prueba de Oro.....	54
2.7.1. Valor predictivo positivo.....	54
2.7.2. Valor predictivo negativo	55
2.8. Resumen del estado del arte del estudio del problema.....	55
3. Materiales y métodos	57
3.1. Materiales	57
3.1.1. Físicos.....	57
3.1.2. Químicos.....	58
3.1.3. Biológicos	59

3.2. Método	59
3.2.1. Selección de animales.....	59
3.2.2. Obtención de muestras sanguíneas	59
3.2.3. Procedimiento para realizar el test rápido de detección de Moquillo canino	60
3.2.4. Procedimiento para realizar el ELISA Cuantitativo	60
3.3. Diseño.....	63
3.3.1. Variables	63
3.4. Población y Muestra.....	64
3.5. Consideraciones éticas	64
4. Resultados y discusión.....	65
4.1. Descripción general de la muestra de estudio.	65
4.2. Resultados del ELISA cualitativo y cuantitativo.	70
4.3. Resultados del tipo de ELISA según sexo.	72
4.4. Resultados del tipo de ELISA según la edad.	74
4.5. Resultados del tipo de ELISA por peso.	75
4.6. Resultados del tipo de ELISA por sintomatología presentada.....	77
4.7. Resultados del tipo de ELISA según la raza	79
4.8. Resultados de los tipos de ELISA según casos con desenlace fatal.	80
5. Conclusiones y recomendaciones	84
5.1. Conclusiones	84

5.2. Recomendaciones.....	85
6. Referencias Bibliográficas	87
7. Anexos	100
7.1. Datos de los pacientes	100
7.2 Sintomatología y desenlace de los pacientes.....	103
7.3. Fotografías del trabajo experimental.....	108
7.3.1. Fotografías del ELISA Cualitativa	108
7.3.2. Fotografías del ELISA Cuantitativo	112

Índice de Figuras

Figura 1. Mapa de la ciudad de Cuenca.....	21
Figura 2. Estructura de Morbilivirus.....	32
Figura 3. Esquema de la patogénesis de Moquillo Canino.....	34
Figura 4. Moquillo Sistémico.....	36
Figura 5. Hiperqueratosis de las almohadillas plantares.....	37
Figura 6. Inmunoglobulina M.....	45
Figura 7. Frecuencia de casos positivos y negativos dependiendo de la técnica utilizada.....	70
Figura 8. Resultados positivos de las técnicas ELISA cuantitativa y cualitativa por sexo.....	72
Figura 9. Frecuencia de resultados positivos por edad y tipo de ELISA.....	74
Figura 10. Frecuencia de casos positivos según la técnica por peso.....	76
Figura 11. Frecuencia de presentación de casos positivos según la técnica empleada y la sintomatología clínica.....	77
Figura 12. Frecuencia de casos positivos según la técnica empleada y la raza.....	79
Figura 13. Frecuencia de casos positivos en la muestra de cachorros con desenlace fatal (n = 22).....	80

Índice de Tablas

Tabla 1. Calibre de agujas para tomas de muestras de sangre	28
Tabla 2. Pautas Vacunales	43
Tabla 3. Laboratorio.....	57
Tabla 4. Oficina	58
Tabla 5. Laboratorio.....	58
Tabla 6. Animales	59
Tabla 7. Variables Independiente: Animales	63
Tabla 8. Variables Dependientes: Medición de Anticuerpos IgM mediante ELISA cuantitativo	64
Tabla 9. Datos generales	65
Tabla 10. Comportamiento de las diferentes variables epidemiológicas en la muestra de estudio	66
Tabla 11. Resultados positivos y negativos según la técnica empleado	70
Tabla 12. Frecuencia de casos positivos y diferencia porcentual por sexo según la técnica empleada.....	72
Tabla 13. Frecuencia de casos positivos según la edad del cachorro y la técnica empleada...74	
Tabla 14. Frecuencias de casos positivos por cada tipo de ELISA y el peso del cachorro.....75	
Tabla 15. Frecuencia de casos positivos por tipo de ELISA y signos clínicos.....77	

Tabla 16. Casos positivos según tipo de ELISA y desenlace fatal..... 80

Tabla 17. Frecuencias de casos positivos y negativos según el tipo de ELISA y el desenlace final de los cachorros82

Índice de Fotos

Foto 1. Toma de Frecuencia Cardíaca	108
Foto 2. Pesaje del paciente.....	108
Foto 3. Toma de Temperatura.....	108
Foto 4. Examen Físico	109
Foto 5. Depilación de la zona de venopunción	109
Foto 6. Desinfección de la zona de venopunción	109
Foto 7. Toma de Muestra	110
Foto 8. Kit CDV Ag Test.....	110
Foto 9. Colocación de las muestras de sangre en la Centrífuga.....	110
Foto 10. Obtención del Suero sanguíneo	111
Foto 11. Realización de Test Rápido de Moquillo	111
Foto 12. Lectura de Resultados.....	111
Foto 13. Recolección del suero.....	112
Foto 14. Rotulación de muestras.....	112
Foto 15. Colocación del suero en el congelador a - 4 °C.....	112
Foto 16. Transporte de Muestras al Laboratorio.....	112
Foto 17. Realización de la tabla simuladora de la placa antigenada.....	113
Foto 18. Homogenización de las muestras	113
Foto 19. Colocación del suero en el diluyente	113
Foto 20. Preparación de la solución de lavado	114
Foto 21. Colocación del Suero diluido en la placa	114
Foto 22. Lavados de la placa antigenada	114
Foto 23. Incubación de la placa (15 min)	115
Foto 24. Colocación del antígeno	115
Foto 25. Colocación del sustrato y solución de frenado	115

Foto 26. Lectura a 450 nm 116

Resumen

El presente estudio de investigación tuvo como objetivo diagnosticar moquillo en caninos mediante la técnica ELISA Cuantitativa y ELISA Cualitativa comparando los resultados obtenidos en cada una de estas. La investigación se desarrolló en la ciudad de Cuenca, Azuay, Ecuador. El procedimiento consistió en tomar muestras sanguíneas de 78 caninos sospechosos de padecer moquillo; en primer lugar se extrajeron muestras de sangre venosa, las cuales fueron sometidas a un proceso de centrifugación para simultáneamente obtener el suero sanguíneo, el cual fue dividido en dos porciones; la primera porción fue usada de manera inmediata para la realización del Test rápido de moquillo, mientras que la segunda fue almacenada a -4°C , para posteriormente al completar el número total de muestras ser llevadas al laboratorio y realizar la técnica de ELISA Cuantitativa. Las muestras fueron obtenidas en el Consultorio Veterinario “Medical Pet”, Clínicas Veterinarias de la Fundación Arca y Centro Agropecuario “El Campo”. Se desarrolló un estudio de tipo experimental, descriptivo y comparativo. Para el análisis estadístico se utilizó el programa Microsoft Excel 2013 y el programa SPSS. Los resultados obtenidos muestran que dentro de la población analizada la técnica de ELISA Cuantitativa detectó un total de 96.15% de casos positivos mientras que la técnica ELISA Cualitativa detectó un total de 66.67% de casos positivos, lo que nos indica que la técnica de ELISA Cuantitativa tiene una mayor sensibilidad en comparación con la técnica Cualitativa.

Abstract

The present study of investigation has as objective to diagnose distemper in canines using the Quantitative ELISA technique and Qualitative ELISA technique comparing the one with the other. The procedure consisted in to take blood samples from 78 dogs suspected of suffer distemper, first venous blood samples were taken, which were subjected to a centrifugation process to simultaneously obtain the blood serum, which was divided in two portions; the first portion was used immediately for the rapid test of distemper, while the second was stored at -4 ° C, later to complete the total number of samples to be move to the laboratory and perform the Quantitative ELISA technique. The samples were obtained in the Veterinary Clinic “Medical Pet”, Fundación Arca and Agricultural Center “El Campo”. Was developed an experimental, descriptive and comparative study. For the interpretation of the results, was perform a statistical analysis using Microsoft Excel 2013 and SPSS. The results obtained show that within the analyzed population, the Quantitative ELISA technique detected a total of 96.15% of positive cases while the Qualitative ELISA detected a total of 66.67% of positive cases, which indicates that the Quantitative ELISA technique It has a higher sensitivity compared to the Qualitative technique.

1. Introducción

El moquillo es una enfermedad muy grave que se presenta con mucha frecuencia en caninos especialmente en cachorros provocando un alto porcentaje de mortalidad, esta enfermedad es causada por Paramixovirus del genero Morbilivirus.

Sergio Linares, Correa y Velásquez (2010) afirman: “Para evitar esta enfermedad es necesaria la vacunación anual que suele reducir, pero no eliminar su aparición. En la medida en que la población se encuentre menos vacunada y existan más perros callejeros, aumentará la presentación de casos clínicos. Aunque es una enfermedad bastante difundida y conocida, presenta ciertas dificultades en el diagnóstico, es por esto que se hace importante las técnicas de laboratorio y su respectiva interpretación” (p.78).

Una forma muy importante para ayudar a controlar esta enfermedad es su diagnóstico temprano, existen distintas formas de detectarlas como por ejemplo la interpretación de los síntomas, por medio de radiología, por hematología o detectando los anticuerpos presentes mediante la técnica de ELISA. Bernar, Shen y Gorham (como se citó en Pinotti, 2011) indican que: “La prueba de ELISA es una prueba útil ya que la IgM en perros infectados persiste entre cinco semanas a tres meses, dependiendo de la cepa y la respuesta del hospedador. En perros vacunados la IgM persiste por aproximadamente tres semanas” (p.29)

En las Clínicas Veterinarias de Cuenca día a día llegan varios pacientes con síntomas de moquillo por lo que este estudio da a conocer un método de diagnóstico muy eficaz para poder detectar a los animales positivos para este virus, los cuales son una fuente de diseminación de esta enfermedad mortal.

1.1. Problema

El moquillo canino es una enfermedad altamente peligrosa que afecta con mayor frecuencia los cachorros, razón por la cual las Clínicas Veterinarias de Cuenca atienden a una gran

cantidad de animales que presentan síntomas de moquillo y realizan exámenes para dar un diagnóstico definitivo, pero en ocasiones el diagnóstico se realiza con pruebas cualitativas que no tienen un 100% de eficacia, por el contrario con pruebas cuantitativas los resultados son más certeros y se puede ayudar a controlar esta enfermedad.

1.2. Delimitación

1.2.1. Temporal

El proceso investigativo tuvo una duración total de 400 horas, distribuidas en el trabajo de experimentación y en la redacción del documento final.

1.2.2. Espacial

La investigación y evaluación de esta investigación se realizó en el Laboratorio de Zoonosis de la Universidad Técnica Particular de Loja, empleando 78 muestras sanguíneas de caninos sospechosos de moquillo obtenidas en el Consultorio Veterinario Medical Pet, Clínicas Veterinarias de la Fundación Arca, y centro Agropecuario “El Campo”.

Provincia: Azuay

Cantón: Cuenca

Figura 1. Mapa de la ciudad de Cuenca



Fuente: (Google Maps, 2019).

La ciudad de Cuenca posee una temperatura entre los 14°C y los 18°C; se encuentra a una altura de 2.538 m.s.n.m; cuenta con una maravillosa naturaleza debido a que está conformada por ríos que la atraviesan de oeste a este, estos cuatro ríos son Machángara, Tarqui Yanuncay y Tomebamba. Esta ciudad está situada entre la latitud: 2° 53' 57" sur y longitud 79° 00' 55", su superficie es de 15.730 hectáreas. (Municipalidad de Cuenca, 2018).

1.2.3. Académica

Con la presente investigación y trabajo experimental, se impulsa realizar nuevas investigaciones en el área de Laboratorio Clínico, se promueve el fortalecimiento de los conocimientos que se adquirieron en la asignatura de Laboratorio Clínico logrando poder interpretar de manera correcta los resultados de los exámenes de laboratorio y poder dar un diagnóstico correcto a los pacientes.

1.3. Explicación del problema

El problema radica en la prevalencia de la enfermedad y su velocidad de acción, considerándose una enfermedad mortal y un foco de infección para otros animales, siendo importante poder detectar a tiempo la enfermedad, para lo cual se necesita el empleo de pruebas que permitan diagnosticar la enfermedad; el método de ELISA Cuantitativo es un método muy efectivo y de gran sensibilidad, sin embargo tiene como desventaja el costo y el tiempo empleado para la realización del mismo, debido a esto se han elaborado pruebas cualitativas que son rápidas y eficaces pero son utilizadas solo para dar un diagnóstico presuntivo, ya que estas solo nos indican si hay presencia o ausencia de un virus.

Al comparar el ELISA Cualitativo con el ELISA Cuantitativo se podrá conocer cuál de las dos técnicas tiene una mayor sensibilidad para detectar animales que se encuentren infectados con el virus de Moquillo Canino, evitando tener falsos positivos o falsos negativos, permitiéndole al Médico Veterinario escoger el mejor método para detectar la enfermedad.

1.3.1. Hipótesis

- H0: Los caninos positivos al Test Anigen Rapid CDV Ag resultarán positivos al KIT INGEZIM MOQUILLO IGM sin distinción de género
- H1: Los caninos positivos al Test Anigen Rapid CDV Ag resultarán negativos al KIT INGEZIM MOQUILLO IGM sin distinción de género

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo General

- Diagnosticar moquillo en caninos (*Canis lupus familiaris*) machos y hembras mediante la técnica ELISA cuantitativa y ELISA cualitativa

1.4.2. Objetivo Específico

- Realizar la Técnica ELISA cuantitativa en caninos de 8 semanas a 1 año de edad sospechosos de moquillo canino
- Realizar la Técnica ELISA cualitativa en caninos de 8 semanas a 1 año de edad sospechosos de moquillo canino
- Comparar las ventajas y desventajas de los 2 tipos de técnicas.

1.5. Fundamentación teórica

El presente trabajo está enfocado en dar a conocer la eficacia de las técnicas usadas para detectar enfermedades y la importancia de dar un diagnóstico certero de enfermedades que son altamente contagiosas y mortales por medio de métodos de Laboratorio Clínico , debido a que día a día llegan a las Clínicas Veterinarias caninos presentando síntomas que nos hacen sospechar de más de una enfermedad, por lo que dar resultados correctos es indispensable para poder realizar un correcto control de los pacientes evitando que la enfermedad se siga propagando e infectando a más animales.

Hoy en día existen varias Clínicas Veterinarias y Laboratorios Clínicos que realizan exámenes para detectar enfermedades, siendo indispensable ir implementado cada vez más

dentro del área de Laboratorio Clínico nuevas técnicas tanto cuantitativas como cualitativas que nos ayuden como Médicos Veterinarios a poder obtener de manera rápida y confiable resultados correctos de distintas enfermedades para así poder dar un diagnóstico final que sea certero y nos ayude a dar el mejor tratamiento para nuestros pacientes.

2. Revisión y análisis bibliográfico y documental

2.1. Anamnesis

La recopilación de la reseña es de vital importancia al momento de llenar el documento médico de cada paciente ya que nos ayuda a conocer que patología presenta el animal que ha llegado a consulta. Al analizar la anamnesis es importante conocer algunos datos específicos de los pacientes debido a que estos influyen en gran parte en la presentación de algunas enfermedades, algunos de estos son la especie, alimentación, la raza, el género, plan de vacunas entre otros (Radostits, Mayhew y Houston, 2002).

2.1.1. Examen físico

Tiene como finalidad a través de distintos pasos identificar si existen alteraciones en el funcionamiento de algún órgano o aparato del cuerpo del paciente, dentro de estas alteraciones se debe tomar en cuenta cuales son las más relevantes, ya que así nos ayudaran a orientar por medio de los síntomas que posible patología se está presentado (Radostits et al., 2002).

Dentro del examen físico se lleva a cabo ciertos procedimientos necesarios para ir recolectando mayor información que es indispensable para llegar a un diagnóstico correcto como la inspección en donde por medio de la vista podemos observar si se presentan alteraciones en alguna parte de cuerpo del animal , esta puede ser interna o externa, la palpación la cual consiste en que a través del tacto podamos ir evaluando distintas partes del cuerpo ,la percusión que nos permite obtener por medio de golpes sonidos que nos indican información de interés para el diagnóstico y la auscultación que por medio de la audición permite identificar si existen alteraciones en los procesos vitales normales del organismo (Brejov, 2016).

2.2. Toma de muestras

La correcta extracción de la sangre es indispensable para llegar a un buen diagnóstico, para esto se debe conocer que pueden existir alteraciones tanto en el momento de toma de la muestra,

en el transporte, presencia de medicación, contaminación o por aspectos del animal que pueden producir cambios en el análisis, dándonos resultados erróneos (Álvarez, 2001).

2.2.1. Sangre

La sangre representa cerca del 8% del peso corporal de un animal. Los análisis de sangre son un importante apoyo para el diagnóstico clínico. Puede extraerse con jeringa y aguja y transferirse a recipientes de diferentes capacidades, con o sin anticoagulante, o recolectarse en tubos de vacío que, al ser herméticos, garantizan la esterilidad de la muestra, lo que es deseable en toda punción venosa. Para que sean representativas, se debe mantener la composición y la integridad de las muestras de sangre durante las fases preanalíticas de recolección, manipulación, transporte y eventual almacenamiento (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Abastecimiento, 2017, p.36).

Antes de la recolección de sangre para análisis de laboratorio, es importante conocer, controlar y, si es posible, evitar algunas variables que pueden interferir en la exactitud de los resultados. En general, estas variables están relacionadas con condiciones preanalíticas como modificaciones en la dieta y uso de medicamentos. Otros aspectos, como el uso de gel separador, anticoagulante y conservante y la hemólisis también pueden provocar una variación de los resultados (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Abastecimiento, 2017, p.36).

2.2.2. Punción

Zapata (como se citó en Galarza, 2017) refiere que el proceso de punción se realiza en diversos sitios anatómicos; en animales menores especialmente en felinos y caninos cuando se desea realizar una punción la muestra se obtiene de las venas safena y cefálica. En ocasiones cuando los animales se encuentran muy deshidratados o cuando son cachorros se dificulta el uso de las venas antes mencionadas por lo que se opta por tomar extraer la sangre de la vena yugular.

Zapata (como se citó en Galarza, 2017) refiere que los métodos para la punción cambian de acuerdo a algunos aspectos como son el grosor de la piel, la dureza de la piel, la especie animal y la ubicación de los vasos que van a ser punzados, entre otros. La técnica de punción debe ser realizada con cuidado y aplicando los métodos de sujeción para cada especie, ya que es importante la inmovilización correcta del animal para obtener una adecuada muestra sanguínea, recordando que antes de insertar la aguja en el vaso este debe ser fijado con la ayuda del pulgar.

Gallo (2014) afirma: “La cantidad de sangre que se puede extraer a un animal sin riesgo del mismo, varía en función de su tamaño o peso; así como también en dependencia a de la técnica que vaya a realizarse” (p.21).

2.2.2.1. Técnica general de punción

Archer (como se citó en Tepán, 2017) piensa que es indispensable provocar la dilatación de la vena logrando identificarla y produciendo un flujo sanguíneo abundante a través de la aguja al puncionarla, y para poder lograr esto se debe aplicar presión digital.

2.2.3. Consideraciones en la toma de muestra de sangre

Tomar muestras de sangre en condiciones adecuadas va a depender del método de obtención de sangre, de la limpieza, la inmovilización del animal, de la manipulación y envío de la muestra tomada, por esto es importante tomar en cuenta algunas normas básicas, como el uso de recipientes, jeringas, agujas que estén en buen estado, sin contaminación y sin humedad, no producir estasis prolongado en la vena, aplicar técnicas de contención dependiendo de la especie animal, cuando se está extrayendo la sangre esta se debe absorber lentamente de tal manera que pueda desplazarse ligeramente y para el correcto mantenimiento se debe tener la muestra extraída en refrigeración (Gallo, 2014).

2.2.4. Métodos de extraer sangre

2.2.4.1. Jeringa

Una forma muy usada para extraer la sangre es mediante una jeringa, se debe prestar mucha atención debido a que se debe evitar que se cree un vacío muy violento, la especie y el tamaño del animal juega un papel importante ya que de esta va a depender el calibre de aguja que se vaya a utilizar. Si la sangre se va a colocar en otro tubo debe quitarse la aguja de jeringa ya que así no habrá hemólisis en la muestra (Ñunez y Bouda, 2007).

Tabla 1. *Calibre de agujas para tomas de muestras de sangre*

Calibre de Aguja	Color	Manejo
25	Azul	Animales de laboratorio (punción cardiaca). Felinos, aves, útil para gasometría en todas las especies.
27	Naranja	
29	Blanco	
22	Negro	Felinos o cachorros, bovinos (vena caudal), aves.
21	Verde	Caninos, ovinos, caprinos.
20	Amarillo	Caninos, ovinos, caprinos, bovinos
18	Rosa	Bovino, equinos
16	Blanco	Bovino, equinos, porcinos
14	Azul	Bovinos, equinos, porcinos

Fuente: (Núñez y Bouda, 2007).

