

Tingkat Deteksi Parvovirus Anjing di Organ Jantung dan Usus Halus pada Infeksi Lapangan

(DETECTION LEVEL OF CANINE PARVOVIRUS IN MYOCARDIUM AND SMALL INTESTINE ON THE FIELD INFECTION)

Putu Bulan Sasmita Dewi¹, I Gusti Ngurah Kade Mahardika², I Gusti Ayu Agung Suartini²

1. Mahasiswa Pendidikan Profesi Dokter Hewan
 2. Laboratorium Virologi
- Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana.
Jl. PB. Sudirman Denpasar, Bali; Tlp. (0361) 223791, 701801.
Email : bulansasmita@gmail.com

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat deteksi parvovirus anjing pada infeksi lapangan dari organ jantung dan usus halus yang dinilai berdasarkan pita hasil *polymerase chain reaction* (PCR). Obyek penelitian yang digunakan adalah spesimen jantung dan usus halus dari lima ekor anjing yang terinfeksi parvovirus alami. Isolasi DNA dilakukan dengan *DNA isolation kit* (Invitrogen) dan diamplifikasi menggunakan teknik PCR. Hasil PCR kemudian diskoring dan dianalisis menggunakan uji t tidak berpasangan. Hasil PCR menunjukkan frekuensi infeksi pada usus halus (4/5) lebih tinggi dibandingkan jantung (3/5), akan tetapi, rerata skor pita PCR dari organ usus dan jantung masing-masing adalah ($3,2 \pm 0,97$) dan ($1,4 \pm 0,75$) yang secara statistik tidak berbeda nyata ($p > 0,05$).

Kata Kunci : tingkat deteksi, parvovirus anjing, jantung, usus halus, infeksi lapangan

ABSTRACT

The study aimed to determine the detection level of canine parvovirus (CPV) in myocardium and intestine of field cases that were scored based on the results of polymerase chain reaction (PCR). The samples of this research were myocardium and small intestine specimens of five field CPV infections. Isolation of DNA was carried out using DNA isolation kit (Invitrogen) and amplified using PCR techniques. The PCR result was scored and analyzed using unpaired t test. The result shows that the detection rate from small intestine (4/5) was higher than myocardium (3/5), however, the average PCR band score of small intestine (3.2 ± 0.97) was statistically not different ($p > 0.05$) than that in myocardium (1.4 ± 0.75).

Keywords : detection level, canine parvovirus, myocardium, small intestine, field infection

PENDAHULUAN

Parvovirus anjing (*canine parvovirus/CPV*) tipe 2 atau yang lebih dikenal dengan CPV-2 merupakan virus yang sangat mengancam hewan kesayangan anjing. Sejumlah survei epidemiologi melaporkan, kasus CPV-2 mayoritas menyerang anak anjing yang berumur kurang dari 6 bulan, tetapi dapat juga menyerang anjing yang lebih tua (Ettinger dan Feldman, 1995). Hasil penelitian Battilani *et al.* (2006) melaporkan bahwa CPV-2 juga bisa menginfeksi kucing domestik. Hal ini menambah kewaspadaan terhadap dampak infeksi CPV pada hewan kesayangan.

Penelitian yang dilakukan di Kota Denpasar, hasilnya rata-rata prevalensi kejadian parvovirus pada anjing dari tahun 2004 sampai 2007 adalah sebesar 3,26% dan ras *Rottweiler*, *Pomerian*, *Minipincher*, dan *Chihuahua* adalah yang paling rentan terhadap infeksi virus ini (Suartha *et al.*, 2011). Angka prevalensi CPV-2 pada anak anjing yang tidak mendapatkan vaksinasi di dunia mencapai 84,05% di India Selatan (Srinivas *et al.*, 2013), 89,5% di Australia (Ling *et al.*, 2012) dan secara umum dapat mencapai angka kematian di atas 80% (Decaro dan Buonavoglia, 2012).

