

Przydatność wybranych metod ekstrakcji RNA do wykrywania wirusa TGE w hodowli komórkowej i kale świń metodą RT-PCR

ZBIGNIEW GRĄDZKI

Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin

Grądzki Z.

Effectiveness of selected RNA extraction methods for the detection of TGEV in cell culture and swine faeces using the RT-PCR method

Summary

Seven nucleic acid extraction methods were compared to detect TGEV through the use of RT-PCR technology. The most useful methods were the classical technique of Chomczynski, its modification with the use of TRIzol re-agent and the absorption of nucleic acids on a solid support. The effectiveness of the above procedures was identical in RNA extraction from cell cultures of 3 reference TGEV strains, one Polish field isolate and 20 swine faecal samples with the addition of 10^4 - 10^5 TCID₅₀ of the FS 772/70 TGEV reference strain. In all cases the isolated RNA was transcribed and amplified in the RT-PCR reaction using primers complementary to the conservative regions located in different genes. It is clear that the use of these RNA extraction methods enabled the isolation of RNA in its non-degraded form as well as the elimination of RNases and inhibitors of the RT-PCR reaction present in swine faeces.

Keywords: RNA extraction, faecal samples, RT-PCR

Wirus TGE (TGEV – Transmissible Gastroenteritis Virus) z rodziny *Coronaviridae*, rzędu *Nidovirales* jest przyczyną na ogół groźnych w skutkach zakażeń przewodu pokarmowego świń (18). Obecnie w Polsce ostra postać kliniczna TGE występuje sporadycznie (5). Niekiedy może pojawiać się jednak forma łagodna (enzootyczna), w której objawy kliniczne są słabo nasilone. Przyżyciowe rozpoznawanie takiej postaci choroby wymaga zastosowania metod umożliwiających wykrywanie niewielkich ilości wirusa w kale zwierząt chorych lub bezobjawowych nosicieli.

Współczesna diagnostyka laboratoryjna chorób zakaźnych, zwłaszcza wywoływanych przez wirusy, posługuje się coraz częściej technikami biologii molekularnej, takimi jak łańcuchowa reakcja polimerazowa (PCR), dzięki którym można wykrywać śladowe ilości drobnoustrojów w materiale klinicznym (6). Pozwala to na identyfikację nie tylko zwierząt chorych, lecz także bezobjawowych nosicieli i siewców oraz innych wektorów szerzenia się chorób. Krytycznym elementem decydującym o przydatności PCR do wykrywania drobnoustrojów w materiale klinicznym, np. w kale, jest odpowiednie przygotowanie matrycowego DNA lub RNA. Ekstrahowana próbka kwasu nukleinowego musi być wolna od zanieczyszczeń substancjami blokującymi lub hamującymi reakcję enzymatyczną. Istotne jest zatem, aby procedu-

ra ekstrakcji skutecznie eliminowała obecność substancji inhibicyjnych w badanej próbce. Metoda PCR nie była dotychczas szerzej wykorzystywana do laboratoryjnej diagnostyki przyżyciowej zakażeń TGEV u świń (6). Wydaje się, że jedną z przyczyn mogą być trudności w optymalizacji warunków reakcji, a zwłaszcza w ekstrakcji jednoniciowego RNA z kału świń.

Celem badań było porównanie skuteczności kilku wybranych metod ekstrakcji kwasów nukleinowych z hodowli komórkowej i kału świń do wykrywania wirusa TGEV metodą RT-PCR.

Materiał i metody

Materiał do ekstrakcji jednoniciowego RNA koronawirusów stanowiło 20 próbek kału, pochodzących od świń klinicznie zdrowych i hodowle komórkowe 3 referencyjnych szczepów TGEV (FS 772/70 – IAH Compton, Anglia; Miller PP-3 i Purdue-115 – NADC, Ames, IA, USA) oraz jednego izolatu krajowego (C-71 – PIWet, Puławy). Mianowanie wirusów wykonano poprzez określenie efektywnej dawki infekcyjnej (TCID₅₀) według metody Reeda-Muencha. Szczegóły procedury zawarte są w podręczniku Larskiego (12). Ekstrakcję RNA wykonywano z supernatantów 20% zawiesin kału w PBS, do których uprzednio dodano 10^4 - 10^5 TCID₅₀ referencyjnego szczepu wirusa

TGEV (FS 772/70) oraz z płynów hodowlanych zawierających taką samą koncentrację cząsteczek wirusowych.

