

Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 48, No 2 (1997)



Polymerase chain reaction (PCR). Description of the method and its application in the detection of viruses

M. PAPANASTASSOPOULOU (Μ. ΠΑΠΑΝΑΣΤΑΣΟΠΟΥΛΟΥ)

doi: [10.12681/jhvms.15795](https://doi.org/10.12681/jhvms.15795)

Copyright © 2018, M PAPANASTASSOPOULOU



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

To cite this article:

PAPANASTASSOPOULOU (Μ. ΠΑΠΑΝΑΣΤΑΣΟΠΟΥΛΟΥ) M. (2018). Polymerase chain reaction (PCR). Description of the method and its application in the detection of viruses. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 48(2), 61–69. <https://doi.org/10.12681/jhvms.15795>

Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης Περιγραφή της μεθόδου και εφαρμογής της στην ανίχνευση ιών

Μ. Παπαναστασοπούλου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR) περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1985. Από τότε έχει δημοσιευτεί πληθώρα εργασιών, που αφορούν τις εφαρμογές της μεθόδου στη μελέτη των ιογενών λοιμωδών νοσημάτων. Στην ανασκόπηση αυτή γίνεται σύντομη περιγραφή της μεθόδου και αναφέρονται οι διάφορες παραλλαγές της και τα προβλήματα που μπορεί να προκύψουν κατά την εκτέλεσή της. Επιπλέον, παρουσιάζεται, ως εφαρμογή της μεθόδου στην εργαστηριακή διάγνωση των ιογενών λοιμωδών νοσημάτων, η ανίχνευση διάφορων ιών σε παθολογικά υλικά.

ABSTRACT. Papanastassopoulou M. Polymerase chain reaction (PCR). Description of the method and its application in the detection of viruses. *Bulletin of the Hellenic Veterinary Medical Society* 48(2):61-69. Since the first publication of the polymerase chain reaction (PCR) in 1985, there has been a large number of reports on its applications in the study of viral infections. This review outlines the PCR methodology and its variations, as well as the problems that may be encountered during its performance. Its application in the detection of various viruses in clinical samples is also presented.

Λέξεις ευρετηρίασης: Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR), μέθοδος, εφαρμογή, ιογενή νοσήματα, ανίχνευση ιών.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Αναμφίβολα η ανακάλυψη και η εφαρμογή της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης υπήρξε μια από τις μεγαλύτερες επιτυχίες της μοριακής βιολογίας. Η

μέθοδος είναι διεθνώς γνωστή ως PCR από τα αρχικά των λέξεων Polymerase Chain Reaction. Η PCR περιγράφηκε και εφαρμόστηκε για πρώτη φορά το 1985 από τους Saiki και συν.¹ και βελτιώθηκε αργότερα από τους Mullis and Faloona². Από τις βασικές τεχνικές της μοριακής βιολογίας που αναπτύχθηκαν την τελευταία δεκαετία, καμία δε χρησιμοποιήθηκε τόσο πολύ, για διαγνωστικούς και μη σκοπούς, όσο η PCR. Με την τεχνική αυτή αντιγράφεται *in vitro*, κατά εκατομμύρια φορές, ένα τμήμα γονιδιακού δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος (DNA) οποιασδήποτε προέλευσης. Πρόκειται δηλαδή για μια ενζυμική μέθοδο σύνθεσης γονιδιακού DNA. Η μέθοδος βρίσκει ευρεία εφαρμογή στη βιολογία, στην ιατρική, στη γενετική, στην ιολογία και σε άλλες επιστήμες.

Σκοπός της ανασκόπησης αυτής είναι η συνοπτική περιγραφή της μεθοδολογίας της PCR, των παραλλαγών της και των προβλημάτων που μπορεί να εμφανιστούν κατά την εκτέλεσή της. Παράλληλα γίνεται αναφορά στην εφαρμογή της μεθόδου στην εργαστηριακή διάγνωση ιών σε παθολογικά υλικά.

Για την ευκολότερη κατανόηση του τρόπου αντιγραφής του DNA με τη μέθοδο PCR θεωρείται σκόπιμο να δοθούν μερικά στοιχεία που αφορούν τη μοριακή δομή του DNA και τον τρόπο αντιγραφής του *in vivo*³.

Τα νουκλεϊκά οξέα (DNA, RNA) είναι μακρομόρια, που αποτελούνται από χιλιάδες απλούστερες δομικές μονάδες, τα νουκλεοτίδια. Κάθε νουκλεοτίδιο αποτελείται από μια αζωτούχο βάση, ένα μόριο μονοσακχαρίτη και ένα μόριο φωσφορικού οξέος. Οι αζωτούχες βάσεις (ή απλώς βάσεις) είναι οι: αδερίνη (Α), γουανίνη (Γ), κυτοσίνη (C), θυμίνη (Τ) και ουρακίλη (U).

Τα νουκλεοτίδια συνδέονται μεταξύ τους με 3',5' - φωσφοδιεστερικούς δεσμούς και σχηματίζουν μια πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα. Το μόριο του DNA, συγκεκριμένα, είναι δίκλωνο, δηλαδή αποτελείται από δύο πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες (κλώνους), που ενώνονται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου. Οι δεσμοί υδρογόνου σχηματίζονται ανάμεσα στις βάσεις της μιας αλυσί-

Εργαστήριο Μικροβιολογίας & Λοιμωδών Νοσημάτων,
Τμήμα Κτηνιατρικής του Α.Π.Θ.

Laboratory of Microbiology and Infectious Diseases,
Faculty of Veterinary Medicine,
Aristotle University of Thessaloniki

Ημερομηνία υποβολής: 24.12.96
Ημερομηνία εγκρίσεως: 11.4.97

δας με τις αντίστοιχες βάσεις της άλλης αλυσίδας. Έτσι δημιουργούνται ζεύγη βάσεων. Ειδικότερα, η Α ενώνεται πάντα με την Τ, ενώ η Γ με τη Σ. Γι' αυτό λέγεται ότι η Α και η Τ είναι συμπληρωματικές βάσεις. Το ίδιο ισχύει και για τις Γ και Σ.

Σε καθεμιά αλυσίδα υπάρχουν δύο ελεύθερα άκρα, ένα 3'-υδροξυλικό (3'-OH ή 3') και ένα 5'-φωσφορικό (5'-P ή 5'), τα οποία έχουν μεγάλη σημασία για τον καθορισμό της κατεύθυνσης αντιγραφής του DNA *in vivo*. Το 3'-OH άκρο έχει ελεύθερη υδροξυλική ομάδα, ενώ το 5'-P έχει ελεύθερη φωσφορική ομάδα. Οι δύο πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες δεν είναι όμοιες μεταξύ τους, αλλά συμπληρωματικές και αντιπαράλληλες. Το "αντιπαράλληλες" έχει την έννοια, ότι οι 3',5'-φωσφοδιεστερικοί δεσμοί έχουν αντίθετη κατεύθυνση στους δύο κλώνους. Έτσι, η μια αλυσίδα ονομάζεται 5'→3' και η άλλη 3'→5'.