2.2.4.2. Sistema de tubos con vacío

Núñez y Bouda (2007) refieren que los tubos provistos de un sistema de vacío son muy útiles en ocasiones donde el vaso a puncionar se encuentra firmemente fijado o es muy visible debido a que al momento de insertar la aguja el tubo absorberá la sangre de inmediato, sin embargo al usar los tubos de vacío se deben tomar en cuenta ciertas consideraciones como: ser realizado por personas que tengan gran práctica en la toma de muestras sanguíneas, evitar la

extracción brusca de la muestra ya que esto provocará el choque de la sangre con las paredes del tubo causando destrucción de los glóbulos rojos, tener presente si el tubo cuenta con anticoagulante o no, siendo esto importante para determinar el volumen de sangre que debemos extraer. El uso de estos tubos no se recomienda en caso de pacientes con alto grado de deshidratación.

2.2.4.3. Sistema de jeringa-tubo

El sistema de jeringa- tubo es de gran utilidad en el laboratorio al ofrecer varias ventajas como resistencia, no requiere de transferencia de la muestra a otro recipiente para análisis, control de la cantidad del vacío aplicado, obtención de pequeñas o grandes cantidades de volumen, y se puede usar anticoagulante (Núñez y Bouda, 2007).

2.2.4.4. Aguja directa

El uso de la aguja directa se recomienda en situaciones donde el volumen de la muestra de sangre es grande o se necesita una extracción sanguínea rápida, por estas razones esta técnica se realiza especialmente en animales mayores. Las dificultades de esta técnica son que puede causar una alteración en el análisis del laboratorio debido a que causa destrucción de eritrocitos y presencia de grasa en la sangre (Núñez y Bouda, 2007).

2.2.5. Suero y plasma

En el análisis de muestras de laboratorio las muestras más utilizadas son el plasma y el suero sanguíneo; el primero se obtiene por medio de la toma de muestra en tubos que contienen anticoagulante, por el contrario, el segundo solo se obtiene en tubos que no tengan anticoagulante. El suero se puede obtener por medio de centrifugación de la muestra o por reposo de la misma, para que el proceso de coagulación se complete separándose así el suero sanguíneo (Gonzales, 2014).

Para adquirir el suero de la sangre primero se debe tomar una muestra de sangre y colocar en un tubo de ensayo de tal forma que se deslice por las paredes evitando que se cree espuma

y dejamos reposar a temperatura ambiente logrando así una rápida coagulación, se espera alrededor de 30 minutos y eliminamos la parte superior del coágulo que se ha formado, después esperamos por 60 minutos y se realiza una centrifugación por 20 minutos, luego de esto dividimos con una pipeta Pasteur el suero del coágulo, de esta forma se obtiene un suero transparente sin restos de sangre y limpio. Es importante conocer que el suero sanguíneo no debe mezclarse con ningún aditivo como anticoagulantes (Ruiz, Coy, Pellicer y Ramírez, 1995).

Cuando el suero no se va a utilizar inmediatamente luego de haberlo obtenido o se va a transportar a lugares lejanos este se puede mantener y conservar por un largo periodo de tiempo para posteriormente ser utilizado, esto se logra por medio de la congelación, también el suero se podrá transportar si no es por mucho tiempo a una temperatura de 5 °C en un cooler (Cordero y Salas, 1999).

2.2.6. Alteraciones en los resultados

Existen dos principales causas que producen cambios en los resultados, estas son la hemólisis y la lipemia. La hemólisis se puede dar cuando se usan materiales que no tienen la asepsia adecuada, materiales húmedos y que no sean de buena calidad, uso del calibre de aguja inadecuado, shock térmico, mala manipulación de la muestra y temperaturas inadecuadas ya sean muy altas o bajas. La lipemia se presenta cuando se toma la muestra de sangre en animales que no hayan ayunado, el ayuno debe ser de 8 a 12 horas, o por patologías como pancreatitis, hipotiroidismo, hiperadrenocortisismo y problemas renales (Núñez y Bouda, 2007).

2.3. Moquillo

2.3.1. Historia, distribución y sinónimos

“El Distemper canino es una enfermedad conocida desde el S. XVIII, el virus causante de la enfermedad fue descubierto por Carré en 1905 y confirmado en 1923-1930 con los trabajos de Laidlaw y Dunkin, siendo los que introdujeron a los hurones como animales de experimentación, los cuales invariablemente mueren al inocularles el virus. Los mismos autores desarrollaron varios procedimientos de inmunización que han formado las bases de métodos presentes en la prevención de la enfermedad” (Figuroa, 1984, p.376).

“Se trata del agente etiológico de una de las principales patologías infecciosas de canes jóvenes y adultos, conocida como Distemper, Enfermedad de Carré o Joven Edad” (Sarute, et al., 2011, p.7).

2.3.2. Definición de Moquillo

Figuroa (1984) afirma: “Es una enfermedad infectocontagiosa, de origen viral que afecta a los canidos y que se caracteriza por fiebre, leucopenia, catarro respiratorio y gastrointestinal con frecuente complicación neurológica” (p.376).

“El moquillo canino es una enfermedad infecciosa muy contagiosa. La infección por el virus del moquillo canino, en perros no inmunizados, provoca inmunodepresión grave y afección multisistémica que suele culminar con la diseminación vírica por el sistema nervioso central” (Ruiz de Gopegui, 2006, p.24).

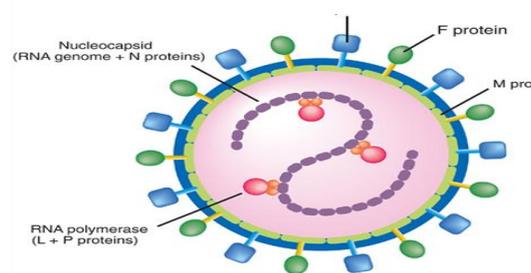
Martella, Martella, Elía y Buonavoglia (como se citó en Pinotti, et al., 2016) refieren que esta enfermedad puede manifestarse en dos etapas: la primera en donde se ve afectada el aparato respiratorio, digestivo y la piel; y una segunda etapa en donde hay fuertes manifestaciones a nivel nervioso provocando lesiones muy graves.

2.3.3. Virus

El virus causante del Distemper canino pertenece al género Morbillivirus, orden Mononegavirales, familia Paramyxoviridae, tiene relación con otros Morbillivirus como el Virus de la Peste Bovina, Virus de la Peste de los Pequeños Rumiantes (Rinderpest) y el Virus del Sarampión en Humanos (Gallegos, 2018).

El virus del moquillo está conformado por diferentes proteínas, en su superficie posee dos proteínas encargadas de la respuesta inmune protectora, la hemaglutinina (h) se encarga de la unión del virus con los receptores celulares, mientras que la proteína de fusión (f) se encarga de la penetración del virus en la célula hospedadora; también posee proteínas internas las cuales son nucleocápside, transcriptasa, polimerasa y matriz (Blanco, Doménech, Orden, Dominguez, Miró, Cutuli, & Simarro, 2013).

Figura 2. Estructura de Morbillivirus



Fuente: (Sato, Yoneda, Honda y Kai, 2012).

Los paramyxovirus pueden presentar actividades hemoaglutinantes, hemolíticas y neuraminidasa. La nucleocápside, que tiene simetría helicoidal y posee un característico aspecto de espina de pescado. La replicación tiene lugar en el citoplasma celular. Los viriones se liberan mediante gemación de la membrana plasmática desde lugares que contienen proteínas de la envoltura del virus. Los viriones son lábiles y sensibles al calor, la desecación, los solventes lipídicos, los detergentes no iónicos y los desinfectantes (Quinn, Markey, Carter, Donnelly y Leonard, 2002, p.475).

Salas (2013) refiere que el virus causante de esta grave y mortal enfermedad con el pasar del tiempo ha afectado a una gran cantidad de animales domésticos, lo que se ha logrado conocer a través del gran número de casos de caninos diagnosticados con moquillo, esto ha llevado a que por medio de las investigaciones se encuentren nuevas cepas de este virus que se han considerado altamente peligrosas, sin embargo, la razón principal de estas variantes aún no se ha podido conocer.

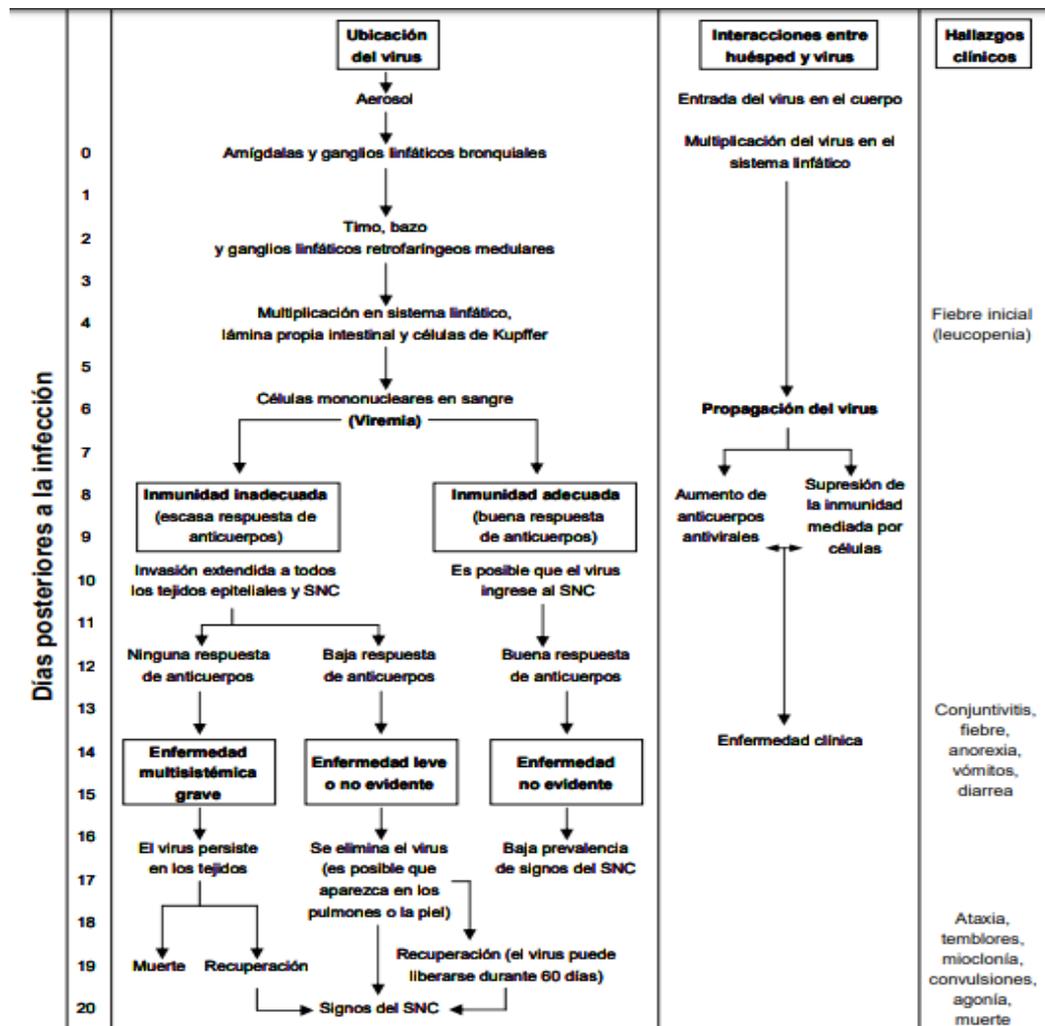
Apple (como se citó en Gallegos, 2018) piensa que el virus puede permanecer activo en un rango de pH de 4,5 a 9, el clima frío ayuda a la supervivencia del virus por esto se conoce que a -65°C puede conservarse por más de siete años tanto. El virus de moquillo canino es sensible a altas temperaturas pudiendo destruirse a temperaturas superiores a 50°C ; es también muy sensible a diversos desinfectantes como amonio, cloroformo o formol siendo estos los más usados en los laboratorios o clínicas para destruir al virus.

2.3.4. Epidemiología

Se había considerado que el CDV infectaba a la familia Canidae, sin embargo, se han detectado brotes en las familias: Felidae, Hyaenidae, Mustelidae, Procyonidae, Ursidae, Viverridae, Ailuridae y Mephitidae. El CDV, tal como otros virus con envoltura, se inactiva rápidamente en el ambiente, por lo que la infección suele requerir el contacto directo. Hay incidencia estacional, con preferencia de infección durante la estación fría, siendo más favorable las temperaturas inferiores a 4°C . La susceptibilidad de los cachorros es máxima entre 3 y 6 meses de edad, que coincide con el periodo que va desde la reducción de la inmunidad pasiva hasta que se obtiene la inmunidad vacunal. Se considera que el animal enfermo puede empezar a eliminar el virus (periodo de prepatencia) al cabo de 7 días posinfección, con un máximo estimada de excreción viral de 90 días. La eliminación comienza cuando la replicación viral alcanza los epitelios (Ruiz de Gopegui, 2016, p.24).

2.3.5. Patogenia

Figura 3. Esquema de la patogénesis de Moquillo Canino



Fuente: (Greene y Appel, 2006).

La infección se desarrolla cuando el virus entra a través de vía aérea para posteriormente multiplicarse en las amígdalas y en los nódulos de los bronquios, luego se asocia a células de defensa del organismo como son los macrófagos y monocitos de distintos órganos, dando lugar a una respuesta de defensa por parte del organismo afectado ya que trata de eliminar el virus, en algunos casos se produce aumento de desarrollo de anticuerpos lo que causa que no se lleguen a presentar los síntomas y en otros animales hay bajo nivel de anticuerpos lo cual indica que se desarrolló un cuadro sintomatológico grave (Blanco et al., 2013).

2.3.6. Diseminación

El virus de Moquillo canino se propaga por medio de aerosoles, por los fluidos corporales del animal infectado como secreciones nasales, por tener contacto con animales infectados o por fómites (Briones, 1990).

2.3.7. Signos

Se presentan una gran variedad de síntomas de acuerdo a la virulencia que produce la infección, el entorno, la edad y el sistema inmunológico; causando pérdida de peso, disminución de la condición corporal elevación de la temperatura por un periodo de tiempo con la consecuente disminución de la misma, heces acuosas, regurgitación secreción nasal y oculares de color verde, infección en el tracto respiratorio causando tos hasta llegar a la última etapa en donde se afecta el sistema nervioso causando convulsiones y por último la muerte del animal afectado (Ferreyra, 2013).

2.3.7.1. Signos clínicos Sistémicos

Gómez y Feijoó (2012) afirma: La enfermedad constituye el resultado de la interacción entre la acción del virus y las infecciones bacterianas oportunistas. Los signos clínicos, por lo tanto, van a depender del tropismo y la virulencia de la cepa actuante, de las condiciones ambientales, de la edad y el estado inmunológico del huésped. En un comienzo existirán signos inespecíficos como apatía anorexia, hipertermia y compromiso de las vías aéreas superiores. Posteriormente, se manifestará un exudado oculonasal seroso bilateral que con el transcurso de los días de evolución se tornará mucopurulento, acompañado por tos (reflejo tusígeno positivo) y en los casos complicados aparecerá disnea. (p.328)

Figura 4. Moquillo Sistémico



Fuente: (Blanco et al., 2013).

2.3.7.2. Signos clínicos neurológicos

Gómez y Feijoó (2012) afirma: La presentación de los signos neurológicos no puede predecirse o evitarse, pues generalmente dependerá del neutropismo de la cepa viral y del nivel inmunitario del animal. Tal es así que los pacientes jóvenes, inmunosuprimidos o muy parasitados padecerán una sintomatología aguda y grave. Puede aparecer rigidez cervical e hiperestesia provocados por irritación de las meninges; convulsiones, signos cerebelosos y vestibulares, paraparesia, tetraparesia ataxia y mioclonías. (p.329)

Las principales manifestaciones clínicas a nivel del sistema nervioso que se observa en un animal con Distemper canino son: dificultad en la propiocepción, parálisis parcial, problemas visuales dificultad en la coordinación de los movimientos, depresión y espasmos (Muñoz, Morgaz y Galán, 2015).

Muñoz et al. (2015) afirma que “Los signos neurológicos pueden surgir 1 a 3 semanas después de la recuperación de los signos sistémicos, así como semanas o meses más tarde. Las mioclonías generalizadas o focales son un signo frecuente y son muy indicativas de la infección por VMC” (p.65).

2.3.7.3. Signos dérmicos

El virus causante del moquillo canino afecta al sistema inmunitario haciendo que este se deprima y por lo tanto se producen heridas en la epidermis como, pérdida del pelaje en las zonas afectadas, hiperqueratosis en las almohadillas plantares de la nariz y descamación; este síntoma es muy importante debido a que es característico de esta enfermedad y nos ayuda a dar un mejor diagnóstico (Machicote, 2012).

Figura 5. Hiperqueratosis de las almohadillas plantares



Fuente: (Blanco et al., 2013).

2.3.7.4. Signos oculares

Las lesiones oculares más significativas producidas por moquillo canino son neuritis del óptico y desprendimiento de retina; en algunos casos ceguera y lesiones en la retina caracterizadas por necrosis con densidad irregular de color gris o rosadas y en casos muy severos desprendimiento ampollar o total de la retina. También hay pacientes con úlcera de córnea por disminución o ausencia repentina de secreción lagrimal por la alteración en la inervación de las glándulas lagrimales. (Gómez y Feijoo, 2012, p.330)

2.3.8. Alteraciones Clínico-patológicas

Las alteraciones clínico-patológicas más habituales son: linfopenia y trombocitopenia. Otras alteraciones están asociadas a las infecciones bacterianas secundarias (leucocitosis,

neutrofilia) e incluso a cuadros de septicemia. En ocasiones, se detectan cuerpos de inclusión víricos en el citoplasma de leucocitos circulantes. En los perros con signos respiratorios puede observarse un patrón radiológico intersticial típico de neumonía vírica, en ocasiones complicando por una neumonía bacteriana (Agut, et al., 2016, p.242).

2.3.9. Diagnóstico

Linares, Correa y Velásquez (2010) afirman: “Aunque es una enfermedad bastante difundida y conocida, presenta ciertas dificultades en el diagnóstico, es por esto que se hace importante las técnicas del laboratorio y su respectiva interpretación. Es importante tener en cuenta la historia clínica, la evaluación física y los paraclínicos para encontrar el diagnóstico preciso” (p. 78).

Debido a la variedad que tiene el virus en el huésped, al periodo impredecible y a los síntomas que causa esta enfermedad es complicado realizar un correcto diagnóstico clínico ya que la sintomatología es bastante similar a la de otras enfermedades lo que no permite hacer una adecuada evaluación ante-mortem para determinar la presencia de la enfermedad (Gallegos, 2018).

2.3.9.1. Citología

Morales (como se citó en Zambrano, 2014) afirma se puede realizar a través de raspados conjuntivales o de amígdalas, o en sedimentos obtenidos de la orina. Antes del raspado conjuntival, se debe instilar 1 gota de anestésico en el ojo del paciente y esperar, aproximadamente 10 minutos. Para el raspado, se puede utilizar un hisopo ligeramente humedecido con solución salina isotónica, haciendo movimientos rotatorios sobre la conjuntiva, o se puede utilizar la parte posterior de una hoja de bisturí. El raspado de amígdalas se puede realizar también con un hisopo. El material obtenido se coloca en un portaobjetos limpio y se fija de inmediato.

2.3.9.2. Inmunofluorescencia directa

Gómez y Guida (2010) afirman: “Esta técnica se puede realizar a partir de improntas conjuntivales, de amígdalas o de epitelio respiratorio. También se puede emplear en muestras sanguíneas o LCR (líquido cefalorraquídeo. Se utilizan anticuerpos específicos antiVCM marcados con fluoresceína” (p.114).

2.3.9.3. Análisis Hematológico

Gómez y Guida (2010) afirman: “Este estudio revela linfopenia, neutrofilia leve y en ocasiones monocitosis, aunque otras infecciones virales también dan estos resultados, a veces, en los frotis sanguíneos se pueden observar inclusiones virales, particularmente en los linfocitos” (p.113).

2.3.9.4. Necropsia y biopsia de la piel

Debido a que el virus del moquillo canino se disemina en diferentes tejidos y órganos en donde permanece localizado se puede tomar muestras de amígdalas, cerebro, bazo y estómago; también se ha descubierto que se puede hacer un diagnóstico tomando muestras de la epidermis dando buenos resultados por ser una prueba específica (Wheeler, 2007).

2.3.10. Diagnóstico diferencial

Existen varias enfermedades que se pueden confundir con el moquillo canino debido a que presentan síntomas muy similares, por esto es indispensable poder diferenciarlas de enfermedades como la Tos de las perreras, infecciones bacterianas, meningoencefalomielitis, enfermedades que presentan síntomas entéricos como el parasitismo por anquilostomas o gusanos redondos, y envenenamiento; debido a que poder identificar de la manera adecuada la enfermedad permitirá poder tratar al animal que se encuentra infectado por el virus de moquillo canino si este se encuentra en la fase inicial de la enfermedad (Barr y Bowman, 2007).

2.3.11. Tratamiento

No existe un tratamiento farmacológico específico que actúe contra el virus del moquillo canino sin embargo, se ha utilizado un tratamiento sintomático que se basa en poder estabilizar al animal afectado y evitar enfermedades secundarias por bacterias para esto se ha utilizado antibióticos que eviten el desarrollo de bronconeumonía, fluidoterapia por vía parenteral para reestablecer el equilibrio hidroelectrónico que se ha perdido por las diarreas y vómitos, y para controlar las manifestaciones nerviosas se recomienda la administración de fenobarbital, diazepam o bromuro de potasio (Muñoz et al., 2015).

