

Porównanie klasycznej metody PCR oraz Real-Time Sybr-Green HRM PCR w rozpoznawaniu zakażeń parwowirusowych u psów

ŁUKASZ ADASZEK, DAGMARA TWARÓG, JERZY ZIĘTEK,
MONIKA WOJCIECHOWSKI*, STANISŁAW WINIARCZYK

Katedra Epizootologii i Klinika Chorób Zakaźnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP, ul. Głęboka 30, 20-612 Lublin
*Zakład Toksykologii i Ochrony Środowiska Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UP, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Adaszek Ł., Twaróg D., Ziętek J., Wojciechowski M., Winiarczyk S.

Comparison of standard PCR and Real-Time PCR in the diagnose of canine parvoviral infections

Summary

The aim of this study was to compare a standard PCR and Sybr-Green HRM PCR in the diagnosis of canine parvoviral infections. A total of 22 feces samples were collected from dogs suspected of parvovirus. The entire DNA for standard PCR and Real-Time PCR was isolated from the feces. In both methods this same pair of primers that allow the amplification of a fragment of VP 2 gene with a length of 1278 bp were used. The specificity of the obtained PCR products in the classical method were established based on the results of sequencing 8 out of 22 DNA probes and based on the comparison of their sequences with a CPV VP2 FJ 222823 sequence taken from the GeneBank. The specificity of Real-Time PCR products were established based on the analysis of their melting curve. In both standard and Real-Time PCR CPV DNA was detected in all 22 feces samples. The length of the obtained products was 1190 bp. To obtain a positive result in Real-Time PCR it was required to increase the number of the cycles from 30 to 60. The Ct values were between 43-53, and the analysis of the melting curve revealed that the Tm of Real-Time PCR products ranged between 80.5-85°C. Despite the results of this study indicating that both of these techniques are specific, sensitive, and repeated methods for detection of the CPV DNA, to shorten the time of Real-Time PCR the application of appropriate primers is required, which enables the amplification of shorter fragments of the DNA than those obtained in our study.

Keywords: CPV, PCR, Real-Time PCR, dogs

Parwowiroza psów (parvovirus, parvoviral infection) jest ostrą, zaraźliwą, wirusową chorobą, przebiegającą z zapaleniem jelit, wymiotami, biegunką, podwyższoną temperaturą ciała, kończącą się niejednokrotnie śmiercią zwierzęcia. Zakażeniu ulegają psy w każdym wieku, niezależnie od rasy i płci. Najbardziej wrażliwe na chorobę są szczenięta między szóstym tygodniem a szóstym miesiącem życia, zwłaszcza takich ras, jak: rottweiler, doberman, labrador, owczarek niemiecki oraz american staffordshire. Parwowiroza uznawana jest za najczęściej występującą chorobę zakaźną psów na świecie i główną przyczynę padnięć szczeniąt przed szóstym miesiącem życia (1, 3, 9).

Czynnikiem etiologicznym choroby jest parwowirus psi (canine parvovirus type 2, CPV-2). Patogen ten, blisko spokrewniony z wirusem panleukopenii kotów (FPV), wirusem zapalenia jelit nerek (MEV) i parwowirusem szopów BFPV, należy do rodzaju *Parvovirus*, podrodziny *Parvovirinae* i rodziny *Parvoviridae*. Namnaża się

w hodowlach komórek nerki psa i kota, płuc kota i nerek, ślinianek szopa, a także śledziony płodu bydła (12, 14).

CPV-2 został po raz pierwszy zidentyfikowany w 1978 r. Od tego czasu do bezpośredniej detekcji samego patogenu, jego białek czy kwasu nukleinowego (2) w kale zwierząt chorych bądź w tkankach zwierząt padłych (13), oraz do pośredniej detekcji swoistych dla niego przeciwciał w surowicy używano wielu testów laboratoryjnych. Wśród nich wyróżnić należy takie techniki, jak: mikroskopia elektronowa (EM), izolacja wirusa (VI), aglutynacja lateksowa (LA), hemaglutynacja (HA) czy test ELISA (2, 7, 8, 13).

