

## 실시간 중합효소연쇄반응법을 이용한 개 파보바이러스 감염증의 분변에서 바이러스 정량 분석

고민수 · 신소연 · 김용환\* · 고바라다\* · 이봉주<sup>1</sup>

전남대학교 수의과대학 수의학과  
\*광주광역시 보건환경연구원

### A Real Time PCR Assay for Detection and Quantitation of Canine Parvovirus Type 2 in the Feces of Dogs with Parvovirus Infection

Min-Soo Koh, So-Yeon Sin, Yong-Hwan Kim\*, Ba-Ra-Da Koh\* and Bong-Joo Lee<sup>1</sup>

College of Veterinary Medicine, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea  
\*Gwangju Metropolitan Health & Environment Research Institute, Gwangju, 500-210, Korea

**Abstract :** We described a rapid, sensitive and reproducible real-time PCR assay for detection and quantitation of canine parvovirus type 2 in the feces of dogs with parvovirus infection. The method was demonstrated to be highly specific and sensitive, allowing a precise canine parvovirus type-2 quantitation over range of eight orders of magnitude from  $10^2$  to  $10^9$  copies of standard DNA. Then, fecal samples from parvovirus infected dogs were analyzed by conventional PCR and real-time PCR. Real-time PCR is more sensitive than conventional PCR, allowing to detect low viral titers of CPV-2 in infected dogs. By real-time PCR, a wide range of parvovirus particles was found in the samples from  $1.45 \times 10^6$  to  $9.45 \times 10^8$  copies/0.01 g of feces. However, when dogs are in infection of parvovirus, it is difficult to prove that the numbers of peripheral blood leukocytes are correlated with those of fecal shedding virus.

**Key words :** canine parvovirus, real-time PCR.

### 서 론

개 파보바이러스(canine parvovirus: CPV)는 parvoviridae family에 속하며 고양이 범백혈구감소증 바이러스(feline panleukopenia virus (FPV))와 형태학적 및 유전학적으로 매우 유사하며 밀접한 관계가 있다<sup>12,15</sup>. CPV는 외막이 없는 바이러스로 단사유전자를 가지며 이십면체의 구조로 되어있다<sup>2</sup>. CPV는 멍크 장염바이러스와 항원적으로 비슷하며, 또한 고양이 FPV의 변이주로 추정되고 있다<sup>4,16</sup>.

파보바이러스 감염증은 1977년 개에서 장염을 유발하는 것으로 최초 보고된 이후 세계적으로 급속히 전파되었다<sup>2</sup>. CPV는 어린 강아지에서 출혈성 장염과 림프구 감소증을 일으키는데, 감염은 비강이나 구강을 통하여 이루어지며 3-10일의 잠복기를 거친다. 초기증상은 기력이 없고, 식욕감퇴와 구토를 일으키고, 구토를 시작한 후 24-48시간 내에 설사가 관찰되고, 계속 진행이 되면 탈수, 체중감소, 수양성 및 혈액이 포함된 설사가 관찰된다<sup>3</sup>. 일단 발병한 강아지는 분변으로 바이러스를 배출하는데 분변속에서 파보바이러스는 장기간 생존이 가능하다<sup>2,3</sup>. 따라서 CPV에 감염된 개의 분변에 노출이 되면 감수성이 높은 개들 특히 모체이행항체의 농도

가 낮고 백신 항체가의 형성이 미약한 6-12주령의 어린 개들은 파보바이러스에 대한 감수성이 매우 높아진다<sup>13</sup>.

파보바이러스에 감염된 개의 분변에서 바이러스를 검출하려는 방법으로 과거에는 ELISA와 hemagglutination (HA)방법 등이 사용되었지만 이러한 방법들은 민감도가 낮고, 시간과 노동력이 많이 필요하였다<sup>14,18</sup>. 그 후 일반적인 PCR법이 개발되어 바이러스를 진단하고 검출하는 방법으로 많이 사용되었다<sup>9,10,17</sup>. 하지만 최근에는 실시간 중합효소반응법(real-time PCR)이 개발되어 더욱 정확하고 신속하게 검사할 수 있으며 여기에 바이러스의 양을 정량까지 할 수 있어 많이 사용되고 있다<sup>1,6,7</sup>.

