

# Zastosowanie testu RT-nested-PCR do wykrywania materiału genetycznego wirusa grypy świń w materiale klinicznym\*)

ANDRZEJ KOWALCZYK, IWONA MARKOWSKA-DANIEL, ZYGMUNT PEJSAK

Zakład Chorób Świń Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego,  
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Kowalczyk A., Markowska-Daniel I., Pejsak Z.

## Application of RT-nested-PCR for RNA detection of swine influenza virus in clinical samples

### Summary

Pigs serve as major reservoirs of H1N1 and H3N2 influenza viruses which are endemic in pig populations worldwide and are responsible for one of the most prevalent respiratory diseases in pigs. Therefore the early detection and identification of such events are paramount in monitoring the spread of influenza viruses. Transfer of influenza A viruses from animal hosts to man may lead to the emergence of new human pandemic strains.

The aim of the study was to prove the matrix gene useful for reverse transcription nested-PCR as sensitive and specific for the detection of swine influenza A viruses in clinical samples.

75 RNA-virus positive samples out of 235 samples, including nasal swabs, lung tissues and whole blood samples, were detected by RT-n-PCR. Using conventional virology method we isolated 33 SIV strains in embryonated chicken SPF eggs. The results of PCR were 100% in agreement with those of virus isolation. The limit of detection of SIV was  $10^{-7}$  EID<sub>50</sub>/0.1 ml. These results demonstrate the usefulness of RT-n-PCR for the detection and identification of influenza A virus in clinical material.

**Keywords:** swine influenza virus

Infekcje wirusem grypy są istotną przyczyną zaburzeń czynności układu oddechowego świń. Choroba objawia się wysoką gorączką, wysiękiem z nosa, kaszlem, problemami z oddychaniem oraz brakiem apetytu (12). Niekiedy konsekwencją zakażenia są: poronienia, rodzenie się martwych prosiąt, spadek skuteczności krycia oraz obniżenie wskaźnika wyproszeń (13).

Chorobę wywołuje pneumotropowy wirus grypy świń (swine influenza virus – SIV), należący do rodziny Orthomyxoviridae, rodzaju Influenzavirus. Materiał genetyczny SIV stanowi pojedynczą nić RNA składającą się z ośmiu segmentów o ujemnej polarności (17). Segmentowana budowa genomu oraz duża częstotliwość występowania mutacji punktowych w obrębie RNA wirusów grypy typu A jest przyczyną zróżnicowania antygenowego szczepów krążących wśród zwierząt (12). Głównymi znacznikami różnorodności antygenowej wirusa są dwa zewnętrzne białka powierzchniowe: hemaglutynina (H) oraz neuraminidaza (N). Do chwili obecnej opisano 16 typów białka H i 9 typów białka N. Najczęściej występujące pod-

typy SIV w Europie to H1N1, H1N2 i H3N2. Duża zmienność SIV stwarza problemy w rozpoznaniu laboratoryjnym choroby (2).

Do wykrywania SIV rutynowo wykorzystuje się izolację wirusa w zarodkach kurzych SPF. Metoda ta cechuje się dużą czułością, jednak jej ograniczeniem jest konieczność przeprowadzenia kilku pasażów, czego konsekwencją jest długi okres oczekiwania na wynik oraz wysoki koszt badania. Powszechnie zastosowanie znalazły również metody serologiczne: test zahamowania hemaglutynacji (HI) oraz test neutralizacji neuraminidazy (NI), w których używa się specyficznych surowic referencyjnych (6). Pozwalają one na wykrycie wysoce zmiennych czynników antygenowych, co przy częstych mutacjach w obrębie SIV może powodować uzyskanie fałszywie negatywnych wyników badania oraz stwarza konieczność ciągłego uaktualniania surowic do testu (2).

Celem badań było opracowanie testu RT-nested-PCR, który umożliwi wykrywanie obecności materiału genetycznego SIV bezpośrednio w materiale klinicznym znacznie szybciej w stosunku do metod konwencjonalnych oraz niezależnie od jego zmienności czy zdolności do namnażania się w zarodkach kurzych.