W diagnostyce laboratoryjnej choroby coraz częściej stosuje się reakcję PCR, a ostatnio także Real-Time PCR (PCR w czasie rzeczywistym). Techniki te cechuje wysoka czułość (większa niż np. ELISA) oraz stosunkowo szybkie uzyskanie wyników badania (w przeciwieństwie do EM i VI), co w praktyce klinicznej ma istotne znaczenie (4-7).

Celem badań było porównanie standardowej techniki PCR oraz Real-Time PCR HRM z użyciem barwnika Sybr-Green w rozpoznawaniu zakażeń parwowirusowych u psów.

Materiał i metody

Materiał. Badania przeprowadzono na kale pobranym od 22 psów (14 samców, 8 samic w wieku 2-14 miesięcy), pacjentów Kliniki Chorób Zakaźnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Lublinie, podejrzanych o zakażenie parwowirusem psów. Zwierzęta nie były szczepione przeciwko parwowirusowi, natomiast do Kliniki zostały zgłoszone z objawami biegunki, wymiotów i silnego stopnia odwodnienia. Badaniem hematologicznym (Exigo, Boule, Szwecja), u wszystkich osobników wykazano leukopenię.

Izolacja wirusowego DNA. Kał od osobników podejrzanych o parwowirusę pobierano za pomocą sterylnych wymazówek, które następnie zalewno płynem fizjologicznym. Całkowite DNA izolowano za pomocą zestawu QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Niemcy), według procedury podanej przez producenta. Przy pomocy tego samego zestawu izolowano całkowite DNA z kału zdrowego psa (kontrola ujemna) oraz z inaktywowanej szczepionki skojarzonej przeciwko parwowirusowi, nosówce oraz chorobie Rubartha (kontrola dodatnia) – Nobivac DHP (Intervet). Uzyskane DNA przeznaczone do dalszych analiz przechowywano w temperaturze -70°C .

Warunki standardowej reakcji PCR. Reakcję PCR przeprowadzano w termocyklerze firmy Biometria (Biometra, Göttingen, Niemcy) z zastosowaniem pary starterów: P1: 5'-CTACTCAGCCACCACTAAAG-3', P2: 5'-ATTTTCTAGGTGTAGTTGAGA-3', komplementarnych do odpowiednich sekwencji genu VP2, pozwalających na amplifikację jego odcinka o długości 1278 pz (15). Reakcja PCR obejmowała 30 następujących po sobie cykli, z których każdy składał się z trzech etapów: denaturacji nici DNA (94°C przez 60 s), przyłączenia starterów (58°C przez 60 s) oraz wydłużania nici (72°C przez 60 s). Badanie przeprowadzono z zastosowaniem kontroli dodatniej i ujemnej. Kontrolę dodatnią stanowił materiał genetyczny CPV izolowany ze szczepionki, zaś kontrolę ujemną całkowite DNA izolowane z kału psa zdrowego.

Analiza jakościowa amplifikowanego DNA. Uzyskane produkty reakcji PCR były analizowane metodą elektroforezy w 1% żelu agarozowym, w buforze TBE przy 10 V/cm przez 50 minut. Wielkość produktów amplifikacji określano w odniesieniu do wzorca masowego DNA ladder 100 bp (Gibco BRL).

Reakcja Real-Time PCR. Reakcję tę dla wszystkich próbek wyizolowanego DNA przeprowadzono przy użyciu aparatu Corbett. W reakcji wykorzystano parę starterów P1 i P2 identycznych jak w przypadku konwencjonalnej metody PCR. Łańcuchową reakcję polimerazy w czasie rzeczywistym z barwnikiem SYBR Green 1 prowadzono w cienkościennych probówkach o pojemności 100 μl . W metodzie zastosowano zestaw DyNAmo HS SYBR Green qPCR Kit (Finnzymes) umożliwiającą przeprowadzenie wysoko specyficznej reakcji.

W skład mieszaniny reakcyjnej o objętości 20 μl wchodziły następujące składniki: 2 μl matrycy DNA, 7,2 μl wody, 0,4 μl każdego ze starterów P1 i P2 (końcowa koncentracja 50 pM), 10 μl Master Mix zawierającego wersję hot start zmodyfikowanej polimerazy Tbr (*Thermus brockianus*), bufor dla polimerazy Tbr, dNTP, MgCl_2 oraz interkalujący barwnik SYBR Green 1.

