

# Techniki molekularne w rozpoznawaniu parwowirozy psów

**Łukasz Adaszek, Dagmara Twaróg, Stanisław Winiarczyk**

z Katedry Epizootologii i Kliniki Chorób Zakaźnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej w Lublinie

Parwowiroza psów jest ostrą, zaraźliwą chorobą wirusową przebiegającą z zapaleniem jelit, objawiającą się wymiotami, biegunką, podwyższoną temperaturą ciała, nierzadko prowadzącą do śmierci zwierzęcia. Zakażeniu ulegają psy w każdym wieku, niezależnie od rasy i płci (1). Na zakażenie najbardziej są wrażliwe szczenięta między szóstym tygodniem a szóstym miesiącem życia zwłaszcza, takich ras, jak: rottweiler, doberman, labrador, owczarek niemiecki oraz american staffordshire (2). Parwowiroza jest uznawana za najczęściej występującą chorobę zakaźną psów na całym świecie i główną przyczynę padnięć szceniąt przed szóstym miesiącem życia (1).

Kliniczna diagnoza parwowirozy psów jest trudna. Główne objawy choroby (wymioty i biegunka) stwierdza się w przebiegu wielu innych chorób zarówno o podłożu zakaźnym, jak niezakaźnym (3, 4, 5). Idealnym byłoby gdyby podejrzenie parwowirozy było zawsze potwierdzone testami laboratoryjnymi (3).

Parwovirus psów – CPV-2 (canine parvovirus type 2) został po raz pierwszy zidentyfikowany w 1978 r. Od tego czasu, do bezpośredniego wykrywania wirusa bądź jego białek czy kwasu nukleinowego (5) w kale zwierząt chorych lub w tkankach zwierząt padłych, albo wykazywania swoistych dla niego przeciwciał w surowicy

## Molecular techniques – diagnostic tools for canine parvoviral infections

Adaszek Ł., Twaróg D., Winiarczyk S., Department of Epizootiology and Clinic of Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin

Canine parvovirus type 2 (CPV2), is an etiological agent of severe enteritis in dogs, particularly puppies. Clinical signs include vomiting and diarrhea, often with blood, high fever, dehydration and leukopenia. Mortality rate is high in young puppies, but vaccines are available to prevent parvovirus. The disease is usually diagnosed basing on the clinical signs. The aim of this article was to present molecular biology methods useful in laboratory diagnostics of parvovirus. Real-time PCR, PCR and sequencing are very specific and they enable to follow changes in field strains of canine parvovirus type 2 that may help to improve the efficacy of vaccines.

**Keywords:** canine parvovirus, real time PCR, PCR, sequencing.

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 (3, 4, 5, 6).

Mikroskopia elektronowa oraz izolacja wirusa są metodami czasochłonnymi i zbyt drogimi w rutynowym użyciu w warunkach klinicznych (4). Mikroskopia elektronowa wymaga długiego okresu inkubacji (5–10 dni) oraz dodatkowego potwierdzenia testami immunofluorescencji lub hemaglutynacji. Z kolei metoda izolacji CPV-2 jest mało czuła, a dodatkowo do jej przeprowadzenia wymagany jest wykwalifikowany personel oraz posiadanie odpowiednich hodowli komórkowych, z których wirus po namnożeniu jest izolowany (3). Z kolei aglutynacja lateksowa jest badaniem szybkim, lecz mniej swoistym. Hemaglutynacja natomiast traci na wiarygodności bez potwierdzającego testu inhibicyjnego (4) oraz wymaga nieprzerwanego dostarczania świeżych erytrocytów do badanego układu (5). Do najczęściej stosowanych metod szybkiej diagnozy CPV-2 w próbkach kału należy test ELISA (4), jednak czułość tej techniki może być niższa w porównaniu do mikroskopii elektronowej (5).

