

Diagnóstico molecular de la Parvovirus canina en perros geriátricos

Molecular diagnosis of Canine Parvovirus in geriatric dogs

Jonathan Eduardo Muncha-Mullo*¹ y Manuel Maldonado-Cornejo²

¹Universidad Católica de Cuenca, Posgrado. Cuenca, Azuay, Ecuador. ²Universidad Católica de Cuenca. Cuenca, Azuay, Ecuador

*Correo electrónico: jmuncha@udlanet.ec

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de parvovirus canino en perros geriátricos que asistieron a consulta con sintomatología gastrointestinal compatible con parvovirus canina en el periodo octubre a diciembre del año 2021 en una clínica veterinaria del sur de Quito, Ecuador, mediante diagnóstico molecular (PCR), se tomó muestras de heces del recto con un hisopo y se homogenizó (10 % p/v) en solución ARN Latter. Las heces suspendidas fueron separadas por centrifugación y se utilizó alícuotas de 200 µL de los sobrenadantes para extraer el ADN. Para el diseño de cebadores y sonda del GenBank fueron recuperadas secuencias de nucleótidos de la partícula viral VP2 de algunas cepas del CPV-2, las cuales fueron alineadas mediante el uso del software Primer 3. Los números y las cepas usadas para la alineación fueron: CPV2: CPV-b, M38245 y CPV-Northern, M19296; CPV2a: CPV-15, M24003 y CPV-31, M24000; CPV-2b: CPV-39, M74849 y CPV-133, M74852; CPV-2 Glu426 mutante: 56/00, AY380577. Para la identificación de la región objetivo del ensayo se realizó por visualización de la alineación de la secuencia para amplificar un fragmento conservado de 93 pb dentro de las secuencias alineadas de VP2. Se realizó PCR en tiempo real con un sistema de detección en tiempo real y estos datos fueron analizados con el software detector de software MXpro Real time qPCR (versión 3.0). La mezcla de PCR de 25 µL para la reacción contiene el mastermix Q Script, los cebadores (laboratorio VetNAAT), Eva Green y agua libre de nucleasas hasta completar la reacción. Se detectó el virus en el 28 % de los pacientes geriátricos muestreados.

Palabras clave: Parvovirus; geriátricos; PCR; gastroenteritis

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the presence of Canine Parvovirus in geriatric dogs that attended consultation with gastrointestinal symptoms compatible with canine parvovirus in the period from November to December 2021 in a Veterinary Clinic in the South of Quito, Ecuador by molecular diagnosis (PCR), stool samples were taken from the anus with a swab and homogenized (10 % w/v) in RNA Latter solution. Suspended faeces were separated by centrifugation and 200 µL aliquots of supernatants were used to extract DNA. For the design of primers and probes from GenBank, VP2 nucleotide sequences were retrieved from some CPV-2 strains, which were aligned using Primer3 software. The numbers and strains used for the alignment were: CPV2: CPV-b, M38245 and CPV-Northern, M19296; CPV2a: CPV-15, M24003 and CPV-31, M24000; CPV-2b: CPV-39, M74849 and CPV-133, M74852; Mutant CPV-2 Glu426: 56/00, AY380577. Identification of the target region of the assay was first performed by visual sequence alignment to amplify a conserved 93 bp fragment within the aligned VP2 sequences. Real-time PCR was performed with a real-time detection system and these data were analyzed with MXpro Real time qPCR software detector software (version 3.0). The 25 µL PCR mix for the reaction contains the Q Script master mix, the primers (VetNAAT lab), Eva green and nuclease-free water until the reaction is complete. The virus was detected in 28 % of geriatric patients sampled.

Key words: Parvovirus; geriatrics; PCR; gastroenteritis

INTRODUCCION

La Parvovirus canina (CPV) es causada por el parvovirus canino tipo 2 (CPV-2), el cual es un virus que afecta a los canidos; perros salvajes (*Lycan pictus*), perros domésticos (*Canis lupus familiaris*), zorros comedores de cangrejos (*Cerdocyon thous*), mapaches (*Procyon*), y lobos con melena (*Chrysocyon brachyurus*), causando cuadros de gastroenteritis graves en animales susceptibles, que pueden ir desde diarreas sanguinolentas hasta provocar la muerte del individuo siendo la mortalidad entre el 20 y 40 % [15].

