



## Metody miareczkowania wektorów AAV

Andrzej Rutkowski, Agnieszka Jaźwa, Slavyana Popowa,  
Alicja Józkowicz, Józef Dulak

Zakład Biotechnologii Medycznej, Wydział Biochemii, Biofizyki i Bio-  
technologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

### Methods for the titration of AAV vectors

#### Summary

Adeno-associated viral (AAV) vectors are promising tools for gene therapy. However, for trustworthy comparison of the results produced from different clinical trials, the exact amount of the used infectious vector particles must be known. We have produced AAV using a commercially available system and compared three common methods for the quantification of the number of produced vectors: ELISA, dot-blot and quantitative PCR (qPCR). Although ELISA is a very reproducible and precise method, it is able only to determine the number of viral capsids in the vector preparation, also those which contain no genetic material and are therefore useless. With this method we established that we are able to produce  $\sim 6.5 \times 10^{11}$  viral capsids/mL. Dot-blot assay determines the number of genomic particles in the vector preparation in a quite precise manner, but it is a very labor- and time-consuming method. qPCR is also a method determining the number of genomic particles. It is, however, much faster and simpler than the dot-blot assay. Both dot-blot and qPCR gave similar results ( $\sim 4 \times 10^{11}$  viral genomes/mL), which indicated only about 2/3 of the produced vectors containing genetic material. Our results show that qPCR is the most convenient and reliable method for quantification of AAV vectors and we believe it could be routinely used to titer the vectors prior to their usage in clinical trials.

#### Key words:

AAV vectors, reporter genes, gene therapy.

#### Adres do korespondencji

Józef Dulak,  
Zakład Biotechnologii  
Medycznej,  
Wydział Biochemii,  
Biofizyki i Biotechnologii,  
Uniwersytet Jagielloński,  
ul. Gronostajowa 7,  
31-271 Kraków;  
e-mail:  
jdulak@mol.uj.edu.pl

### 1. Wstęp

Wektory oparte na wirusach towarzyszących adenowirusom (AAV, ang. *adeno-associated virus*) są obiecującym narzędziem terapii genowej. Są niepatogenne, słabo immunogenne, nie powo-

dują transformacji nowotworowej, a ekspresja transgenu wprowadzonego do komórek może się utrzymywać przez długi czas (1). Różne poznane dotychczas serotypy są w stanie efektywnie infekować różne rodzaje komórek, zarówno aktywnie dzielących się jak i nie dzielących się. Wektory AAV już dziś stosowane są w próbach klinicznych w celu leczenia mukowiscydozy, hemofilii, a w toku są nie opublikowane jeszcze badania kliniczne pierwszej fazy chorób takich jak choroba Canavan, choroba Parkinsona czy dystrofia mięśniowa (2).

Bardzo istotnym etapem, wieńczącym produkcję wektorów AAV przed ich zastosowaniem w klinice, jest poznanie liczby cząstek wirusa, które podaje się pacjentom. Dzięki temu możliwe jest też porównywanie wyników badań prowadzonych przez różne grupy. Do mianowania wektorów AAV można stosować kilka metod, z których każda ma swoje zalety i wady. Jedną z najpopularniejszych jest metoda immunologiczna ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*). Do oznaczania miana AAV została po raz pierwszy użyta przez Grimma i wsp. (3). W teście tym wykorzystuje się przeciwciało A20, rozpoznające kompletny kapsyd wirusa (4). Często stosowana jest też metoda *dot-blot* oparta na hybrydyzacji Southerna (5), a zatem służąca do oznaczania liczby kopii genomów. Tę samą informację niosą wyniki ilościowej polimerazowej reakcji łańcuchowej (qPCR). Jest ona zbliżona do standardowej techniki PCR, ale wykorzystuje barwnik fluorescencyjny interkalujący do podwójnych nici DNA, dzięki czemu, mierząc fluorescencję w próbkach, można ilościowo obserwować przyrost produktu (6).