2.3.12. Prevención y Control

Se basa en una buena higiene y manejo de los cachorros y perros jóvenes, y en el uso de vacunas atenuadas. La vacuna contra el moquillo es muy esencial y debe ser administrada a todos los perros sea cual sea su estilo de vida. La primovacuna es más segura si se aplican tres dosis (8, 12 y 16 semanas) o incluso cuatro (si se ha empezado a las 6 semanas) para evitar la interferencia con la inmunidad materna (Agut, et al., 2016, p.242).

La mayoría de las vacunas compuestas por CDV son producidas con virus obtenidos mediante adaptación a huevos embrionados o cultivos celulares aviares (cepa Onderstepoort) o bien con virus adaptado a cultivos celulares caninos (cepa Rockborn). Dado que en algunas ocasiones se han descrito casos de encefalitis posvacunales tras el empleo de cepas adaptadas a cultivos celulares caninos, se consideran más seguro el uso de la cepa adaptada a cultivos celulares aviares. Para inducir la protección de cachorros jóvenes en presencia de niveles moderados de anticuerpos maternos se han utilizado vacunas compuestas por virus de moquillo heterotípico (Quinn et al., 2002).

Aunque muchos perros permanecen protegidos durante varios años después de la vacunación, un porcentaje de los animales vacunados se vuelven sensibles después de un año.

Debido a la naturaleza lábil del virus, su control se puede lograr tras la aparición de un brote de la enfermedad en una perrera mediante el aislamiento estricto y la desinfección (Quinn et al., 2002, p.480).

2.4. Vacunas

2.4.1. Definición

López y Modrego (1994) refiere que las vacunas están conformadas por proteínas o agentes infecciosos ; estas son de vital importancia en el cuidado de los animales debido a que generan inmunidad en el organismo evitando que se presenten enfermedades infecciosas, sin embargo, las vacunas siguen siendo estudiadas y mejoradas debido a varias razones como: en ocasiones han causado efectos adversos, no son elaboradas de la manera correcta provocando que individuos vacunados mueran, se desea crear vacunas que brinden mayor inmunidad y seguridad y porque día a día se van descubriendo nuevos virus que afectan a la salud.

2.4.2. La necesidad de vacunar

Las vacunas son una manera muy eficiente de controlar y de evitar que se presenten enfermedades contagiosas ya que ayudan a mantener un buen estado de salud tanto en animales como en humanos, por medio de las vacunas se refuerza el sistema inmunitario del animal haciéndole más fuerte y previniendo que sea susceptible a una enfermedad (Ramsey y Tennant, 2012).

Animales que se encuentren inmunizados por las vacunas presentan una mayor protección ante la infección que causa el virus del moquillo ya que con la inmunización no se produce una inmunosupresión en el organismo esto se da gracias a la respuesta inmune antiviral creada al existir la eliminación de cepas virulentas (Céspedes, Cruz y Navarro, 2010).

2.4.3. Vacunación contra Moquillo canino

La vacuna contra moquillo canino debe aplicarse los primeros meses de vida del animal, sin embargo, se puede considerar que el tiempo adecuado puede variar debido a que la vacunación está muy relacionada con la inmunidad que les transmite la madre a sus cachorros, para lo cual es importante conocer el protocolo de vacunación que ha recibido la madre (Gutiérrez, 2010).

Gutiérrez (2010) piensa que, pese a que en algunas literaturas se describe que la protección de anticuerpos maternos dura hasta 45 días o 77 días de nacido aproximadamente, es de vital importancia empezar la vacunación contra Distemper a la quinta o sexta semanas; ya que en ocasiones no se tiene el conocimiento certero de cuando la madre fue vacunada por última vez, si ha seguido con la revacunación anual o si fue vacunada durante su periodo de celo.

En el caso que se cuente con toda la historia clínica de madre y exista la certeza de que ha cumplido todo su programa de vacunación el tiempo de vacunación contra moquillo puede extenderse a una o dos semanas más, es decir, vacunar a la octava semana de vida del cachorro (Gutiérrez, 2010).

La inmunidad transmitida por parte de la madre a sus cachorros desaparece a los 84 días de vida; sin embargo, se recomienda la aplicación de las vacunas en un periodo entre 42 a 112 días de vida. Cuando un animal ha padecido una enfermedad este genera una inmunidad adquirida que puede protegerlo durante algunos años de vida (Bravo y Esclante, 2006).

Es importante conocer que para que una vacuna mantenga su capacidad de protección no se debe romper la cadena de frío, en el caso de la vacuna contra Distemper canino se puede mantener a 0°C, 4°C o 20 °C, esto dependiendo del tiempo en el cual va a ser utilizada, es decir, si se la va a almacenar por un periodo largo de tiempo se la debe conservar a la temperatura más baja (0°C) y si va a ser utilizada en pocos días luego de su adquisición puede ser mantenida a 20°C (Bravo y Esclante, 2006).

2.4.3.1. Pautas Vacunales

Tabla 2. *Pautas Vacunales*

Edad de Vacunación	Vacunas
6 semanas	Parvovirus y distemper.
2 meses	Pentavalente: distemper, hepatitis, parvovirus, Leptospira, coronavirus Tos de las perreras
3 meses	Pentavalente (revacunación) Rabia
4 meses	Rabia (Revacunación)
5-6 meses	Distemper, parvovirus, hepatitis, Leptospira Leishmania (3 dosis separadas un mes una de otra)
Revacunación anual	

Fuente: (Muñoz, Morgaz y Galán, 2015).

2.4.4. Respuesta inmune contra antígenos virales

Ochoa (2001) refiere que el objetivo de aplicar una vacuna en un organismo es el de generar una defensa mediante la elaboración de anticuerpos y la activación de células de defensa propias del organismo frente la presencia de agentes patógenos, para lo cual destruye las toxinas generadas por los mismos. Los anticuerpos por medio de algunos mecanismos como por ejemplo evitar la adhesión del agente a superficies del organismo afectado, destrucción del agente infeccioso por medio de la encapsulación del mismo o destrucción de partes específicas de la estructura del microorganismo logran inactivar de esta manera a las toxinas generadas por los mismos, evitando que puedan causar daños a la salud del hospedero en el que se encuentran.

En la sangre, mucosas y fluidos corporales se produce una reacción entre los anticuerpos y los antígenos impidiendo la penetración celular con lo que se evita que la multiplicación local se extienda al órgano blanco, siendo una gran protección en problemas virales (Ochoa, 2010).

2.5. Sistema Inmunitario

2.5.1. Definición

Fernández (2012) afirma: El sistema inmunitario consta de una red de leucocitos, anticuerpos y otras sustancias que luchan contra las infecciones y rechazan las proteínas extrañas. Además, el sistema inmunitario cuenta con varios órganos. Algunos, como la médula ósea son los lugares en los que se producen los glóbulos blancos, mientras que otros, como el bazo, los ganglios linfáticos o el hígado, atrapan microorganismos y sustancias extrañas y proporcionan un lugar de acumulación de células inmunitarias, interacción entre ellos y con sustancias extrañas, y generación de una respuesta inmunitaria. (p. 58)

2.5.2. Inmunoglobulinas

Díaz, Fernández y Parede (1997) aseguran que las inmunoglobulinas son moléculas conformadas por proteínas que se generan en células plasmáticas, existen cinco tipos que se encargan de brindar protección a un organismo que está siendo afectado por un agente infeccioso, estas son: inmunoglobulina A, inmunoglobulina G, inmunoglobulina M e inmunoglobulina E.

“Las inmunoglobulinas y los receptores de las células T son moléculas estructuralmente similares, producto de genes que son cortados, empalmados y modificados durante el desarrollo del linfocito” (Parham, 2006, p.15).

La clase de inmunoglobulina que más abunda en el suero es la llamada inmunoglobulina G (IgG). La segunda más abundante en el suero de la mayor parte de los mamíferos es la inmunoglobulina M (IgM). La tercera en abundancia en estos animales es la inmunoglobulina IgA; también esta predomina en secreciones como saliva, leche y líquido intestinal. La inmunoglobulina D (IgD) es rara en los líquidos corporales, y no existe en todos los mamíferos.

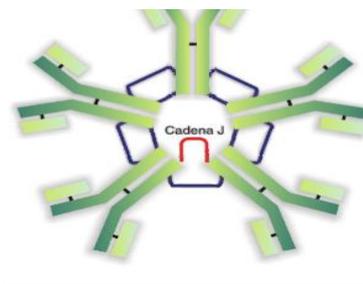
La inmunoglobulina E (IgE), cuya concentración en suero es baja, actúa como mediadora de las reacciones alérgicas. (Tizard, 2002, p.150)

“Las inmunoglobulinas están constituidas por dos cadenas pesadas idénticas, ligadas entre sí por uniones disulfuro. Cada una de las cadenas pesadas están unidas también por puentes disulfuro a cadenas livianas, idénticas entre sí” (Cauerhff, Horacio, Fossati y Goldbaum, 2007, p.51).

2.5.3. Inmunoglobulina G e Inmunoglobulina M

Un individuo tiene la capacidad de generar inmunoglobulinas G e inmunoglobulina M como defensa principal cuando en su organismo ingresa un microorganismo patógeno; sin embargo, por lo general la IgM se produce en un organismo después de haber interactuado con el agente infeccioso. Se considera que para realizar un análisis serológico identificando la presencia de la IgM se debe conocer que esta, a diferencia de la IgG, no tiene la capacidad de atravesar la placenta lo que nos indica que si se detecta la IgM en la muestra de suero sanguíneo de un animal la inmunoglobulina debe haber sido generada por el propio organismo del animal mas no haber sido transmitida por medio de la madre (Forbes, Sahm y Weissfeld, 2009).

Figura 6. Inmunoglobulina M



Fuente: (Montoya, 2008, p .130).

2.5.4. Antígenos

Los antígenos son considerados estructuras compuestas por un grupo de moléculas que cuentan con conjuntos químicos que tienen la capacidad de provocar la formación de

anticuerpos específicos para mezclarse con grupos reactivos de la molécula extraña (Alexander y Good, 1984).

2.5.5. Sistema inmune y enfermedad

El entender como funciona la inmunidad del organismo ha permitido llegar a conocer cuáles son las alteraciones que se producen en el momento del desarrollo de una enfermedad, y como las células encargadas de la protección se ven afectadas por estas alteraciones, lo cual en la antigüedad era difícil de comprender, pero debido a la implementación de equipos es posible aplicar distintos métodos y pasos que ayudan a llegar a un diagnóstico adecuado y a la aplicación de ciertos tratamientos que logran controlar una enfermedad. La defensa del organismo empieza con el desarrollo de procesos inflamatorios contra células o tejidos que pertenecen al organismo y frente a organismos no patógenos cuando se ha desarrollado una enfermedad autoinmune (Benenaula, 2010).

2.6. Técnica de ELISA

Guzmán (2004) afirma: La técnica de ELISA está estrechamente relacionada con las enzimas ya que las utiliza como marcador para cuantificar la formación de complejos antígeno-anticuerpo, se ha desarrollado diferentes métodos de aplicar el ELISA pero en todos se usa el marcador enzimático que se puede unir a un anticuerpo o a un antígeno, también en todos los métodos de ELISA en su procedimiento se lleva a cabo una separación que tiene el objetivo de eliminar el conjugado enzimático libre antes de que se determine la cantidad de conjugado enzimático enlazado, esto se logra por medio de una reacción catalítica entre el sustrato y la enzima.(p.48)

Se considera que este método de diagnóstico es muy eficaz y nos ayuda a obtener resultados certeros debido a que permite identificar diferentes tipos de virus y sus anticuerpos dando a conocer que muestras de un estudio son negativas y cuales son positivas (Gilchris, et al., 2005).

El método de ELISA es uno de los mejores para la identificación de anticuerpos y antígenos que nos permite analizar varios parámetros en un periodo corto de tiempo y una de sus ventajas más importantes es que esta técnica no es costosa (Siachoque, 2006).

Arce, Rosas y Rodríguez (2007) afirman: El ELISA ha llegado a ser la prueba más popular en los últimos años en el diagnóstico clínico y en la investigación debido a su gran sensibilidad y especificidad para medir antígenos o anticuerpos. Para poder estabilizar un ELISA se necesita primero un soporte sólido, generalmente placas de poliestireno de fondo plano. Segundo, se debe cuidar que el anticuerpo con la enzima (conjugado) proporcione seguridad, estabilidad y una señal sensitiva. Tercero, hay que determinar el amortiguador apropiado para pegar el antígeno o el anticuerpo a la placa de poliestireno, además de la solución de bloqueo de los sitios abiertos. (p. 155)

“Estas técnicas, emplean marcadores enzimáticos para la detección y amplificación de las reacciones antígeno - anticuerpo. Las técnicas de conjugación para marcar los antígenos y los anticuerpos con una enzima deben permitir mantener la actividad de la enzima y del anticuerpo o antígeno conjugado” (Anguita, 1996, p. 47).

2.6.1. Principales tipos de Elisa

2.6.1.1. ELISA tipo sándwich

Este método se utiliza para identificar y cuantificar un antígeno o un anticuerpo específico; para lo cual se utiliza una placa de poliestireno que consta de varios pocillos, los cuales están tapizados con un anticuerpo específico al cual se le conoce como anticuerpo de captura; luego se añade la solución de antígeno a analizar en cada uno de los pocillos y si el suero corresponde a un animal que estaba enfermo el anticuerpo de captura se unirá al antígeno presente en esta solución problema, de esta manera se va a producir la primera unión (Tizard, 2009).

Seguido de esto se realizan varios lavados y luego se adiciona un anticuerpo específico conocido como anticuerpo de detección que se unirá al antígeno; posteriormente se somete a todos los sueros a un proceso de incubación y se lavan de nuevo las placas para eliminar el anticuerpo sin unir, seguido de esto se coloca una antiglobulina que está marcada con una enzima y el sustrato que producirá un cambio de color en los sueros. Es importante que el anticuerpo de captura y el de detección sean de diferentes especies y que la antiglobulina específica de especie se usa para visualizar el anticuerpo de detección debido a que de esta manera se evitará resultados falsos positivos (Tizard, 2009).

Tizard (2009) afirma: “En este análisis, la intensidad de color de la reacción se relaciona directamente con la cantidad del antígeno unida. Debido a que estas pruebas implican la formación de capas anticuerpo-antígeno-anticuerpo se denominan ELISA tipo sándwich” (p. 514).

2.6.1.2. ELISA Competitivo

“El ELISA competitivo directo se diferencia del ELISA directo en que se añaden conjuntamente al pocillo el conjugado OTA-HRP y concentraciones conocidas de OTA libre, compitiendo ambas moléculas, ligada y libre, por unirse a los anticuerpos monoclonales inmovilizados en el pocillo. En consecuencia, la presencia de OTA en la muestra produce una inhibición de la respuesta, que será proporcional a la concentración de la micotoxina libre”. (Pavón, Blanco, Gonzales, 2007, p.257)

2.6.1.3. ELISA indirecto

Se incuba el Ag en un tampón apropiado en los pocillos de una placa de microtitulación y se absorbe en las paredes de los pocillos. La Ag libre se elimina por lavado. Los Abs no unidos se eliminan por lavado y el Ag absorbido en la placa reacciona con el Ab específico. El conjunto Ag-Ab es entonces detectado mediante el empleo de un segundo Ab marcado enzimáticamente

que reconoce dominios constantes de Abs y suele ser específico de especie, lo cual permite que un mismo Abs marcado sea capaz de detectar diferentes Ags. El conjugado se une al Ab problema y una vez lavado el conjugado no ligado, el ligando unido se visualiza por la adición de un cromógeno. La cantidad de enzima enlazada indica la cantidad de Abs en la muestra y puede ser medida por la degradación de su sustrato. (Suárez, 2017, p. 95)

2.6.2. Elisa Cualitativo

Es un método usado con el fin de identificar antígenos en un periodo de tiempo muy corto y de una manera fácil; se considera que esta técnica da resultados con bajo nivel de error siendo esta una de las razones por la cual es muy utilizada en pruebas bioquímicas y microbiológicas; otra razón que hace muy útil este método es que se pueden utilizar varios tipos de muestras como orina, sangre, suero o plasma. Esta técnica se considera como un diagnóstico presuntivo por lo cual cuando nos da un resultado positivo se recomienda confirmar el resultado aplicando un Elisa cualitativo (Rubio, García y Romero, 2016).

2.6.2.1. Principios de Elisa Cualitativo

2.6.2.1.1. Kit Anigen Rapid CDV Ag Test

BIONOTE (2017) afirma: “El kit Anigen Rapid CDV Ag Test es un inmunoensayo cromatográfico para la detección cualitativa del antígeno del virus de la infección canina en la conjuntiva, orina, suero o plasma”.

El kit Anigen Rapid CDV Ag Test tiene dos letras que son línea de prueba (T) y línea de control (C) en la superficie del dispositivo, estas dos líneas no se pueden observar en la ventana antes de aplicar la muestra a analizar. La línea de control tiene el objetivo de confirmar que la prueba se está realizando correctamente por lo tanto esta debe aparecer cada vez que se haya realizado la prueba, de lo contrario si no se tiñe de púrpura la prueba debe ser desechada porque

indica que alguno de los pasos del kit no fueron empleados correctamente, mostrándonos la importancia de leer el instructivo del fabricante antes de su uso (BIONOTE , 2017).

BIONOTE (2017) afirma: Si los antígenos CDV están presentes en la muestra, se podrá observar en la ventana de resultados que la línea de prueba (T) se va tiñendo de color púrpura. Los anticuerpos altamente selectivos contra CDV se utilizan como un detector de captura en el ensayo. Los anticuerpos son capaces de detectar el antígeno CDV en muestras caninas con una alta precisión.

2.6.2.2. Precauciones

BIONOTE (2017) afirma:

- El kit de prueba es solo para uso canino.
- El dispositivo de prueba es sensible a la humedad y al calor por lo que es indispensable realizar la prueba en el momento inmediato en el que se retira el dispositivo de prueba de la bolsa de aluminio.
- Aplique la muestra usando un gotero en forma vertical.
- No toque la membrana de la ventana del dispositivo de prueba.
- No se deberá usar la prueba después de la fecha de vencimiento marcada en la etiqueta del paquete, esto puede afectar los resultados dando falsos negativos.
- No mezcle componentes de diferentes números de lote porque los componentes de este kit han sido probados con control de calidad como unidad de lote estándar.
- Se deben aplicar todas las medidas de protección ya que las muestras deben manipularse como potencialmente infecciosas para lo cual es indispensable el uso de guantes protectores, mandil y mascarillas al manipular las muestras.
- Tomar en cuenta que debe haber una correcta desinfección de las manos después de haber manipulado las muestras analizadas por el kit.

- Descontaminar y desechar las muestras de los animales analizados, los kits usados y los materiales potencialmente contaminados de manera segura de acuerdo con las regulaciones nacionales y locales.

2.6.2.3. Almacenamiento y estabilidad

BIONOTE (2017) afirma:

- Guarde el kit de prueba a 2 o 30 grados centígrados, no congele.
- No guarde el kit de prueba bajo la luz solar directa.
- El kit de prueba es estable dentro de la fecha de vencimiento marcada en la etiqueta del paquete.

2.6.3. ELISA Cuantitativo

Crowther (como se citó en Benenaula, 2010) piensa que el ELISA Cuantitativo se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmunoadsorbente) la reacción antígeno anticuerpo quedará inmovilizado y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un substrato específico que al actuar sobre la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro.

2.6.3.1. Principios de Elisa Cuantitativo

2.6.3.1.1. INgezim Moquillo IgM 15.CDM.K.2

Se basa en la técnica del inmunoensayo enzimático de captura cuyo fundamento se detalla a continuación. En caso tanto de infección como primovacunación, existe una alta tasa de anticuerpos IgM frente al virus del Moquillo. Este tipo de anticuerpos son los detectados en nuestro ensayo. Las placas se suministran tapizadas con un anticuerpo monoclonal (Acm)

específico de IgM de perro. En cada pocillo se dispensan los sueros problema a valorar. Los anticuerpos IgM presentes en el suero serán capturados por el Acm de la placa. Tras lavar para eliminar el material no unido, se añade el antígeno (INGENASA, 2013, p. 3).

INGENASA (2013) afirma: El Viral recombinante quedará unido al pocillo solo si el suero contenía IgM específicas del virus del Moquillo. Tras sucesivos lavados para eliminar el material no adherido, podrá demostrarse la presencia de este antígeno mediante la adición de un Acm conjugado específico del virus del Moquillo marcado con peroxidasa. Tras la adición del sustrato adecuado, los pocillos en los que se han ensayado sueros con anticuerpos IgM específicos presentarán una reacción coloreada, proporcional al título o nivel de anticuerpos, mientras que en los pocillos donde se hayan ensayado sueros negativos, no aparecerá reacción coloreada (p. 3).

2.6.3.2. Precauciones

INGENASA (2013) afirma:

- Se debe leer y analizar atentamente las instrucciones proporcionadas en el folleto del kit de ELISA.
- Conservar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de su utilización siendo esto muy importante para evitar cualquier tipo de alteración en los resultados, afectando así al diagnóstico final.
- Es importante recordar que nunca se debe mezclar reactivos ni instrucciones de diferentes kits.
- Se debe respetar la fecha de elaboración y vencimiento de cada kit, por lo tanto, no se debe utilizar los kits luego de la fecha de caducidad y no pipetear los reactivos con la boca.
- Es indispensable utilizar una punta de pipeta nueva por cada muestra a testar.