El CPV es de tamaño pequeño, mide 20 nanómetros (nm) y pertenece a la familia *Parvoviridae*, no posee envoltura lipídica, tiene cápside de forma icosaédrica, tiene ácido desoxirribonucleico (ADN) de cadena simple en sentido negativo [15]. La familia *Parvoviridae* se encuentra dividida a su vez en dos subfamilias clasificadas por su rango y hospedador: La subfamilia *Parvovirinae* afecta a los vertebrados y la *Densovirinae* afecta a insectos y algunos artrópodos [15].

El CPV afecta al tracto gastroentérico invadiendo las criptas intestinales conduciendo a un acortamiento de las vellosidades reduciendo la capacidad de absorción y digestión causando diarreas sanguinolentas [11].

Los parvovirus necesitan para su replicación, una célula en división rápida nuclear, en donde forma cuerpos de inclusión intracelular [15].

Se considera que el CPV-2 surgió de una mutación de un virus con características similares al de la panleucopenia viral felina (FPLV), el cual logró adaptarse a los caninos; en el mercado existen vacunas disponibles y a pesar de esto el CPV es el agente etiológico más relevante en enfermedades virales del tracto gastroentérico, sobre todo en cachorros. El CPV-2 es la cepa original y ha tenido varias mutaciones lo cual ha dado inicio a la aparición de nuevas variantes [9].

En la década de los 70 surgió el primer brote de CPV, clasificado de tipo II y desde ese momento ha sufrido varias alteraciones genéticas (mutaciones) en su hospedador final el perro, generándose desde entonces nuevas cepas [15]. Más adelante, a principio de los 80, esta cepa original sufrió una mutación genética y apareció el CPV tipo 2^a [15]. En el año 1984 apareció la variante CPV tipo IIb, esto como consecuencia de una adaptación genética por parte del virus, la cual ayudó a que éste pueda replicarse y propagarse de una forma más eficaz en caninos susceptibles y establecer periodos de incubación más cortos, entre 4 y 5 días (d) [15].

La forma de propagación del virus se dio mediante la excreción por vía fecal, reportándose en las heces en una proporción de 10⁹ partículas virales, referente a una dosis media de un cultivo tisular, la cual se da durante el periodo agudo de la enfermedad; en esta fase, los animales susceptibles se podrían infectar rápidamente por vía del contacto oro-fecal o con fluidos de líquidos tisulares (melena) [8].

El virus (CPV) es resistente a las condiciones ambientales, lo cual hace que la enfermedad esté presente en las poblaciones caninas, debido a su fácil diseminación [8] pudiéndose transmitir a partir de los 8 a 12 d post infección, y excretándose por las heces de pacientes infectados, los cuales a su vez se convierten en reservorios del virus [8].

Entre los factores predisponentes de la enfermedad se citan, la edad y el estado inmunitario del perro, que determinan si el individuo se pueda infectar y sobrevivir tras la infección [8]. Luego del periodo de incubación, que oscila entre 4 a 7 d, los pacientes infectados presentan cuadros repentinos de vómitos, diarreas, anorexia y fiebre [8].

El CPV afecta a perros de cualquier edad presentándose en cachorros con mayor frecuencia, en pacientes adultos que han sido vacunados se han encontrado casos positivos, sin embargo la enfermedad en estos pacientes no es tan agresiva y en pacientes geriátricos inmunocomprometidos se han reportado casos con cuadros gastroentéricos hemorrágicos [14].

Las vacunas son una herramienta indispensable en Medicina Veterinaria que ayudan a controlar la presencia de enfermedades infecciosas en los animales de compañía, sin embargo existen factores que pueden interferir en una correcta inmunización como por ejemplo, la inmunización en cachorros menores a 5 semanas (sem) de edad ya que los anticuerpos maternos pueden interferir en la inmunización, de aquí la importancia de cumplir con un correcto calendario de vacunación para que la vacuna tenga un efecto adecuado y pueda proteger de las enfermedades infecciosas a lo largo de la vida del paciente [10].

Existen casos de animales positivos para CPV pese a tener vacunas dentro de su calendario de salud, sin embargo no han sido colocadas dentro del tiempo establecido, estos pacientes han logrado superar a la enfermedad en menor tiempo y con mínimas complicaciones frente a pacientes con presencia del virus y sin calendario de vacunación [6].

Los factores de riesgo para que un animal pueda infectarse del CPV están relacionados a la alimentación, los animales que consumen carne cruda, huesos y alimento casero, animales con cargas parasitarias gastroentéricas, mal estado de salud, y la falta de un calendario de vacunación [2].

