



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE GUAYAQUIL**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**IMPLEMENTACIÓN DEL PROTOCOLO DE PCR EN TIEMPO REAL PARA
EL DIAGNÓSTICO DEL VIRUS DEL MOQUILLO CANINO**

*Trabajo de titulación previo a la obtención
del título de Ingeniera en Biotecnología*

AUTOR:

MARÍA MERCEDES ELIZALDE BURGOS

TUTOR:

MSc. ROSA MARCELA VEGA VILLACIS

GUAYAQUIL - ECUADOR

2025

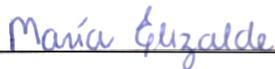
**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN**

Yo, María Mercedes Elizalde Burgos con documento de identificación N° 0929549087 manifiesto que:

Soy la autora y responsable del presente trabajo; y, autorizo a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Guayaquil, 03 de febrero del año 2025

Atentamente,



María Mercedes Elizalde Burgos

CI: 0929549087

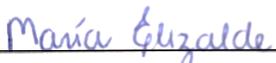
**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Yo, María Mercedes Elizalde Burgos con documento de identificación N° 0929549087, expreso mi voluntad y por medio del presente documento cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy la autora del trabajo experimental: **IMPLEMENTACIÓN DEL PROTOCOLO DE PCR EN TIEMPO REAL PARA EL DIAGNÓSTICO DEL VIRUS DEL MOQUILLO CANINO**, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: *Ingeniera en Biotecnología*, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribo este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 03 de febrero del año 2025

Atentamente,



María Mercedes Elizalde Burgos

CI: 0929549087

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, **Rosa Marcela Vega Villacís** con documento de identificación N°0603452566, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **IMPLEMENTACIÓN DEL PROTOCOLO DE PCR EN TIEMPO REAL PARA EL DIAGNÓSTICO DEL VIRUS DEL MOQUILLO CANINO**, realizado por **María Mercedes Elizalde Burgos** con documento de identificación N° 0929549087, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo Experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 03 de febrero del año 2025

Atentamente,



Rosa Marcela Vega Villacís

CI: 0603452566

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, **Alberto Orlando Narváez** con documento de identificación N°1308496007, investigador auxiliar 1 del Instituto Nacional de Salud Pública – INSPI Dr. Leopoldo Izquieta Pérez, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **IMPLEMENTACIÓN DEL PROTOCOLO DE PCR EN TIEMPO REAL PARA EL DIAGNÓSTICO DEL VIRUS DEL MOQUILLO CANINO**, realizado por **María Mercedes Elizalde Burgos** con documento de identificación N° 0929549087, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo Experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 03 de febrero del año 2025

Atentamente,



Dr. Solón Alberto Orlando Narváez

CI: 1308496007

Dedicatoria

A mis padres, Consuelo y Pedro, quienes, con su amor y esfuerzo, me han enseñado que siempre habrá obstáculos en la vida, pero hay que vencerlos para alcanzar nuestros sueños. Desde mis primeros pasos hasta este gran logro, siempre estuvieron junto a mí, brindándome su apoyo, sus palabras de aliento. Cada sacrificio que hicieron por mi educación y bienestar ha sido la fuerza que me impulsó a no rendirme. Esta tesis es, por y para ellos, el fruto de todo lo que me han dado y han hecho por mí y por ello, les dedico cada página con todo mi amor y gratitud.

A mi hermano, Carlos, mi compañero de vida. Gracias por estar siempre presente, por comprenderme en los días de estrés y cansancio, y por recordarme que los grandes logros requieren tiempo, paciencia y esfuerzo. Tus palabras de ánimo y tu fe en mí me motivaron a seguir adelante, incluso cuando el camino parecía más difícil. Esta meta alcanzada es también tuya, porque estuviste conmigo en cada paso.

A ustedes, mi familia, les dedico este trabajo con todo mi corazón. Porque sin su amor, apoyo y confianza, este sueño no habría sido posible.

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Politécnica Salesiana por darme las herramientas para mi desarrollo profesional. Gracias a los docentes por el conocimiento impartido en estos años.

De la misma manera, agradezco al Instituto Nacional de Salud Pública – INSPI por darme la oportunidad de realizar mi trabajo de titulación en sus instalaciones, facilitándome los recursos necesarios para el mismo. En especial, agradezco a la Ing. Naomi Mora y al Dr. Alberto Orlando, por su disposición, guía y apoyo en este proceso.

A mi tutora Rosa Vega, por su orientación y compromiso en cada etapa de este trabajo, ayudándome a perfeccionar lo realizado.

A mi familia, por su apoyo incondicional, paciencia y motivación, siendo siempre mi mayor fuente de inspiración.

Resumen

El virus del moquillo canino representa una de las enfermedades virales más graves que afecta a los caninos domésticos y otras especies carnívoras, con altos índices de morbilidad y mortalidad. La implementación de un protocolo de diagnóstico molecular mediante PCR en tiempo real (qPCR) constituye una herramienta esencial para la detección precisa y rápida de este patógeno, permitiendo fortalecer las estrategias de control y prevención de la enfermedad.

La investigación se centra en la adaptación de un protocolo publicado para la detección del virus del moquillo canino (CDV) por PCR en tiempo real (qPCR). Primeramente, se eligieron cebadores específicos, asegurando su compatibilidad con el protocolo adaptado. Posterior a eso se trabajó con muestras biológicas, a las que se le extrajo ARN viral para la síntesis de ADNc. Se demostró que la qPCR tiene una mayor efectividad para la identificación del virus, superando a métodos convencionales permitiendo mejorar la capacidad de respuesta ante brotes epidemiológicos, contribuyendo al control de enfermedades infecciosas.

El protocolo no solo permite la identificación precisa de infecciones activas en diferentes fases de la enfermedad, sino que también puede detectar cargas virales bajas, lo que es crucial para identificar animales asintomáticos que pueden actuar como reservorios. Además, los resultados obtenidos en esta investigación pueden ser empleados en estudios epidemiológicos, análisis de efectividad vacunal y en la evaluación de programas de manejo sanitario en refugios y criaderos.

Con la implementación de este método, se espera contribuir a las capacidades diagnósticas. Al proporcionar altamente sensible para la detección del virus del moquillo canino (CDV), este enfoque permitirá un monitoreo más preciso del virus. Al implementar diagnósticos avanzados

que mejoren la detección temprana del virus y optimicen la gestión de brotes en población que sean vulnerables. Al reducir la propagación del virus del moquillo canino (CDV) disminuyen los riesgos asociados a la transmisión del virus.

Palabras clave: PCR en tiempo real; virus del moquillo canino; diagnóstico molecular; vigilancia epidemiológica.

Abstract

Canine distemper virus is one of the most serious viral diseases affecting domestic dogs and other carnivorous species, with high morbidity and mortality rates. The implementation of a molecular diagnostic protocol using real-time PCR (qPCR) is an essential tool for the accurate and rapid detection of this pathogen, allowing for strengthening strategies for disease control and prevention.

The research focuses on the adaptation of a published protocol for the detection of canine distemper virus (CDV) by real-time PCR (qPCR). First, specific primers were chosen, ensuring their compatibility with the adapted protocol. After that, work was done with biological samples, from which viral RNA was extracted for the synthesis of cDNA. It was shown that qPCR is more effective for identifying the virus, surpassing conventional methods, allowing for improved response capacity to epidemiological outbreaks, contributing to the control of infectious diseases.

The protocol not only allows for the accurate identification of active infections at different stages of the disease, but can also detect low viral loads, which is crucial for identifying asymptomatic animals that may act as reservoirs. Furthermore, the results obtained in this research can be used in epidemiological studies, vaccine effectiveness analyses, and in the evaluation of health management programs in shelters and breeding facilities.

By implementing this method, it is expected to contribute to diagnostic capabilities. By providing highly sensitive detection of canine distemper virus (CDV), this approach will allow for more accurate monitoring of the virus. By implementing advanced diagnostics that improve early

detection of the virus and optimize outbreak management in vulnerable populations, reducing the spread of canine distemper virus (CDV) reduces the risks associated with virus transmission.

Keywords: Real-time PCR; Canine Distemper Virus; molecular diagnosis; epidemiological monitoring.

