



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES

CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título:

“DIAGNÓSTICO DEL VIRUS DISTEMPER Y PARVOVIRUS CANINO A TRAVÉS DE KITS RÁPIDOS Y qPCR EN LA CIUDAD DE LATACUNGA”

Proyecto de Investigación presentado previo a la obtención del Título de
Medica Veterinaria y Zootecnista

Autor:
Farías Román María Laura

Tutor:
Molina Cuasapaz Edie Gabriel MVZ. Mtr

LATACUNGA – ECUADOR

Agosto 2021

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

María Laura Farías Román con cédula de ciudadanía No. 0250013646, declaro ser autora del presente proyecto de investigación: “Diagnóstico del virus Distemper y Parvovirus canino a través de kits rápidos y qPCR en la ciudad de Latacunga”, siendo el MVZ. Mtr. Molina Cuasapaz Edie Gabriel, Tutor del presente trabajo; y, eximo expresamente a la Universidad Técnica de Cotopaxi y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales.

Además, certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Latacunga, 11 de agosto del 2021

María Laura Farías Román
Estudiante
CC: 0250013646

MVZ. Mtr. Edie Gabriel Molina Cuasapaz
Docente Tutor
CC: 1722547278

CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR

Comparecen a la celebración del presente instrumento de cesión no exclusiva de obra, que celebran de una parte **FARIAS ROMAN MARIA LAURA** identificada con cédula de ciudadanía **0250013646** de estado civil soltera, a quien en lo sucesivo se denominará **LA CEDENTE**; y, de otra parte, el Ingeniero Ph.D. Cristian Fabricio Tinajero Jiménez, en calidad de Rector, y por tanto representante legal de la Universidad Técnica de Cotopaxi, con domicilio en la Av. Simón Rodríguez, Barrio El Ejido, Sector San Felipe, a quien en lo sucesivo se le denominará **LA CESIONARIA** en los términos contenidos en las cláusulas siguientes:

ANTECEDENTES: CLÁUSULA PRIMERA. - **LA CEDENTE** es una persona natural estudiante de la carrera de Medicina Veterinaria titular de los derechos patrimoniales y morales sobre el trabajo de grado “Diagnóstico del virus Distemper y Parvovirus canino a través de kits rápidos y qPCR en la ciudad de Latacunga”, la cual se encuentra elaborada según los requerimientos académicos propios de la Facultad; y, las características que a continuación se detallan:

Historial Académico. -

Inicio de la carrera: Abril 2016 - Agosto 2016

Finalización de la carrera: Abril 2021 – Agosto 2021

Aprobación en Consejo Directivo: 20 de Mayo del 2021

Tutor: MVZ. Mtr. Edie Gabriel Molina Cuasapaz

Tema: “Diagnóstico del virus Distemper y Parvovirus canino a través de kits rápidos y qPCR en la ciudad de Latacunga”

CLÁUSULA SEGUNDA. - **LA CESIONARIA** es una persona jurídica de derecho público creada por ley, cuya actividad principal está encaminada a la educación superior formando profesionales de tercer y cuarto nivel normada por la legislación ecuatoriana la misma que establece como requisito obligatorio para publicación de trabajos de investigación de grado en su repositorio institucional, hacerlo en formato digital de la presente investigación.

CLÁUSULA TERCERA. - Por el presente contrato, **LA CEDENTE** autoriza a **LA CESIONARIA** a explotar el trabajo de grado en forma exclusiva dentro del territorio de la República del Ecuador.

CLÁUSULA CUARTA. - OBJETO DEL CONTRATO: Por el presente contrato **LA CEDENTE**, transfiere definitivamente a **LA CESIONARIA** y en forma exclusiva los siguientes derechos patrimoniales; pudiendo a partir de la firma del contrato, realizar, autorizar o prohibir:

1. La reproducción parcial del trabajo de grado por medio de su fijación en el soporte informático conocido como repositorio institucional que se ajuste a ese fin.
2. La publicación del trabajo de grado.
3. La traducción, adaptación, arreglo u otra transformación del trabajo de grado con fines académicos y de consulta.
4. La importación al territorio nacional de copias del trabajo de grado hechas sin autorización del titular del derecho por cualquier medio incluyendo mediante transmisión.
5. Cualquier otra forma de utilización del trabajo de grado que no está contemplada en la ley como excepción al derecho patrimonial.

CLÁUSULA QUINTA. - El presente contrato se lo realiza a título gratuito por lo que **LA CESIONARIA** no se halla obligada a reconocer pago alguno en igual sentido **LA CEDENTE** declara que no existe obligación pendiente a su favor.

CLÁUSULA SEXTA. - El presente contrato tendrá una duración indefinida, contados a partir de la firma del presente instrumento por ambas partes.

CLÁUSULA SÉPTIMA. - CLÁUSULA DE EXCLUSIVIDAD. - Por medio del presente contrato, se cede en favor de **LA CESIONARIA** el derecho a explotar la obra en forma exclusiva, dentro del marco establecido en la cláusula cuarta, lo que implica que ninguna otra persona incluyendo **LA CEDENTE** podrá utilizarla.

CLÁUSULA OCTAVA. - LICENCIA A FAVOR DE TERCEROS. - LA CESIONARIA podrá licenciar la investigación a terceras personas siempre que cuente con el consentimiento de **LA CEDENTE** en forma escrita.

CLÁUSULA NOVENA. - El incumplimiento de la obligación asumida por las partes en la cláusula cuarta, constituirá causal de resolución del presente contrato. En consecuencia, la resolución se producirá de pleno derecho cuando una de las partes comunique, por carta notarial, a la otra que quiere valerse de esta cláusula.

CLÁUSULA DÉCIMA. - En todo lo no previsto por las partes en el presente contrato, ambas se someten a lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, Código Civil y demás del sistema jurídico que resulten aplicables.

CLÁUSULA UNDÉCIMA. - Las controversias que pudieran suscitarse en torno al presente contrato, serán sometidas a mediación, mediante el Centro de Mediación del Consejo de la Judicatura en la ciudad de Latacunga. La resolución adoptada será definitiva e inapelable, así como de obligatorio cumplimiento y ejecución para las partes y, en su caso, para la sociedad. El costo de tasas judiciales por tal concepto será cubierto por parte del estudiante que lo solicitare.

En señal de conformidad las partes suscriben este documento en dos ejemplares de igual valor y tenor en la ciudad de Latacunga, a los 11 días del mes de agosto del 2021.

María Laura Farías Román
LA CEDENTE

Ing. Ph.D. Cristian Tinajero Jiménez
LA CESIONARIA

AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

En calidad de Tutor del Proyecto de Investigación con el título:

“DIAGNÓSTICO DEL VIRUS DISTEMPER Y PARVOVIRUS CANINO A TRAVÉS DE KITS RÁPIDOS Y qPCR EN LA CIUDAD DE LATACUNGA”, de Farías Román María Laura de la carrera de Medicina Veterinaria, considero que el presente trabajo investigativo es merecedor del Aval de aprobación al cumplir las normas, técnicas y formatos previstos, así como también ha incorporado las observaciones y recomendaciones propuestas en la Pre defensa.

Latacunga, 11 de agosto del 2021

MVZ. Mtr. Edie Gabriel Molina Cuasapaz

DOCENTE TUTOR

CC: 1722547278

AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

En calidad de Tribunal de Lectores, aprobamos el presente Informe de Investigación de acuerdo a las disposiciones reglamentarias emitidas por la Universidad Técnica de Cotopaxi; y, por la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales; por cuanto, la postulante: Farías Román María Laura, con el título del Proyecto de Investigación: “DIAGNÓSTICO DEL VIRUS DISTEMPER Y PARVOVIRUS CANINO A TRAVÉS DE KITS RÁPIDOS Y qPCR EN LA CIUDAD DE LATACUNGA”, ha considerado las recomendaciones emitidas oportunamente y reúne los méritos suficientes para ser sometido al acto de sustentación del trabajo de titulación.

Por lo antes expuesto, se autoriza realizar los empastados correspondientes, según la normativa institucional.

Latacunga, 11 de agosto del 2021

Lector 1 (Presidente)
Dra. Mg. Nancy Margoth Cueva Salazar
CC: 050161635-3

Lector 2
Dra. Mg. Janeth Elsa Molina Molina
CC: 050240963-4

Lector 3
Dr. Mg. Jorge Washington Armas Cajas
CC: 050155645-0

AGRADECIMIENTO

Quiero darles las gracias a mis amados padres, Edwin y Bélgica a mis hermanos y a mi pequeño sobrino, por ser mi constante fuente de inspiración y siempre alentarme a volar.

A mi tutor Dr. Molina Gabriel quien ha sido una parte fundamental de esta investigación ya que con su apoyo incondicional se ha podido culminar con este trabajo.

A las "clínicas veterinarias " en donde me abrieron las puertas para poder realizar mi investigación.

A los miembros de mi tribunal, por su apoyo en la revisión y elaboración de este trabajo.

A nuestra gloriosa Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Técnica de Cotopaxi y a todos los docentes que con su entusiasmo y su implicación en nuestra educación. Seremos excelentes Médicos Veterinarios Zootecnistas.

A mi novio Bryan que, gracias a su cariño, sus consejos y su apoyo me ayudó a seguir adelante ante tantas dificultades por estar incondicionalmente a mi lado.

María Laura Farías Román

DEDICATORIA

Primero gracias papito DIOS por darme la oportunidad de seguir adelante por darme la fuerza para nunca rendirme en este camino.

Con mucho orgullo va dedicado mi Trabajo de Grado a mi mamita Bélgica Román, y a mi papa Edwin Portilla ya que son el pilar fundamental en todos mis triunfos y logros. Gracias por su amor infinito, paciencia, trabajo, sacrificio y apoyo incondicional, he logrado llegar a cumplir mi meta, los amo

Mis hermanos, Cesar, Maribi, Paul, Luis, por ser mi ejemplo e inspiración a superarme cada día, gracias por estar siempre presentes, acompañándome, motivándome y enseñándome que todo es posible, con el simple hecho de dar el primer paso.

A mi sobrinito también gracias por ese inmenso cariño y dulcera que me brindas.

A mis amigos Marcelo, Ximena, Anderson, Bexy, Matthew, y Jhony, sin suda mis mejores recuerdos los tengo junto a ustedes, gracias por estar en los malos y buenos momentos.

María Laura Farías Román

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

TÍTULO: “DIAGNÓSTICO DEL VIRUS DISTEMPER Y PARVOVIRUS CANINO A TRAVÉS DE KITS RÁPIDOS Y qPCR EN LA CIUDAD DE LATACUNGA”

AUTOR: María Laura Farías Román

RESUMEN

Distemper y Parvovirus canino son enfermedades altamente contagiosas que afectan a perros de cualquier edad, aunque su incidencia es más alta en aquellos menos de un año. El diagnóstico confiable y tratamiento oportuno mejoran el pronóstico de los animales infectados. Por lo tanto, se comparó el diagnóstico del Distemper y Parvovirus canino entre la prueba molecular qPCR y los kits rápidos en casos clínicos de caninos domésticos, que acuden a los centros Veterinarios en la ciudad de Latacunga. Se analizaron 24 muestras de parvovirus canino de los cuales 19 muestras resultaron positivas a kits rápidos, se encontraron que 5 muestras de parvovirus diagnosticada por kits rápidos de resultados negativos dieron positivas a PCR en tiempo real, por otro lado 4 muestras de parvovirus positivas por kits rápidos dieron resultados negativos a qPCR esto comprueba que es una técnica altamente sensible y de alta especificidad para la detección del virus, a diferencia de los kits rápidos. Con Distemper canino hubo problemas con el proceso de estandarización, pero de las 6 muestras positivas de Distemper diagnosticadas por kits rápidos 2 dieron resultados positivos a qPCR. Los resultados de esta investigación permiten establecer que la qPCR es una técnica de diagnóstico recomendable para la detección de Parvovirus y Distemper canino, los resultados obtenidos mediante esta técnica son de mayor confianza y rapidez. Las pruebas rápidas utilizadas en la consulta veterinaria que en este y otros estudios han mostrado constantemente su baja sensibilidad.

Palabras clave: Parvovirus, Distemper, qPCR, Diagnóstico, kits rápidos.

TECHNICAL UNIVERSITY OF COTOPAXI
FACULTY OF AGRICULTURAL SCIENCES AND NATURAL RESOURCES

THEME: “DISTEMPER VIRUS AND CANINE PARVOVIRUS DIAGNOSIS THROUGH QUICK KITS AND qPCR IN LATACUNGA CITY”.

AUTHOR: Farías Román María Laura

ABSTRACT

Distemper and canine Parvovirus, which are highly contagious diseases that affect any age dogs, although their incidence is higher in the less than one-year-old. The reliable diagnosis and opportune treatment improve the infected animals' prognostic. So, it was compared the Distemper and canine Parvovirus diagnosis between the qPCR molecular test and the quick kits into domestic canines' clinical cases, which come to veterinary centers in Latacunga city. It was analyzed 24 canine parvovirus samples, which 19 samples were positive to quick kits, they were found that 5 parvovirus samples diagnosed by quick kits with negative results were positive by real-time PCR, on the other hand 4 positive parvovirus samples per quick kits gave negative results to qPCR, this proves that it is a highly sensitive and highly specificity technique for virus detection, unlike quick kits. With canine Distemper there were problems by the standardization process, but from 6 positive Distemper samples diagnosed through quick kits, 2 gave positive qPCR results. The research results allow to set that qPCR is a recommended diagnostic technique for the Parvovirus and canine Distemper detection, since the results obtained by this technique are more reliable and faster. The quick tests used into the veterinary clinic that into this and other studies have shown their low sensitivity consistently.

Keywords: Parvovirus, distemper, qPCR, diagnosis, quick kits.

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|--|------|
| DECLARACIÓN DE AUTORÍA | ii |
| CONTRATO DE CESIÓN NO EXCLUSIVA DE DERECHOS DE AUTOR | iii |
| AVAL DEL TUTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN | vi |
| AVAL DE LOS LECTORES DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN..... | vii |
| AGRADECIMIENTO..... | viii |
| DEDICATORIA..... | ix |
| RESUMEN..... | x |
| ABSTRACT | xi |
| ÍNDICE DE TABLAS | xv |
| ÍNDICE DE GRAFICOS..... | xvi |
| INDICE DE FIGURAS | xvii |
| 1. INFORMACIÓN GENERAL | 1 |
| 2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO..... | 2 |
| 3. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO | 3 |
| 4. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN | 3 |
| 5. OBJETIVOS:..... | 4 |
| 6. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA..... | 4 |
| 6.1 El Distemper canino | 4 |
| 6.2 Transmisión..... | 4 |
| 6.3 Patogenia | 5 |
| 6.3 La infección clínica | 5 |
| 6.4 Forma Subaguda..... | 5 |
| 6.5 Forma Crónica..... | 6 |
| 6.6 Lesiones..... | 6 |
| 6.7 Diagnóstico | 6 |
| 6.8 Diagnóstico diferencial | 7 |
| 6.9 Tratamiento y Prevención | 7 |
| 6.10 Parvovirus canino | 7 |
| 6.11 Etiología..... | 8 |
| 6.12 Patogenia..... | 8 |
| 6.13 Signos clínicos | 8 |
| 6.14 Diagnóstico | 9 |

| | |
|---|----|
| 6.15 Diagnóstico diferencial | 9 |
| 6.16 Tratamiento | 9 |
| 6.17 qPCR | 9 |
| 6.18 Elementos químicos que necesita la qPCR..... | 10 |
| 6.19 Desnaturalización | 11 |
| 6.20 Hibridación | 11 |
| 6.21 Extensión | 11 |
| 6.22 ¿Cuáles son los métodos para detectar los productos amplificados? | 12 |
| 6.23 ¿Cómo se captura la señal de fluorescencia? | 12 |
| 6.24 Cómo se analizan los resultados | 13 |
| 6.25 Ventajas de la qPCR..... | 14 |
| 7. VALIDACION DE HIPÓTESIS | 15 |
| 8. MÉTODOLOGÍAS Y DISEÑO EXPERIMENTAL..... | 15 |
| 8.1 Metodología | 15 |
| 8.3 Diseño de la investigación | 16 |
| 8.3.1 Método de investigación | 16 |
| 8.3.2 Tipo de investigación | 16 |
| 8.3.3 Método descriptivo | 16 |
| 8.3.4 Método comparativo | 16 |
| 8.4. Técnica y procedimiento para la recolección de datos | 16 |
| 8.5 Recolección de la historia clínica y muestras de pacientes..... | 17 |
| 8.6. Instrucciones para la toma de muestra para la detección de Parvovirus canino por qPCR..... | 17 |
| 8.7 Instrucciones para la toma de muestra para la detección de Distemper canino por qPCR | 17 |
| 8.8 qPCR. | 17 |
| 8.9 Para la extracción de material genético de ADN O ARN de Parvovirus canino (CPV) y Distemper canino (CDV)..... | 18 |
| 8.10 Para la preparación de una reacción de 15uL de qPCR para detectar Parvovirus canino (CPV) se utilizaron los siguientes reactivos:..... | 21 |
| 8.11 Para la preparación de una reacción de 16uL de qPCR para detectar Distemper canino (CDV) se utilizaron los siguientes reactivos: | 21 |
| 8.12 Las condiciones de ciclos térmicos para la amplificación en el caso de Parvovirus canino (CPV) y Distemper canino (CDV) fueron: | 21 |
| 8.13 Materiales | 22 |
| 9. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS..... | 23 |

| | |
|--|----|
| 9.1.1 La situación de la vacunación frente a CPV y la CDV..... | 27 |
| 10. IMPACTOS (TÉCNICOS, SOCIALES, AMBIENTALES O ECONÓMICOS..... | 32 |
| 10.1 Impacto técnico | 32 |
| 10.2 Impacto social | 32 |
| 10.3 Impacto económico..... | 32 |
| 11. CONCLUSIONES | 33 |
| 13. BIBLIOGRAFIA | 35 |
| 1. ANEXOS..... | 40 |
| Anexo 3. Hoja de vida del tutor del proyecto..... | 42 |
| Anexo 4. Historia clínica de Parvovirus y Distemper canino. | 42 |
| Anexo 4. Reportes de los resultados de Parvovirus canino y Distemper canino..... | 45 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Representación de los resultados del estado de vacunación. | 27 |
| Tabla 2. Prevalencia de acuerdo a la edad. | 29 |
| Tabla 3. Comparación de costos de los kits rápidos vs costos de qPCR. | 31 |

ÍNDICE DE GRAFICOS

| | |
|--|----|
| Gráfico 1. Representación de los resultados tanto positivos como negativos de Parvovirus (CPV) y Distemper canino (CDV) de los kits rápidos. | 24 |
| Gráfico 2. Representación de los resultados tanto positivos como negativos de Parvovirus (CPV) y Distemper canino (CDV) de qPCR. | 24 |
| Gráfico 3. Presentación de los resultados de signos clínicos de Parvovirus (CPV) y Distemper canino (CDV). | 28 |
| Gráfico 4. Casos positivos y porcentaje de Parvovirus (CPV) y Distemper canino (CDV) de acuerdo a la edad en los animales investigados. | 30 |
| Gráfico 5. Diagnóstico de Parvovirus (CPV) y Distemper canino (CDV) canino de acuerdo a la raza. | 31 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Curva de Disociación o curva Melting | 14 |
| Figura 2. Mapa del cantón Latacunga, donde se encuentra los centros veterinarios. (34) | 15 |
| Figura 3. Las muestras fueron transportadas en el buffer DNA/RNA Shield hasta el laboratorio. | 18 |
| Figura 4. Posteriormente, se tomó 200ul de cada muestra y se mezcló con 400ul de Viral RNA Buffer que forma parte del kit. | 18 |
| Figura 5. Para transferir la mezcla a una columna de silicio. | 19 |
| Figura 6. Se realizaron dos lavados con Viral Wash Buffer. | 19 |
| Figura 7. Centrifugar por 2 minutos a 12000rpm. | 19 |
| Figura 8. Por último, se añadió etanol (96%) a la columna para remover el buffer de lavado. | 19 |
| Figura 9. Se transfirió la columna de extracción a un tubo Eppendorf para mezclar el material genético con agua libre de nucleasas. | 19 |
| Figura 10. Amplificación e interpretación de los resultados. | 19 |
| Figura 11. Interpretación de resultados de Kits Rápidos. | 26 |

1. INFORMACIÓN GENERAL

Título del Proyecto:

Diagnóstico del virus Distemper y Parvovirus canino a través de KITS rápidos y qPCR en la ciudad de Latacunga.

Fecha de inicio:

20-04-2020

Fecha de finalización:

04-07-2020

Lugar de ejecución:

Latacunga, Cotopaxi

Facultad que auspicia

Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales

Carrera que auspicia:

Medicina veterinaria

Proyecto de investigación vinculado:

Diagnóstico molecular enfermedades de atención veterinaria

Equipo de Trabajo:

Estudiante investigador: María Laura Farias Román

Docente tutor: MVZ. Mtr. Edie Gabriel Molina Cuasapaz

Área de Conocimiento:

Área: Agricultura

Subárea: Veterinaria

Línea de investigación:

Salud Animal

Sub líneas de investigación de la Carrera:

Microbiología, Parasitología, Inmunología y Sanidad animal

2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

El moquillo canino es una de las enfermedades infecciosas más importantes que afectan a los caninos en todo el mundo. El cual afecta un rango importante de órganos incluyendo tejidos linfoides, piel, encéfalo y tractos intestinal y respiratorio, lo cual se traduce en una variedad de síntomas de carácter respiratorio, entérico y nervioso, la principal vía de infección de este virus es a través de los exudados respiratorios en forma de microgotas o aerosol, aunque también ha sido aislado de diversos tejidos y secreciones como la orina, heces y secreciones oculares. (1)

El parvovirus canino es una enfermedad vírica altamente contagiosa y causa principalmente una enfermedad gastrointestinal, es una de las causas más importantes que provocan mortalidad en cachorros. De aquí se deduce la importancia de realizar diagnósticos precisos con mayor confiabilidad para mejorar el pronóstico de los pacientes.