\*) Badania wykonano w ramach grantu MN i I nr 0972/P06/2005/25.

## Materiał i metody

**Szczepy wirusowe.** Materiał do badań stanowiło 235 próbek (106 wymazów z nosa, 33 wycinki tkanki płucnej oraz 60 próbek krwi pełnej) pobranych w latach 2004-2006 od świń wykazujących kliniczne objawy grypy, odchowywanych w 19 fermach trzody chlewnej na terenie Polski.

Jako materiał kontrolny do standaryzacji i optymalizacji metod wykorzystano szczepy referencyjne najczęściej występujących podtypów SIV w Europie: H1N1 (A/Sw/Bel/1/98), H1N2 (A/Sw/Eng/96) i H3N2 (A/Sw/FI/1/98).

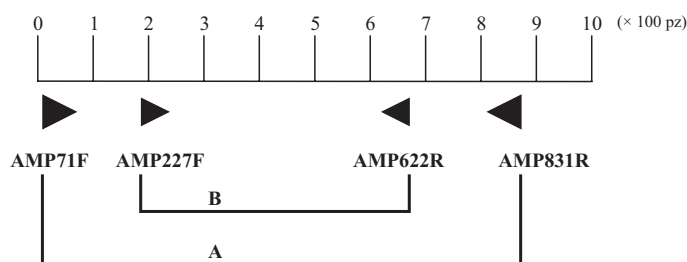
**Ekstrakcja RNA i RT-nested-PCR.** Całkowite RNA ekstrahowano z 350 µl objętości materiału wyjściowego, używając zestawu Total RNA Prep Plus (A&A Biotechnology) wg procedury producenta. Materiał genetyczny po elucji wykorzystano bezpośrednio do reakcji odwrotnej transkrypcji lub przechowywano w -70°C do dalszych badań.

Reakcję RT przeprowadzono w 20 µl roztworu zawierającego bufor do odwrotnej transkrypcji (50 mM Tris-HCl, pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>), 125 µM każdego z dNTP (Fermentas), 1 jednostki inhibitora RNazy (Invitrogen), 100 jednostek odwrotnej transkryptazy M-MLV (Invitrogen) i 50 ng Random Primers (Invitrogen). Mieszaninę reakcyjną inkubowano w 24°C przez 10 minut, a następnie przez 60 minut w 42°C, w celu uzyskania kopii cDNA.

Równolegle przeprowadzono badania nad przydatnością i specyficznością starterów uniwersalnych, ograniczających koniec 5' wirusowego RNA (vRNA) (8). Stosowano je zamiennie ze starterami typu random i dodawano do reakcji odwrotnej transkrypcji w ilości 50 pmoli.

Zastosowane w badaniu startery zostały opracowane przez Ellis i wsp. (6) na podstawie analizy sekwencji genu białka M1 pochodzącej ze szczepów wirusa grypy izolowanych od człowieka, świń oraz ptaków. Wykorzystany region ograniczał się do otwartej ramki odczytu tej sekwencji, charakteryzującej się wysoką konserwatywnością (8). Sekwencje starterów zaprojektowano tak, by rozpoznawały wirusa grypy również w sytuacjach, gdy doszło do transmisji międzygatunkowej. Wybrano dwie pary starterów: jedną amplifikującą fragment o długości 760 pz (AMP71F, AMP831R) oraz drugą, zagnieżdżającą się w długości pierwszej (nested), flankującą fragment o długości 410 pz (AMP227F, AMP622R) (tab. 1, ryc. 1).