Target utama CPV-2 adalah sel-sel sel-sel yang sedang berkembang, terutama jantung dan kriptus usus halus (Parrish, 1995). Pengetahuan tentang tropisme ini penting untuk mengetahui biologi CPV-2 dan menentukan jaringan target terbaik untuk deteksi dan isolasi virus. Berbagai strain CPV-2 mempunyai preferensi yang berbeda. Ada tiga strain CPV-2 yang berbeda penyebarannya di berbagai negara yaitu CPV-2a, CPV-2b, dan CPV-2c. Hasil penelitian yang dilakukan Zhao *et al.* (2013) menunjukkan bahwa di daerah Nanjing, Cina strain CPV-2a yang dominan. Hasil penelitian Nandi *et al.* (2010) mengindikasikan bahwa strain CPV-2b yang dominan di India. Sedangkan di Taiwan, kedua strain menunjukkan tingkat infeksi yang hampir sama jumlahnya (Lin *et al.*, 2014). Penelitian yang dilakukan (Decaro *et al.*, 2009) menunjukkan CPV-2c lebih dominan menginfeksi anjing di Eropa dan Amerika.

Berdasarkan beberapa penelitian tersebut dapat disimpulkan bahwa strain parvovirus tersebar berdasarkan letak geografis. Strain baru virulen diberi nama CPV-s5 ditemukan di Shenzhen, Cina pada tahun 2010 (Zhu *et al.*, 2014) semakin menambah daftar variasi CPV-2. Galur-galur virus itu mungkin saja memiliki sifat biologi yang berbeda, termasuk tropisme pada jaringan.

Data tersebut di atas menunjukkan perlunya pengetahuan tentang biologi parvovirus yang berada di Indonesia umumnya dan Bali khususnya. Salah satu sifat biologi CPV adalah preferensi jaringan target. Virus CPV memilih kriptus usus dan organ limfoid untuk tempat

bereplikasi, namun juga dapat menyebar ke semua jaringan (Pollock, 1982). Perubahan patologi anatomis yang signifikan ditemukan pada usus halus dengan lesi berupa edema dan hemoragi enteritis (Decaro dan Buonavoglia, 2012). Kongesti dan nekrosis juga ditemukan pada epikardium jantung.

METODE PENELITIAN

Obyek penelitian yang digunakan adalah spesimen jantung dan usus halus dari lima ekor anjing dari kasus lapangan koleksi Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana dan sudah dikonfirmasi positif dengan uji PCR. Spesimen jantung dan usus halus ini kemudian disimpan pada suhu -20°C di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana.

Bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah kontrol positif berupa DNA parvo virus yang sebelumnya sudah dikonfirmasi, (Buonavoglia *et al.*, 2001) kontrol negatif berupa *aquabidest* steril, L6 (lisis *buffer*), es, proteinase K, RNase, L3 (*binding buffer*), SDS 10%, etanol 100%, *wash buffer* (W4), *wash buffer* (W5), *elution buffer* (El) di suhu -20°C , pada 4°C untuk menggunakan langsung atau *aliquot*.

Bahan yang digunakan untuk PCR antara lain Rmix (invitrogen) (mengandung 0,2 mM dNTP, 1,6 mM MgSO_4 , dan *buffer*), sepasang primer dengan volume masing-masing primer 0,6 μl (10 mM), 0,25 μl enzim *SuperscriptTM III One-Step PCR System with Platinum[®] Taq Polimerase* (invitrogen), 1 μl DNA cetakan, dan *aquabidest*. Primer yang digunakan adalah primer *HAFOR* (Lin *et al.*, 2014) dan *VPR* (Buonavoglia *et al.*, 2001). Sekuensnya adalah 5'-CAGGTGATGAATTTGCTACA-3' dan 5'-TTCTAGGTGCTAGTTGAG-3' dengan panjang produk 956 bp.