W badaniach zastosowano następujące metody ekstrakcji RNA:

- klasyczna metoda z wykorzystaniem izotiocjanianu guanidyny, fenolu i chloroformu oraz precypitacji etanolowej, według Chomczyńskiego i Sacchi (2),

- metoda z zastosowaniem trawienia próbki proteinazą K oraz ekstrakcji fenolowo-chloroformowej i precypitacji etanolowej (19),

- metoda trawienia proteinazą K w obecności 0,5% SDS (19),

- metoda ekstrakcji 0,5% SDS po uprzednim traktowaniu próbki RNA-azinem (17),

- metoda z zastosowaniem detergentu kationowego CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide, Sigma Chemical Co, USA) (11),

- metoda z użyciem sproszkowanego szkła. Procedura ta została opisana przez Yamada i wsp. (25). Niektóre jej etapy zostały zmodyfikowane. Szczegółowy tok postępowania podano w pracy Winiarczyka i wsp. (24),

- metoda z użyciem odczynnika TRIzol. Jest to skrócona procedura Chomczyńskiego, zapewniająca szybką ekstrakcję RNA, wolnego od zanieczyszczeń DNA i białkowych. Do 0,25 ml próbki dodawano 0,75 ml TRIzol LS Reagent (Life Technologies) i mieszaninę homogenizowano, przepuszczając kilkakrotnie przez końcówkę pipety. Zhomogenizowaną próbkę inkubowano przez 5 min. w temp. pokojowej (18-22°C). Po inkubacji do mieszaniny dodawano 0,2 ml chloroformu i wytrząsano przez 15 sek., a następnie inkubowano od 2-15 min. w temp. pokojowej. Po inkubacji próbki wirowano w temp. 4°C przez 15 min. przy 12 000 g. Fazę wodną zawierającą RNA przenoszono do nowej probówki, mieszano z 0,5 ml alkoholu izopropylowego, inkubowano przez 10 min. w temp. pok. i wirowano w warunkach podanych poprzednio. Supernatant odrzucono, a osad RNA płukano jednokrotnie 75% etanolem, używając minimum 1,0 ml alkoholu na jedną próbkę. Następnie próbki wirowano w temp. 4°C przez 5 min. przy 7500 g. Po wirowaniu odciągano supernatant, a osad suszono przez 5 min. na powietrzu lub w komorze próżniowej. Wysuszony osad rozpuszczano w wodzie wolnej od RN-az (15-20 µl) i inkubowano 10 min. w łaźni wodnej o temp. 55-60°C.

Próbki RNA przechowywano w stanie zamrożenia w temp. -70°C.

Oligonukleotydy – startery reakcji RT-PCR. Ekstrahowany RNA amplifikowano w reakcji RT-PCR z użyciem starterów komplementarnych do genu nukleoproteiny (Oligo 97, 93) oraz genu glikoproteiny S i polimerazy (Oligo 21, 32). Startery wewnętrzne (nested primers – Oligo 99, 20) wykorzystano w reakcji nested PCR w celu potwierdzenia specyficzności uzyskiwanych produktów. Dane dotyczące pozycji i sekwencji użytych starterów, ich lokalizacji w obrębie genomu oraz przewidywanej długości produktów amplifikacji podano w odrębnej publikacji (7).

Wykonanie reakcji RT-PCR i analiza produktów amplifikacji. Reakcję wykonywano na matrycy RNA

ekstrahowanego z zakażonych hodowli komórkowych i z próbek kału świń z dodatkiem wirusa. Produkty amplifikacji analizowano elektroforetycznie w 1,5% żelu agarozowym (Sigma), barwionym bromkiem etydyny, w obecności wzorca masowego (100 bp DNA Ladder, Gibco BRL). Szczegóły procedur podano w poprzedniej publikacji (7).