Mizak i Borowski (7), porównywali takie metody wykrywania CPV-2, jak ocena efektu cytopatycznego (CPE) w hodowlach komórkowych oraz test PLA, polegający na wiązaniu się swoistych przeciwciał z antygenami wirusa. Wyniki ich obserwacji wskazują, iż test PLA ma 4–5-krotnie wyższą czułość niż odczyt CPE, przy którym interpretacja wyników jest bardzo subiektywna. Ponadto PLA, dzięki znacznej powtarzalności uzyskiwanych wyników i możliwości skrócenia czasu badania, znajduje zastosowanie w badaniach diagnostycznych zakażeń parwowirusowych psów.

Ostatnio w diagnostyce laboratoryjnej coraz częściej stosuje się reakcję PCR (polymerase chain reaction – łańcuchowa reakcja polimerazy; 5, 6). Technika ta polega na wykorzystaniu starterów (krótkich odcinków oligonukleotydów) oraz specjalnych enzymów do powielania poszukiwanego fragmentu kwasu nukleinowego. Startery przyłączają się komplementarnych sekwencji jednoniciowych odcinków DNA (poddanych wcześniej rozpleceniu) i tworzą „ramy”, w obrębie, których termostabilny enzym (polimeraza DNA) dobudowuje komplementarną do wyjściowej matrycy nić – jest to jeden cykl reakcji. Powtarzające się cykle łańcuchowej reakcji polimerazy (na ogół około 30) prowadzą do eksponentyjalnego wzrostu ilości produktu PCR (8).

W przebiegu PCR można wyróżnić kilka etapów. W fazie wstępnej amplifikacji

powielanie produktu jest powolne. Wynika to z długiego czasu potrzebnego starterom na odszukanie komplementarnych sekwencji w obrębie matrycy (9). W kolejno następującej fazie logarytmicznej (log-linear phase) w warunkach idealnych dochodzi do podwojenia liczby kopii DNA w czasie każdego cyklu reakcji. Kiedy niedobór polimerazy, starterów oraz nagromadzone produkty wpływają na coraz mniejszą efektywność amplifikacji, reakcja wchodzi w fazę przejściową (transition phase), a następnie osiąga fazę plateau (plateau phase), gdzie obserwuje się dalsze spowolnienie jej tempa aż do całkowitego zahamowania powielania DNA.

Badania Mochizuki (6) dowodzą, iż PCR jest metodą czulszą niż izolacja CPV-2 oraz hemaglutynacja i może być stosowana w celu wykazania obecności wirusa w próbkach kału. Ponadto jest to technika szybka, swoista i może być stosowana nawet w przypadku próbek zawierających zainaktywowany wirus. Jednak PCR ma też swoje wady, gdyż może dawać fałszywie negatywne wyniki spowodowane obecnością w próbkach inhibitorów polimerazy.

Według Ho-Seong Cho i wsp. (5) PCR jest czuła, szybka i swoistą metodą badawczą, która wymaga jednak specjalistycznego sprzętu, rzadko występującego w klinikach weterynaryjnych. Jako alternatywę dla tej techniki autorzy proponują metodę LAMP, która jest wysoce selektywna, czuła, krótsza czasowo niż PCR (trwa około godziny), a jej produkty widoczne są „gołym okiem”. Ponadto nie wymaga ona posiadania termocyklera, dlatego wydaje się bardziej użyteczna dla klinik weterynaryjnych niż PCR.

Z doniesień Senda (10) wynika, iż PCR może być wykorzystane również do badania zanieczyszczenia szczepionek dzikimi szczepami CPV-2 (10).

W przypadku wirusów metoda PCR nie dostarcza jednak informacji o ich zakaźności. W dodatku wynik niedostatecznie zoptymalizowanego PCR może być obciążony dużym błędem, który wynika z powielenia nieswoistego fragmentu DNA o wielkości identycznej lub zbliżonej do produktu swoistego (11).