Isolasi DNA sesuai dengan panduan manual Invitrogen. Jaringan dihomogenkan dengan mikropastel dalam tabung sentrifuse. Sebanyak 90 μl L6 (lisis *buffer*) ditambahkan dan homogenkan kembali dengan mikropastel. Setelah itu, 10 μl proteinase K ditambahkan dan diinkubasikan pada suhu 55°C selama tiga jam dengan sekali divorteks. Selanjutnya 10 μl RNase ditambahkan pada campuran tadi dan diinkubasikan dua menit pada temperatur ruangan.

Campuran disentrifugasi pada kecepatan 15000 rpm selama lima menit. Supernatan diambil dan dimasukkan ke tabung sentrifuse. Sebanyak 5 μl SDS 10% ditambahkan dan divorteks selama lima detik sebelum penambahan 100 μl L3 (*binding buffer*), serta dicampur dengan vorteks selama lima detik dan diinkubasi pada suhu 70°C selama 10 menit. Sebanyak 100 μl etanol murni ditambahkan kedalamnya dan divorteks selama lima detik. Campuran

dipindahkan ke dalam *pure link spin cartridge* dan disentrifugasi pada kecepatan maksimal selama 30 detik. Setelah itu ganti tube kembali.

Proses pencucian DNA dimulai dengan menambahkan 500 µl wash buffer (W4) pada *lysate*. *Cartridge* disentrifugasi pada temperatur ruangan dengan kecepatan 12.000 rcf selama 30 detik dan diletakkan dalam *wash tube* baru. Langkah tersebut diulangi satu kali. Kemudian, 500 µl *wash buffer* (W5) ditambahkan ke *cartridge* dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rcf selama 30 detik pada temperatur ruangan. Langkah tersebut diulang sekali lagi sebelum *cartridge* disentrifugasi lagi pada kecepatan maksimum selama dua menit pada temperatur ruangan untuk menyingkirkan residu *wash buffer* (W5).

Proses *Eluting* DNA dimulai dengan menambahkan 200 µl *elution buffer* (E1) ke dalam *cartridge* lalu diinkubasikan pada temperatur ruangan selama satu menit. Tabung kemudian disentrifugasi dengan kecepatan maksimum selama satu setengah menit pada temperatur ruangan. Dengan melakukan cara ini, tabung telah mengandung DNA murni. Untuk mendapatkan DNA lebih banyak, tahapan itu diulangi menginkubasikan tabung menggunakan tabung mikrosentrifuse steril 1,5 ml pada temperatur ruangan yang kemudian disentrifugasi dengan kecepatan maksimum. Setelah itu, *cartridge* bisa dibuang. Penyimpanan DNA murni dalam waktu yang lama dilakukan dalam *elution buffer* (E1) di suhu -20°C. Penyimpanan DNA murni dilakukan pada suhu 4°C untuk penggunaan langsung atau *aliquot* dengan cara menghindari pengulangan *freezing* dan *thawing* dari DNA.

Uji PCR dilakukan dengan mencampurkan 5 µl Rmix (invitrogen) yang mengandung 0,2 mM dNTP, 1,6 mM MgSO₄, dan *buffer*; sepasang primer dengan volume masing-masing primer 0,6 µl (10 mM); 0,25 µl enzim *SuperscriptTM III One-Step PCR System with Platinum[®] Taq Polimerase* (invitrogen); 1 µl DNA cetakan; dan *aquabidest* sampai volume menjadi 10 µl ke dalam tabung PCR. Campuran tadi kemudian dimasukkan ke dalam mesin *Termocycler* yang telah diprogram dengan kondisi (1) 95°C selama tujuh menit, (2) 94°C selama 45 detik, (3) 52°C selama 45 detik, (4) 72°C selama satu menit, siklus kemudian diulang dari tahapan kedua sampai tahapan keempat sebanyak 39 kali, (5) 72°C selama lima menit, dan (6) 22°C selama tak terhingga.