Índice de Contenido

Capítulo 1.....	1
Antecedentes.....	1
1.1. Introducción.....	1
1.2. Planteamiento del problema.....	2
1.3. Justificación	4
1.4. Objetivos.....	5
1.4.1. Objetivo General.....	5
1.4.2. Objetivos Específicos.....	5
Capítulo 2.....	6
Marco Teórico	6
2.1. Etiopatología	6
2.1.1. Moquillo canino	6
2.1.2. Etiología.....	6
2.1.3. Epidemiología.....	7
2.2. Ruta de infección y propagación del virus del moquillo canino.....	8
2.3. Signos clínicos	11
2.3.1. Fase aguda.....	11
2.3.2. Fase subaguda	12
2.3.3. Fase crónica	12
2.4. Diagnóstico	12
2.4.1. Métodos diagnósticos.....	14
2.4.2. Detección de Dianas	17
2.4.3. Método para la detección de antígenos.....	18

2.4.4. Métodos diagnósticos.....	14
2.5. Tratamiento	19
Capítulo 3.....	20
Materiales y Métodos.....	20
3.1. Extracción de RNA vacuna viva atenuada (VANGUARD® PLUS 5/CV-L).....	20
3.2. Obtención de ADNc	22
3.3. Condiciones de la PCR cuantitativa en tiempo real.....	23
3.4. Determinación de la concentración.....	24.
3.5. Curva estándar a partir de diluciones seriadas para determinar la sensibilidad.....	25
Capítulo 4.....	26
Resultados y Discusiones	26
4.1. Resultados.....	26
4.1.1. Resultados de PCR en Tiempo Real: Análisis de Amplificación y Fluorescencia.....	26
4.1.2. PCR en tiempo real para las muestras de sangre total.....	27
4.1.3. Curva estándar a partir de diluciones seriadas para determinar la sensibilidad.....	28
4.2. Discusiones.....	34
Capítulo 5.....	35
Conclusiones y recomendaciones.....	35
5.1. Conclusiones.....	35
5.2. Recomendaciones.....	36

Abreviaturas

qPCR	PCR en tiempo real
CDV	Virus del moquillo canino
LCR	Líquido cefalorraquídeo
IRM	Resonancia magnética
TC	Tomografía computarizada
N	Nucleoproteína
P	Fosfoproteína
H	Hemaglutinina

Simbología

°C grados Celsius

μl Microlitro

μM Micrómetros

Min Minutos

s Segundos

ng Nanogramos

Índice de figuras

Figura 1. Estructura del virus del moquillo canino	7
Figura 2. Contagio Distemper.....	9
Figura 3. Patogenia del moquillo canino	10
Figura 4. Dermatitis en el vientre en cachorros con el CDV.....	11
Figura 5. Vacuna para Virus del moquillo canino	20
Figura 6. Curva de amplificación.....	26
Figura 7. Curvas de amplificación obtenidas con las muestras de sangre totales.....	28
Figura 8. Curva estándar.....	33
Figura 9. Curva de amplificación de las diluciones.....	33

Índice de tablas

Tabla 1. Preparación del primer mix para ADNc.....	22
Tabla 2. Preparación del segundo mix para ADNc.....	22
Tabla 3. Preparación del Master Mix 2X. Volumen final: 15 μ l	24
Tabla 4. Parámetros de Ciclos de PCR en Tiempo Real para la amplificación del ADNc.....	24
Tabla 5. Lecturas de las diluciones.....	27
Tabla 6. Resultados de la qPCR de las muestras de sangre de caninos.....	30
Tabla 7. Resultados del termociclador con las diluciones.....	30
Tabla 8. Cálculos para el Coef. De varianza y promedio.....	32
Tabla 9. Cálculos de Desviación estándar y el promedio de la cuantificación.....	32

Capítulo 1

Antecedentes

1.1. Introducción

La implementación de un protocolo de diagnóstico molecular para el virus del moquillo canino (CDV) surge de la necesidad de poder mejorar la precisión y rapidez en la detección de la enfermedad en perros (Buñay, 2019). La enfermedad del moquillo tiene una alta tasa de mortalidad, que está afectando a perros y representando un reto para el control de zoonosis (Buñay, 2019). En ciertos países el índice de vacunación no es homogénea, los brotes de moquillo son constantes, y la capacidad de poder ser diagnosticados en el tiempo correcto es limitada. Esto llevó que se considerará la PCR en tiempo real (qPCR) como una herramienta que podría innovar el diagnóstico en el ámbito veterinario, ofreciendo resultados rápidos y confiables (Buñay, 2019).

Existen averiguaciones previas que demuestran la efectividad de la PCR en tiempo real en el diagnóstico del CDV, por su alta sensibilidad y especificidad. La qPCR aparte de que nos permite detectar el virus con precisión, también permite la cuantificación de carga, lo cual es útil en estudios epidemiológicos y de seguimiento de brotes (Alejandra Rivera-Martínez, 2024).

Las pruebas de diagnóstico molecular para CDV en zonas vulnerables impulsó la idea de la implementación de un protocolo de qPCR, esto con el fin de centralizar un método de diagnóstico que nos permita bajar el riesgo de que el virus se propague y así ayudar a mejorar la respuesta ante posibles brotes (Alejandra Rivera-Martínez, 2024). La implementación del protocolo de qPCR no solo busca mejorar el diagnóstico, sino también contribuir al control y prevención de esta enfermedad en el ámbito de la salud pública veterinaria. Este protocolo nos

podría ayudar con la generación de datos precisos sobre esta incidencia del moquillo, lo que permite a las autoridades de salud animal poder planificar la vacunación y control de manera más precisa, esto beneficiaría a poblaciones de caninos (Alejandra Rivera-Martínez, 2024).

La implementación de la qPCR para el diagnóstico de CDV es una mejoría en comparación con otros métodos clínicos, ya que esto nos permitirá detectar el virus incluso en fases tempranas, antes de que los síntomas aparezcan.

1.2. Planteamiento del problema

El CDV también plantea desafíos adicionales debido a su alta capacidad de mutación y su estrecha relación genética con otros *Morbillivirus*. Algunas investigaciones sugieren que podría representar una potencial amenaza zoonótica bajo ciertas condiciones (Martínez et al., 2024). El virus del moquillo canino está afectando a perros domésticos como a fauna silvestre, causando una enfermedad de trastornos genéticos con manifestaciones respiratorias, gastrointestinales y neurológicas. Esta enfermedad es una amenaza para la salud animal, la conservación de especies y la economía asociada al cuidado veterinario. A pesar de los avances en la vacunación, los brotes recurrentes sugieren una subestimación de los casos, insuficiencia en los diagnósticos tempranos y mutaciones virales que complican su manejo epidemiológico (Martínez et al., 2024).

Aunque se dispone de vacunas que han contribuido significativamente a reducir la incidencia de la enfermedad, la aparición de mutaciones genómicas en el CDV, particularmente en la proteína hemaglutinina (H), ha generado una mayor diversidad genética que complica tanto la eficacia de las vacunas como las estrategias de diagnóstico y control (Martínez et al., 2024).

La detección del CDV es un reto considerable. Los métodos tradicionales, como las pruebas serológicas, presentan limitaciones en sensibilidad y especificidad, especialmente en los primeros estadios de la enfermedad o en animales vacunados. Si bien las técnicas moleculares han demostrado ser herramientas más eficaces para la detección temprana y específica del ARN viral, su implementación no está generalizada debido al costo y la necesidad de infraestructura especializada (Martínez et al., 2024). Debido a la amplia disponibilidad de vacunas del virus, sigue habiendo casos positivos, incluso en caninos que ya han sido vacunados, lo que aumenta la necesidad de métodos de diagnósticos que tengan mayor precisión. La enfermedad puede atribuirse a diversos factores que se relacionan con la vacuna eficientemente. La presencia de anticuerpos de la madre en caninos a temprana edad podría interferir con la respuesta inmunitaria, neutralizando la vacuna e impidiendo que se genere una protección adecuada (FERNANDEZ ANCCO & AMANCA SASARI, 2023).

Otro aspecto es la falta de adherencia a los protocolos de vacunación. La aparición de nuevas variantes del CDV con una mayor capacidad inmunológica que plantea un desafío. Al implementar un protocolo de PCR en tiempo real para el virus es presentado como una herramienta fundamental. Esta técnica nos brinda una mayor precisión, lo que está facilitando un tratamiento oportuno y reduce la propagación del virus (FERNANDEZ ANCCO & AMANCA SASARI, 2023).

1.3. Justificación

El virus del moquillo canino es una enfermedad viral altamente contagiosa que afecta a perros, causando una alta mortalidad en las poblaciones caninas. La propagación del virus puede ser acelerada por la alta densidad de población canina, las condiciones ambientales desfavorables y la escasa conciencia sobre la importancia de la vacunación y la atención veterinaria.

La implementación de un Protocolo de diagnóstico mediante PCR en tiempo real representa una solución eficaz para abordar esta problemática. La PCR en tiempo real permite la detección rápida y precisa del virus, facilitando la identificación de casos positivos y la implementación de medidas de control adecuadas. La reducción de la incidencia del virus no solo beneficiará a las poblaciones caninas, sino que también ayudará a mitigar el riesgo de brotes en poblaciones más amplias, destacando la relevancia de esta investigación en la salud pública. (Martínez et al., 2024).

La implementación de un protocolo de diagnóstico del moquillo mediante la técnica de PCR en tiempo real se presenta como una solución clave. Esto permite una detección altamente sensible y específica del virus, incluso en etapas tempranas de la infección, lo que resulta fundamental para frenar su propagación. Además, la estandarización de este protocolo en laboratorios fortalecerá la capacidad de respuesta ante brotes y mejorará la vigilancia epidemiológica (Martínez et al., 2024).

Este trabajo no solo contribuirá al control y prevención del moquillo canino, sino que también tendrá un impacto positivo en la salud animal y la gestión de enfermedades zoonóticas, reforzando la necesidad de implementar medidas proactivas y efectivas basadas en evidencia científica (Martínez et al., 2024). La implementación de este protocolo también facilita la capacitación y sensibilización de los profesionales de la salud veterinaria sobre la importancia

del diagnóstico molecular avanzado en el manejo de enfermedades infecciosas. A medida que se establece un protocolo estandarizado y accesible, se fomenta el uso de tecnologías de diagnóstico modernas en todo el sistema sanitario veterinario, lo que, a largo plazo, puede mejorar la calidad de los servicios veterinarios en general y asegurar un enfoque más integral para el manejo de enfermedades infecciosas (Martínez et al., 2024).