## 2. Materiały i metody

### 2.1. Produkcja wektorów AAV

Wektory AAV produkowane były z użyciem komercyjnie dostępnego zestawu AAV Helper-Free System (Stratagene). Komórki AAV293 (Clontech) hodowano w medium DMEM *low glucose* (PAA), z 10% płodową surowicą bydlęcą (PAA), penicyliną (100 U/mL) i streptomycyną (10 µg/mL). Komórki transfekowano na trzech szalkach o średnicy 15 cm przy konfluencji ok. 75%. 51 µg każdego z plazmidów: pAAV-RC (zawierający geny *rep* oraz *cap* wirusa AAV), pAAV-lacZ (z reporterowym genem β-galaktozydazy pomiędzy sekwencjami ITR) oraz pHelper (niosący niezbędne geny adenowirusa) mieszano z 450 µl 2 M CaCl<sub>2</sub> i uzupełniano wodą do 3 mL. Wytrząsając mieszaninę na wortexie, dodawano do niej kroplami 3 mL 2X HBS (BD Biosciences). 20 minut później na każdą z szalek nakraplano po 2 mL mieszaniny i pozostawiano w inkubatorze. Po 6 h zmieniano medium na świeże i pozostawiano na 60 h. Komórki zdrapywano z szalek, zbierano do 50 mL próbki i wirowano przez 5 min przy 160 × g. Osad komórek zawieszano w 3 mL medium bez dodatków i poddawano czterem cyklom zamrażania w parach ciekłego azotu i rozmrażania w łaźni wodnej 37°C, krótko wytrząsając po każdym rozmrożeniu. Powstałą

zawiesinę poddano serii wirowań (5 min,  $15\,000 \times g$ ), przenosząc nadsącz po każdym wirowaniu do nowej probówki. Do preparatu wirusowego dodawano DNazy oraz RNazy do końcowego stężenia  $0,1\text{ mg/mL}$  i inkubowano przez 30 min w  $37^\circ\text{C}$ . W naszych późniejszych doświadczeniach stosowana była odmienna procedura (zob. (7)).

## 2.2. Test ELISA

Miano wirusów oznaczano testem ELISA (PROGEN Biotechnik) zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. Do oznaczenia używano preparatu wirusowego rozcieńczonego 100- oraz 1000-krotnie.

## 2.3. Metoda *dot-blot*

Do wyznaczenia krzywej standardowej wykorzystano plazmid pAAV-lacZ (o długości 7270 par zasad) w dziesięciokrotnych rozcieńczeniach z zakresu od  $100\text{ ng}/\mu\text{L}$  do  $0,1\text{ ng}/\mu\text{L}$  (odpowiadających od  $2,5 \times 10^{10}$  do  $2,5 \times 10^7$  kopii plazmidu). Próbki oraz DNA blokujące (DNA z nasienia śledzia, Promega) denaturowano w  $100^\circ\text{C}$  (5 min) po czym schładzano na lodzie, krótko wstrząsano i wirowano.  $2\ \mu\text{L}$  każdej próbki (standardy oraz DNA wyizolowany z wirusów), nanoszono na membranę Hybond-N+ (Amersham Biosciences), a po jej wyschnięciu wystawiano na działanie 700 jednostek UV przez 42 sekundy. Membranę inkubowano w wodzie traktowanej DEPC przez 10 minut, po czym przenoszono do  $1,5\text{ mL}$  buforu prehybrydacyjnego (Superarray; z dodatkiem  $100\ \mu\text{g/mL}$  DNA nasienia śledzia) i inkubowano 3 h w  $60^\circ\text{C}$ , z kołysaniem. Następnie membranę przenoszono do  $2\text{ mL}$  buforu hybrydacyjnego (Superarray; z dodatkiem  $100\ \mu\text{g/mL}$  DNA nasienia śledzia oraz  $50\ \mu\text{g}$  sondy znakowanej biotynylowaną urydyną rozpoznającej gen  $\beta$ -galaktozydazy) i pozostawiano na 16 h w  $60^\circ\text{C}$ , z kołysaniem. Następnie membranę przepłukiwano kolejno: dwa razy w  $5\text{ mL}$  buforu  $1\%$  SDS,  $2 \times$  słony cytrynian sodu (SSC), 15 min, temperatura pokojowa (RT); dwa razy w  $5\text{ mL}$  buforu  $0,5\%$  SDS,  $0,1 \times$  SSC, 15 min, RT; w  $5\text{ mL}$  buforu płuczącego, 5 min,  $37^\circ\text{C}$ ; w  $4\text{ mL}$  buforu blokującego, 5 min,  $37^\circ\text{C}$ ; w  $4\text{ mL}$  buforu płuczącego, 5 min,  $30^\circ\text{C}$ ; w  $8\text{ mL}$   $1 \times$  buforu blokującego z alkaliczną fosfatazą-streptawidyną (1:2000), 30 min,  $27^\circ\text{C}$ ; cztery razy w  $10\text{ mL}$  buforu płuczącego, 5 min, RT; dwa razy w  $10\text{ mL}$  buforu płuczącego do alkalicznej fosfatazy, 5 min, RT. Kliszę fotograficzną wystawiano na luminescencję membrany po jej inkubacji z  $1\text{ mL}$  substratu CDP-star i wywoływano. Ilość DNA w krzywej i próbkach badanych mierzono z fotografii kliszy densytometrycznie z odjęciem tła.