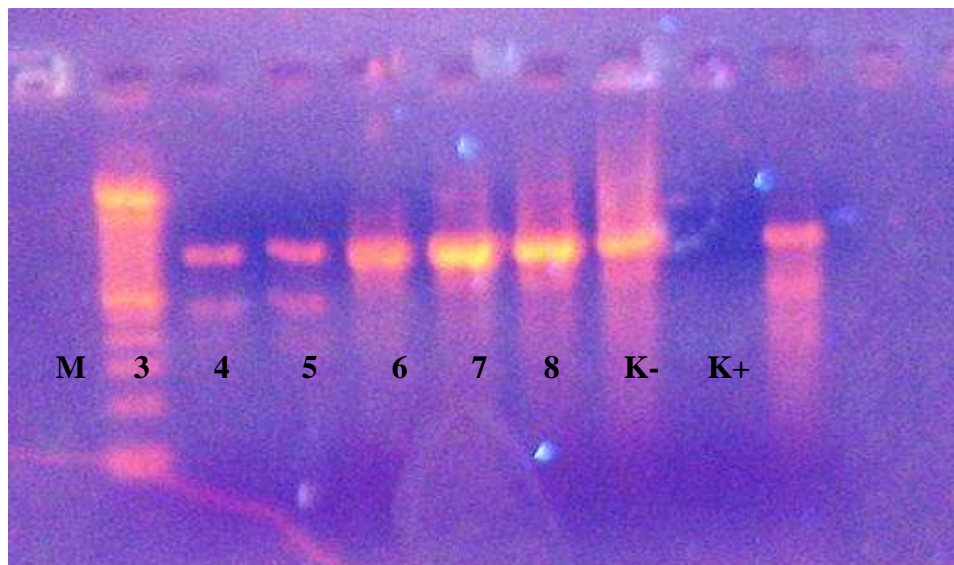
Hasil uji PCR diketahui dengan melakukan elektroforesis. Media elektroforesis berupa *gel agarose* 1% yaitu satu gram *agarose* dalam 100 ml *Tris Acetate EDTA buffer* (TAE IX). Larutan dipanaskan hingga berwarna kuning dan ditambahkan tiga mikroliter *etidium bromide*. Campuran ini kemudian dicetak pada cetakan agar. Setelah mengeras, *gel agarose* diletakkan pada mesin elektroforesis yang telah mengandung TAE IX.

Produk PCR sebanyak 4 µl ditambahkan dengan 1 µl 10X *BluejuiceTM Gel Loading Buffer* (invitrogen). Pembacaan hasil uji PCR dilakukan dengan cara memasukan 100 bp DNA *ladder* (invitrogen) pada lubang pertama dan lubang selanjutnya dimasukan DNA hasil amplifikasi. Mesin elektroforesis diberi tegangan 100 *volt* selama 30 menit. Visualisasi DNA dilakukan dengan meletakan *gel agarose* di atas *UV Transluminator*. Hasil yang positif ditandai dengan adanya pita pada gel yang sejajar dengan pita kontrol positif. Panjang DNA yang teramplifikasi dapat diketahui dengan membandingkan antara pita yang timbul dengan marker berupa 100 bp DNA *ladder* (Mahardika *et al.*, 2015).

Analisis data hasil pita PCR dari organ jantung dan usus halus diberi nilai dari 0 sampai 8 berdasarkan pada hasil PCR dari virus parvo yang sudah dikonfirmasi positif dan setelahnya diencerkan hingga 10⁵ kali. Kontrol negatif berfungsi sebagai batasan untuk menentukan titer virus yang tipis ataupun tebal. Semakin tebalnya pita PCR menandakan semakin tingginya titer virus yang ada di organ tersebut, dan sebaliknya. Hasil penelitian dianalisis dengan uji t tidak berpasangan. Uji ini dipilih karena dalam penelitian ini membandingkan hasil skor pita PCR antara jantung dan usus halus yang tidak berhubungan (Sampurna dan Nindhia, 2011).