Η αντιγραφή του DNA *in vivo* γίνεται με κατεύθυνση 5'→3'. Για την αντιγραφή απαιτούνται: α) μονόκλωνη πολυνουκλεοτιδική αλυσίδα, που θα χρησιμεύει ως πρότυπο (μήτρα) για την αντιγραφή, β) ολιγονουκλεοτιδική αλυσίδα με ελεύθερο 3'-OH άκρο, που θα χρησιμεύει ως αφετηρία (primer) για να ξεκινήσει η διαδικασία της αντιγραφής, γ) το ένζυμο DNA πολυμεράση εξαρτημένη από DNA, το οποίο καταλύει την αντίδραση και δ) 5'-τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια όλων των αζωτούχων βάσεων.

ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ^{1,2,4-6}

I. Αρχή της μεθόδου

Στην ιολογία η PCR χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του γενώματος των ιών και όχι ολόκληρου του ιικού σωματιδίου ή των αντιγόνων του, όπως γίνεται με τις κλασικές μεθόδους. Για την ανίχνευση των DNA ιών, ένα τμήμα του ιικού γενώματος (DNA-πρότυπο ή DNA-μήτρα) με γνωστή αλληλουχία βάσεων αντιγράφεται με τη βοήθεια του ενζύμου DNA πολυμεράση, κάτω από κατάλληλες συνθήκες κατά αρκετά εκατομμύρια φορές. Έτσι, η ποσότητα του DNA-προτύπου πολλαπλασιάζεται εκθετικά μέσα σε λίγες ώρες. Για παράδειγμα, από μια αρχική ποσότητα DNA-προτύπου 10^6 μg, μήκους 2 χιλιοβάσεων (kilobase, kb), μπορεί να συντεθεί ποσότητα αντιγράφων νουκλεϊκού οξέος 0,5-1 μg μέσα σε 3 ώρες. Συνήθίζεται, λοιπόν, να λέγεται ότι "η PCR βρῖσκει βελόνα στα άχυρα και στη συνέχεια συνθέτει μια στοίβα από απειράριθμες βελόνες"⁷. Η μεγάλη ποσότητα των αντιγράφων DNA, δηλαδή του προϊόντος της PCR όπως αυτά ονομάζονται, μπορεί στη συνέχεια να ταυτοποιηθεί ή να υποστεί παραπέρα ανάλυση (π.χ. χαρτογράφηση γενώματος με ένζυμα περιορισμού (enzyme restriction analysis), εξακρίβωση της αλληλουχίας βάσεων (sequencing) κ.λπ.). Το τμήμα του ιικού γενώματος

που αντιγράφεται μπορεί να έχει μήκος 100-10.000 βάσεις. Με κατάλληλη τροποποίηση, η οποία περιγράφεται στο κεφάλαιο "Παραλλαγές της PCR", είναι δυνατή και η αντιγραφή του γενώματος των RNA ιών.

II. Παθολογικό υλικό

Ως πηγή ιικού DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοδήποτε βιολογικό υλικό. Συνήθως χρησιμοποιούνται διάφορα όργανα, ιστοί, πλήρες αίμα ή λευκοκύτταρα αίματος και εκχυλίσματα ενοφθαλμισμένων με παθολογικό υλικό κυττάρων κυτταροκαλλιιεργειών. Αρχικά το παθολογικό υλικό υφίσταται ειδική κατεργασία, ώστε το DNA (ιού και κυττάρου) να είναι απαλλαγμένο από πρωτεΐνες και ενδογενείς νουκλεάσες. Ωστόσο, αρκετοί ερευνητές χρησιμοποιούν παθολογικό υλικό, το οποίο δεν υποβάλλεται στην παραπάνω ειδική κατεργασία, αλλά μόνο σε θέρμανση, ώστε να καταστραφεί η κυτταρική μεμβράνη και να απελευθερωθεί το DNA⁸⁻¹⁰. Κατά την εφαρμογή της κλασικής PCR, ο αριθμός των μορίων του DNA-πρωτύπου στο παθολογικό υλικό πρέπει να κυμαίνεται από 10^2 - 10^5 . Συγκέντρωση μορίων μεγαλύτερη του 10^5 οδηγεί σε σύνθεση μη ειδικών προϊόντων, λόγω υψηλής συγκέντρωσης κυτταρικών ρακών, ενώ συγκέντρωση μικρότερη του 10^2 οδηγεί στη μη ικανοποιητική απόδοση προϊόντος, το οποίο δεν είναι δυνατό να ανιχνευτεί με τις μεθόδους που αναφέρονται στο κεφάλαιο "Ανίχνευση και ταυτοποίηση του προϊόντος της PCR". Όμως, η ευαισθησία της μεθόδου μπορεί να αυξηθεί αν αυξηθεί ο αριθμός των κύκλων αντιγραφής ή αν χρησιμοποιηθεί η διπλή PCR, η οποία αναφέρεται στο κεφάλαιο "Παραλλαγές της PCR". Η διπλή PCR επιτρέπει θεωρητικά την ανίχνευση ενός μορίου DNA-πρωτύπου σε 10^6 κύτταρα.

III Αντιδραστήρια

Τα αντιδραστήρια που απαιτούνται για την *in vitro* αντιγραφή του DNA με τη μέθοδο PCR είναι ίδια με αυτά που περιγράφηκαν στην *in vivo* αντιγραφή.

α) Αφετηρίες (primers). Ως αφετηρίες χρησιμοποιούνται δύο μικρά μόρια (ζεύγος) ολιγονουκλεοτιδίων, που παρασκευάζονται τεχνητά με διάφορες μεθόδους. Καθεμιά έχει αλληλουχία βάσεων συμπληρωματική προς εκείνη που βρίσκεται στο 3'-OH άκρο των 2 αντιπαράλληλων αλυσίδων του DNA-πρωτύπου. Καθορίζουν τα άκρα του τμήματος που θα αντιγραφεί και αντιπροσωπεύουν τις περιοχές από τις οποίες θα ξεκινήσει η διαδικασία σύνθεσης αντιγράφων DNA. Η παρουσία τους είναι απαραίτητη, γιατί το ένζυμο DNA πολυμεράση δεν είναι ικανό να συνθέσει *de novo* νέα αλυσίδα DNA. Οι αφετηρίες έχουν μήκος συνήθως 20-30 βάσεις και ελεύθερο 3'-OH άκρο. Επιπλέον, η θερμοκρασία μετουσίωσης ή τήξης (melting temperature, T_m) της μίας αφετηρίας πρέπει να είναι παραπλήσια με την T_m

της δεύτερης και να κυμαίνεται μεταξύ 55° C και 80° C. Η Tm της κάθε αφετηρίας εξαρτάται από την ποσοστιαία σύστασή της σε ζεύγη βάσεων κυρίως GC, αλλά και AT και βρίσκεται με διάφορους μαθηματικούς τύπους.

β) DNA πολυμεράση. Το ένζυμο DNA πολυμεράση δρα ως καταλύτης κατά τη διαδικασία αντιγραφής του DNA *in vivo* και *in vitro*. Για να δράσει, απαιτεί την παρουσία μονόκλωνου DNA-προτύπου, καθώς και την παρουσία 5'-τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων. Καταλύει την προσθήκη μονονουκλεοτιδίων στο 3' άκρο των αφετηριών στην κατεύθυνση 5'→3' και κατ' αυτόν τον τρόπο οι αφετηρίες επιμηκύνονται. Έτσι συνθέτονται δύο νέες αλυσίδες DNA, συμπληρωματικές προς τις πρότυπες. Τα τελευταία χρόνια, ως ένζυμο χρησιμοποιείται η θερμοανθεκτική Taq- DNA πολυμεράση (Taq πολυμεράση), που απομονώνεται από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* (Taq).