La presente investigación está enfocada en dar a conocer la eficacia de la técnica qPCR usada para detectar la enfermedad de Distemper y Parvovirus canino y la importancia de dar un diagnóstico seguro de las enfermedades que son altamente contagiosas y mortales, debido a que día a día se presentan de forma muy frecuente en las clínicas veterinarias, donde el pronóstico lamentablemente no es favorable para el animal, por lo que dar resultados correctos es indispensable para poder realizar un correcto control de los pacientes evitando que las enfermedades se sigan propagando e infectando a más animales. Y el estudio del diagnóstico puede ser de alguna manera beneficioso para comprobar la infección en poblaciones susceptibles.

Es indispensable implementar, en el área de Laboratorio Clínico, técnicas que ayuden a los Médicos Veterinarios a obtener de manera segura y confiable resultados correctos de distintas enfermedades para dar un diagnóstico final y por ende un mejor tratamiento para los pacientes.

Por lo tanto, en la presente investigación se diagnosticó del virus del Distemper y Parvovirus canino estimada a través de qPCR en casos clínicos de caninos domésticos en la ciudad de Latacunga. Esta investigación es una verdadera opción para incorporar la técnica de qPCR ya que el método más sensible para detectar y cuantificar la presencia de los microorganismos en los animales.

3. BENEFICIARIOS DEL PROYECTO

3.1 Directos

- Las mascotas que presentan el Distemper y Parvovirus canino.
- Los Centros Veterinarios, del cantón Latacunga.

3.2 Indirectos

- Los propietarios de mascotas.
- Médicos veterinarios que trabajan en clínicas de menores.
- Población en general.

4. EL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

El problema radica en la desconfianza en el diagnóstico de las enfermedades de alta prevalencia como Distemper y Parvovirus canino considerándose unas de las enfermedades mortales y un foco de infección para otros animales siendo importante poder detectar a tiempo las enfermedades.

Hoy en día el moquillo canino, al que también se conoce como Distemper, es el precursor de un elevado porcentaje de mortalidad de caninos doméstico. La deficiencia de medidas de atención y la no rutina en el riguroso control de vacunaciones son los principales motivos de la enfermedad viral.

Al igual que el Parvovirus canino, es uno de los principales agentes virales que afectan a los caninos sin importar la edad, siendo los cachorros los más propensos a sufrirla. Actualmente la situación epidemiológica mundial de la enfermedad es de tipo enzootia, a pesar de que existe vacunación, y es preocupante, porque su difusión va en aumento en la población. (2)

Por la cual los centros veterinarios de Latacunga tienden a una gran cantidad de animales que presentan síntomas de Distemper y Parvovirus, pero en ocasiones el diagnóstico se realiza con pruebas que no tienen un 100% de precisión. Además, los dueños de las mascotas no suelen costear exámenes complementarios debido a que tienen precios relativamente elevados y generalmente están fuera de su presupuesto. Cabe mencionar que las pruebas moleculares no han sido usadas en las clínicas veterinarias a causa del costo excesivo y a su vez por la falta disponibilidad para las mismas. Sin embargo, dado el desarrollo y el uso cada vez más frecuente de las pruebas moleculares, especialmente en el diagnóstico de COVID-19 en humanos, los costos de las mismas han reducido considerablemente, al punto de costar lo mismo que pruebas diagnósticas basadas en la detección de inmunoglobulinas.

Consecuentemente, una forma muy importante para ayudar a controlar estas enfermedades es un diagnóstico temprano para lo cual se necesita el empleo de pruebas que permiten diagnosticar las enfermedades, como la técnica qPCR que son más específicas, sensibles, que las pruebas convencionales que se utilizan actualmente en clínicas veterinarias.

5. OBJETIVOS:

5.1 Objetivo General

- Comparar el diagnóstico del Distemper y Parvovirus canino entre la prueba molecular qPCR y los kits rápidos en casos clínicos de caninos domésticos, que acuden a los centros Veterinarios en la ciudad de Latacunga.

5.2 Objetivo específicos

- Estimar la variación entre las pruebas rápidas y la prueba qPCR en el diagnóstico de Parvovirus y Distemper canino.
- Determinar los factores de riesgo asociados a la presentación de las enfermedades.
- Analizar el costo beneficio de la implementación del diagnóstico del Distemper y Parvovirus canino a través con la metodología qPCR en la ciudad de Latacunga.

6. FUNDAMENTACIÓN CIENTÍFICO TÉCNICA

6.1 El Distemper canino

El moquillo canino fue descrito por Edward Jenner en 1809 y su etiología fue señalada por Carré en 1906. Es una enfermedad infecciosa causada por un agente viral del orden Mononegavirales, familia Paramyxoviridae, género Morbillivirus, que produce una infección sistémica con altos índices de morbilidad y apreciable letalidad, principalmente en animales jóvenes y desprotegidos inmunológicamente. (3)

El Distemper canino es probablemente la enfermedad viral y altamente contagiosa de mayor distribución mundial. 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. (4)

6.2 Transmisión

La transmisión se produce directamente a través de aerosoles de secreciones respiratorias o a través de secreciones oculares, orina y heces. CDV se elimina 7 días después de la infección y, en casos extremos, puede extenderse durante 60 a 90 días. Debido a la inestabilidad fuera del huésped, el virus se deteriorará rápidamente, por lo que la contaminación indirecta es rara. El

contacto entre animales recién infectados, subclínicos o enfermos mantendrá la infección de los cachorros, que son el grupo más vulnerable. Los perros que se recuperan de una infección son inmunes a la vida y ya no liberan patógenos al medio ambiente. Algunas personas pueden portar el virus en su sistema nervioso central. (5)

6.3 Patogenia

Dentro de la patogenia de esta enfermedad, se conoce que la principal vía de infección de este virus es a través de secreciones orales o nasales que se dispersan en forma de aerosoles o por contacto de individuos afectados con susceptibles. El órgano de replicación inicial es el tejido linfoide del tracto respiratorio superior, dispersándose posteriormente a todo el organismo en las células mononucleares del torrente sanguíneo, como el sistema respiratorio, digestivo y nervioso, dependiendo del estado inmunitario del animal, produciendo neumonía, gastroenteritis, alteraciones en la piel y afección del sistema nervioso central. (6)

El virus de Distemper Canino (CDV) posee un ARN monocatenario de polaridad negativa, con nucleocápside helicoidal, rodeada de una envoltura lipoproteica que contiene proteínas como Hemaglutinina (H), de Fusión (F) y de Matriz (M), las que participan en los mecanismos de infección, replicación viral y determinan el tropismo. Mundialmente se conoce un solo serotipo. (7)

La hemaglutinina (H) y la proteína de fusión (F) son las responsables de la unión y fusión con la célula. El gen H tiene la mayor variabilidad en todo el genoma, este gen se utiliza para clasificar las diferentes cepas virales. (8)

6.3 La infección clínica

Este es el método más común. El período de incubación (desde la infección hasta la aparición de los síntomas clínicos) suele ser de 7 a 1 días. Dentro de 3 a 7 días, aparecen fiebre y leucopenia y casi siempre pasan desapercibidas. La fiebre suele remitir en unos pocos días hasta que se desarrolla una segunda ola de fiebre con conjuntivitis, rinitis y pérdida del apetito. Pueden persistir signos gastrointestinales y respiratorios como tos, diarrea, vómitos, pérdida de apetito, deshidratación y pérdida de peso. (9)

6.4 Forma Subaguda

Los signos subagudos del SNC pueden variar de Enfermedades sistémicas, como mielitis aguda cerebral. El sistema nervioso incluye: contracciones y espasmos musculares involuntarios locales o grupos de músculos. Comienza la parálisis Generalmente en las extremidades posteriores (ataxia). Convulsiones, salivación excesiva, ejercicio, masticar, pedalear, orinar o

defecar involuntariamente, hiperestesia, vocalización y reacciones de miedo. ceguera. Dependiendo de la gravedad de la infección. Después de recuperarse del moquillo canino agudo o de manifestaciones no evidentes, la enfermedad neurológica puede tardar semanas o incluso meses en aparecer. Se puede observar hiperqueratosis en las almohadillas de los pies y la nariz. (9)

6.5 Forma Crónica

Se han encontrado dos formas crónicas en perros adultos. La primera es causada por un proceso inmunomediado que produce una encefalitis multifocal que progresa lentamente (encefalitis por moquillo canino múltiple). Esta forma suele presentarse en perros de entre 4 y 8 años. Se manifiesta como debilidad en las extremidades traseras, falta de respuesta a las amenazas, parálisis y temblores de cabeza. La recuperación de este tipo de infección por VDC es posible. (10)

6.6 Lesiones

Las lesiones iniciales ocurren alrededor de tres semanas post infección y se desarrollan durante un período de inmunosupresión inducida por el virus, por lo tanto, no son lesiones inflamatorias, no hay presencia de manguitos perivasculares. Se ha demostrado que esta desmielinización coincide con la replicación del virus del CDV en las células gliales de la sustancia blanca, astrocitos y oligodendrocitos. En las fases tardías de la enfermedad, la desmielinización continúa avanzando a pesar de una clara disminución del ARN y antígeno viral a nivel del SNC. Así mismo, comienza a haber una fuerte respuesta inflamatoria humoral y celular, caracterizada por infiltración de células mononucleares y un aumento de las IgG. Por lo tanto, se han considerado mecanismos inmunopatogénicos dirigidos hacia antígenos propios como causa de la progresión del proceso desmielinizante (1)

6.7 Diagnóstico

Se basa en la presencia de al menos tres de los signos que se mencionan a continuación: hipertermia (39,5 °C o más); secreción ocular y/o nasal; disnea; diarrea y/o vómitos; lesiones cutáneas; hiperqueratosis en almohadilla plantar y hocico; signos nerviosos compatibles y persistencia de la sinología por más de tres semanas. Para confirmar el diagnóstico, las principales pruebas que se pueden utilizar para este fin son: Inmunofluorescencia directa (DIF): Puede detectar virus en hisopos conjuntivales, mucosa genital, tejido, sangre, líquido cefalorraquídeo u orina. La Prueba ELISA: esta es una prueba útil porque la IgM de un perro infectado durará de 5 semanas a 3 meses, dependiendo de la cepa del huésped y la respuesta. La Inmunocitoquímica: permite la detección de antígenos virales y cuerpos de inclusión en

glóbulos blancos, improntas vaginales, prepucios o conjuntivales, líquido de lavado bronquial, sedimento de orina o líquido cefalorraquídeo al inicio de la infección. La RT-PCR: la infección se puede confirmar el día después de que ocurra la infección porque puede amplificar fragmentos de ácido nucleico de manera exponencial, incluso si solo hay una molécula en la muestra. Observar las partículas de virus en las heces a través de un microscopio electrónico. (11)

6.8 Diagnóstico diferencial

Diagnóstico diferencial con hepatitis canina, parvovirus, leptospirosis, toxoplasmosis y rabia. El diagnóstico también se basa en el aislamiento del virus en cultivo celular durante la fase aguda de la enfermedad. (12)

6.9 Tratamiento y Prevención

No existen fármacos antivirales efectivos para el tratamiento de la infección por CDV. El tratamiento recibe en la terapia de soporte (expectorantes, mucolíticos, fluidos y anti eméticos) y en la administración de antibacterianos profilácticos. Los ataques deben ser controlados con anticonvulsivos. En los casos crónicos es habitual utilizar corticoesteroides si existe evidencia de inflamación, y normalmente se obtiene una buena respuesta; no obstante, existe el riesgo de que la inmunosupresión impide la eliminación del virus en casos agudos. El uso de neutralizantes de radicales libres y antioxidantes como por ejemplo vitaminas (E y C) también puede ser útil. El tratamiento procainamida o clonazepam está descrito, aunque no suele tener éxito. La eutanasia puede estar indicada cuando la afección neurológica es grave pero muchos perros pueden llevar vidas casi normales con control de las mioclonías y los ataques. (13)

6.10 Parvovirus canino

El Parvovirus Canino (PVC) emergió como una enfermedad viral sumamente contagiosa reconocida por primera vez en 1977. Desde entonces, se ha establecido como un patógeno entérico para los perros alrededor del mundo. "Parvo" significa pequeño (latín), este virus es miembro de la familia Parvoviridae, género Protoparvovirus y especie Protoparvovirus de los carnívoros. (14)

El parvovirus canino (CPV) causa principalmente una enfermedad gastrointestinal (GI), es una de las causas más importantes de muerte de los cachorros domésticos y salvajes de todas las edades, aunque principalmente a cachorros de entre 3 a 6 meses de edad; este ocasiona enteritis hemorrágica; siendo esta la causa más común de morbilidad y mortalidad en caninos jóvenes. (15)

6.11 Etiología

El parvovirus canino contiene una cadena simple de ADN, conformada por alrededor de 5000 bases. Es un virus muy pequeño que posee una cápside compuesta por dos proteínas mayores, denominadas VP1 (viral proteína 1) y VP2. CPV-2 no tiene envoltura de virus, lo que lo hace altamente resistente a los solventes. Cambios de lípidos, temperatura y pH, lipídicos, a la temperatura y a los cambios de pH. (16)

En la actualidad existen tres variantes virales detectadas en los casos de parvovirus canina; la variante CPV 2a, CPV 2b y CPV2c. (17)

El cuadro clínico patológico del CPV cursa con enteritis grave, ocasionalmente se produce miocarditis, muerte súbita o edema pulmonar en cachorros de cuatro a 10 semanas de edad. La enfermedad se caracteriza por producir anorexia, depresión, vómito, diarrea hemorrágica profusa, deshidratación; en casos muy graves la muerte. (18)

6.12 Patogenia

Los cachorros se infectan por contacto directo con las heces de otros cachorros infectados o por transmisión vertical de la madre infectada. El CPV se replica primero en el tejido linfoide de la faringe y en las placas de Peyer, entonces se produce viremia en los tejidos principales donde se encuentran las células. (2)

Después de un periodo de incubación que dura 4 a 6 días, el canino comienza con depresión, vómitos y diarreas. El virus invade las células epiteliales en división activa en las criptas del intestino delgado, Las células de este tejido provocan el acortamiento y la reducción de las vellosidades de la capacidad de absorción y digestión; que da paso a la diarrea, lo cual produce una intensa hemorragia en la luz intestinal de los cachorros gravemente afectados. (19)

6.13 Signos clínicos

El parvovirus canino (CPV) causa dos formas diferentes de enfermedad: miocarditis y enteritis. El período de incubación es de tres a ocho días y el virus puede excretarse el tercer día antes de que aparezcan los síntomas clínicos. Los síntomas clínicos pueden variar, dependiendo de la edad y el estado inmunológico del animal infectado, así como de las especies susceptibles. En la forma intestinal hay hipertermia entre 40 y 41 ° C, debilidad, anorexia y vómitos. Diarrea mucosa con sangre con heces y olor a sangre característicos, deshidratación severa, pérdida de peso, malestar abdominal y signos de dolor. En la forma cardíaca, pueden aparecer algunos signos previos; dificultad para respirar, gemidos, muerte súbita. La insuficiencia cardíaca congestiva también puede ocurrir en cachorros aparentemente normales entre las 6 semanas y

los 6 meses de edad. Los cachorros con problemas cardiacos tienen menos posibilidades de supervivencia, si se recuperan, tendrán secuelas como miocarditis, insuficiencia cardíaca congestiva, intolerancia al ejercicio, tos y dificultad respiratoria. (20)

6.14 Diagnóstico

Los síntomas clínicos presentes en perros infectados con parvovirus suelen ser muy indicativos de esta enfermedad, pero el diagnóstico se confirma mediante analítica en sangre (disminución del número de leucocitos/linfocitos en sangre que son las células de la defensa frente a infecciones), aunque también se puede testar la detección del parvovirus en una prueba rápida de antígenos en las heces del animal. Esta prueba puede dar resultados falsos negativos 3-4 días después de la infección porque el virus no se elimina en este momento. Esta excreción ocurre alrededor de los días 8-10; entonces es más fácil realizar el diagnóstico mediante la prueba de antígenos, que requiere una confirmación final mediante PCR. (21)

6.15 Diagnóstico diferencial

Existen otros procesos patológicos que pueden presentar manifestaciones clínicas similares a la enteritis por parvovirus, como moquillo canino, infección por coronavirus, hepatitis, gastroenteritis hemorrágica, enteritis parasitaria e infección bacteriana. Infección por coronavirus: el curso de la enfermedad es leve y la tasa de mortalidad es baja. Incluso sin tratamiento, los animales generalmente se recuperan en 6-9 días, pero la identificación clínica es imposible. Moquillo canino: se produce diarrea, pero también pueden producirse problemas respiratorios, nerviosismo, etc. Enteritis parasitaria: a veces puede ocurrir al mismo tiempo. (22)

6.16 Tratamiento

Como la mayoría de las infecciones virales, el parvovirus canino no tiene un tratamiento específico. Se basa en síntomas clínicos y pruebas de laboratorio, basadas principalmente en combatir la deshidratación, el desequilibrio electrolítico, la invasión bacteriana, los vómitos y las diarreas severas. Además, el uso correcto de fármacos, como También son importantes los eméticos, analgésicos, antibióticos, antiespasmódicos (hidrocloruro de difenoxilato e hidrocloruro de loperamida). La clave es prevenir la hipovolemia, las endotoxinas y el shock neurogénico. (23)

6.17 qPCR

El primero en sentar las bases para el desarrollo de la PCR en tiempo real fue Higuchi. En 1992, mediante la grabación de video en tiempo real de la incorporación de bromuro de etidio en el

ADN durante cada ciclo de PCR realizado bajo luz ultravioleta. Desde entonces, el objetivo de la PCR en tiempo real ha sido detectar y cuantificar secuencias de ácido nucleico específicas mediante el uso de genes indicadores fluorescentes en las reacciones. El principio de esta tecnología se basa en la PCR de punto final, pero el método de detección y análisis de productos amplificados es diferente. (24)

El término "tiempo real" significa que la detección del producto amplificado ocurre en cada ciclo de la reacción. Por su parte, el término "cuantitativo" se refiere a la capacidad de cuantificar la cantidad de ADN en una muestra, que es diferente a la PCR de punto final, que no puede detectar o cuantificar la secuencia diana en tiempo real. Para ser precisos, las dos últimas características representan las grandes ventajas de la PCR en tiempo real, porque a medida que avanza la reacción, los productos amplificados son monitoreados sin necesidad de manipularlos en un gel de agarosa para ver si la reacción fue exitosa, porque sucede. Reacción en cadena de la polimerasa al final. (25)

En la actualidad, la PCR cuantitativa fluorescente en tiempo real es el método más sensible para detectar y cuantificar ácidos nucleicos. Incluso con una cantidad muy pequeña de templado, el sistema puede garantizar una alta sensibilidad, especificidad y eficiencia. Una de sus aplicaciones más comunes es cuantificar cambios muy pequeños en la expresión génica mediante la detección de niveles de ARNm en células o tejidos. La cantidad de ARNm que se puede detectar en la reacción puede provenir de una concentración baja en lugar de la PCR, y se requiere una concentración más alta para el punto final. (26)

6.18 Elementos químicos que necesita la qPCR

El principal elemento de la PCR es el ADN y sus propiedades químicas aportan ventajas para su funcionamiento. Para entrar en el contexto, es importante recordar que la molécula de ADN está compuesta por tres componentes: azúcar (desoxirribosa), grupos fosfato y bases nitrogenadas (adenina, timina, guanina o citosina) que son complementarias al ADN. Las bases de la otra hebra estructuran el ADN en una doble hélice de esta manera. En la PCR, la hibridación separa las hebras de ADN y sirve como molde para que las enzimas sinteticen nuevas hebras que portan la secuencia diana. En lo que respecta a la ADN polimerasa, se encarga de catalizar la reacción y sintetizar nuevas hebras de ADN con secuencias blancas. La enzima más utilizada se llama ADN polimerasa Taq. (27)

La primera es una secuencia de oligonucleótidos, ubicada a ambos lados de la secuencia diana a amplificar, delimitar y complementar a la misma. En la PCR se utilizan dos secuencias de

cebadores diferentes, una se llama "directa" o sentido, la otra se llama "recompensa" o antisentido, ambas deben diseñarse para hibridar con la plantilla y la hebra de ADN puede pasar a través de la extensión de la polimerasa Taq. Para ellos, los dNTP son los ladrillos o bases nitrogenadas que usa la polimerasa Taq para construir nuevas cadenas de ADN. Son factores importantes que afectan la especificidad de la reacción, por lo que su concentración debe ser suficiente, de lo contrario afectarán la función de la polimerasa Taq. El tampón es la solución tampón utilizada en la reacción, generalmente compuesta de Tris-HCL (pH = 8). (27)

El magnesio es un cofactor enzimático que incide en la especificidad de la reacción, por lo que debe tener una concentración suficiente para no afectar el desempeño de la polimerasa Taq; usualmente su concentración oscila entre 0.5 a 2.5 mM. A veces ya está contenido en el búfer, pero en otros casos debe agregarse. El agua es el solvente en la reacción y se usa en forma destilada sin nucleasa (enzima que degrada el ácido nucleico). (28)

Posteriormente durante cada ciclo se repiten tres etapas:

6.19 Desnaturalización

En esta etapa, las hebras de ADN se calientan y separan a una temperatura de 95 ° C durante 20-30 segundos; el tiempo depende de la secuencia de hibridación, es decir, si el número de GC es grande, tomará más tiempo para el enlace a romperse, debido a estas bases. El emparejamiento consta de tres enlaces, uno más que la base AT. También depende de la velocidad a la que el termociclador eleva la temperatura, que depende del modelo del dispositivo. Al final de esta fase, tenemos una cadena separada como siguiente control de temperatura. (24)

6.20 Hibridación

En esta etapa, el cebador se alinea en el extremo del molde previamente aislado y se hibrida con su secuencia complementaria. Para formar un complejo de imprimación caliente, es importante que la temperatura de recocido o temperatura de fusión (T_m) sea óptima, normalmente entre 50-60°C. Si el diseño del cebador es correcto y la temperatura adecuada, la estabilidad y especificidad del complejo son eficaces. (24)

6.21 Extensión

En esta etapa, la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y empieza su función catalítica a una velocidad muy rápida; agrega dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN. La extensión de las cadenas es en dirección de la síntesis del ADN, es decir, de 5 a 3. La temperatura óptima para la reacción es de 72 °C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional. Al final del ciclo, se habrán formado los amplicones con un tamaño

dictado por el número total de pares de bases (pb) que deberá ser conocido por el investigador. (24)

6.22 ¿Cuáles son los métodos para detectar los productos amplificados?