HASIL DAN PEMBAHASAN

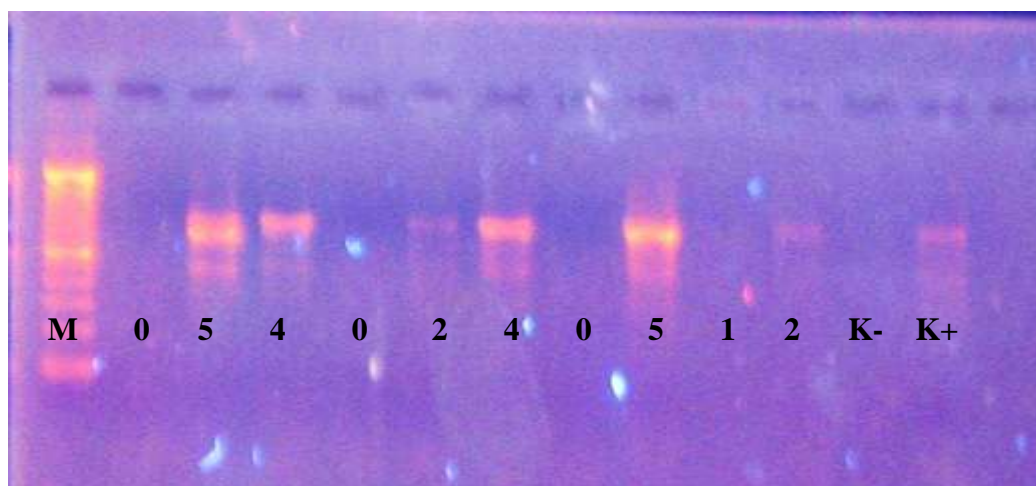
Penentuan standar pita dilakukan sebelum menentukan tebal pita PCR. Standar ini dibuat dari DNA parvo yang sudah dikonfirmasi positif. *Deoxyribonucleic acid* (DNA) parvovirus ini akan diencerkan sampai pengenceran 10⁵ hingga mendapatkan titer terendah. Berikut adalah standar ketebalan pita hasil PCR.



Gambar 4.1. Standar penentuan tebalnya pita

Keterangan gambar : M : Marker
3-8 : standar yang digunakan menentukan skor pita pcr
K- : kontrol negatif
K+ : kontrol positif

Standar delapan merupakan DNA parvovirus tanpa pengenceran. Standar tujuh sampai tiga masing masing merupakan pengenceran 10^1 sampai 10^5 . Penempatan sampel pada *gel agarose* berurutan jantung dan usus halus pada anjing satu sampai lima. Kontrol negatif adalah *aquabidest* sedangkan kontrol positif berupa DNA parvo yang sebelumnya sudah dikonfirmasi positif. Berikut adalah hasil PCR yang telah dielektroforesis.



Gambar 4.2. Hasil elektroforesis dan skoring pita PCR

Keterangan gambar : M : marker
K- : kontrol negatif
K+ : kontrol positif

Hasil elektroforesis pita PCR tersebut dijabarkan dalam tabel 4.1.

Tabel 4.1. Hasil skoring pita PCR

Sampel	Jantung	Usus Halus
Sampel 1	0	5
Sampel 2	4	0
Sampel 3	2	4
Sampel 4	0	5
Sampel 5	1	2
Rata-Rata	1,4	3,2
Standar error	0,75	0,97
p	>0,05	

Hasil pembacaan skor pita menunjukkan bahwa dalam lima sampel jantung dan usus, terdapat tiga sampel jantung dan empat sampel usus halus yang positif. Rata-rata skor pita PCR adalah 1,4 untuk jantung dan 3,2 untuk usus halus. Berdasarkan frekuensinya, maka perbandingan jumlah pita positif adalah 3:5 atau 60% untuk jantung dan 4:5 atau 80% untuk usus halus.