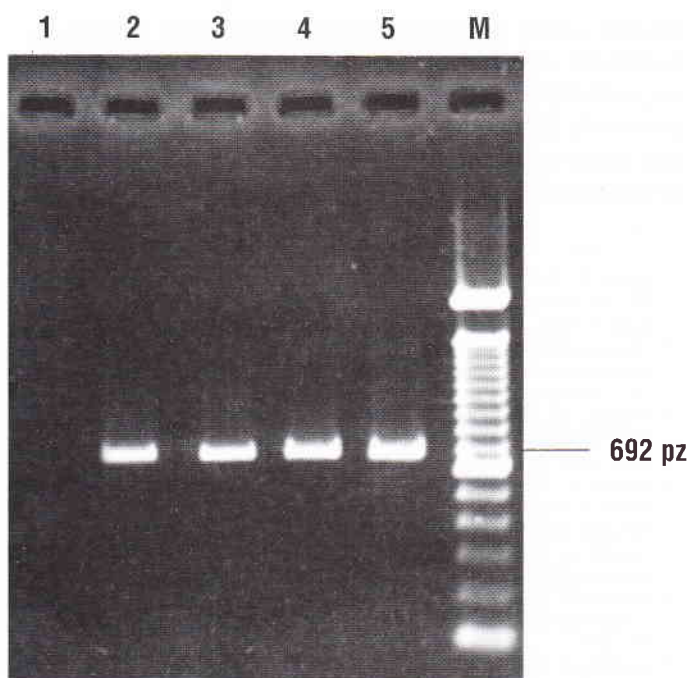
Wyniki i omówienie

Uzyskane wyniki zebrano w tab. 1. Jak wynika z zawartych w niej danych, jedynie metoda z użyciem RN-azinu i SDS okazała się zupełnie nieprzydatna. Żadna z próbek RNA izolowanych tą metodą z kału i hodowli komórkowych nie ulegała amplifikacji w reakcji RT-PCR. Zastosowanie 6 pozostałych metod do ekstrakcji RNA z hodowli komórkowych TGEV zapewniało uzyskanie dodatnich wyników w reakcji RT-PCR w przypadku każdej z 4 badanych próbek. Pozytywne wyniki uzyskiwane w amplifikacji cDNA wskazują, że ekstrahowany kwas nukleinowy nie ulegał degradacji w trakcie izolacji oraz był wolny od zanieczyszczeń substancjami hamującymi lub blokującymi reakcje enzymatyczne (ryc. 1, 2). Tylko 3 metody, z użyciem TRIzolu, guanidyny w kombinacji z proszkiem szklanym oraz według Chomczyńskiego, okazały się w pełni przydatne do przygotowania matrycy RNA TGEV z zawiesiny kału do reakcji RT-PCR. Zapewniały one powstawanie swoistych produktów amplifikacji z RNA pochodzącym z każdej z 20 próbek (tab. 1). W przypadku obydwu technik z wykorzystaniem proteinazy K dodatni wynik amplifikacji uzyskano z RNA ekstrahowanym z 3 na 20 próbek kału. W odniesieniu do pozostałych 17 próbek w obrazie elektroforetycznym nie stwierdzano specyficznych produktów amplifikacji, pomimo że kontrolna elektroforeza RNA przed wykonaniem reakcji PCR wskazywała na zachowanie jego podstawowej struktury. Wyniki te świadczą o obecności w ekstraktach RNA inhibitorów blokujących reakcję amplifikacji, których użyte metody nie były w stanie usunąć. Podobne rezultaty uzyskano z zastosowaniem detergentu kationowego CTAB (tab. 1).