γ) Τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs). Τα τέσσερα 5'-τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dATP, dCTP, dGTP και dTTP) είναι ουσιώδη δομικά στοιχεία για τη σύνθεση των νέων αλυσίδων. Προμηθεύουν τα μονονουκλεοτίδια που είναι απαραίτητα για την επιμήκυνση των αφετηριών.

δ) Ρυθμιστικό διάλυμα της αντίδρασης. Το ρυθμιστικό διάλυμα περιέχει τα εξής συστατικά: Tris-HCl (pH 8,3 στους 20° C), MgCl₂, KCl, Tween 20 και ζελατίνη ή βόεια αλβουμίνη. Τα συστατικά αυτά υποβοηθούν τη διαδικασία αντιγραφής. Για παράδειγμα, το KCl διευκολύνει την ένωση των αφετηριών στο DNA-πρότυπο και ενισχύει τη δραστηριότητα της πολυμεράσης, ενώ τα ελεύθερα ιόντα Mg⁺⁺, το απορρυπαντικό (Tween 20) και οι πρωτεΐνες είναι απαραίτητα για τη λειτουργία και τη σταθερότητα του ενζύμου.

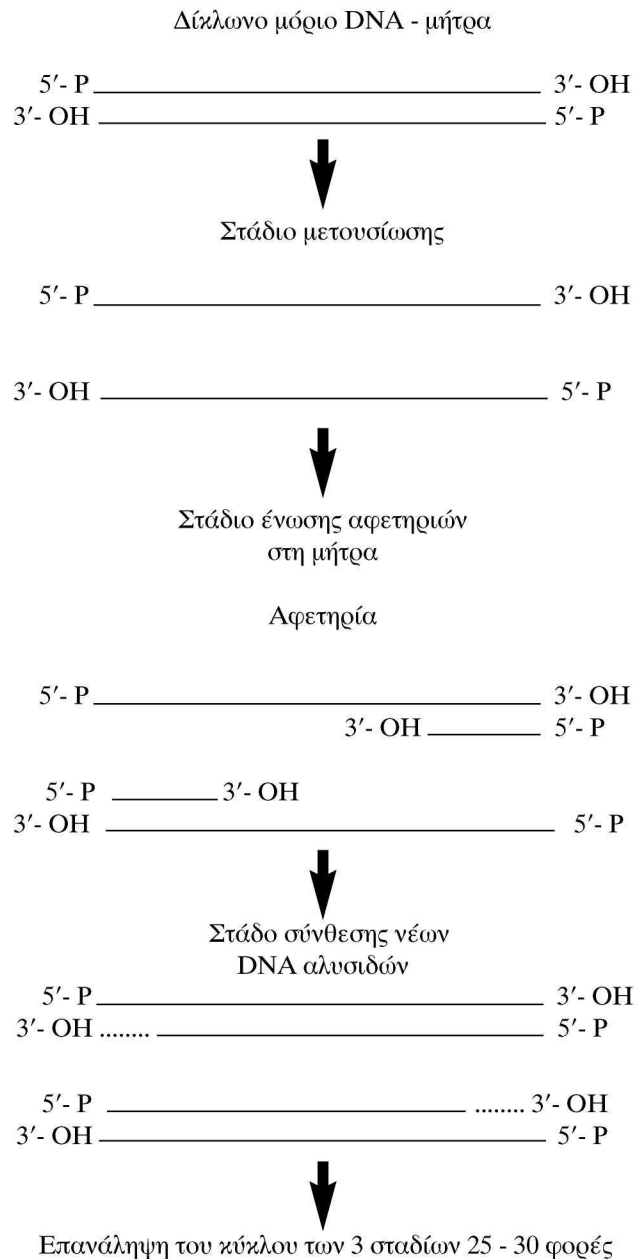
Όλα τα παραπάνω αντιδραστήρια χρησιμοποιούνται σε συγκεκριμένη συγκέντρωση σε κάθε νέα εφαρμογή της μεθόδου.

IV. Στάδια αντιγραφής

Η μέθοδος περιλαμβάνει συνεχώς επαναλαμβανόμενους κύκλους διαδοχικής αύξησης και μείωσης της θερμοκρασίας του μίγματος παθολογικού υλικού και αντιδραστηρίων, που περιγράφηκαν παραπάνω. Κάθε κύκλος ολοκληρώνεται σε τρία στάδια (εικόνα 1). Το παθολογικό υλικό και τα αντιδραστήρια τοποθετούνται σε ειδικό μικροσωληνάριο των 0,2 ml ή 0,5 ml και αναμιγνύονται. Το μίγμα καλύπτεται με λίγες σταγόνες παραφινελαίου, ώστε να αποφεύγεται η εξάτμιση, και το μικροσωληνάριο τοποθετείται σε ειδική συσκευή, το θερμοκυκλοποιητή. Η συσκευή αυτή ρυθμίζει αυτόματα την κατάλληλη για κάθε στάδιο αντιγραφής θερμοκρασία, σύμφωνα με προεπιλεγμένο πρόγραμμα.

Στη συνέχεια περιγράφονται τα 3 στάδια αντιγρα-

Εικόνα 1. Στάδια αντιγραφής ενός τμήματος ιικού DNA με τη μέθοδο PCR



φής μιας τυπικής αντίδρασης και δίνεται ενδεικτικά για κάθε στάδιο η θερμοκρασία και ο χρόνος παραμονής του μίγματος σε αυτή. Φυσικά δεν είναι δυνατό να ακολουθηθεί πάντοτε με επιτυχία η ίδια για κάθε περίπτωση μεθοδολογία. Έτσι, σε κάθε νέα εφαρμογή της μεθόδου πιθανώς να απαιτείται προσδιορισμός της άριστης συγκέντρωσης των παραπάνω αντιδραστηρίων ή κατάλληλη τροποποίηση των θερμοκρασιών σε σχέση με διάφορους παράγοντες που την επηρεάζουν, αλλά και σε σχέση με τον τύπο του θερμοκυκλο-

ποιητή που χρησιμοποιείται.

α) Στάδιο μετουσίωσης του δίκλωνου DNA-προτύπου (Denaturation). Το μίγμα θερμαίνεται στους 95° C για 20 δευτερόλεπτα, ώστε να σπάσουν οι δεσμοί υδρογόνου, που συνδέουν τις 2 πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες του δίκλωνου DNA. Έτσι, προκύπτουν δύο μονόκλωνες αλυσίδες, που θα χρησιμεύσουν ως μήτρα για τη σύνθεση νέων συμπληρωματικών αλυσίδων. Η θερμοκρασία που χρησιμοποιείται στο στάδιο αυτό μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ 90 και 95° C.

β) Στάδιο ένωσης των αφετηριών στη μήτρα (Primer annealing). Η θερμοκρασία του μίγματος μειώνεται στους 55° C για 30 δευτερόλεπτα. Έτσι επιτυγχάνεται η ειδική ένωση των αφετηριών με τις συμπληρωματικές προς αυτές μονόκλωνες DNA αλυσίδες-μήτρα, που προέκυψε στο πρώτο στάδιο. Οι αφετηρίες εντοπίζουν το προς αντιγραφή τμήμα του ιικού DNA και προσανατολίζονται κατά τέτοιο τρόπο, ώστε το 5' άκρο της καθεμιάς να ενώνεται με το 3' άκρο της συμπληρωματικής αλυσίδας-μήτρα. Η θερμοκρασία που χρησιμοποιείται στο στάδιο αυτό μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ 40 και 60° C. Η άριστη θερμοκρασία εξαρτάται από το μήκος των αφετηριών, από τη συγκέντρωσή τους στο μίγμα και από την Tm τους και επιλέγεται να είναι 5° C έως 10° C μικρότερη της Tm.