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo General

Implementar un protocolo para la detección del virus del moquillo canino con el fin de optimizar el diagnóstico de la enfermedad, contribuyendo al control y prevención del moquillo en las poblaciones caninas de Ecuador.

1.4.2. Objetivos Específicos

Establecer un protocolo de PCR en tiempo real para la detección del virus del moquillo canino, incluyendo la selección de primers, sondas, controles positivos y negativos, así como la determinación de los parámetros óptimos de amplificación.

Evaluar la sensibilidad y especificidad del diagnóstico PCR en tiempo real en comparación con métodos tradicionales de diagnóstico del virus del moquillo canino, para establecer su eficacia en la detección temprana de la enfermedad.

Capítulo 2

Marco Teórico

2.1. Etiopatología

2.1.1. Moquillo canino

El moquillo canino es una de las enfermedades más comunes en los perros, con una tasa de mortalidad elevada. Comprender las propiedades del virus y sus mecanismos de patogenicidad es crucial para los veterinarios, ya que les permite prevenir la enfermedad, realizar diagnósticos precisos, evaluar alternativas y tiempos de tratamiento, y proporcionar pronósticos adecuados (Calzada, N. L. A., & Vázquez, M. L. 2020).

2.1.2. Etiología

El virus del moquillo canino forma parte del género *Morbillivirus* de la familia *Paramyxoviridae*. Este virus tiene una estructura pleomórfica y partículas que varían entre 150 y 250 nm de tamaño. Su genoma, compuesto de RNA de sentido negativo, mide 15.69 kb y es monocatenario. Esta estructura genómica impide un reagrupamiento frecuente, lo que contribuye a la variabilidad antigénica. Su envoltura está formada por una capa lipídica derivada de la membrana celular (Calzada, N. L. A., & Vázquez, M. L. 2020).

El virus contiene seis proteínas estructurales. Tres de ellas están asociadas con el RNA viral: la nucleoproteína (N), que forma la cápside helicoidal (con un diámetro de 13 a 18 nm), y representa la principal proteína interna. Las otras dos proteínas son la fosfoproteína (P) y la polimerasa grande, las cuales participan en la actividad de la polimerasa viral durante la transcripción y replicación del RNA (Calzada, N. L. A., & Vázquez, M. L. 2020).

En la formación de la envoltura viral intervienen tres proteínas adicionales. Una de ellas es la proteína de matriz (M), que recubre la nucleocápside viral y se asocia con la envoltura lipoproteica, siendo esencial para la ensambladura del virión. La envoltura viral, que comprende tanto proteínas lipídicas como de matriz, se caracteriza por la presencia de espículas de 8 a 12 nm que corresponden a diversas glucoproteínas transmembrana. La glucoproteína H, la más grande, tiene la capacidad de aglutinar glóbulos rojos y facilita la unión del virus a la célula huésped. La glucoproteína F, por su parte, es responsable de la fusión de la membrana y de las actividades hemolíticas (**Figura 1**).

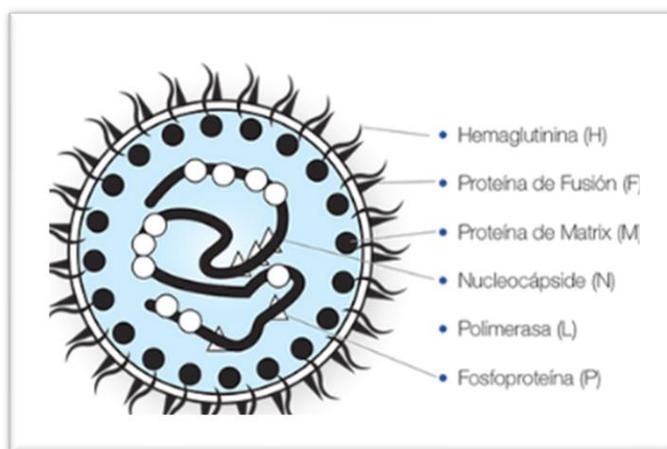


Figura 1. Estructura del virus del moquillo canino
(Calzada, N. L. A., & Vázquez, M. L. 2020).

2.1.3. Epidemiología

El virus del moquillo canino afecta a canino tanto a temprana edad como a caninos adultos pero los que son cachorros tienen mayor posibilidad a que sean infectados. Son más

vulnerables y esto es por la disminución de anticuerpos que adquieren de la madre, entre los 3 y 6 meses se ve una incidencia de este virus. Por otro lado, indiferentemente si es macho o hembra ambos géneros podrían contraer la infección. Los perros que son de raza pura presentan un riesgo notable menor de infección en comparación con los mestizos, con una reducción estimada de 85%. Se puede relacionar con factores genéticos o con prácticas en criaderos de razas puras. Han sido analizados algunos factores ambientales como la temperatura y la humedad, pero hasta el momento no hay evidencia que verifique que esto influya en la propagación del virus (Canales K'Ana, 2020).

Los caninos que han podido recuperarse ante este virus desarrollan una inmunidad de forma permanente, lo que quiere decir es que no volverán a contraer del virus. Es de suma importancia destacar que factores como las situaciones de estrés que se presente puede aumentar el riesgo de infección en perros que no han recibido las vacunas de refuerzo (Canales K'Ana, 2020).

La influencia de factores ambientales, como la temperatura y la humedad, ha sido objeto de estudio, pero hasta el momento no se ha podido establecer una relación concluyente entre estas variables y la aparición de la enfermedad. Esto indica que el CDV no parece depender directamente de las condiciones climáticas para su desarrollo en los perros, aunque se requieren más investigaciones para comprender completamente la interacción entre el ambiente y la enfermedad (Canales K'Ana, 2020).

2.2. Ruta de infección y propagación del virus del moquillo canino

La transmisión del CDV se produce a través de secreciones respiratorias que es cuando el perro estornuda. Sin embargo, el virus también se puede presentar mediante orina o heces, esto aumentaría las vías de contagio (**Figura 2**). Una vez que el CDV penetra en el cuero del animal,

su replicación inicial ocurre en los tejidos linfoides del sistema respiratorio. El CDV afecta a perros que son vulnerables a través de la inhalación de partículas virales presentes en el aire o en gotitas microscópicas de aerosol que contiene el agente infeccioso (Canales K'Ana, 2020).

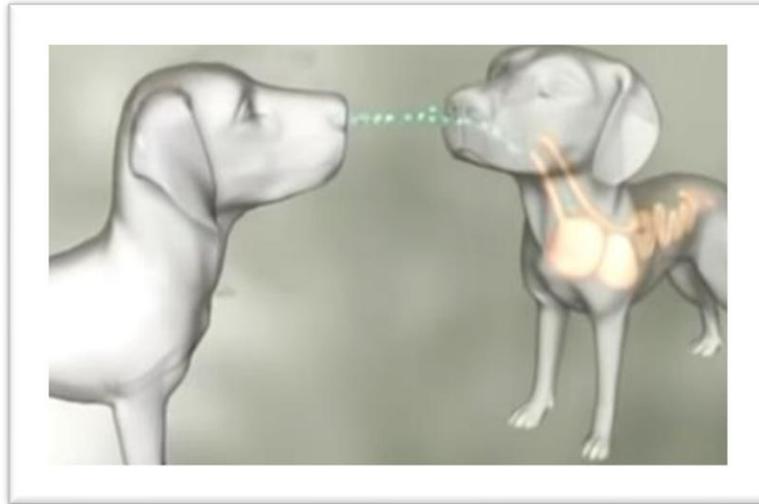


Figura 2. Contagio Distemper (Poma, 2021)

El virus afecta a perros que son vulnerables principalmente a través de inhalación de partículas presentes en el ambiente o gotas microscópicas que contiene el agente infeccioso. Cuando el virus penetra en el cuerpo del canino, su replicación ocurre en los tejidos linfoides del sistema respiratorio. En la etapa temprana, las células implicadas en la dispersión del virus son los macrófagos y monocitos tisulares que residen en el epitelio respiratorio (Canales K'Ana, 2020).

Entre el 4to y 6to día post-infección el virus se encuentra propagándose a través de los sistemas linfáticos hacia los órganos hematopoyéticos distantes, esto incluye el bazo, timo, ganglios linfáticos, etc. Entre el Octavo y el noveno día después de la infección inicial comienza una segunda etapa, la cual comienza con una fiebre alta. Durante esta etapa, el virus es difundido a través del torrente sanguíneo hacia órganos y tejidos (Canales K'Ana, 2020).

Entre el día 9 y 14 dependiente del sistema inmunológico del canino, puede estarse eliminando el virus en la mayoría de los tejidos. En ciertos caninos, la producción de anticuerpos neutralizantes es rápida y eficientes. Estos anticuerpos son esenciales porque neutralizan el virus extracelular y ayudan en la propagación intracelular, permitiendo que el animal elimine la infección sin mostrar síntomas que sean significativos (**Figura 3**) (Canales K'Ana, 2020).