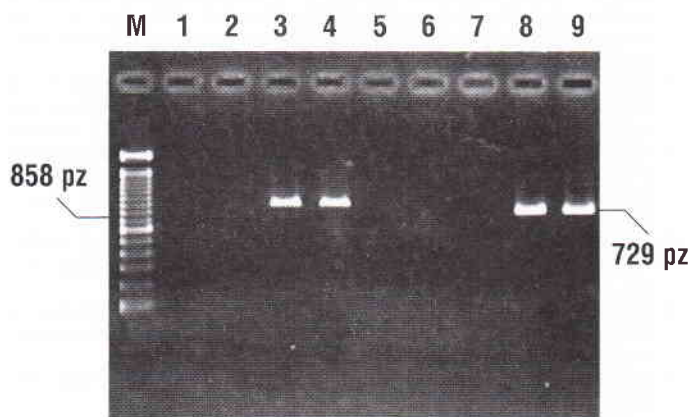
Tab. 1. Porównanie skuteczności różnych metod ekstrakcji RNA z kału świń oraz z hodowli komórkowej do wykrywania wirusa TGEV

Metoda ekstrakcji RNA	Liczba prób badanych			
	Kał (n = 20)		Hodowla komórkowa (n = 4)	
	RT-PCR (+)	RT-PCR (-)	RT-PCR (+)	RT-PCR (-)
Wg Chomczyńskiego, Sacchi	20	0	4	0
TRIzol	20	0	4	0
Gene Clean II; RNAID	20	0	4	0
CTAB	4	16	4	0
Proteinaza K, fenolowanie	3	17	4	0
Proteinaza K, 0,5% SDS	3	17	4	0
RN-azina, 0,5% SDS	0	20	0	4

Objaśnienia: (+) – dodatni wynik reakcji, (-) – ujemny wynik reakcji



Ryc. 1. Produkty reakcji RT-PCR o długości 692 pz uzyskane na matrycy RNA referencyjnych szczepów wirusa TGEV oraz izolatu krajowego, z użyciem starterów Oligo 97, 93 komplementarnych do genu nukleoproteiny genu TGEV. Nr 1 – kontrola negatywna, nr 2 – TGEV C-71, nr 3 – TGEV FS 772/70, nr 4 – TGEV Miller PP-3, nr 5 – TGEV Purdue-115, M – marker masy cząsteczkowej (100bp DNA ladder – Gibco). Elektroforeza w 1,5% żelu agarozowym barwionym bromkiem etydyny.



Ryc. 2. Produkty reakcji RT-PCR i nested PCR uzyskane na matrycy RNA referencyjnych szczepów TGEV z użyciem starterów komplementarnych do genów glikoproteiny S i polimerazy genu TGEV. Nr 3, 4 – produkty reakcji RT-PCR o długości 858 pz uzyskane z użyciem starterów Oligo 21, 32 na matrycy RNA szczepów TGEV FS 772/70 i Miller PP-3. Nr 8, 9 – produkty reakcji nested PCR o długości 729 pz uzyskane z użyciem starterów Oligo 21, 20 na matrycy cDNA produktów RT-PCR o długości 858 pz szczepów TGEV FS 772/70 i Miller PP-3. Nr 1, 2, 5, 6, 7 – kontrola negatywna. M – marker masy cząsteczkowej (100bp DNA ladder – Gibco). Elektroforeza w 1,5% żelu agarozowym barwionym bromkiem etydyny.

Jednym z istotnych elementów decydujących o przebiegu oraz czułości reakcji PCR jest odpowiednia jakość matrycy kwasu nukleinowego (1, 3, 8, 11, 13, 16, 17, 19, 22, 25). Idealna metoda ekstrakcji DNA lub RNA powinna być wydajna oraz szybka i prosta w wykonaniu.

Wykazano, że stosowanie wieloetapowych technik wpływa na wydłużenie czasu trwania ekstrakcji, co prowadzi do obniżenia wydajności izolacji kwasu nukleinowego (8). Ważne są także warunki wykonywania ekstrakcji, które mogą się przyczynić do degradacji materiału genetycznego. Ma to szczególne znaczenie w przypadku gdy ekstrahowany jest RNA, z uwagi na znaczną podatność tego kwasu na destrukcyjne działanie RN-az (8, 19).