실시간 중합효소연쇄반응법은 PCR 증폭량을 실시간으로 확인하면서 해석하는 방법으로 전기영동이 필요 없이 신속하게 정량할 수 있는 장점을 가지고 있다.

현재까지 파보바이러스에 감염된 개에서 백혈구 감소증의 소견과 분변으로 분비되는 바이러스 양과의 상관관계를 확인한 연구가 없는 실정이었다. 따라서 본 연구에서는 개 파보바이러스 감염시 신속하게 진단할 수 있는 real-time PCR법을 이용하여 개 파보바이러스 감염시 분변내로 분비되는 바이러스의 정량을 측정하여 백혈구감소증 소견과의 상관관계를 비교하고자 실시하였다.

<sup>1</sup>Corresponding author.  
E-mail : bjlee@chonnam.ac.kr

## 재료 및 방법

### 재료수집 및 DNA 추출

분변 재료는 2004년 11월부터 2005년 2월까지 목포지역의 동물병원에서 구토와 혈변의 임상증상을 보이는 환견들을 파보 장염키트로 검사하여 파보바이러스 양성으로 판정된 39마리의 개들로부터 멸균된 면봉으로 직장에서 채취되었다. 채취된 분변은 phosphate buffered saline (PBS)에 균질화시켜, 3,000 rpm에서 10분간 원심 분리한 후, 상층액 200  $\mu$ l를 취하여 주형 DNA를 준비하는데 사용하였다. 파보바이러스 DNA의 추출은 AccuPrep Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 침부된 방법에 따라 추출하였다. 간단히 기술하면 상층액 200  $\mu$ l에 20  $\mu$ l의 proteinase K와 200  $\mu$ l의 binding buffer를 혼합하여 섞은 후 60°C에서 10분간 반응하였다. 반응이 끝난 후 100  $\mu$ l의 isopropanol을 혼합하여 섞은 lysate를 binding column tube에 옮겨 8,000 rpm에서 1분간 원심분리 하였다. 원심 후 binding column에 500  $\mu$ l의 세척용액을 넣고 원심분리하였다. 세척된 binding column에 binding 되어있는 DNA는 50  $\mu$ l의 elution buffer를 이용하여 추출하였다. 추출된 DNA는 -20°C에서 사용 전까지 냉동 보관하였다. 또한 파보바이러스 양성을 보인 동일한 개체에서 혈액을 채취하여 혈액분석기를 이용하여 혈액내의 백혈구수를 측정하였다.

### PCR을 이용한 감염여부 확인

분변에서 추출된 DNA를 이용하여 일반 PCR 방법으로 파보바이러스 양성 여부를 판정하였다. PCR은 VP1 유전자를 증폭시킬 수 있는 한 쌍의 primer를 설계 제작하여 사용하였다. 사용된 primer는 CPV-primer 1 (5'-AAGAGAGCCAGGAGAGGTA-3')과 CPV-primer 2 (5'-TTCTGACAGCAGGTTGACCA-3')이었다. PCR은 AccuPower PCR PreMix (Bioneer, Korea)를 사용하여 실시하였는데 반응액은 1  $\mu$ l의 각각의 primer에 3  $\mu$ l의 주형 DNA와 멸균된 증류수를 혼합하여 20  $\mu$ l로 조성되었다. PCR 반응액은 GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, USA)을 이용하여, 94°C에서 5분간 가열한 후 94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분간의 과정을 30회 반복하여 증폭시킨 후, 최종적으로 72°C에서 증폭된 DNA를 15분 동안 extension을 실시하였다. 증폭된 DNA의 확인은 1% agarose gel에서 560 bp의 밴드 유무로 확인하였다.