Data anamnesa lima ekor anjing yang dijadikan sampel sangat membantu dalam penelitian ini. Berikut adalah anamnesa pasien dalam tabel 4.2.

Tabel 4.2. Data anamnesa lima ekor anjing sampel

Sampel	Umur	Gejala Klinis
Sampel 1	4 bulan	Lemas, muntah, dan diare berdarah selama tiga hari
Sampel 2	2 bulan	Muntah, lemas, diare tidak berdarah dan mati mendadak
Sampel 3	4 bulan	Lemas, muntah, tidak nafsu makan, dan diare berdarah
Sampel 4	6 bulan	Lemas dan diare berdarah tanpa diketahui berapa lama
Sampel 5	3 bulan	Lemas, muntah berbuih, dan diare berdarah

Berdasarkan hasil analisis data menggunakan uji t tidak berpasangan dengan program *Statistical Product and Service Solutions* versi 17.0 atau SPSS 17.0, didapatkan hasil $p > 0,05$.

Parvovirus anjing atau CPV merupakan penyakit dengan target utama sel-sel yang sedang aktif membelah, terutama jantung dan kriptus usus halus (Parrish, 1995). Virus masuk melalui jalur oronasal, selanjutnya bereplikasi pada sel-sel yang aktif membelah. Infeksi CPV di jantung umumnya terjadi pada anjing berumur dibawah dua bulan namun bentuk ini tidak lagi dianggap masalah karena pada kebanyakan anak anjing akan dilindungi oleh maternal antibodi (Decaro and Buonavoglia, 2012). Bentuk CPV yang menyerang usus halus terjadi

pada anak anjing yang berusia diatas dua bulan. Anak anjing pada umur tersebut sudah tidak lagi mendapatkan antibodi induknya melalui air susu (Decaro *et al.*, 2005).

Sampel nomor satu dan sampel nomor empat hasil skor pitanya adalah sama yaitu skor nol pada jantung dan skor lima pada usus halusnya. Hasil skoring didukung oleh data anamnesa anjing. Anjing nomor satu berumur empat bulan dengan gejala klinis lemas, muntah, dan diare berdarah selama tiga hari. Anjing nomor empat berumur enam bulan dengan gejala klinis lemas dan diare berdarah tanpa diketahui berapa lama. Kedua anjing ini memperlihatkan gejala klinis diare berdarah yang hebat sehingga menunjukkan bahwa terdapat infeksi hebat yang ada di usus halusnya.

Sampel nomor dua pada penelitian ini menunjukkan skor empat pada jantung dan nol pada usus. Hal ini menunjukkan rendahnya titer virus pada usus halus. Hasil skoring didukung oleh data anamnesa yaitu anjing berumur dua bulan dengan gejala klinis muntah, lemas, diare tidak berdarah dan mati mendadak. Badan inklusi intranukleus serta degenerasi sel-sel jantung muncul pada anjing infeksi parvovirus percobaan berumur empat minggu dan nekrosis sel-sel jantung serta miokarditis ditemukan pada umur delapan minggu. Kerusakan jantung akan semakin parah seiring bertambahnya umur (Meunier *et al.*, 1985).

Sampel nomor tiga menunjukkan skor dua pada jantung dan skor empat pada usus halus. Sampel nomor lima menunjukkan skor satu pada jantung dan skor dua pada usus. Pada kedua sampel ini dapat dilihat bahwa infeksi pada usus halus lebih tinggi titernya dibanding pada jantung apabila terjadi infeksi bersama. Titer CPV pada usus halus rata-rata lebih tinggi dibandingkan dengan titer pada jantung yaitu 3,2 untuk usus halus dan 1,4 untuk jantung. Hasil penelitian ini sesuai dengan teori bahwan titer parvovirus pada usus halus secara umum lebih tinggi dibandingkan jantung (Decaro *et al.*, 2007). Frekuensi positif menunjukkan perbandingan jumlah pita positif adalah 3:5 untuk jantung dan 4:5 untuk usus halus. Frekuensi ini menunjukkan bahwa parvovirus lebih mudah dideteksi pada usus halus dibanding dengan jantung.