## 2.4. Polimerazowa reakcja łańcuchowa w czasie rzeczywistym (qPCR)

Reakcja PCR prowadzona była w oparciu na metodzie opisanej przez Rohr i wsp. (8) przy wykorzystaniu zestawu DyNAmo™ HS (Finnzymes). Użyte startery rozpoznawały gen  $\beta$ -galaktozydazy (F: 5' AGA ATC CGA CGG GTT GTT ACT CGC 3'; R: 5' TGC GCT CAG GTC AAA TTC AGA CGG C 3') obejmując fragment długości 176 par zasad. Reakcję PCR rozpoczynano od inicjacji w 95°C przez 15 min (aktywacja polimerazy, denaturacja kapsydów AAV), po czym następowało 40 cykli: denaturacji (15 sek, 95°C), przyłączania starterów (20 sek, 58°C) i syntezy produktów (15 sek, 72°C). Produkt amplifikacji wykazywał fluorescencję pochodzącą od SYBR Green – barwnika interkalującego pomiędzy dwie nici DNA. Produkty PCR poddawano analizie pod kątem ich krzywych topnienia, co pozwalało na ocenę specyficzności amplifikacji. Liczbę kopii genu określono na podstawie krzywej standardowej sporządzonej z plazmidu pAAV-lacZ. Do analizy pobrano 1  $\mu$ l 1000-krotnie rozcieńczonego nieoczyszczonego preparatu AAV, stąd do obliczenia liczby wirusów w 1 mL próbki wyjściowej, wynik reakcji przemnożono przez  $10^6$ . Zakładając, że 1 cząstka AAV posiada 1 kopię DNA, a także, iż 1 pg DNA długości 7270 bp (długość plazmidu użytego do sporządzenia krzywej standardowej) zawiera  $2,5 \times 10^5$  kopii, policzono liczbę cząstek genomu AAV. W obliczeniach uwzględniono fakt, że plazmid użyty do przygotowania krzywej standardowej miał formę dwuniciowego DNA w przeciwieństwie do jednoniciowego DNA wektorów AAV.