- Incluir sistemáticamente un control positivo y uno negativo siempre que se utilice el kit.
- La solución de frenado es un ácido fuerte, por lo que debe ser manipulado con precaución. En caso de contacto con piel y ojos, lavar inmediatamente con agua abundante.
- El sustrato es muy sensible a la luz y las contaminaciones. Se recomienda sacar del bote únicamente el volumen que vaya a utilizarse y nunca devolver al bote la solución sobrante.

2.6.3.3. Conservación

“Todos los reactivos que se suministran en el kit, deben mantenerse en refrigeración entre + 2 °C y +8 °C hasta su utilización. El antígeno recombinante, una vez reconstituido debe almacenarse congelado a – 20 °C” (INGENASA, 2013, p. 3).

2.6.4. Parámetros de validación de los inmunoensayos enzimáticos.

Ochoa (2001) afirma: “La validación es el proceso establecido para la obtención de pruebas convenientemente documentadas y demostrativas de que un método es lo suficientemente fiable para producir el resultado previsto dentro de intervalos definidos” (p. 29).

Existen tres tipos de validaciones para interpretar pruebas de laboratorio, estas son:

- Validación retrospectiva: se usa cuando se tiene información que permite comprobar la calidad de una técnica y en métodos que no han sido validados (Ochoa, 2001).
- Validación prospectiva: es aquella que se aplica a nuevos métodos (Ochoa, 2001).
- Revalidación: “En ocasiones hay cambios significativos en las condiciones originales la técnica o cuando éste lleva largo tiempo utilizándose” (Ochoa, 2001, p. 29).

En los ensayos cuantitativos existen algunos parámetros estudiados, los cuales son:

- Selectividad
- Precisión
- Límite de detección
- Linealidad
- Rango o intervalo
- Exactitud
- Límite de cuantificación

En los ensayos cualitativos existen algunos parámetros estudiados, los cuales son:

- Sensibilidad
- Eficacia o coincidencia
- Valor predictivo positivo
- Valor predictivo negativo
- Especificidad

2.7. Prueba de Oro

Es una prueba estadística encargada de determinar los valores predictivos, la especificidad y sensibilidad de una prueba diagnóstica, con el objetivo de determinar si los individuos que forman parte de una investigación son enfermos o están sanos; los individuos que participan en esta prueba deben ser individuos enfermos, sanos o sospechosos de tener la enfermedad a analizar (Álvarez, 2007).

2.7.1. Valor predictivo positivo

“El valor predictivo positivo se define como la probabilidad que un individuo con un resultado positivo, tenga la enfermedad” (Salech, Mery, Larrondo y Rada, 2008).

2.7.2. Valor predictivo negativo

“El valor predictivo negativo corresponde a la probabilidad que un individuo con un resultado negativo, no tenga la enfermedad” (Salech et al., 2008).

2.8. Resumen del estado del arte del estudio del problema

En el artículo titulado Diagnóstico de moquillo canino con la prueba Dot-ELISA se mostró que la existencia del virus no corresponde únicamente a la sintomatología comúnmente asociada y se dio a conocer la seroprevalencia de moquillo canino, mediante el diagnóstico con la prueba serológica InmunoComb® IgM, demostrando que no todos los pacientes que presentan sintomatología asociada con el virus de distemper canino son positivos a la prueba. El kit diagnóstico InmunoComb® IgM contiene una tarjeta plástica dentada donde se adhieren los anticuerpos del virus del moquillo presentes en la sangre de pacientes positivos a la infección, el fabricante reporta una especificidad del 95,5% y una sensibilidad del 93,1% para la prueba (Linares, Correa, y Velásquez, 2010).

En la tesis titulada Estudio retrospectivo del distemper canino en animales llegados al Hospital Universitario de veterinaria (Ciudad de Santa Cruz de la Sierra, quinquenio 2002-2006), se planteó como objetivo evaluar retrospectivamente la situación epidemiológica del Distemper canino en el Hospital Universitario de Veterinaria (HUV). Este trabajo correspondió a un estudio epidemiológico observacional, de tipo longitudinal y bajo un modelo Caso-Control. Se demostró que existen varios factores que influyen en la presentación del moquillo dando a conocer que la edad influyó, siendo los de mayor riesgo los animales hasta los 3 años de vida, y los mayores a los 3 años de vida presentan menor riesgo de enfermarse. Los animales con una condición corporal buena tuvieron menos riesgo de contraer Distemper canino, en relación a los de condición corporal regular y mala. El sexo y la raza del animal no constituyeron factores predisponentes a esta enfermedad (Bravo y Escalante, 2006).

En el estudio que lleva el nombre de Distemper Canino: evaluación de dos alternativas terapéuticas y caracterización de aspectos clínico-epidemiológicos en la ciudad de Santa Fe, durante los años 1998 - 2009 , se realizó un relevamiento epidemiológico en caninos con diagnóstico de distemper confirmado por inmunofluorescencia directa, se ensayaron tres tipos de tratamientos: convencional o de sostén, de sostén más lipopolisacáridos bacterianos y de sostén más azatioprina y se determinó que no se observaron diferencias entre las proporciones de caninos con evolución favorable y desfavorable en los tres tratamientos realizados (Pinotti, 2011).

3. Materiales y métodos

3.1. Materiales

3.1.1. Físicos

Tabla 3. *Laboratorio*

Descripción	Unidad	Cantidad
Centrifugadora	Unidad	1
Refrigeradora	Unidad	1
Pipetas Pasteur	Unidad	1
Multipipeta	Unidad	1
Pipeta Automática	Unidad	3
Tubos de tapa roja 3 ml	Paquete (100 unidades)	1
Tubos Eppendorf	Paquete (100 unidades)	1
Ternómetros	Unidad	2
Tubos de ensayo de 5ml	Paquete (10 unidades)	1
Jeringuillas 3 ml	Caja (100 unidades)	1
Torniquete	Unidad	1
Mascarilla	Caja	1
Guantes	Caja	1
Mandil	Unidad	2
Gorros	Caja	1
Bozales	Unidad	1
Máquina Rasuradora	Unidad	1
Torundas de algodón	Unidad	100
Gradillas	Unidad	1
Agujas Vacutainer	Unidad	100
Lector de ELISA	Unidad	1
Lavador Automático	Unidad	1
Vortex	Unidad	1

Tabla 4. *Oficina*

Descripción	Unidad	Cantidad
Laptop	Unidad	1
Hojas de papel bond	Resma	1
Esferos	Unidad	2
Impresora	Unidad	1
Engrampadora	Unidad	1
Libreta de notas	Unidad	1
Tinta de impresión	Unidad	2

3.1.2. Químicos

Tabla 5. *Laboratorio*

Descripción	Unidad	Cantidad
Alcohol	Frasco	1
Agua Destilada	Frasco	1
Placa de Pocillos con Acm	Unidad	1
Kit Anigen Rapid CDV Ag	Caja (10 unidades)	6
Solución de lavado del Kit de ELISA INGEZIM MOQUILLO IGM	Frasco	1
Conjugado del Kit de ELISA INGEZIM MOQUILLO IGM	Frasco	1
Control del Kit de ELISA INGEZIM MOQUILLO IGM	Frasco	1
Antígeno del Kit de ELISA INGEZIM MOQUILLO IGM	Frasco	1

3.1.3. Biológicos

Tabla 6. *Animales*

Descripción	Cantidad
Caninos	78

3.2. Método

El tipo de metodología de esta investigación fue experimental, descriptivo y comparativo debido a que se tomó como referencia trabajos que ya se han realizado sobre este mismo tema para llegar a una conclusión y poder rechazar o aceptar las hipótesis planteadas.

3.2.1. Selección de animales

Para esta investigación se utilizó 78 caninos de los que se sospechaba que tenían moquillo de diferentes razas, tamaño, peso, sexo y edades comprendidas entre 8 semanas a 1 año, para lo cual primero se realizó una valoración de los pacientes para conocer cuáles son los síntomas que presentaban y se procedió a llenar una ficha clínica con la anamnesis respectiva.

3.2.2. Obtención de muestras sanguíneas

Se realizó el examen físico de los caninos con síntomas de moquillo, se procedió a preparar el instrumental para extraer la sangre para lo cual se colocó la aguja vacutainer en el capuchón y también en el tubo de tapa roja con vacío, posteriormente se sujetó al paciente con ayuda de un auxiliar, se rasuró una parte del miembro anterior, se colocó el torniquete para localizar con mayor facilidad la vena cefálica, se desinfectó el área con alcohol y se procedió a extraer 3 ml de sangre.

Se centrifugó la muestra a 3500 revoluciones por minuto durante un tiempo de 5 minutos, y una vez que ha pasado este tiempo procedemos a sacar el tubo con la muestra centrifugada y con la ayuda de una pipeta pasteur se extrajo el suero y colocamos 0.5 ml en un tubo eppendorf, y el sobrante en otro tubo eppendorf, se rotuló cada muestra del suero con la edad,

raza, numero de muestra y nombre del paciente este último se colocará en un collar con pilas hasta que sea colocado en el congelador a $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.3. Procedimiento para realizar el test rápido de detección de Moquillo canino

- Se retiró el dispositivo de prueba de la bolsa de aluminio y se colocó sobre una superficie plana y seca.
- Con la ayuda de la pipeta pasteur se absorbió 0.5 ml de suero y luego se agregó cuatro gotas de la muestra de suero que hemos obtenido en el orificio de muestra, teniendo en cuenta que al momento de colocar en el dispositivo debe realizarse gota a gota y siempre la pipeta debe permanecer en posición vertical.
- Después se activó el temporizador por 10 minutos y se observó.
- La muestra cruzará la ventana de resultados. Si no aparece después de 1 minuto, agregaremos una gota más de muestra mezclada al orificio de la muestra.
- Luego de haber transcurrido los 10 minutos, se interpretó los resultados de la prueba de la siguiente manera: si se observa que se tiñen las dos líneas la del control “C” y la de prueba “T” indica que hay la presencia del antígeno CDV por lo tanto el resultado es positivo. Si solo aparece la línea de control “C” en la ventana del dispositivo indica que no hay antígeno por lo tanto la interpretación es negativa. En el caso que no se observe ninguna de las dos líneas o solo la de la prueba “T” el resultado es invalido y la prueba se tiene que repetir.

3.2.4. Procedimiento para realizar el ELISA Cuantitativo

- Se sacaron los componentes del kit del refrigerador, excepto el conjugado y el antígeno, para equilibrar los componentes a temperatura ambiente.
- Se realizó en una hoja una tabla la cual simula la placa antigenada del kit, colocamos en la columna números del 1 al 11 y en las filas las letras desde la A hasta la H, dentro

de estas celdas, que simulan cada pocillo, desde el inicio ponemos los números de las muestras de cada paciente para saber cómo van a ser colocadas cada una en la placa.

- Se rotularon 78 tubos de eppendorf con el número de muestra de cada paciente, se colocó en una gradilla y se procedió a colocar 500 μ l de diluyente en cada tubo de eppendorf rotulado.
- Se sacó del cooler los sueros de cada paciente, se tomó cada uno de los sueros y se homogenizó con la ayuda de un vortex, luego con la pipeta se tomó 5 μ l de cada suero y se colocó en el tubo de eppendorf que contiene el diluyente, tomando en cuenta siempre el número de muestra, ya que esto es indispensable para obtener un correcto resultado.
- Se preparó la solución de lavado, la cual debe disolverse una parte de solución de lavado en 9 partes de agua destilada, por lo tanto, colocamos 55,55 ml de la solución de lavado en 500 ml de agua destilada y lo homogenizamos.
- Se saca la placa de la funda y se marcó con un esfero en que celda se va a colocar el control positivo, negativo y el blanco, en este caso colocamos los controles por duplicado.
- Con la ayuda de la pipeta se tomó 100 μ l del control positivo y se colocó en la celda A1, evitando que se creen burbujas, luego 100 μ l del mismo control y se colocó en la celda B1, luego se tomó el control negativo y se colocó 100 μ l en la celda C1 y 100 μ l en la D1, por último, en la celda E1 colocamos 100 μ l de blanco (no contiene nada).
- Se tomó la gradilla en donde se encuentran los sueros diluidos y se empezó con el proceso colocando 100 μ l de cada suero con la pipeta en cada pocillo correspondiente, es decir según la tabla que se realizó anteriormente, esto se hace con todas las 78 muestras del suero diluido, es importante homogenizar con el vortex cada muestra antes de colocar en los pocillos.

- Una vez colocadas todas las muestras en la placa, se cubrió con la cinta y se colocó en la incubadora por 15 minutos a 37 °C. Hasta esperar los 15 minutos se saca del refrigerador el antígeno y se reconstituye; para realizar esto ponemos 1,2 ml de agua destilada en el antígeno y homogenizamos.
- Después de esperar los 15 minutos, se eliminó el contenido de la placa volcándola bruscamente para evitar el intercambio de fluidos entre los pocillos.
- Se colocó mediante el lavador automático la solución de lavado antes preparada en los pocillos de la placa, una vez colocada en todos los pocillos agitamos ligeramente la placa y absorbemos con el lavador automático y repetimos este proceso por 3 veces.
- Se preparó el antígeno, para esto en un recipiente se colocó 1,10 ml del antígeno reconstituido y 10 ml del diluyente, y lo homogenizamos; posteriormente se añadió 100 µl del antígeno preparado en cada pocillo, se cubrió con la cinta y se incubó por 15 minutos a 37 °C. Hasta que se cumplan los 15 minutos se preparó el conjugado para lo cual se colocó en un recipiente 110 µl del conjugado en 11 µl de diluyente.
- Se procedió a realizar el lavado como se mencionó antes por 4 veces.
- Se agregó 100 µl de conjugado diluido en cada pocillo de la placa, se cubrió, y se incubó durante 15 minutos a 37 °C.
- Posteriormente se realizaron 4 lavados como antes se mencionó con ayuda del lavador automático.
- Se añadió 100 µl de sustrato en cada pocillo y se mantuvo la reacción durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Se agregó 100 µl de solución de frenado a cada pocillo, luego de colocar en las 78 muestras se esperó 5 minutos y por último se colocó la placa en la máquina de ELISA y se procedió a leer inmediatamente a 450 nm.

- Se validó el kit de la siguiente manera: Abs450nm control positivo > 0.8 y Abs450nm control negativo < 0.15
- Se procedió a comparar con los resultados obtenidos de los controles tanto positivo como negativos: $1.398 > 0.8$; $1.321 > 0.8$; $0,064 < 0.15$ y $0,064 < 0.15$
- Se procedió a interpretar los resultados con respecto al valor de los controles positivos, se determinará el siguiente punto de corte: Cut off = Abs control positivo $\times 0,2$. Para lo cual se sumó los dos controles positivos y se dividió para dos: $1,398 + 1.321/2$ dando como resultado 1.35 y este valor se multiplicó por 0,2. El valor obtenido fue 0,27. En base a este valor se interpretó considerando lo siguiente:
 - Muestras negativas: aquellas cuya Abs₄₅₀ sea $\leq 0,27$
 - Muestras positivas: aquellas cuya Abs₄₅₀ sea $> 0,27$

3.3. Diseño

Para realizar la estadística e interpretar los datos obtenidos con la experimentación se usó el programa Microsoft Excel 2013 para realizar una estadística inferencial representando los datos en tablas y mediante gráfico de barras y se usó el programa SPSS para obtener la media, moda, desviación estándar, rango, valor máximo y valor mínimo de los valores de anticuerpos obtenidos en el ELISA Cuantitativo.

3.3.1. Variables

Tabla 7. *Variables Independiente: Animales*

Concepto	Categorías	Indicadores	Índice
Caninos que presenten síntomas de moquillo	Caninos	Número de machos	Número
		Número de caninos hembras	Número

Tabla 8. *Variables Dependientes: Medición de Anticuerpos IgM mediante ELISA cuantitativo*

Concepto	Categorías	Indicadores	Índice
Medición de anticuerpos maternos IgM para descartar anticuerpos postvacunales	Muestra de sangre	Volúmen de sangre	ml
	Anticuerpos	Medición de anticuerpos IgM	Densidad óptica

3.4. Población y Muestra

El tamaño de la muestra fue de 78 caninos de la ciudad de Cuenca, se extrajo sangre de caninos entre machos y hembras de 8 semanas a 1 año de edad, que presentaron sintomatología de moquillo canino, a los cuales se les realizó en primer lugar el Test rápido y posterior a ello se llevó a cabo la medición de anticuerpos IgM mediante la Técnica ELISA Cuantitativa. Los caninos tomados para la investigación fueron pacientes que concurrían al Consultorio Veterinario “Medical pet”, a las Veterinarias de la Fundación Arca y al Centro Agropecuario “El Campo”.

3.5. Consideraciones éticas

Para realizar esta investigación se deben tomar en cuenta algunos aspectos como: mantener la asepsia en todos los procedimientos que se van a realizar y todos los materiales físicos que se van a ocupar deben estar estériles y en las condiciones óptimas y tener conocimiento sobre cómo realizar de la manera adecuada y menos dolorosa la extracción de sangre.

Cardozo y Mrad de Osorio (2008) afirma: “La investigación debe ser tal que sea para el bien de la sociedad y no innecesaria. Se debe evitar todo el daño y sufrimiento innecesario en los animales durante los experimentos. El investigador responsable debe ser capaz de decidir si se terminan o no los experimentos que provoquen algún sufrimiento a los animales” (p.46-71).

4. Resultados y discusión

4.1. Descripción general de la muestra de estudio.

Tabla 9. *Datos generales*

Porcentaje de resultados de 78 caninos											
ELISA Cuantitativo						ELISA Cualitativo					
Positivos (75)			Negativos (3)			Positivos (52)			Negativos (26)		
96,15 %			3,85%			66,67 %			33,33%		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	1,398	1,683	0,629	0,664	0,743	0,701	0,421	0,676	0,281	0,648	0,613
	Control +										
B	1,321	0,642	1,646	0,525	0,678	0,363	0,578	0,513	0,43	0,483	0,269
	Control +										
C	0,064	0,324	0,643	0,354	2,739	0,278	2,104	0,633	2,095	0,647	0,556
	Control -										
D	0,064	0,407	0,464	0,637	2,565	0,524	0,385	0,4	0,61	0,863	0
	Control -										
E	0,068	0,557	0,378	0,396	2,651	2,837	0,41	1,206	2,206	0,33	0
	Blanco										
F	2,817	1,2	0,593	0,388	0,422	1,609	0,242	1,005	0,373	1,604	0
G	0,433	0,306	0,594	0,665	0,598	0,594	0,618	0,598	0,407	0,514	0
H	0,571	2,335	1,336	0,557	0,637	0,246	2,454	0,689	0,502	0,389	0
	Media		,8			Desv. desviación		,7			
	Máximo		2,8			Mínimo		,2			
	Rango		2,6								

En la tabla 9 se puede observar que del número total de caninos muestreados (78) por medio de la técnica de ELISA Cuantitativo se obtuvo un total de 75 casos positivos representado el 96,15% del total de muestras y 3 casos negativos representando el 3,85%; mientras que con el ELISA Cualitativo 52 casos fueron positivos y 26 fueron negativos representando el 66,66% y el 33,33 % respectivamente. En la tabla 9 observamos que el 50 % los títulos de anticuerpos encontrados en el ELISA cuantitativo, son mayores o iguales de 0,6 unidades de absorbancia a 450 nm. Esto se corresponde con una media aritmética de 0,8 y un rango de 2,6 que va desde un valor mínimo de 0,2 a un máximo de 2,8. Por su parte, el coeficiente de variación, derivado de la desviación estándar (0,7) y la media aritmética (0,8), fue de 87,5 %, lo que sugiere una amplia variabilidad en las titulaciones obtenidas. Esta elevada variabilidad en el título de

anticuerpos ha sido reportada con anterioridad, donde la concentración de IgM puede ser 25 veces mayor que el punto mínimo de corte (Garde et al., 2013).

Tabla 10. *Comportamiento de las diferentes variables epidemiológicas en la muestra de estudio*

Variable	Categorías	n	%
<i>Sexo</i>	Macho	40	51,28
	Hembra	38	48,71
<i>Raza</i>	Mestizo	46	58,97
	French Poodle	16	16,66
	Beagle	4	5,12
	Shih Tzu	3	3,84
	Golden Retriever	2	2,56
	Pastor Alemán	2	2,56
	Otros*	5	6,41
<i>Edad (meses)</i>	2-3	33	42,30
	4-5	20	25,64
	6-7	11	14,10
	8-9	5	6,41
	10-11	5	6,41
	12	4	5,12
<i>Peso (kg)</i>	1-4,9	54	69,23
	5-8,9	20	25,64
	9-12	4	5,12
<i>Sintomatología</i>	Signos Sistémicos	50	64,10
	Signos Nerviosos	25	32,05
	Signos Oculares	3	3,84

Otros: *Dachshund (1), Rottweiler (1), Pekinés (1), Bull Terrier (1), Akita (1)*

En la tabla 10 se presentan las frecuencias de las características epidemiológicas y la sintomatología en el total ($n = 78$) de los cachorros estudiados. De esta tabla se aprecia que no existen diferencias notables respecto al número de caninos por sexo, no así por la raza, edad, peso y tipo de sintomatología mostrada.