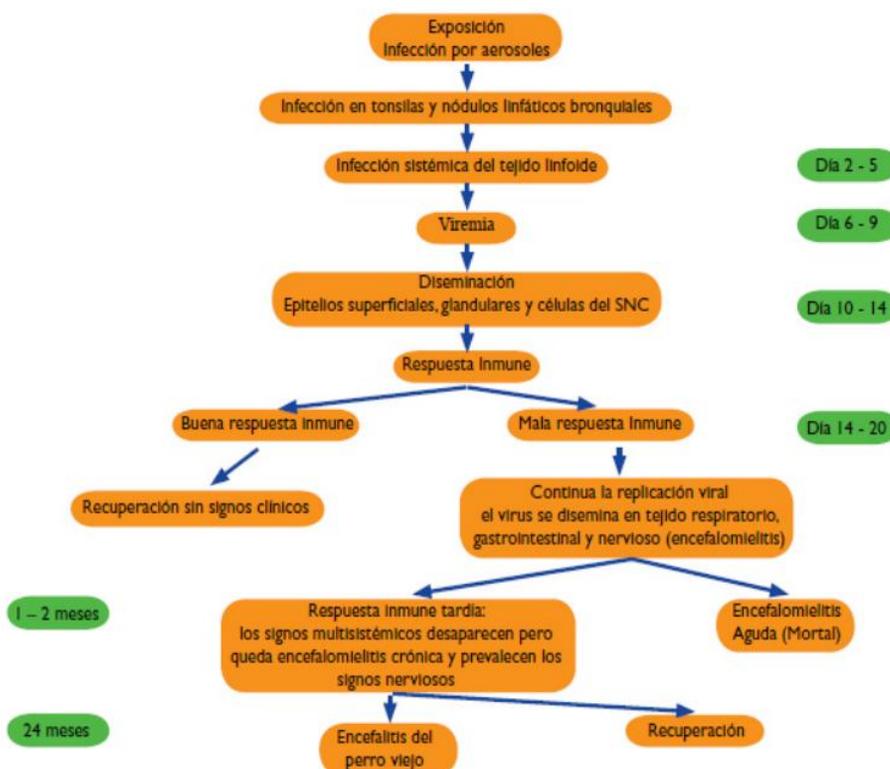


Figura 3. Patogenia del moquillo canino (Canales K'Ana, 2020).

La etapa de eliminación del virus empieza en un aproximado de una semana después de haber empezado la etapa inicial. En algunos casos, la excreción puede ser prolongada hasta tres meses, aunque lo que es más habitual, es que sea de menor duración. A pesar de que el virus no puede sobrevivir mucho tiempo fuera del huésped, su transmisión puede seguir por la liberación por parte de perros que se encuentran con la infección (Canales K'Ana, 2020).

2.3. Signos clínicos

Varían en diversos factores como la cepa viral específica o la capacidad inmunológica. Es importante destacar un porcentaje significativo, cerca de la mitad de perros que hayan sido infectados pero que sean asintomáticos. Las manifestaciones clínicas del virus se presentan en diferentes aspectos (Canales K'Ana, 2020).

2.3.1. Fase aguda

Después de 3 a 7 días de la enfermedad, el virus causa una temperatura alta, deshidratación, pérdida de peso y de apetito. Los perros a temprana edad pueden desarrollar una dermatitis vesicular en el vientre, aunque de repente esto se vincula a problemas neurológicos (**Figura 4**) (Canales K'Ana, 2020).

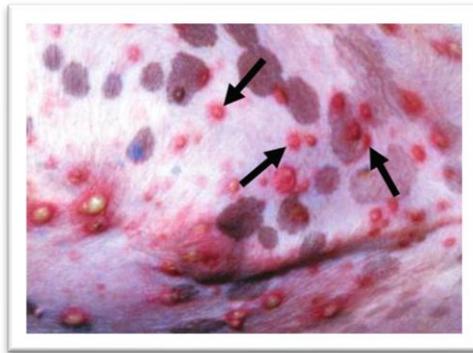


Figura 4. Dermatitis en el vientre en cachorros con el CDV (Canales K'Ana, 2020).

Los perros que son afectados pueden morir por esta enfermedad. Los signos neurológicos en esta fase se pronuncian tras la etapa sistémica y se asocian a la invasión del virus, lo que provoca que se desencadene una encefalopatía fulminante (Canales K'Ana, 2020).

2.3.2. Fase subaguda

Los síntomas suelen manifestarse de manera moderada. Después de un período de 2 a 3 semanas, se puede evidenciar signos neurológicos más graves, entre los cuales puede incluir parálisis y contracciones musculares involuntarias. También convulsiones que pueden ser presentadas en distintas formas, dependiendo de la región del cerebro que se vea comprometido. Esto puede causar que el animal produzca una salivación excesiva y realizan movimientos de la mandíbula, esto afecta a los lóbulos del cerebro (Canales K'Ana, 2020).

2.3.3. Fase crónica

En caninos que ya son adultos, esta enfermedad se puede distinguir de dos maneras. La 1ra por un proceso inflamatorio que puede causar encefalitis multifocal. Esto suele suceder en perros de 4 y 8 años, y se caracteriza por signos como pérdida de fuerza. La segunda forma es la encefalitis crónica que aparece en caninos, los síntomas más frecuentes es la dificultad para coordinar los movimientos, patrones de movimientos repetitivos como caminar en círculos (MALDONADO GONZÁLEZ, 2024).

2.4. Diagnóstico

Para diagnosticar este virus, es importantes destacar una gama de signos clínicos específicos. Entre los más comunes son fiebre, secreciones oculares o nasales, problemas respiratorios. Además, hay que tener en cuenta las fechas de vacunaciones, pero dado que no todos los síntomas aparecen de

manera simultánea, la enfermedad puede hacerse presente de diferentes maneras, es por ello que se puede requerir exámenes de laboratorio (MALDONADO GONZÁLEZ, 2024).

Para obtener un diagnóstico que sea concreto, se debe identificar ciertas características de las células infectadas. Esto se sitúan en el núcleo y en el citoplasma de las células que se encuentran afectadas. La detección se consigue por técnicas de tinción citológica como muestras de tejido que ayudan a ver el material viral en las células y confirmar que el virus está presente (MALDONADO GONZÁLEZ, 2024).

Con el pasar del tiempo, se ha implementado técnicas para diagnosticar el virus del moquillo canino. Hay algunas pruebas comerciales que son muy conocidas gracias a su rapidez y facilidad de aplicación, pero su precisión no ha sido eficaz debido a la alta incidencia de resultados falsos negativos. En la actualidad, se han desarrollado diagnósticos basados en tecnologías moleculares con técnicas de validación cruzada. Estas técnicas permiten la identificación del virus mediante estándares que pueden detectar copias completas del material genético del virus utilizando PCR (Ortegón, 2023).

Estrategias más precisas incluyen el LCR, donde el tipo de muestra y la técnica de recolección es determinante para poder obtener resultados confiables, en especial en casos crónicos donde el virus es difícil de identificar. En estas situaciones, el análisis de líquido cefalorraquídeo se convierte en una alternativa para el diagnóstico (Ortegón, 2023).

Las pruebas PCR son reconocidas por su precisión en la detección del CDV. Actualmente se han desarrollado variantes avanzadas que han demostrado ser altamente sensibles en casos clínicos (Ortegón, 2023).

2.4.1. Métodos diagnósticos

Pruebas diagnósticas convencionales

1) **Análisis del líquido cefalorraquídeo (LCR):** Este análisis implica la recolección de LCR para evaluar el recuento celular, citología, proteínas en su totalidad y características. Para este análisis se usa una cámara de recuento celular y técnicas como la citocentrifugación.

Ventajas:

- Ayuda a reducir en el espectro los diagnósticos.
- El LCR se puede usar para evaluar cambios a lo largo del tiempo, especialmente después de tratamientos o cirugías.

Desventajas:

- No tiene exactitud para patología específicas.
- Hay que tener mayor cuidado para evitar la mala interpretación de resultados.

(Carrillo del Pino, 2023)

2) **Imágenes transversales (IRM y TC):** Resonancia magnética (RM) y tomografía computarizada (TC) para la identificación de lesiones intracraneales o médula espinal.

Ventajas

- IRM: Tiene una alta resolución de tejidos blandos y ayuda en diagnósticos presuntivos.
- TC: Permite una delimitación precisa de los bordes entre el tumor y el tejido encefálico.

Desventajas

- IRM: Lenta y un poco costosa y es necesaria la anestesia general.
- TC: Tiene un menor detalle de tejidos blandos.

(Carrillo del Pino, 2023)

3) Pruebas serológicas (ELISA)

Ventajas

- Este método nos ayuda en la identificación de la presencia de anticuerpos y facilita la detección de infecciones de forma indirecta.
- Tiene una sensibilidad alta, aproximadamente podría superar el 90%, lo que la hace una herramienta eficaz para la detección.

Desventajas

- Para que haya mayor seguridad con esta prueba es necesario emplearla con otras técnicas de diagnóstico.

- La presencia de infección de parásitos puede generar respuestas cruzadas que podrían estar afectando los resultados de la prueba.

(Gétaz, L & Castro Soto, 2023).

Pruebas diagnósticas moleculares

1) qPCR (Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real)

Ventajas

- La qPCR muestra una especificidad de aproximadamente 80%, la cual garantiza que los resultados positivos sean seguros.
- La qPCR permite la detección de variantes genéticas relacionadas con resistencia a antibióticos.