Konwencjonalne PCR jest metodą jakościową. Analiza potencjalnych produktów reakcji ma miejsce po jej zakończeniu, a zatem w fazie plateau. Natomiast efektywna amplifikacja DNA następuje tylko do momentu uzyskania określonej ilości amplikonów w fazie logarytmicznej. Dlatego też w fazie plateau nie jest zachowana proporcjonalna zależność między początkową zawartością matrycowego DNA a ilością uzyskanego produktu. W wyniku powielenia matrycy zawierających różne początkowe stężenia sekwencji docelowej

otrzymujemy zbliżoną ilość amplikonów. Z informacji tych jasno wynika, iż nie jest możliwe przeprowadzenie wiarygodnych obliczeń dotyczących początkowych ilości DNA matrycowego poprzez ocenę ilościową produktów na tym etapie reakcji (12).

Kolejną niedogodnością PCR jest właśnie potrzeba oddzielnej analizy uzyskanych amplikonów po zakończeniu reakcji, w celu potwierdzenia oczekiwanych wyników (13). Detekcja potencjalnie zamplifikowanego DNA może być przeprowadzona dzięki rozdzielaniu elektroforetycznemu na żelu agarozowym, wybarwieniu, np. bromkiem etydy, i wizualizacji promieniami UV. Oprócz żeli agarozowych stosowane być mogą żele poliakrylamidowe. Żele agarozowe zapewniają szybszą analizę, jednak ocena wielkości produktu jest mniej dokładna. Żele poliakrylamidowe z kolei wymagają więcej czasu na ich przygotowanie i analizę, lecz są tańsze i cechują się wyższą rozdzielczością (14).

Możliwa jest też analiza densytometryczna lub badanie amplikonów za pomocą metody Southern blot, która jest jednak czasochłonna i składa się z kilku etapów, podczas których może dojść do zanieczyszczenia laboratorium produktami reakcji. Innym rozwiązaniem jest zastosowanie metody PCR-ELISA z wykorzystaniem znakowanych biotyną lub digoksygeniną starterów, sond lub bezpośrednią inkorporacją digoksygeniny do powstających amplikonów (15). Dwie ostatnie metody mogą jednocześnie stanowić element weryfikujący swoistość produktu PCR (11).

Kluczową rolę w PCR odgrywają enzymy syntetyzujące DNA. Najczęściej używaną polimerazą jest termostabilna polimeraza *Taq* pochodząca z bakterii *Thermus aquaticus*, która nie posiada jednak zdolności sprawdzania powielanych fragmentów DNA (proof reading), co skutkuje znacznym poziomem błędnie wstawianych przez nią nukleotydów. Dokładność polimerazy nie jest tak istotna w analizie wielkości produktu PCR, ma natomiast duże znaczenie w badaniach obejmujących detekcję polimorfizmów i mutacji punktowych (14). Z tego względu w powyższych analizach powinno się redukować ten problem dzięki zastosowaniu alternatywnych, termostabilnych polimeraz DNA posiadających aktywność egzonukleazy w kierunku 3' – 5', jak np. polimeraza *Pfu* pochodząca z *Pyrococcus furiosus*.

Ważnym zagadnieniem w optymalizacji PCR jest zapobieganie powstawaniu nieswoistych produktów reakcji. Do tego zjawiska może prowadzić zarówno nadmiar polimerazy DNA, jak i użytych starterów oraz źle dobrana temperatura topnienia lub sekwencja starterów (14).

Z kolei brak produktu może wynikać z użycia niedostatecznej ilości polimerazy DNA, źle dobranych starterów czy rozkładu innych ważnych składników reakcji będących substratami, dla polimerazy, jak np. deoksynukleozydotrifosforanów (dNTP), które są najbardziej wrażliwymi odczynnikami używanymi w tej metodzie (14).