Las no diferencias respecto al sexo son consistentes con planteamientos de trabajos anteriores en los que se reconoce que no existe suficiente evidencia como para asegurar una diferente susceptibilidad al moquillo respecto al sexo de los canes (Headley y Graca, 2000). Con este supuesto concuerdan también estudios más actuales realizados en Latinoamérica tales como en Chile (Garde et al., 2013), Perú (Soto et al., 2018), Brasil (Gomes da Costa et al., 2019), Colombia (Linares-Villalba et al., 2010). A ello se suman las investigaciones en otros países como en la India (Latha et al., 2007) y en Turquía (Gencay et al., 2004).

A pesar de lo anterior, también existen reportes regionales y de Ecuador en los que la frecuencia de presentación de sintomatología clínica difiere respecto al sexo. Así un trabajo realizado en Cuba observa el predominio de esta afección en cachorros machos (Torres González et al.; 2017). Por su parte en Ecuador una investigación en la que se revisaron todas las historias clínicas de 12 consultorios veterinarios de Guaranda, mostró no solo una prevalencia del 20 % de signología compatible con Distemper sino además una frecuencia mayor también en machos (Aldaz, 2017), con lo que concuerdan además los resultados de Barros Figueroa (2015) en el Cantón Naranjal de la provincia del Guayas. Contrariamente, la investigación de Zambrano (2014) en Manta aporta evidencias de que las hembras son las que con mayor frecuencia se presentan afectadas.

Tomando estos resultados previos en contexto, se podría concordar en que la mayoría de los estudios que relacionan el sexo de los canes con la frecuencia de infección por el virus del

moquillo, son de corte transversal y no probabilísticos, por lo que la muestra empleada puede no ser representativa de la población de estudio.

En cuanto a la raza, la mestiza fue la que con más frecuencia se presentó en la muestra con más del 50 % de los caninos afectados. A ésta le sigue en mucha menor proporción la French Poodle con un 16,66 %, mientras que las demás apenas estuvieron representadas con porcentajes inferiores al 10 % cada una.

De forma similar a lo observado en este estudio, la sintomatología entre los perros mestizos no vacunados parece ser muy frecuente en porcentajes que van desde el 40 % hasta cerca del 65% (Headley y Graca, 2000; Torres González et al., 2017; Linares- Villalba et al., 2010; Zambrano, 2014).

Otros estudios sugieren además que una de las razas en las que con mayor frecuencia puede presentarse el virus es en la French Poodle (Zambrano, 2014; Aldaz, 2017), tal y como se observa en la presente investigación. Si bien la preferencia racial del virus no se ha descrito muy bien, algunos estudios sugieren que los perros braquicéfalos son menos susceptibles a la encefalitis causada por Distemper (condición potencialmente mortal en los cachorros) que los dolicocefalos (Headley y Graca, 2000; Barros Figueroa, 2015), por ello no es de extrañar que el French Poodle se encuentre entre los más afectados en la muestra de estudio.

Por otro lado, se observa una tendencia a disminuir la presentación de sintomatología de Distemper a medida que la edad del cachorro es mayor. De los datos se deduce que aproximadamente dos de cada tres caninos (67,94 %) que muestran sintomatología compatible son menores de 6 meses de edad. Esto es concordante también con la observación de que los caninos más afectados poseen un peso menor, lo que podría deberse a su corta edad y desarrollo.

En la revisión sobre el tema que realizan Headley y Graca (2000) observan que los perros jóvenes son más susceptibles a padecer de moquillo canino, lo que podría explicarse, según Barengo et al. (2018) por una caída paulatina de los anticuerpos maternos entre los 3 a 6 meses de edad, lo que concuerda plenamente con lo observado en el presente estudio.

En cuanto a la sintomatología mostrada se debe notar que las manifestaciones sistémicas fueron las más frecuentes (64,1 %) seguidas por las nerviosas (32,05 %) y como menos frecuentes las oculares (3,84 %). Si bien los resultados del presente trabajo concuerdan con otros respecto a la elevada frecuencia con la que se presenta la sintomatología sistémica respiratoria y gastrointestinal con mayor prevalencia (Aldaz, 2017; Soto et al., 2018; Garde et al., 2013), no se debe olvidar que varias investigaciones sugieren lo contrario, dando mayor prevalencia a la sintomatología nerviosa (Zambrano, 2014).

Las diferencias anteriores se explican si se considera que los signos neurológicos podrían ser una manifestación más tardía de la enfermedad, con un pronóstico reservado a malo, el cual se presenta después de progresar por la sintomatología sistémica y ocular (Barengo et al., 2018). A pesar de esto, Raurrel et al., (2018) sostienen que los signos neurológicos pueden presentarse tempranamente entre la primera a tercera semana de la infección, así como meses después del cuadro clínico sistémico. Plantean además que puede presentarse aislado, sin necesidad de manifestaciones sistémicas, aunque esto ocurre fundamentalmente en los perros no vacunados y con edades menores a un año.

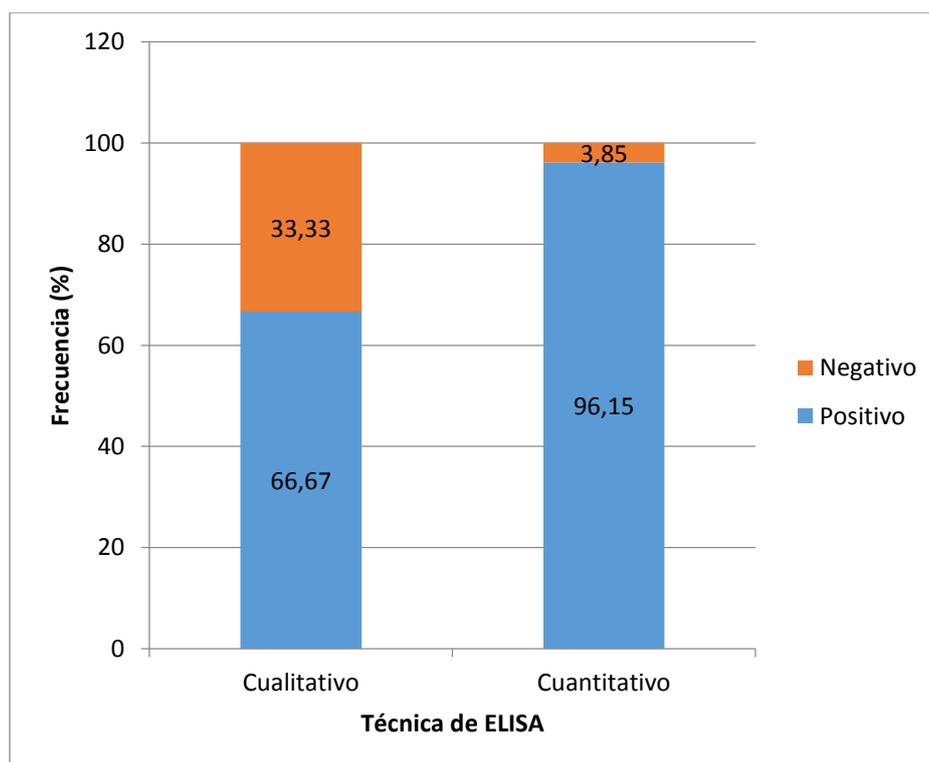
4.2. Resultados del ELISA cualitativo y cuantitativo.

Tabla 11. Resultados positivos y negativos según la técnica empleada.

Resultado	Cualitativo		Cuantitativo		Diferencia porcentual
	n	%	n	%	
Positivo	52	66,67	75	96,15	29,48
Negativo	26	33,33	3	3,85	
Total	78	100	78	100	

Nota: n, frecuencia absoluta de casos; %, frecuencia relativa de casos respecto al total; *, se refiere a la diferencia porcentual en la detección de casos positivos en ambas pruebas.

Figura 7. Frecuencia de casos positivos y negativos dependiendo de la técnica utilizada



De la Tabla 11 y Figura 7 se observa una diferencia considerable en la frecuencia de casos positivos propuestos por cada tipo de técnica, siendo aproximadamente un 29,5 % mayor en el ELISA cuantitativo, en el que resultaron 75 casos positivos de 78 casos posibles (96,15 %),

con solo tres casos negativos (3,85 %). En el ELISA cualitativo, el número de casos positivos resultaron menores con un total de 52 casos (66,67 %) y por ende los que dieron negativos fue mayor con 26 casos (33,33 %). Esto sugiere que no existe una buena concordancia entre el diagnóstico clínico-epidemiológico realizado por el especialista y los resultados de la prueba cualitativa, aspecto que concuerda con estudios previos al respecto (Linares-Villalba et al., 2010).

Las técnicas inmunocromatográficas como la presentada por BIONOTE (2017) en el kit *Anigen Rapid CDV Ag Test* empleado en la presente investigación ha mostrado ser útil en procesos de despistaje o *screening*, por su sencillez, rapidez y economía. En fuentes comerciales como Zetbio (n.d.) se le presenta con una sensibilidad y especificidad elevadas de 97,5 % y 99,2% respectivamente, mientras que otros autores indican que respecto al PCR puede tener una sensibilidad y especificidad del 100 % cuando se emplea en muestras de hisopado o raspado conjuntival (Barengo et al., 2018). A esto se suma el trabajo de Li et al. (2013) en el que este tipo de técnica puede ser más sensible al ELISA convencional para detectar el antígeno viral en muestras de linfocitos sanguíneos y en la conjuntiva palpebral. Contrariamente el trabajo de Latha et al. (2007) no pudo corroborar la calidad diagnóstica de este tipo de pruebas con sensibilidades y especificidades bastante bajas a las indicadas. Esto puede explicarse porque se trata de un test que puede ser susceptible a los cambios de temperatura, así como a la cantidad de antígenos virales obtenidos de la muestra a evaluar, por lo que debe tomarse la muestra en etapas tempranas de la enfermedad por el riesgo de falsos negativos (Garde et al., 2013; Barengo et al., 2018; Latha et al., 2007). En tal caso Raurrel et al. (2018) refieren que, al ser un virus neurotrópico, puede que no se detecte en tejidos como la conjuntiva y la piel en casos estrictamente neurológicos.

Por otro lado, la mayoría de los autores consultados refieren que la detección de altos títulos de anticuerpos IgM en suero contra antígenos del virus del moquillo canino, son compatibles

con estadios tempranos o fase aguda de la infección sugiriendo, con una alta sensibilidad, una infección o multiplicación viral en curso que puede detectarse hasta tres meses después de iniciado el proceso infeccioso (Barengo et al., 2018; Blixenkroner-Moller, 1991; von Messling et al., 1999; Garde et al., 2013). Por su parte, Linares-Villaba et al. (2010) indican que las pruebas para detectar IgM en sangre pueden tener una sensibilidad del 93,1 % y del 95,5 % respectivamente, mientras que otros observan que los títulos de IgM se correlacionan bien con ensayos de elevada sensibilidad como los inmunofluorescentes (Waner et al., 2003) y los test de neutralización viral (Gemma et al., 1995).

A pesar de lo anterior, la detección cuantitativa de IgM tiene como desventajas de que además de requerir un equipamiento especial, puede reportar falsos negativos en pacientes inmunosuprimidos en la fase aguda de la enfermedad (Raurrel et al., 2018). De forma contraria en estudios de seguimiento de caninos afectados por este virus de que la determinación cuantitativa de IgM puede aportar muchos falsos positivos, producto de una disminución del antígeno o carga viral mas no de este anticuerpo (Soma et al., 2003).

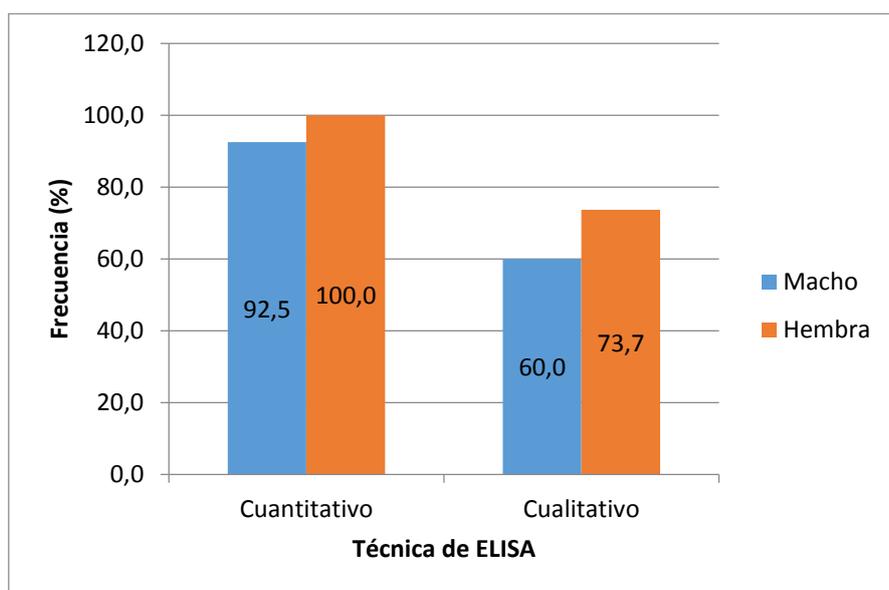
4.3. Resultados del tipo de ELISA según sexo.

Tabla 12. *Frecuencia de casos positivos y diferencia porcentual por sexo según la técnica empleada.*

<i>Sexo</i>	<i>ELISA Cuantitativo</i>			<i>ELISA Cualitativo</i>		<i>Diferencia porcentual</i>
	<i>N</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	
<i>Macho</i>	40	37	92,5	24	60,0	32,5
<i>Hembra</i>	38	38	100,0	28	73,7	26,3
<i>Diferencia porcentual*</i>			7,5		13,7	

Nota: *, se refiere a la diferencia de porcentajes por filas y columnas respectivamente; N, se refiere al total de machos y hembras; n, se refiere al total de casos positivos, machos y hembras en cada técnica.

Figura 8. Resultados positivos de las técnicas ELISA cuantitativa y cualitativa por sexo



La Tabla 12 y Figura 8 muestran una leve diferencia de casos positivos en cuanto al sexo, siendo predominantes las hembras. Esta diferencia se hace más notable en el caso de la técnica cualitativa, donde las hembras mostraron un 13,7 % más de casos positivos, respecto a la técnica cuantitativa donde solo fue de un 7,5 %.

Además, se observa que la técnica cuantitativa detecta más casos positivos en machos y hembras que la cualitativa. En este caso para los machos el ELISA cuantitativo detectó 37 casos de los 40 cachorros que se presentaron (92,5 %) respecto a los 24 de 40 (60,0 %) con la técnica cualitativa, lo que representa una diferencia porcentual de 32,5 % a favor de la primera. Para las hembras, el las 38 fueron positivas por la técnica cuantitativa (100 %) respecto a los 28 de la cualitativa (73,7 %), lo que representa un 26,3 % más de casos positivos nuevamente en favor del ELISA cuantitativo.

Como se mencionó anteriormente, las evidencias hasta el momento no sugieren una diferente susceptibilidad al virus del moquillo canino según el sexo (Headley y Graca, 2000; Garde et al., 2013; Soto et al., 2018; Gomes da Costa et al., 2019; Linares-Villalba et al., 2010; Latha et al., 2007; Gencay et al., 2004). Por ello se considera en el presente estudio que las

leves diferencias observadas en la prueba cualitativa podrían deberse a las limitaciones propias de la misma como se detalló en el apartado anterior.

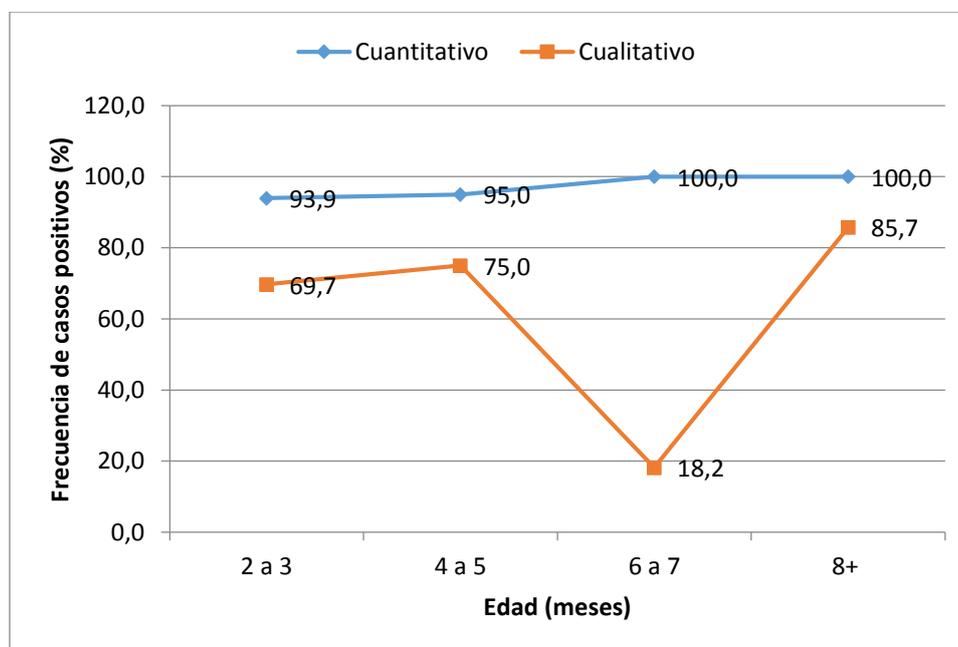
4.4. Resultados del tipo de ELISA según la edad.

Tabla 13. Frecuencias de casos positivos según la edad del cachorro y técnica empleada.

Edad (meses)	N	ELISA Cuantitativo		ELISA Cualitativo		Diferencia porcentual
		n	%	n	%	
2 a 3	33	31	93,9	23	69,7	24,2
4 a 5	20	19	95,0	15	75,0	20,0
6 a 7	11	11	100,0	2	18,2	81,8
8+	14	14	100,0	12	85,7	14,3
<i>Total</i>	78	75	96,2	52	66,7	29,5

Nota: N, se refiere al total por grupo de edad; n, se refiere al total de casos positivos, para cada edad según la técnica empleada, % se refiere al total de casos positivos respecto al total por edad.

Figura 9. Frecuencia de resultados positivos por edad y técnica de ELISA



En la Tabla 13 y Figura 9 se observa que la técnica cuantitativa tiene una tendencia a reportar más casos positivos a mayor edad, siendo el reporte de estos el 100 % a partir de 6 meses de

edad. Sin embargo, en la técnica cualitativa, este comportamiento es muy irregular, con un porcentaje muy bajo de resultados positivos precisamente en el intervalo de 6 a 7 meses. Para los cachorros de 2 a 5 meses de edad se observa una diferencia porcentual entre ambos procedimientos diagnósticos de 20 % o más de casos positivos a favor de la técnica cuantitativa, mientras que para los 8 o más meses esta diferencia fue menor (14,3 %). El dato más llamativo es la gran discrepancia porcentual observada para estos casos en el rango de edad de 6 a 7 meses que fue del 81,8% a favor del ELISA cuantitativo (11 casos vs. 2 casos respectivamente).

En el caso del test cuantitativo se podría explicar esta tendencia considerando la inmadurez del sistema inmune de los cachorros y por ende una respuesta inmune menos eficiente que conduce a menores títulos de anticuerpos (Headley y Graca, 2000; Barengo et al., 2018). Por otro lado, los resultados observados para el test cualitativo a los 6 a 7 meses podría estar relacionado con una disminución de la carga viral en las zonas de obtención de la muestra y por ende una disminución en la frecuencia de positivos por el test (Barengo et al., 2018).

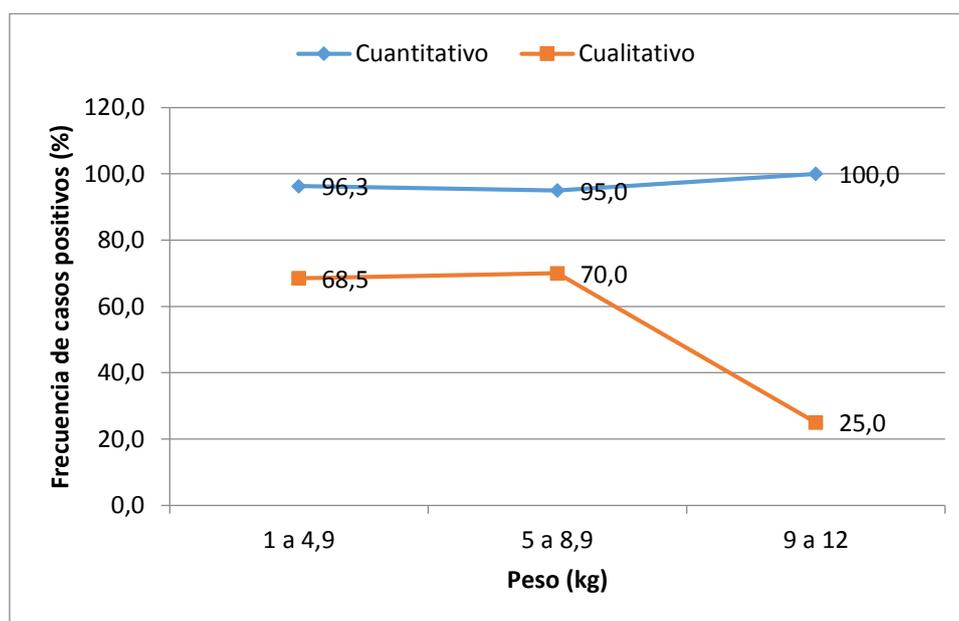
4.5. Resultados del tipo de ELISA por peso.