## 2.5. Infekcja komórek

Komórki AAV293 hodowane na płycie 24-dołkowej infekowano przy ok. 80% konfluencji. Z nieoczyszczonych wirusów przygotowywano seryjne rozcieńczenia w medium hodowlanym do stężeń  $4 \times 10^{10}$  kapsydów/mL (na podstawie testu ELISA). Komórkom podawano po 250  $\mu$ l tych preparatów ( $1 \times 10^{10}$  kapsydów), a po dwóch godzinach dodawano 250  $\mu$ l medium hodowlanego. Po 12 h od infekcji medium wymieniano na świeże (1 mL) i inkubowano przez 72 h, po czym wykrywano w nich ekspresję  $\beta$ -galaktozydazy.

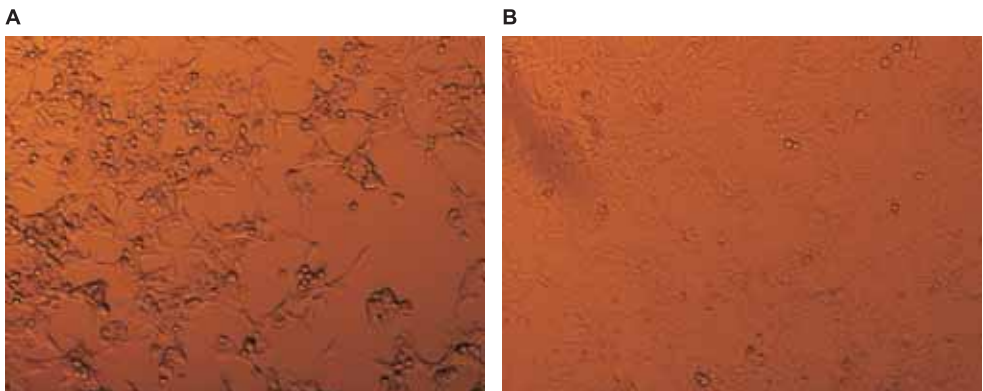
## 2.6. Oznaczanie $\beta$ -galaktozydazy *in situ*

Komórki po infekcji przepłukiwano dwukrotnie PBS (PAA), po czym utrwalano 0,25% glutaraldehydem (Applichem; 15 min, RT). Utrwalone komórki przepłukiwano 4-krotnie buforem PBS, po czym podawano roztwór substratu: 5 mM  $K_3Fe(CN)_6$ , 5 mM  $K_4Fe(CN)_6$ , 2 mM  $MgCl_2$ , 0,2% X-gal (Applichem), po 250  $\mu$ l na jedną studzienkę. Płytkę inkubowano 2 h w 37°C, po czym wszystkie dołki przemywano dwukrotnie buforem PBS.