Obie reakcje przeprowadzono w objętości 25 µl, pierwszą po dodaniu 2 µl cDNA, drugą natomiast po dodaniu 2 µl objętości produktu pierwszej reakcji. Koncentracja starterów wynosiła 25 pmoli na reakcję. Mieszanina reakcyjna PCR z polimerazą Taq (0,5 jednostki) (Fermentas) zawierała bufor do polimerazy, 200 µM każdego z dNTP oraz 2 mM MgCl<sub>2</sub> dla reakcji pierwszej i 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> w reakcji nested. Optymalna temperatura przyłączenia każdej pary starterów została określona na podstawie szeregu powtórzeń wykonanych w gradiencie temperatur przy użyciu termocyklera iCycler (BioRad). Amplifikację prowadzono w 35 cyklach: 95°C (5 minut), 55°C (reakcja pierwsza PCR) lub 60°C (reakcja druga PCR) (45 sek.) oraz 72°C (1 minuta). Cykle poprzedzono wstępną denaturacją w temp. 95°C przez 5 minut. Produkty amplifikacji analizowano po rozdiale elektroforetycznym w 1,5% żelu agarozowym z do-



Ryc. 1. Schemat umiejscowienia starterów zewnętrznych (A) oraz wewnętrznych – nested (B) używanych w teście nested-PCR do amplifikacji fragmentu genu białka matrix

Tab. 1. Charakterystyka starterów wykorzystanych w teście RT-nested-PCR do amplifikacji fragmentu genu M1 wirusa grypy

Nazwa	Sekwencja 5'-3' (pozycja nukleotydów)	Wielkość produktu
Odwrotna transkrypcja - RT		
Starter uniwersalny	AGTAGAAACAAGG (1-13)	
Pierwsza reakcja PCR		
AMP71F	CGGTCAGGCCCTCAAAGC (60-80)	760 pz
AMP831R	AGGCGATCAAGAATCCACAA (839-819)	
Nested PCR		
AMP227F	GTGCCAGTGAGCGAGGAC (216-235)	410 pz
AMP622R	ATCTCCATGGCCTCTGCT (626-608)	

datkiem bromku etydydu o koncentracji 1 µg/ml. Rozdział prowadzono w buforze TAE, przy stałym stężeniu prądu elektrycznego, wynoszącym 350 mA.

**Ocena swoistości i czułości testu RT-nested-PCR.** Optymalizację oraz ocenę czułości zaczęto od pierwszego etapu PCR. W tym celu sporządzono dwanaście kolejnych dziesiętnych rozcieńczeń (10<sup>-1</sup>-10<sup>-12</sup>) płynu owodniowo-omocznioowego jaj SPF, w których namnażano szczepy referencyjne SIV.

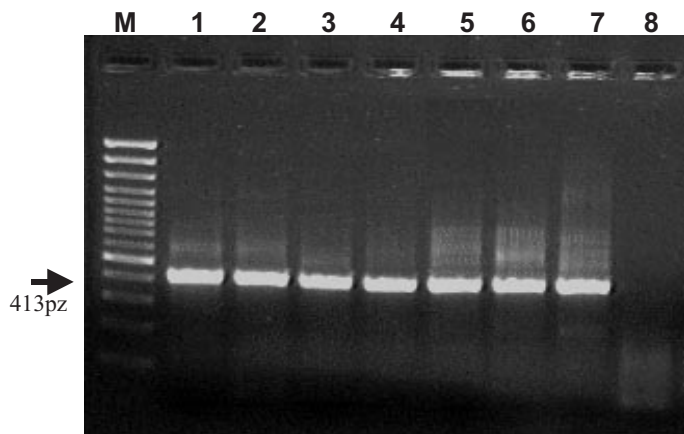
Rozcieńczenia dziesiętne wykorzystano również podczas ustalenia optymalnego stężenia jonów Mg<sup>2+</sup>, porównania wydajności Random Primers i starterów uniwersalnych w reakcji RT oraz stężenia starterów w mieszaninie reakcyjnej PCR. cDNA pochodzące z rozcieńczeń wirusa zostało podzielone na siedem wariantów stężeń MgCl<sub>2</sub> od 3,5 mM do 0,5 mM. W celu zoptymalizowania stężenia starterów wykorzystano następujące ich koncentracje: 25 pmoli, 15 pmoli, 10 pmoli, 7 pmoli oraz 5 pmoli/reakcję.