Zoptymalizowana reakcja Real-Time PCR obejmowała 60 następujących po sobie cykli, z których każdy składał się z trzech etapów: denaturacji nici DNA (93°C , 60 s), hybrydy-

zacji starterów (58°C , 50 s) oraz wydłużania komplementarnych nici (72°C , 60 s).

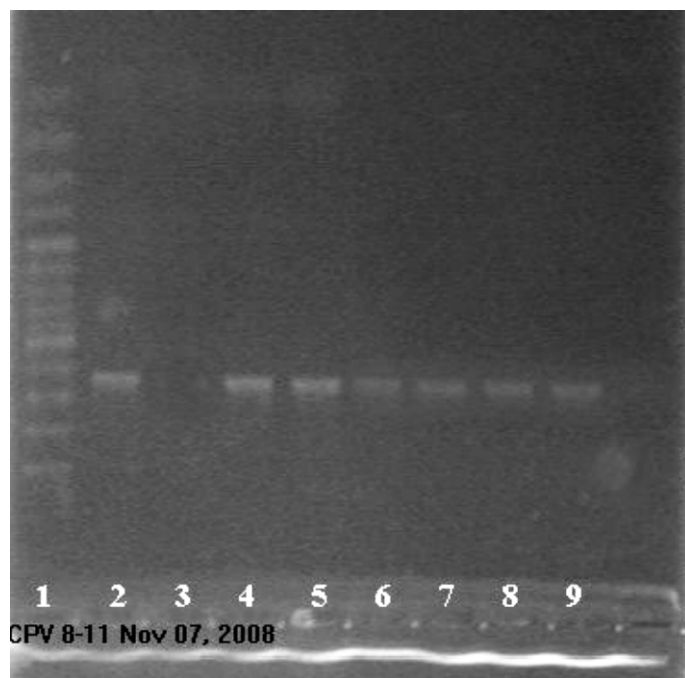
Pomiar fluorescencji mieszaniny reakcyjnej oraz określenie wartości wskaźnika Ct (ilość cykli amplifikacji, po których natężenie fluorescencji powstającego produktu przewyższy fluorescencje tła) wykonywano w czasie rzeczywistym na etapie wydłużania nici komplementarnych do matrycy DNA. W celu potwierdzenia swoistości amplifikacji określano temperaturę topnienia (HRM) produktów PCR przez stopniowe podnoszenie temperatury mieszaniny reakcyjnej z 50°C do 95°C przy ciągłym pomiarze natężenia fluorescencji. Dodatkowo, po zakończeniu amplifikacji wszystkie produkty reakcji Real-Time PCR analizowano metodą elektroforetyczną w 1% żelu agarozowym.

Sekwencjonowanie. Celem ostatecznej identyfikacji produktów amplifikacji uzyskanych w obu badaniach molekularnych osiem losowo wybranych produktów PCR poddano oczyszczaniu (QIAquick PCR Purification Kit QIAGEN), sekwencjonowaniu, a następnie porównaniu z analogiczną sekwencją genu VP2 CPV 2b, umieszczoną w bazie danych GenBank pod numerem FJ 222823. Sekwencjonowanie wykonywano w Serwisie Sekwencjonowania i Syntezy DNA Instytutu Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Wyniki sekwencjonowania odbierano poprzez pocztę elektroniczną, po czym opracowywano za pomocą programu komputerowego Lasergene DNA Star.

Wyniki i omówienie

Wyniki standardowej reakcji PCR oraz Real-Time PCR. W standardowej reakcji PCR wykorzystującej startery P1 i P2 ograniczające odcinek genu VP2, we wszystkich badanych 22 próbkach kału pobranych od chorych osobników wykazano materiał genetyczny CPV (ryc. 1). Wielkość uzyskanych produktów amplifikacji wynosiła około 1200 pz.

Reakcję PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzono dla wszystkich próbek poddanych uprzednio konwen-



Ryc. 1. Elektroforeza w żelu agarozowym produktów amplifikacji CPV o wielkości około 1200 pz. 1 – marker masowy, 2 – kontrola dodatnia, 3 – kontrola ujemna, 4-9 – produkty amplifikacji CPV

cyjonalnej metodzie PCR. Zarówno profil temperaturowy reakcji, jak i użyte startery były identyczne jak w klasycznej PCR.