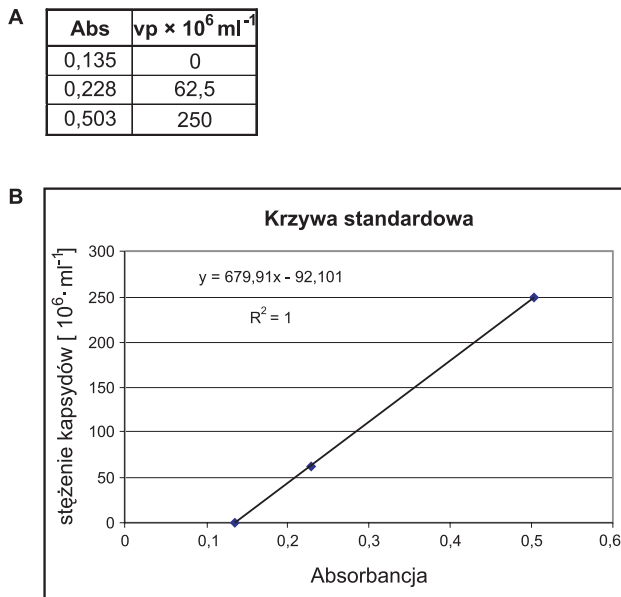
### 3. Wyniki

Komórki pakujące AAV293 po 60 h od transfekcji zaczęły się zaokrąglać i odrywać od podłoża (rys. 1A), w przeciwieństwie do komórek nietransfekowanych (rys. 1B), co wskazuje na produkcję wirusów w komórkach. Komórki zebrano i zawieszono w czystym medium, poddano lizie i pozbyto się pozostałości komórkowych przez serię wirowań. Ilość kapsydów wirusowych w nieoczyszczonym preparacie oznaczono metodą ELISA. Krzywa standardowa dopasowana do punktów eksperymentalnych wykazała współczynnik  $R^2$  równy jedności (rys. 2B). Na podstawie wyznaczonej zależności stężenia cząstek wirusowych od absorpcji obliczono stężenia wirusów w badanych próbkach. W rozcieńczeniu 100-krotnym wartość absorpcji sięgnęła wartości 2,260, co jest wynikiem niemiernym. Do obliczenia stężenia wirusów zastosowano zatem wynik z rozcieńczenia 1000-krotnego, gdzie absorpcja wynosiła 1,089. Na podstawie równania prostej dopasowanej do punktów obliczono, że stężenie kapsydów w preparacie wirusowym wynosiło  $6,5 \times 10^{11}$  kapsydów/mL.

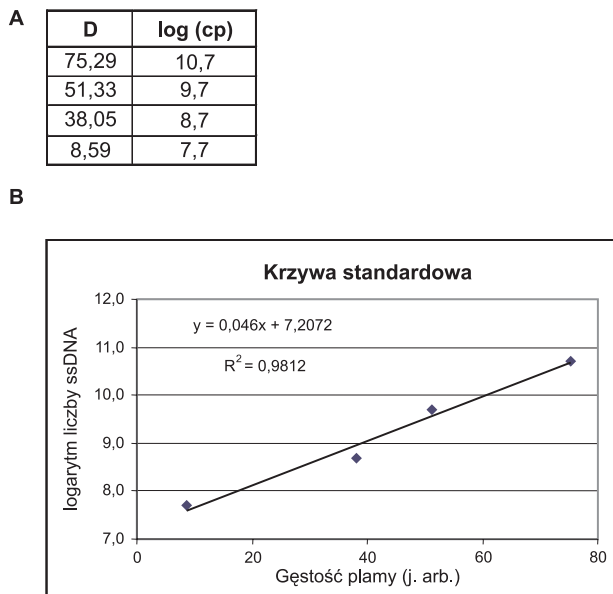
Po przeprowadzeniu procedury *dot-blot*, dokonano pomiaru densytometrycznego plam z krzywej standardowej oraz z badanych próbek. Wyniki zestawiono na wykresie przedstawiającym logarytm liczby kopii genu w badanej próbce w funkcji gęstości plamki. Do punktów dopasowano prostą dobrze korelującą z danymi eksperymentalnymi ( $R^2 = 0,98$ ; rys. 3B). Gęstość plam w preparacie wirusów nierozcieńczonym i rozcieńczonym 10-krotnie wynosiła odpowiednio 34,3 oraz 3,33 jednostki. Na podstawie równania dopasowanej prostej liczba kopii DNA wynosiła dla 2  $\mu$ l próbki nierozcieńczonej i rozcieńczonej 10-krotnie odpowiednio  $6,0 \times 10^8$  oraz  $2,3 \times 10^7$ . Proces izolacji DNA z wirusów prowadził do ok. 50% strat (danych nie przedstawiono), stąd średnie stężenie genomów w nierozcieńczonym preparacie wirusów wynosiło ok.  $(4,1 \pm 1,9) \times 10^{11}$  vg/mL.



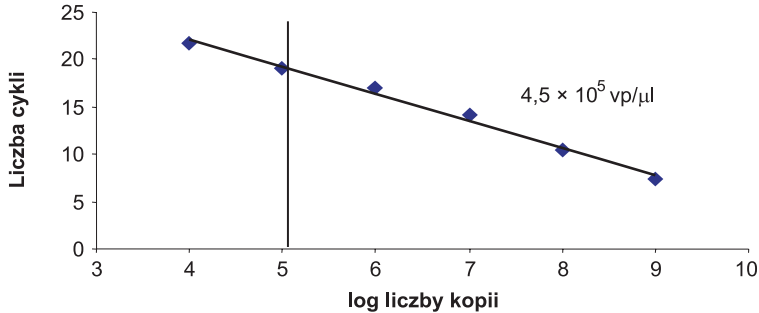
Rys. 1. Morfologia komórek AAV293. A) w 60 h po transfekcji oraz B) komórek nietransfekowanych.