Do kontroli swoistości testu wykorzystano materiał genetyczny wyekstrahowany z drobnoustrojów odpowiedzialnych za infekcje układu oddechowego świń, a mianowicie materiał genetyczny PRRSV (porcine reproductive and respiratory syndrome virus), CSFV (classical swine fever virus), ADV (Aujeszky's disease virus), oraz szczepy wirusa ptasiej grypy AIV (avian influenza virus): H7N4 A/Turkey/95/95 i H5 A/Robin/Poland/119-128/02, a ponadto DNA bakterii: *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida* i *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

## Wyniki i omówienie

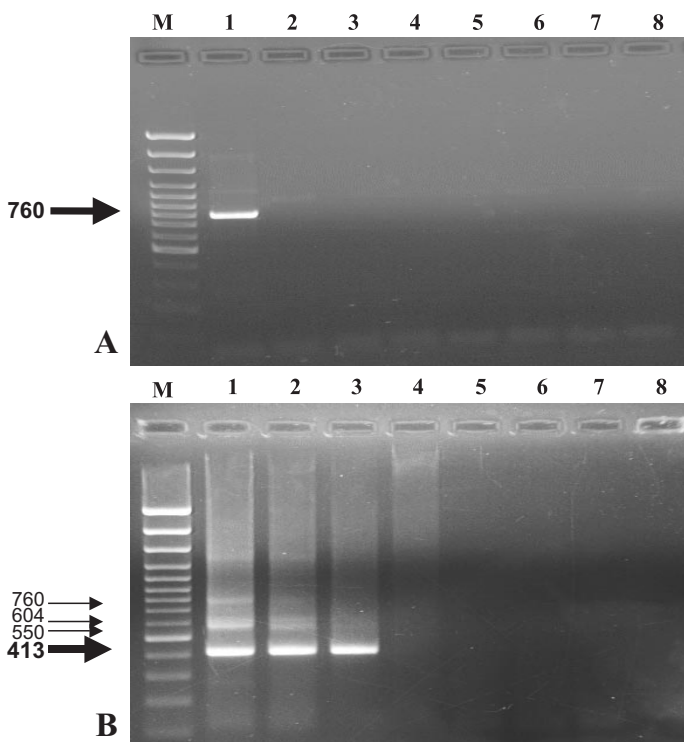
W przebadanych 235 próbkach klinicznych materiału genetyczny SIV wykryto ogółem w 75 próbkach: w 52 wymazach z nosa, 14 wycinkach tkanki płucnej oraz 9 próbkach krwi.

Przeprowadzona równolegle izolacja wirusa w jajach SPF pozwoliła na uzyskanie szczepów SIV jedynie z 33 próbek.



**Ryc. 2. Wyniki testu RT-nested-PCR**

Ścieżki: M – marker masy molekularnej; 1 – H1N1 (A/Sw/Bel/1/98); 2 – H1N2 (A/Sw/Eng/96); 3 – H3N2 (A/Sw/FI/1/98); 4 – H7N4 (A/Turkey/Poland/95/95); 5 – H5 (A/Robin/Poland/119-128/02); 6 – szczep terenowy SIV wyizolowany w 2005 roku; 7 – szczep terenowy SIV wyizolowany w 2006 roku, 8 – kontrola ujemna



**Ryc. 3. Wyniki testu RT-nested-PCR dla genu białka matrix 1 – pierwszy etap (A) oraz nested PCR (B)**

Ścieżki: M – marker masy molekularnej; ścieżki 1-8 przedstawiają kolejne rozcieńczenia płynu owodniowo-omocznioowego namnożonego szczepu referencyjnego H1N1 (A/Sw/Bel/1/98) o mianie EID  $10^{-4}$ , co odpowiada mianom wirusa:  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-11}$ ,  $10^{-12}$