Bardzo ważny dla przebiegu reakcji jest też odpowiedni bufor, zapewniający optymalne warunki dla działania polimerazy oraz zawierający  $MgCl_2$ . Jony magnezu wiązane są w trakcie reakcji przez polimerazę DNA, startery, matrycę, a także dNTP, dlatego bardzo istotne jest ustalenie ich odpowiedniego stężenia (14).

Ze względu na wiele czynności wykonywanych manualnie w tradycyjnym PCR oraz mnogość czynników, od których zależy powodzenie doświadczenia, optymalizacja tego procesu może okazać się żmudna i długotrwała (16).

Natomiast reakcja PCR z analizą przyrostu ilości produktu w czasie rzeczywistym, tzw. real-time PCR (ilościowe real-time PCR – Quantitative PCR-QPCR), jest wolna od większości tych wad. Jest to technika jakościowo-ilościowa o dużym zakresie czułości. Umożliwia ona fluorescencyjne wykrywanie produktów już w czasie przebiegu reakcji, co predysponuje stosowanie real-time PCR na większą niż dotychczas skalę (11).

Detekcja w przypadku tej metody przebiega w czasie rzeczywistym i polega na pomiarze poziomu fluorescencji emitowanej przez barwniki interkalujące<sup>1</sup> do DNA lub sondy molekularne. Im wyższe jest stężenie ampliconów, tym wyższy poziom fluorescencji. W początkowych cyklach, ze względu na powolną amplifikację DNA, obserwujemy niski poziom emisji fluorescencji, rejestrowany jako tło (background). W późniejszych etapach wzrost stężenia ampliconów powoduje wzrost poziomu fluorescencji, aż w końcu przekracza on poziom tła, czyli osiąga wartość progową (Ft – fluorescence threshold). Cykl, w którym to zjawisko następuje, nazywamy cyklem progowym (Ct – threshold cycle). Od tego cyklu rozpoczyna się faza logarytmiczna amplifikacji. Im więcej kopii powielanej sekwencji docelowej znajduje się w badanym materiale, tym mniej cykli potrzeba, aby fluorescencja osiągnęła wartość progową (9).

W przeciwieństwie do konwencjonalnej PCR, w przypadku real-time PCR pomiar ilości ampliconów jest przeprowadzany podczas fazy eksponentialnej (logarytmicznej), w której warunki reakcji są optymalne i obserwowana jest najefektywniejsza amplifikacja. Dzięki temu QPCR umożliwia dokładną ocenę ilości

początkowej sekwencji docelowej w badanej próbce (15).

Tak, więc stosując QPCR, można określić np. bezwzględną liczbę drobnoustrojów w badanym materiale. Aby tego dokonać należy porównać wartości Ct uzyskane w przypadku badanej próbki z krzywą wzorcową, skonstruowaną w trakcie tego samego eksperymentu na podstawie wartości Ct uzyskanych dla serii prób, zawierających różne, znane ilości kopii badanej matrycy. Możliwe jest również porównanie liczby drobnoustrojów obecnej w badanej próbce do ich liczby w materiale pochodzącym z innego narządu wewnętrznego lub w próbkach pobranych w różnym czasie po zakażeniu (11).

Usunięcie odrębnego procesu detekcji ampliconów po zakończeniu reakcji (post-PCR detection) czyni z QPCR system zamknięty (homogeniczny – *closed system*), co zmniejsza ryzyko zanieczyszczenia w porównaniu z konwencjonalnym PCR. Jednoetapowość przeprowadzania reakcji, wraz z użyciem znaczników fluorescencyjnych i czułych metod wykrywania ich emisji (wcześniejsze wykrycie produktu), pozwala również na zwiększenie szybkości real-time PCR. Pewną rolę w zapewnieniu krótszego czasu trwania tej reakcji mogą odgrywać również mniejsze rozmiary ampliconów rekomendowane przez twórców komercyjnych systemów do przeprowadzania QPCR, jakkolwiek udowodniono, iż zmniejszone rozmiary produktu nie zawsze prowadzą do zwiększenia wydajności tej techniki (15).