γ) Στάδιο σύνθεσης αντιγράφων DNA (Primer extension). Η θερμοκρασία αυξάνεται πάλι στους 72° C για 1 λεπτό και η Taq πολυμεράση, χρησιμοποιώντας ως μήτρα τις μονόκλωνες αρχικές DNA αλυσίδες, επιμηκύνει τις αφετηρίες. Κατ' αυτόν τον τρόπο συνθέτονται δύο καινούργιες DNA αλυσίδες, με αποτέλεσμα το διπλασιασμό των δύο αρχικών. Η διαδικασία αντιγραφής εξελίσσεται, όπως προαναφέρθηκε, στην κατεύθυνση 5'→3', δηλαδή εντός των ορίων του τμήματος του ιικού γενώματος, το οποίο καθορίζουν οι δύο αφετηρίες που αποτελούν και τα άκρα του. Η θερμοκρασία που χρησιμοποιείται στο στάδιο αυτό μπορεί να κυμαίνεται μεταξύ 70 και 75° C.

Τα 3 παραπάνω στάδια αντιπροσωπεύουν ένα κύκλο PRC, ο οποίος ολοκληρώνεται σε 2-3 λεπτά περίπου, αν και αυτό εξαρτάται από το πόσο γρήγορα ο θερμοκυκλοποιητής επιτυγχάνει τις αυξομειώσεις της θερμοκρασίας στα προαναφερθέντα 3 στάδια αντιγραφής. Μετά το τέλος του 1ου κύκλου η θερμοκρασία αυξάνεται και πάλι στους 95° C και ξεκινά ο 2ος κύκλος αντιγραφής. Συνήθως εκτελούνται 25-30 κύκλοι PCR. Ωστόσο, ο συνολικός αριθμός των κύκλων αντιγραφής εξαρτάται από τη συγκέντρωση των μορίων του DNA προτύπου στο παθολογικό υλικό. Έτσι όταν η συγκέντρωση είναι π.χ. 3×10^5 τότε απαιτούνται 25-30 κύκλοι, ενώ όταν αυτή είναι 10^3 ή μικρότερη απαιτούνται 40-50 κύκλοι PCR. Σε κάθε κύκλο αντιγραφής, ως μήτρες χρησιμοποιούνται τόσο οι αρχικές όσο και οι καινούργιες DNA

αλυσίδες που συνθέτουν στους αμέσως προηγούμενους κύκλους. Επομένως, μετά το τέλος κάθε κύκλου η προϋπάρχουσα ποσότητα του DNA-προτύπου διπλασιάζεται. Εάν, λοιπόν, ο αριθμός των κύκλων είναι n, τότε η ποσότητα του DNA που αντιγράφεται αυξάνεται σε 2^n . Όταν η απόδοση του συστήματος είναι 100% η ποσότητα του προτύπου, μετά από 25-30 κύκλους, θα αυξηθεί κατά 33,6 εκατομμύρια έως 1 δισεκατομμύριο φορές περίπου, αντίστοιχα, μέσα σε 3 ώρες. Στην πραγματικότητα όμως, λόγω της προοδευτικής μείωσης της δραστηριότητας του ενζύμου και λόγω διάφορων άλλων παραγόντων, η απόδοση του συστήματος είναι πάντοτε μικρότερη. Έτσι, για παράδειγμα, όταν η απόδοση είναι 80%, που θεωρείται ως μια σχετικά καλή απόδοση, τότε η ποσότητα του προτύπου, μετά από 30 κύκλους, αυξάνεται κατά 45,5 εκατομμύρια φορές.

Σε αρκετούς ιούς το DNA είναι μονόκλωνο. Στην περίπτωση αυτή, στον πρώτο κύκλο παραλείπεται το στάδιο της μετουσίωσης και η αντιγραφή ξεκινά από το 2ο στάδιο, όπου ενώνεται η μία μόνο αφετηρία με το πρότυπο. Έτσι παράγεται ένα δίκλωνο DNA που αποτελείται από την αρχική και την καινούργια αλυσίδα. Ο 2ος κύκλος και οι επόμενοι περιλαμβάνουν και τα 3 στάδια αντιγραφής.

IV. Ανίχνευση και ταυτοποίηση του προϊόντος της PCR

Για να γίνει ορατό το προϊόν της αντίδρασης και να επιβεβαιωθεί η ειδικότητά του, δηλαδή να διαπιστωθεί αν περιέχονται σε αυτό οι αναμενόμενες αλληλουχίες βάσεων του DNA-προτύπου, χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι, όπως:

α) Ηλεκτροφόρηση του προϊόντος σε πηκτή αгарόζης και στη συνέχεια χρώση του με τη φθορίζουσα χρωστική βρωμιούχο 3,8-διαμνο-5-αιθυλ-6-φαινυλφαινανθριδίνιο (ethidium bromide). Με τον τρόπο αυτό προσδιορίζεται το μέγεθος του προϊόντος, το οποίο πρέπει να είναι ίδιο με εκείνο του DNA-προτύπου.

β) Ανίχνευση του προϊόντος με χρωματομετρική μέθοδο, π.χ., μέθοδος DIANA (Detect Immobilized Amplified Nucleic Acid)¹¹, μέθοδος CODAF (Colorimetric Detection of Amplicons on Filter)¹², μέθοδος τύπου ELISA^{13,14} κ.λπ.

γ) Μοριακός υβριδισμός.

δ) Μέθοδος εξακρίβωσης της αλληλουχίας βάσεων (sequencing).

ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ ΤΗΣ PCR^{2,4-6,14,41,42}

Παραλλαγές της PCR αποτελούν η RNA-ή RT-PCR (reverse transcription-PCR), η διπλή PCR (nested PCR ή double PCR with nested primers), η αντίστροφη (inverse) PCR, η in situ PCR και η ανταγωνιστική PCR (competitive PCR, cPCR).

1. RNA-ή RT-PCR. Στην περίπτωση των RNA ιών, μετά την αρχική κατεργασία του παθολογικού υλικού, το ικό γένωμα πρέπει να μεταγραφεί σε συμπληρωματικό DNA (complementary DNA, cDNA) για να ακολουθήσει η εφαρμογή της PCR. Το cDNA είναι μια μονόκλωνη αλυσίδα DNA, η οποία έχει αλληλουχία βάσεων συμπληρωματική προς εκείνη του τμήματος του RNA που θα αντιγραφεί. Η μεταγραφή του RNA-προτύπου σε cDNA είναι απαραίτητη, γιατί η DNA πολυμεράση δεν μπορεί να συνθέσει DNA χρησιμοποιώντας ως μήτρα το RNA. Για τη σύνθεση της πρώτης αλυσίδας cDNA από το ικό RNA-πρότυπο χρησιμοποιείται ένα ένζυμο που ονομάζεται *ανάστροφη αντιγραφάση* και η διαδικασία είναι γνωστή ως *ανάστροφη μεταγραφή*. Στη συνέχεια η δεύτερη αλυσίδα cRNA συνθέτεται με τη βοήθεια της Taq πολυμεράσης. Τα στάδια και τα αντιδραστήρια της RNA-PCR, μετά την ανάστροφη μεταγραφή, είναι ίδια με αυτά που έχουν ήδη περιγραφεί.