Procedura ekstrakcji powinna gwarantować także odpowiednio wysoki stopień czystości matrycy (19). Używanie do reakcji PCR dostatecznie oczyszczonego genomowego DNA lub RNA z supernatantu zakażonej hodowli komórkowej nie przedstawia większych trudności. Zastosowanie PCR w diagnostyce klinicznej związane jest z koniecznością izolacji czystego kwasu nukleinowego z płynów ustrojowych, tkanek, wydzielin i wydaliny (15). W przypadku koronawirusów enterotropowych oraz innych zarazków wykazujących powinowactwo do przewodu pokarmowego, materiałem przydatnym do diagnostyki przyżyciowej są próbki kału. Specyficzną amplifikację kwasów nukleinowych ekstrahowanych z takiego materiału utrudniać może, poza dużą zawartością RN-az, obecność niespecyficznych inhibitorów, mogących blokować reakcję enzymatyczną (8, 11, 20, 23). Uwidocznia się to zwłaszcza wtedy, gdy amplifikacja przeprowadzana jest na matrycy RNA, kiedy próbka poddawana jest podwójnej reakcji enzymatycznej, a blokowanie lub hamowanie jej przebiegu może zachodzić na poziomie odwrotnej transkrypcji, jak również w trakcie właściwej polimeryzacji DNA.

Natura inhibitorów zawartych w kale oraz mechanizmy ich oddziaływania na reakcje enzymatyczne są słabo poznane (4, 8, 9, 11, 21, 23, 24). Hale i wsp. (8) sugerują, że hem będący częstym składnikiem próbek materiału biologicznego może, poprzez działanie chelatujące na jony magnezu (Mg^{++}), obniżać aktywność polimerazy DNA, a tym samym wydajność reakcji PCR. Shieh i wsp. (21) stwierdzili, że podobny efekt hamujący wywierają kwasy, polisacharydy oraz jony żelaza i glinu.

W celu eliminacji niespecyficznych inhibitorów obecnych w próbkach kału opracowano lub zmodyfikowano kilka metod ekstrakcji kwasów nukleinowych z materiału biologicznego (10, 13, 14, 16, 24, 25). Istota tych procedur polega, między innymi, na wykorzystaniu technik immunologicznych do wychwytywania cząstek wirusowych z zawiesiny (10, 14). Korzystny efekt osiągnąć można także poprzez wprowadzenie dodatkowego oczyszczania kwasów nukleinowych metodą chromatografii na celulozie CF-11 (23) lub żelu Sephadex G-200 (8). Według niektórych autorów, skuteczną w usuwaniu inhibitorów zawartych w próbkach kału jest technika ekstrakcji RNA z użyciem detergentu kationowego CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) (8, 11, 20).

Klasyczną metodą ekstrakcji RNA z materiału biologicznego jest technika wprowadzona przez Chomczyńskiego i wsp. (2), oparta na wykorzystaniu czynnika chaotropowego – izotiocyanianu guanidyny w kombinacji z ekstrakcją fenolowo-chloroformową. Matrycowy RNA ekstrahowany tą metodą jest wolny od inhibitorów enzymów, co umożliwia jego wykrywanie w reakcji RT-

PCR. Podstawową wadą oryginalnej metody Chomczyńskiego jest dość długi, kilkugodzinny czas trwania ekstrakcji RNA, co czyni ją niewygodną w rutynowej pracy laboratoryjnej. Zalecane w tej procedurze stosowanie rozpuszczalników organicznych, takich jak fenol i chloroform, oraz toksycznego 2-merkaptotetanolu stanowi także ryzyko zagrożenia zdrowia człowieka. Fakty te sprawiły, że metoda Chomczyńskiego była poddawana licznym modyfikacjom, zmierzającym do skrócenia procedury, eliminacji toksycznych reagentów, lub wprowadzenia dodatkowych etapów zwiększających wydajność ekstrakcji RNA oraz poprawiających stopień jego oczyszczenia. Spośród tych udoskonaleń na uwagę zasługuje zastosowanie adsorpcji uwolnionego pod wpływem działania guanidyny DNA lub RNA na nośniku stałym, np. na cząstkach chemicznie czystego, sproszkowanego szkła (3, 4, 8, 9, 24, 25), hydroksyapatytu (20) lub silikonu (13).