### 표준곡선을 만들기 위한 plasmid DNA 준비

표준곡선을 만들기 위한 plasmid DNA를 만들기 위하여 CPV-2의 VP2 gene을 증폭하여 pGEM-TEasy vector (Promega, USA)에 cloning 하였다. 이를 간단히 설명하면 CPV-2의 VP2 유전자에 존재하는 보존역에서 492 bp의 증폭 산물을 얻을 수 있는 한 쌍의 primer인 CPV VP2-F (5'-ATGAAAATCAAGCAGCAGAT-3')와 CPV VP2-R (5'-CTTCCACCAAAAATCTGAG-3')을 설계하여 준비하였다.

준비된 한 쌍의 primer를 사용하여 canine parvovirus를 PCR로 증폭한 후 GeneClean II kit (Bio101, USA)로 492 bp의 밴드를 잘라 삽입될 DNA를 준비하였고, pGEM-TEasy vector에 cloning하였다. 다량의 plasmid DNA를 확보하기 위해 *E. coli* DH5 $\alpha$  균주에 형질전환한 후 Plasmid mini kit (Qiagen, Germany)를 사용하여 plasmid DNA를 추출하였다. 추출된 standard plasmid DNA는 10<sup>1</sup>-10<sup>9</sup> copy/10  $\mu$ l로 10 배씩 계단 희석하여 real-time PCR를 실시하여 표준곡선을 작성하였다.

### Real-time PCR

Real-time PCR은 ABI Prism<sup>®</sup> 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, USA)에서 수행되었고, 도출된 정보는 sequence detection software로 분석되었다. 계단 희석된 standard plasmid DNA와 분변에서 추출된 DNA를 사용하여 real-time PCR을 실행하였다. 반응액에는 25  $\mu$ l의 Platinum Quantitative PCR SuperMix-UDG와 1  $\mu$ l의 ROX Reference Dye (invitrogen)를 넣고 600 nM의 primer CPV-For (5'-AAACAGGAATTAATACTATACTAATATATTTA-3')와 CPV-Rev (5'-AAATTTGACCATTTGGATAAACT-3'), 200 nM의 probe CPV-Pb (5'-TGGTCCTTAACTGCATTAATAATGTTACC-3') 그리고 1 ng/ $\mu$ l의 DNA가 포함되었다. 반응 조건은 먼저 95°C에서 10분간 가열한 후, 95°C에서 15초, 52°C에서 30초, 60°C에서 1분간의 과정을 40회 반복하여 행해졌다.

## 결 과

### 일반 PCR에 의한 파보 바이러스 검출

일반 PCR에 의한 파보바이러스의 양성의 경우에는 560 bp 크기의 밴드를 관찰할 수 있었다. PCR방법을 이용하여 파보 바이러스의 진단 키트의 양성을 보인 39마리의 분변에서 실시한 결과 39마리의 분변에서 모두 양성반응을 보인 것을 확인하고 모든 샘플을 real-time PCR에 사용하였다.

### 표준곡선

CPV-2의 VP-2 gene이 함유되어있는 표준 plasmid DNA 수를 10배수 계단희석을 실시하여 10<sup>1</sup>에서 10<sup>10</sup>개의 농도로 맞춘 후 real-time PCR을 실시하여 Fig 1과 같은 표준곡선을 만들었다. Real-time PCR의 검출가능 최저농도는 10<sup>2</sup>개의 표준 플라스미드 DNA 이었다.

### Real-time PCR과 일반 PCR의 민감도 비교

Real-time PCR의 sensitivity를 측정하기 위하여 표준곡선을 만들는데 사용되었던 계단 희석된 standard plasmid DNA로 일반 PCR을 실행하여 비교하였다. Real-time PCR에서는 10  $\mu$ l의 template DNA중에 10<sup>2</sup>개의 CPV capsid 2 gene이 들어있는 plasmid DNA가 존재하여도 양성의 반응을 보였지만(Fig 1) 일반 PCR에서는 같은 양의 template DNA