QPCR stanowi nowe spojrzenie na kinetykę reakcji PCR oraz rolę, jaką odgrywają niektóre związki chemiczne w hamowaniu reakcji amplifikacji (17). Wysoka czułość tej metody pozwala na użycie znacznie mniejszych początkowych ilości sekwencji matrycowej niż wymagają tego inne stosowane powszechnie techniki (17). Dlatego metoda ta zastępuje często inne „narzędzia molekularne”, jak sekwencjonowanie czy analizę polimorfizmu fragmentów restrykcyjnych – RFLP. Obok diagnostyki parwowirusy psów stosuje się ją, m.in. w rozpoznawaniu wścieklizny, gruźlicy czy wykrywania oporności na antybiotyki *Staphylococcus aureus* (18).

Metody real-time PCR dzielimy na nieswoiste (niezależne od sekwencji matrycy) oraz zależne od sekwencji matrycy techniki swoiste. W obu grupach używa się barwników fluorescencyjnych, związanych ze starterami lub/i sondami (metody swoiste) lub obecnych w roztworze, w którym zachodzi PCR (metody nieswoiste; 18, 19). Do nieswoistych metod wykrywania produktów real-time PCR należą

techniki wykorzystujące barwnik SYBR Green I, przy których nie trzeba dysponować specjalnymi starterami ani sondami DNA (18). Dlatego też metoda ta nie wymaga tak specjalistycznej wiedzy, jak w wypadku technik swoistych, potrzebnej do ich zaprojektowania. Ponadto na jej wynik nie wpływa w stopniu tak dużym, jak w przypadku technik zależnych od matrycy, możliwość wystąpienia różnic w sekwencji wyjściowej, które mogą uniemożliwić hybrydyzację sond (15). SYBR Green I, obecny w mieszaninie reakcyjnej, w każdym cyklu QPCR po etapie wydłużania interkaluje do powstałego dwuniciowego produktu PCR (9) i wzbudzony emituje światło o długości 520 nm. Wzrost fluorescencji jest proporcjonalny do ilości otrzymanego w reakcji DNA. Zaletami tej metody są: stosunkowo niewielki koszt oraz uniwersalność, jednak istnieje też niebezpieczeństwo uzyskania fałszywie pozytywnych lub zawyżonych wyników (14). Aby zweryfikować wyniki, przeprowadza się analizę krzywej topnienia produktów powstałych w reakcji. Temperatura topnienia ( $T_m$ ) specyficznego dla danej reakcji ampliconu jest zwykle wyższa niż  $T_m$  dimerów starterów, do których może wiązać się SYBR Green I (9). Techniki real-time PCR, mimo szeregu zalet, posiadają również pewne ograniczenia w porównaniu do konwencjonalnego PCR. Należą do nich niekompatybilność oprogramowań z niektórymi fluoroforami oraz względne ograniczenie zdolności multipleksowych używanych obecnie systemów. Ponieważ większość popularnych systemów QPCR opiera się na hybrydyzacji sond do komplementarnej sekwencji jednej z nici ampliconu, użycie większej liczby starterów stwarza korzystniejsze warunki dla wytworzenia zwiększonego sygnału fluorescencyjnego. Kolejnym ograniczeniem, mogącym mieć duże znaczenie w laboratoriach o małej przepustowości, jest duży, początkowy koszt tej metody (13, 15).

W przypadku techniki wykorzystującej SYBR Green I, ze względu na możliwość wiązania się powyższego barwnika z jakimkolwiek dsDNA, technologii tej nie powinno się stosować do analizy dsDNA w tkance, gdyż występujący tu nadmiar genomowego DNA fałszuje sygnał emitowany przez produkt reakcji wysokim sygnałem tła (17).