Tabla 14. *Frecuencias de casos positivos por cada tipo de ELISA y el peso del cachorro.*

<i>Peso (kg)</i>	<i>ELISA CUANTITATIVO</i>			<i>ELISA CUALITATIVO</i>		<i>Diferencia porcentual</i>
	<i>N</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	
1 a 4,9	54	52	96,3	37	68,5	27,8
5 a 8,9	20	19	95,0	14	70,0	25,0
9 a 12	4	4	100,0	1	25,0	75,0
Total	78	75	96,2	52	66,7	29,5

Nota: N, se refiere al total por grupo de peso; n, se refiere al total de casos positivos, para cada peso según la técnica empleada, % se refiere al total de casos positivos respecto al total por edad.

Figura 10. Frecuencia de casos positivos según la técnica por peso



Según los resultados de la Tabla 14 y Figura 10, la técnica cuantitativa muestra más casos positivos en cualquiera de los pesos de los cachorros que la cualitativa. Se observa así una diferencia porcentual de 25 % o más de casos positivos en el ELISA cuantitativo en los pesos de 1 a 8,9 kg, mientras que para 9 kg o más la diferencia porcentual es mucho mayor con 75 % (4 casos positivos de la técnica cuantitativa por 1 de la cualitativa). Además, mientras en la primera de las técnicas la tendencia es a proponer más casos positivos a mayor peso, en el caso de la detección cualitativa hay una disminución significativa para el peso de 9 a 12 kg. Como se mencionó en párrafos anteriores, el título de anticuerpos puede elevarse con la edad y concomitantemente con el peso del animal, dado el desarrollo inmunológico del mismo que garantiza una respuesta humoral más eficiente (Headley y Graca, 2000; Barengo et al., 2018). Por su parte la técnica cualitativa empleada depende de la carga viral, la misma que puede estar disminuyendo por la actividad del sistema inmune, así como por la edad y la virulencia de la cepa infectante (Barengo et al., 2018).

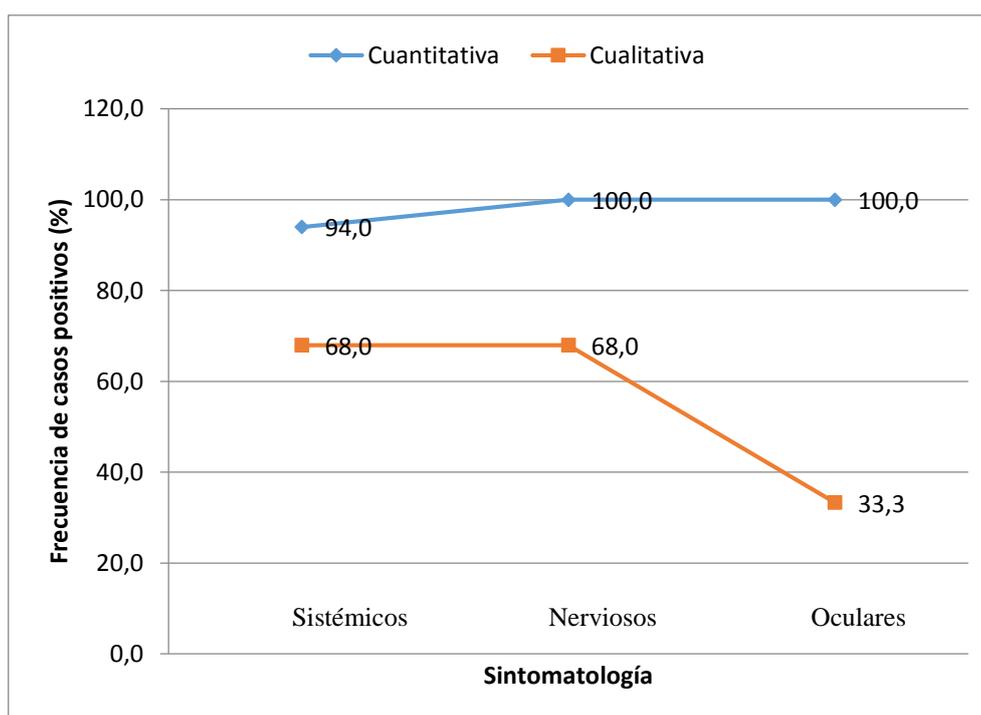
4.6. Resultados del tipo de ELISA por sintomatología presentada

Tabla 15. Frecuencia de casos positivos por tipo de ELISA y signos clínicos.

Signos clínicos	N	ELISA CUANTITATIVO		ELISA CUALITATIVO		Diferencia porcentual
		n	%	n	%	
Sistémicos	50	47	94,0	34	68,0	26,00
Nerviosos	25	25	100,0	17	68,0	32,00
Oculares	3	3	100,0	1	33,3	66,67
Total	78	75	96,2	52	66,7	29,49

Nota: N, se refiere al total por grupo de signos; n, se refiere al total de casos positivos, para cada signo según la técnica empleada, % se refiere al total de casos positivos respecto al total por signo clínico.

Figura 11. Frecuencia de presentación de casos positivos según la técnica empleada y la sintomatología clínica



En la Tabla 15 y Figura 11 se puede observar que, en cuanto a la frecuencia de casos positivos según la sintomatología, los resultados también muestran más casos positivos en el test cuantitativo para cualquiera de los signos manifiestos en los cachorros. De esta forma la diferencia porcentual de casos detectados por la técnica cuantitativa para los signos sistémicos

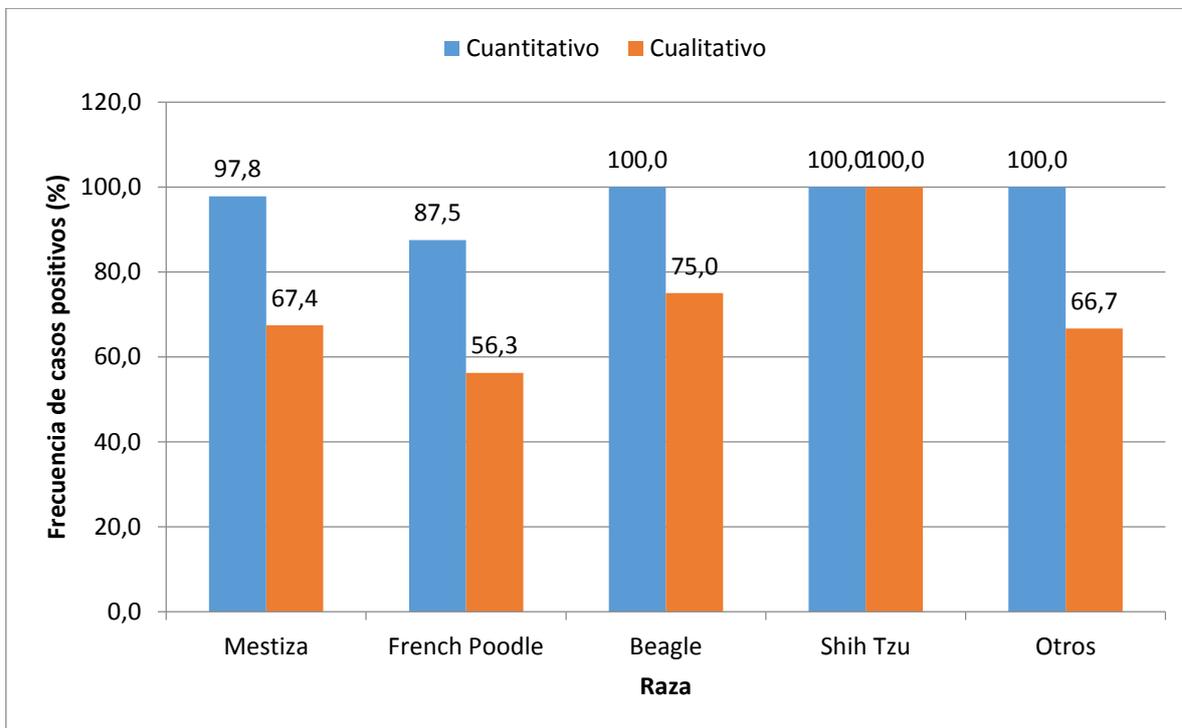
fue de 26 % (47 casos vs 34 casos respectivamente); en los signos nerviosos fue de 32 % (25 casos vs. 17 respectivamente) y en los signos oculares fue de 66,7 % (3 casos por ELISA cuantitativo vs. 1 caso por el cualitativo). Asimismo, mientras el test cuantitativo reporta positivos el 100 % de los casos con signos oculares y nerviosos, su contraparte cualitativa solo muestra el 68 % de positividad en los signos sistémicos y un 33 % en los oculares.

En estas diferencias se deben considerar los principios o fundamentos diagnósticos de los test empleados. En el caso del ELISA cualitativo depende de la carga viral en las zonas en las que se toma la muestra, mientras que el cuantitativo se detecta la respuesta de anticuerpos de fase aguda que aporta el hospedero.

En tal caso el trabajo realizado por Soma et al. (2003) en el que se hizo un seguimiento de varias semanas del título de IgM y antígeno viral en suero de perros no vacunados con sintomatología clínica del virus, mostró que, en una segunda determinación de estos marcadores, el antígeno viral se reduce considerablemente, mas no así el título de IgM el mismo que se mantenía elevado respecto al punto de corte.

4.7. Resultados del tipo de ELISA según la raza

Figura 12. Frecuencia de casos positivos según la técnica empleada y la raza



Para analizar los resultados según la raza, se unieron categorías de esta variable por lo escaso de la muestra. Los resultados muestran que en la raza Shih Tzu ambas técnicas proponen como positivos al 100 % de los cachorros con sintomatología acorde a la enfermedad, mientras que en la French Poodle, ambas técnicas proponen la menor frecuencia de positividad (87,5 % vs. 56,3 %, para la Cuantitativa y Cualitativa respectivamente). A excepción de la raza Shih Tzu, en todas las demás razas la técnica cuantitativa propone una frecuencia mayor de casos positivos: 25 % de diferencia porcentual de casos en la raza Beagle; aproximadamente 31 % más en las razas French Poodle y Mestiz y 33,3 % más en las otras razas (Figura 12).

Considerando las frecuencias generales de casos positivos dados por ambas pruebas, es comprensible que, en la mayoría de las razas, la frecuencia de éstos sea mayor en el ELISA cuantitativo. Llama la atención el caso de la raza French Poodle que para las técnicas cuantitativa y cualitativa posee el menor título de anticuerpos y antígenos virales

respectivamente. Considerando que esta raza es dolicocefala, se pueden explicar las observaciones realizadas si se tiene en cuenta que ésta posee una alta susceptibilidad a la encefalitis causada por el virus en cuestión (Arlington et al., 2000; Barros Figueroa, 2015), lo que puede aportar falsos positivos por ambas técnicas (Raurrel et al., 2018; Soma et al., 2003).

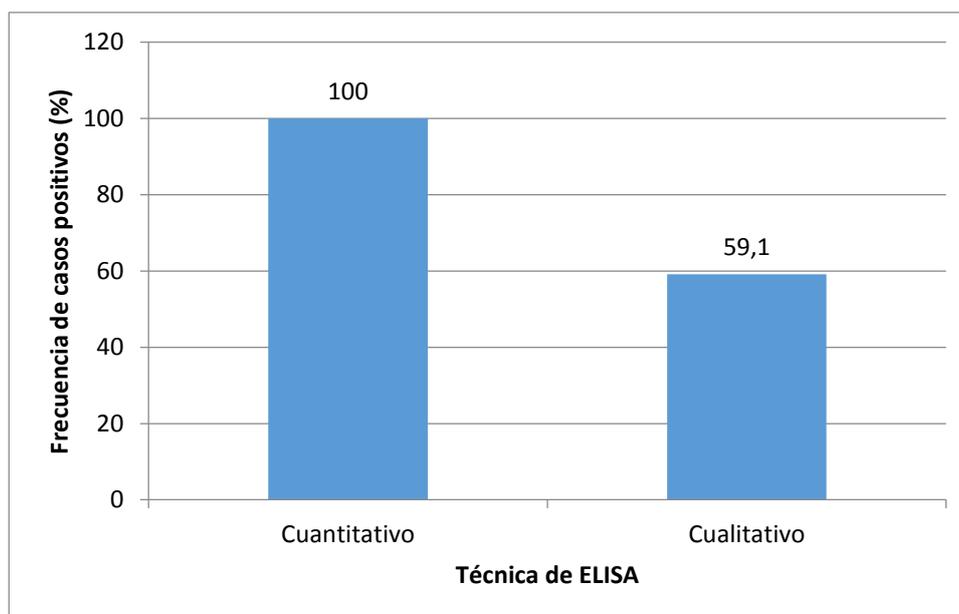
4.8. Resultados de los tipos de ELISA según casos con desenlace fatal.

Tabla 16. Casos positivos según la técnica de ELISA y desenlace fatal.

Resultado	Casos positivos		
	N	ELISA Cuantitativo	ELISA Cualitativo
Desenlace fatal (n)	22	22	13
%	28,2*	100,0**	59,1**
Diferencia porcentual	-	40,9	

Nota: N, número total de casos fatales; n, número de casos fatales que fueron positivos por cada técnica; *, se calculó respecto a la frecuencia de mortalidad total (22 muertes/78 casos son sintomatología); **, es el porcentaje de casos fatales dados positivos por cada técnica.

Figura 13. Frecuencia de casos positivos en la muestra de cachorros con desenlace fatal (n = 22)



En la Tabla 16 y Figura 13 se presentan las frecuencias de casos positivos según desenlace fatal de la enfermedad. En la Tabla 16 se puede observar que del total de casos estudiados ($n = 78$), 22 murieron con sintomatología clínica compatible con el virus del moquillo, lo que representa el 28,2 % del total de la muestra. La mortalidad por el virus del moquillo canino es muy variable y puede oscilar entre 4,73 % a 85 %. Esta elevada variabilidad puede deberse a la alta frecuencia de caninos con edades entre los 2 a 6 meses, así como de las diferencias en las susceptibilidades a la encefalitis de las razas evaluadas en cada estudio (Headley y Graca, 2000., 2000; Aldaz, 2017).

Por otro lado, al comparar los resultados positivos de ambas técnicas en la Tabla 16 y Figura 13, se hace más notoria la diferencia en su capacidad para detectar estos casos de desenlace fatal: la técnica cuantitativa propuso como positivos y por tanto de riesgo, el 100 % del total de fallecidos, mientras que la cualitativa solo el 59,1 %, lo que representa una diferencia porcentual del 40,9 %. Estos resultados sugieren que la técnica cuantitativa es más eficiente en detectar los cachorros que mueren con sintomatología clínica sugestiva del virus.

Lo anterior se puede observar mejor en la tabla 17, en la que se subdividen las pruebas para evaluar su capacidad discriminante respecto al desenlace fatal o no de los cachorros con signos compatibles de la enfermedad de interés. Para comparar las mismas además se calcularon los indicadores de pruebas diagnósticas como sensibilidad y especificidad, y los valores predictivos positivo y negativo. La sensibilidad se debe interpretar como la proporción de cachorros que mueren que son dados como positivos por la prueba diagnóstica. Por otro lado, la especificidad se refiere a la proporción de sanos que realmente son identificados por el test empleado. El valor predictivo de las pruebas diagnósticas empleadas por su parte se refiere a la proporción de cachorros que realmente mueren o sobreviven del total de positivos o negativos respectivamente (Díaz Arce, Beltrán Carreño y Cueva Sarmiento, 2018).

Tabla 17. Frecuencias de casos positivos y negativos según el tipo de ELISA y el desenlace final de los cachorros

ELISA	Resultado	Desenlace		Indicadores diagnósticos			
		<i>Murieron</i>	<i>No murieron</i>	<i>S</i>	<i>E</i>	<i>VPP</i>	<i>VPN</i>
Cuantitativo	<i>Positivo</i>	22	53	100,0	5,4	29,3	100,0
	<i>Negativo</i>	0	3				
Cualitativo	<i>Positivo</i>	13	39	59,1	30,4	25,0	65,4
	<i>Negativo</i>	9	17				

Nota: S: sensibilidad, E: especificidad, VPN: valor predictivo negativo, VPP: valor predictivo positivo.

Con lo anterior se puede observar claramente que la sensibilidad del ELISA cuantitativo es muy alta en comparación con el cualitativo. Esto se comporta al revés para la especificidad, que, aunque baja para ambas técnicas, la cualitativa resulta mejor que la cuantitativa. Por otra parte, los valores predictivos positivos en ambos casos son bajos y similares entre sí, no así el valor predictivo negativo, el que es mejor en el test cuantitativo. Estos resultados se interpretan como que el ELISA cuantitativo puede detectar al 100 % de los cachorros que pueden morir con sintomatología clínica compatible con Distemper, pero para ello propone un número elevado de falsos positivos o de cachorros que realmente no tienen un desenlace fatal, sino que mejoran con el tratamiento. Por su parte, un resultado negativo en el test cuantitativo predice según los datos un muy bajo riesgo de muerte en los caninos, no así con el test cualitativo, en el que uno de cada tres de los que se indican negativos, muere.

Si bien el estudio no estuvo diseñado para evaluar el desempeño de los test en la detección de Distemper, los análisis de los datos anteriores aportan evidencias de que el ELISA cuantitativo es mejor que el cualitativo para descartar los casos de bajo riesgo de muerte entre los caninos con sintomatología compatible a esta enfermedad. De igual modo, es compatible con casi el 100 % de los casos que posiblemente tienen esta patología según los signos

presentes, aunque también se podría estar aportando un número elevado de falsos positivos en ambos casos.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1. Conclusiones

- La técnica de ELISA cuantitativo propone un número mayor de casos positivos concordantes con la sintomatología clínica (96,15 %) que la técnica cualitativa (66,67 %).
- La técnica cuantitativa resultó positiva en el 92,5 % de los cachorros machos, respecto al 60 % de la técnica cualitativa, resultando en una diferencia porcentual de 32,5 %. En el caso de las hembras, el ELISA resultó positivo en el 100 % de los casos respecto al 73,7 % del ELISA cualitativo, con una diferencia porcentual de 26,3 %.
- El ELISA cuantitativo dio más casos positivos en todas las edades de los cachorros, con frecuencias que oscilan entre 93,9 % y 100 %, mientras que el ELISA cualitativo dio resultados positivos que oscilaron entre 18,2 % y 85,7 %, siendo el mínimo en la edad de 6 a 7 meses.
- La técnica cuantitativa también reportó más casos positivos en todos los pesos de los cachorros analizados, con porcentajes que oscilan entre 95 % y 100 %, mientras que la técnica cualitativa dio resultados entre el 25 % y el 70 %, con un mínimo en el peso de más de 9 kg.
- El ELISA cuantitativo detectó más casos positivos según los síntomas presentados, de modo que las frecuencias oscilaron entre 94 % (síntomas sistémicos) y 100 % (síntomas nerviosos y oculares). Por su parte el ELISA cualitativo resultó positivo en el 33,3 % de los que tenían sintomatología ocular, y 68 % en los que presentaron síntomas sistémicos y nerviosos.

- A excepción de los cachorros Shih Tzu donde ambas técnicas dieron positivas para el 100 % de sus integrantes, en las demás razas la técnica cuantitativa resultó en más casos positivos, con una diferencia porcentual que oscila entre el 25 % al 33,3 %.
- La mortalidad observada en los cachorros fue del 28,2 %, de los cuales el 100 % resultó positivo por la técnica cuantitativa respecto al 59,1 % de la técnica cualitativa, para una diferencia porcentual del 40,9 % a favor de la primera.
- La técnica cualitativa, si bien es menos costosa, rápida y fácil de aplicar, podría estar reportando muchos falsos negativos (bajo valor predictivo negativo de muerte de 65,4 %), mientras que la técnica cuantitativa por su parte, podría estarlo haciendo con los falsos positivos (bajo valor predictivo positivo de muerte de 29,3 %).
- La técnica cuantitativa es mejor para detectar los casos con alto riesgo de muerte, aunque para ello propone muchos casos positivos. De forma similar, de todos los que propuso como negativos, ninguno murió en el estudio.

5.2. Recomendaciones

- Para evaluar el verdadero poder discriminante de las técnicas cualitativa y cuantitativa, debe emplearse una metodología en la que se pueda contar con un test o prueba de oro con la cual contrastar los resultados obtenidos para esto podrían emplearse otras técnicas moleculares como pruebas de referencia imperfecta, tales como el PCR, que posea una elevada sensibilidad y especificidad.
- Para los estudios prospectivos que persigan predecir la mortalidad con la técnica cuantitativa, podrían emplearse curvas ROC (Característica Operativa del Receptor) para identificar puntos de corte más adecuados a la muestra de estudio ya que estas constituyen un procedimiento estadístico para determinar la exactitud diagnóstica de

distintos tests. Además, se debe elevar el número de muestras para reducir el error en las estimaciones realizadas.