Na 19 przypadków podejrzenia grypy (na podstawie objawów klinicznych obserwowanych u świń, od których pozyskano materiał do badań), 14 zostało potwierdzonych bezpośrednim testem RT-nested-PCR oraz izolacją wirusa. Z uwagi na słabą przeżywalność wirusa grypy, w niektórych przypadkach przyczyną uzyskania wyniku ujemnego mogło być nieodpowiednie pobranie próbki lub zbyt długi czas między wystąpieniem objawów choroby a próbobraniem (większe prawdopodobieństwo wykrycia wirusa grypy u osobników w okresie wiremii i nasilenia gorączki). Najczęściej po ustąpieniu objawów chorobowych, co zazwyczaj następuje po 5-7 dniach od ich wystąpienia, zmniejsza się gwałtownie siewstwo wirusa, a co za tym idzie – prawdopodobieństwo jego izolacji z próbek pobranych przyżyciowo (krew, wymazy z nosa) (5). Wówczas w celu potwierdzenia etiologii choroby konieczne jest zbadanie wycinków płuc. Po pobraniu próbek materiał należy przechowywać maksymalnie 48 godz. w temp.  $4^{\circ}\text{C}$ , przy dłuższym przechowywaniu konieczne jest umieszczenie próbek w temperaturze  $-70^{\circ}\text{C}$ .

W wykonanych badaniach oczekiwany produkt wielkości 410 pz otrzymano tylko w próbach, w których użyto RNA szczepów SIV oraz AIV (ryc. 2). W badaniach Ellis i wsp. (6) również stwierdzono uniwersalność opracowanych starterów dla wirusa grypy typu A, otrzymując produkty o wielkości 410 pz w materiale pochodzącym ze szczepów ludzkich wirusa grypy: Wuh/359/95 i Sw/Tw/70, świńskich: Sw/OMS/82 i Sw/OMS/84 oraz ptasich: Dk/Ger/73 i Dk/Ukr/63. Wspomniani badacze potwierdzili jednocześnie, że test jest niespecyficzny dla wirusów grypy typu B. Na podstawie badań własnych oraz Ellis i wsp. można stwierdzić wysoką zachowawczość amplifikowanego fragmentu wśród szczepów mających powinowactwo do różnych gatunków. Analizy filogenetyczne oparte na informacji zawartej w zapisie genu M wskazują, że jest to miejsce w genomie o zmniejszonym współczynniku mutacji w porównaniu do innych genów, np. genu kodującego hemaglutyninę (3).

Analiza czułości testu wykazała, że prążek na wysokości 410 pz był widoczny do trzeciego dołka na żelu, co odpowiadało rozcieńczeniu  $10^{-3}$  i mianu  $10^{-7}$  EID<sub>50</sub>/0,1 ml SIV (ryc. 3B). Produkt reakcji ze starterami zewnętrznymi został zidentyfikowany tylko w pierwszym rozcieńczeniu wirusa, zatem czułość tej części procesu była 100-krotnie niższa w porównaniu do reakcji nested-PCR. W pracy Ellis i wsp. (6) limit detekcji wirusa z użyciem tych samych starterów w teście nested-PCR ustalono na poziomie  $\leq 10$  pfu użytych szczepów referencyjnych/ml, nie podano natomiast informacji dotyczącej czułości pojedynczego etapu PCR. Wyniki zbliżone do uzyskanych w badaniach Ellis i wsp. zanotowali Kho i wsp. (11) którzy stosowali nested-PCR do identyfikacji wirusa choroby Newcastle. W ich badaniach granica wykrywalności materiału genetycznego kształtowała się na po-

ziomie 3 pfu/ml, przewyższając 100-krotnie czułość testu ze starterami zewnętrznymi. W badaniach Wrighta i wsp. (15) wykorzystujących startery specyficzne dla genu H w standardowym teście PCR czułość wynosiła od 25 do 30 pfu/ml. Trudno jest odnieść w pełni powyższe wyniki do badań własnych z uwagi na zastosowanie odmiennych metod określenia ilości izolowanego wirusa. Stauber i wsp. (14) zastosowali jednoetapowy test PCR do wykrywania wirusa choroby Newcastle w preparatach szczepionkowych, który charakteryzował się czułością na granicy  $10^{-2}$  EID<sub>50</sub> dla żywych izolatów szczepionkowych oraz  $10^{-5}$  EID<sub>50</sub> dla szczepionek inaktywowanych. Podobne wyniki uzyskano w teście nested-PCR do diagnostyki molekularnej wirusa nosówki psów, czułość pierwszej części PCR wynosiła 10 TCID<sub>50</sub>, zaś czułość nested – 0,1 TCID<sub>50</sub> (9). Aslanzadeh i wsp. (1) wykazali u pacjentów seropozytywnych wobec HCV (hepatitis C virus), obecność materiału genetycznego wirusa w 72% próbek badanych pojedynczym testem PCR i 78% próbek pochodzących od tych samych pacjentów po zastosowaniu testu nested.