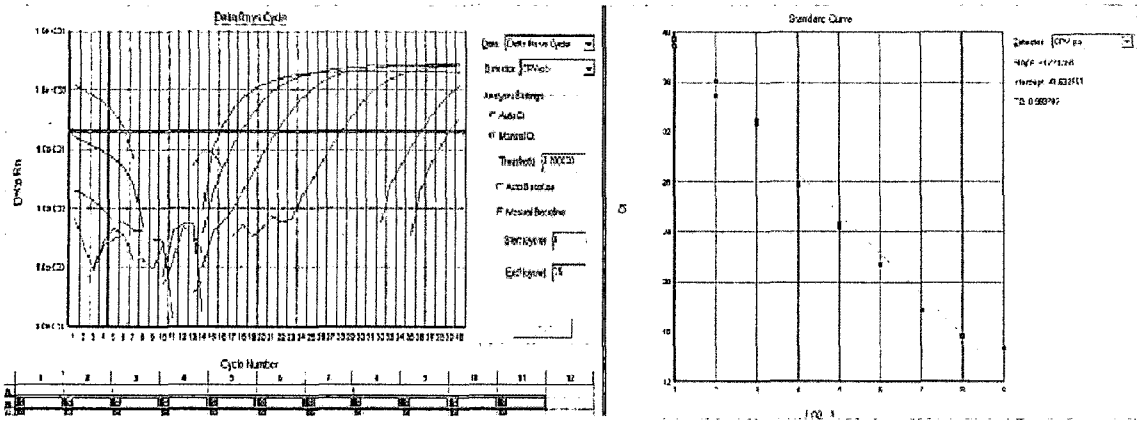


Fig 1. Real-time PCR standard curve: a 10-fold dilution series of standard plasmid DNA.

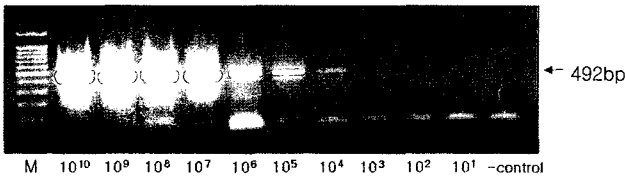


Fig 2. The serial dilution of standard plasmid DNA was detected by conventional PCR. M; 100 bp DNA ladder.

중에 10<sup>4</sup>개의 plasmid DNA가 존재할 때 양성반응을 보였다 (Fig 2).

개의 분변에서 파보 바이러스의 정량분석

파보바이러스 양성을 보인 39마리의 분변 0.1 g에서 추출한 DNA를 이용하여 real-time PCR을 실시한 결과, 분변 0.01 g 속에 1.45×10<sup>6</sup>-9.45×10<sup>8</sup>개의 바이러스 particle이 존재하는 것으로 나타났다(Table 1). 즉 파보바이러스에 감염된 개의 분변에는 다양한 농도의 바이러스가 존재하였다. 파보바이러스에 감염되어 나타나는 백혈구감소증의 수치와 분변에 존재하는 바이러스의 양과의 상관관계는 개체에 따라 다르게 나타났다. 39 예의 실험재료 중 20개의 실험재료에서는 혈액내의 백혈구수치와 분변내의 바이러스 titer가 반비례하여 나타났지만, 나머지(19/39)의 실험재료에서는 이러한 양상을 보이지 않았다(Fig 3).

고찰

현재까지 CPV-2를 빠르고 정확하게 정량하여 진단할 수 있는 방법은 없는 실정이다. 배양세포를 이용한 virus titration은 시간이 많이 소요되고 과정이 복잡하여 일상적인 실험방법은 아니며, 또한 모든 CPV 바이러스가 CPE를 형성하지 않기 때문에 이를 증명하기 위해서는 형광항체(IFA)를 이용하여 검출해야 되는데 이를 위해서는 더 많은 시간이 소요될 것이다<sup>5</sup>. 따라서 이러한 고전적인 방법을 사용하게 되면 특히 준 임상형에서나 회복기에 있는 개의 경우에는 오진을 할 수 있으며 이로 인해서 감염된 분변으로 환경을 오

염시킬 뿐만 아니라 다른 동물을 감염시킬 수 있다. 특히 대단위 사육장이나 동물보호시설에서 다수의 개가 사육되는 경우에는 분변으로 분비되는 작은 수의 바이러스에 의해 전체 개가 감염을 일으킬 수 있는데 이러한 경우에 real-time PCR을 이용하면 적은 수의 바이러스도 감지할 수 있기 때문에 예방을 위한 프로그램에도 사용할 수 있을 것이다.