- En base al trabajo experimental se recomienda que si se utiliza la técnica de ELISA Cualitativa como método para diagnosticar Distemper canino al momento de realizar la prueba se debe usar la muestra de suero directa no diluida como describe el fabricante ya que es probable que muestras con baja carga antigénica al ser diluidas no sean detectadas por el test dándonos así falsos negativos.
- Se recomienda realizar un estudio más amplio en diferentes clínicas veterinarias para evaluar el verdadero poder predictivo de ambas pruebas diagnósticas empleando sueros de pacientes caninos controles con sintomatología similar al Distemper. Esto permitiría además evaluar el verdadero poder discriminante de ambas pruebas.
- La prueba cuantitativa podría dar una mejor idea de la gravedad de la enfermedad y el posible desenlace fatal, ya que todos los cachorros que murieron en el estudio, resultaron positivos por esta prueba.

6. Referencias Bibliográficas

Agut, A., Clemente, F., Díaz, Sandra., Lloret, A., Luján, A., Noli, Chiara.,... Tabar, M. (2016).

Manual clínico de medicina interna en pequeños animales II. Sheffield, Inglaterra: 5m Publishing

Aldaz, N. G. (2017). *Estudio retrospectivo del distemper canino en la ZONA 5* (Tesis de

Grado). Facultad de Ciencias Agropecuarias, Recursos Naturales y del Ambiente.

Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Estatal de Bolívar.

Guaranda-Ecuador.

Alexander, W., y Good, R. (1948). *Principios de inmunología Clínica*. Recuperado de

https://books.google.com.ec/books?id=IseyZ9jq5LoC&printsec=frontcover&dq=inmunologia&hl=es419&sa=X&ved=0ahUKEwiUyPi4II_hAhXSs1kKHY4RB_IQ6AEIMjAC#v=onepage&q=inmunologia&f=false

Álvarez, R. (2007). *Estadística aplicada a la ciencia de la salud*. Recuperado de

<https://books.google.com.ec/books?id=V2ZosgPYI0kC&pg=PA121&dq=prueba+de+oro+estadistica&hl=es-&sa=X&ved=0ahUKEwiJifi77OLiAhXIuFkKHxIGDaMQ6AEIKDAA#v=onepage&q=prueba%20de%20oro%20estadistica&f=false>

Álvarez, J. (2001). *Bioquímica nutricional y metabólica del bovino en el trópico*. Recuperado de

<https://books.google.com.ec/books?id=Noc2neOIRhkC&pg=PA4&dq=toma+de+muestras+de+sangre+en+animales&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwi91o2o1IzhAhWlzVkkHXECCDQQ6AEILjAB#v=onepage&q=toma%20de%20muestras%20de%20sangre%20en%20animales&f=false>

- Anguita, G. (1996). *Detección de leche de vaca en mezclas lácteas y quesos maduros de oveja y cabra, utilizando anticuerpos monoclonales, policlonales y técnicas inmunoenzimáticas (ELISA)* (Tesis para optar al grado de Doctor en Veterinaria). Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España
- Arce, A. Y., Rosas, A. G., y Rodríguez, L. E. (2007). *Prácticas de inmunología general aplicada y veterinaria*. Recuperado de <https://bibliotecas.ups.edu.ec:2708/lib/bibliotecaupssp/reader.action?docID=3215777&query=inmunoglobulinas#>
- Barengo, F., Pérez, R. E., Nieto Farías, M.V. (2018). *Detección de antígeno del virus del Moquillo Canino en fase aguda* (Tesis de Grado). Facultad de Ciencias Veterinarias – UNCPBA. Tandil.
- Barr, S., y Bowman, D. (2007). *La consulta veterinaria en 5 minutos: enfermedades infecciosas y parasitología en caninos y felinos*. Buenos Aires, Argentina: Inter-Médica Editorial
- Barros Figueroa, A. V. (2015). *Determinación de la incidencia de distemper canino por el método de test rápido CDV en el cantón Naranjal* (Tesis de Grado). Universidad Católica de Santiago de Guayaquil. Facultad de Educación Técnica para el Desarrollo. Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Guayaquil-Ecuador.
- Benenaula, D. (2010). *Determinación de inmunoglobulina A en suero sanguíneo por los métodos de inmunodifusión radial y Elisa cuantitativo indirecto en niños de edad escolar* (Tesis de Pregadro). Universidad de Cuenca, Cuenca, Ecuador.
- BIONOTE. (2017). *Anigen Rapid CDV Ag Test Kit*.

- Blanco, M., Doménech, A., Orden, J., Domínguez, G., Miró, G., Cutuli, M.... y Simarro, I. (2013). *Inmunología y Enfermedades infecciosas del perro y gato*. Zaragoza, España: Grupo Asís Biomedia.
- Blixenkronne-Moller, M., Rode Pedersen, I., Appel, M.J., Griot, C. (1991). Detection of IgM antibodies against canine distemper virus in dog and mink sera employing enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J Vet Diagn Invest*, 3: 3-9.
- Bravo, L., y Escalante, C. (2006). *Estudio Retrospectivo del Distemper Canino en animales llegados al Hospital Universitario de Veterinaria (Ciudad de Santa Cruz de la Sierra, quinquenio 2002-2006)* (Tesis de grado presentada para obtener el título de Médico Veterinario Zootecnista). Universidad Autónoma Gabriel René Moreno, Santa Cruz, Bolivia.
- Brejov, G. (2016). *Manual de Semiología Veterinaria*. Recuperado de <http://www.fvet.uba.ar/fcvanterior/areas/semiologia/03082016/SEMIO-TOMO-1.pdf>
- Briones, S. (1990). *Manual de Medicina Veterinaria Homeopática*. Recuperado de https://books.google.com.ec/books?id=mowPPPcukqgC&pg=PA46&dq=Manual+de+Medicina+Veterinaria+Homeop%C3%A1tica&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiIyqj_58LeAhVIzIMKHaw6BCM6AEILDAB#v=onepage&q=Manual%20de%20Medicina%20Veterinaria%20Homeop%C3%A1tica&f=false
- Cardozo, F., y Mrad de Osorio, A. (2008). Ética en investigación con animales: Una actitud responsable y respetuosa del investigador con rigor y calidad científica. *Revista Latinoamericana de Bioética*, 8(2), 50-52. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/1270/127012550006.pdf>

- Cauerhff, A., Horacio, G., Fossati, C., y Goldbaum, F. (2007). *Respuesta inmune: Anticuerpos, alergias, vacunas y reproducción humana*. Recuperado de <https://bibliotecas.ups.edu.ec:2708/lib/bibliotecaupssp/reader.action?docID=3186448&query=inmunoglobulinas+maternas#>
- Céspedes, P., Cruz, P., y Navarro, C. (2010). Modulación de la respuesta inmune durante la infección por virus distemper canino: implicancias terapéuticas y en el desarrollo de vacunas. *Med Vet*, 42. (2), 15-28. Recuperado de https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0301732X2010000200003&script=sci_arttet
- Cordero, L., y Salas, J. (1999). *Enfermedades de los animales domésticos*. Recuperado de https://books.google.com.ec/books?id=C8jN5jYIZzUC&pg=PA186&dq=suero+de+sangre+animal&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwIj3c_v2YzhAhVGxVkkKHU4bCNsQ6AEIJzAA#v=onepage&q&f=false
- Díaz, J., Fernández, M. T., y Parede, F. (1997). *Aspectos Básicos de Bioquímica Clínica*. Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?id=Y1Qm0nRmAtsC&pg=PA52&dq=inmunoglobulinas&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjsle25y6reAhWOqlMKHYwaBmQQ6AEIKzAB#v=onepage&q=inmunoglobulinas&f=false>
- Díaz Arce, D., Beltrán Carreño, J. P., Cueva Sarmiento, J. E. (2019). ¿Son suficientes los indicadores del rendimiento de una prueba o test diagnóstico para evaluar su desempeño?. *Revista Cubana Med. Gen. Integr*, 34(3). Recuperad de: <http://www.revmgi.sld.cu/index.php/mgi/article/view/519/229>

- Fernández, N. (2012). *Manual Merck para la salud de las mascotas*. Badalona, España: Paidotribo
- Ferreya, E. (2013). Uso de la Azatioprina en el tratamiento del Distemper canino. *Revista electrónica de Veterinaria*, 14(1), 1-3. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/636/63625683008.pdf>
- Figueroa, M. (1984). *Enfermedades infecciosas de los animales domésticos en Centroamérica*. Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?id=rftdNOglDIC&pg=PA376&dq=moquillo+canino&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiNje7eufDdAhWvVt8KHZC5C58Q6AEIKTAB#v=onepage&q=moquillo%20canino&f=false>
- Forbes, B., Sahm, D y Weissfeld, A. (2009). *Diagnóstico Microbiológico*. Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?id=239cauKqSt0C&pg=PA160&dq=inmunoglobulina+M&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwje7--LgoXjAhUDvIkKHY-dCzQQ6AEIMTAC#v=onepage&q=inmunoglobulina%20M&f=false>
- Galarza, M. (2017). *Determinación de valores de referencia en hemograma y química sanguínea de caninos machos en condiciones de altitud* (Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Médica Veterinaria Zootecnista). Universidad Politécnica Salesiana, Cuenca, Ecuador.
- Gallegos, M. (2018). *Detección molecular del Gen M del virus Distemper Canino* (Memoria para optar al Título Profesional de Médico Veterinario Departamento de Medicina Preventiva Animal). Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Gallo, C. (2014). *Manual de Diagnóstico con énfasis en laboratorio clínico veterinario* (Trabajo de Graduación). Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua.

- Garde, E., Pérez, G., Acosta-Jamett, G., Bronsvort, B. M. (2013). Characteristics of a Canine Distemper Virus Outbreak in Dichato, Chile Following the February 2010 Earthquake. *Animals*, 3, 843-854. DOI:10.3390/ani3030843
- Gemma, T., Miyashita, N., Shin, Y. S., Okita, M., Mori, T., Iwatsuki, K., Mikami, T., Kai, C. (1995). Serological survey of canine distemper virus infection using Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Vet. Med.*, 57(4), 761-763.
- Gencay, A., Oncel, T., Karaoglu, T., Sancak, A. A., Demir, A. B., Ozkul, A. (2004). Antibody Prevalence to Canine Distemper Virus (CDV) in Stray Dogs in Turkey. *Revue Méd. Vét.*, 155(8-9), 432-434.
- Gilchris, L., Fuentes, C., Martínez, R., López, E., Duveiller, R., Singh, M...García, A. (2005). *Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada*. Recuperado de https://books.google.com.ec/books?id=Uyapftl6eHMC&pg=PA60&dq=TECNICA+D+E+ELISA&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiXxOW6zv_gAhVExVkkHfSFDiQQ6AEIJzAA#v=onepage&q=TECNICA%20DE%20ELISA&f=false
- Gómez, N., y Guida, N. (2010). *Enfermedades infecciosas de los canidos y felinos*. Recuperado de <http://www.intermedica.com.ar/enfermedades-infecciosas-de-los-caninos-y-felinos.html>
- Gómez, N., y Feijoó, S. (2012). *Clínica Médica de pequeños Animales*. Recuperado de <https://bibliotecas.ups.edu.ec:2708/lib/bibliotecaupssp/reader.action?docID=3202850&query=moquillo+canino+#>
- Gomes da Costa, V., Saivish, M. V., Rodrigues, R. L., Lima Silva, R. F., Moreli, M. L., Krüger, R. H. (2019). Molecular and serological surveys of canine distemper virus: A meta-

- analysis of cross-sectional studies. *PLOS ONE*, 14(5). doi: e0217594.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217594>
- Gonzales, Á. (2014). *Principios de bioquímica clínica y patología molecular*. Barcelona, España: Elsevier.
- Greene, C., y Appel, M. (2006). *Canine Distemper: Infectious Diseases of the dog and cat*. San Luis, Estados Unidos: ELSEVIER
- Gutiérrez, J. A. (2010). *Inmunología Veterinaria*. México, D. F. México: Manual Moderno
- Guzmán, E. (2004). Las pruebas de Elisa. *Gaceta Médica de México*, 140(3), 48. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2004/gms043o.pdf>
- Headley, S., y Graca, D. (2000). Distemper canino: hallazgo epidemiológico de 250 casos de caninos. *Vet. Res. Animal*, 37(2),136.
- INGENASA. (2013). *Ingezim Moquillo IgM*. Recuperado de <file:///C:/Users/David%20Ramos/Downloads/P15CDMK2%20INGEZIM%20MOQUILLO%20IgM.pdf>
- Latha, D., Srinivasan, S. R., Thirunavukkarasu, P. S., Gunaselan, L., Ramadass, P., Narayanan, R. B. (2007). Assessment of canine distemper virus infection in vaccinated and unvaccinated dogs. *Indian J. Biotechnol*, 6, 35-40. Recuperado de <https://pdfs.semanticscholar.org/6712/982f36d65940f480e1efebd7cba9736ec33d.pdf>
- Li, Z., Zhang, Y., Wang, H., Jin, J., Li, W. (2013). Sandwich-dot enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of canine distemper virus. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 77, 303–308.
- Linares-Villalba, S. E., Correa-Salgado, A. M., Velázquez-Garzón, L. H. (2010). Diagnóstico de moquillo canino con la prueba Dot-ELISA. *Vet. Zootec*, 4(2), 77-84.

- Lopez, J., y Modrego, A. (1944). *La Biotecnología y su aplicación industrial en España*. Recuperado de https://books.google.com.ec/books?id=uwo0_FYSy9YC&pg=PA147&dq=vacunas+para+animales&hl=es419&sa=X&ved=0ahUKEwj2leLrmpbhAhVtplkKHQPcD0cQ6AEITTAH#v=onepage&q=vacunas%20para%20animales&f=false
- Machicote, G. (2012). *Atlas de dermatología canina y felina*. Recuperado de <http://ebookcentral.proquest.com/lib/bibliotecaupssp/detail.action?docID=4909029>.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Abastecimiento. (2017). *Manual Veterinario de toma y envío de muestras*. Recuperado de <iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/.../01016970MT13-spa.pdf?...1..>
- Montoya, H. (2008). *Microbiología básica para el área de la salud y afines*. Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia.
- Municipalidad de Cuenca. (2018). *Conoce Cuenca*. Recuperado de <http://cuenca.com.ec/es/conoce-cuenca>
- Muñoz, P., Morgaz, J., y Galán. (2015). *Manual Clínico del perro y el gato*. Barcelona, España: ELSEVIER
- Núñez, L., y Bouda, J. (2007). *Patología Clínica Veterinaria*. Recuperado de <https://es.scribd.com/doc/114710430/LIBRO-PATOLOGIA-CLINICA-VETERINARIA-Nunez>
- Ochoa, R. (2001). *Sistemas ELISA en ensayos clínicos de vacunas y estudios seroepidemiológicos* (Tesis presentada en opción al grado de Doctor en Ciencias Médicas). Instituto Superior de Ciencias Médicas de la Habana, la Habana, Cuba.
- Parham, P. (2006). *Inmunología*. Madrid, España: Editorial Medica Panamericana. Recuperado de

https://books.google.com.ec/books?id=IX3Sqib_1ooC&pg=PA23&dq=inmunoglobulinas&hl=es419&sa=X&ved=0ahUKEwjsle25y6reAhWOqlMKHYwaBmQQ6AEIJAA#v=onepage&q=inmunoglobulinas&f=false

Pavón, M., Blanco, R., y Gonzáles, I. (2007). Detección de ocratoxina a en higos secos utilizando el anticuerpo map1 y una técnica de ELISA competitivo. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 1(2), 257. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/27593818_Deteccion_de_ocratoxina_A_e_n_higos_secos_utilizando_el_anticuerpo_MAP1_y_una_tecnica_de_ELISA_competitivo

Pinotti, M. A. (2011). *Distemper Canino: Evaluación de dos alternativas terapéuticas y caracterización de aspectos clínico-epidemiológicos en la Ciudad de Santa Fe, durante los años 1998 – 2009* (Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Veterinarias). Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

Pinotti, M., Gollan, A., Canavesio, M., Passegi, C., Larrateguy, M., Paz, M., y Formentini, E. (2016). Virus de Distemper Canino: detección molecular de diferentes aislamientos provenientes de perros de la provincia de santa fe, argentina, entre los años 2000 y 2010. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 18(2), 350-351. Recuperado de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1668-34982016000200007&lng=en&tlng=en#ref

Quinn, P., Markey, B., Carter, M., Donnelly, J., y Leonard. (2002). *Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias*. Zaragoza, España: Acribia

Radostits, O., Mayhew, J., y Houston, D. (2002). *Examen y Diagnóstico Clínico en Veterinaria*. Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?id=LbCb4qLs64EC&printsec=frontcover&dq=ana>

mnesis+veterinaria&hl=es419&sa=X&ved=0ahUKEwiS1v3gp4rhAhWLwFkKHXxz
CE8Q6AEIJzAA#v=onepage&q&f=false

Ramsey, I., y Tennant, B. (2012). *Manual de enfermedades infecciosas en pequeños animales*.
Barcelona, España: Ediciones S, Lexus.

Raurrel, X., Centellas, C., Feliz, G. (2018). Actualización en el diagnóstico del moquillo canino
neurológico. *ARGOS*, 32-34.

Rubio, F., García, B., y Romero, R. (2016). *Técnicas de Inmunodiagnóstico*. Recuperado de
<https://books.google.com.ec/books?id=WylDAAAQBAJ&pg=PA138&dq=inmunocromatograf%C3%ADa&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiA15bIsZbhAhXIs1kKHSOeC2EQ6AEIMTAC#v=onepage&q=inmunocromatograf%C3%ADa&f=false>

Ruiz de Gopegui, R. (2016). *Enfermedades infecciosas caninas*. Zaragoza, España: Grupo Asís
Biomedica.

Ruiz, S., Coy, P., Pellicer, M., y Ramírez, A. (1995). *Manual de prácticas de fisiología animal
veterinaria*. Recuperado de
<https://books.google.com.ec/books?id=KoXaJn3hly4C&pg=PA37&dq=hematologia+animal&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjvOr91YzhAhUS2FkKHdjBBYgQ6AEIKzAB#v=onepage&q=hematologia%20animal&f=false>

Salas, V. (2013). *Análisis filogenético del gen de la hemaglutinina del virus Distemper canino
en perros infectados naturalmente en Chile* (Memoria para optar al Título Profesional
de Médico Veterinario Departamento de Medicina Preventiva Animal). Universidad de
Chile, Santiago, Chile.

- Salech, F., Mery, V., Larrondo, F., y Rada, G. (2008). Estudios que evalúan un test diagnóstico: interpretando sus resultados. *Revista médica de Chile*, 136(9), 1208. Recuperado de https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S00349887200800090001
- Sarute, N., Pérez, R., Francia, L., Hernández, M., Bedó, G., Bonilla, B....Panzera, Y. (2011). Primer diagnóstico molecular y caracterización parcial del gen de la nucleoproteína del Virus Distemper Canino en Uruguay. *Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay*, 47 (182), 7. Recuperado de <https://bibliotecas.ups.edu.ec:2708/lib/bibliotecaupssp/reader.action?docID=3198134&query=distemper+canino+>
- Sato, H., Yoneda, M., Honda, T. y Kai, C. (2012). Morbillivirus Receptors and Tropism: Multiple Pathways for Infection. *Frontiers in Microbiology*, 3(75), 3. Recuperado de <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2012.00075/full>
- Siachoque, H. O. (2006). *Inmunología Diagnostico e interpretación de pruebas de laboratorio*. Recuperado de https://books.google.com.ec/books?id=KthmqoNj8VkC&pg=PA20&dq=TECNICA+DE+ELISA&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiXxOW6zv_gAhVExVkkHfSFDiQQ6AEILTAB#v=onepage&q=TECNICA%20DE%20ELISA&f=false
- Soma, S., Uemura, T., Nakamoto, Y., Ozawa, T., Bandai, T., Oji, T., Une, S. (2003). Canine distemper virus antibody test alone increases misdiagnosis of distemper encephalitis. *Vet Record*, 173(19), 101-104. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/vr.101866>
- Soto, A., Luna, L. R., Rosadio, R., Maturrano, L. (2018). Detección molecular del virus del distemper canino en casos clínicos de caninos domésticos no vacunados y evaluación

de factores de riesgo. *Rev Inv Vet Perú*, 29(3), 964-97. doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v29i3.14744>

Suárez, I. (2017). Metodología ELISA para estudiar la Estabilidad de Medicamentos Biotecnológicos (Tesis Doctoral. Universidad de Granada. Recuperado de <https://hera.ugr.es/tesisugr/26634533.pdf>

Tepán, M. (2017). *Determinación de valores de referencia en hemograma y química sanguínea en caninos hembras en condiciones de altitud* (Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Médica Veterinaria Zootecnista). Universidad Politécnica Salesiana, Cuenca, Ecuador.

Tizard, I. R. (2002). *Inmunología Veterinaria*. México D. F., México: McGraw-Hill Interamericana.

Torres González-Cháve, M., Peraza-González, B., Díaz-Rodríguez, S., Camacho-Socarrás, C., Vega-Rodríguez, N., Vega-Cañizares, E. (2017). Caracterización clínica del moquillo canino en dos municipios de La Habana. *Rev. Salud Animal*, 39(1), 43-50.