W badaniach mających na celu ustalenie wpływu użytych starterów typu random oraz starterów uniwersalnych na końcowy efekt testu nested PCR wykazano analogiczną czułość obydwu testów, niezależnie od rodzaju zastosowanych starterów.

Graniczną koncentrację starterów w teście PCR określono na poziomie 7,5 pmola. W badaniach mających na celu ustalenie optymalnej zawartości jonów Mg<sup>2+</sup>, przy których wykrywany jest jeszcze materiał genetyczny, a jednocześnie nie stwierdza się obecności niespecyficznych prążków wykazano, że poszukiwany produkt PCR był obecny w każdym zastosowanym stężeniu MgCl<sub>2</sub>. Na podkreślenie zasługuje, że obecności niespecyficznych prążków nie stwierdzono w żadnej próbie. W związku z tym stężenie MgCl<sub>2</sub> w mieszaninie reakcyjnej pierwszej reakcji PCR z zewnętrznymi starterami ustalono na poziomie 2 mM MgCl<sub>2</sub>, co stanowiło średnią badanych stężeń. W drugiej reakcji PCR zmniejszono stężenie MgCl<sub>2</sub> do 1,5 mM w celu obniżenia prawdopodobieństwa nagromadzenia się jonów magnezowych przeniesionych z wcześniejszej reakcji PCR. Mieszanina drugiej reakcji była rozcieńczeniem składników pierwszej w stosunku 1 : 5.

Oczekiwany amplikon o wielkości 410 pz został stwierdzony razem z dodatkowymi, słabo widocznymi prążkami zlokalizowanymi zawsze na określonym poziomie masy molekularnej. Na ryc. 3B widoczne są towarzyszące prążki na wysokościach 550 pz, 604 pz oraz 760 pz. Dodatkowe prążki zostały potwierdzone w reakcji z wykorzystaniem dwóch par starterów dla tego samego odcinka genu w pracach Kempa i wsp. (10) oraz Kho i wsp. (11), natomiast nie stwierdzono ich w pracy Ellis i wsp (6). Jest to efekt wytworzenia produktów czterech prawdopodobnych kombinacji dwóch par starterów, z czego tylko jedna para nested

(startery AMP227F oraz APM622R) daje podstawowy i najsilniej widoczny amplikon wielkości 410 pz. Mamy tu do czynienia z trzema wariantami: kombinacją dwóch zewnętrznych starterów AMP71F oraz AMP831R i ich produktem 760 pz; AMP71F wraz z APM622R (550 pz) oraz AMP227F z AMP831R (605 pz). Podobne zjawisko jednoczesnej obecności towarzyszących prążków zostało po raz pierwszy zaobserwowane podczas prób wykorzystania testów RT-nested-PCR w jednoprobówkowym teście przy wykrywaniu wirusa HIV (10). W badaniach własnych podjęto próbę wyeliminowania omawianego zjawiska poprzez dobranie temperatur przyłączania starterów oraz obniżanie ich koncentracji. Stwierdzono, że niższa koncentracja starterów w drugiej reakcji, nested PCR w stosunku do pierwszej nie eliminuje syntezy prążków dodatkowych. Z kolei stosując dziesiętne rozcieńczenia zawiesiny wirusa wykazano, że na obecność dodatkowych prążków ma wpływ ilość materiału wyjściowego, użytego do reakcji RT. Jak widać na ryc. 3B w ostatnim rozcieńczeniu płynu owodniowo-omocznioowego (ścieżka nr 3), gdzie ilość wirusa jest jeszcze wykrywalna, prążki dodatkowe zupełnie znikły. Tę samą zależność wykazano w teście RT-nested-PCR do wykrywania wirusa choroby Newcastle (11). Nieskuteczne okazały się również próby eliminacji dodatkowych prążków, jakie podjęli Ding i wsp. (4). Autorzy ci usiłowali usunąć dodatkowe prążki na drodze optymalizacji koncentracji MgCl<sub>2</sub> oraz stężenia starterów. W rezultacie niepowodzeń uznali ich obecność za nieuniknioną konsekwencję testu nested PCR z nową, specyficzną parą starterów. Pomimo tej niekorzystnej właściwości testów nested PCR uważa się, że ich zaletą jest specyficzność wynikająca z zawężenia miejsca amplifikowanego w pierwszej części PCR (15).