Ograniczeniami wspólnymi zarówno dla PCR, jak i QPCR jest konieczność posiadania wcześniejszej wiedzy o sekwencji matrycy, aby móc zaprojektować odpowiednie startery (13) oraz możliwość hamowania reakcji przez niektóre substancje (12), np. SDS, EDTA, DMSO czy

<sup>1</sup> Interkalacja nazywane jest zjawisko tworzenia się stabilnych kompleksów pomiędzy DNA a płaskimi ligandami, które dzięki swej konformacji mają zdolność wsunienia się pomiędzy sąsiadujące ze sobą pary zasad nukleinowych w DNA (przyp. red.)

heparynę, co może dawać wyniki fałszywie ujemne (14). Ponadto, w obu tych reakcjach, im większy odcinek DNA amplifikujemy, tym trudniej uzyskać prawidłowy produkt reakcji.

Tak jak w konwencjonalnym PCR, również w QPCR istnieje potrzeba optymalizowania reakcji przez właściwie dobraną koncentrację magnezu, starterów, sond oraz stosowanie odpowiedniej polimerazy, najlepiej zmodyfikowanej polimerazy *hot start*, która obniża ryzyko generowania produktów nieswoistych, ponieważ jest nieaktywna w temperaturze pokojowej. Jednak w przypadku QPCR, dzięki jego większemu zautomatyzowaniu i zazwyczaj krótszemu czasowi trwania, optymalizacja ta jest mniej czasochłonna (16).

Inną, obecnie najczęściej używaną w celu identyfikacji szczepów parwowirusów molekularną techniką, jest sekwencjonowanie. Powstanie tej szybkiej i skutecznej metody analizy DNA, połączonej z PCR, było odpowiedzią na wzrastające potrzeby tworzenia genomowych bibliotek oraz klonowania fragmentów DNA. Ciągłe jest to jeszcze technika zbyt kosztowna dla przeciętnego laboratorium, jednak cały czas prowadzone są badania nad jej udoskonaleniem i obniżeniem generowanych przez nią kosztów (13).

Począwszy od wynalezionej w 1977 r. przez Maxama i Gilberta metody chemicznej oraz opracowanej w tym samym czasie przez Sangera i Coulsona metody enzymatycznej, sekwencjonowanie ciągle ewoluuje. Obecnie stosowana jest głównie metoda enzymatyczna Sangera, a raczej jej modyfikacje. Istnieje kilka wariantów sekwencjonowania. To, który wariant zastosujemy, zależy m.in. od długości sekwencji, którą chcemy przeanalizować. Wybór metody sekwencjonowania zależy też od celu, jaki chcemy osiągnąć (14).

Sekwencjonowanie może być stosowane m.in. do bezpośredniej analizy produktów reakcji PCR, co pozwala na szybkie i niskokładowe badanie DNA. Metoda ta jest też bardzo użyteczna przy oznaczaniu patogenów, wykrywaniu i charakteryzowaniu mutacji czy przeszukiwaniu i charakteryzowaniu bibliotek cDNA (14).

W przypadku sekwencjonowania wadą jest fakt, iż, tak jak przy PCR i QPCR, musimy mieć wcześniejsze informacje o sekwencji docelowej. Zaletą jest międzylaboratoryjna odtwarzalność sekwencjonowania, której poziom jest zadowalający, podobnie jak w PCR i QPCR (13).

Nowoczesne metody molekularne stosowane do detekcji CPV-2, takie jak PCR czy real-time PCR, wymagają drogiego sprzętu, odczynników i wykwalifikowanych użytkowników, dlatego ich zastosowanie jako metod w laboratoriach weterynaryjnych nie jest jeszcze szeroko rozpowszechnione (3). Mimo tego, iż techniki te prawdopodobnie nie zastąpią całkowicie tradycyjnych metod wykrywania zakażeń parwowirusowych czy innych jednostek chorobowych, to bez tych niezmiernie przydatnych „molekularnych narzędzi” nie można już sobie wyobrazić nowoczesnej diagnostyki (20). Potrzebna jest jednak ich standaryzacja oraz przystosowanie do praktyki laboratoryjnej również w przypadku parwowirusy psów (3).