Rys. 2. Krzywa standardowa testu ELISA. A) Wartości absorbancji (Abs) i odpowiadające im stężenia kapsydów (vp) × 10<sup>6</sup> mL<sup>-1</sup>. B) Wykres zależności stężenia cząstek wirusowych od absorbancji, wraz z równaniem dopasowanej prostej i współczynnikiem dopasowania R<sup>2</sup>.



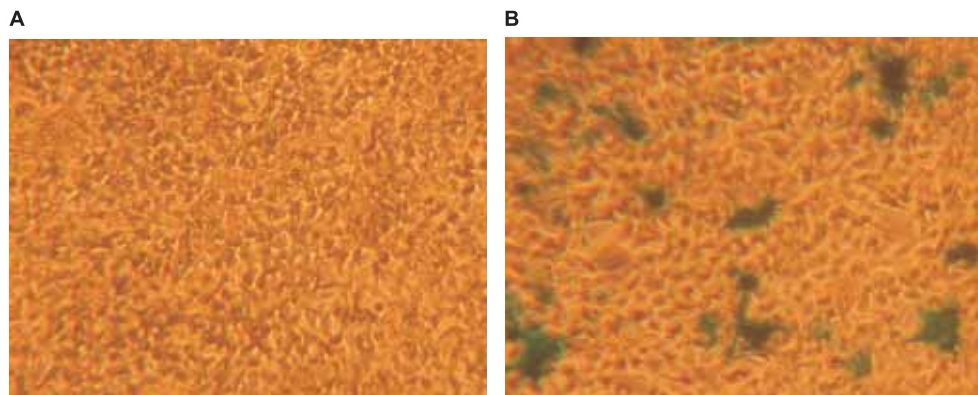
Rys. 3. Krzywa standardowa metody *dot-blot*. A) Gęstości plam (D) i odpowiadające im logarytmy liczby kopii plazmidowego DNA w formie jednociowej [log(cp)]. B) Log(cm) w funkcji gęstości plam, wraz z równaniem dopasowanej prostej oraz współczynnikiem R<sup>2</sup>.



Rys. 4. Oznaczenie miana cząstek AAV za pomocą metody *Real-time* PCR. Sześciopunktowa krzywa standardowa w zakresie od 0,01 pg do 1000 pg plazmidowego DNA (pAAV-LacZ). Na osi x przedstawiono liczbę kopii w wartościach logarytmicznych. Ilość cząstek AAV w analizowanej próbce ( $4,5 \times 10^{11}$  vp/mL) obliczono poprzez przekształcenie odszukanej na osi x wartości logarytmicznej liczby kopii do liczby kopii ( $4,5 \times 10^5$  vp/ml) oraz pomnożenie tej wartości przez rozcieńczenie i 1000 (liczba cząstek w 1 mL).

Analiza krzywej standardowej sporządzonej z plazmidu pAAV-LacZ (rys. 4) przy użyciu metody qPCR pozwoliła na precyzyjne określenie ilości cząstek AAV w analizowanym preparacie. Średni współczynnik regresji trzech zanalizowanych niezależnie krzywych standardowych wynosił 0,992. Możliwość detekcji bardzo wysokich rozcieńczeń pAAV-LacZ sięgających nawet 1 fg plazmidowego DNA świadczy o wysokiej czułości oznaczenia. Przeprowadzona analiza krzywych topnienia otrzymanych produktów PCR wykazała specyficzność reakcji qPCR (danych nie przedstawiono). Analizowaną próbkę, którą stanowił nieoczyszczony preparat AAV, rozcieńczono 1000 razy ze względu na obecność licznych białek komórkowych, które hamują reakcję PCR. Po uwzględnieniu rozcieńczenia w obliczeniach miano cząstek AAV w analizowanym preparacie wynosiło  $4,5 \times 10^{11}$  genomów wirusowych (vg)/mL.