Skor paling tinggi di jantung adalah empat sedangkan skor lima pada usus halus. Hal ini menandakan titer yang lebih rendah pada jantung dapat menyebabkan infeksi yang lebih berat daripada infeksi pada usus. Tentu saja parahnya infeksi ini dilihat dari fungsi organnya. Jantung memiliki fungsi yang vital sehingga sedikit saja terdapat virus pada jantung akan menyebabkan infeksi fatal (Gagnon *et al.*, 1980).

Penelitian ini juga menunjukkan bahwa teknik yang dipakai sangat sensitif. Pita PCR masih tampak jelas pada pengenceran 1:100.000. Secara teoritis, PCR hanya memerlukan satu molekul DNA target dalam spesimen. Sekalipun demikian, PCR umunya dapat

mendeteksi 1000 molekul DNA yang dimasukkan dalam reaksi (Mahardika *et al.*, 2015). Deteksi virus menggunakan uji PCR adalah 100% sensitif dan spesifik dengan ambang minimum deteksi 10^4 pada kultur jaringan dengan dosis infeksi 50% (Agungpriyono *et al.*, 1999).

Hasil uji t tidak berpasangan menunjukkan angka 0,180. Angka ini berarti lebih besar dari 0,05. Dengan demikian, pengujian statistik skor pita PCR dari jantung dan usus halus menunjukkan tidak ada perbedaan ($p > 0,05$).

Hasil deteksi dari usus dan jantung yang bervariasi menyebabkan deteksi virus untuk diagnosis hendaknya dilakukan pada kedua organ predelesi itu. Selain jantung dan usus, deteksi parvovirus juga dapat dilakukan dengan menggunakan sampel dari jaringan tonsil, limpa, sumsum tulang belakang, timus, kelenjar limfoid, dan feses (Decaro *et al.*, 2007).

SIMPULAN

Rata-rata skor pita PCR dari organ usus halus dan jantung masing-masing adalah ($3,2 \pm 0,97$) dan ($1,4 \pm 0,75$) dan secara statistik tidak berbeda nyata ($p > 0,05$).

SARAN

Pengambilan sampel jaringan yang digunakan dalam mendiagnosis parvovirus, tidak hanya pada jaringan usus halus saja, namun diambil juga pada jaringan jantung.

UCAPAN TERIMAKASIH

Pada kesempatan ini, penulis mengucapkan terimakasih kepada drh. Ni Made Ritha Krisna Dewi, M.Si dan drh. Ni Putu Sutrisna Dewi, S.Kh, yang telah membantu penulis selama menyusun proposal penelitian, selama penelitian hingga penulis mendapatkan hasil yang diinginkan untuk dapat menyelesaikan jurnal ini serta pihak yang telah banyak membantu dalam penyelesaian jurnal ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Agungpriyono DR, Uchida K, Tabaru H, Yamaguchi R, Tateyama S. 1999. Subacute massive necrotizing myocarditis by canine parvovirus type 2 infection with diffuse leukoencephalomalacia in a puppy. *Veterinary Pathology*. 36, 77-80.
- Battilani M, Scagliarini A, Ciulli S, Morganti L, Prospero S. 2006. High genetic diversity of the VP2 gene of a canine parvovirus strain detected in a domestic cat. *Virology*. 352, 22-26.
- Buonavoglia C, Martella V, Pratelli A, Tempesta M, Cavalli A, Buonavoglia D, Bozzo G, Elia G, Decaro N, Carmichael L. 2001. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. *The Journal of General Virology*. 82, 3021-3025.