Von Messling, V., Harder, T.C., Moennig, V., Rautenberg, P., Nolte, I., Haas, L. (1999). Rapid and Sensitive Detection of Immunoglobulin M (IgM) and IgG Antibodies against Canine Distemper Virus by a New Recombinant Nucleocapsid Protein-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Clin. Microbiol*, 37(4), 1049–1056.

Waner, T., Mazar, S., Nachmias, E., Keren-Kornblatt, E., Harrus, S. (2003). Evaluation of a dot ELISA kit for measuring immunoglobulin M antibodies to canine parvovirus and distemper virus. *Vet Record*, 152, 588-591.

Wheeler, J. T. (2007). El Moquillo ¿tiene cura?. *Revista electrónica de Veterinaria*, 8(7), 4.

Recuperado

de

<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070707/070701.pdf?q=070701>

Zambrano, P. (2014). *Estudio Inmunocromatográfico y Citológico de Moquillo Canino en Perros de la Ciudad De Manta* (Tesis presentada como requisito para optar por el Grado Académico de MAGÍSTER EN SALUD CANINA). Universidad Técnica de Machala, Machala, Ecuador.

Zetbio, (n.d.). Canine Distemper Virus Antigen Test Kit (CDV Ag). Disponible en:

<http://www.zetbio.com>

7. Anexos

7.1. Datos de los pacientes

Número	Sexo	Raza	Edad	Resultado del ELISA Cualitativo	Resultado del ELISA Cuantitativo
# 1	Macho	Mestizo	10 meses	Negativo	Positivo
#2	Macho	Mestizo	2 meses	Negativo	Positivo
#3	Hembra	Mestizo	10 meses	Positivo	Positivo
#4	Macho	Mestizo	4 meses	Positivo	Positivo
#5	Macho	French	7 meses	Positivo	Positivo
#6	Hembra	Shih Tzu	12 meses	Positivo	Positivo
#7	Macho	Mestizo	6 meses	Negativo	Positivo
#8	Macho	Mestizo	2 meses	Positivo	Positivo
#9	Macho	Shih Tzu	10 meses	Positivo	Positivo
#10	Hembra	Mestizo	5 meses	Negativo	Negativo
#11	Hembra	Mestizo	4 meses	Positivo	Positivo
#12	Hembra	Mestizo	3 meses	Positivo	Positivo
#13	Hembra	Mestizo	8 meses	Positivo	Positivo
#14	Macho	French	11 meses	Positivo	Positivo
#15	Hembra	Mestizo	4 meses	Negativo	Positivo
#16	Hembra	Mestizo	4 meses	Positivo	Positivo
#17	Macho	French	2 meses	Negativo	Positivo
#18	Hembra	Beagle	11 meses	Positivo	Positivo
#19	Macho	French	12 meses	Positivo	Positivo
#20	Macho	Bull Terrier	8 meses	Positivo	Positivo
#21	Hembra	Mestizo	3 meses	Positivo	Positivo
#22	Macho	Dachshund	6 meses	Negativo	Positivo
#23	Hembra	Mestizo	5 meses	Positivo	Positivo
#24	Macho	French	12 meses	Negativo	Positivo
#25	Macho	Mestizo	3 meses	Positivo	Positivo

#26	Macho	Mestizo	2 meses	Positivo	Positivo
#27	Hembra	Mestizo	2 meses	Positivo	Positivo
#28	Hembra	Mestizo	2 meses	Positivo	Positivo
#29	Macho	Mestizo	2 meses	Positivo	Positivo
#30	Hembra	Mestizo	2 meses	Positivo	Positivo
#31	Hembra	Mestizo	2 meses	Positivo	Positivo
#32	Hembra	Mestizo	2 meses	Positivo	Positivo
#33	Hembra	Mestizo	2 meses	Negativo	Positivo
#34	Hembra	Mestizo	6 meses	Positivo	Positivo
#35	Macho	Mestizo	2 meses	Positivo	Positivo
#36	Hembra	Golden	5 meses	Positivo	Positivo
#37	Hembra	Mestizo	6 meses	Negativo	Positivo
#38	Hembra	French	3 meses	Positivo	Positivo
#39	Macho	Mestizo	4 meses	Positivo	Positivo
#40	Hembra	Mestizo	5 meses	Negativo	Positivo
#41	Hembra	Mestizo	6 meses	Negativo	Positivo
#42	Macho	Mestizo	4 meses	Positivo	Positivo
#43	Hembra	Mestizo	4 meses	Negativo	Negativo
#44	Macho	Mestizo	7 meses	Negativo	Positivo
#45	Macho	Pastor Aleman	2 meses	Positivo	Positivo
#46	Macho	Mestizo	2 meses	Positivo	Positivo
#47	Hembra	French	2 meses	Positivo	Positivo
#48	Hembra	French	3 meses	Negativo	Positivo
#49	Macho	French	2 meses	Negativo	Negativo
#50	Macho	Mestizo	4 meses	Positivo	Positivo
#51	Hembra	Golden	4 meses	Positivo	Positivo
#52	Macho	Mestizo	3 meses	Positivo	Positivo
#53	Macho	Beagle	12 meses	Positivo	Positivo
#54	Macho	French	3 meses	Positivo	Positivo

#55	Macho	Mestizo	2 meses	Negativo	Positivo
#56	Hembra	Mestizo	3 meses	Negativo	Positivo
#57	Macho	Mestizo	8 meses	Positivo	Positivo
#58	Hembra	Pekinés	8 meses	Positivo	Positivo
#59	Hembra	Mestizo	4 meses	Positivo	Positivo
#60	Macho	Mestizo	6 meses	Negativo	Positivo
#61	Macho	Akita	2 meses	Positivo	Positivo
#62	Hembra	Mestizo	4 meses	Positivo	Positivo
#63	Macho	French	5 meses	Positivo	Positivo
#64	Hembra	Mestizo	4 meses	Positivo	Positivo
#65	Macho	Pastor Alemán	4 meses	Negativo	Positivo
#66	Hembra	French	6 meses	Negativo	Positivo
#67	Macho	French	3 meses	Positivo	Positivo
#68	Hembra	French	3 meses	Positivo	Positivo
#69	Hembra	Mestizo	4 meses	Positivo	Positivo
#70	Hembra	Shih Tzu	2 meses	Positivo	Positivo
#71	Hembra	Mestizo	3 meses	Positivo	Positivo
#72	Macho	Rottweiler	3 meses	Negativo	Positivo
#73	Hembra	Mestizo	5 meses	Positivo	Positivo
#74	Macho	Beagle	6 meses	Negativo	Positivo
#75	Macho	Mestizo	7 meses	Negativo	Positivo
#76	Macho	Beagle	3 meses	Positivo	Positivo
#77	Macho	French	2 meses	Negativo	Negativo
#78	Macho	French	8 meses	Positivo	Positivo

7.2 Sintomatología y desenlace de los pacientes

Número	Sintomatología	Estado
#1	Fiebre, tos por las mañanas, secreción nasal mucopurulenta, secreción ocular, apatía, disminución del peso corporal e inapetencia.	Desenlace fatal
#2	Tos, secreción nasal, diarrea de mal olor, vómitos y depresión.	Desenlace aparentemente favorable
#3	Secreción nasal, diarrea verdosa, tos, decaimiento, dermatitis, alopecia, hiperqueratosis de la nariz.	Desenlace fatal
#4	Decaimiento, pústulas en la zona abdominal, vómitos, diarrea verdosa, convulsiones y deshidratación.	Desenlace fatal
#5	Secreción nasal verdosa, tos, fiebre, inapetencia y disminución del peso.	Desenlace aparentemente favorable
#6	Hiperqueratosis en las almohadillas plantares, espasmos, descoordinación y convulsiones.	Desenlace aparentemente favorable
#7	Melena, tos, secreciones oculares, disnea, fiebre, deshidratación.	Desenlace aparentemente favorable
#8	Letargo, falta de apetito, diarrea, secreciones nasales y oculares, tos, fiebre, hiperqueratosis de las almohadillas plantares y disminución de peso.	Desenlace aparentemente favorable
#9	Gastroenteritis, espasmos, convulsiones, fiebre, descarga nasal de color verde, descoordinación.	Desenlace aparentemente favorable
#10	Diarrea, vómitos, lagañas, caquexia, conjuntivitis, descarga nasal, inapetencia y fiebre.	Desenlace aparentemente favorable
#11	Fiebre, tos, secreción ocular, vómitos, diarrea, decaimiento, inapetencia y presenta ulcera corneal.	Desenlace fatal
#12	Hiperqueratosis de las almohadillas plantares, decaimiento, alopecia en las extremidades, descamación y convulsiones.	Desenlace fatal
#13	Letargo, hiperqueratosis de las almohadillas plantares, caquexia, vómitos, fiebre, deshidratación, gastroenteritis, melena, decaimiento, alopecia en las extremidades, pérdida de apetito.	Desenlace aparentemente favorable
#14	Letargo, vómitos, melena, heces fétidas, hiperqueratosis de las almohadillas plantares, inapetencia, alopecia, y deshidratación severa.	Desenlace aparentemente favorable

#15	Melenas, estornudos, vómitos, secreción nasal transparente.	Desenlace fatal
#16	Decaimiento, espasmos, convulsiones, dificultad en la coordinación de los movimientos de los miembros posteriores.	Desenlace aparentemente favorable
#17	Gastroenteritis, espasmos musculares, vómitos, decaimiento, inapetencia, disminución de peso y deshidratación.	Desenlace fatal
#18	Diarrea pastosa, fiebre, moquera, fiebre, deshidratación, caquexia, decaimiento, abrasiones en la piel de las almohadillas plantares y gastroenteritis.	Desenlace aparentemente favorable
#19	Ataxia, mioclonías, depresión, decaimiento, caquexia, disminución del apetito y convulsiones.	Desenlace aparentemente favorable
#20	Tos, fiebre, heces de color verdoso, disminución de peso y dolor abdominal.	Desenlace fatal
#21	Decaimiento, disnea, secreción nasal y ocular, vomito, fatiga, fiebre, deshidratación y dermatitis.	Desenlace aparentemente favorable
#22	Diarrea de color café oscuro, decaimiento, heces fétidas y melena.	Desenlace aparentemente favorable
#23	Convulsiones, decaimiento y apatía.	Desenlace aparentemente favorable
#24	Diarrea, fiebre, decaimiento, secreción nasal verdosa y secreción ocular.	Desenlace fatal
#25	Fiebre, decaimiento, deshidratación, vómito, diarrea, descoordinación y convulsiones.	Desenlace fatal
#26	Descarga nasal mucopurulenta, tos, decaimiento, vómito y fiebre.	Desenlace aparentemente favorable
#27	Descarga nasal mucopurulenta, tos, decaimiento, vómito y fiebre.	Desenlace fatal
#28	Descarga nasal mucopurulenta, tos, decaimiento, vómito y fiebre.	Desenlace aparentemente favorable
#29	Descarga nasal mucopurulenta, tos, decaimiento, vómito y fiebre.	Desenlace aparentemente favorable
#30	Descarga nasal mucopurulenta, tos, decaimiento, vómito y fiebre.	Desenlace aparentemente favorable
#31	Descarga nasal mucopurulenta, tos, decaimiento, vómito y fiebre.	Desenlace aparentemente favorable

#32	Descarga nasal mucopurulenta, tos, decaimiento, vómito y fiebre.	Desenlace aparentemente favorable
#33	Gastroenteritis, vómito, diarrea y tos.	Desenlace aparentemente favorable
#34	Convulsiones, espasmos y parálisis en las extremidades anteriores.	Desenlace aparentemente favorable
#35	Espasmos, convulsiones, decaimiento.	Desenlace aparentemente favorable
#36	Vómitos, caquexia, disminución del peso, tos, fiebre.	Desenlace aparentemente favorable
#37	Disminución del peso, decaimiento, inapetencia, secreción nasal verdosa y secreción ocular, melena.	Desenlace aparentemente favorable
#38	Úlcera córnea, diarrea, vómitos, espasmos, secreción nasal y secreción ocular y presenta tos.	Desenlace aparentemente favorable
#39	Mioclonías, apatía, anorexia, fiebre, convulsiones y disminución del peso corporal.	Desenlace aparentemente favorable
#40	Diarrea, costras en la nariz, secreción nasal y diarrea pastosa.	Desenlace fatal
#41	Secreción nasal y ocular, tos, gastroenteritis, lagañas, vómito, fiebre, caquexia y decaimiento.	Desenlace aparentemente favorable
#42	Hiperqueratosis en las almohadillas plantares, secreciones oculares verdosas, fiebre, disminución de peso y decaimiento.	Desenlace fatal
#43	Tos, bronquitis, inapetencia, fiebre, mal olor, anorexia y secreción nasales y oculares de color verde claro.	Desenlace aparentemente favorable
#44	Vómitos, diarrea, secreción nasal verdosa, fiebre y presenta tos.	Desenlace aparentemente favorable
#45	Caquexia, secreciones nasales y oculares, hipertermia, diarrea y ganglios inflamados.	Desenlace aparentemente favorable
#46	Secreción nasal serosa y ocular mucopurulenta, alopecia, decaimiento, convulsiones, espasmos musculares y gastroenteritis.	Desenlace aparentemente favorable
#47	Mioclonías, ataxia, hiperqueratosis en la nariz, decaimiento, disminución de peso, esta agresivo y ha presentado convulsiones.	Desenlace aparentemente favorable

#48	Diarrea, dermatitis, disnea, secreción ocular serosa, secreción nasal mucopurulenta, estornudos, letargo, inapetencia.	Desenlace aparentemente favorable
#49	Depresión, decaimiento, vómitos, apatía, secreción nasal verdosa y secreción ocular mucopurulenta y viscosa y respiración abdominal.	Desenlace aparentemente favorable
#50	Gastroenteritis, deshidratación, vómitos, espasmos musculares, tos y diarrea fétida.	Desenlace fatal
#51	Tos, fiebre intermitente, melena, vómitos, deshidratación, dolor abdominal y tics nerviosos.	Desenlace aparentemente favorable
#52	Heces fétidas, deshidratación, disminución de peso y depresión, vómitos y depresión.	Desenlace aparentemente favorable
#53	Secreción nasal y ocular verdosa, decaimiento, vómitos, tos, disnea, diarrea, e hinchazón de los párpados.	Desenlace aparentemente favorable
#54	Decaimiento, inapetencia, letargo, vómitos, disminución de peso, hiperqueratosis en las almohadillas plantares y secreciones nasales y oculares mucopurulentas.	Desenlace aparentemente favorable
#55	Apatía, secreción ocular mucopurulenta y diarrea fétida.	Desenlace aparentemente favorable
#56	Diarrea, vómitos, fiebre, tos, secreción ocular mucopurulenta y gastroenteritis.	Desenlace fatal
#57	Diarrea fétida, hiperqueratosis plantar, alopecia en las extremidades posteriores y convulsiones.	Desenlace aparentemente favorable
#58	Diarrea, vómito, secreción nasal serosa, secreción ocular verdosa, fiebre, deshidratación, tos, letargo.	Desenlace fatal
#59	Convulsiones, decaimiento, anorexia, caquexia, ataxia, espasmos musculares, vómito y camina en círculos.	Desenlace aparentemente favorable
#60	Apatía, inapetencia, secreción ocular mucopurulenta, dolor, ganglios inflamados, fiebre.	Desenlace aparentemente favorable
#61	Vómito, diarrea, convulsiones, camina en círculos y anorexia.	Desenlace aparentemente favorable
#62	Secreción nasal mucopurulenta, fiebre, letargo, decaimiento, convulsiones y apatía.	Desenlace aparentemente favorable

#63	Vómito, ganglios inflamados, apatía, anorexia, caquexia.	Desenlace fatal
#64	Tos, disnea, secreciones nasales verdosas, gastroenteritis, convulsiones.	Desenlace aparentemente favorable
#65	Fiebre, vómito, diarrea pastosa, inapetencia y secreción nasal transparente.	Desenlace aparentemente favorable
#66	Vómito, diarrea verdosa, alopecia abdominal.	Desenlace aparentemente favorable
#67	Melena, decaimiento, tos, secreción nasal viscosa, secreción ocular verdosa y caquexia.	Desenlace aparentemente favorable
#68	Ganglios inflamados, alopecia abdominal y letargia.	Desenlace aparentemente favorable
#69	Secreción ocular, ganglios inflamados, decaimiento, inapetencia.	Desenlace fatal
#70	Diarrea, convulsiones, apatía, disnea, parálisis de las extremidades posteriores.	Desenlace aparentemente favorable
#71	Secreción nasal y secreción ocular, vomito, decaimiento, diarrea y espasmos musculares.	Desenlace fatal
#72	Debilidad, secreción nasal, secreción ocular serosa, vómitos, caquexia, diarrea.	Desenlace aparentemente favorable
#73	Fiebre, inapetencia, disnea, secreción nasal mucopurulenta, secreción nasal verdosa, espasmos musculares.	Desenlace fatal
#74	Secreción nasal y ocular, dermatitis abdominal, caquexia y deshidratación.	Desenlace fatal
#75	Fiebre, secreción ocular vómitos, inapetencia y apatía.	Desenlace aparentemente favorable
#76	Secreción nasal ocular, letargo, disnea, tos y diarrea.	Desenlace aparentemente favorable
#77	Tos, fiebre, apatía, vómito y diarrea.	Desenlace aparentemente favorable
#78	Secreción nasal, apatía, anorexia, letargo, deshidratación e hipertermia.	Desenlace aparentemente favorable

7.3. Fotografías del trabajo experimental

7.3.1. Fotografías del ELISA Cualitativa



Foto 1. Toma de Frecuencia Cardíaca



Foto 2. Pesaje del paciente



Foto 3. Toma de Temperatura



Foto 4. Examen Físico



Foto 5. Depilación de la zona de venopunción



Foto 6. Desinfección de la zona de venopunción



Foto 7. Toma de Muestra

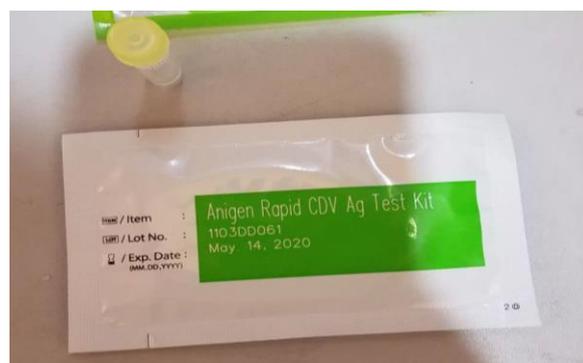


Foto 8. Kit CDV Ag Test



Foto 9. Colocación de las muestras de sangre en la Centrifuga



Foto 10. Obtención del Suero sanguíneo



Foto 11. Realización de Test Rápido de Moquillo



Foto 12. Lectura de Resultados



Foto 14. Recolección del suero



Foto 13. Rotulación de muestras



Foto 15. Colocación del suero en el congelador a - 4 °C

7.3.2. Fotografías del ELISA Cuantitativo



Foto 16. Transporte de Muestras al Laboratorio



Foto 17. Realización de la tabla simuladora de la placa antigenada



Foto 18. Homogenización de las muestras



Foto 19. Colocación del suero en el diluyente



Foto 20. Preparación de la solución de lavado



Foto 21. Colocación del Suero diluido en la placa



Foto 22. Lavados de la placa antigenada



Foto 23. Incubación de la placa (15 min)



Foto 24. Colocación del antígeno

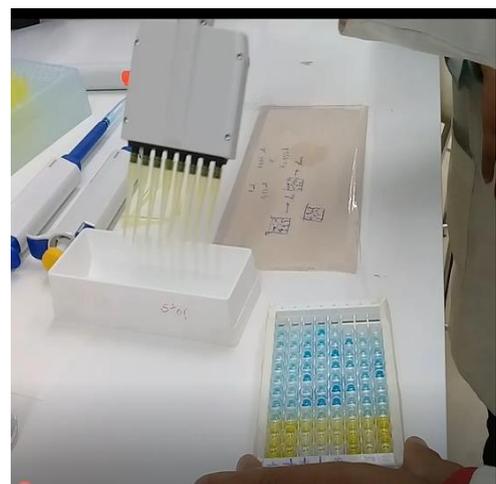
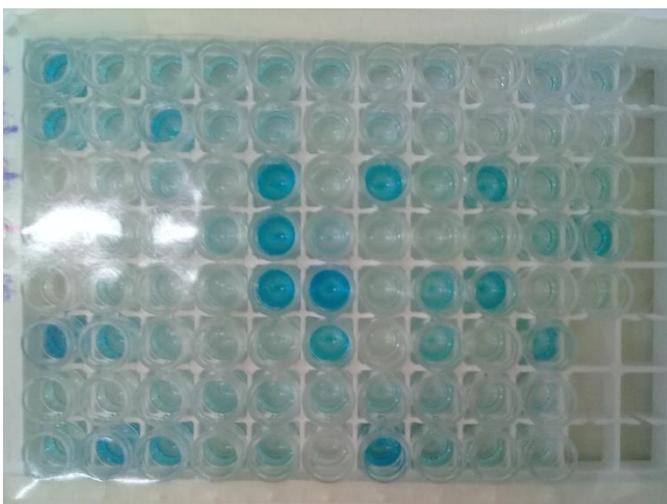


Foto 25. Colocación del sustrato y solución de frenado



Foto 26. Lectura a 450 nm