Pomimo opracowania wielu metod ekstrakcji RNA z próbek kału, zróżnicowanych technicznie i wykorzystujących różne reagenty chemiczne, problem wpływu nieswoistych inhibitorów kałowych na reakcje enzymatyczne nie został do końca rozwiązany. Uważa się, że w kale zawarty jest wiele różnych inhibitorów amplifikacji oraz że każda z metod ekstrakcji kwasów nukleinowych powoduje eliminację innych substancji inhibicyjnych (8). Można więc domniemywać, że zahamowanie reakcji amplifikacji stanowi wypadkową pomiędzy ilością inhibitorów w badanej próbce, ilością wirusa, wydajnością ekstrakcji RNA oraz stopniem w jakim dana metoda jest w stanie usunąć nieswoiste inhibitory reakcji.

W badaniach własnych wykazano, że spośród porównywanych metod izolacji kwasów nukleinowych z materiału biologicznego, godną rekomendacji techniką ekstrakcji RNA wirusa TGEV z kału świń jest klasyczna metoda opracowana przez Chomczyńskiego i wsp. (2). Jej przydatność do diagnostyki rutynowej limitowana jest jednak długim czasem trwania procedury, zwłaszcza gdy badana jest większa ilość prób. Opracowana przez firmę Life Technologies jednostopniowa metoda ekstrakcji RNA z materiału biologicznego z użyciem odczynnika TRIzol jest modyfikacją standardowej metody Chomczyńskiego, zapewniającą uzyskanie matrycy RNA porównywalnej jakości w czasie 1 godz. TRIzol jest jednofazowym roztworem fenolu i izotiocyanianu guanidyny, powodującym lizę oraz rozpuszczenie składników komórkowych próbki przy jednoczesnym zapewnieniu integralności uwolnionego RNA. Ekstrahowany kwas nukleinowy jest wolny od DNA oraz zanieczyszczeń białkowych. Alternatywną metodą ekstrakcji RNA koronawirusów wydaje się być technika z zastosowaniem adsorpcji kwasów nukleinowych na nośnikach stałych. Izolacja RNA wykonywana jest w środowisku 6,0 M roztworu wodnego guanidyny, natomiast jako nośniki stałe można wykorzystywać komponenty komercyjnych zestawów Geneclean II lub RNAID firmy BIO 101, La Jolla, CA, USA. W oparciu o uzyskane w badaniach własnych wyniki można stwierdzić, że metoda ta jest także prostą i szybką techniką uzyskiwania czystego RNA koronawirusów z kału świń do reakcji RT-PCR.

Istotną zaletą procedury z zastosowaniem guanidyny i nośników stałych jest brak etapu ekstrakcji fenolowej, co pozwala na ograniczenie ryzyka zagrożenia zdrowia personelu laboratoryjnego i jednocześnie eliminuje konieczność utylizacji sprzętu plastikowego jednorazowego użytku (20, 25).