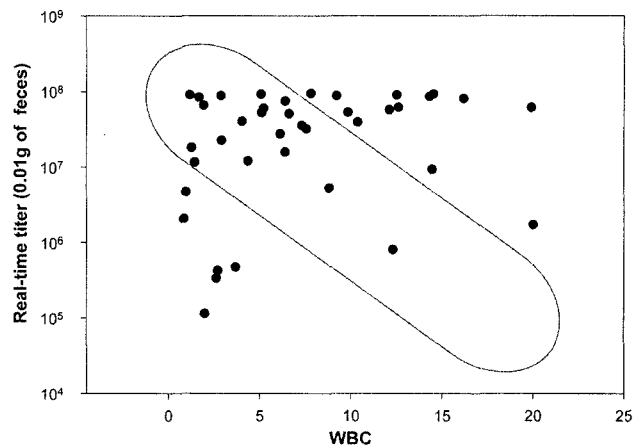
본 연구에서 간편하고 빠른 TaqMan을 이용한 real-time PCR을 이용하여 분변내에 있는 CPV-2 particles를 검출하고 정량을 시도하였다. 본 연구에서 사용한 real-time PCR은 일반 PCR에서 증폭하여 agarose gel에서 전기영동을 실시한 것보다 log<sub>2</sub>개의 CPV-2의 DNA copy를 검출할 수 있을 정도로 더 민감하다는 것을 보여주었으며, 이러한 결과는 Decaro 등 (2005)의 일반 PCR 과의 민감도 비교와도 일치하였다. 이와 같이 본 연구에서 확립한 real-time PCR은 재현성에서 탁월하였으며 10<sup>2</sup>에서 10<sup>9</sup>copy에서 검출이 가능하였다. 그리고 real-time PCR은 일반 PCR에 비교하여 자동화시스템을 갖고 있어서 더 많은 수의 샘플을 더 짧은 시간에 할 수 있는 장점을 갖고 있다. Decaro 등 (2005)은 개의 분변에서 CPV-2를 검출하기 위하여 real-time PCR법을 개발하고 이를 일반 PCR 방법, 형광항체 염색방법 그리고 hemagglutination 방법등과 비교하여 이중 real-time PCR방법이 가장 민감하고 특이도도 높다고 보고하였다.

본 연구에는 파보바이러스에 감염된 개에서 백혈구 감소증의 소견과 분변에서 분비되는 바이러스 양과의 상관관계를 확인하고자 파보 바이러스 감염 개의 혈액을 채취하여 백혈구 수치를 검사하고, 동일한 개체의 분변에서 분비되는 파보바이러스 양을 측정하여 비교하였다. 본 연구에서는 백혈구수치가 낮은 개체의 분변에서 분비되는 바이러스의 양이 많을 것이라고 가설을 세웠다. 하지만 이와 같은 가설을 입증하는 경우도 있었지만 그렇지 않은 경우도 많이 발견할 수 있었다. 절반 정도의 샘플에서만 이러한 분변내의 바이러스 농도는 혈액내의 백혈구 감소 수치와 반비례하는 양상을 보였다. 따라서 분변에서 분비되는 바이러스의 양과 백혈구 감소 수치와의 상관관계를 정의하기에는 어려움이 있었다. 또한 본 연구에서는 파보바이러스에 감염된 개의 분변 0.01 g