Desventajas

- En ciertos casos la especificidad suele ser de un 20%, lo que incrementa el riesgo de falsos positivos.
- Se debe de tener cuidado ya que si se manipula mal la muestra puede dar resultados erróneos debido a la contaminación cruzada. resultados incorrectos si no se toman.

(Mercado & Vasquez, 2021)

RT-PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa): El proceso es iniciado con la conversión del ARN en ADNc por la acción de la transcriptasa inversa y la amplificación para permitir la identificación y análisis.

Ventajas

- Ayuda a que se detecte con facilidad cantidades bajas de materiales genéticos con resultados seguros.
- Demora tan sólo unas horas en la obtención de resultados y permitiendo mayor rapidez.

Desventajas

- Los resultados son confiables siempre y cuando se maneje con una adecuada recolección y manipulación de las muestras.
- La muestra siempre se debe tener en refrigeración para que no interfiera con los resultados.

(Silva et al., 2022)

2.4.2. Detección de Dianas

La identificación de la región de fosfoproteína (P) es un paso importante, ya que debe ser específica qué regiones del organismo que se quiere detectar. Antes de la implementación de este método de detección, se debe asegurar de que se puede identificar la mayoría de los aislamientos, por lo que un resultado negativo expone de manera significativa la salud pública. Para que el

método sea garantizado, es necesario que se valide considerando ciertos factores (Pascual & Hevia, 2024).

Es de suma importancia evaluar condiciones del entorno dónde se estaría aplicando el método de detección, ya que podrían estar presentes sustancias que estarían interfiriendo en el proceso y dificultando la identificación del patógeno. Es necesario confirmar que el método no genere resultados con errores a lo que se detecte microorganismos similares. Para evitar que suceda este tipo de problemas hay que asegurarse que no ocurra reacciones cruzadas que puedan comprometer la exactitud y la precisión de los resultados (Pascual & Hevia, 2024).

En esta etapa, se debe usar muestras que contengan cantidades específicas del microorganismo que se va a detectar. Eso permite que se evalúe correctamente ya sea pequeñas concentraciones del patógeno, asegurándose que este método sea de manera efectiva y segura (Pascual & Hevia, 2024).

2.4.3. Método para la detección de antígenos

El diagnóstico con más exactitud se puede obtener mediante una prueba de sangre, ya que esto nos permite la observación de los cuerpos de inclusión de Lentz en glóbulos rojos y leucocitos. Por lo que posiblemente se puede encontrar estos cuerpos en otros tipos de células como en las epiteliales. Si no se puede observar estos cuerpos, no hay que descartar la posibilidad de una infección del virus del moquillo (Silva et al., 2022).

El 21% de los caninos que presentan infección tienen cuerpos de inclusión. Las pruebas inmunocromatográficas rápidas, que se basan en inmunoensayos, brindan un diagnóstico rápido

al detectar la proteína F. Estas pruebas pueden ser realizada con muestras de mucosa conjuntival, suero, plasma, sangre o heces de canino que tengan la infección (Silva et al., 2022).

Los antígenos pueden ser detectados por pruebas comerciales inmunocromatográficas, comunes por su alta sensibilidad, la cual tiene un porcentaje alto en comparación con la técnica de hemaglutinación (Silva et al., 2022).

Esta técnica inmunocromatográfica requiere de una alta concentración de antígenos virales para poder obtener resultados precisos. También hay otra prueba que actúa de manera eficiente y con rapidez que es la prueba ELISA y nos permite identificar anticuerpos IgM específicos. Estos anticuerpos se detectan en las primeras etapas de la infección, pero va disminuyendo entre 2 y 3 semanas después de que haya iniciado la enfermedad. Debe ser evaluada la morfología de leucocitos como presencia de cuerpos de inclusión con sospecha del virus. Hay estudios que demuestran la precisión de las pruebas inmunocromatográficas, pero depende de la muestra que haya sido utilizada, observando una sensibilidad del 100%. También puede ser evaluada la combinación con un recuento sanguíneo y la búsqueda de inclusiones que hayan sido virales como método de diagnóstico rápido (Silva et al., 2022).

2.5. Tratamiento

El manejo del moquillo canino es un desafío para los veterinarios debido a la ausencia de un tratamiento antiviral que sea específico, por lo que se hace más difícil un pronóstico conciso en varios casos. A pesar de los avances que ha habido sobre el virus y el desarrollo de terapias, los cambios en las pautas de tratamientos aún no han sido suficientes para poder controlar la enfermedad (Ortegón, 2023).

Este enfoque es basado en el uso de antibióticos para controlar infecciones secundarias, en especial en el tracto digestivo y respiratorio para que no haya indicio de convulsiones. En algunos casos del virus de moquillo la mejoría observada con tratamiento sintomático se puede interpretar erróneamente como un resultado positivo del tratamiento (Ortegón, 2023).

Los síntomas neurológicos más leves, suelen ser más manejables. Las mioclonías suelen ser un poco más difícil de poder tratar y por lo general, son irreversibles. Para poder enfrentar contra convulsiones agudas, se puede utilizar diazepam, administrado por vía intravenosa (Ortegón, 2023).

Capítulo 3

Materiales y Métodos

3.1. Extracción de RNA vacuna viva atenuada (Vanguard® Plus 5/CV-L)

El presente protocolo de extracción de RNA se aplicó tanto para muestras de sangre total colectadas de caninos, así como para las vacunas liofilizadas comerciales que sirvieron para control positivo (figura 5).



Figura 5. Vacuna para Virus del moquillo canino

Para la vacuna liofilizada, que se empleó de control positivo, se rehidrató asépticamente el frasco contenedor de la vacuna liofilizada con el frasco del componente líquido que la acompaña. Luego se colocó toda la vacuna en un criovial para empezar con la extracción.

El proceso de extracción utilizado fue el Kit Zymo Research Cat. No R1035 y se siguió lo indicado por el fabricante. Se coloca en un microtubo de 1.5 ml, 200 μ l de la vacuna o de la muestra y se adiciono 200 μ l de shield, se procedió a darle vortex para ponerle 10 μ l de la Proteinasa K, la cual nos ayuda a eliminar proteínas y se lo incubó por 15 minutos a temperatura ambiente. Una vez pasado ese tiempo, se colocó 800 μ l de Viral ARN Buffer, se le dio vortex y se lo transfirió a una columna con un tubo de recolección para llevarlo a una centrifuga por 2 minutos a máxima velocidad.

Cuando salió de la centrifuga, se colocó en un tubo nuevo para agregarle 500 μ l de Viral Wash Buffer y se lo centrifugó por 30 segundos, este paso se repitió dos veces, cambiando el tubo de recolección.

Luego, se añadió 500 μ l de etanol al 100% y se lo centrifugó por 1 minuto. Una vez cumplido el tiempo, la columna fue puesta en un microtubo de 1.5 ml y por último se le agregó 20 μ l de agua grado molecular y se centrifugó por 30 segundos. La columna se descartó y nos quedó la extracción de 20 μ l en el tubo.

3.2. Obtención de ADNc

El protocolo que a continuación se describe, se aplicó en muestras de RNA que se obtuvieron tanto de sangre total como de la vacuna que sirvió como control positivo según lo descrito en el paso anterior.

Se preparó un primer mix en el área blanca según lo descrito en la tabla 1.

Tabla 1. Preparación del primer mix para ADNc

Componente	Volumen (μ l)
Hexámeros aleatorios 50 μ M	1
Mezcla de dNTP 10 μ M cada uno	1
Volumen total del mix:	2

En el área de extracción se colocó 11 μ l del ARN extraído al mix que se preparó para llevarlo al termociclador a 65 °C por 5 minutos. Una vez que pasó los 5 minutos se lo colocó en hielo por 1 minuto.

Se preparó un segundo mix como se describe en la tabla 2.

Tabla 2. Preparación del segundo mix para ADNc

Componente	Volumen (μ l)
Buffer de enzima RT	4
DTT 100Mm	1
Enzima RT	1
Volumen total del mix	6

En el área de extracción se colocó en un tubo 7 μ l del segundo mix y se lo mezcló pipeteando 10 veces para luego llevarla a centrifugar brevemente.

Una vez que se lo centrifugó se lo llevó al termociclador a 42 °C por 50 minutos, 70 °C a 10 minutos y 4 °C.

Para las muestras de sangre total, colectadas de caninos, se siguió el proceso antes descrito. Se trabajó con un total de 13 muestras de procedencia clínica.

3.3. Condiciones de la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).

Cada muestra analizada (muestra de sangre total y control positivo) fueron analizadas, por duplicado, a través de la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). Se amplificó un fragmento de 114 pb, que corresponden al gen de la fosfoproteína (P) del virus del moquillo canino, siguiendo lo descrito por los autores Tomaszewicz, McAloose, Calle, Auer, Posautz, Slavinski, Brennan, Walzer, Seimon (2020).

Para ellos, se emplearon los cebadores: CDVF4 -GTCGGTAATCGAGGATTCGAGAG y CDVR3 – GCCGAAAGAATATCCCCAGTTAG, a una concentración final de 0,4 μ M y la sonda taqMan CDV MGB 6FAM-ATCTTCGCCAGAATCCTCAGTGCT-MGBNFQ a 0,2 μ M (Tomaszewicz et al., 2020). Las condiciones de master mix están descritos en la tabla 3. La qPCR se realizó en termociclador GeneAmp Applied BioSystem 2400, aplicando las condiciones de amplificación, descritas en la tabla 4.