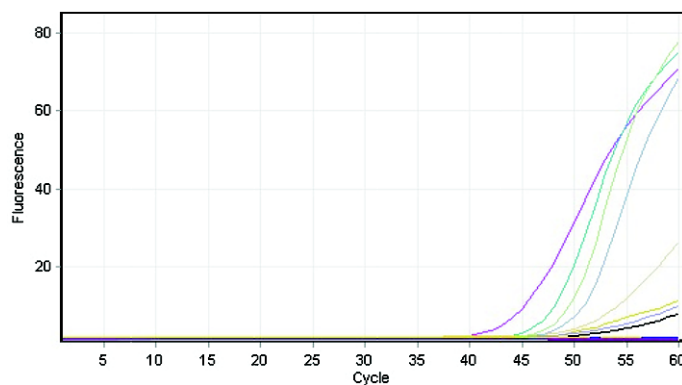
Podobnie jak w metodzie standardowej, techniką Real-Time HRM PCR z zastosowaniem barwnika SYBR Green I, DNA parwowirusa psów wykryto we wszystkich badanych próbkach. W odróżnieniu od klasycznej łańcuchowej reakcji polimerazy, uzyskanie dodatnich wyników w PCR w czasie rzeczywistym wymagało zwiększenia liczby cykli reakcji z 30 do 60. Wartości Ct wahały się w granicach 43-53 (ryc. 2). Analiza krzywej topnienia amplikonów wykazała, iż temperatura topnienia (T_m) uzyskanych produktów wirusa mieści się w przedziale od 80,5°C do 85°C (ryc. 3).

Obecność wszystkich produktów reakcji Real-Time PCR została dodatkowo potwierdzona metodą elektroforezy w żelu agarozowym. Także w tym przypadku wielkość produktów odnoszonych do wzorca masowego szacowano na około 1200 pz.

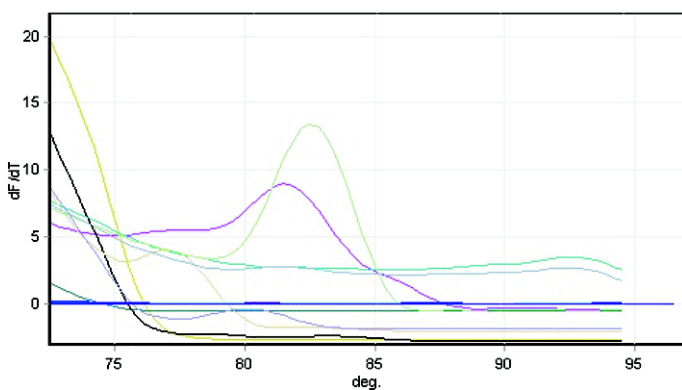
Sekwencjonowanie. Czytelne sekwencje odcinka genu VP2 parwowirusa psów uzyskano dla ośmiu losowo wybranych produktów reakcji PCR. Ich analiza wykazała, iż do matrycy-produktu reakcji amplifikacji hybrydował jedynie jeden z użytych w badaniach własnych starterów (forward-P1), podczas gdy P2, mimo że wykazywał komplementarność sekwencji nukleotydu, nie ulegał wiązaniu z amplikonem. Efektem tego było uzyskanie sekwencji pochodzących jedynie od jednego startera. Zsekwencjonowane fragmenty o długości 1190 pz wykazywały wzajemnie wysoką homologię, jak i wysokiego stopnia podobieństwo z wzorcową sekwencją genu VP2 CPV 2b pochodzącą z internetowej bazy danych GenBank: FJ 222823 rzędu 99,2-100%.