Trzeba też nadmienić, iż zakażenia psów wywołane wirusem CPV-2, pomimo stosowania już od dłuższego czasu szczepień profilaktycznych, stanowią nadal realne zagrożenie dla zdrowia tych zwierząt (7)

Wiele dowodów wskazuje też na to, iż CPV-2 ciągle ewoluje i zmienia swój profil antygenowy, co dyktuje nieprzemijającą potrzebę stosowania badań diagnostycznych wykrywających tego wirusa (7).

## Piśmiennictwo

1. Frymus T: Parwowiroza. W: *Choroby zakaźne psów*. Wydawnictwo SI-MA, Warszawa, 1999, s. 7-36.
2. Winiarczyk S., Grądzki Z., Wołoszyn S., Pejsak Z., Żmudzinski J.F., Gundlach J., Radzikowski A., Osek J. W: *Choroby zakaźne zwierząt z elementami zoonoz*. Lublin 2000.
3. 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.
4. Drane D. P., Hamilton R. C., Cox J. C.: Evaluation of a novel diagnostic test for canine parvovirus. *Vet. Microbiol.* 1994, **41**, 293-302.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Griffiths A. J. F., Miller J. H., Lewontin R. C., Suzuki D. T., Gelbart W. M.: *An Introduction to Genetic Analysis*. W. H. Freeman and Company, New York 2000, s. 2130-2144.
9. Studzińska A., Tyburski J., Daca P., Tretyn A.: PCR w czasie rzeczywistym. Istota metody i strategii monitorowania przebiegu reakcji. *Biotechnologia* 2008, **1**, 71-85.
10. Senda M., Parrish C. M., Harasava R., Gamoh K., Muramatsu M., Hirayama N., Itoh O.: Detection by PCR of wild-type canine parvovirus which contaminates dog vaccines. *J. Clin. Microbiol.* 1995, **33**, 110-113.
11. Stadejek T.: Postęp w rozwoju techniki cyklicznej polimerizacji DNA in vitro – Real-Time PCR. *Medycyna Wet.* 2006, **62**, 390-394.
12. Valasek M.A., Repa J.J.: The power of real-time PCR. *Adv. Physiol. Educ.* 2005, **29**, 151-159.
13. Pereira F., Carneiro J., Amorim A.: Identification of Species with DNA-Based Technology: Current Progress and Challenges. Recent Patents on DNA & Gene Sequences. 2008, **2**, 187-200.
14. Słomski R.W.: *Przykłady analizy DNA*. Wydawnictwo Akademii Rolniczej w Poznaniu, Poznań, 2002, s.13-18.
15. Mackay I.M., Arden K.E., Nitsche A.: Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* 2002, **30**, 1292-1305.
16. Espy M. J., Uhl J. R., Sloan L. M., Buckwalter S. P., Jones M. F., Vetter E.A., Yao J.D., Wengenack N.L., Rosenblatt J.E., Cockerill F.R. 3rd, Smith T.F.: Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006, **19**, 595-610.
17. Wiedro K., Stachowska E., Chlubek D.: Łańcuchowa reakcja polimerazy z analizą w czasie rzeczywistym (RT-PCR). *Roczniki Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie*. 2007, **53**, 5-9.
18. Orłowska A., Smreczak M., Trębas P., Żmudzinski J. F.: Zastosowanie Real time PCR z uwzględnieniem przydatności w diagnostyce wścieklizny. *Medycyna Wet.* 2008, **64**, 1280-1282.
19. Mackay I.M.: Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004, **10**, 190-212.
20. Dziubek Z., Janeczko J., Juszczyk J., Kajfasz P., Liberski P.P., Magdżik W., Olszńska-Krowicka M., Pawłowski Z., Ślusarczyk J., Wierzbicka M.: *Choroby zakaźne i pasożytnicze*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2003, s. 51-60.