2. Διπλή PCR. Η διπλή PCR αναπτύχθηκε από τους Mullis και Faloona² και έχει μεγαλύτερη ευαισθησία και ειδικότητα από την PCR των Saiki και συν¹, που περιγράφηκε παραπάνω. Με τη μέθοδο αυτή μια μικρή ποσότητα του προϊόντος, που συντέθηκε με κλασική PCR (1η PCR), υποβάλλεται σε μια 2η PCR. Στη δεύτερη PCR χρησιμοποιούνται δυο νέες αφετηρίες, διαφορετικές από εκείνες της πρώτης. Οι αφετηρίες αυτές ονομάζονται εσωτερικές αφετηρίες και οριοθετούν μια περιοχή του ικού γενώματος, η οποία είναι τμήμα της αρχικής περιοχής-προτύπου που αντιγράφηκε με την κλασική PCR. Η μέθοδος πραγματοποιείται κάτω από τις ίδιες συνθήκες που αναφέρθηκαν στην κλασική PCR. Εφαρμόζοντας διπλή PCR, η ποσότητα του αρχικού νουκλεϊκού οξέος-προτύπου αυξάνεται κατά τουλάχιστον 10^{11} - 10^{12} φορές.

3. Αντίστροφη PCR. Η αντίστροφη PCR χρησιμοποιείται για την αντιγραφή ενός τμήματος του ικού γενώματος του οποίου η αλληλουχία βάσεων είναι άγνωστη, αλλά τα όρια του καθορίζονται από ένα τμήμα με γνωστές αλληλουχίες. Στην περίπτωση αυτή η αντιγραφή ακολουθεί αντίθετη πορεία από εκείνη που ακολουθεί κατά την κλασική μέθοδο, δηλαδή εκτός των ορίων της γνωστής περιοχής του γενώματος, την οποία οριοθετούν οι αφετηρίες και γι' αυτό η μέθοδος ονομάζεται *αντίστροφη PCR*.

4. In situ PCR. Η in situ PCR συνδυάζει την ανίχνευση του ικού γενώματος με τον ταυτόχρονο εντοπισμό της θέσης (πυρήνας ή κυτταρόπλασμα) που πολλαπλασιάζεται ο ιός μέσα στο μολυσμένο κύτταρο. Η τεχνική είναι ίδια με την κλασική PCR, με τις εξής διαφορές: α) η όλη διαδικασία εκτελείται πάνω σε καλυπτρίδα, στην οποία είναι μονιμοποιημένο το παθολογικό υλικό και β) το ένα από τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια είναι επισημασμένο με ένα μόριο αναφο-

ράς, ραδιοϊσότοπο ή ένζυμο. Το μόριο αυτό ενσωματώνεται στο προϊόν της PCR και στη συνέχεια ανιχνεύεται με αυτοραδιογραφία ή ανοσοενζυμική μέθοδο, αντίστοιχα. Έτσι, κατά την ανίχνευση του ραδιενεργού ή μη μορίου αναφοράς εντοπίζεται και η θέση που πολλαπλασιάζεται ο ιός¹⁴.

5. Ανταγωνιστική PCR Η ανταγωνιστική PCR χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της ποσότητας του νουκλεϊκού οξέος-προτύπου σε παθολογικά υλικά. Η μέθοδος περιλαμβάνει την ταυτόχρονη αντιγραφή του νουκλεϊκού οξέος-προτύπου (στόχος) και ενός νουκλεϊκού οξέος-μάρτυρα (ανταγωνιστικό νουκλεϊκό οξύ), του οποίου η συγκέντρωση είναι γνωστή. Το νουκλεϊκό οξύ-μάρτυρας είναι το ίδιο με το πρότυπο, διαφέρει ωστόσο κατά τι από αυτό, π.χ. στο μέγεθος, έτσι ώστε, μετά την αντιγραφή, να είναι εφικτή η διαφοροποίησή του από το πρότυπο.

Κατά την εκτέλεση της μεθόδου σταθερή ποσότητα προτύπου αντιγράφεται σε μια σειρά αντιδράσεων PCR, μαζί με προκαθορισμένες αραιώσεις του μάρτυρα. Δηλαδή, τόσο το πρότυπο, σε σταθερή ποσότητα, όσο και η καθεμιά από τις αραιώσεις του μάρτυρα συνυπάρχουν στο αντίστοιχο μίγμα αντίδρασης και ανταγωνίζονται για το ίδιο ζεύγος αφετηριών και τα άλλα συστατικά του μίγματος (εξ ου και το όνομα *ανταγωνιστική PCR*). Έτσι, η οποιαδήποτε μεταβολή στις παραμέτρους που επηρεάζουν την αντίδραση, θα επηρεάσει κατά τον ίδιο τρόπο την απόδοση σε προϊόν και των δύο νουκλεϊκών οξέων και, επομένως, αυτά αντιγράφονται με την ίδια αναλογία. Μετά το τέλος της αντιγραφής, τα προϊόντα της PCR ταυτοποιούνται με διάφορες μεθόδους και σε κάθε αντίδραση προσδιορίζεται η αναλογία της απόδοσης σε προϊόν του μάρτυρα προς εκείνη του προτύπου, με τη μέθοδο της ανάλυσης οπτικής πυκνότητας. Επειδή η ποσότητα του μάρτυρα, που προστίθεται σε κάθε μίγμα, είναι γνωστή, η αρχική συγκέντρωση του προτύπου μπορεί εύκολα να υπολογιστεί, αφού η αναλογία μεταξύ των δύο προϊόντων αντανακλά την αναλογία στις συγκεντρώσεις μεταξύ του μάρτυρα και του προτύπου^{4,6,41,42}.

ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΤΗΣ PCR

Η "αχίλλειος πτέρνα" της μεθόδου είναι η μεγάλη ευαισθησία της, με συνέπεια την πιθανή λήψη ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Αιτία των αποτελεσμάτων αυτών είναι η τυχαία μεταφορά απειροελάχιστης ποσότητας εξωγενούς νουκλεϊκού οξέος από ένα δείγμα σε άλλο με τα εργαλεία, τον αέρα ή τα αντιδραστήρια. Το εξωγενές νουκλεϊκό οξύ μπορεί να προέρχεται ακόμη και από το δέρμα των χεριών του εκτελεστή της μεθόδου. Το νουκλεϊκό αυτό οξύ μπορεί να χρησιμεύει ως μήτρα κατά την αντιγραφή, αντί του επιθυμητού προτύπου. Ο κίνδυνος τέτοιας "μόλυνσης" είναι ακόμη μεγα-

λύτερος σε περίπτωση που εφαρμόζεται διπλή PCR. Για την αποφυγή της "μόλυνσης" των δειγμάτων λαμβάνοντας διάφορα μέτρα, τα οποία αναφέρονται από τους Wright και Wynford-Thomas¹⁵.

Περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με τη βασική μεθοδολογία της PCR, τις παραλλαγές της και τις παραμέτρους που επηρεάζουν την ειδικότητα της και την απόδοσή της σε προϊόν αναφέρονται σε διάφορα εγχειρίδια, στα οποία μπορεί κανείς ακόμη να βρει βασικές εφαρμογές της μεθόδου στη γενετική, στην ιατρική, στην ιατροδικαστική και σε διάφορα άλλα πεδία έρευνας⁴⁻⁶.

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ PCR ΣΤΗΝ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΩΝ ΙΟΓΕΝΩΝ ΛΟΙΜΩΔΩΝ ΝΟΣΗΜΑΤΩΝ

Ανίχνευση ιών σε παθολογικά υλικά

Είναι γνωστό, ότι οι εργαστηριακές εξετάσεις (απομόνωση και ταυτοποίηση ιού, ανίχνευση ικών αντιγόνων, ανίχνευση ιικού γενώματος με μοριακό υβριδισμό και ανίχνευση ειδικών αντισωμάτων) που χρησιμοποιούνται για την επιβεβαίωση της κλινικής διάγνωσης ενός ιογενούς λοιμώδους νοσήματος παρουσιάζουν προβλήματα, λόγω διάφορων αιτιών (π.χ. παραμονή του ιού σε λανθάνουσα κατάσταση, ύπαρξη μη κυτταροπαθογόνων στελεχών, νεογέννητα ζώα με αντισώματα λόγω φυσικής παθητικής ανοσίας κ.λπ.). η χρήση της PCR μπορεί να δώσει λύση σε όλα σχεδόν τα προβλήματα αυτά, έστω και αν περιορίζονται στη μεγάλη διάρκεια χρόνου που απαιτείται για τη λήψη αποτελεσμάτων. Οι πρώτες εργασίες για την εφαρμογή της PCR στην ανίχνευση ιών, οι οποίοι παρουσιάζουν ή όχι προβλήματα στη διάγνωση, εμφανίστηκαν στα τέλη της δεκαετίας του '80^{16,17} και μέχρι σήμερα έχουν δημοσιευτεί χιλιάδες σχετικά άρθρα. Είναι φανερό, ότι στην εργασία αυτή είναι αδύνατο να γίνει αναφορά σε όλα τα άρθρα, γι' αυτό δίνονται, ως παραδείγματα, βιβλιογραφικές αναφορές που επιλέχθηκαν από την προσιτή σε εμάς βιβλιογραφία της τελευταίας πενταετίας. Αυτό σημαίνει ότι υπάρχουν και άλλα είδη ιών, εκτός αυτών που παρουσιάζονται, που έχουν διαγνωστεί πριν από το 1992 και δεν αναφέρονται εδώ.

Οι ιοί που ανιχνεύονται με PCR αναφέρονται στη συνέχεια κατά είδος ζώου που προσβάλλουν.

Βοοειδή. DNA-προϊός της ενζωτικής λεύκωσης των βοοειδών^{18,19}, ιός της ανοσολογικής ανεπάρκειας των βοοειδών^{19,20}, ιός του αφθώδους πυρετού^{14,21,22}, ιός της ιογενούς διάρροιας των βοοειδών^{23,14,25}, ερπητοϊός 2 του προβάτου (αίτιο του κακοήθους καταρροϊκού πυρετού των βοοειδών)^{26,27}, ιός της λοιμώδους ρινотραχειτίδας /φλυκταίνωδους αιδοιοκολπίτιδας των βοοειδών^{28,29}.

Μικρά μηρυκαστικά. Ιός της αρθρίτιδας - εγκεφαλίτιδας των αιγών³⁰, ιός της προϊούσας πνευμονίας (Maedi

- Visna) του προβάτου³¹, ιός της πανώλους των μικρών μηρυκαστικών³². Σε υγιή πρόβατα και αίγες έχει, επίσης, ανιχνευτεί ο ερπητοϊός 2 του προβάτου, ο οποίος θεωρείται ως αίτιο του κακοήθους καταρροϊκού πυρετού των βοοειδών^{26,27}.

Χοίροι. Ιός του αναπνευστικού και αναπαραγωγικού συνδρόμου του χοίρου¹⁰, ιός της γρίπης του χοίρου³³, κοροναϊός της επιδημικής διάρροιας του χοίρου³⁴.

Ιπποειδή. Ερπητοϊός 1 και ερπητοϊός 4 των ιπποειδών³⁵, ιός θηλωμάτων των βοοειδών (γενότυπος 1 και γενότυπος 2) που προκαλεί σαρκοειδές στα ιπποειδή³⁶, ιός της πανώλους των ιπποειδών³⁷.

Σκύλοι. Παρβοϊός 2 του σκύλου^{38,39}.

Γάτες. DNA-προϊός της ανοσολογικής ανεπάρκειας της γάτας^{40,41}, ιός της ανοσολογικής ανεπάρκειας της γάτας^{42,43}, ερπητοϊός 1 της γάτας⁴⁴, κοροναϊός της γάτας^{45,46}.

Πτηνά. Ιός της λοιμώδους λαρυγγοτραχειίτιδας⁴⁷, ιός της λοιμώδους θυλακίτιδας⁴⁸.

Άλλα είδη ζώων. Ιός της ηπατίτιδας Β του αρκτόμους (*Marmota monax*)⁴⁹, ιός της ευλογιάς της καμήλας⁵⁰.

Σε αρκετές από τις παραπάνω περιπτώσεις ο υπεύθυνος ιός ανιχνεύτηκε με την PCR σε πολύ μικρότερο χρονικό διάστημα, μετά τη λοίμωξη, απ' ό,τι με μεθόδους απομόνωσης, ανίχνευσης αντιγόνων ή με μοριακό υβριδισμό^{24,25,26}. Επιπλέον, όσον αφορά τους ιούς του γένους *Lentivirus* της οικογένειας των ρετροϊών, οι ερευνητές ήταν σε θέση να προσδιορίσουν τον αριθμό των μονοπύρηνων κυττάρων του περιφερικού αίματος, που είχαν προσβληθεί από ρετροϊό ή DNA-προϊό, με τιτλοποίηση *in vitro*^{20,40,43}. Ακόμη, στην περίπτωση του ιού της ανοσολογικής ανεπάρκειας της γάτας οι ερευνητές, χρησιμοποιώντας ανταγωνιστική PCR, προσδιόρισαν ακριβώς την ποσότητα των σωματιδίων του DNA-προϊού που υπήρχε στα μονοπύρηνια κύτταρα του περιφερικού αίματος προσβεβλημένων ζώων⁴¹, αλλά και την ποσότητα του ελεύθερου RNA ρετροϊού που υπήρχε στο πλάσμα του αίματος⁴². Ο προσδιορισμός της ποσότητας του ελεύθερου RNA ρετροϊού στο πλάσμα του αίματος έχει μεγάλη σημασία για την πρόβλεψη της εξέλιξης της αντίστοιχης νόσου και την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας των αντιικών φαρμάκων και εμβολίων. Τέλος, οι ερευνητές εντόπισαν ζώα φορείς, τα οποία είχαν θεωρηθεί ως μη μολυσμένα, λόγω απουσίας ειδικών αντισωμάτων^{18,21,25,45}.