Piśmiennictwo

1. Boom R., Sol C. A., Salimans M. M., Jansen C. L., Wertheim van Dillen P. M., van der Noordaa J.: Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 1990, 28, 495-503.
2. Chomczyński P., Sacchi N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987, 162, 156-159.
3. Davis L. G., Dibner M. D., Bartley J. F.: Glass powder elution of DNA, w: *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier Science Publishing Co., New York, 1986, s. 123-125.
4. Gantzer C., Senouci S., Maul A., Levi Y., Schwartzbrod L.: Enterovirus genomes in wastewater: concentration on glass wool and glass powder and detection by RT-PCR. *J. Virol. Methods* 1997, 65, 265-271.
5. Grądzki Z., Winiarczyk S.: Koronawirus układu oddechowego (PRCV) i jego patogenność dla świń. *Medycyna Wet.* 1997, 53, 448-453.
6. Grądzki Z., Winiarczyk S.: Metody biologii molekularnej w rozpoznawaniu wirusowego zapalenia żołądka i jelit (TGE) świń. *Medycyna Wet.* 1997, 53, 197-201.
7. Grądzki Z., Winiarczyk S.: Zastosowanie metody RT-PCR do wykrywania wirusa TGEV oraz jego różnicowania z wirusem PRCV w hodowli komórkowej i kale świń. *Medycyna Wet.* Praca w druku.
8. Hale A. D., Green J., Brown D. W.: Comparison of four RNA extraction methods for the detection of small round structured viruses in faecal specimens. *J. Virol. Methods* 1996, 57, 195-201.
9. Ijzerman M. M., Dahling D. R., Fout G. S.: A method to remove environmental inhibitors prior to the detection of waterborne enteric viruses by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 1997, 63, 145-153.
10. Jansen R. W., Siegl G., Lemon S. M.: Molecular epidemiology of human hepatitis A virus defined by an antigen-capture polymerase chain reaction method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, 87, 2867-2871.
11. Jiang X., Wang J., Graham D. Y., Estes M. K.: Detection of Norwalk virus in stool by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1992, 30, 2529-2534.
12. Larski Z.: Diagnostyka wirusologiczna chorób zwierząt, wyd. PWRiL Warszawa 1977, s. 149-161.
13. McCaustland K. A., Bi S., Purdy M. A., Bradley D. W.: Application of two RNA extraction methods prior to amplification of hepatitis E virus nucleic acid by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 1991, 35, 331-342.
14. Muir P., Nicholson F., Jhetam M., Neogi S., Banatvala J. E.: Rapid diagnosis of enterovirus infection by magnetic bead extraction and polymerase chain reaction detection of enterovirus RNA in clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1993, 31, 31-38.
15. Ochert A. S., Boulter A. W., Birnbaum W., Johnson N. W., Teo C. G.: Inhibitory effect of salivary fluids on PCR: potency and removal. *PCR Meth. Applic.* 1994, 3, 365-368.
16. Puissant C., Hondebine L. M.: An improvement of the single-step method of RNA isolation by acid guanidinium-thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Biotechniques* 1990, 8, 148-149.
17. Rotbart H. A.: Enzymatic RNA amplification of enteroviruses. *J. Clin. Microbiol.* 1990, 28, 438-442.
18. Saif L. J., Wesley R. D.: Transmissible gastroenteritis. w: *Diseases of swine*, red. A. D. Leman, B. E. Strauss, W. L., Mengeling, S. D'Alaire, D. J. Taylor, 7th ed., Iowa State University Press, Ames, IA, 1992, s. 362-386.
19. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.: *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
20. Santos N., Gouvea V.: Improved method for purification of viral RNA from fecal specimens for rotavirus detection. *J. Virol. Methods* 1994, 46, 11-21.
21. Shieh Y. C., Wait D., Tai L., Sobsey M. D.: Methods to remove inhibitors in sewage and other fecal wastes for enterovirus detection by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 1995, 54, 51-66.
22. Verhófstede C., Franssen K., Marissens D., Verhelst R., van der Groen G., Lauwers S., Zissis G., Plum J.: Isolation of HIV-1 RNA from plasma: evaluation of eight different extraction methods. *J. Virol. Methods* 1996, 60, 155-159.
23. Wilde J., Eiden J., Yolken R.: Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1990, 28, 1300-1307.
24. Winiarczyk S., Grądzki Z., Markowska I., Pejsak Z.: Przydatność różnych metod ekstrakcji RNA rotawirusów z kału prosiąt do diagnostyki tych zakażeń metodą PCR. *Medycyna Wet.* 1994, 59, 605-607.
25. Yamada O., Matsumoto T., Nakashima M., Hagarai S., Kamahora T., Ueyama H., Kishi Y., Uemura H., Kurimura T.: A new method for extracting DNA or RNA for polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 1990, 27, 203-210.

Adres autora: dr hab. Zbigniew Grądzki ul. Bursztynowa 15/109, 20-576 Lublin