La monitorización del producto amplificado durante la reacción es un paso importante de la PCR en tiempo real, y su estrategia técnica para lograr buenos resultados es un sistema basado en genes indicadores fluorescentes. En general, estos sistemas se pueden dividir en dos métodos diferentes: específicos y no específicos. El método no específico se basa en el uso de moléculas intercaladas que tienen afinidad por el ADN bicatenario y producen una señal fluorescente cuando se oxidan. La fluorescencia emitida se captura durante la fase de extensión de cada ciclo y es proporcional al número de copias de ADN bicatenario obtenidas en cada ciclo de PCR. (29)

El gen indicador más utilizado para estos fines se llama SYBR Green. Es una molécula cargada positivamente que en realidad no emite fluorescencia cuando no se une al ADN bicatenario en solución; sin embargo, cuando interactúa con pequeñas cantidades de ADN. Se combinan, su fluorescencia aumenta 1000 veces. El software de la mayoría de los termocicladores ahora proporciona esta función fácil de aplicar y analizar. El método específico y el método no específico parten de principios diferentes y tienen una señal fluorescente de emisión común para detectar el producto amplificado. Estos métodos siguen un principio llamado transferencia de energía por resonancia de fluorescencia para generar señales; este método implica transferir energía de un gen donante o indicador fluorescente a un aceptor. Para ello, existen dos métodos específicos, que son: ensayos basados en hidrólisis e hibridación. (30)

6.23 ¿Cómo se captura la señal de fluorescencia?

Cualquier método utilizado para detectar el producto amplificado en cada ciclo de reacción requiere la tecnología incluida en el termociclador qPCR para:

- excitar al reportero
- capturar la señal de emisión del mismo
- realizar el análisis cuantitativo

Para ello existen en el mercado diferentes tipos de termocicladores, cuyas principales diferencias están en la fuente de energía utilizada para la excitación. Básicamente, existen tres fuentes: bombillas, diodos emisores de luz (LED) y láseres. Independientemente de la fuente, el reportero se excita primero y su señal de emisión se recoge a través de un filtro que permite el paso de la longitud de onda adecuada que llega a un fotodetector que recoge la información

de la muestra para su análisis en el software de la computadora. Otras características notables son la velocidad de calentamiento o enfriamiento en cada etapa de la reacción, la cantidad de muestras que se pueden soportar, los consumibles de reacción y el kit utilizado para la amplificación; en algunos casos, solo se utilizan reactivos del proveedor del termociclador. es decir, son sistemas cerrados, y en otros casos se pueden utilizar reactivos de diferentes proveedores, es decir, son sistemas abiertos. (31)

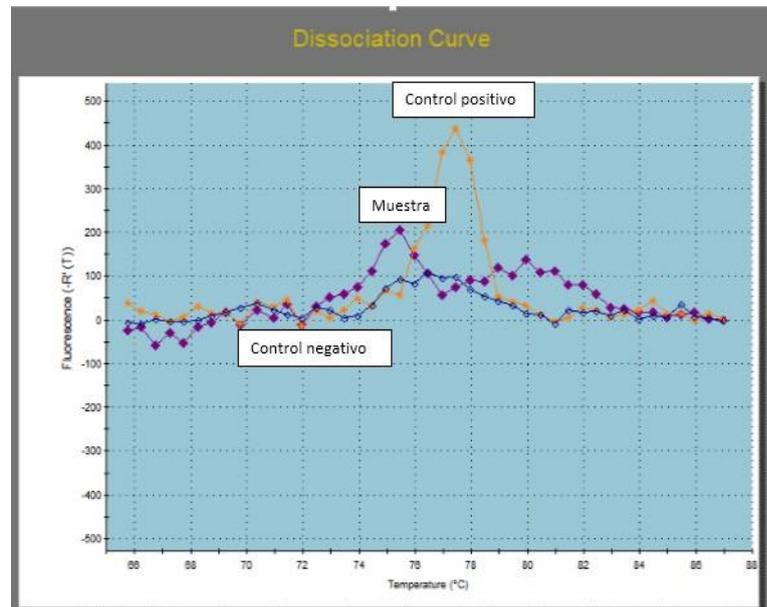
6.24 Cómo se analizan los resultados

Detectar la amplificación en tiempo real y capturar la fluorescencia de cada muestra no es suficiente; analizar la reacción es el paso final para determinar la cuantificación de genes. Para este propósito, los termocicladores están provistos de un PC con un software generalmente fácil de usar. Este software genera una serie de gráficos que muestran todos los datos necesarios para saber si la respuesta fue exitosa. (31)

Uno de estos gráficos es de amplificación, que muestra el curso y el progreso de la reacción, y otro gráfico es la curva de disociación o curva de fusión, que muestra información sobre la especificidad de la reacción. Otro paso importante en el análisis es la elección del tipo de cuantificación utilizado para determinar la amplificación exacta del gen diana; Este procedimiento depende de los intereses del investigador. Hay dos tipos de cuantificación para esto: absoluta y relativa. (32)

El primero se usa generalmente para averiguar el número exacto de copias amplificadas del blanco o la concentración exacta de ácidos nucleicos en una muestra. En la práctica, este tipo de cuantificación se utiliza para medir la carga viral o bacteriana en diferentes tejidos. Cuando es necesario evaluar cambios en la expresión génica en varios estados fisiológicos, se utiliza la segunda. Estos cambios se basan en el nivel de ARNm del gen diana en comparación con el gen de referencia (gen de mantenimiento) Aunque el estado fisiológico puede cambiar por varias razones, su expresión no cambiará. Los datos se expresan en relación con el gen de referencia y generalmente se denominan el número de veces que los niveles de ARNm aumentaron o disminuyeron, o cuando no hubo cambios. Independientemente del tipo de cuantificación seleccionado, casi todo el software del dispositivo es capaz de realizar los análisis matemáticos y estadísticos necesarios para cada tipo de cuantificación. (33)

Figura 1. Curva de Disociación o curva Melting.



Fuente: VetNAAT

6.25 Ventajas de la qPCR

Las principales ventajas de qPCR son que proporciona una detección y cuantificación rápida y de alto rendimiento de las secuencias de ADN diana en diferentes matrices. El menor tiempo de amplificación se ve facilitado por la amplificación y visualización simultáneas de amplicones de ADN recién formados. Además, la qPCR es más segura en términos de evitar contaminaciones cruzadas porque no se requiere ninguna manipulación adicional con las muestras después de la amplificación. Otras ventajas de qPCR incluyen un amplio rango dinámico para la cuantificación (7-8 Log 10) y la multiplexación de la amplificación de varios objetivos en una sola reacción. La opción de multiplexación es esencial para la detección y cuantificación en ensayos de diagnóstico de qPCR que se basan en la inclusión de controles de amplificación internos. (32)

qPCR juega un papel importante en la detección, cuantificación y tipificación de patógenos virales. Esto se debe a que la detección de virus clínicos y veterinarios importantes mediante métodos de cultivo requiere mucho tiempo o es imposible, mientras que las pruebas ELISA no están disponibles universalmente y adolecen de una sensibilidad y especificidad comparativamente bajas. qPCR (con la inclusión de la transcripción inversa para el diagnóstico de virus de ARN) proporciona la sensibilidad y especificidad adecuadas. (33)

7. VALIDACION DE HIPÓTESIS

Con la investigación realizada utilizando la técnica de qPCR fue factible reconocer de forma precisa, los virus de Parvovirus y Distemper canino en la ciudad de Latacunga en comparación con los kits rápidos.

8. MÉTODOLOGÍAS Y DISEÑO EXPERIMENTAL

8.1 Metodología

8.1.1 Área de investigación

El presente trabajo de investigación se realizó en la provincia de Cotopaxi, cantón Latacunga en las clínicas veterinarias donde se llevó a cabo servicios veterinarios entre los cuales destaca la parte clínica de la cual se derivó esta investigación.

8.1.2 Ubicación de zona estratégica

El Cantón Latacunga se encuentra en el centro del Ecuador, en la Región Interandina del Ecuador, al sureste de la provincia de Cotopaxi, al sur del volcán Cotopaxi, en la hoya del Patate Latitud 0.93521 Longitud 78.61554, Altitud 2750 msnm y con un clima frío andino de 12 °C en promedio. (34)

Figura 2. Mapa del cantón Latacunga, donde se encuentra los centros veterinarios. (34)



Límites

- Norte: Pichincha
- Sur: Tungurahua y Bolívar
- Este: Napo
- Oeste: Pichincha y Los Ríos

8.2 Unidad experimental

Para el desarrollo de este proyecto de investigación se escogieron y se utilizaron 30 caninos sin límite de edad, a los cuales con el consentimiento del dueño o tutor se les realizó la prueba de qPCR de Distemper y Parvovirus canino.

8.3 Diseño de la investigación

8.3.1 Método de investigación

En la presente investigación, se recolectaron 24 muestras de hisopado rectal de Parvovirus canino que llegaron a consulta los cuales se tomaron al azar sin importar su edad o sexo y 6 muestras sanguíneas de caninos que hayan experimentado el Distemper.

8.3.2 Tipo de investigación

El tipo de investigación que se realizó es de laboratorio, se efectuó la extracción de muestras rectal y sanguínea de las clínicas veterinarias para la detección del Distemper y Parvovirus canino.

8.3.3 Método descriptivo

En este método se realizó una presentación narrativa, numérica y/o gráfica, bien detallada y exhaustiva de la realidad que se estudia.

Se usó materiales para la recogida de datos, mediante la toma de muestras se procedió a retirar muestras rectales y sanguínea, para la posterior realización de la prueba de qPCR de Distemper y Parvovirus canis.

El método descriptivo buscó un conocimiento principal de la validez que se produce de la observación directa del investigador y del conocimiento que se obtiene mediante el análisis de las informaciones aportadas por otros autores.

8.3.4 Método comparativo

Este método consistió en establecer una similitud con enfoques de búsqueda diferenciadora y búsqueda antagónica.

Se han comparado pruebas para la realización de esta investigación, ya que lo que se busca es la cantidad de casos tanto positivos como negativos. Ha diferencias de otras pruebas moleculares qPCR tiene mayor rango dinámico de detección.

8.4. Técnica y procedimiento para la recolección de datos

La técnica utilizada en el presente proyecto de investigación fue la toma de hisopado rectal y sanguínea para la posterior realización de la prueba de qPCR.

8.5 Recolección de la historia clínica y muestras de pacientes

Para la obtención de los datos de la historia clínica y las muestras de los pacientes que presentaron sintomatología sugerente a la enfermedad de Distemper y Parvovirus canino, se contó con el apoyo de varias clínicas veterinarias ubicadas en la ciudad de Latacunga. La historia clínica se obtuvo entrevistando al propietario de cada paciente, además de la valoración hecha por un Médico Veterinario. La historia clínica que se elaboró de cada paciente comprendió los siguientes datos: nombre, sexo, raza, edad, peso, frecuencia respiratoria, frecuencia cardíaca, tiempo de llenado capilar, Temperatura y si fue vacunado de Distemper y Parvovirus canino.

8.6. Instrucciones para la toma de muestra para la detección de Parvovirus canino por qPCR

- Se recolectó la muestra de heces caninas utilizando el hisopo suministrado en el kit.
- Se insertó el hisopo en el tubo que contiene 600 µL de buffer de conservación de muestra.
- Se cortó el restante del hisopo y se cerró el tubo con la muestra disuelta.
- Conserve en refrigeración de 2 a 8°C hasta el envío.
- Envíe las muestras.

8.7 Instrucciones para la toma de muestra para la detección de Distemper canino por qPCR

- Se rasuro el pelo para lograr una mejor visualización de la vena.
- Luego se desinfecto la zona con alcohol para identificar mejor la vena y eliminar la contaminación macroscópica de la piel y el pelo.
- Se realizó un torniquete para obtener una mayor visibilidad de la vena.
- Se realizó la punción para extraer la sangre aproximadamente 3 ml de sangre.
- y se colocó en un tubo con solución EDTA para evitar su coagulación.
- Conserve en refrigeración de 2 a 8°C hasta el envío.
- Envío de las muestras.

8.8 qPCR.

La técnica de qPCR implementada, se validó en los laboratorios Life Science Initiative e Inmunolab donde, se evaluó en muestras sanguíneas y de heces de perros con sintomatología compatible con Distemper y Parvovirus canino recogido en diferentes centros veterinarios de Latacunga ha sido previamente confirmado mediante pruebas de kits rápidos. Las muestras de heces y sanguíneas fueron recolectadas y transportadas en hielo y una vez en el laboratorio

realizaron su respectivo análisis. La presencia de CPV y CDV se detectó utilizando los Primers (cebadores) diseñados en el software de diseño Geneious Prime.

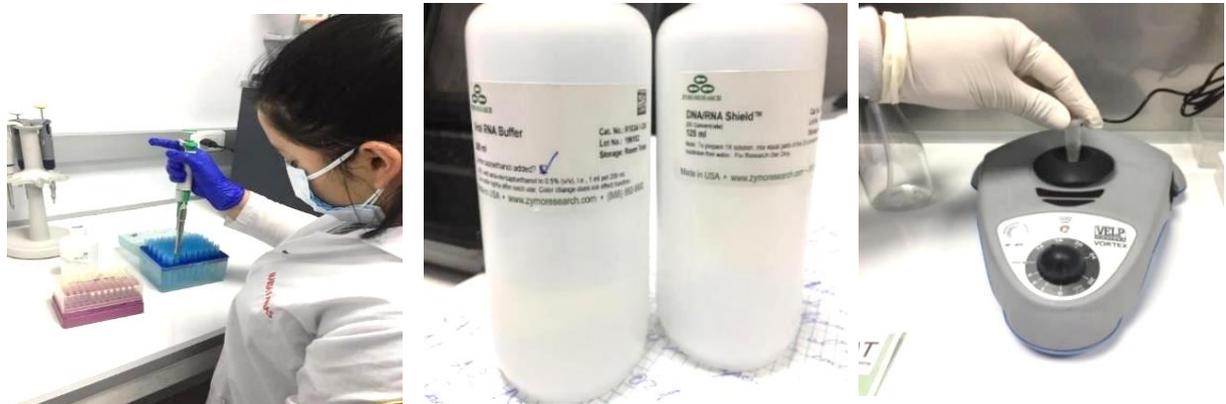
8.9 Para la extracción de material genético de ADN O ARN de Parvovirus canino (CPV) y Distemper canino (CDV)

Figura 3. Las muestras fueron transportadas en el buffer DNA/RNA Shield hasta el laboratorio.



Fuente: VetNAAT

Figura 4. Posteriormente, se tomó 200ul de cada muestra y se mezcló con 400ul de Viral RNA Buffer que forma parte del kit.



Fuente: VetNAAT

Figura 5. Para transferir la mezcla a una columna de silicio.



Fuente: VetNAAT

Figura 6. Se realizaron dos lavados con Viral Wash Buffer.



Fuente: VetNAAT

Figura 7. Centrifugar por 2 minutos a 12000rpm.



Fuente: VetNAAT

Figura 8. Por último, se añadió etanol (96%) a la columna para remover el buffer de lavado.



Fuente: VetNAAT

Figura 9. Se transfirió la columna de extracción a un tubo Eppendorf para mezclar el material genético con agua libre de nucleasas.



Fuente: VetNAAT

Figura 10. Amplificación e interpretación de los resultados.



Fuente: VetNAAT

8.10 Para la preparación de una reacción de 15uL de qPCR para detectar Parvovirus canino (CPV) se utilizaron los siguientes reactivos:

- 7,5 µL de Máster mix qScript XLT 1-step.
- 1 µL de Eva Green.
- 0,5 µL de cada primer (Forward y Reverse)
- 3 µL de templado.
- 2,5 µL de agua libre de nucleasas.

8.11 Para la preparación de una reacción de 16uL de qPCR para detectar Distemper canino (CDV) se utilizaron los siguientes reactivos:

- 7,5 µL de Máster mix qScript XLT 1-step.
- 1 µL de Eva Green.
- 1 µL de cada primer (Forward y Reverse)
- 3 µL de templado.
- 2,5 µL de agua libre de nucleasas.

8.12 Las condiciones de ciclos térmicos para la amplificación en el caso de Parvovirus canino (CPV) y Distemper canino (CDV) fueron:

- De 1 ciclo durante 10 min a 95°C, 40 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 55°C y 30 s a 72°C, 1 ciclo de 1m a 72°C, 30 s a 65°C, y 30 s de 85°C. En cada análisis se incluyeron controles positivo, negativo e interno.
- Las condiciones de ciclos térmicos para la amplificación fueron de 1 ciclo durante 30 min a 50°C, 1 ciclo de 10 min a 95 °C, 40 ciclos de 30 s a 95°C, 1 m a 60°C y 30 s a 72°C, 1 ciclo de 1m a 95°C, 30 s a 65°C, y 30 s de 88°C. En cada análisis se incluyeron controles positivo, negativo e interno.

8.13 Materiales

8.13.1 Equipo de laboratorio

- Termociclador (Mx3000P)
- Centrífugas
- Cámara de flujo
- Vórtex
- Estetoscopio
- Termómetro

8.13.2 Materiales de laboratorio

- Guantes
- Alcohol
- Mascarilla
- Mandil
- Algodón
- Hisopos estériles
- Tubos al vacío para toma de muestras (vacutainer)
- Micropipetas
- Columnas de silicio
- Tubos de Eppendorf
- Tubo y tapas de ópticos
- Muestras de CPV y CDV

8.13.3 Reactivos

- Primer/cebadores
- Mater Mix (Eva Green)
- Agua libre de nucleasas
- Templado

8.13.4 Material de oficina

- Hoja de registro
- Laptop
- Libreta de notas
- Esfero
- Cámara fotográfico

9. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

La parvovirus canina se caracteriza por presentar principalmente un cuadro gastroentérico en cachorros, pudiendo llegar a causar la muerte y el moquillo es una enfermedad vírica multisistémica grave, de distribución mundial, altamente contagiosa, que ataca a los perros, así como a muchas otras especies del orden Carnívora.

Lo anterior, hace necesario disponer de una técnica de diagnóstica precisa, no solo para restablecer un tratamiento conveniente en aquellos caninos que se han enfermado, sino que también para evitar la propagación de la enfermedad, y la muerte de los pacientes caninos. Actualmente, en las clínicas veterinarias de Latacunga es usual el diagnóstico de las enfermedades Parvovirus canino (CPV) y Distemper canino (CDV) en base a los signos clínicos, condiciones de animal y a través de kits rápidos, debido a su bajo costo y su rapidez con que entrega el resultado y su sencilla aplicación. (35)

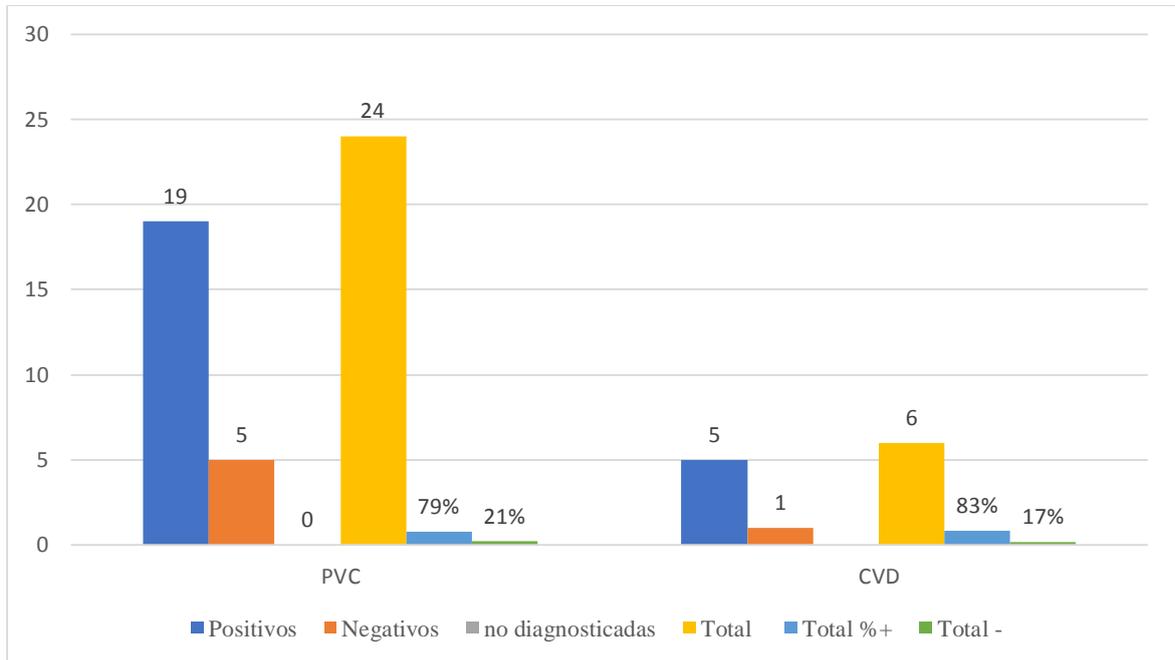
Sin embargo, este diagnóstico no es definitivo para su determinación, ya que al ser una técnica que depende de la unión antígeno-anticuerpo. (36)

Entre los métodos de diagnóstico moleculares, la qPCR se presenta como una mejor alternativa de elección por su alta sensibilidad y alta especificidad, de modo que permite establecer un tratamiento rápido y selectivo para cada paciente, respecto de métodos tradicionales que se utilizan en clínicas como por ejemplo a través de kits rápidos.