W przeprowadzonych badaniach porównano przydatność dwóch metod molekularnych, PCR oraz Real-Time PCR, do diagnostyki klinicznych przypadków parwowirusy. Zarówno w przypadku konwencjonalnej metody, jak i PCR w czasie rzeczywistym dla wszystkich badanych 22 próbek kału uzyskano wyniki dodatnie. Świadczy to o wysokiej i porównywalnej czułości tych metod. Na odpowiednią czułość i swoistość PCR wpływa prawidłowy wybór sekwencji wyjściowej, stanowiącej matrycę do namazania kwasu nukleinowego. Nawet pojedyncza mutacja punktowa w amplifikowanym DNA, szczególnie w okolicy 3' pozycji startera, może być przyczyną fałszywie ujemnych wyników reakcji. Obecność zmiennych regionów w matrycy można wykazać drogą sekwencjonowania (10). Dlatego też, w celu dokładniejszej analizy wyników otrzymanych w reakcji PCR, uzyskane amplikony poddano oczyszczaniu i sekwencjonowaniu. Osiem wybranych losowo i zsekwencjonowanych amplikonów wykazywało podobieństwo rzędu 99,2-100% zarówno wzajemnych sekwencji, jak i z sekwencją FJ 222823, należąca do szczepu CPV 2b oraz z wirusem szczepionkowym (Nobivac) użytym jako kontrola dodatnia. Powyższe wyniki badań własnych wskazują na swoistość PCR oraz Real-Time PCR.

W wyniku reakcji PCR oraz sekwencjonowania uzyskano fragmenty specyficzne, o wielkości zbliżonej, jednak nie identycznej, do odcinków otrzymanych przez Salwę i Kopczewskiego (15), na publikacji których się



Ryc. 2. Wartości Ct dla produktów Real-Time PCR genu VP2 CPV



Ryc. 3. Analiza krzywej topnienia amplikonów, CPV uzyskanych w reakcji Real-Time PCR. Temperatura topnienia (T_m) uzyskanych produktów wirusa mieści się w przedziale od 80,5°C do 85°C

wzorowano. Analizując uzyskane sekwencje izolatów własnych można wywnioskować, iż starter P1 (forward) przyłączał się do odpowiadającego mu komplementarnego fragmentu matrycy, natomiast P2 (reverse) ze względu na brak hybrydyzacji do sekwencji docelowej uniemożliwił polimerazie dobudowywanie nukleotydów w przeciwnym kierunku. W wyniku tego pozostawały one fragmentami jednoniciowymi, dominującymi produktami reakcji. Ponieważ teoretycznie amplifikowana była tylko ta nić DNA, do której hybrydował P1, mogło to być przyczyną wolniejszej amplifikacji i późniejszego osiągnięcia przez emitowaną fluorescencję poziomu progowego. Z tego powodu uzyskany w przypadku Real-Time PCR wskaźnik Ct mógł mieć tak wysoką wartość. Udowodniono, iż przy wykorzystaniu pojedynczego startera w metodzie cyklicznego sekwencjonowania, bardzo podobnej do konwencjonalnej PCR, ilość produktu przyrasta w trakcie reakcji liniowo, a nie wykładniczo (16). Przyczyną uzyskania wartości progowej po tak dużej liczbie cykli mogła być też mała ilość matrycowego DNA oraz jego znaczna długość.

Wzrastający w Real-Time PCR poziom fluorescencji, mimo przeważającej w reakcji liczby produktów jednoniciowych, wskazuje na możliwość wiązania się barwnika SYBR Green I również z ssDNA (jednoniciowym DNA). Fakt ten pokrywa się z wynikami badań uzyskanymi przez Zippera i wsp. (19), którzy poddali szczegółowej analizie ten asymetryczny cyjaninowy barwnik fluo-

rescencyjny. Według tych badaczy, SYBR Green I wiąże się z ssDNA, jednak poziom jego fluorescencji jest przynajmniej 11 razy niższy niż po interkalacji do dsDNA, co wyjaśniałoby dużo większą ilość cykli (60 zamiast 30), konieczną do wykrycia produktów reakcji PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzonej w badaniach własnych. Konieczność przeprowadzenia większej liczby cykli w celu uzyskania produktu w Real-Time PCR wynikała także ze znacznej wielkości (ponad 1000 par zasad) sekwencji docelowej. Temperatura topnienia przekraczająca 80°C, poszczególnych produktów reakcji Real-Time PCR, świadczy o ich swoistości. Amplifikacja, mimo wykorzystania tylko jednego startera, jednoniciowej matrycy oraz znacznej długości produktu, dowodzi niezwykle wysokiej skuteczności zarówno techniki PCR, jak i Real-Time PCR.