W przeprowadzonych badaniach nie stwierdzono obecności specyficznego amplikonu w teście PCR z wykorzystaniem materiału genetycznego pozostałych badanych patogenów układu oddechowego świń. Nie wykryto również amplikonu w kontroli ujemnej. Wskazuje to jednoznacznie na specyficzność opracowanego testu.

Obecność fałszywie pozytywnych wyników w diagnostyce weterynaryjnej z wykorzystaniem testów RT-PCR jest rzadko omawiana. Kontaminację stwierdza się zwykle poprzez otrzymanie wyniku dodatniego w kontroli ujemnej lub przeprowadzając test weryfikacyjny, przy czym najczęściej jest on wykonany z użyciem innych narzędzi detekcji, np. weryfikacyjny test PCR oparty na innym fragmencie sekwencji. W publikacji poświęconej ryzyku pojawiania się fałszywie pozytywnych wyników RT-PCR w diagnostyce PRRSV za jedną z przyczyn występowania takich rezultatów uznano niską czułość testu weryfikacyjnego lub użycie w nim innych starterów komplementarnych do regionu o większej zmienności (7). Jako drugą z przyczyn tego zjawiska uznaje się zanieczyszczenie

wyzolowanego RNA pozostałościami DNA, którego obecność w eluacie tłumaczona jest brakiem właściwej separacji kolumn do izolacji. Z kolei obecność DNA w mieszaninie reakcyjnej PCR może być efektem kontaminacji próbki ludzkim DNA pochodzącym od pracowników laboratorium. Trudno jest uznać samą obecność DNA obcego pochodzenia za czynnik wpływający na syntezę prążków świadczących o wyniku pozytywnym dla danej reakcji PCR. Natomiast fałszywie pozytywne rezultaty testu w zaprezentowane przez Fetzera i wsp. (7) były najprawdopodobniej spowodowane niespecyficznością jednego ze starterów, który w 100% był komplementarny do fragmentu ludzkiego genu w *locus* SPEG.

Podsumowując, w prezentowanej pracy przedstawiono czułość, swoistość oraz uniwersalność testu RT-nested-PCR do wykrywania genu białka M1 szczepów izolowanych od świń i ptaków. Zastosowany test można uznać za narzędzie do określenia szerokiego zakresu podtypów wirusa grypy. Przedstawiony test nie różnicuje izolatów wirusa pod względem podtypu, natomiast służy do potwierdzenia obecności materiału genetycznego wirusa typu A bezpośrednio w materiale biologicznym. Z uwagi na międzygatunkową transmisję wirusa grypy, powyższe ma duże znaczenie epidemiologiczne. Biorąc pod uwagę wrażliwość populacji świń na zakażenie ptasią odmianą wirusa, w tym wysoce patogennym szczepem HPAI, zastosowanie uniwersalnej i czulej metody posiada duże znaczenie w monitorowaniu rozprzestrzenienia się SIV (9).