**Table 1.** Results of parvovirus positive fecal samples by WBC number and real-time PCR titers

Sample No.	WBC (× 1,000/ul)	Real-time PCR titer (0.01g of feces)
1	10.98	1.44×10 <sup>6</sup>
2	0.82	2.08×10 <sup>7</sup>
3	2.62	3.35×10 <sup>6</sup>
4	14.46	9.32×10 <sup>7</sup>
5	20.06	1.72×10 <sup>7</sup>
6	7.54	3.21×10 <sup>8</sup>
7	10.36	3.93×10 <sup>8</sup>
8	4.36	1.20×10 <sup>8</sup>
9	14.52	9.24×10 <sup>8</sup>
10	8.08	5.27×10 <sup>8</sup>
11	12.52	8.95×10 <sup>8</sup>
12	12.64	6.11×10 <sup>8</sup>
13	12.12	5.69×10 <sup>8</sup>
14	6.38	7.49×10 <sup>8</sup>
15	2.86	8.78×10 <sup>8</sup>
16	5.2	5.98×10 <sup>8</sup>
17	6.12	2.76×10 <sup>8</sup>
18	9.2	8.71×10 <sup>8</sup>
19	7.8	9.45×10 <sup>8</sup>
20	1.92	6.53×10 <sup>8</sup>
21	1.44	1.16×10 <sup>8</sup>
22	0.96	4.71×10 <sup>7</sup>
23	3.66	4.75×10 <sup>6</sup>
24	12.3	8.07×10 <sup>6</sup>
25	5.1	5.26×10 <sup>8</sup>
26	6.38	1.58×10 <sup>8</sup>
27	7.3	3.56×10 <sup>8</sup>
28	16.18	8.03×10 <sup>8</sup>
29	19.9	6.09×10 <sup>8</sup>
30	5.06	9.22×10 <sup>8</sup>
31	1.16	9.02×10 <sup>8</sup>
32	2.7	4.25×10 <sup>6</sup>
33	9.82	5.29×10 <sup>8</sup>
34	14.3	8.52×10 <sup>8</sup>
35	1.26	1.81×10 <sup>8</sup>
36	2.9	2.26×10 <sup>8</sup>
37	1.66	8.37×10 <sup>8</sup>
38	4.02	4.04×10 <sup>8</sup>
39	6.6	5.07×10 <sup>8</sup>

에서 1.45×10<sup>6</sup>-9.45×10<sup>8</sup>개의 바이러스 particle이 존재하는 것으로 나타났으며 이는 다른 연구자들의 연구결과와 일치하였다<sup>6</sup>.



**Fig 3.** The numbers of parvovirus particles per 0.01 g of fecal sample were determined by real-time PCR and compared with the number of white blood cell (WBC×1,000/ul). Data are expressed as individual dog.

파보바이러스에 대한 real-time PCR의 사용은 감염된 개의 분변에서 바이러스가 배출되는 기간 및 그 양의 정도를 파악할 수 있다. 또한 백신을 한 후나 감염되었을 때 분비되는 바이러스 양을 측정할 수 있어 파보바이러스 감염증의 병원성연구에 새로운 지평을 열 수 있을 것으로 기대된다. 이러한 방법은 백신효능 검사에 필수적인 바이러스 배출기간 및 배출량을 정확하게 측정할 수 있어 백신 효능 검사에 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 국내에서 개의 파보바이러스에 대한 연구가 미미하게 진행되고 있어서 향후 이러한 방법을 이용하여 바이러스의 지속적인 감시가 필요하며, 개에서 분리한 CPV-2 분리주의 분자 역학적 측면에서도 심도 있는 연구가 필요한 실정이다.

### 결론

파보바이러스에 대한 real-time PCR을 확립하여 파보바이러스에 감염된 개의 분변에서 분비되는 바이러스의 양을 측정하였다. 이러한 방법은 매우 특이적이며 신속하고 정확하게 분변 속에서 파보바이러스를 검출할 수 있었는데, 파보바이러스에 감염된 개의 분변 속에는 다양한 농도(1.45×10<sup>6</sup>-9.45×10<sup>8</sup>/0.01 g)의 바이러스가 존재한다는 것을 확인하였다. 또한 일반 PCR보다 2 log만큼이나 적은수의 바이러스도 검출할 수 있었다. 파보바이러스에 감염되었을 때 나타나는 백혈구감소 수치와 분변에 분비되는 바이러스의 양과의 상관관계를 비교하였지만 그 상관관계를 증명할 수 없었다. 하지만 Real-time PCR법은 일반 PCR법보다 파보바이러스 감염 초기나 회복기에 소량의 바이러스가 분비될 때도 쉽게 검출할 수 있는 장점이 있다.