Do tej pory mało jest informacji na temat zastosowania nieswoistych metod Real-Time PCR wykorzystujących barwnik SYBR Green I do detekcji CPV-2. Technika ta była wykorzystana m.in. do identyfikacji genu VP2 różnych wariantów parwowirusa świń (18), natomiast badania przeprowadzone przez Manaresi i wsp. (11) dowiodły wysokiej czułości, skuteczności i dużej szybkości tej techniki w zakresie wykrywania ludzkiego parwowirusa B19. Badania Desario i wsp. (7) mające na celu porównanie szeregu metod służących do detekcji CPV i wybór najbardziej odpowiedniego testu diagnostycznego wykazały, że najskuteczniejszą metodą jest PCR w czasie rzeczywistym, który wykazuje najwyższą korelację z tradycyjnym PCR. Zgodność wyników obu badań wynosiła 94,38%. W przypadku innych metod wykrywania CPV, tak czułość, jak i korelacja między nimi były na niższym poziomie. Badania te wykazały również, iż swoiste metody Real-Time PCR są niezwykle specyficzne, czułe, bardziej powtarzalne i mniej czasochłonne niż konwencjonalne PCR, wymagają jednak drogiego sprzętu i odczynników, co czyni je obecnie niedostępnymi dla rutynowej praktyki klinicznej. Wyniki powyższych badaczy wskazują również na fakt, iż sekwencjonowanie jest metodą bardzo przydatną do genotypowania CPV, pod warunkiem, że wykorzystana się do tego celu odpowiedni fragment genu VP2, w którym występują różnice nukleotydowe charakterystyczne dla wariantów 2a, 2b oraz 2c powyższego wirusa. Z obserwacjami tymi pokrywają się dane opublikowane przez Decaro i wsp. (6), którzy wskazali na znacznie wyższą czułość Real-Time PCR aniżeli testu HA oraz tradycyjnej metody PCR w rozpoznawaniu zakażeń parwowirusowych u psów. Technika ta zapewnia dodatkowo powtarzalne wyniki w zakresie 8 rzędów wielkości, od 10² do 10⁹ kopii, oraz pozwala na precyzyjną kalkulację obciążenia badanej próbki DNA CPV.

Wyniki badań własnych nieznacznie odbiegają od danych przedstawionych przez innych autorów. Porównanie konwencjonalnej reakcji PCR oraz Real-Time PCR (metoda SYBR Green I), zastosowanych w badaniach własnych dowodzi, iż obie metody są specyficzne, czułe i powtarzalne, jednak w przypadku amplifikacji tak długich oraz jednoniciowych fragmentów DNA, jakie opisano powyżej, nieco szybsza niż Real-Time PCR (trwa ok. 4,5 h) okazuje się tradycyjna metoda PCR (trwa ok.

3,5 h). W stosunku do innych danych piśmiennictwa, analizowana przez autorów sekwencja DNA jest jednak znacznie dłuższa, dlatego dłuższy musi być też całkowity czas reakcji Real-Time PCR. Aby skrócić czas trwania PCR w czasie rzeczywistym należałoby amplifikować krótsze odcinki DNA (co jest zalecane przez twórców komercyjnych zestawów do Real-Time PCR) oraz stosować dwa komplementarne do matrycy startery. Mimo rozwoju nowoczesnych metod, takich jak np. mikromacierze, oraz początkowych trudności, występujących niekiedy w przypadku PCR w czasie rzeczywistym, dzięki swoim licznym zaletom technika ta znajduje się na dobrej drodze, by być standardową metodą badawczą w wielu laboratoriach diagnostycznych (17), zaś jego odmiana wykorzystująca barwnik SYBR Green I może stać się dużo bardziej użyteczna do wykrywania CPV niż konwencjonalny PCR.