A pesar de que la qPCR tiene ventajas sobre los kits rápidos, como, por ejemplo: tiene un diagnóstico más seguro, pero una de la desventaja es que requiere de equipos más costosos, de reactivos más especializados y lleva más tiempo.

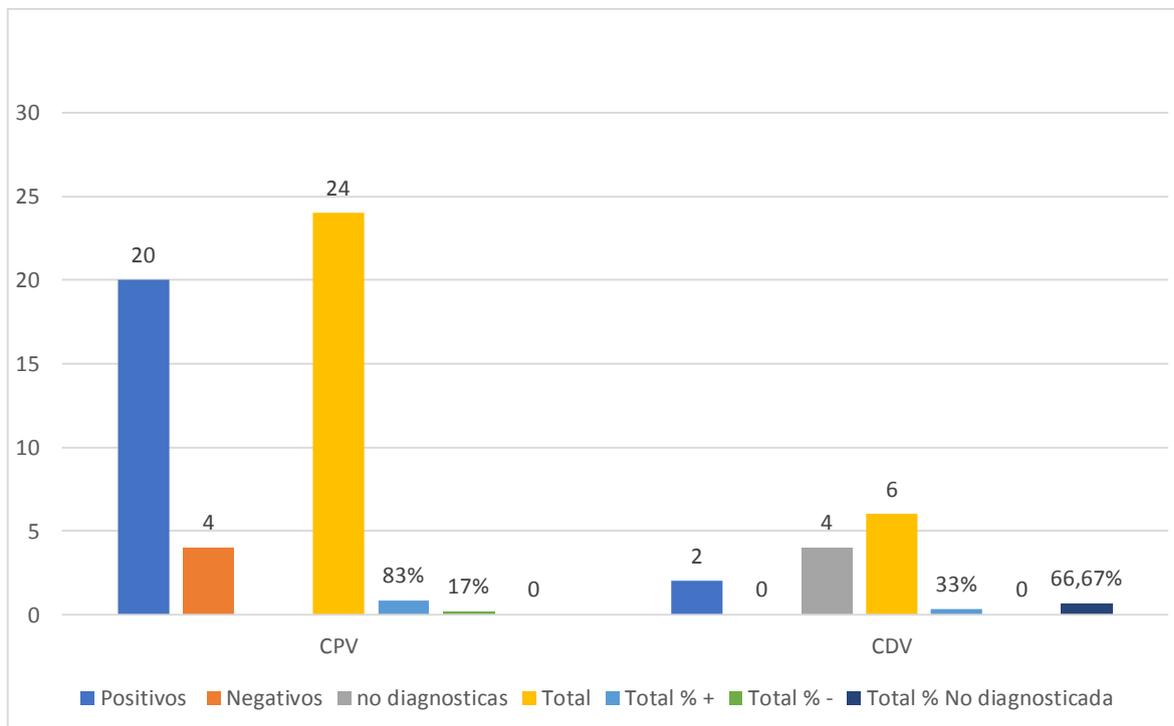
Consecuentemente, se evaluó con los kits rápidos 30 muestras de heces y sanguíneas de perros con sintomatología compatible con Parvovirus y Distemper canino recolectadas en distintas clínicas veterinarias de la ciudad de Latacunga cuyo diagnóstico fue confirmado previamente mediante la técnica qPCR.

Gráfico 1. Representación de los resultados tanto positivos como negativos de Parvovirus (CPV) y Distemper canino (CDV) de los kits rápidos.



Fuente: Directa.

Gráfico 2. Representación de los resultados tanto positivos como negativos de Parvovirus (CPV) y Distemper canino (CDV) de qPCR.



Fuente: Directa.

Al interpretar el grafico 1 y 2 se observan un total de 24 caninos muestreados de Parvovirus canino de los cuales 20 muestras resultaron positivas a qPCR, correspondiente a 83% y 4 muestras negativas al qPCR lo que corresponde al 17%, en el caso de moquillo 2 muestras resultaron positivas con un 33% y no diagnosticadas con un 66,67 % con Distemper hubo problemas con el proceso de estandarización fue bastante largo hubo muchos problemas de amplificación y de contaminación y almacenada inadecuadamente, pero de las 6 muestras positivas de Distemper diagnosticadas por kits rápidos 2 dieron resultados positivos a qPCR.

Al comparar los resultados obtenidos en el presente trabajo, se encontraron que 5 muestras de parvovirus diagnosticada por kits rápidos de resultados negativos dieron positivas a qPCR, por otro lado 4 muestras de Parvovirus positivas por kits rápidos dieron resultados negativos a qPCR esto comprueba que es una técnica altamente sensible y de alta especificidad para la detección del virus, a diferencia de los kits rápidos.

Esto nos indica que la existencia de caninos negativos a la prueba que serían tratados bajo las mismas condiciones para la enfermedad, pudiendo repercutir en el pronóstico y tratamiento de los animales enfermos. Por tanto, es recomendable utilizar una técnica complementaria al diagnóstico dado por el médico tratante. (36)

Una posible explicación del resultado es que los kits rápidos necesitan de una alta concentración de antígeno viral que se requiere para producir una banda visible en el dispositivo de reacción. Otros factores como la presencia de agua, sangre u otros fluidos en la muestra, y la humedad ambiental, a la que es altamente sensible la membrana de nitrocelulosa que posee el dispositivo, pueden afectar la migración del complejo antígeno anticuerpo. (35)

Adicionalmente, la interpretación del resultado también depende de la habilidad del operador para detectar el cambio de color en el dispositivo de reacción. La presencia de anticuerpos en el lumen intestinal también disminuiría la cantidad de partículas virales disponibles en la muestra de deposiciones para realizar los kits rápidos. (37)

El problema de los test rápidos es que su sensibilidad suele ser menor que los métodos moleculares de detección del virus. Han realizado varios estudios que comparan los test inmunocromatográficos con los métodos moleculares, en algunos estudios la sensibilidad de los test no supera el 50 % comparándolo con las técnicas moleculares, mientras que la especificidad fue 100%. (38)

La sensibilidad tan baja generalmente suele estar relacionada con la baja excreción de virus en heces en estadios tardíos de la infección y/o la presencia de altos niveles de anticuerpos frente a CPV presentes en la pared del intestino, que secuestran las partículas víricas y no se diseminan en heces. (39)

Los kits rápidos son el método de diagnóstico a campo más rápido y común usado en la práctica ya que el procedimiento es simple y rápido y puede ser llevado a cabo por veterinarios, así como los dueños de los animales para obtener un diagnóstico inmediato de CPV. Sin embargo, se necesitan grandes cargas de antígeno viral para producir claramente una banda visible y la interpretación del resultado puede ser afectada por la subjetividad del operador. Esto es muy común cuando la carga de virus es baja. (40)

Figura 11. Interpretación de resultados de Kits Rápidos.



Fuente: Directa.

La qPCR es efectiva en la detección de (CVP-CDV) y si bien su realización tiene un costo mayor en equipos, reactivos y personal, su sensibilidad y especificidad supera ampliamente a los kits rápidos utilizados en forma frecuente en las clínicas veterinarias. (35)

De hecho, la PCR se convierte en un importante método moderno de diagnóstico. En la actualidad, el método estándar para diagnosticar la presencia de patógenos virales en muestras clínicas se basa en el cultivo y otras técnicas que consumen mucho tiempo y son engorrosas. Sin embargo, se está investigando activamente el uso de nuevos métodos moleculares como la qPCR. (41)

El PCR es una técnica altamente sensible para la detección del virus, debido a que requiere poca cantidad de ADN y ARN para lograrla amplificación. (42)

9.1.1 La situación de la vacunación frente a CPV y la CDV

Se registraron todos los datos de la reseña y anamnesis de los caninos que asistieron a la consulta en las clínicas veterinarias, a partir de los cuales se obtuvieron los factores de riesgo relacionados con la vacunación y los signos clínicos.

En cuanto a la sanidad de los animales muestreados, eran de 5 caninos vacunados contra la Parvovirus canina y no vacunados eran 19 mientras que en Distemper 1 era vacunado y 5 eran de animales no vacunados. No se puede argumentar respecto de la eficiencia de las vacunas, ya que la información sobre la vacunación del animal puede ser similar, al igual que la circunstancia de la vacuna a la hora de la inyección en el animal.

Tabla 1. Representación de los resultados del estado de vacunación.

| | N. ° | Percentage (%) |
|--------------------------|------|----------------|
| Caninos vacunados CPV | 5 | 16,67 |
| Caninos no vacunados CPV | 19 | 63,33 |
| Caninos vacunados CDV | 1 | 3,33 |
| Caninos no vacunados CDV | 5 | 16,67 |
| Total | 30 | 100,00 |

Fuente: VetNAAT

Los dueños mostraron certificados de vacunación contra el CPV y CDV vigente o que mencionaron que habían sido vacunados, encontrándose que aquellos caninos que no fueron vacunados tuvieron un mayor número de manifestación. Sin embargo, caninos que se encontraban vacunados también presentaron la enfermedad, demostrando así que, incluso los cachorros fueron vacunados son susceptibles de padecer la enfermedad.

El elevado número de infección es secuela de que no existe responsabilidad precisa por parte de los dueños de las mascotas, en saber emplear un calendario de vacunación y así evita que la mascota sufra la enfermedad y a su vez tenga altos gastos en el tratamiento hospitalario.

De acuerdo a la literatura esta falla en la vacunación puede deberse a varias causas, entre ellas la afección por una variable antigénica más patógena, o por una inmunización durante el período crítico. (43)

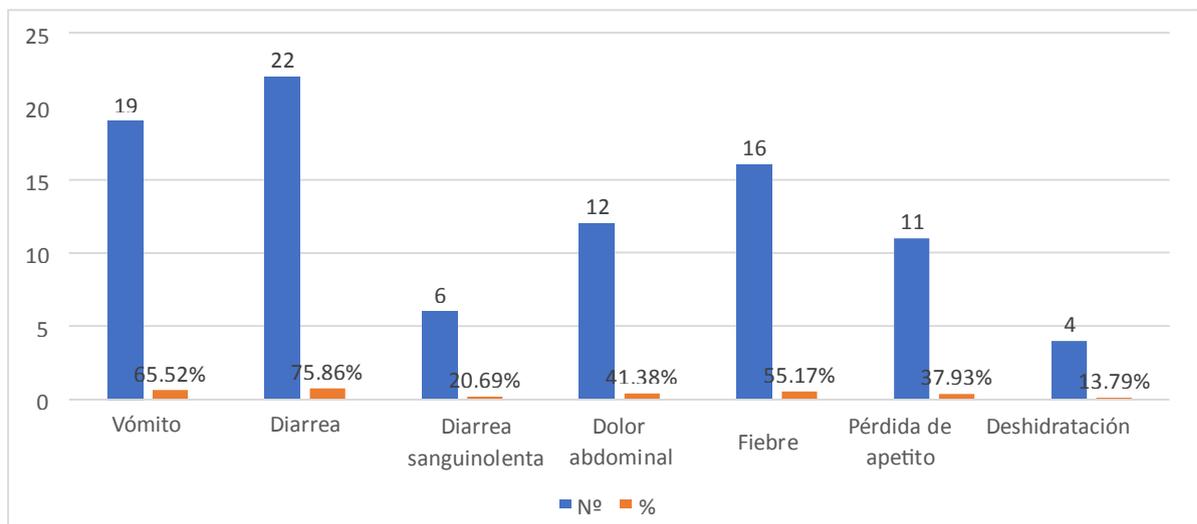
Sin embargo, para una protección completa y para evitar fallas de la vacuna es importante adherirse estrictamente a los protocolos de vacunación recomendados, con un enfoque especial en el esquema, el almacenamiento y la administración; la educación del propietario es

importante en relación con la vulnerabilidad de un cachorro y el límite de su exposición a otros perros durante este tiempo. (19)

El propio animal que incluyen en su respuesta vacunal, como su estado sanitario y la presencia de anticuerpos maternos. Los anticuerpos maternos pueden interferir en la respuesta inmune frente a la vacunación, por lo que los protocolos vacunales en cachorros han sido muy discutidos. (44)

No es confiable vacunar a nuestras mascotas con una sola dosis, es necesario un plan preventivo de vacunas y los refuerzos, para garantizar la protección inmunológica contra el virus, ahora hay alta confusión por parte de los propietarios de las mascotas, en cuanto a la vacunación. (2)

Gráfico 3. Presentación de los resultados de signos clínicos de Parvovirus (CPV) y Distemper canino (CDV).



Fuente: Directa.

En cuanto a la anamnesis de los caninos positivos a CPV y CDV, trabajando con 30 caninos en la investigación, presentaron la sintomatología dentro de este grupo de animales, el 65,52% presentaron sólo vómitos; el 75,86% presentaron diarrea; el 20,69% presentaron diarrea sanguinolenta severa; el 41,38% presentaron dolor abdominal, el 55,17% presentó fiebre; el 37,93% presentaron pérdida de apetito y el 13,79% presentaron deshidratación.

Nuestros datos indican que de acuerdo a los signos clínicos que principalmente se están utilizando para emitir un diagnóstico de PVC y CDV aproximadamente uno de cada dos pacientes positivos fue erróneamente diagnosticado, generando con esto que el control de la enfermedad sea más complicado debido a que no se toman las medidas sanitarias para estos pacientes falsos negativos.

Se observó que todos los caninos presentaron diarrea con la presencia del virus, dado que en todos los perros con CPV y CDV que presentaron el signo clínico y en ningún canino sin diarrea se encontró el virus, indicando que el síntoma diarreico está presente en todos los animales infectados.

Estos resultados tienen relación en el sentido de que los signos no se presentan de modo simultánea, y más bien ello depende inicialmente del tiempo del virus, debiendo tener en cuenta que los animales se presentaron para la recolección de la muestra en tiempos distintos comenzando en que adquirieron el virus, y por otro lado asimismo depende de la dificultad de la infección, siendo un agente poderoso el tipo de cepa con la cual se encuentren infectados.

Un estudio realizado analizó los síntomas clínicos en 40 casos en los que se confirmó la presencia de parvovirus como la causa de la enfermedad y encontró que el 100% de los perros incluidos en el estudio tenían diarrea; pero solo el 55% de ellos tenía sangre en las heces; El 85% tenía vómitos, el 48% tenía síntomas de presión y el 48% tenía anorexia; Se detectó fiebre en el 45% de los casos y el 43% del total de casos examinados estaban deshidratados. (45)

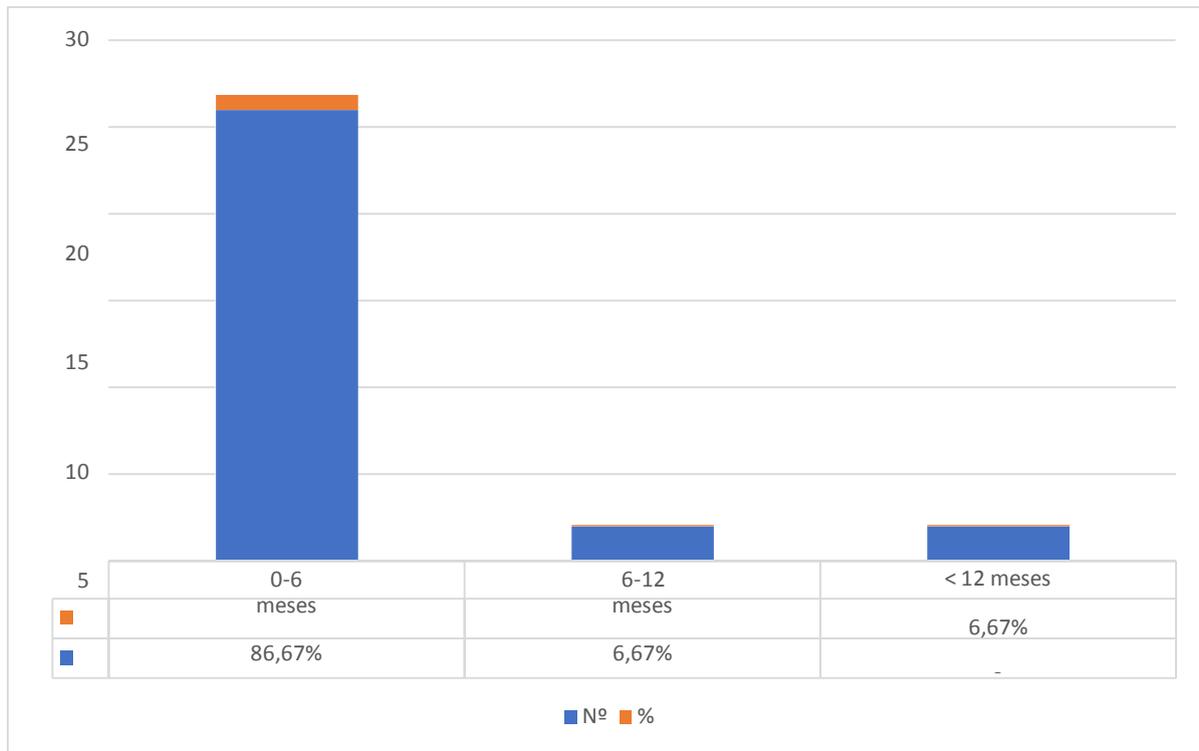
Puede concluirse que, al menos en la ciudad de Latacunga, la presencia de diarrea, vomito, pérdida de apetito, y fiebre son observados en forma conjunta en más de los casos.

Tabla 2. Prevalencia de acuerdo a la edad.

| Edad (meses) | Casos | Percentage (%) |
|--------------|-------|----------------|
| 0-6 | 26 | 86,67 |
| 6-12 | 2 | 6,67 |
| < 12 | 2 | 6,67 |
| Total | 30 | 100 |

Fuente: Directa

Gráfico 4. Casos positivos y porcentaje de Parvovirus (CPV) y Distemper canino (CDV) de acuerdo a la edad en los animales investigados.



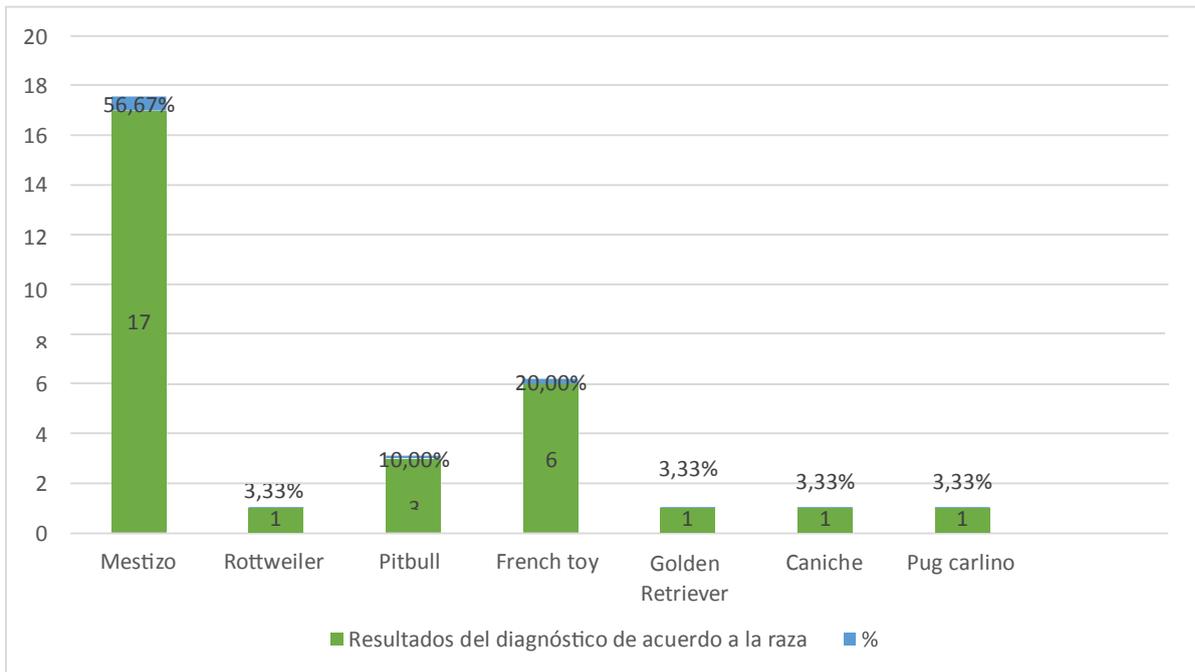
Fuente: Directa.

Al interpretar el gráfico 4 se concluye, que en pacientes diagnosticados de 0 – 6 meses es del 86,67% mientras que en la edad de 6 – 12 meses es del 6,67% y en la de >12 meses es del 6,67%. Estos resultados concuerdan con la literatura investigada la cual indica que los cachorros de entre 0 a 6 meses son los más susceptibles a contraer la enfermedad debido a la pérdida de la inmunidad materna y debido a la patogenicidad del virus que infecta mayormente células en división.