Tabla 3. Preparación del Master Mix 2X. Volumen final: 15 μ l

Componente	X1
Mix 2X	10 μ l
Primer F	1 μ l
Primer R	1 μ l
Sonda	0,5 μ l
H₂O	2,5 μ l

Tabla 4. Parámetros de Ciclos de PCR en Tiempo Real para la amplificación del ADNc

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95 °C	3 minutos
	95 °C	15 segundos
40	60 °C	30 segundos

En cada reacción de amplificación se incluyeron controles positivos y negativos. En el control negativo no se agregó plantilla de ARN, garantizando que no haya contaminación cruzada. El control positivo fue la vacuna liofilizada, procesada como se indicó anteriormente.

3.4. Determinación de la concentración

Se utilizó el kit QuantiFluor ssDNA System[®], siguiendo lo descrito por el fabricante. Primero, se preparó el tampón TE 1X, diluyendo el tampón TE 20X con agua grado molecular, luego para la solución de trabajo se diluyó Dye en tampón TE 1X a una relación de 1:400 y se le dio vortex.

Para establecer una línea base de medición, se preparó un control blanco. Para ello se pipeteo 200 μ l de la solución de trabajo en un tubo de 0,5 ml, asegurando que no se añadiera ninguna otra sustancia que pueda interferir con la medición. Luego, para preparar el estándar se debe mezclar 4 μ l de estándar ssDNA con 200 μ l de la solución de trabajo, la correcta homogenización de esta mezcla es esencial para la obtención de mediciones correctas y evitar variaciones en la fluorescencia.

Se agrego 20 μ l del ADNc que fue extraído, según lo descrito anteriormente, en 200 μ l de solución de trabajo. Se dejó en incubación por 5 minutos a temperatura ambiente.

3.5. Curva estándar a partir de diluciones seriadas para determinar la sensibilidad

Se realizaron diluciones seriadas, a partir del control positivo, para determinar la sensibilidad del protocolo. Se utilizaron cinco tubos, a los cuales se añadieron inicialmente 18 μ l de agua grado molecular. En el primer tubo de reacción, se incorporó 2 μ l de control positivo. Una vez que fue añadido, se mezcló pipeteando 10 veces para asegurar la homogeneización completa de la solución.

Posterior a eso se tomó 2 μ l del primer tubo y se transfirieron al segundo tubo. Esto se realizó en sucesivo hasta alcanzar un factor de dilución de 10^{-5} . La curva de amplificación correspondiente a estas diluciones se presenta en la figura 8. La sensibilidad se determinó con respecto a los valores de Ct obtenidos para cada dilución, se lo especifica en la tabla 7. La línea generada muestra una eficiencia de amplificación de un 98%, lo que señala que la reacción de PCR en tiempo real (qPCR) se haya dentro de los parámetros para las pruebas diagnósticas.

Capítulo 4

Resultados y Discusiones

4.1. Resultados:

4.1.1. Resultados de PCR en Tiempo Real: Análisis de Amplificación y Fluorescencia

El primer producto de amplificación en tiempo real, obtenido mediante el protocolo descrito previamente, se observa en la **figura 6**. En esta reacción se incluyen controles positivos que se procesaron por duplicado como se menciona en el capítulo anterior, es por ello que se observan dos curvas idénticas: la una, con un Ct de 18.45, y la otra, con un Ct tiene 18.47.

Estos valores de Ct significa una baja variabilidad entre replicados y reflejan una amplificación eficiente del material genético. La uniformidad en la señal de fluorescencia y la proximidad de los valores de Ct indican que la PCR en tiempo real se llevó a cabo bajo condiciones óptimas, minimizando posibles errores o variaciones en la eficiencia de amplificación.

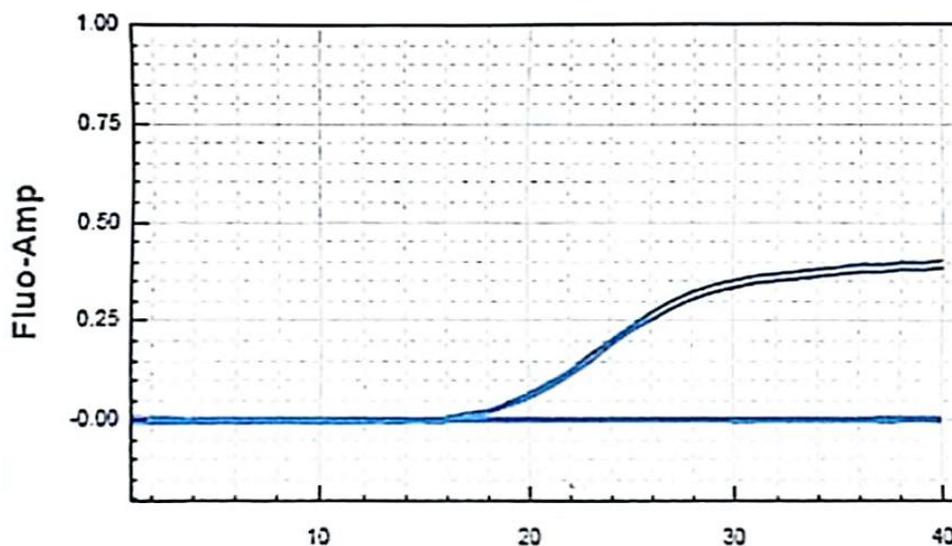


Figura 6. Curva de amplificación

4.1.2. PCR en tiempo real para las muestras de sangre total

La qPCR es altamente presenta una alta sensibilidad y especificidad que permite la detección del material genético en las muestras de sangre total. La medición del Ct proporciona una estimación de la carga viral en la muestra, lo que facilita la interpretación de los resultados y la diferenciación entre infecciones.

Al analizar las muestras mediante PCR en tiempo real representa una herramienta de diagnóstico de gran utilidad, ya que permite detectar la infección incluso en etapas tempranas del CDV. Su aplicación en estudios epidemiológico y en el monitoreo de brotes que contribuye significativamente a la implementación de estrategias de control y prevención.

Tabla 5. Resultados de la qPCR de las muestras de sangre de caninos.

Muestras	Ct
Control negativo	N/A
1	N/A
2	N/A
3	N/A
4	N/A
5	22.28
6	N/A
7	N/A
8	N/A
9	N/A

10	N/A
11	N/A
12	N/A
13	22.33
Control positivo	22.33

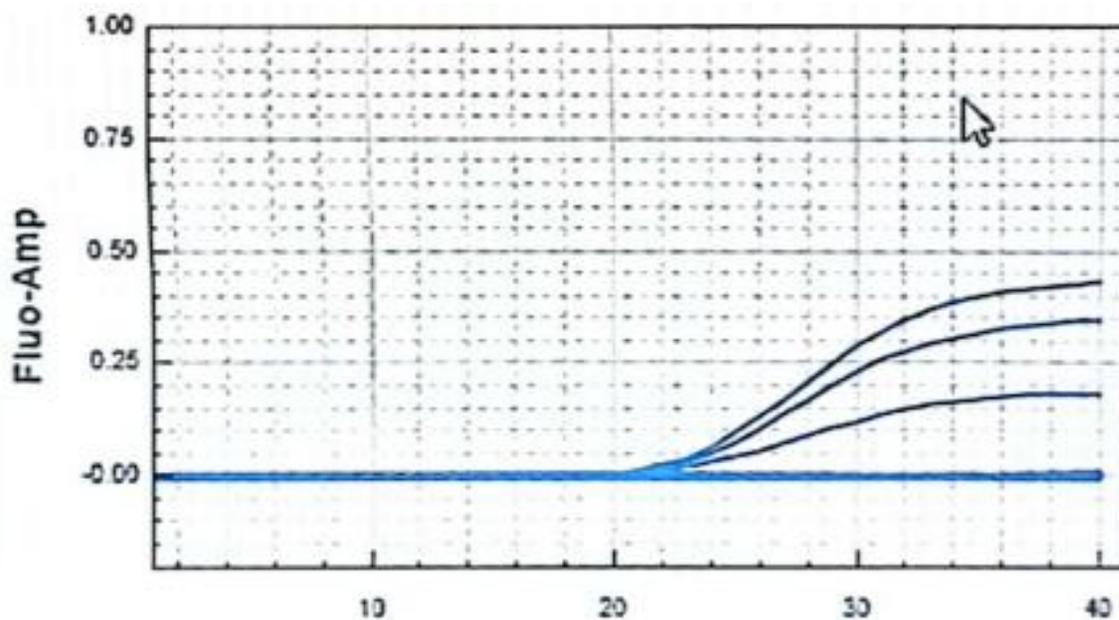


Figura 7. Curvas de amplificación obtenidas con las muestras de sangre totales

En el eje de las x se observa el valor del ciclo umbral (Ct) y en el eje de las y la fluorescencia relativa de la amplificación.

4.1.3. Curva estándar a partir de diluciones seriadas para determinar la sensibilidad

Al evaluar la sensibilidad, se realizó una curva estándar mediante las diluciones seriadas del ADNc. Una vez preparados los mix de reacción, se añadieron las diluciones, cuyas concentraciones están detalladas en la tabla 6.