La transmisión de CPV también se puede dar por fómites tales como: platos, zapatos, juguetes, bebederos, jaulas, entre otros, que tuvieron contacto con heces o vómitos de perros enfermos [16]. Tras la ingestión, la replicación viral primaria se da en los órganos linfoides orofaríngeos, ganglios linfáticos mesentéricos y el timo. El virus se generaliza de los sitios primarios de la replicación por vía sanguínea hacia las células del intestino delgado y células epiteliales de la lengua, cavidad oral y esófago [1]. Otros órganos blanco del CPV son pulmones, hígado, riñón, además posee cierto tropismo por las células hematopoyéticas [1]. En cachorros se ha visto que las células del miocardio también se ven afectadas por el virus CPV [1].

La necrosis que se produce en las células del intestino delgado, generan un colapso de las vellosidades, generándose un colapso, de la cual se pierde la integridad del epitelio intestinal; al perderse esta integridad, se facilita la translocación bacteriana y la producción de endotoxinas como consecuencia de la pérdida de la barrera epitelial del intestino delgado, causándose así, una bacteriemia generalizada con la lamentable muerte del paciente como consecuencia de una falla multiorgánica [1].

Una vez que la CPV se instaura en el paciente, los signos clínicos pueden ir desde una infección leve que pasa casi desapercibida, hasta una infección aguda que puede ser mortal. Los principales signos que se presentan son: la anorexia, letargia y pirexia la cual puede progresar dentro de 1 a 2 d presentándose vómitos y diarreas sanguinolentas, lo cual se acompaña de dolor abdominal y cuadros de deshidratación que pueden oscilar entre 7 y 10 % [12].

La CPV puede presentarse de forma cardiaca, siendo ésta otra manera en la que ha sido reportada aunque solamente en cachorros menores de 12 sem de edad, pudiéndose dar casos también en animales adultos, sobrevivientes a la infección, a los cuales se le generó una miocarditis secundaria al proceso viral, los cuales luego puedan sufrir

fallas cardíacas sobre los 5 años de edad. La presentación cardíaca tiene una tasa de mortalidad superior al 50 %, en cachorros con afección cardíaca por el virus presentan postración, arritmias cardíacas evidentes en la auscultación y edemas pulmonares [12].

Un cuadro sobreagudo se ha reportado en cachorros de 4 a 12 sem de edad, caracterizado por un aumento en la respiración, quejidos, vómitos repentinos, llegando hasta la muerte, en solo cuestión de minutos (min) a esta forma se le conoce como "síndrome miocárdico" [12]. Los cachorros que logran superar este cuadro, van a presentar más adelante, alteraciones cardíacas como: congestión cardíaca y edema pulmonar [12]. En el cuadro subagudo se presenta diarrea leve la cual es responsiva al tratamiento el paciente es portador sano y tiende a no presentar episodios de hipertermia [12].

El diagnóstico clínico de la enteritis producida por parvovirus se puede confundir como resultado de su presentación impredecible, ya que los signos clínicos de parvovirus pueden tener diagnósticos diferenciales con cuadros de Salmonelosis, coronavirus y la fase entérica del distemper canino, entre otras enfermedades parasitarias [12]. Los métodos que se utilizan hoy en día para la detección de CPV 2 a partir de las heces o contenido intestinal son: la microscopía electrónica, hemoaglutinación fecal, aislamiento viral, la aglutinación con látex, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), inmunocromatografía y las pruebas de ELISA [13].

Estos estudios son útiles para el diagnóstico ya que en los casos agudos de la enfermedad, la cantidad de virus que se elimina en las heces es considerablemente grande. Actualmente algunas pruebas se realizan en laboratorios, pero al tener la necesidad de realizar un diagnóstico temprano existen pruebas rápidas como es: Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA), este examen se puede realizar de forma práctica, la cual requiere de una muestra de heces pequeña o hisopado rectal, se la realiza rápidamente y la sensibilidad y especificidad son altas [13].

La inmunocromatografía es un método diagnóstico que consiste en detectar antígenos de CPV y virus del distemper canino (DCV) en heces y vómitos, dos anticuerpos monoclonales se unen específicamente a epítopes distintos de los antígenos, posteriormente son absorbidos en la esponja de celulosa, estos antígenos de CPV son desplazados y se unen al complejo oro-coloide del anticuerpo de CPV el cual forma un complejo anticuerpo antígeno [17].