Piśmiennictwo

- Buonavoglia C., Martella V., Pratelli A., Tempesta M., Cavalli A., Buonavoglia D.: Evidence for evolution of canine parvovirus type-2 in Italy. *J. Gen. Virol.* 2001, 82, 3021-3025.
- Cho H.-S., Kang J.-I., Park N.-Y.: Detection of canine parvovirus in fecal samples using loop-mediated isothermal amplification. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2006, 18, 81-84.
- Costa A. P., Leite J. P., Labarthe N. V., Garcia R. C.: Genomic typing of canine parvovirus circulating in the State of Rio de Janeiro, Brazil, from 1995 to 2001 using polymerase chain reaction assay. *Vet. Res. Commun.* 2005, 29, 735-743.
- Decaro N. i wsp.: Molecular epidemiology of canine parvovirus, *Eur. Emerg. Infect. Dis.* 2007, 13, 1222-1223.
- Decaro N., Elia G., Desario C., Roperto S., Martella V., Campolo M., Lorusso E., Cavalli A., Buonavoglia C.: A minor groove binder probe real-time PCR assay for discrimination between type 2-based vaccines and field strains of canine parvovirus. *J. Virol. Methods* 2006, 136, 65-70.
- Decaro N., Elia G., Martella V., Desario C., Campolo M., Trani L. D., 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, 19-28.
- Desario C., Decaro N., Campolo M., Cavalli A., Cirone F., Elia G., Martella V., Lorusso E., Camero M., Buonavoglia C.: Canine parvovirus infection: which diagnostic test for virus? *J. Virol. Methods* 2005, 126, 179-185.
- Drane D. P., Hamilton R. C., Cox J. C.: Evaluation of a novel diagnostic test for canine parvovirus. *Vet. Microbiol.* 1994, 41, 293-302.
- Hueffer K., Parrish C. R.: Parvovirus host range, cell tropism and evolution. *Current Opinion Microbiol.* 2003, 6, 392-398.
- Kamińska A., Dąbrowska J.: Fałszywie dodatnie i fałszywie ujemne wyniki reakcji opartych na amplifikacji kwasów nukleinowych w diagnostyce zakażeń. Przyczyny i implikacje diagnostyczne. *Przegl. Epidemiol.* 2004, 58, 343-349.
- Manaresi E., Gallinella G., Zuffi E., Bonvicini F., Zerbinì M., Musiani M.: Diagnosis and quantitative evaluation of parvovirus B19 infections by real-time PCR in the clinical laboratory. *J. Med. Virol.* 2002, 67, 275-281.
- Mizak B., Borowski A.: Zastosowanie testu PLA do oceny namnażania wirusa nosówki, adenowirusa typu 1 oraz parwowirusa psów w hodowlach komórkowych. *Medycyna Wet.* 1998, 54, 753-756.
- Mochizuki M., San Gabriel M. C., Nakatani H., Yoshida M.: Comparison of polymerase chain reaction with virus isolation and haemagglutination assays for the detection of canine parvoviruses in faecal samples. *Res. Vet. Sci.* 1993, 55, 60-63.
- Ozkul A., Keles I., Karaoglu T., Cabalar M., Burgu I.: Detection and RFLP analysis of canine parvovirus (CPV) DNA by polymerase chain reaction (PCR) in a dog. *Turkish J. Vet. Anim. Sci.* 2002, 26, 1201-1203.
- Salwa A., Kopczeński A., Wolańczyk-Rutkowiak K.: Badania serologiczne i molekularne psów uodpornionych przeciw parwowirusowi. *Medycyna Wet.* 2006, 62, 1261-1264.
- Slomski R.: Przykłady analiz DNA. *Wyd. AR, Poznań* 2004, 13-18.
- Stadejek T.: Postęp w rozwoju techniki cyklicznej polimeryzacji DNA in vitro – Real-Time PCR. *Medycyna Wet.* 2006, 62, 390-394.
- Wilhelm S., Zimmermann P., Selbitz H. J., Truyen U.: Real-time PCR protocol for the detection of porcine parvovirus in field samples. *J. Virol. Methods* 2006, 134, 257-260.
- Zipper H., Brunner H., Bernhagen J., Vitzthum F.: Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res.* 2004, 32, 1-10.

Adres autora: dr Łukasz Adaszek, ul. Głębocka 30, 20-612 Lublin; e-mail: ukaszek0@wp.pl