La mayor incidencia de CPV por debajo de 6 meses podría deberse a la afinidad del virus por células de criptas intestinales que se multiplican rápidamente en crías de destete con mayor índice mitótico debido a cambios en la flora bacteriana y en la dieta debido al destete. (46)

La disminución del nivel de anticuerpos maternos después de los 3 meses de edad podría ser uno de los factores predisponentes, que hacen que el grupo de edad de 3 a 6 meses sea más propenso al CPV y que a medida que avanzan en edad se vuelven propensos a la infección en áreas endémicas debido a la disminución en títulos protectores. (46)

La prevalencia en la edad de más de 6 meses podría deberse a la edad inadecuada o el momento de la vacunación, sin refuerzo de los animales y el mantenimiento inadecuado de la cadena de frío para el almacenamiento de las vacunas (46)

Gráfico 5. Diagnóstico de Parvovirus (CPV) y Distemper canino (CDV) canino de acuerdo a la raza.

Fuente: Directa.

Según la figura 5 la raza con mayor prevalencia de parvovirus canino es la Mestiza con 17 casos positivos correspondiente al 56,67 %. La superior prevalencia para la raza mestiza puede deberse a que no existe consideración suficiente por parte de los propietarios para conducir un plan de vacunación y desparasitación apropiado completo para sus mascotas y a la falsa fe de que esta raza es inmune ante cualquier enfermedad.

De acuerdo a varios estudios realizados hasta la actualidad, todas las razas son susceptibles a la enfermedad, a pesar de ello la literatura menciona que existen ciertas razas con mayor riesgo de enteritis por CPV, entre ellas tenemos: Rottweilers, Dóberman Pinscher, Pitbull American, Terrier y Pastor Alemán. Aunque se describe que los mestizos son menos susceptibles a padecerla que las razas puras, y a pesar de que en este caso se observe todo lo contrario, no significa que los mismos tengan mayor riesgo de contraer la enfermedad, sino que está relacionado con que esta raza acude con mayor frecuencia a un centro veterinario. (47)

Tabla 3. Comparación de costos de los kits rápidos vs costos de qPCR.

| El costo de los kits comercialmente | El costo en las clínicas veterinarias | El costo de la qPCR para CPV | El costo de la qPCR para CDV |
|-------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| \$ 10,00 | \$ 20,00 | \$ 20,00 | \$ 25,00 |

Fuente: VetNAAT.

Nuestros resultados nos indican que tanto los costos de las pruebas de kits rápidas en parvovirus en las clínicas veterinarias tienen parcialmente el mismo costo que la prueba molecular qPCR que por lo que realizar una prueba de gran sensibilidad y especificidad alta precisión y exactitud, podemos realizar un tratamiento breve salvaguardando a nuestras mascotas y aumentando la satisfacción del cliente y así teniendo un diagnóstico más preciso sin tener falsos positivos o negativos como son los kits rápidos y esto se debe a que el paciente, en ese momento no está eliminando por las heces el virus.

El precio de la CDV tiene un costo mayor en la prueba qPCR, en comparación con kits rápidos que tiene menor precio lo cual son usados en la mayor parte en las clínicas veterinarias para obtener un diagnóstico inmediato, sin embargo, es que su sensibilidad suele ser menor que los métodos moleculares de detección del virus por lo que costear exámenes complementarios sería muy afable para su mascota tener un diagnóstico temprano que sean muy específicas sensibles, y más que todo fiables. El costo de los kits rápidos comerciales sin duda tiene una gran diferencia sin duda es una gran ventaja en comparación con los otros costos.

10. IMPACTOS (TÉCNICOS, SOCIALES, AMBIENTALES O ECONÓMICOS)

10.1 Impacto técnico

Levantamiento de información relevante con respecto a los pacientes de las clínicas veterinarias de la ciudad de Latacunga.

10.2 Impacto social

Mejorar la calidad de vida de las mascotas de la ciudad que a su vez influye en el estado de bienestar de las personas.

10.3 Impacto económico

Reducir los costos de tratamientos a través de un diagnóstico más preciso

11. CONCLUSIONES

- La técnica de qPCR para la detección de CDV Y CPV fue implementada de forma exitosa siendo esta capaz de detectar y cuantificar ADN Y ARN viral en materia fecal y sanguínea de los animales infectados, en la cual se diagnosticaron 30 casos siendo 24 muestras de parvovirus y 6 de Distemper donde se determinó que 5 muestras de parvovirus diagnosticada por kits rápidos de resultados negativos dieron positivas a qPCR , por otro lado 4 muestras de parvovirus positivas por kits rápidos dieron resultados negativos a qPCR demostrando así que esta prueba tiene una alta sensibilidad y especificidad en comparación con los kits rápidos que necesitan grandes cargas de antígeno viral para producir claramente una banda visible y la interpretación del resultado.
- Esta investigación demostró que la falta de vacunación puede considerarse como síntomas y factores de riesgo importantes de la infección por parvovirus y Distemper canino, también se determinó que, al menos en la ciudad de Latacunga, la presencia de diarrea, vomito, pérdida de apetito, y fiebre son observados en forma conjunta en más de los casos, que los cachorros de entre 0 a 6 meses son los más susceptibles a contraer la enfermedad debido a la pérdida de la inmunidad materna y que la raza mestiza fue la más afectada puede deberse a que no existe consideración suficiente por parte de los propietarios para conducir un plan de vacunación.
- El diagnóstico es un periodo crítico en el manejo de los pacientes, que implica decisiones médicas que establecerá el progreso del cuidado del paciente de esta forma es imprescindible implementar y costear exámenes complementarios del Distemper y Parvovirus canino a través con la metodología qPCR en la ciudad de Latacunga que nos ayuden como Médicos Veterinarios a poder obtener resultados precisos para así poder dar un diagnóstico final y nos ayude a dar el mejor tratamiento para nuestros pacientes.

12. RECOMENDACIONES

- Debido a que la CPV y CDV en caninos son muy importantes en las urgencias veterinarias, deben diagnosticarse y tratarse lo más rápido posible utilizando pruebas de diagnóstico más precisas para realizar un tratamiento urgente salvaguardando a los pacientes caninos y aumentando la satisfacción del cliente
- Al ser el Parvovirus y el Distemper canino una de las enfermedades de alta mortalidad se recomienda a los dueños de sus mascotas la visita al Médico Veterinario para que sus mascotas reciban un adecuado plan de vacunación.
- Para la ejecución de este proyecto se tuvo presente tener en cuenta el bienestar a los animales y proceder con ética.
- Se empleó los medios de sujeción adecuados para no ocasionar estrés ni desconfianza en los animales.
- Para la recolección de heces y la extracción de sangre se procedió de un modo rápido y adecuadamente.

13. BIBLIOGRAFIA

1. Mondino, Gutierrez, Delucchi. Evaluación de los potenciales evocados somatosensoriales del nervio tibial en perros con. SMVU. 2019 marzo; 55(211).
2. Hurtado Hernandez D. Nueva perspectiva de la parvovirus canina en el sur del Valle de Aburra. Tesis. Antioquia: Corporacion Universitaria Lasallista, Medicina Veterinaria; 2012.
3. Pinotti M, Gollan A, Canavesio M, Passeggi C, Larrateguy MV, Paz M.E. Virus de Distemper Canino: detección molecular de diferentes. InVet. 2016; 18(1).
4. Linares E, Correa A, Velásquez. Diagnóstico de moquillo canino. vet. zootec. 2010 abril;4(2).
5. Garcia Vidaña VJ. Diagnóstico de Distemper Canino por medio de prueba rápida para detección de antígeno en perros. Tesis. Torreón: Universidad Autónoma agraria Antonio Narro, Unidad Laguna; 2016.
6. Soto, R L, E L, A RR, Maturrano H L. Detección molecular del virus del distemper canino en casos clínicos de caninos domésticos no vacunados y evaluación de factores de riesgo. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 2018 mayo; 29(3).
7. Isa Yallico M. Análisis Retrospectivo del Distemper Canino - Morbillivirus en los siete cantones de la provincia Bolívar en el periodo 2017 - 2020. Maestría. Bolivar: Universidad Tecnica de Cotopaxi, Ciencias Veterinarias; 2017.
8. Piche, Alfaro, Jiménez Soto M, Murcia, Jiménez C. Caracterización molecular de dos brotes de distemper canino en animales de vida silvestre en Costa Rica. Revista de Ciencias Veterinarias. 2017; 36(2).
9. Wheeler JT. El Moquillo Canino ¿tiene cura? REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria. 2007 junio; VIII (7).
10. Barros Figueroa AV. Determinacion de la incidencia de distemper canino por el metodo detest rapido CDV en el cantón Naranjal. Tesis. Guayaquil: Universidad Católica de Santiago, Medicin Veterinaria; 2015.
11. Pinotti A. 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. SantA Fe: Universidad Nacional del Litoral, Facultad de Ciencias Veterinarias; 2011.
12. Rivera Pin WY. Comparación en el diagnóstico de distemper canino, mediante el kit-cdv, con la citología del tercer párpado. Tesis. Guayaquil: Universidad de Guayaquil, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; 2012.

13. Ramsey IK, Tennant BJ. Manual de Enfermedades Infecciosas en Pequeños Animales. Segunda ed. Lexus, editor. Barcelona: J.M. SASTRE VIDA; 2012.
14. Appel MJ CBGHSFCL. Enteritis viral canina. I. Informe de situación sobre enteritisvirales parecidas a corona y parvo. Veterinario de Cornell. 1979 abril; III (69).
15. Tarlinton TAJDR. Variantes del parvovirus canino (CPV - 2) que circulan en perrosnigerianos. Vet Rec Open. 2016 noviembre; 3(1).
16. D ML. Claves para comprender a la Parvovirus Canina producida por la variante CPV-2c. Revista Electrónica de Veterinaria. 2015; 16(2).
17. Trujillo Rojas W, Rodríguez Betancourt CA, Sepúlveda Núñez M. Reporte de caso: canino raza Pitbull Stanford con. REDVET. 2016 noviembre; 17(11).
18. Castillo KC. Estudio comparativo de casos fatales de parvovirus canino tipo ii en cachorros (Canis familiaris). Científica Biológico Agropecuaria Tuxpan. 2014 Julio; 2(3).
19. Estela Benavides ER. Frecuencia de Presentación de Parvovirus y Coronaviruses Canina Diagnosticados por Inmunocromatografía en la ciudad. Tesis. Perú: Univesidad Nacional de Cajamarca, Facultad de Ciencias Veterinarias; 2017.
20. Tandazo Jaramillo TJ. Diagnóstico de parvovirus canino mediante la prueba de elisa, en veterinarias de la ciudad de santa rosa. Tesis. Machala: Universidad Tecnica de Machala, Facultad de ciencias Agropecuarias; 2015.
21. Urgenciesveterinaries.com. [En línea].; 2020 [citado 2021 mayo 24. Disponible en: <https://urgenciesveterinaries.com/parvovirus-canino-sintomas-diagnostico-tratamiento/>].
22. Gamo S. PortalVeterinaria. [En línea].; 2011 [citado 2021 mayo 09. Disponible en: <https://www.portalveterinaria.com/articoli/articulos/21898/parvovirus-canina.html>].
23. Mendoza Gavira CM. Diagnóstico de parvovirus canino mediante el método del rapid kit cpv ag en pacientes con gastroenteritis hemorrágica en el distrito de Tarapoto. Tesis. Tarapoto: Universidad Nacional de San Martín-Tarapoto, Departamento Académico Agrosilvo Pastoral; 2017.
24. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de lapolimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Medigraphic. 2013 mayo; 2(2).
25. Serrato Díaz A, Cornejo Romero A, Rendón Aguilar B, Rocha Munive M. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos. [Online]. Mexico; 2014 [cited 2021]junio 10. Available from: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/pcr.pdf>.
26. Cariello NF SJST. Fidelidad de la ADN polimerasa (Vent) de Thermococcus litoralis en PCR determinada por electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante. Res de ácidos nucleicos. 1991 agosto; 19(15).

27. Watson JD CF. Una estructura para el ácido nucleico desoxirribosa. 1953. *Naturaleza*. 2003 enero; 421(6921).
28. Hoffmann, Cerveza, Reid, Mertens, Oura, Rijn, et al. Una revisión de las tecnologías de RT-PCR utilizadas en virología veterinaria y control de enfermedades: diagnóstico sensible y específico de cinco enfermedades del ganado notificables a la Organización Mundial de Sanidad Animal. *Microbiol veterinario*. 2009 octubre; 139(1-2).
29. Bustin SA BVNTPM. RT-PCR cuantitativa en tiempo real: una perspectiva. *J Mol Endocrinol*. 2005 junio; 34(3).
30. Herschhorn A HA. Transcriptasas inversas retrovirales. *Cell Mol Life Sci*. Agosto 2010;67(16).
31. Hubert, Brunner, Bernhagen J, Vitzthum. Investigaciones sobre la intercalación del ADN y la unión superficial por SYBR Green I, su determinación de estructura e implicaciones metodológicas. *Res de ácidos nucleicos*. 2004 Julio; 32(12).
32. Klein D. Cuantificación mediante tecnología de PCR en tiempo real: aplicaciones y limitaciones. *Trends Mol Med*. 2002 junio; 8(6).
33. Yang, Rothman. Diagnósticos basados en PCR para enfermedades infecciosas: usos, limitaciones y aplicaciones futuras en entornos de atención aguda. *Lancet Infect Dis*. 2004 junio; 4(6).
34. Cutiño Pérez Y. EcuRed. [En línea].; 2014 [citado 2021 mayo 14. Disponible en: [https://www.ecured.cu/Latacunga_\(Ecuador\)](https://www.ecured.cu/Latacunga_(Ecuador))].
35. Casarez Riquelme AE. Implementación de la reacción en cadena de la polimerasa para la detección de parvovirus canino. Tesis. Santiago: Univesidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias; 2017.
36. Quino Quispe. Detección de parvovirus canino tipo 2 (CPV 2) en perros de Lima Metropolitana mediante PCR. Tesis. Lima: Universidad Nacional Mayor De San Marcos, Facultad de CMedicina Veterinaria; 2017.
37. Decaro N BC. Parvovirus canino: una revisión de los aspectos epidemiológicos y dediagnóstico, con énfasis en el tipo 2c. *Vet Microbiol*. 2012 febrero; 155(1).
38. Decaro N, Buonavoglia. Parvovirus canino: una revisión de los aspectos epidemiológicosy de diagnóstico, con énfasis en el tipo 2c. *Vet Microbiol*. 2012 febrero; 1(155).
39. Desario, Decaro , Campolo , Cavalli A, Cirone , Elia G, et al. Infección por parvoviruscanino: ¿qué prueba diagnóstica para el virus? *Métodos J Virol*. 2005 junio; 126(1-2).
40. Cano Portela IL. Parvovirosis canina, una nueva variante: ¿un nuevo desafío? Tesis.Montevideo: Universidad de la República, Veterinaria; 2013.

41. Prashant S, Rastogi, Kukreti, Narwal PS. Ensayo de sensibilidad de la reacción de la cadena de polimerasa para la detección. Revista abierta de diagnósticos clínicos. 2012septiembre; 2(3).
42. Lorenz T. Reacción en cadena de la polimerasa: protocolo básico más estrategias de optimización y resolución de problemas. J Vis Exp. 2012 mayo; 22(63).
43. Mylonakis, Kalli, Rallis. Enteritis parvoviral canina: una actualización sobre el diagnóstico clínico, el tratamiento y la prevención. Veterinario Med (Auckl). 2016 Julio; 7(91 100).
44. Pollock, Carmichael. Inmunidad derivada de la madre a la infección por parvovirus canino: transferencia, disminución e interferencia con la vacunación. Asociación Americana de Medicina Veterinaria. 1982 enero; 180(1).
45. Pollock V, Coyne J. Parvovirus canino. Veterinario Clin North Am Small Anim Pract. 1993mayo; 23(3).
46. Mokhtari A, Farmani, Rajabi. Detección de parvovirus canino por PCR y su asociación con algunos de los factores de riesgo. MVZ Córdoba. 2018 mayo; 23(2).
47. Duque García, Echeverri Zuluaga, Trejos Suárez, Ruiz Sáenz. Prevalencia y epidemiología molecular del parvovirus canino 2 en perros con diarrea en Colombia, América del Sur: ¿Está surgiendo un posible nuevo CPV-2a? Microbiología veterinaria. 2017 marzo; 206(56 61).

1. ANEXOS

Anexo 1. Aval de Traducción



AVAL DE TRADUCCIÓN

En calidad de Docente del Idioma Inglés del Centro de Idiomas de la Universidad Técnica de Cotopaxi; en forma legal **CERTIFICO** que:

La traducción del resumen al idioma Inglés del proyecto de investigación cuyo título versa: **“DIAGNÓSTICO DEL VIRUS DISTEMPER Y PARVOVIRUS CANINO A TRAVÉS DE KITS RÁPIDOS Y qPCR EN LA CIUDAD DE LATACUNGA”** presentado por: **Fariás Román María Laura**, egresada de la Carrera de: **Medicina Veterinaria**, perteneciente a la **Facultad de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales**, lo realizó bajo mi supervisión y cumple con una correcta estructura gramatical del Idioma.

Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad y autorizo a la peticionaria hacer uso del presente aval para los fines académicos legales.

Latacunga, Agosto del 2021

Atentamente,

Erika Cecilia Borja Salazar
DOCENTE CENTRO DE IDIOMAS-UTC
CI: 0502161094



MARCO PAUL
 BELTRAN
 SEMBLANGE



**CENTRO
 DE IDIOMAS**

Anexo 3. Hoja de vida del tutor del proyecto**HOJA DE VIDA****1.- DATOS PERSONALES:**

Nombre: Molina Cuasapaz Edie Gabriel
Apellido Paterno Apellido Materno Nombres

Lugar y fecha de Nacimiento: Quito, 12 de julio 1990

Edad: 30 años **Género:** masculino

Nacionalidad: **Tiempo de Residencia en el Ecuador (Extranjeros):**

Dirección Domiciliaria: Pichincha Quito Solanda
Provincia Cantón Parroquia

Av. Mariscal Sucre S25-225 y Alfredo Escudero

Dirección

Teléfono(s): 022964757 0985728986
Convencionales Celular o Móvil

Correo electrónico: 1722547278 **Cédula de Identidad:** 1722547278

Tipo de sangre: O positivo **Estado Civil:** soltero

Personas con discapacidad: N.º de carné del CONADIS: NO POSEE

2.- INSTRUCCIÓN FORMAL:

| Nivel de Instrucción | Nombre de la institución educativa | Título obtenido | Número de registro Senescyt | Lugar (país y ciudad) |
|----------------------|--|---|-----------------------------|-----------------------|
| Tercer nivel | Universidad Central del Ecuador | Médico Veterinario Zootecnista | 1005-2016-1684132 | Ecuador |
| Cuarto nivel | Universidad politécnica de Valencia Universidad Autónoma de Barcelona | Máster en Mejora Genética Animal y Biotecnología de la Reproducción | 7241137679 | España |

DECLARACIÓN: DECLARO QUE, todos los datos que incluyo en este formulario son verdaderos y no he ocultado ningún acto o hecho, por lo que asumo cualquier responsabilidad.