- Decaro N, Buonavoglia C. 2012. Canine parvovirus--a review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. *Veterinary Microbiology*. 155, 1-12.
- Decaro N, Campolo M, Desario C, Elia G, Martella V, Lorusso E, Buonavoglia C. 2005. Maternally-derived antibodies in pups and protection from canine parvovirus infection. *Biologicals : Journal of the International Association of Biological Standardization*. 33, 261-267.
- Decaro N, Desario C, Parisi A, Martella V, Lorusso A, Miccolupo A, Mari V, Colaianni ML, Cavalli A, Di Trani L, Buonavoglia C. 2009. Genetic analysis of canine parvovirus type 2c. *Virology*. 385, 5-10.
- Decaro N, Martella V, Elia G, Desario C, Campolo M, Lorusso E, Colaianni ML, Lorusso A, Buonavoglia C. 2007. Tissue distribution of the antigenic variants of canine parvovirus type 2 in dogs. *Veterinary Microbiology*. 121, 39-44.
- Ettinger SJ, Feldman EC. 1995. *Textbook of Veterinary Medicine, Vol 2*. Elsevier Saunders, California.
- Gagnon AN, Crowe SP, Allen DG, Downey RS. 1980. Myocarditis in Puppies: Clinical, Pathological and Virological Findings. *Can Vet J*. 21, 195-197.
- Lin CN, Chien CH, Chiou MT, Chueh LL, Hung MY, Hsu HS. 2014. Genetic characterization of type 2a canine parvoviruses from Taiwan reveals the emergence of an Ile324 mutation in VP2. *Virology Journal*. 11, 39.
- Ling M, Norris JM, Kelman M, Ward MP. 2012. Risk factor for death from canine parvoviral-related disease in Australia. *Veterinary Microbiology*. 158, 280-290.
- Mahardika IGNK, Astawa INM, Kencana GAY, Suardana IBK, Sari TK. 2015. *Teknik Lab Virus*. Udayana University Press, Denpasar, Bali.
- Meunier PC, Cooper BJ, Appel MJ, Slauson DO. 1985. Pathogenesis of canine parvovirus enteritis: the importance of viremia. *Veterinary Pathology*. 22, 60-71.
- Nandi S, Chidri S, Kumar M, Chauhan RS. 2010. Occurrence of canine parvovirus type 2c in the dogs with haemorrhagic enteritis in India. *Research in Veterinary Science*. 88, 169-171.
- Parrish CR. 1995. Pathogenesis of feline panleukopenia virus and canine parvovirus. *Bailliere's Clinical Haematology*. 8, 57-71.
- Pollock RV. 1982. Experimental canine parvovirus infection in dogs. *The Cornell Veterinarian*. 72, 103-119.
- Sampurna IP, Nindhia TS. 2011. *SPSS Untuk Biostatistika*. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana, Denpasar.
- Srinivas VMV, Mukhopadhyay HK, Thanislass J, Antony PX, Pillai RM. 2013. Molecular epidemiology of canine parvovirus in southern India. *Veterinary World*. 6, 744-749.
- Suartha IN, Mustikawati D, Erawan IGMK, Widyastuti SK. 2011. Prevalensi dan Faktor Risiko Penyakit Virus Parvo pada Anjing di Denpasar. *Jurnal Veteriner*. 12, 235-240.
- Zhao Y, Lin Y, Zeng X, Lu C, Hou J. 2013. Genotyping and pathobiologic characterization of canine parvovirus circulating in Nanjing, China. *Virology Journal*. 10, 272.
- Zhu Y, Huang Y, Wang Y, Chen K, Niu X, Luo Y, Guo X. 2014. *Genome Sequence of a Canine Parvovirus Strain, CPV-s5, Prevalent in Southern China*. Genome announcements 2.