Posteriormente, las muestras fueron llevadas al termociclador con un total de 40 ciclos de reacción bajo las condiciones previamente descritas. Con las lecturas de amplificación se construyó la curva estándar.

El sistema de identificación representa la clasificación de la muestra analizada; a saber, si es un control negativo, una dilución específica o un control positivo. El Ct es un valor de umbral en el ciclo de qPCR, que indica los valores de ciclos necesarios para que la señal de fluorescencia supere el umbral de fluorescencia detectable por el equipo. Los valores que tengan un Ct bajo sugieren una mayor concentración de material genético en la muestra. El control negativo significa que no se detectó material genético en la muestra. El control positivo indica la presencia del material genético esperado y los valores representan la clasificación de los resultados de acuerdo con la dilución de la muestra y su detección de la qPCR.

El análisis de datos se enfocó en evaluar la eficiencia del protocolo implementado para la detección del CDV a través de qPCR, por lo que se analizaron los valores de Ct producto de la amplificación del sistema mediante el cálculo de la pendiente de la curva. Estos resultados, presentados en la Tabla 7 fueron requeridos para validar la precisión del protocolo empleado, asegurando que el método de detección implementado es capaz de identificar el ADN con mayor sensibilidad y especificidad.

Tabla 6. Lecturas de las diluciones

Muestra	Ct1 (ng/μl)	Ct2 (ng/μl)
Control positivo	33,3	33,3
1x10 ⁻¹	3,15	3,28
1x10 ⁻²	0,44	0,74
1x10 ⁻³	< LOD	< LOD
1x10 ⁻⁴	< LOD	< LOD
1x10 ⁻⁵	< LOD	< LOD

Tabla 7. Resultados del termociclador con las diluciones

SI	Ct	SN
Control negativo	N/A	CN
10 ⁻⁵	N/A	5
10 ⁻⁴	N/A	4
10 ⁻³	N/A	3
10 ⁻²	32.51	2
10 ⁻¹	27.64	1
Control positivo	22.52	CP
Control negativo	N/A	CN
10 ⁻⁵	N/A	5

10^{-4}	N/A	4
10^{-3}	N/A	3
10^{-2}	32.01	2
10^{-1}	27.89	1
Positive	23.60	CP

En la qPCR, se requiere evaluar la eficiencia de amplificación y las mediciones. Para ello, se realizaron diluciones seriadas del control positivo. De dichas diluciones, se obtuvieron valores relativos de fluorescencia. Aquellas muestras que presentaron valores de Ct, indican el número del ciclo en el que la fluorescencia de amplificación supera el umbral de detección.

En la tabla 8, se presentan los valores de Ct obtenidos para diferentes diluciones de la muestra, junto con la varianza y la eficiencia. La desviación estándar permite evaluar la consistencia en los valores de Ct. La eficiencia de amplificación se calcula a partir de la pendiente de la curva de amplificación.

En la tabla 9 muestra los valores de concentración obtenidos en las dos lecturas de PCR en tiempo real (qPCR) y su desviación estándar. La desviación estándar indica la variabilidad de las mediciones y por otro lado el promedio refleja las concentraciones de cada dilución.

< LOD significa que está por debajo del límite de detección, lo que indica que las diluciones fueron bajas.

Tabla 8. Cálculos para la Desviación estándar, promedio y eficiencia

Log factor de dilución	Promedio (ng/μl)	Ct1	Ct2	Desviación estándar	Promedio (Ct)	Eficiencia
0	33,3	23,6	22,52	0,76	23,06	1,17391304
-1	3,215	27,89	27,64	0,18	27,765	
-2	0,59	32,01	32,51	0,35	32,26	

Tabla 9. Cálculos de Desviación estándar y el promedio de la cuantificación

Muestra	Concentración Lectura 1 (ng/μl)	Concentración Lectura 2 (ng/μl)	Desviación estándar	Promedio
Control positivo	33,3	33,3	0	33,3
1×10^{-1}	3,15	3,28	0,09	3,22
1×10^{-2}	0,44	0,74	0,21	0,59
1×10^{-3}	< LOD	< LOD		
1×10^{-4}	< LOD	< LOD		
1×10^{-5}	< LOD	< LOD		

En la **figura 8** se observa la relación del logaritmo del factor de dilución del control positivo respecto al promedio del valor de Ct. Se aplica una transformación logarítmica a la concentración o dilución. Esto permite determinar la eficiencia de amplificación, la pendiente de recta permite calcular la eficiencia de la qPCR, en función de los valores de Ct para las muestras analizadas, lo que se presenta en la **figura 9**.

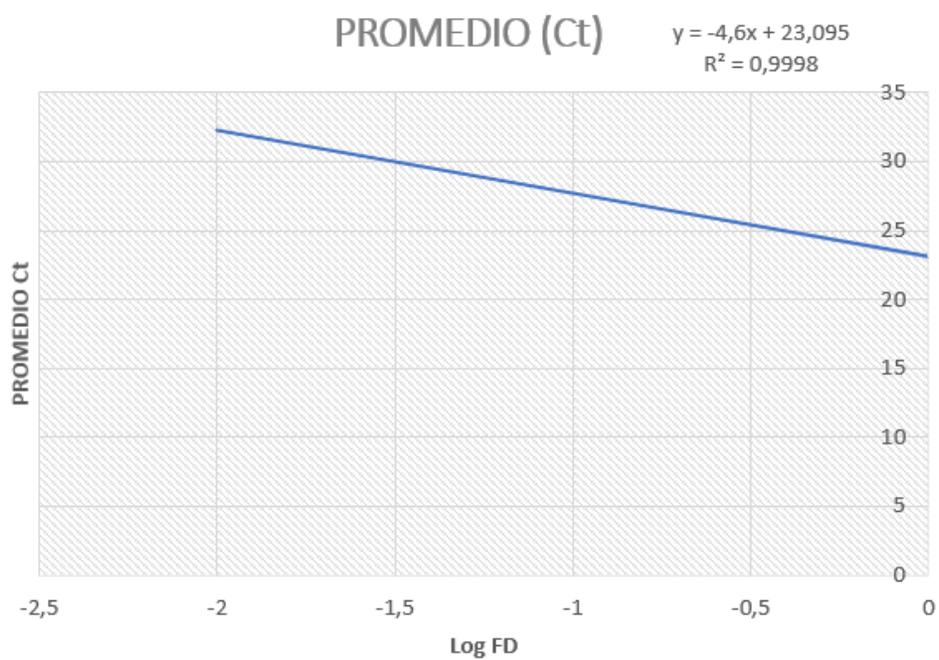


Figura 8. Curva estándar

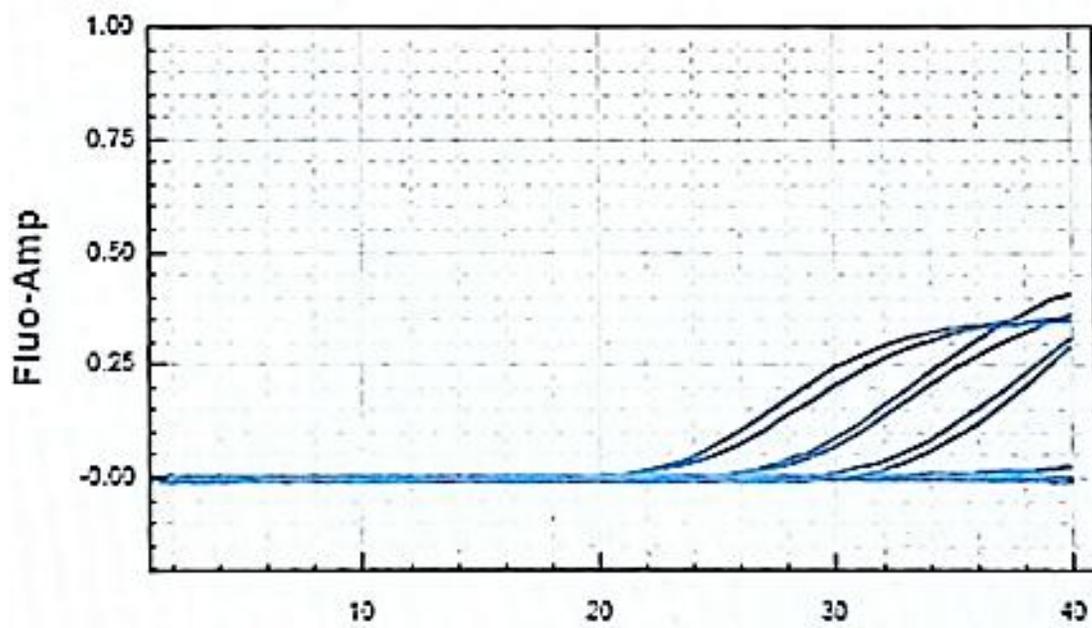


Figura 9. Curva de amplificación de las diluciones

4.2. Discusión

Los resultados obtenidos de la PCR en tiempo real (qPCR) sirven para el diagnóstico confirmativo del virus del moquillo canino (CDV). La implementación del protocolo para el manejo y control de esta enfermedad es crucial para prevenir su propagación y reducir el riesgo de infecciones.