Edie Gabriel Molina Cuasapaz

Anexo 4. Historia clínica de Parvovirus y Distemper canino.

| ID | Clinica | Nombre | Sexo | Raza | Edad (meses) | Peso (kg) | Vacuna CPV | Vacuna CDV | FC | FR | TLL C | Temperatura | Anamnesis | CPV Ag | CDV Ag | qPCR CPV | qPCR CDV |
|------|-----------------------------------|----------|--------|-------------|--------------|-----------|------------|------------|-----|----|-------|-------------|---|----------|----------|----------|----------|
| V001 | MEDIVET | Titan | macho | A. Bully | 5 | 14.2 | si | no | 125 | 23 | 3 | 36.8 | dolor abdominal, diarrea, vómito y sin apetito | negativo | negativo | Positivo | |
| V002 | MEDIVET | Morita | hembra | Pitbull | 4 | 13 | no | no | 128 | 25 | 3 | 39 | vómito, diarrea y sin apetito | positivo | negativo | Positivo | |
| V003 | MEDIVET | Mechas | hembra | mestizo | 6 | 8 | no | no | 124 | 24 | 1 | 37.4 | Dolor abdominal, diarrea, secreción nasal. | negativo | negativo | Positivo | |
| V004 | ZOOCAT | Luna | hembra | mestizo | 5 | 6.10 | no | no | 119 | 24 | 2 | 38.1 | deshidratación, falta de apetito, vómito | positivo | negativo | negativo | |
| V005 | ZOOCAT | Napoleón | macho | mestizo | 5 | 6.22 | no | no | 116 | 23 | 2 | 37.5 | vómito, deshidratación, falta de apetito | positivo | negativo | Negativo | |
| V006 | Hospital Veterinario Planeta vida | Harri | macho | french toy | 2 | 0.54 | no | no | 120 | 26 | 3 | 39.5 | Diarrea con sangre, pérdida de apetito, deshidratación | positivo | negativo | Positivo | |
| V007 | DOCTORVET | Chobitas | macho | mestizo | 3 | 2.5 | no | no | 125 | 22 | 3 | 37.1 | Diarrea con sangre, pérdida de apetito y vomito | negativo | negativo | Positivo | |
| V008 | DOCTORVET | Nena | hembra | pitbull | 4 | 5.12 | no | no | 126 | 24 | 2 | 39.5 | dolor abdominal, pérdida de apetito, fiebre, diarrea | positivo | negativo | Positivo | |
| V009 | Mi Mascota | Lucero | hembra | mestizo | 3 | 2.2 | si | si | 123 | 25 | 2 | 39.4 | dolor abdominal, pérdida de apetito, fiebre. | positivo | positivo | Negativo | Positivo |
| V010 | Hospital Veterinario Planeta vida | Maxi | macho | mestizo | 2 | 0.85 | si | si | 140 | 27 | 3 | 39.2 | dolor abdominal sin apetito y deshidratado, fiebre | positivo | negativo | Negativo | |
| V011 | Mi Mascota | Nena | hembra | mestizo | 7 | 7.27 | no | no | 111 | 22 | 2 | 37.7 | diarrea, vomito, pérdida de apetito, dolor abdominal | positivo | negativo | Positivo | |
| V012 | Mi Mascota | Bebe | hembra | caniche | 4 | 4 | no | no | 116 | 25 | 3 | 37.5 | vomito, diarrea con sangre, dolor abdominal, pérdida de apetito | positivo | negativo | Positivo | |
| V013 | DOCTORVET | Luna | hembra | mestizo | 5 | 4.12 | no | no | 125 | 24 | 2 | 38.8 | diarrea sanguinolenta severa, falta de apetito | positivo | negativo | Positivo | |
| V014 | Hospital Veterinario Planeta vida | Luky | macho | mestizo | 3 | 3.12 | no | no | 126 | 25 | 3 | 39.2 | diarrea, vómito, deshidratación, pérdida de apetito | positivo | negativo | Positivo | |
| V015 | Hospital Veterinario Planeta vida | Polar | macho | mestizo | 3 | 1.85 | si | no | 134 | 27 | 3 | 33 | diarrea, vómito, pérdida de apetito, dolor abdominal, deshidratado. | negativo | negativo | Positivo | |
| V016 | DOCTORVET | Negro | macho | mestizo | 3 | 4.5 | no | no | 124 | 24 | 2 | 39.4 | diarrea con sangre, dolor abdominal, diarrea sanguinolenta severa, deshidratado, pérdida de apetito. | positivo | negativo | Positivo | |
| V017 | ZOOCAT | Luna | hembra | french toy | 3 | 4.6 | no | no | 126 | 25 | 3 | 39.3 | vomito, decaimiento, deshidratación, diarrea sanguinolenta severa, pérdida de apetito, dolor abdominal. | positivo | negativo | Positivo | |
| V018 | Planeta vida | Jeyko | macho | pug carlino | 9 | 26.2 | no | no | 124 | 23 | 2 | 38.5 | vómito y diarrea y sin apetito | negativo | negativo | Positivo | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|--------------|----------|--------|------------|---|------|----|----|-----|----|---|------|--|----------|----------|----------|----------|
| V019 | Mi Mascota | Zeus | macho | mestizo | 3 | 4.5 | no | no | 126 | 27 | 2 | 38.7 | vómito y diarrea | negativo | positivo | | Positivo |
| V020 | Mi Mascota | Sara | hembra | mestizo | 4 | 3.24 | no | no | 128 | 25 | 3 | 39.6 | vómito y diarrea y sin apetito | positivo | negativo | Positivo | |
| V021 | Mi Mascota | zered | macho | mestizo | 2 | 2 | no | no | 125 | 23 | 2 | 38.4 | vomito y diarrea | positivo | negativo | Positivo | |
| V022 | DOCTORVET | morcilla | hembra | french toy | 2 | 1.5 | no | no | 128 | 29 | 3 | 39.5 | diarrea con sangre, vomito, deshidratación, letargo y pérdida de apetito | positivo | negativo | Positivo | |
| V023 | Mi Mascota | peluchin | hembra | french toy | 6 | 3.45 | no | no | 128 | 28 | 3 | 39.4 | vómito, diarrea sanguinolenta | positivo | negativo | Positivo | |
| V024 | DOCTORVET | Max | macho | french toy | 6 | 5.42 | no | no | 125 | 25 | 2 | 39.1 | vómito, diarrea, deshidratado y sin apetito | positivo | negativo | Positivo | |
| V025 | Planeta vida | Lucas | macho | french toy | 4 | 4.25 | no | no | 128 | 23 | 3 | 39 | diarrea y vómito | positivo | negativo | positivo | |

Anexo 4. Reportes de los resultados de Parvovirus canino y Distemper canino

Diagnóstico de Parvovirus Canino (CPV-qPCR)

Código: CPV-1001

Fecha de toma de muestra: 10/05/2021

Fecha de reporte: 08/06/2021

Resultado: **Positivo**

Propietario: -

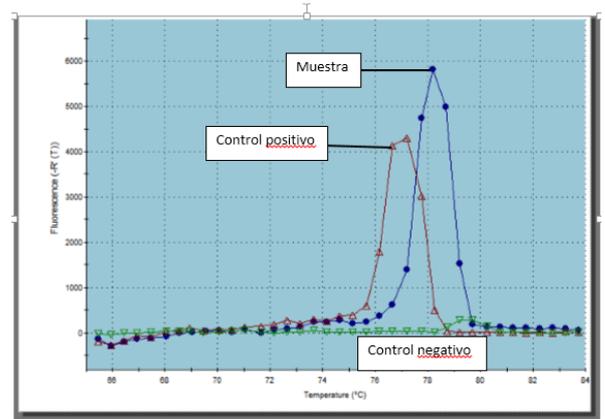
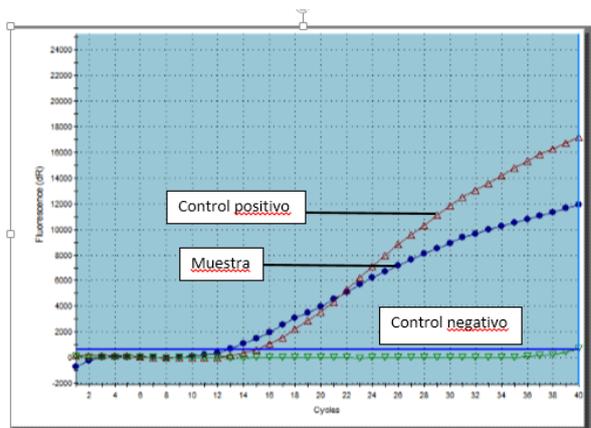
Institución: MEDIVET.

Paciente: Titán.

Edad: 5 meses.

Raza: American Bully.

Muestra: Hisopado rectal.



MVZ. Gabriel Molina Cuasapaz MSc.
Coordinador de Diagnóstico Veterinario
+593 998587787

Biol. David Ortega Paredes MSc. PhD.
Coordinador de Diagnóstico Molecular Veterinario
+593 995836635

Dr. Galo Leoro Monroy
Médico-director
02 2 239379

Diagnóstico de Parvovirus Canino (CPV-qPCR)

Código: CPV-1002

Fecha de toma de muestra: 10/05/2021

Fecha de reporte: 08/06/2021

Resultado: Positivo

Propietario: -

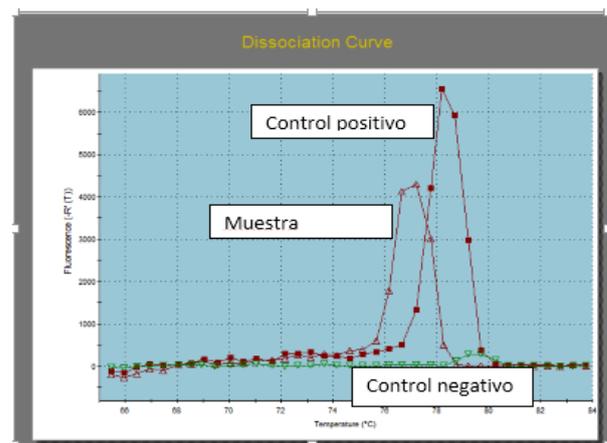
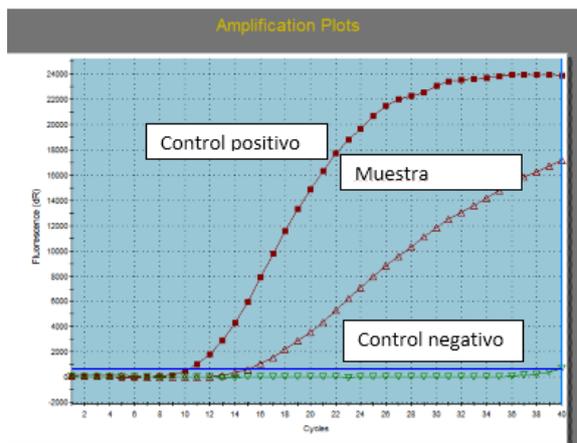
Institución: MEDIVET

Paciente: Morita.

Edad: 4 meses.

Raza: Pitbull.

Muestra: Hisopado rectal.



MVZ. Gabriel Molina Cuasapaz MSc.
Coordinador de Diagnóstico Veterinario
+593 998587787

Biol. David Ortega Paredes MSc. PhD.
Coordinador de Diagnóstico Molecular Veterinario
+593 995836635

Dr. Galo Leoro Monroy
Médico-Director
02 2 239379

Diagnóstico de Parvovirus Canino (CPV-qPCR)

Fecha de toma de muestra: 10/05/2021

Código: CPV-1003

Fecha de reporte: 08/06/2021

Resultado: **Positivo**

Propietario: -

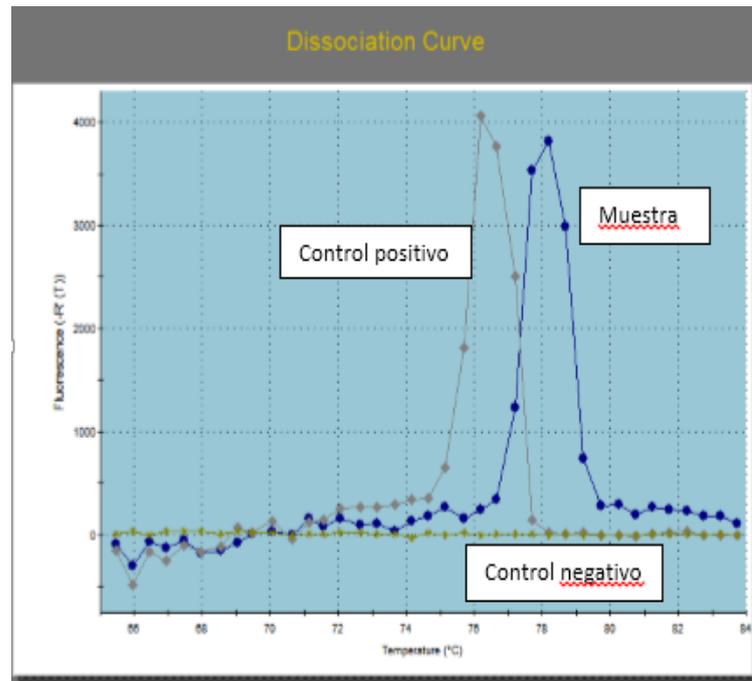
Institución: MEDIVET.

Paciente: Mechas.

Edad: 6 meses.

Raza: Mestizo.

Muestra: Hisopado rectal.



MVZ. Gabriel Molina Cuasapaz MSc.
Coordinador de Diagnóstico Veterinario
+593 998587787

Biol. David Ortega Paredes MSc. PhD.
Coordinador de Diagnóstico Molecular Veterinario
+593 995836635

Dr. Galo Leoro Monroy
Médico-Director
02 2 239379

Diagnóstico de Parvovirus Canino (CPV-qPCR)

Código: CPV-1004

Fecha de toma de muestra: 10/05/2021

Fecha de reporte: 08/06/2021

Resultado: **Negativo**

Propietario: -

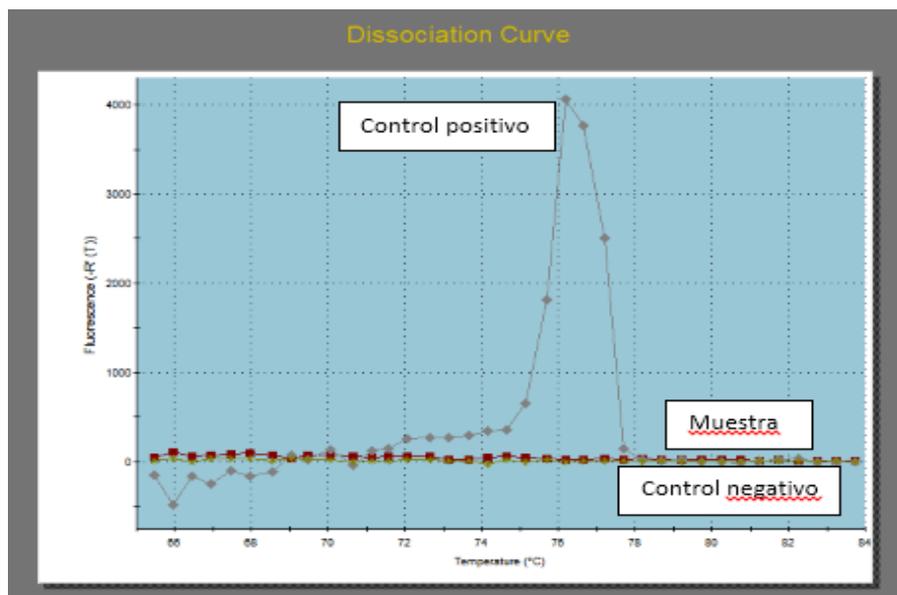
Institución: ZOOCAT.

Paciente: Luna.

Edad: 5 meses.

Raza: Mestizo.

Muestra: Hisopado rectal.



MVZ. Gabriel Molina Cuasapaz MSc.
Coordinador de Diagnóstico Veterinario
+593 998587787

Biol. David Ortega Paredes MSc. PhD.
Coordinador de Diagnóstico Molecular Veterinario
+593 995836635

Dr. Galo Leoro Monroy
Médico-Director
02 2 239379

Diagnóstico de Parvovirus Canino (CPV-qPCR)

Fecha de toma de muestra: 10/05/2021

Código: CPV-1005

Fecha de reporte: 15/05/2021

Resultado: **Positivo**

Propietario: -

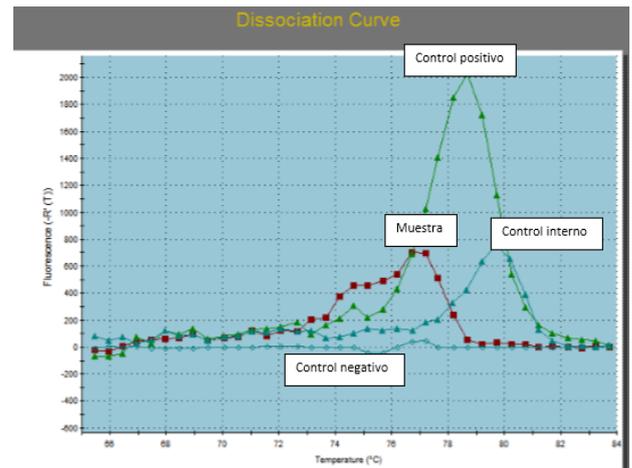
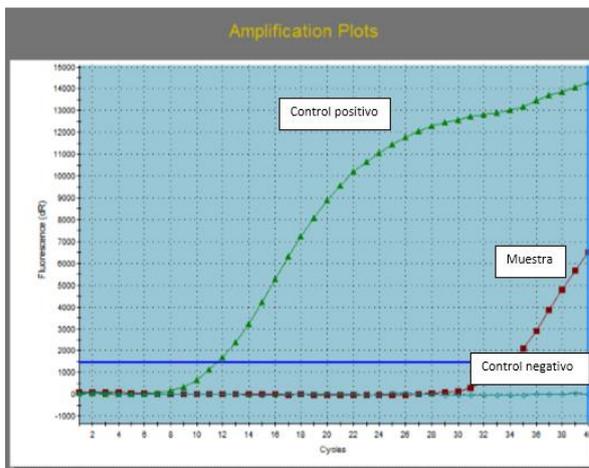
Institución: Clínica Veterinaria "ZOOCAT".

Paciente: Napoleón.

Edad: 5 meses.

Raza: Mestizo.

Muestra: Hisopado rectal.



MVZ. Gabriel Molina Cuasapaz MSc.
Coordinador de Diagnóstico Veterinario
+593 998587787

Biol. David Ortega Paredes MSc. PhD.
Coordinador de Diagnóstico Molecular Veterinario
+593 995836635

Dr. Galo Leoro Monroy
Médico-Director
02 2 239379



Diagnóstico de Parvovirus Canino (CPV-qPCR)

Código: CPV-1006

Fecha de toma de muestra: 11/05/2021

Fecha de reporte: 08/06/2021

Resultado: Positivo

Propietario: -

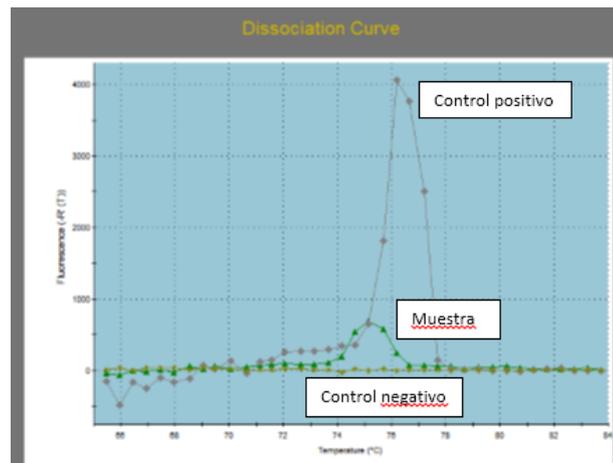
Institución: Hospital Veterinario "Planeta Vida".

Paciente: Harri.

Edad: 2 meses.

Raza: French Toy.

Muestra: Hisopado rectal.



MVZ. Gabriel Molina Cuasapaz MSc.
 Coordinador de Diagnóstico Veterinario
 +593 998587787

Biol. David Ortega Paredes MSc. PhD.
 Coordinador de Diagnóstico Molecular Veterinario
 +593 995836635

Dr. Galo Leoro Monroy
 Médico-Director
 02 2 239379

Diagnóstico de Parvovirus Canino (CPV-qPCR)

Código: CPV-1007

Fecha de toma de muestra: 18/05/2021

Fecha de reporte: 08/06/2021

Resultado: Positivo

Propietario: -

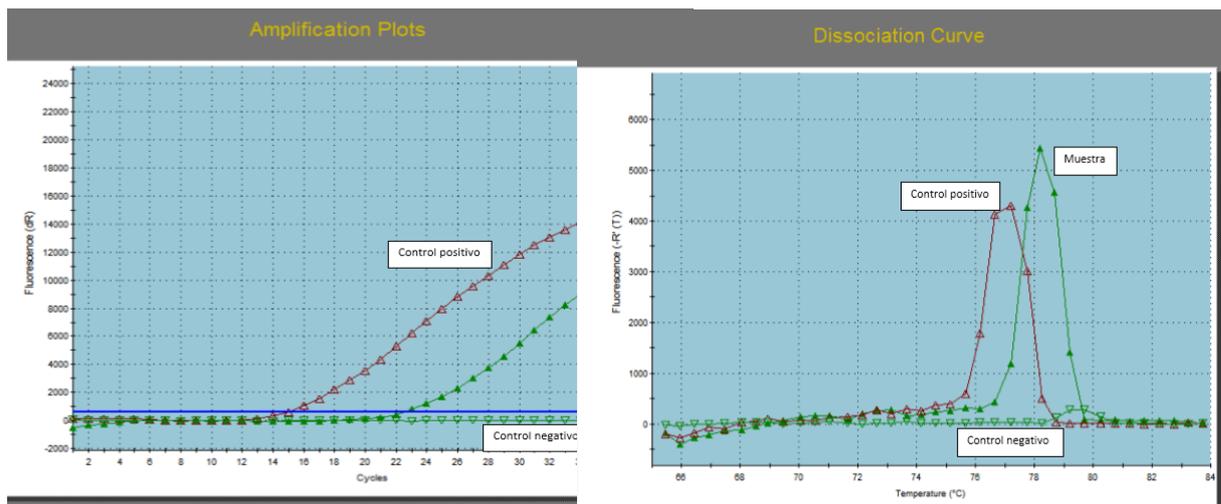
Institución: DOCTORVET.

Paciente: Chobitas.

Edad: 3 meses.

Raza: Mestizo.

Muestra: Hispado rectal.



MVZ. Gabriel Molina Cuasapaz MSc.
Coordinador de Diagnóstico Veterinario
+593 998587787

Biol. David Ortega Paredes MSc. PhD.
Coordinador de Diagnóstico Molecular Veterinario
+593 995836635

Dr. Galo Leoro Monroy
Médico-Director
02 2 239379

Diagnóstico de Parvovirus Canino (CPV-qPCR)

Código: CPV-1008

Fecha de toma de muestra: 20/05/2021

Fecha de reporte: 08/06/2021

Resultado: Positivo

Propietario: -

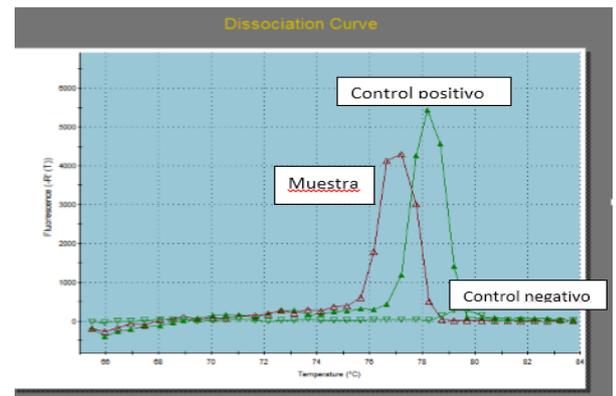
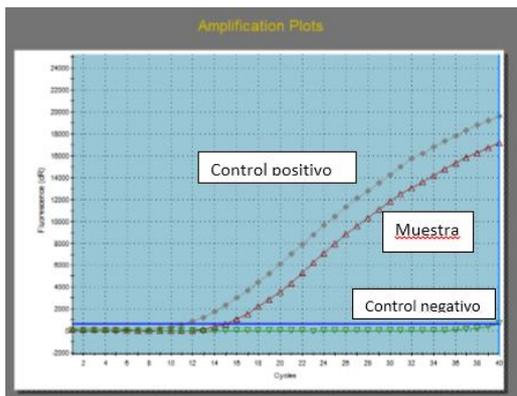
Institución: DOCTORVET.