Wirusy rozcieńczono w medium hodowlanym i podano komórkom  $10^{10}$  kapsydów (ocenione na podstawie testu ELISA). Po trzech dniach od infekcji, przeprowadzono test na ekspresję  $\beta$ -galaktozydazy. Na rysunku 5 widać, że zainfekowanych jest ok. 20% wszystkich komórek. Liczba tych komórek w pełnej konfluencji w jednej studzience płytki 24-dołkowej wynosi około  $5 \times 10^5$ , a zatem 20% pozytywnych komórek to około  $10^5$ . Oznacza to obecność  $10^5$  cząstek infekcyjnych wirusa na  $10^{10}$  kapsydów wykrytych w teście ELISA (czyli 1 cząstka infekcyjna na  $10^5$  kapsydów).



Rys. 5. Reakcja na obecność  $\beta$ -galaktozydazy. Komórki AAV-293 A) nieinfekowane wektorem AAV, B) zainfekowane wyprodukowanymi wektorami AAV z genem lacZ. W trzy dni po infekcji przeprowadzono reakcje na  $\beta$ -galaktozydazę *in situ*.

#### 4. Dyskusja

Test ELISA, opracowany pierwotnie przez Grimma i wsp. (3), wykorzystuje przeciwciała, które rozpoznaje epitop strukturalny kompletnej cząsteczki wirusa AAV, nie rozpoznaje natomiast pojedynczych białek kapsydu (4). Daje to pewność, że wynik testu nie jest zawyżony przez obecność wolnych białek kapsydu wirusa. Należy jednak pamiętać, że w ten sposób wykrywane są wszystkie cząstki wirusa, również te, które nie zawierają wewnątrz wirionu materiału genetycznego. Cząstki takie są oczywiście z punktu widzenia terapii genowej bezużyteczne. Dlatego też, choć test ELISA jest testem bardzo czułym, dokładnym i powtarzalnym, nie można traktować go jako jedyne wyznacznika stężenia wirusów w badanych próbkach.

Test *dot-blot* oraz qPCR są natomiast metodami pozwalającymi na wykrycie kopii genomów wirusa, dzięki czemu wskazują obecność tylko kapsydów zawierających materiał genetyczny. Trawienie preparatu wirusowego nukleazami zapewnia, że nie wykrywają one DNA, które nie jest zamknięte wewnątrz kapsydów wirusowych. O ile metoda *dot-blot* jest tańsza, o tyle jej dużą wadą jest pracochłonność i czasochłonność przygotowywania znakowanych sond, oraz samej procedury oznaczania stężenia. Ilościowa PCR pozwala na bardzo dokładne ilościowe oznaczenie ilości kopii genomów w badanej próbce. Wyniki obu metod wyraźnie pokazują, że w wyprodukowanym preparacie wektorów AAV, znaczna część kapsydów zawiera DNA, a zatem są to cząstki posiadające potencjał infekcyjny. Widać również, porównując wyniki z *dot-blot* oraz z qPCR z testem ELISA, że jedynie około 2/3 kapsydów zawiera DNA wirusa. Niemniej jednak istotne jest poznanie liczby cząstek *de facto* infekujących komórki.