Existen pruebas de diagnóstico molecular como el PCR en tiempo real, esta técnica puede diferenciar las cepas virales al utilizar muestras fecales frescas teniendo una sensibilidad y especificidad alta, sin embargo su costo es elevado; las sondas genómicas MGB (Minor Groove Binder) pueden reconocer las diferencias que existen entre los nucleótidos de las cepas virales [7].

El diagnóstico clínico del CPV es difícil ya que la sintomatología clínica como vómitos y diarreas es muy común en otras enfermedades gastroentéricas, por lo cual es necesario el uso de herramientas diagnósticas de alta sensibilidad y especificidad como el PCR en la cual se detecta el ADN viral, siendo esta prueba un método fiable, preciso y rápido para la detección del CPV, esta prueba requiere de 2 a 4 horas para la detección viral [4].

MATERIALES Y METODOS

Muestras

Para el estudio se obtuvieron 24 muestras de heces, vía rectal de perros geriátricos (mayores a 7 años), que se presentaron en el servicio veterinario de la clínica veterinaria del Sur de Quito durante el periodo entre los meses de octubre a diciembre del 2021, con sintomatología gastroentérica como diarreas y vómitos. A cada uno de los pacientes le fue llenada la ficha médica, los pacientes enfermos presentaron signos clínicos como vómitos y fiebre conjuntamente con diarreas hemorrágicas.

Toma de la muestra

La toma de la muestra se realizó mediante el uso de un hisopo estéril, posteriormente se colocó la muestra de heces en el buffer ARN Lateral, conteniendo el ácido ribonucleico, en un volumen de 600 microlitros (µL) en donde se conservará el material genético viral.

Luego las muestras fueron conservadas en un congelador (marca Biobase, modelo BPR-5UV160, España) y mantenidas entre 2 y 8°C, hasta su posterior análisis. Cada una de las muestras fue identificada con los datos del paciente para su posterior análisis en el procesador MX3000 Multiplex Quantitative PCR (qPCR) System marca Stratagene, EUA.

Diseño experimental

El análisis estadístico se realizó mediante una estadística descriptiva (frecuencias y porcentajes de individuos positivos y negativos), considerando la cantidad de muestras que fueron tomadas de acuerdo a los criterios de inclusión y exclusión que se planteó en la investigación, en donde se tomaron para el estudio los perros geriátricos con sintomatología gastroentérica que asistían a consulta durante los meses de octubre a diciembre.

Extracción del ADN

Para la extracción de ADN, después de la toma de la muestra se la colocó en solución ARN Lateral, se homogenizó la muestra, se centrifugó a alta velocidad 12.298 G y se separó las suspensiones fecales y se usaron alícuotas de 200 µL del sobrenadante. Se utilizó una centrifuga marca Bionote, modelo mini 10, fabricada por GYROZEN de origen Coreana.

PCR en tiempo real

Se realizó el PCR en tiempo real mediante el uso de un sistema de detección en tiempo real y para el análisis de los datos se utilizó el software detector de software MXpro Real time qPCR (versión 3.0).

Para realizar la reacción, la mezcla de PCR de 25 µL contiene el mastermix Q Script, los cebadores VetNAAT Lab, Eva Green, agua libre de nucleasas hasta que la reacción se complete.

El protocolo que se usó en este estudio fue: a 95 °C se activó la Taq ADN polimerasa durante 10 min y 40 ciclos consistentes en desnaturalización a una temperatura de 95°C por 15 segundos (s), se realizó la hibridación de los cebadores a una temperatura de 52 °C, durante 30 s y extensión a temperatura de 60 °C durante 1 min.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la FIG. 1 se puede observar que en este estudio se obtuvo 28 % (7/25) de positivos para CPV por PCR (Diagnóstico molecular) en el grupo de pacientes que presentaron sintomatología gastroentérica.

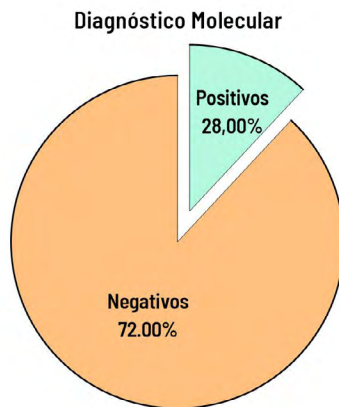


FIGURA 1. Porcentaje de pacientes positivos y negativos a Parvovirus canina

De los pacientes geriátricos vacunados que se presentaron a consulta con sintomatología gastroentérica, no se encontró ningún caso positivo.