Paciente: Nena.

Edad: -

Raza: Pitbull.

Muestra: Hisopado rectal.



MVZ. Gabriel Molina Cuasapaz MSc.
Coordinador de Diagnóstico Veterinario
+593 998587787

Biol. David Ortega Paredes MSc. PhD.
Coordinador de Diagnóstico Molecular Veterinario
+593 995836635

Dr. Galo Leoro Monroy
Médico-Director
02 2 239379

Diagnóstico de Parvovirus Canino (CPV-qPCR)

Código: CPV-1009

Fecha de toma de muestra: 20/05/2021

Fecha de reporte: 08/06/2021

Resultado: **Negativo.**

Propietario: -

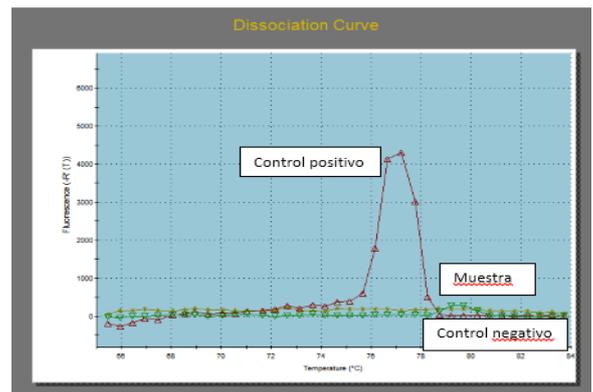
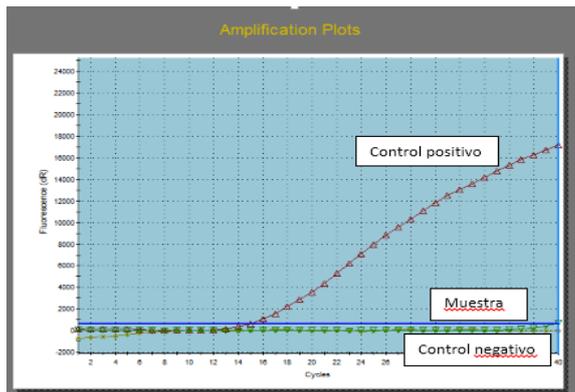
Institución: Clínica Veterinaria "Mi Mascota".

Paciente: Lucero.

Edad: 3 meses.

Raza: Mestizo.

Muestra: Hisopado rectal.



MVZ. Gabriel Molina Cuasapaz MSc.
Coordinador de Diagnóstico Veterinario
+593 998587787

Biol. David Ortega Paredes MSc. PhD.
Coordinador de Diagnóstico Molecular Veterinario
+593 995836635

Dr. Galo Leoro Monroy
Médico-Director
02 2 239379

Diagnóstico de Distemper Canino (CDV-qPCR)

Código: CDV-1010

Fecha de toma de muestra: 20/05/2021

Fecha de reporte: 29/06/2021

Resultado: **Positivo**

Propietario: -

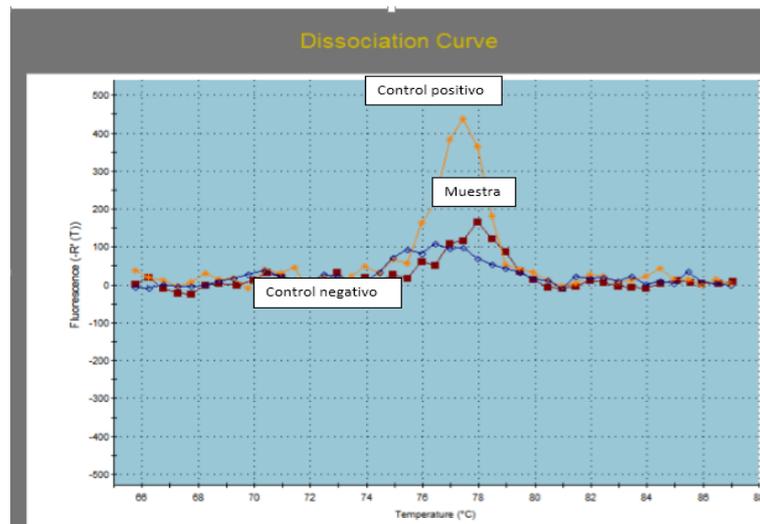
Institución: Clínica Veterinaria "Mi Mascota".

Paciente: Lucero.

Edad: 3 meses.

Raza: Mestizo.

Muestra: Plasma sanguíneo.



MVZ. Gabriel Molina Cuasapaz MSc.
 Coordinador de Diagnóstico Veterinario
 +593 998587787

Biol. David Ortega Paredes MSc. PhD.
 Coordinador de Diagnóstico Molecular Veterinario
 +593 995836635

Dr. Galo Leoro Monroy
 Médico-Director
 02 2 239379

Diagnóstico de Parvovirus Canino (CPV-qPCR)

Código: CPV-1010

Fecha de toma de muestra: 19/05/2021

Fecha de reporte: 08/06/2021

Resultado: **Negativo**

Propietario: -

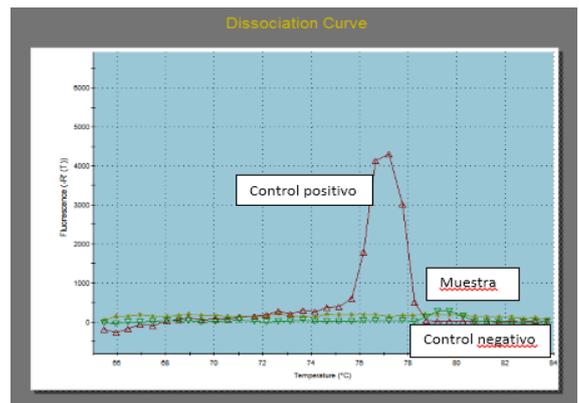
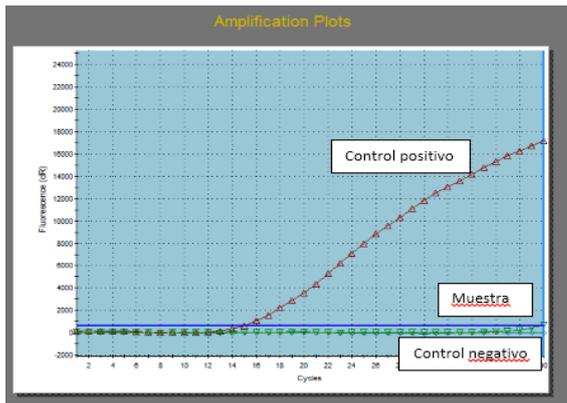
Institución: Hospital Veterinario "Planeta Vida".

Paciente: Maxi.

Edad: 2 meses.

Raza: Mestizo.

Muestra: Hisopado rectal.



MVZ. Gabriel Molina Cuasapaz MSc.
Coordinador de Diagnóstico Veterinario
+593 998587787

Biol. David Ortega Paredes MSc. PhD.
Coordinador de Diagnóstico Molecular Veterinario
+593 995836635

Dr. Galo Leoro Monroy
Médico-Director
02 2 239379

Diagnóstico de Parvovirus Canino (CPV-qPCR)

Fecha de toma de muestra: 25/05/2021

Código: CPV-1011

Fecha de reporte: 08/06/2021

Resultado: **Positivo**

Propietario: -

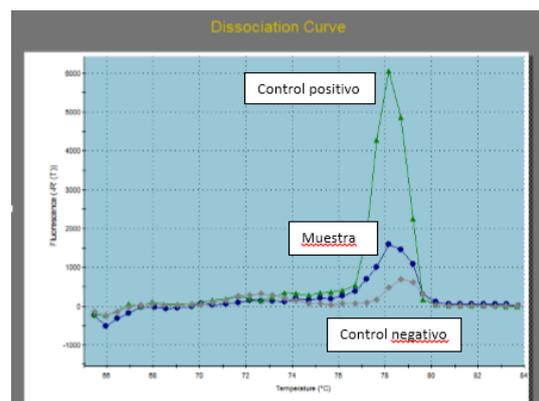
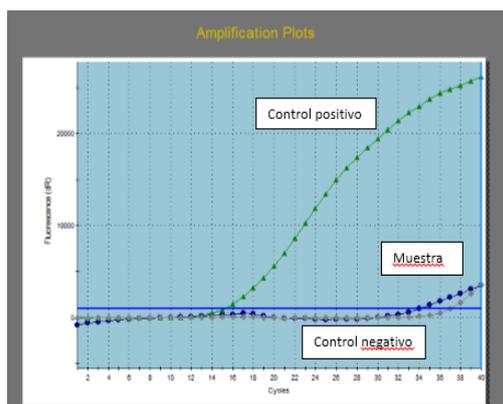
Institución: Clínica Veterinaria "Mi Mascota".

Paciente: Nena.

Edad: 7 meses.

Raza: Mestizo.

Muestra: Hisopado rectal.



MVZ. Gabriel Molina Cuasapaz MSc.
Coordinador de Diagnóstico Veterinario
+593 998587787

Biol. David Ortega Paredes MSc. PhD.
Coordinador de Diagnóstico Molecular Veterinario
+593 995836635

Dr. Galo Leoro Monroy
Médico-Director
02 2 239379

Diagnóstico de Parvovirus Canino (CPV-qPCR)

Fecha de toma de muestra: 24/05/2021

Código: CPV-1012

Fecha de reporte: 08/05/2021

Resultado: **Positivo**

Propietario: -

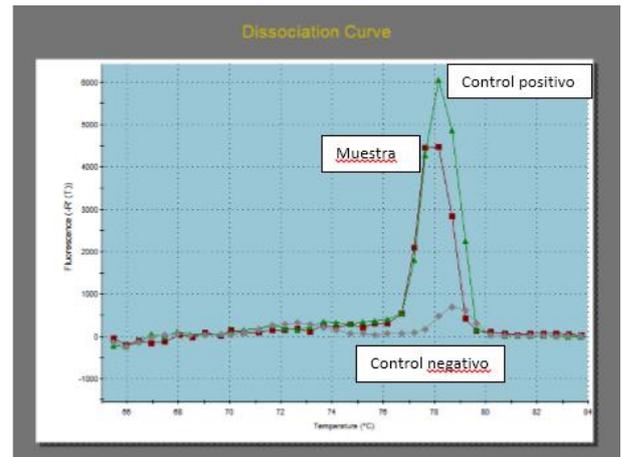
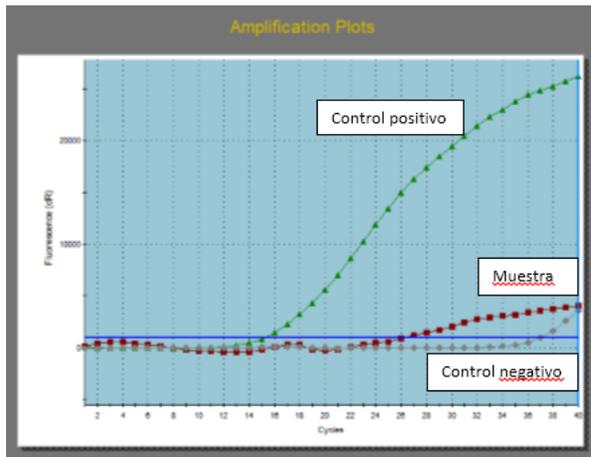
Institución: Clínica Veterinaria "Mi Mascota".

Paciente: Bebé.

Edad: 4 meses.

Raza: Caniche.

Muestra: Hisopado rectal.



MVZ. Gabriel Molina Cuasapaz MSc.
Coordinador de Diagnóstico Veterinario
+593 998587787

Biol. David Ortega Paredes MSc. PhD.
Coordinador de Diagnóstico Molecular Veterinario
+593 995836635

Dr. Galo Leoro Monroy
Médico-Director
02 2 239379

Diagnóstico de Parvovirus Canino (CPV-qPCR)

Fecha de toma de muestra: 04/06/2021

Código: CPV-1013

Fecha de reporte: 08/06/2021

Resultado: **Positivo**

Propietario: -

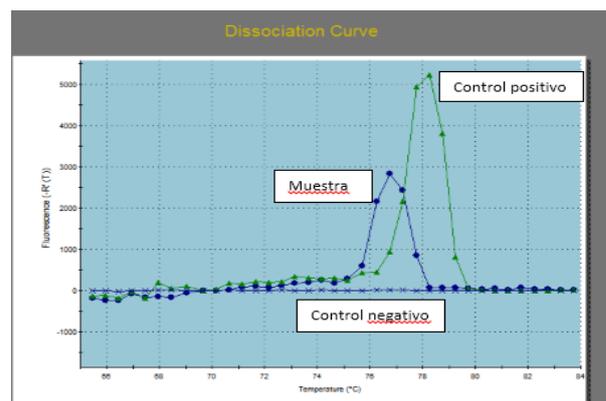
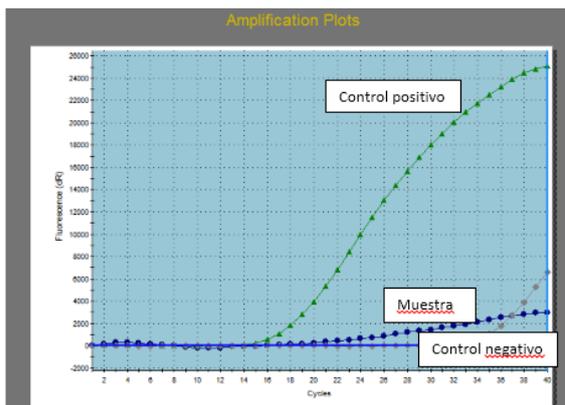
Institución: DOCTORVET.

Paciente: Luna.

Edad: 5 meses.

Raza: Mestizo.

Muestra: Hisopado rectal.



MVZ. Gabriel Molina Cuasapaz MSc.
Coordinador de Diagnóstico Veterinario
+593 998587787

Biol. David Ortega Paredes MSc. PhD.
Coordinador de Diagnóstico Molecular Veterinario
+593 995836635

Dr. Galo Leoro Monroy
Médico-Director
02 2 239379

Diagnóstico de Parvovirus Canino (CPV-qPCR)

Código: CPV-1014

Fecha de toma de muestra: 05/06/2021

Fecha de reporte: 08/06/2021

Resultado: Positivo

Propietario: -

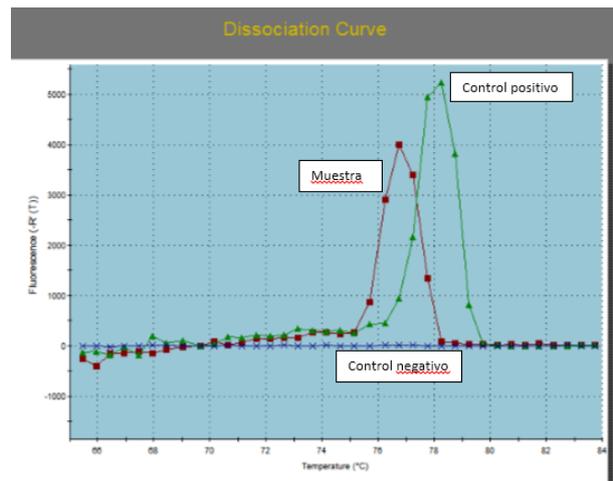
Institución: Hospital Veterinario "Planeta Vida".

Paciente: Luky.

Edad: 3 meses.

Raza: Mestizo.

Muestra: Hisopado rectal.



MVZ. Gabriel Molina Cuasapaz MSc.
Coordinador de Diagnóstico Veterinario
+593 998587787

Biol. David Ortega Paredes MSc. PhD.
Coordinador de Diagnóstico Molecular Veterinario
+593 995836635

Dr. Galo Leoro Monroy
Médico-Director
02 2 239379

Diagnóstico de Parvovirus Canino (CPV-qPCR)

Código: CPV-1015

Fecha de toma de muestra: 09/06/2021

Fecha de reporte: 15/06/2021

Resultado: Positivo

Propietario: -

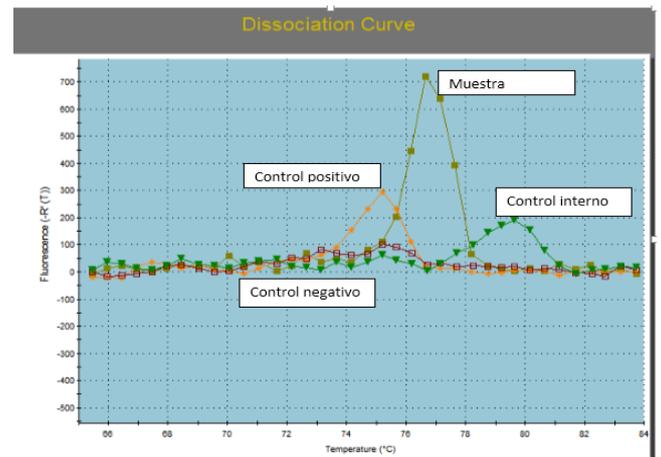
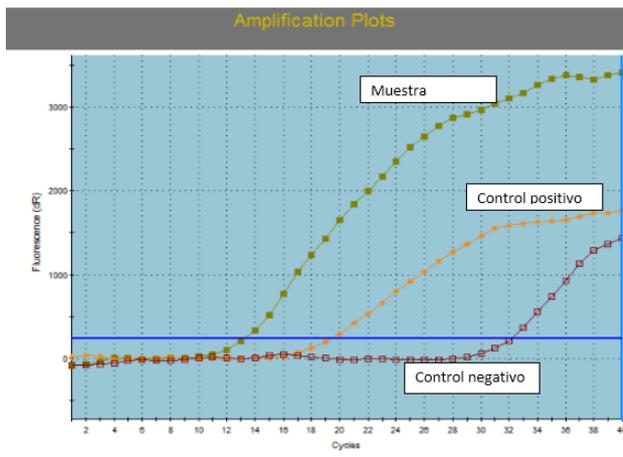
Institución: Hospital veterinario "Planeta vida"

Paciente: Polar.

Edad: 3 meses.

Raza: Mestizo.

Muestra: Hispado rectal.



MVZ. Gabriel Molina Cuasapaz MSc.
Coordinador de Diagnóstico Veterinario
+593 998587787

Biol. David Ortega Paredes MSc. PhD.
Coordinador de Diagnóstico Molecular Veterinario
+593 995836635

Dr. Galo Leoro Monroy
Médico-Director
02 2 239379

Diagnóstico de Parvovirus Canino (CPV-qPCR)

Código: CPV-1016

Fecha de toma de muestra: 10/06/2021

Fecha de reporte: 15/06/2021

Resultado: **Positivo**

Propietario: -

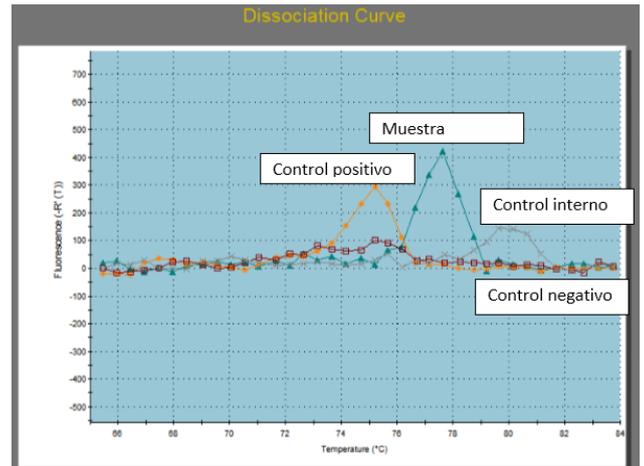
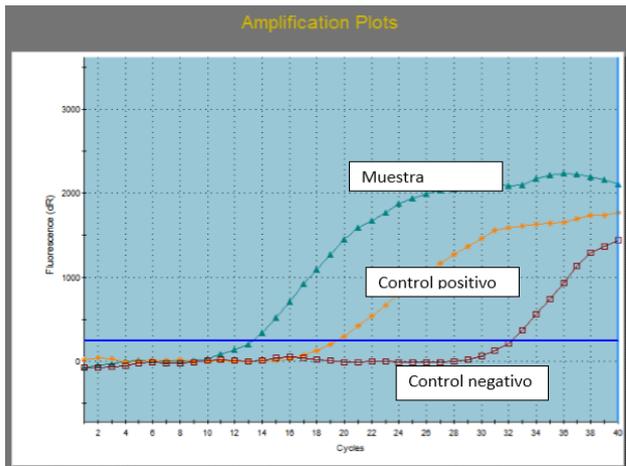
Institución: DOCTORVET.

Paciente: Negro.

Edad: 3 meses.

Raza: Mestizo.

Muestra: Hisopado rectal.