Ένα ακόμη πλεονέκτημα της PCR είναι η δυνατότητα αναδρομικής εξέτασης μονιμοποιημένων και εγκλεισμένων σε παραφίνη ιστών, ώστε να προσδιοριστεί μετά από πολλά χρόνια το αίτιο μιας λοίμωξης. Οι αναδρομικές μελέτες ανίχνευσης ιών σε συντηρημένους ιστούς αφορούν τον παρβοϊό 2 του σκύλου¹³, τους κοροναϊούς της γάτας⁴⁵, τον ιό της ιογενούς διάρροιας των

βοοειδών^{51,52}, τον ιό θηλωμάτων των βοοειδών που προκαλεί σαρκοειδή στα ιπποειδή⁵³, τους ερπητοϊούς 1 και 4 του ίππου⁵⁴ και τον ιό του καταρροϊκού πυρετού του προβάτου⁵⁵. Υπάρχει, όμως ένας περιορισμός ως προς την παλαιότητα του δείγματος, ώστε να είναι δυνατή η ανίχνευση του νουκλεϊκού οξέος του ιού που προκάλεσε κατά το παρελθόν τη λοίμωξη. Σε όλες τις παραπάνω μελέτες οι ερευνητές συμφωνούν, ότι διάφοροι παράγοντες, που έχουν σχέση με τη διαδικασία μονιμοποίησης και το διάστημα συντήρησης του εγκλεισμένου σε παραφίνη ιστού, πιθανόν να προκαλέσουν διάσπαση του ιικού γενώματος, με αποτέλεσμα να ληφθούν ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Ο κίνδυνος λήψης ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων είναι πολύ μεγάλος εάν το τμήμα του ιικού γενώματος, που θα αντιγραφεί, έχει μήκος μεγαλύτερο των 900 βάσεων. Γι' αυτό, σε περίπτωση αναδρομικής μελέτης χρησιμοποιείται η διπλή PCR, η οποία, όπως προαναφέρθηκε, εμφανίζει μεγάλη ευαισθησία. Και πάλι όμως το δείγμα δεν μπορεί να είναι παλαιότερο των 10 ετών.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης είναι μια αποτελεσματική μέθοδος, η οποία βρísκει όλο και περισσότερες εφαρμογές. Η βοήθεια την οποία μπορεί να προσφέρει σε περιπτώσεις που η εργαστηριακή διάγνωση είναι πολύ δύσκολη ή που απαιτούνται περίπλοκες διαδικασίες (π.χ. συγκαλλιέργεια κλπ.) είναι μεγάλη. Προς το παρόν, βέβαια, δε φαίνεται ότι πρόκειται να αντικαταστήσει πλήρως τις κλασσικές μεθόδους διάγνωσης, οι οποίες σε πολλές περιπτώσεις δίνουν άριστα αποτελέσματα, γιατί ακόμη το κόστος της είναι αρκετά υψηλότερο από εκείνο των κλασσικών μεθόδων. Επιπλέον, δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη διάγνωση όλων των γνωστών ιογενών νοσημάτων, αφού δεν είναι γνωστή η δομή και η οργάνωση του γενώματος όλων των ιών, πράγμα που θα καθιστούσε δυνατή την παραγωγή των κατάλληλων αφετηριών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Saiki RF, Scharf S, Faloona FA, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985, 230: 1350 - 1354.
2. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987, 155: 335-350
3. Τριανταφυλλίδης Κ. Κλασική και Μοριακή Γενετική. Θεσσαλονίκη, 1992
4. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning, a Laboratory manual 2nd Ed. Cold Spring Harbor laboratory Press, 1989, Book 1: 7.39 - 7.79, Book 2: 9.31 - 9.58 και 14.5 - 14.30
5. Erlich HA (ed) PCR Technology, Principles and Applications for DNA Amplification. Stockton Press, New York, 1989.
6. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds). PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications. Academic Press, New York, 1990.
7. DeMarchi JM. The polymerase chain reaction. *Clin Microbiol Newsletter* 1990, 12:81-87
8. Ballagi-Pordany A, Klingeborn B, Flensburg L, Belak S. Equine herpesvirus type 1: Detection of viral DNA sequences in aborted fetuses with the polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* 1990, 22:373-381.
9. Ballagi -Pordany A, klintevall K, Mezza M, Klingeborn B, Belak S. Direct detection of bovine leukemia virus infection: Practical applicability of a double polymerase chain reaction. *J Vet Med (B)* 1992, 39:69-77.
10. Suarez P, Zardoya R, Prieto C, Solana A, Tabares E, Bautista JM, Castro JM. Direct detection of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus by reverse polymerase chain reaction (RT-PCR). *Arch Virol* 1994, 135:89-99.
11. Wahlber J, Lundeberg J, Hultman T, Uhlen M. General colorimetric method for DNA diagnostics allowing direct solid-phase genomic sequencing of positives samples. *Proc Nat Acad Sc USA* 1990, 87:6569-6573.
12. Belak S, Ballagi-Pordany A. Application of the polymerase chain reaction (PCR) in veterinary diagnostic virology. *Vet Res Comm* 1993, 17:55-72.
13. Truyen U, Platzer G, Parrish CR, Haenichen T, Hermanns W, Kaaden OR. Detection of canine parvovirus DNA in paraffin-embedded tissues by polymerase chain reaction. *J Vet Med (B)* 1994, 41:148-152.
14. Prato Murphy ML, Rodriguez M, Schudel AA, Meyer RF. Localization of foot and mouth disease virus RNA in tissue culture infected cells via in situ polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1995, 54:173-178.
15. Whight PA, Wynford-Thomas D. The polymerase chain reaction: Miracle or mirage? A critical review of its uses and limitations in diagnosis and research. *J Pathol* 1990, 162:99-117.
16. Belak S, Ballagi-Pordany A, Flensburg J, Virtanen A. Detection of pseudorabies virus DNA sequences by the polymerase chain reaction. *Arch Virol* 1989b, 108:279-286.
17. Gould AR, Hyatt AD, Eaton BT, White JR, Hooper PT, Blacksell SD, LeBlanc SPM. Current techniques in rapid bluetongue diagnosis. *Aus Vet J* 1989, 66:450-454.
18. Eaves FW, Molloy JB, Dimmock CK, Eaves LE. A field evaluation of the polymerase chain reaction procedure for the detection of bovine leukaemia virus proviral DNA in cattle. *Vet Microbiol* 1994, 39:313-321.
19. Hidalgo G, Bonilla JA. Lymphoproliferation assays in cattle naturally infected with bovine leukaemia virus (BLV) and bovine immunodeficiency-like virus (BIV). *J Vet Med (B)* 1996, 43:325-332.
20. Nadin-Davis SA, Chang SC, Smith H, Jacobs RM. Detecton of bovine immunodeficiency-like virus by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1993, 42:323-326.