Del total de casos positivos, en el estatus casos por sexo, el 12 % fueron hembras y el 16 % machos.

En el estudio realizado por Moncada [15] se encontró el 27 % de animales adultos con patologías gastroentéricas, lo cual se puede asemejar con el presente estudio en donde se encontró un 28 % de perros positivos para CPV, teniendo en cuenta que en el estudio de Moncada [15] no se realizó PCR para CPV en los pacientes con sintomatología gastroentérica.

En la actualidad, el CPV es una de las causas principales de gastroenteritis infecciosa en perros alrededor del mundo, teniendo altas tasas de morbilidad y mortalidad, principalmente en cachorros lo que dificulta la tenencia y crianza de mascotas, esto implica tener técnicas de diagnóstico de alta sensibilidad y especificidad, tanto para instaurar un adecuado tratamiento como para evitar la diseminación de la enfermedad, por lo cual en el estudio realizado por Cáceres [5] utilizando PCR se logró detectar el 41,7 % de cachorros infectados con CPV mientras que, en el presente estudio se obtuvo el 28 % de casos positivos a CPV en perros geriátricos diagnosticados mediante PCR, resultados que se asemejan a los obtenidos en el presente estudio con la diferencia de que se encontró el 28 % de casos positivos en pacientes geriátricos con sintomatología gastroentérica.

En un estudio realizado por Azam se encontró el 14,28 % de casos positivos a CPV en cachorros con sintomatología gastroentérica, resultados que se asemejan al presente estudio con un 28 % de casos positivos correspondientes a pacientes geriátricos [4].

En un estudio realizado por Aldaz, en donde se evaluaron los factores de riesgo asociados a CPV ratifica que la edad es un factor

importante para contraer la enfermedad, en este estudio se evidenció que la mayor casuística de perros enfermos se dió en cachorros menores de 6 mes de edad [2].

En un estudio realizado en Perú por Villanueva [18] se encontró la presencia de parvovirus en pacientes de 12 a 24 mes de edad determinando como resultado el 7 %, lo cual indica que existe la presencia de CPV en pacientes adultos, al igual que en el presente estudio se evidenció la presencia del virus en pacientes geriátricos y no como lo manifiesta Arindaga que el PC es una enfermedad infecciosa que se presenta solo en cachorros [3].

En un estudio realizado por Flores en Nicaragua mediante PCR se encontró 28,9 % de casos positivos a CPV (13/45) en cachorros, el 66,7 % (30/45) de los pacientes presentaron cuadros diarreicos, el 43,3 % (13/30) dió positivo para el CPV y el resto de perros que no presentaron diarrea dieron negativo [9]. Los resultados de este estudio se asemejan a los encontrados en la presente investigación de acuerdo a la relación pacientes con diarrea ya que en los dos estudios los pacientes con diarrea fueron los que dieron positivos a CPV.

CONCLUSIONES

En este estudio se comprobó la presencia de CPV en pacientes geriátricos y que mediante la PCR, se puede diagnosticar los casos positivos, ratificando que es una excelente herramienta diagnóstica para CPV.

Con este estudio se recomienda a los médicos veterinarios colocar dentro de los diagnósticos diferenciales a la CPV en pacientes geriátricos con sintomatología gastroentérica, así se puede dar un tratamiento temprano y se puede evitar que la enfermedad se disemine, dado que si se encontró pacientes geriátricos positivos a la enfermedad y ocasionalmente en, la clínica diaria se pasan desapercibidos.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores certifican que no existen conflictos de intereses en el presente artículo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] ALBAN, G.; MARTOS, C. ; SANCHEZ, I. Parvovirus canino. En: **Medicina Interna en pequeños animales**. 1era. Ed. Elsevier. México. Pp 245-266. 2019.
- [2] ALDAZ-CÁRDENAS, J.; GARCÍA-DÍAZ, J.; QUIÑONEZ-RAMOS, R. Factores de riesgo asociados a la Parvovirus Canina en el Cantón Guaranda, Bolívar, Ecuador. **Rev. Salud Anim.** 37(3): 183-190. 2015.
- [3] ARÁNDIGA, L. Revisión de la Parvovirus canina: actualización de las últimas técnicas diagnósticas y tratamientos médicos. 2021. Universidad Católica de Valencia. España. En línea: <https://bit.ly/3MLGETH>. 20/11/2021.
- [4] AZAM, M.; Detección de parvovirus canino por PCR y su asociación con algunos factores de riesgo. **Rev. MVZ Córdoba**. 23(2): 6607-6616. 2018.
- [5] CACERES, A. Implementación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para la Detección de Parvovirus. 2017. Universidad de Chile. Chile. En línea: <https://bit.ly/30bJERA>. 15/12/2021.

