

## Importance of Primer Selection in Molecular Diagnosis of Canine Parvovirus

Mehmet Sezer<sup>1</sup>, Nüvit Coşkun<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 36100, Kars, Türkiye.

<sup>2</sup>Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, 36100, Kars, Türkiye.

### Abstract

Canine parvovirus (CPV), also known as bloody diarrhea in dogs, is associated with high mortality, particularly in unvaccinated animals. The causative agent is Canine Parvovirus-2, which has a single-stranded DNA genome. The most affected group is puppies (1 month and under) that have not yet been vaccinated or that have been exposed to other animals before sufficient immunity has developed after vaccination. Although there is no specific treatment, rapid diagnosis is important in order to differentiate it from other diseases it may be confused with and to guide the necessary precautions. Since clinical symptoms are not sufficient for diagnosis, diagnosis supported by rapid tests is the most commonly used approach. Alternatively, molecular methods such as polymerase chain reaction (PCR) provide a definitive diagnosis. However, the most important parameter for accurate diagnosis in PCR tests is the selection of the gene region targeted for amplification and the appropriate oligonucleotide primers. If the selected gene region is specifically chosen for diagnosis, it should generally be chosen from regions that are resistant to mutation. In this study, blood samples from 12 dogs suspected of having CPV were examined using 3 different primers. Blood samples were centrifuged at 2000 rpm to remove the leukocyte layer, and the collected middle layer was transferred to 1.5 ml sterile polystyrene tubes using a pipette. The phenol/chloroform method was used for viral DNA extraction. Optimizations were first performed with three different primer pairs targeting the capsid-encoding protein: HFor/HRev (target location 3556-3575/4185-4166), Pbs/Pbas (target location 4043-4062/4470-4449), and Pabs/Pabas (target location 3025-3045/3706-3685), and then the samples were tested with different PCR reactions for each primer pair. 7, 5, and 12 positive results were obtained from each primer pair, respectively. This situation reflects the mutations occurring in the CPV genotype variants (2a, 2b, and 2c) present in the field. Consequently, this shows us that even in viral diseases commonly diagnosed in the field, mutations occurring over time can cause difficulties in diagnosis. The results of our study emphasize the importance of always working with multiple primers.

**Keywords:** Canine Parvovirus, Dog, Molecular Diagnostic, Optimization, PCR

### Canine Parvovirus Moleküler Tanısında Primer Seçimi ve Önemi

#### Özet

Canine parvovirus (CPV) köpeklerin kanlı ishali olarak da bilinmektedir ve özellikle aşısız hayvanlarda yüksek mortalite ile seyretmektedir. Hastalığın etkeni tek zincirli DNA genomuna sahip olan Canine Parvovirus-2'dir. En fazla etkilendiği grup henüz aşılanmamış veya aşılandıktan sonra yeterince bağışıklık oluşmasını beklemeden diğer hayvanlarla temas ettirilen yavru (1 ay ve altı) köpeklerdir. Her ne kadar spesifik bir tedavisi olmasa da hızlı teşhis konulması, karıştığı diğer hastalıklardan ayrılarak alınacak önlemlere rehberlik etmesi bakımından önemlidir. Teşhis olarak klinik semptomlar yeterli olmadığı için çabuk testler ile desteklenerek tanı konulması en sık kullanılan yaklaşımdır. Bunun harici polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi moleküler yöntemler ile kesin teşhis koyulmaktadır. Fakat PCR testlerinde doğru teşhis için en önemli olan parametre çoğaltılması hedeflenen gen bölgesi ve buna yönelik oligonükleotid primerlerin seçimidir. Seçilen gen bölgesi özellikle teşhis için seçiliyorsa genel olarak mutasyona kapalı bölgelerden seçilmelidir. Bu çalışmada CPV şüpheli olan 12 köpeğe ait kan örneği 3 farklı primer kullanarak incelenmiştir. Kan örnekleri lökosit tabakası çıkarmak için 2000 devirde santrifüj edilmiş ve orta tabakada toplanan tabaka pipet yardımı ile 1,5 ml steril polistren tüplere aktarılmıştır. Viral DNA ekstraksiyonu için fenol/kloroform yöntemi kullanılmıştır. Kapsit kodlayan proteine yönelik üç farklı primer çifti HFor/HRev (hedef lokasyon 3556-3575/4185-4166), Pbs/Pbas (hedef lokasyon 4043-4062/4470-4449) ve Pabs/Pabas (hedef lokasyon 3025-3045/3706-3685) ile önce optimizasyonlar yapılmış ve sonrasında örnekler her primer çifti için farklı PCR reaksiyonları ile test edilmiştir. Her primer çiftinden PCR reaksiyonu sonucunda sırasıyla 7, 5 ve 12 adet pozitiflik elde edilmiştir. Bu durumun sahada var olan CPV genotip (2a, 2b ve 2c) varyantlarında meydana gelen mutasyonların bir yansıması olarak karşımıza çıkmaktadır. Sonuç olarak bu durum bize sahada yaygın olarak teşhis konulan viral hastalıklarda bile zaman içerisinde meydana gelen mutasyonların tanıda güçlükler neden olabildiğini göstermektedir. Çalışmamızın sonuçları her zaman birden fazla primer ile çalışmanın önemini vurgulamaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Canine Parvovirus, Köpek, Moleküler Tanı, Optimizasyon, PCR