### 참고 문헌

1. Aberham C, Pendl C, Gross P, Zerlauth G, Gessner M. A

- quantitative, internally controlled real-time PCR assay for the detection of parvovirus B19 DNA. *J Virol Methods* 2001; 92: 183-191.
2. Appel MJG, Cooper BJ, Geisen H, Carmichael LE. Status report: Canine viral enteritis. *J Am Vet Assoc* 1978; 173: 1516.
  3. Appel MJG, Scott FW, Carmichael LE. Isolation and immunization studies of a canine parvo-like virus from dogs with haemorrhagic enteritis. *Vet Rec* 1979; 105: 156.
  4. Carmichael LE, Joubert JC, Pollock RVH. A modified live canine parvovirus vaccine. *Cornell Vet* 1983; 73: 13.
  5. Decaro N, Desario C, Campolo M, Cavalli A, Ricci D, Martella V, Tempesta M, Buonavoglia C. Evaluation of lactogenic immunity to canine parvovirus in pups. *New Microbiol* 2004; 27: 375-379.
  6. Decaro N, Elia G, Martella V, Desario C, Campolo M, Trani LD, Tarsitano E, Tempesta M, Buonavoglia C. A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 in the feces of dogs. *Vet Microbiol* 2005; 105(1): 19-28.
  7. Gruber F, Falkner FG, Dorner F, Hämmerle T. Quantitation of viral DNA by real-time PCR applying duplex amplification, internal standardization, and two-color fluorescence detection. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 2837-2839.
  8. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real-time quantitative PCR. *Genome Res* 1996; 6: 986-994.
  9. Hirasawa T, Kaneshige T, Mikazuki K. Sensitive detection of canine parvovirus DNA by the nested polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* 1994; 41: 135-145.
  10. Hirayama K, Kano R, Hosokawa-Kanai T, Tuchiya K, Tsuyama S, Nakamura Y, Sasaki Y, Hasegawa A. VP2 gene of a canine parvovirus isolate from stool of a puppy. *J Vet Med Sci* 2005; 67: 139-143.
  11. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 7276-7280.
  12. Kelly WR. An enteric disease of dogs resembling feline panleukopenia. *Aust Vet J* 1978; 54: 593.
  13. Klingeborn B, Moreno-Lopez J. Diagnostic experience from an epidemic of canine parvoviral enteritis. *Zbl Vet Med B* 1980; 27: 483.
  14. Mochizuki M, San Gabriel MV, Nakatani H, Yoshida M, Harasawa R. Comparison of polymerase chain reaction with virus isolation, haemagglutination assays for the detection of canine parvoviruses in faecal specimens. *Res Vet Sci* 1993; 55: 60-63.
  15. Parrish CR, Carmichael LE, Antczak DF. Antigenic relationships between canine parvovirus type 2, feline panleukopenia virus and mink enteritis virus using conventional and monoclonal antibodies. *Arch Virol* 1982; 72: 267.
  16. Parrish CA, Aquadro CF, Strassheim ML, Evermann JF, Sgro JY, Mohammad HO. Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. *J Virol* 1991; 65: 6545-6552.
  17. Truyen U, Platzer G, Parrish CR., Hänichen T, Hermanas W, Kaaden OR. Detection of canine DNA in paraffin-embedded tissues by polymerase chain reaction. *J Vet Med B* 1994; 41: 148-152.
  18. Uwatoko K, Sunairi M, Nakajima M, Yamaura K. Rapid method utilizing the polymerase chain reaction for detection of canine parvovirus in feces of diarrheic dog. *Vet Microbiol* 1995; 43: 315-323.