- [6] CASTILLO-CERVANTES, K.; GUERRERO-LOREDO, A.; VELAZQUEZ-ORDONEZ, V.; ZAMORA-ESPINOSA, J.; FAJARDO-MUNOZ, R. Estudio comparativo de casos fatales de parvovirus canino tipo II en cachorros (*Canis familiaris*) importados. **Rev. Biol. Agropec. Tuxpan** 2(1): 216-220. 2014.
- [7] DIAZ, C.; CORREA, J.; VERA, V. Aspectos moleculares del virus de la parvovirus canina y sus implicaciones en la enfermedad. **Rev. Med. Vet.** (15): 57-65. 2008.
- [8] ESCOBAR, K. Determinación de la frecuencia de títulos de anticuerpos IgG protectores contra Parvovirus canino tipo 2 en una población de perros de la zona Conurbada de Toluca. 2016. Universidad Autónoma del Estado de México. México. En línea: <https://bit.ly/3zxdw60>. 15/12/2021.
- [9] FLORES, B.; MAIRENA, J.; GUTIERREZ, J.; SHELEBY-ELIAS, J.; FUERTES, H.; HALAIHEL, N. Identificación de parvovirus canino tipo 2C en cachorros de Nicaragua. **Rev. MVZ Córdoba.** 25(2): e1788. 2021.
- [10] FRANCO, G.; PUENTES, R. Pautas para la vacunación en caninos y felinos en Uruguay. **Vet.** (Montevideo). 56(213): e20205621305. 2020.
- [11] HURTADO-HERNANDEZ, D.; BAEZ-SUAREZ, P. Nueva perspectiva del parvovirus canino. **J. Agricult. Anim. Sci.** 1(2): 55-60. 2012.
- [12] GONZALEZ, D.; GUZMAN, A. C. Estudio retrospectivo del diagnóstico histopatológico de enfermedades enterocolíticas en caninos en el período 2013 - 2017 de la empresa Corpavet. 2019. Colombia. En línea: <https://bit.ly/3xExMSl>. 15/12/2021.
- [13] MARRON, G. Correlación de la cinética de severidad de la enfermedad, conteo total de leucocitos y títulos de IgG contra parvovirus canino en perros naturalmente infectados (vacunados y no vacunados). 2018. Universidad Autónoma del Estado de México. México. En línea: <https://bit.ly/3Nlc3>. 12/12/2021.
- [14] MAURO, L. Claves para comprender a la Parvovirus Canina producida por la variante CPV-2c. **REDVET.** 16(2): 1-10. 2015.
- [15] MONCADA, F.C. Estudio retrospectivo de casos de necropsia en caninos en el periodo 2013 - 2018 de la empresa Corpavet y del laboratorio de patología de la Universidad de La Salle. 2019. Colombia. En línea: <https://bit.ly/3zMRCN5>. 05/01/2022.
- [16] RUIZ-ROMERO, R.; CANDOSA-ARANDA, E.; SANCHEZ-GODOY, F.; DUCOING-WATTY, A. Diagnóstico del parvovirus canino-2 (CPV-2) por inmunohistoquímica en perros domésticos. **Vet. Mex.** 38(1): 41-53. 2007.
- [17] SILVA, P.; DALLO, B.; PESENTI, A.; MEDEIROS, J.; MARTINS, A.; MACHADO, L. Prueba inmunocromatográfica rápida en el diagnóstico del moquillo canino. **Rev. MVZ Córdoba.** 27(1): 1-8. 2022.
- [18] VILLANUEVA, I. Prevalencia de Parvovirus y Coronaviriosis Canina Diagnosticadas por Inmunocromatografía en el Distrito de Castilla. 2021. Universidad Nacional de Piura. Perú. En línea: <https://bit.ly/3mFTLIP>. 10-02-2022.