Wyniki infekcji komórek i wykrywania aktywności  $\beta$ -galaktozydazy *in situ* wskazują na obecność funkcjonalnie prawidłowych wektorów w preparacie. Dowodzi to,



że przy produkcji wektorów nie doszło do żadnych zaburzeń wpływających na infekcyjność wirusów, a powstałe wektory są faktycznie w stanie wprowadzać obce geny do infekowanych komórek. Wyniki metody mianowania *in vitro* należy jednak traktować ostrożnie z kilku względów. Po pierwsze, nie ma gwarancji, że wszystkie cząstki zdolne do infekcji komórek faktycznie wniknęły do tych komórek. Po drugie, niemożliwe jest odróżnienie komórek zainfekowanych przez pojedynczą cząstkę wektora od zainfekowanych przez kilka wirusów. Seryjne rozcieńczenia wektorów mogą wprawdzie zbliżyć warunki do takich, w których do jednej komórki wnika tylko jeden wirus, należy jednak pamiętać, że również komórki między sobą mogą różnić się podatnością na infekcję. Po trzecie, komórki po infekcji ulegają podziałom, co uniemożliwia późniejsze stwierdzenie, czy grupa blisko leżących obok siebie komórek wykazujących ekspresję danego genu pochodzi z podziałów jednej komórki, czy kilku komórek, ani ile wirusów do tych komórek wniknęło. Po czwarte, ograniczeniem tej metody jest możliwość jej zastosowania tylko dla genów reporterowych, przy czym należy pamiętać, że stosowanie różnych wektorów reporterowych może dawać różne wyniki nawet w tych samych typach komórek (zob. (7)). W przypadku genów terapeutycznych można uciekać się wprawdzie do metod immunologicznych z przeciwciałem przeciwko terapeutycznemu białku, są to jednak metody drogie. Po piąte, warunki infekcji *in vitro* znacznie różnią się od tych *in vivo*, a *in vitro* możemy badać infekcyjność względem konkretnych komórek. Ze względu na wymienione uwagi, wyniki nie oddają bezwzględnej infekcyjności wyprodukowanych wirusów, ale infekcyjność w podanych warunkach względem danej linii komórkowej.

Najczęściej dziś stosowaną metodą mianowania wektorów AAV jest qPCR. Nie mówi on wprawdzie nic o infekcyjności wyprodukowanych wektorów, jednak jeśli produkuje się je wystandaryzowaną metodą, można zakładać, że powstałe wektory będą w równej mierze infekcyjne. Jest to ponadto metoda pozwalająca stwierdzić faktyczną liczbę kopii genu zamkniętego w cząstkach opornych na działanie DNazy, czyli zamkniętych w kapsydzie. Najlepiej zatem nadaje się ona do porównania ilości otrzymanych wirusów przez różne grupy badawcze.

Badania finansowano z projektów 2 P04 016 26, PBZ-KBN 096 P05 2004, 1998 P01 2006 31 (Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego). Andrzej Rutkowski otrzymuje stypendium Sapere Auso z Małopolskiej Fundacji Stypendialnej. Agnieszka Jaźwa jest stypendystką Funduszu im. Stanisława Estreichera. Alicja Józkowicz jest beneficjentem Wellcome Trust (International Senior Research Fellowship).

## Literatura

1. Wu Z., Asokan A., Samulski R. J., (2006), *Mol. Ther.*, 14, 316-327.
2. Grieger J. C., Samulski R. J., (2005), *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 99, 119-145.
3. Grimm D., Kern A., Pawlita M., Ferrari F., Samulski R., Kleinschmidt J., (1999), *Gene Ther.*, 6, 1322-1330.
4. Wistuba A., Kern A., Weger S., Grimm D., Kleinschmidt J. A., (1997), *J. Virol.*, 71, 1341-1352.

5. Southern E. M., (1975), *J. Mol. Biol.*, 98, 503-517.
6. Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R., (1993), *Biotechnology (N Y)*, 11, 1026-1030.
7. Jaźwa A., Rutkowski A., Gołda S., Rehhahn A., Józkwicz A., Dulak J., (2007), *Biotechnologia*, 3, 141-156.
8. Rohr U. P., Wulf M. A., Stahn S., Steidl U., Haas R., Kronenwett R., (2002), *J. Virol. Methods*, 106, 81-88.