21. House C, Meyer RF. The detection of foot-and-mouth disease virus in oesophageal-pharyngeal samples by a polymerase chain reaction technique. *J Virol Methods* 1993, 43:1-6.
22. Marquardt O, Straub OC, Ahl R, Haas B. Detection of foot-and-mouth disease virus in nasal swabs of symptomatic cattle by RT-PCR within 24 hours. *J Virol Methods* 1995, 53:255-261.
23. Schmitt BJ, Lopez OJ, Ridpath JF, Galeota-Wheeler J, Osorio FA. Evaluation of PCR for diagnosis of bovine viral diarrhoea virus in tissue homogenates. *J Vet Diagn Invest* 1994, 6:44-47.
24. Horner GW, Tham KM, Orr D, Ralston J, Rowe S, Houghton T. Comparison of an antigen capture enzyme-linked assay with reverse transcription-polymerase chain reaction and cell culture immunoperoxidase tests for the diagnosis of ruminant pestivirus infections. *Vet Microbiol* 1995, 43:75-84.
25. Radwan GS, Brock KV, Hogan JS, Smith KL. Development of a PCR amplification assay as a screening test using bulk milk samples for identifying dairy herds infected with bovine viral diarrhoea virus. *Vet Microbiol* 1995, 44:77-92.
26. Baxter SIF, Pow I, Bridgen A, Reid HW. PCR detection of the sheep-associated agent of malignant catarrhal fever. *Arch Virol* 1993, 132:145-159.
27. Wiyono A, Baxter SIF, Saepulloh M, Damayanti R, Daniels P, Reid HW. PCR detection of ovine herpesvirus-2 DNA in Indonesian ruminants - normal sheep and clinical cases of malignant catarrhal fever. *Vet Microbiol* 1994, 42:45-52.
28. Vilcek S. Detection of the bovine herpesvirus-1 (BHV-1) genome by PCR. *J Virol Methods* 1993, 41:245-248.
29. Santurde G, Da Silva N, Villares R, Tabares E, Solana A, Bautista JM, Castro JM. Rapid and high sensitivity test for direct detection of bovine herpesvirus-1 genome in clinical samples. *Vet Microbiol* 1996, 49:81-92.
30. Barlough J, East N, Dean Rowe J, Van Hoosear K, DeRock E, Bigornia L, Rimstad E. Double-nested polymerase chain reaction for detection of caprine arthritis-encephalitis virus proviral DNA in blood, milk and tissues of infected goats. *J Virol Methods* 1994, 50:101-114.
31. Brodie SJ, Pearson LD, Snowden GD, DeMartine JC. Host-virus interaction as defined by amplification of viral DNA and serology in lentivirus-infected sheep. *Arch Virol* 1992, 130:413-428.
32. Nanda YP, Chatterjee A, Purohit AK, Diallo A, Innui K, Sharma RN, Libeau G, Thevasagayam JA, Broening A, Kitching RP, Anderson J, Barrett T, Taylor WP. The isolation of peste des petits ruminants virus from Northern India. *Vet Microbiol* 1996, 51:207-216.
33. Schorr E, Wentworth D, Hinshaw VS. Use of polymerase chain reaction to detect swine influenza virus in nasal swab specimens. *Am J Vet Res* 1994, 55 (7):952-956.
34. Tobler K, Ackermann M. Identifikation und Charakterisierung von neuen und unbekannten Coronaviren mit Hilfe von RT-PCR und degenerierten Primern. *Schweiz Arch Tierheilk* 1996, 138:80-86.
35. Wagner Wn, Bogdan J, Haines D, Townsend HG, Misra V. Detection of equine herpesvirus and differentiation of equine herpesvirus type 1 from type 4 by polymerase chain reaction. *Can J Microbiol* 1992, 38 (11):1193-1169.
36. Otten N, Von Tscherner C, Lazary S, Antczak DF, Gerber H. DNA of bovine papillomavirus type 1 and 2 in equine sarcoids: PCR detection and direct sequencing. *Arch Virol* 1993, 132:121-131.
37. Zientara S, Sailleau C, Moulay S, Wade-Evans A, Cruciere C. Application of the polymerase chain reaction to the detection of African horse sickness viruses. *J Virol Methods* 1995, 53:47-54.
38. Hirasawa T, Kaneshige T, Mikazuki K. Sensitive detection of canine parvovirus DNA by the nested polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* 1994, 41:135-145.
39. Uwatoko D, Sunairi M, Nakajima M, Yamaura K. Rapid method utilizing the polymerase chain reaction for detection of canine parvovirus in feces of diarrheic dogs. *Vet Microbiol* 1995, 43:315-323.
40. Lawson M, Meers J, Blechynden L, Robinson W, Greene W, Carnegie P. The detection and quantitation of feline immunodeficiency provirus in peripheral blood mononuclear cells using the polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* 1993, 38:11-21.
41. Allenspach K, Amacker M, Leutenegger CM, Hottiger M, Hofmann-Leibmann R, Hubscher U, Pistello M, Lutz H. Die Quantifizierung von proviraler FIV-DNA mittels kompetitiver PCR. *Schweiz Arch Tierheilk* 1996, 138:87-92.
42. Vahlenkamp TW, Egberink HE, Van Eijk MJT, Slotboom-Kamphorst AME, Verschoor EJ, Hornizek MC, De Ronde A. Competitive reverse transcription-polymerase chain reaction for quantitation of feline immunodeficiency virus. *J Virol Methods* 1995, 52:335-346.
43. Tomonaga K, Mikami T. Detection of feline immunodeficiency virus transcripts by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* 1996, 48:337-344.
44. Hara M, Fukuyama M, Suzuki Y, Kisikawa S, Ikeda T, Kiuchi A, Tabuchi K. Detection of feline herpesvirus 1 DNA by the nested polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* 1996, 48:345-352.
45. Li X, Scott FW. Detection of feline coronaviruses in cell cultures and in fresh and fixed feline tissues using polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* 1994, 42:65-77.
46. Fehr D, Bolla S, Herrewegh AAPM, Hornizek MC, Lutz H. Nachweis feline Coronaviren mittels RT-PCR: Grundlage zum Studium der Pathogenese der felineen infektiösen Peritonitis (FIP). *Schweiz Arch Tierheilk* 1996, 138:74-79.
47. Scholz E, Porter RE, Guo P. Differential diagnosis of infectious laryngotracheitis from other respiratory diseases by simplified PCR procedure. *J Virol Methods* 1994, 50:313-322.
48. Lee LH, Yu SL, Shieh HK. Detection of infectious bursal disease virus infection using the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1992, 40:243-254.
49. Pardoe IU, Michalak TI. Detection of hepatitis B and woodchuck hepatitis viral DNA in plasma and mononuclear cells from heparinized blood by the polymerase

- chain reaction. *J Virol Methods* 1995, 51:277-288.
50. Pfeffer M, Meyer H, Wernery U, Kaaden OR. Comparison of camelpox viruses isolated in Dubai. *vet Microbiol* 1996, 49:135-146.
51. Gruber AD, Greiser-Wilke IM, Haas L, Hewicker-Trautwein M, Moenning V. Detection of bovine viral diarrhoea virus RNA in formalin-fixed, paraffin-embedded brain tissue by nested polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1993, 43:309-320.
52. Gruber AD, Moenning V, Hewicker-Trautwein M, Trautwein G. Effect of formalin fixation and long-term storage on the detectability of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) RNA in archival brain tissue using polymerase chain reaction. *J Vet Med (B)* 1994, 41:654-661.
53. Block N, Breen M, Spradbrow PB. Genomic sequences of bovine papillomaviruses in formalin-fixed sarcoids from Australian horses revealed by polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* 1994, 41:163-172.
54. O'Keefe JS, Julian A, Moriarty K, Murray A, Wilks CR. A comparison of the polymerase chain reaction with standard laboratory methods for the detection of EHV-1 and EHV 4 in archival tissue samples. *N Z Vet J* 1994, 42:93-96.
55. Parsonson IM, McColl KA. Retrospective diagnosis of bluetongue virus in stored frozen and fixed tissue samples using PCR. *Vet Microbiol* 1995, 46:134-149.