Este protocolo permitió identificar la presencia del agente causal del Síndrome de Distemper, a partir de muestras de sangre total. Junto con el estudio descrito por Ania Tomaszewicz Brown y colaboradores (2020), que se utilizó como referencia de este trabajo de investigación, permitió demostrar que la qPCR es una técnica con alta sensibilidad y especificidad para la detección en muestras biológicas.

A través de este protocolo se logró detectar genoma viral a baja concentración en las muestras de sangre total, con un mínimo de 0,59 ng/ μ l y un Ct de 32,51. Esto es importante en el diagnóstico temprano del virus, debido a que algunos caninos podrían no presentar síntomas en las primeras etapas, lo que dificulta la identificación de casos a través de métodos convencionales.

En un estudio realizado por Farías (2021) destacan la importancia de la precisión del diagnóstico en la identificación del virus del moquillo canino (CDV). La qPCR demostró ser significativamente más sensible que los kits rápidos, permitiendo detectar virus que no fueron detectadas con el método convencional. La presencia de falsos negativos en los kits rápidos representa un riesgo clínico importante, ya que los animales infectados podrían no recibir tratamiento adecuado y continuar propagando el virus.

Además, en este estudio la qPCR también presentó una mayor especificidad, minimizando la posibilidad de falsos positivos que podrían generar tratamientos innecesarios. En contraste, los kits rápidos, al depender de la detección de antígenos virales, pueden arrojar resultados erróneos debido a variaciones en la carga viral o interferencias en la muestra.

Los autores Rivera-Martinez y colaboradores (2024) realizaron un estudio en el que se evaluó la implementación del virus del moquillo canino (CDV), demostrando que esta técnica posee una sensibilidad 100 veces mayor en comparación con la RT-PCR convencional, lo que permite una identificación más temprana y precisa del virus en muestras clínicas. En México, se ha reportado una variabilidad en la prevalencia del CDV, con valores del 71% en Monterrey, 23.3% en Coahuila y un aumento del 0.2% en 2015 al 3.8% en 2016 en Mexicali, lo que evidencia la necesidad de un diagnóstico eficiente para la prevención de brotes. La qPCR, además de su alta sensibilidad y especificidad frente a métodos serológicos como ELISA o inmunofluorescencia, permite la cuantificación de la carga viral en sangre.

Capítulo 5

Conclusiones y recomendaciones

5.1. Conclusiones

La implementación del protocolo de qPCR para el diagnóstico del virus nos permite detectar una alta sensibilidad y especificidad la presencia del patógeno en muestras de sangre. La identificación de cargas virales bajas y detección del virus en etapas de la adolescencia recalca lo importante de esta técnica en el control epidemiológico de este virus.

El desarrollo del protocolo nos facilita la estandarización de un método diagnóstico, lo que representa un avance en el manejo del virus. De igual manera, la comparación con métodos tradicionales, la qPCR es una buena alternativa ya que es eficaz y con una mayor precisión.

Implementar un protocolo aparte de contribuir a la salud y bienestar de los animales, también presenta una reducción en el impacto que se tiene con respecto a este virus de moquillo canino. La qPCR también permite cuantificar de manera precisa la carga viral. Esto es de suma importancia para diferenciar infecciones entre caninos que ya se encuentran recuperados o vacunados.

5.2. Recomendaciones

Es de suma importancia la utilización de un protocolo en programas de vigilancias epidemiológicas para ver las incidencias que se presentan a causas del virus en diferentes lugares. Esto podría ayudar en la identificación en áreas de alto riesgo y diseñar estrategias más efectivas.

Ya que carnívoros silvestres también se pueden ver afectados por el virus, es de mayor necesidad la implementación del protocolo en poblaciones de fauna silvestre. Esto será una ayuda para la protección de la biodiversidad y la prevención de diseminación del virus en ecosistemas que se consideran vulnerables.

Se recomienda mantener un monitoreo seguido de variantes genéticas del virus que hayan sido detectadas por el protocolo. Esto ayudará a la anticipación de problemas que se relacionan con la eficacia de las vacunas y los ajustes de los diagnósticos para mantener la sensibilidad debido a nuevas cepas.

La PCR en tiempo real (qPCR) tiene una mayor sensibilidad y especificidad y es recomendable combinar su uso con otras técnicas diagnósticas, como pruebas serológicas (ELISA) para confirmar casos sospechosos.

Referencias Bibliográficas

Rivera-Martínez, A., Rodríguez-Alarcón, CA, Adame-Gallegos, JR, Laredo-Tiscareño, SV, de Luna-Santillana, E. d. J., Hernández-Triana, LM, & Garza-Hernández, JA (2024). Virus del moquillo canino: orígenes, mutaciones, diagnóstico y epidemiología en México. *Vida*, 14 (8), 1002. <https://doi.org/10.3390/life14081002>

Calzada, N. L. A., & Vázquez, M. L. (2020). Moquillo canino: fisiopatología y signos clínicos. *Vanguardia Veterinaria*, 33–42. <https://www.vanguardiaveterinaria.com.mx/moquillo-canino-fisiopatologia?srsltid=AfmBOopWbt1LYDcETfVAo5WfY25-ZfILsY-ssOj57LPOfsMGJfEdJHki>

Canale K'Ana, D. H. (2020). *Virus del distemper canino: Revisión actualizada del agente y la patogenia de la enfermedad*. <https://core.ac.uk/download/pdf/326003111.pdf>

MALDONADO GONZÁLEZ, F. Y. (2024, octubre). *FRECUENCIA DE DETECCIÓN DE ANTÍGENO DEL VIRUS DISTEMPER CANINO EN PERROS CON SÍNTOMAS DE MOQUILLO CANINO EN EL MUNICIPIO DE LA ESPERANZA, QUETZALTENANGO*. <http://www.repositorio.usac.edu.gt/20845/1/Tesis%20Med.%20Vet.%20Frida%20Yambrej%20Maldonado%20Gonz%C3%A1lez.pdf>

FERNANDEZ ANCCO, BR. A., & AMANCA SASARI, BR. J. F. (2023). *TITULACIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA EL PARVOVIRUS CANINO UTILIZANDO UN PROTOCOLO DE VACUNACIÓN y ANÁLISIS HEMATOLÓGICO EN LA CLINICA VETERINARIA GOOFY – CUSCO*. https://repositorio.unsaac.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12918/8050/253T20230608_TC.pdf?sequence=1&isAllowed=y

González, S. S. (2024). TÉCNICAS RÁPIDAS NO MOLECULARES APLICADAS AL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. Microbiología alimentaria. Rosario Pascual Anderson. https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=esYpEQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA259&dq=análisis+del+gen+Diana++para+primers+y+sondas&ots=v1OoEhrmkp&sig=2tBggeSFi-mkpeahDSb_c9xx0SY#v=onepage&q&f=false

Ortegón, J. (2023). Actualización en el Diagnóstico y Tratamiento para el virus del Distemper Canino. *Revista Española de Cirugía Oral y Maxilofacial*, 32(3), 139–145. <https://repository.ucc.edu.co/server/api/core/bitstreams/dc34e8ed-cbd2-48c5-b650-c8097866f133/content>

Tomaszewicz Brown A, McAloose D, Calle PP, Auer A, Posautz A, Slavinski S, et al. (2020) Development and validation of a portable, point-of-care canine distemper virus qPCR test. *PLoS ONE* 15(4): e0232044. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0232044>

Silva, PNH, Dallo, BF, Pesenti, ACA, Medeiros, JM, Martins, A. y Machado, LP (2022). Prueba inmunocromatográfica rápida en el diagnóstico del moquillo canino. *Revista MVZ Córdoba*, 27 (1). <https://doi.org/10.21897/RMVZ.2046>

Arándiga, L. (2021). Revisión de la Parvovirus canina: actualización de las últimas técnicas diagnósticas y tratamientos médicos . *Universidad Católica de Valencia*, 1–51. Retrieved from <https://riucv.ucv.es/bitstream/handle/20.500.12466/1889/TFG- LORETO DE MIGUEL ARÁNDIGA.pdf?sequence=1>

Carrillo del Pino, J. (2023). *SINDROME VESTIBULAR CENTRAL COMO INDICADOR DE MASAS OCUPANTES DE ESPACIO INTRACRANEALES*. https://repositorio.unne.edu.ar/bitstream/handle/123456789/54429/RIUNNE_FVET_FG_Carrillo_Del_Pino_J.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Gétaz, L., & Castro Soto, M. del R. (2023). Sensibilidad de la prueba ELISA para detectar los anticuerpos IgG contra el *Strongyloides stercoralis* en pacientes inmunocomprometidos. *Gaceta Médica Boliviana*, 46(1), 14–17. <https://doi.org/10.47993/gmb.v46i1.613>

Mercado Michel, B., & Vásquez Michel, A. (2021). Validación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa En Tiempo Real (qPCR) acoplada a curvas melting como herramienta alternativa para el diagnóstico de Tuberculosis Mutidrogorresistente. *REVISTA CON-CIENCIA*, 9(1), 78–93. <https://doi.org/10.53287/vbagg9961cx41z>

Silva, PNH, Dallo, BF, Pesenti, ACA, Medeiros, JM, Martins, A. y Machado, LP (2022). Prueba inmunocromatográfica rápida en el diagnóstico del moquillo canino. *Revista MVZ Córdoba*, 27 (1). <https://doi.org/10.21897/RMVZ.2046>