### Piśmiennictwo

1. *Aslanzadeh J., Padilla B. B., Shanley J. D.*: Evaluation of PCR and nested PCR for laboratory diagnosis of hepatitis C virus infection. *Mol. Cell Probes* 1996, 10, 173-178.
2. *Choi Y. K., Goyal S. M., Kang S. W., Farnham M. W., Joo H. S.*: Detection and subtyping of swine influenza H1N1, H1N2 and H3N2 viruses in clinical samples using two multiplex RT-PCR assays. *J. Virol. Methods* 2002, 102, 53-59.
3. *Di Trani L., Bedini B., Donatelli I., Campitelli L., Chiappini B., De Marco M. A., Delogu M., Buonavoglia C., Vaccari G.*: A sensitive one-step real-time PCR for detection of avian influenza viruses using a MGB probe and an internal positive control. *BMC Infect. Dis.* 2006, 25, 87.
4. *Ding L., Imura E., Saijo K., Hamada H., Ohno T.*: A speedy method to detect inserted DNA fragment in cell lines transfected with retroviral vectors. *Cytotechnology* 2000, 34, 243-252.
5. *Easterday B. C., Van Reeth K.*: Swine influenza, [w:] B. E. Straw, S. D'Allaire, W. L. Mengeling, D. J. Taylor (wyd.): *Disease of swine*. The Iowa State University Press, USA 1999, 277-290.
6. *Ellis J. S., Zambon M. C.*: Combined PCR-heteroduplex mobility assay for detection and differentiation of influenza A viruses from different animal species. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39, 4097-4102.
7. *Fetzer C., Pesch S., Ohlinger V. F.*: High risk of false positive results in a widely used diagnostic test for detection of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet. Microbiol.* 2006, 115, 21-31.
8. *Ito T., Gorman O. T., Kawaoka Y., Bean W. J., Webster R. G.*: Evolutionary analysis of the influenza A virus M gene with comparison of the M1 and M2 proteins. *J. Virol.* 1991, 65, 5491-5498.
9. *Jóźwik A., Frymus T.*: Comparison of the immunofluorescence assay with RT-PCR and nested PCR in the diagnosis of canine distemper. *Vet. Res. Commun.* 2005, 29, 347-359.
10. *Kemp D. J., Churchill M. J., Smith D. B., Biggs B. A., Foote S. J., Peterson M. G., Samaras N., Deacon N. J., Doherty R.*: Simplified colorimetric analysis of polymerase chain reactions: detection of HIV sequences in AIDS patients. *Gene* 1990, 94, 223-228.
11. *Kho C. L., Mohd-Azmi M. L., Arshad S. S., Yusoff K.*: Performance of an RT-nested PCR ELISA for detection of Newcastle disease virus. *J. Virol. Methods* 2000, 86, 171-183.
12. *Markowska-Daniel I., Kowalczyk A.*: Wpływ zmienności na międzygatunkową transmisję zakażeń wirusem grypy. *Medycyna Wet.* 2006, 62, 981-987.
13. *Pejsak Z., Markowska-Daniel I., Kowalczyk A., Jabłoński A., Kozaczyński W., Loda M.*: Zaburzenia w rozrodzie związane z wybuchem grypy świń w fermie wielkotowarowej. *Medycyna Wet.* 2005, 61, 1154-1159.
14. *Stauber N., Brechtbuhl K., Bruckner L., Hofmann M. A.*: Detection of Newcastle disease virus in poultry vaccines using the polymerase chain reaction and direct sequencing of amplified cDNA. *Vaccine* 1995, 13, 360-364.
15. *Tao S. C., Jiang D., Lu H. L., Xing W. L., Zhou Y. X., Cheng J.*: One-Tube Nested RT-PCR Enabled by Using a Plastic Film and its Application for the Rapid Detection of SARS-Virus. *Biotechnol. Lett.* 2004, 26, 179-183.
16. *Wright K. E., Wilson G. A., Novosad D., Dimock C., Tan D., Weber J. M.*: Typing and subtyping of influenza viruses in clinical samples by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33, 1180-1184.
17. *Zhang W. D., Evans D. H.*: Detection and identification of human influenza viruses by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 1991, 33, 165-189.

Adres autora: prof. dr hab. Iwona Markowska-Daniel, ul. Sienkiewicza 35A, 24-100 Puławy; e-mail: iwondam@piwet.pulawy.pl