MVZ. Gabriel Molina Cuasapaz MSc.
Coordinador de Diagnóstico Veterinario
+593 998587787

Biol. David Ortega Paredes MSc. PhD.
Coordinador de Diagnóstico Molecular Veterinario
+593 995836635

Dr. Galo Leoro Monroy
Médico-Director
02 2 239379

Diagnóstico de Parvovirus Canino (CPV-qPCR)

Fecha de toma de muestra: 10/06/2021

Código: CPV-1017

Fecha de reporte: 15/06/2021

Resultado: **Positivo**

Propietario: -

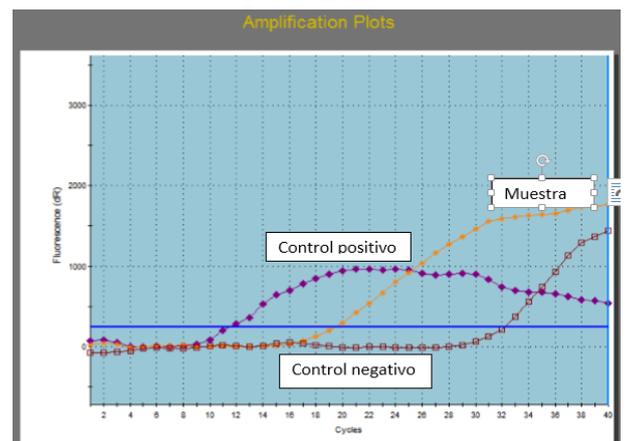
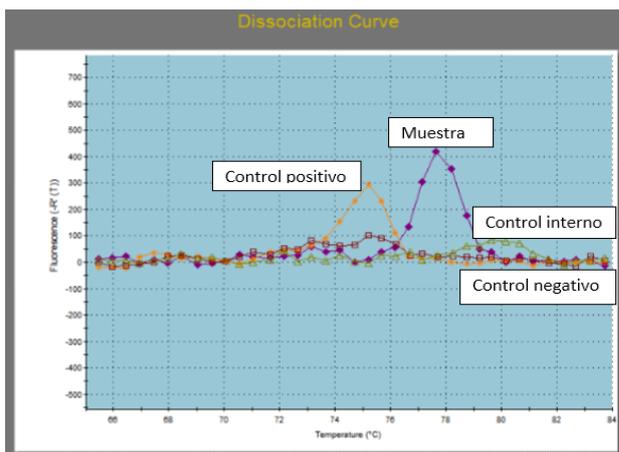
Institución: ZOOCAT.

Paciente: Luna.

Edad: 3 meses.

Raza: French Toy.

Muestra: Hisopado rectal.



MVZ. Gabriel Molina Cuasapaz MSc.
Coordinador de Diagnóstico Veterinario
+593 998587787

Biol. David Ortega Paredes MSc. PhD.
Coordinador de Diagnóstico Molecular Veterinario
+593 995836635

Dr. Galo Leoro Monroy
Médico-Director
02 2 239379

Diagnóstico de Parvovirus Canino (CPV-qPCR)

Código: CPV-1018

Fecha de toma de muestra: 27/06/2021

Fecha de reporte: 30/06/2021

Resultado: Positivo

Propietario: -

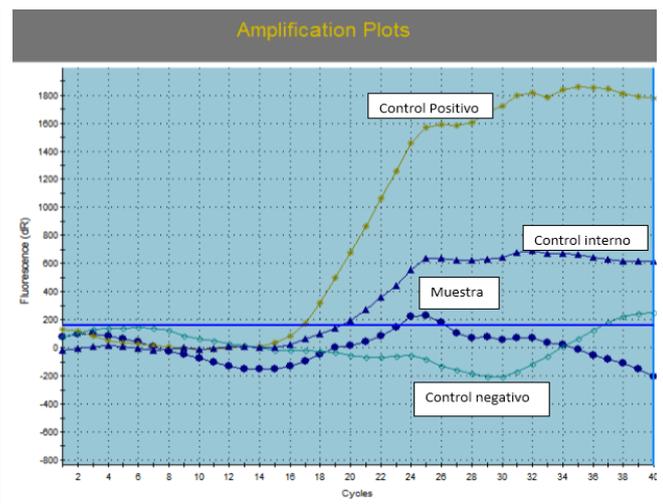
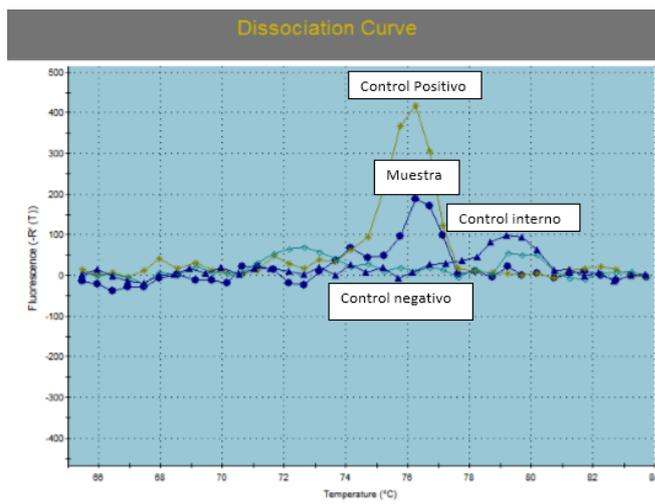
Institución: Hospital Veterinario "Planeta Vida".

Paciente: Jeyko.

Edad: 9 meses.

Raza: Pug Carlino

Muestra: Hisopado rectal.



MVZ. Gabriel Molina Cuasapaz MSc.
Coordinador de Diagnóstico Veterinario
+593 998587787

Biol. David Ortega Paredes MSc. PhD.
Coordinador de Diagnóstico Molecular Veterinario
+593 995836635

Dr. Galo Leoro Monroy
Médico-Director
02 2 239379

Diagnóstico Distemper Canino (CDV-qPCR)

Fecha de toma de muestra: 27/06/2021

Código: CDV-1019

Fecha de reporte: 29/06/2021

Resultado: **Positivo**

Propietario: -

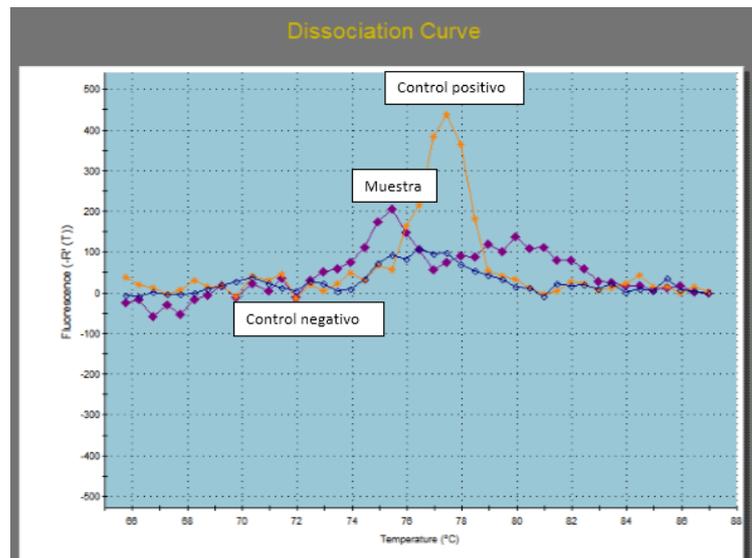
Institución: Clínica Veterinaria "Mi Mascota".

Paciente: Zeus.

Edad: 3 meses.

Raza: Mestizo.

Muestra: Plasma sanguíneo.



MVZ. Gabriel Molina Cuasapaz MSc.
 Coordinador de Diagnóstico Veterinario
 +593 998587787

Biol. David Ortega Paredes MSc. PhD.
 Coordinador de Diagnóstico Molecular Veterinario
 +593 995836635

Dr. Galo Leoro Monroy
 Médico-Director
 02 2 239379

Diagnóstico de Parvovirus Canino (CPV-qPCR)

Código: CPV-1020

Fecha de toma de muestra: 27/06/2021

Fecha de reporte: 30/06/2021

Resultado: **Positivo**

Propietario: -

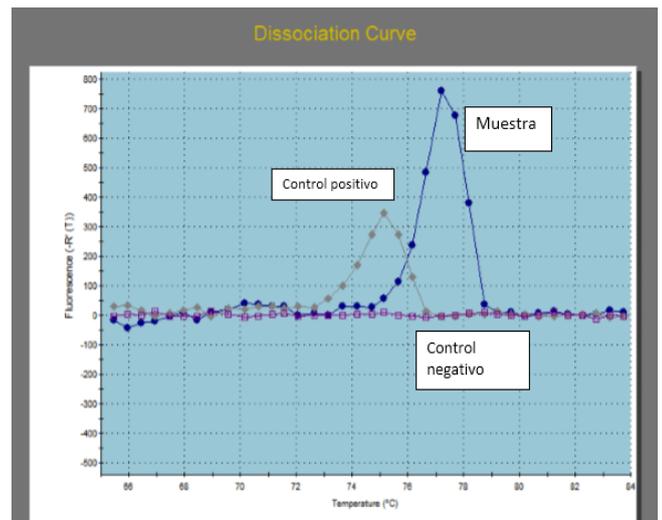
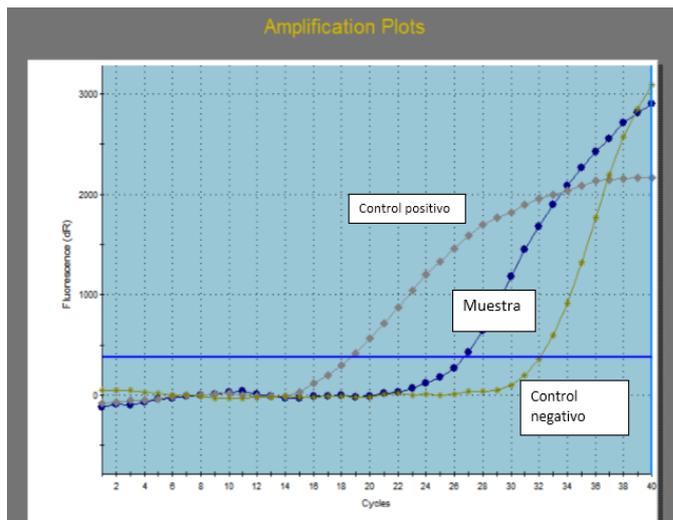
Institución: Clínica Veterinaria "Mi Mascota".

Paciente: Sara.

Edad: 4 meses.

Raza: Mestizo.

Muestra: Hisopado rectal.



MVZ. Gabriel Molina Cuasapaz MSc.
Coordinador de Diagnóstico Veterinario
+593 998587787

Biol. David Ortega Paredes MSc. PhD.
Coordinador de Diagnóstico Molecular Veterinario
+593 995836635

Dr. Galo Leoro Monroy
Médico-Director
02 2 239379

Diagnóstico de Parvovirus Canino (CPV-qPCR)

Código: CPV-1021

Fecha de toma de muestra: 27/06/2021

Fecha de reporte: 30/06/2021

Resultado: **Negativo**

Propietario: -

Institución: Clínica Veterinaria "Mi Mascota".

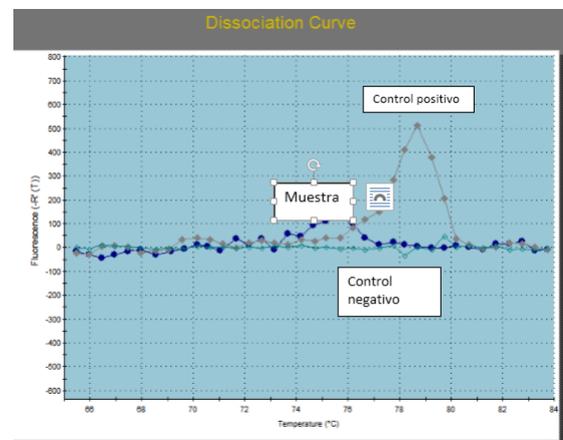
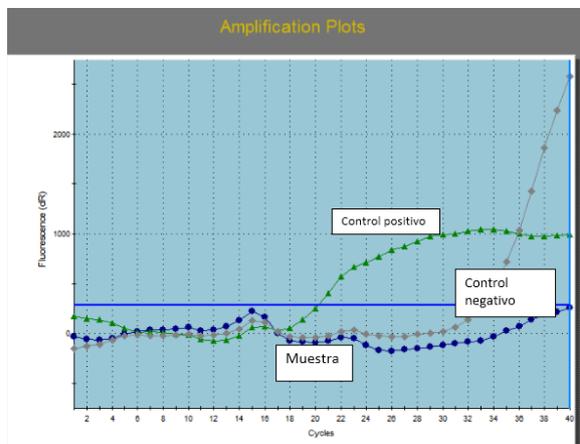
Paciente: Zered.

Edad: 2 meses.

Raza: Mestizo.

Muestra: Hisopado rectal.

Observaciones: El contenido de la muestra llegó al laboratorio derramado en la funda, se utilizó el sobrante del tubo para realizar la amplificación, se recomienda repetir el muestreo adecuadamente para confirmar el resultado.



MVZ. Gabriel Molina Cuasapaz MSc.
Coordinador de Diagnóstico Veterinario
+593 998587787

Biol. David Ortega Paredes MSc. PhD.
Coordinador de Diagnóstico Molecular Veterinario
+593 995836635

Dr. Galo Leoro Monroy
Médico-Director
02 2 239379

Diagnóstico de Parvovirus Canino (CPV-qPCR)

Código: CPV-1022

Fecha de toma de muestra: 28/06/2021

Fecha de reporte: 30/06/2021

Resultado: Positivo

Propietario: -

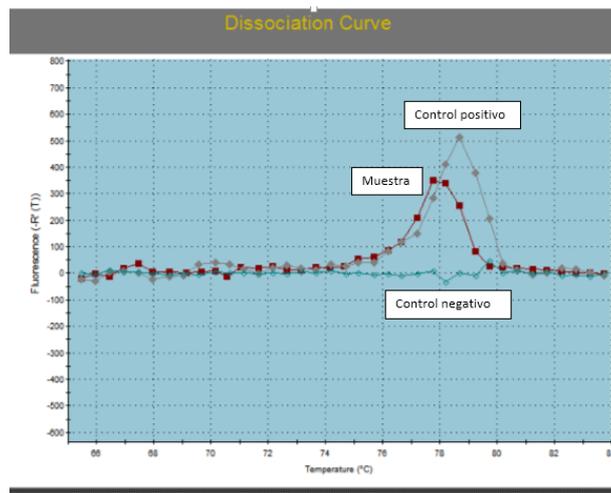
Institución: DOCTORVET.

Paciente: Morcilla.

Edad: 2 meses.

Raza: French toy.

Muestra: Hisopado rectal.



MVZ. Gabriel Molina Cuasapaz MSc.
Coordinador de Diagnóstico Veterinario
+593 998587787

Biol. David Ortega Paredes MSc. PhD.
Coordinador de Diagnóstico Molecular Veterinario
+593 995836635

Dr. Galo Leoro Monroy
Médico-Director
02 2 239379

Diagnóstico de Parvovirus Canino (CPV-qPCR)

Código: CPV-1023

Fecha de toma de muestra: 05/07/2021

Fecha de reporte: 07/07/2021

Resultado: **Positivo**

Propietario: -

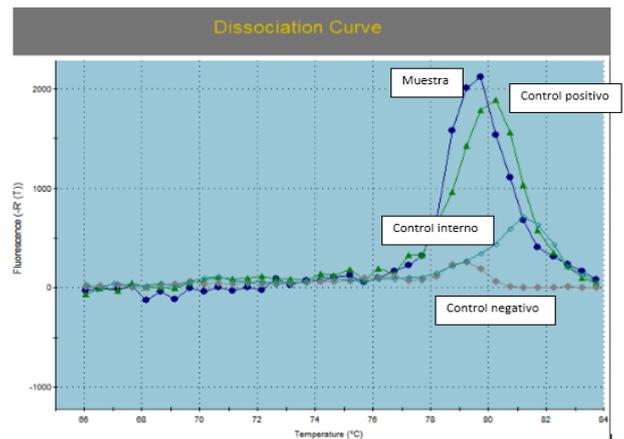
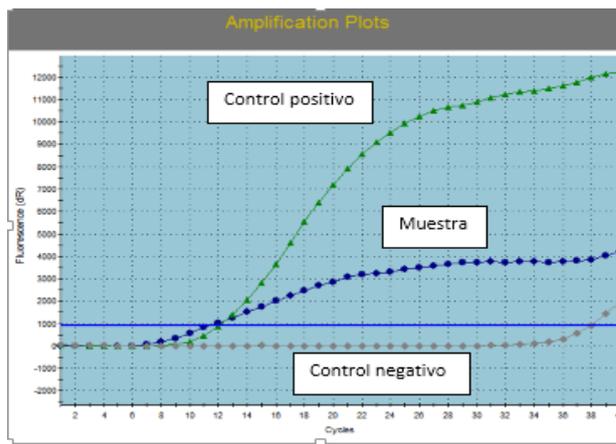
Institución: Clínica Veterinaria "Mi Mascota".

Paciente: Peluchín.

Edad: 6 meses.

Raza: French Toy.

Muestra: Hisopado rectal.



MVZ. Gabriel Molina Cuasapaz MSc.
Coordinador de Diagnóstico Veterinario
+593 998587787

Biol. David Ortega Paredes MSc. PhD.
Coordinador de Diagnóstico Molecular Veterinario
+593 995836635

Dr. Galo Leoro Monroy
Médico-Director
02 2 239379

Diagnóstico de Parvovirus Canino (CPV-qPCR)

Código: CPV-1024

Fecha de toma de muestra: 05/07/2021

Fecha de reporte: 07/07/2021

Resultado: **Positivo**

Propietario: -

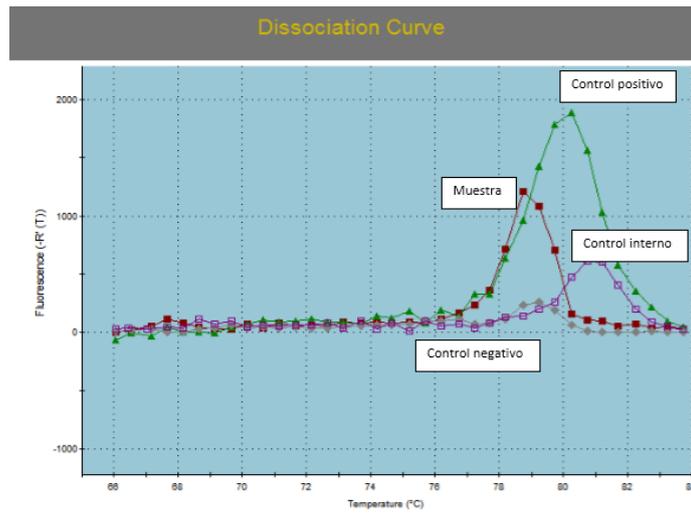
Institución: Clínica Veterinaria "Mi Mascota".

Paciente: Max.

Edad: 6 meses.

Raza: French Toy.

Muestra: Hisopado rectal.



MVZ. Gabriel Molina Cuasapaz MSc.
Coordinador de Diagnóstico Veterinario
+593 998587787

Biol. David Ortega Paredes MSc. PhD.
Coordinador de Diagnóstico Molecular Veterinario
+593 995836635

Dr. Galo Leoro Monroy
Médico-Director
02 2 239379

Diagnóstico de Parvovirus Canino (CPV-qPCR)

Código: CPV-1025

Fecha de toma de muestra: 08/07/2021

Fecha de reporte: 09/07/2021

Resultado: **Positivo**

Propietario: -

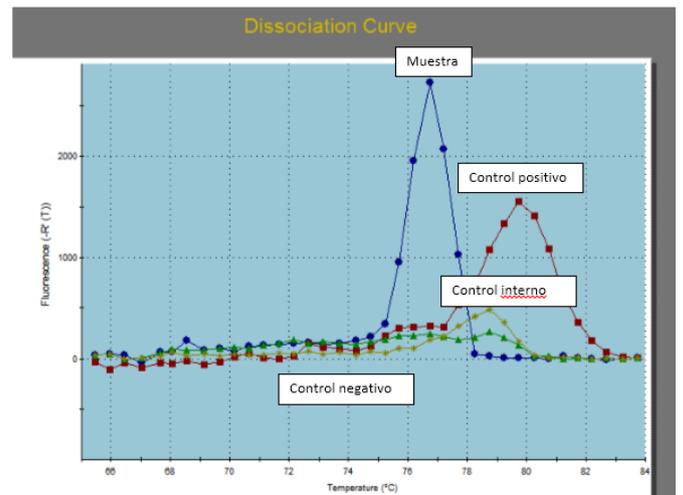
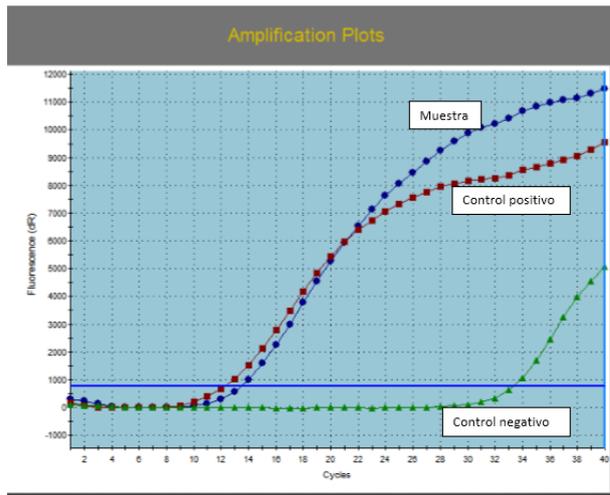
Institución: Hospital Veterinario "Planeta Vida".

Paciente: Lucas.

Edad: 4 meses.

Raza: French Toy.

Muestra: Hisopado rectal.



MVZ. Gabriel Molina Cuasapaz MSc.
Coordinador de Diagnóstico Veterinario
+593 998587787

Biol. David Ortega Paredes MSc. PhD.
Coordinador de Diagnóstico Molecular Veterinario
+593 995836635

Dr. Galo Leoro Monroy
Médico-Director
02 2 2393

